

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**Facultad de Farmacia**

**Departamento de Microbiología**



**Estudio de la diversidad procariota en ambientes salinos empleando técnicas moleculares**

**Nahid Oueriaghli**

Granada, 2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Nahid Oueriaghi  
D.L.: GR 1820-2014  
ISBN: 978-84-9083-003-1





**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**Facultad de Farmacia**  
**Departamento de Microbiología**

Memoria presentada por la Licenciada en Biotecnología

Dra. Nahid Oueriaghli para aspirar al grado de Doctor

Granada, 2013

**Vº Bº de los directores**

**Fdo.Dra. Victoria Béjar Luque**

Catedrática de Microbiología  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Granada

**Fdo. Dr. Fernando Martínez-  
Checa Barrero**

Profesor Titular de Microbiología  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Granada

**La Doctoranda**

**Fdo. Nahid Oueriaghli**



A mis padres



# Resumen

Los microorganismos son los más abundantes en la Tierra y se encargan de mediar diversos procesos críticos para el medio ambiente. Dado su rol central en procesos ecológicos básicos del ecosistema resulta de gran importancia determinar sus patrones de distribución, su composición poblacional y los factores más relevantes que influyen en la estructura y el funcionamiento de dichas organismos.

Actualmente y gracias a la introducción de técnicas de la biología molecular, el estudio de la diversidad microbiana en ambientes naturales ha avanzado enormemente. Estas técnicas han permitido estudiar no sólo la identidad, sino también la actividad y la genómica microbiana. Por otro lado, la utilización de las nuevas técnicas de agrupamiento (FPquest) y ordenación (Canoco) incluyendo los datos de los parámetros ambientales ha permitido analizar y evaluar el impacto de diferentes factores sobre la composición y la estructura de la comunidad microbiana. La utilización en conjunto de ambas metodologías constituye una excelente estrategia para abordar una descripción de la diversidad microbiana en dos niveles de análisis complementario que permiten evidenciar tanto las características más conspicuas como los detalles de la estructura de la comunidad obteniendo, así, una descripción más acabada y fiable de dicha diversidad.

En el **Capítulo 1** de la presente Tesis Doctoral, se pretende el hallazgo de la diversidad procariota (bacterias, arqueas y *Halomonas*) en distintos hábitats salinos e hipersalinos de España y Marruecos, empleando técnicas independientes de cultivo, basados en la técnica PCR/DGGE. Durante el desarrollo de este capítulo, incluimos en nuestro trabajo el estudio de un hábitat no salino, un suelo agrícola de la provincia de Granada, que fue estudiado con fines comparativos. Los resultados obtenidos a partir de los perfiles de DGGE indicaron variaciones en la diversidad procariota según el hábitat estudiado y su salinidad, mostrando la existencia de una alta diversidad de bacterias y una diversidad media de arqueas en todos los hábitats analizados. Por otra parte, hemos hallado que los microorganismos más abundantes en el conjunto de los hábitats estudiados pertenecen a los phyla *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*. Por otro lado, hemos descubierto que los miembros del phylum *Euryarchaeota* fueron abundantes en todos los ambientes salinos estudiados, siendo el orden *Halobacteriales* el más dominante. Sin embargo, la comunidad de arqueas hallada en estos suelos agrícolas pertenecían mayoritariamente al phylum *Thaumarchaeota* y al orden *Thermoplasmatales*. Respecto a *Halomonas*, un taxón que se aísla frecuentemente en hábitats salinos y no salinos, se reveló la presencia del mismo en todos los hábitats estudiados excepto en la salina de La Malahá, mostrando asimismo la ubicuidad de dicho género y que la especie más predominante ha sido *H. ventosae*.



De forma paralela, en el **Capítulo 2**, se ha llevado a cabo el mismo estudio con más profundidad para describir la diversidad procariota y el efecto de los diferentes parámetros ambientales y temporales que tienen en la misma en Rambla Salada, un ambiente que ha sido estudiado extensamente por nuestro grupo de investigación con métodos clásicos de cultivo. Los resultados de este trabajo indicaron que Rambla Salada resultó altamente sincrónica en cuanto a la variación temporal y a la de los parámetros físico-químicos. Sin embargo, los cambios temporales de la estructura de la comunidad procariota no resultaron concordantes entre las comunidades procariotas halladas en dicho ambiente. Para la comunidad de bacterias, se observó una estrecha relación entre dicha comunidad y la salinidad y el oxígeno, siendo las épocas con concentraciones bajas de salinidad y altas de oxígeno las que presentaron la mayor diversidad. Mientras que para la comunidad de arqueas hallada en este ambiente, ocurrió lo contrario, la mayor diversidad se detectó en la época con mayor concentración de sal. En lo que relaciona la comunidad de *Halomonas*, los resultados obtenidos demostraron la ubicuidad y la versatilidad de este género, ya que ha sido detectado en todas las zonas y épocas de muestreo, y especialmente con mayor abundancia en la época caracterizada por elevadas concentraciones salinas.

El análisis de las comunidades procariotas en Rambla Salada, evidenció la predominancia del phylum *Bacteroidetes* y *Proteobacteria*. En cuanto a la comunidad de arqueas, las especies del phylum *Euryarchaeota*, del orden *Halobacteriales*, han sido las más abundantes. Por otro lado, *H. almeriensis* y *H. ventosae* constituyeron los taxa que predominan en la comunidad de *Halomonas* hallada en Rambla Salada.

Finalmente, los resultados de los experimentos realizados con la técnica CARD-FISH cuyo objetivo ha sido cuantificar la comunidad procariota estudiada, revelaron que la comunidad de bacterias representa hasta el 66% de la población total de microorganismos, mientras que las comunidades de arqueas y *Halomonas* mostraron un 16% y menos del 1% del total de la microbiota hallada en Rambla Salada respectivamente.

La biodiversidad procariota encontrada por métodos moleculares fue distinta a la determinada por Luque y col. (2013) empleando métodos tradicionales de cultivo, indicando que, en Rambla Salada existen una serie de filotipos que aún quedan para cultivar.

**Palabras claves:** Hábitats hipersalinos, Rambla Salada, Biodiversidad, PCR/DGGE, CARD-FISH, FPquest, Canoco, *Halomonas*.

## Agradecimientos

*Primero y antes que nada, dar gracias a Aláh, por ser la fortaleza de mi corazón y la luz de mi mente, por acompañarme y guiarme en cada paso que doy, y por haber puesto en mi camino a las personas que me han acompañado y ayudado durante estos años de trabajo duro.*

*Son muchas las personas que han participado en este trabajo, sobre todo los miembros del grupo de investigación "Exopolisacáridos Microbianos (BIO 188)" de la Facultad de Farmacia de la universidad de Granada, y a quienes quiero expresar mi gratitud por el apoyo y la confianza que me han prestado de forma directa o indirectamente, a la realización de esta tesis doctoral.*

*Quiero expresar mis sinceros agradecimientos a la Dra. Emilia Quesada por haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, por confiar en mí como persona para la realización de esta Tesis Doctoral, y por introducirme en el mundo de la biología molecular y del halofilismo.*

*Me complace agradecer a mis directores de tesis, la Dra. Victoria Béjar y el Dr. Fernando Martínez-Checa, por la paciencia infinita, por los enormes esfuerzos y la dedicación en la dirección y la corrección de esta tesis y por su trato familiar, y por supuesto, quisiera resaltar que, sin ellos, esta tesis nunca hubiese sido posible, por lo tanto quiero decirles en dos palabras, Muchísimas gracias.*

*Agradezco también a la Dra. Inmaculada Llamas por su disponibilidad para escucharme, apoyarme, resolver todas mis dudas, por su amistad y ayuda que no tiene precio.*

*A la Dra. Ana del Moral por sus sugerencias e ideas de las que tanto provecho he sacado, su apoyo e inestimable ayuda en todo momento.*

*Un especial agradecimiento quiero expresar al Dr. David Porcel por todos sus consejos que me ha ofrecido en lo relacionado con el uso de la Microscopía de Laser Confocal y por haber aceptado formar parte del tribunal de la presente Tesis Doctoral.*

*Me gustaría dar muchísimas gracias a Sami, por ser una parte muy importante de mi vida, por haberme apoyado en las buenas y en las malas, por aguantar mis genios en los momentos de estrés, y sobre todo por su paciencia y amor incondicional. K. B.*

*No puedo olvidar a mis compañeros del laboratorio, los que han pasado y los que continúan (Hakima, Loles, Carmen, Roció, Margarita, Melanie, Sebastián y José), y en especial a mi amigo y compañero del trabajo,*

*A Ali, con el he pasado muchas horas de trabajo, y a quien le quiero decir gracias por los buenos y los difíciles momentos, por aguantarme, y por poder contar contigo cuando lo he necesitado.*

*Quiero agradecer de forma especial a Marta por su apoyo, por el ánimo y por los enormes mensajes del whatsapp, y a ella le quiero decir, Marta, son muy pocas las palabras que he escrito para agradecerte.*

*Quiero expresar mis agradecimientos a Asma y Lamia, las primeras amigas que hice cuando llegue a Granada para realizar mi tesis y con ellas, he pasado los mejores momentos de trabajo y compañía, gracias por vuestra simpatía y cariño, por ayudarme en los momentos de estrés y hacerme amenas las horas de trabajo.*

*A vosotras, mis amigas, las que han compartido conmigo paralelamente este camino (Ikram, Naima, Mirella, Nieve y Sara) y las que se encuentran lejos (Bahija). Gracias de corazón por vuestra amistad, cariño, apoyo y ánimos.*

*La lista de las personas para agradecer es muy larga, porque esta experiencia no habría sido tan agradable sin todas ellas (Belén, Cinta, Kadiya, Patricia, Paula y Vicky) y sus palabras adecuadas cuando se necesita apoyo.*

*A todos los miembros del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia por haber compartir conmigo todos estos años, y sobre todo por su amabilidad y simpatía...*

*Por último, y no menos importante, quiero dar las gracias a mi familia, y a mis padres en primer lugar, a pesar de no estar presentes físicamente, se que procuran mi bienestar desde mi país (Marruecos), les quiero agradecer por su cariño, apoyo incondicional y la confianza depositada en mí. A mi hermana Nada, por nunca faltar cuando la he necesitado, y por estar siempre a mi lado. A mi preciosa Lina, por su simpatía y agradable sonrisa que me daba alegría y fortaleza para seguir adelante. A mis hermanos Wadih y Adil (Omar y Sofia) por sus consejos y apoyo y a mi Elena por el ánimo, por los “tapers” y por demasiadas cosas que os tengo que agradecer.*

*Muchas gracias a todos los que me han ayudado a llegar hasta aquí y a todos aquellos que colaboraron de forma directa o indirecta a vivir esta experiencia.*



# Índice

<i>Resumen</i>	I
<i>Agradecimientos</i>	III
<i>Índice</i>	VII
<i>Publicaciones</i>	XIII
<i>Contribuciones a Congresos</i>	XIII
<i>Índice de tablas</i>	XVII
<i>Índice de figuras</i>	XXI
<i>Abreviaturas</i>	XXV
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>I. Biodiversidad</b>	3
I. 1. Concepto de biodiversidad	3
I. 2. Diversidad microbiana	4
I. 3. Diversidad microbiana en la escala espacio-tiempo	5
<b>II. Aplicación de técnicas moleculares en el estudio de la diversidad microbiana</b>	7
II. 1. Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE)	9
II. 2. Hibridación in situ de fluorescencia con un sistema de deposición del receptor catalizado (CARD-FISH)	12
<b>III. Ambientes hipersalinos</b>	13
III. 1. Concepto	13
III. 2. Rambla Salada	15
III. 3. Biodiversidad en ambientes hipersalinos	18
III. 4. Microorganismos halófilos	19
<b>OBJETIVOS</b>	33
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	37
<b>I. Selección de los hábitats y toma de muestras</b>	39
<b>Rambla Salada (Murcia)</b>	41
<b>II. Análisis de la diversidad microbiana mediante PCR-DGGE</b>	42

II. 1. Extracción de ADN _____	43
II. 2. Extracción de ARN _____	44
II. 3. Determinación de la concentración de ADN y ARN _____	45
II. 4. Amplificación mediante PCR de fragmentos del gen del ARNr 16S _____	46
II. 5. Amplificación mediante PCR de los genes <i>nirS</i> y <i>nosZ</i> del género <i>Halomonas</i> _____	48
II. 6. RT-PCR _____	50
II. 7. Análisis de los productos de PCR mediante electroforesis convencional _____	51
II. 8. Purificación y concentración de los productos de PCR _____	52
II. 9. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) _____	52
II. 10. Secuenciación y análisis de las bandas del DGGE _____	54
<b>III. Análisis de la diversidad y métodos estadísticos _____</b>	<b>56</b>
III. 1. Análisis de la comunidad microbiana con FPquest _____	56
III. 2. Índices de diversidad _____	57
III. 3. Análisis estadísticos _____	59
<b>IV. Análisis cuantitativo de las comunidades microbianas mediante CARD-FISH _____</b>	<b>60</b>
IV. 1. Preparación y fijación de las muestras _____	61
IV. 2. Inactivación de peroxidasas y permeabilización de las células _____	62
IV. 3. Hibridación con sondas marcadas con HRP _____	62
IV. 4. Amplificación de la señal CARD _____	63
IV. 5. Tinción con DAPI y observación al microscopio _____	63
IV. 6. Determinación de la abundancia relativa _____	64
<b>RESULTADOS Y DISCUSION _____</b>	<b>67</b>
<b><i>I. CAPITULO 1 Diversidad procariota en hábitats hipersalinos _____</i></b>	<b>69</b>
<b><i>Resumen _____</i></b>	<b>71</b>
<b>I. 1. Resultados _____</b>	<b>73</b>
I. 1. 1. Salina de Cabo de Gata (Almería) _____	73
I. 1. 2. Salina de La Malahá (Granada) _____	84
I. 1. 3. Salinas de Larache, Souk larbaâ y Asilah (Marruecos) _____	93
I. 1. 4. Suelos agrícolas de Motril (Granada) _____	113
<b>I. 2. Discusión _____</b>	<b>128</b>
<b><i>II. CAPITULO 2 Diversidad procariota en Rambla Salada _____</i></b>	<b>133</b>
<b>II. 1. Resultados _____</b>	<b>135</b>
II. 1. 1. Parámetros físico-químicos de Rambla Salada _____	135

<i>II. 2. Diversidad de bacterias en Rambla Salada</i>	137
<b>Resumen</b>	139
<b>II. 2. 1. Diversidad de bacterias</b>	141
Amplificación por PCR del gen del ARNr 16S	141
DGGE	141
Análisis de las secuencias	144
Índices de diversidad	151
Influencia de los factores ambientales en la diversidad de bacterias	156
<b>II. 2. 2. Análisis de la comunidad de bacterias mediante CARD-FISH</b>	159
<b>II. 2. 3. Discusión</b>	164
<i>Material suplementario</i>	171
<i>II. 3. Diversidad de arqueas en Rambla Salada</i>	177
<b>Resumen</b>	179
<b>II. 3. 1. Diversidad de arqueas predominantes</b>	181
Amplificación por PCR del gen del ARNr 16S	181
DGGE	181
Análisis de las secuencias	183
Índices de diversidad	189
Influencia de los factores ambientales en la diversidad de arqueas	194
<b>II. 3. 2. Diversidad de arqueas metabólicamente activas</b>	198
Amplificación por RT-PCR del gen del ARNr 16S	198
DGGE	198
Análisis de las secuencias	200
Índices de diversidad	206
Influencia de los factores ambientales en la diversidad de arqueas metabólicamente activas	212
<b>II. 3. 3. Análisis de la comunidad de arqueas mediante CARD-FISH</b>	215
<b>II. 3. 4. Discusión</b>	220
<i>Material suplementario</i>	235
<i>II. 4. Diversidad de Halomonas en Rambla Salada</i>	244
<b>Resumen</b>	246
<b>II. 4. 1. Diversidad de Halomonas</b>	248



Amplificación por PCR del gen del ARNr 16S _____	248
DGGE _____	248
Análisis de las secuencias _____	250
Amplificación por PCR de los genes <i>nirS</i> y <i>nosZ</i> _____	257
DGGE y análisis filogenético de las secuencias _____	258
Índices de diversidad _____	260
Influencia de los factores ambientales en la diversidad de <i>Halomonas</i> _____	265
<b>II. 4. 2. Análisis de la comunidad de <i>Halomonas</i> mediante CARD-FISH _____</b>	<b>268</b>
<b>II. 4. 3. Discusión _____</b>	<b>274</b>
<i>Material suplementario</i> _____	280
<b>CONCLUSIONES</b> _____	<b>286</b>
<b>BIBIOGRAFÍA</b> _____	<b>290</b>
<b>ANEXOS</b> _____	<b>317</b>
<b>Anexo 1</b> _____	<b>318</b>
<b>Anexo 2</b> _____	<b>319</b>
<b>Anexo 3</b> _____	<b>320</b>

La presente Tesis Doctoral ha sido subvencionada por las ayudas de los siguientes proyectos de investigación:

**“Estudio de la comunidad de procariontes de Rambla Salada (Murcia), un espacio protegido de interés ecológico comunitario. Selección de bacterias de utilidad industrial y ecológica”**, subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (CGL2005-05947/BOS) durante el periodo 2005-2007. Investigador principal: Emilia Quesada Arroquia.

**“Origen, biodiversidad y biogeografía de las especies del género *Halomonas*”**. subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (CLG2008-02399/BOS) durante el periodo 2008-2011. Investigador principal: Victoria Béjar Luque.

Asimismo, durante la realización de la Tesis Doctoral, la doctoranda ha disfrutado de una beca de la Agencia Española de Cooperación para el Desarrollo Internacional (AECID) (2008-2009) y de los contratos de personal investigador con cargo a proyectos (2010-2012).



De la presente Tesis Doctoral se han extraído las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

## Publicaciones

**Oueriaghli, N., Béjar, V., Quesada, E., Martínez-Checa, F. (2013).** Molecular-ecology techniques reveal both spatial and temporal variations in the diversity of archaeal communities in Rambla Salada, Spain. *Microbial Ecology*, Doi 10.1007/s00248-013-0176-5.

**Oueriaghli, N., Martínez-Checa, F., Quesada, E., Béjar, V. (2010).** La biodiversidad microbiana como fuente de productos de interes biotecnológico. *Ars Pharm*, 3: 525-539.

**Oueriaghli, N., González Domenech, C.M., Martínez-Checa, F., Quesada, E., Muyzer, G., Béjar, V. (2013).** Molecular techniques highlight the predominance of denitrifying species within the *Halomonas* population in the hypersaline habitat of Rambla Salada, Spain. (enviado a la revista *Microbial Ecology*).

## Contribuciones a Congresos

- **Comunicaciones orales**

1. Nahid Oueriaghli, Rocío Luque, Fernando Martínez-Checa, Inmaculada Llamas, Victoria Béjar y Emilia Quesada. **Estudio de biodiversidad de procariotas en Rambla Salada.** XII Reunión del Grupo de Taxonomía Filogenia y Biodiversidad Microbiana (SEM). Tarragona, España, 2008.
2. Nahid Oueriaghli, Rocío Luque, Fernando Martínez-Checa, Victoria Béjar y Emilia Quesada Arroquia. **Microbiota en Rambla Salada: Técnicas moleculares versus técnicas clásicas de aislamiento y selección de microorganismos.** VIII Reunión de la RED de Microorganismos Extremófilos. Grazalema, Cádiz, España, 2008.
3. Rocío Luque, Nahid Oueriaghli, Emilia Quesada Arroquia, Victoria Béjar y Fernando Martínez-Checa. **Ubiquity and diversity of the genus *Halomonas*.** IV Reunión de la RED de Microorganismos Extremófilos. Palma de Mallorca, España, 2009.
4. Nahid Oueriaghli, Rocío Luque, Inmaculada Llamas, Victoria Béjar y Fernando Martínez-Checa. **Diversity of archaea in saline and non-saline soils.** V Reunión de la RED de Microorganismos Extremófilos. Santa Susana, Girona, España, 2010.
5. Nahid Oueriaghli, Emilia Quesada Arroquia, Victoria Béjar y Fernando Martínez-Checa. **Biogeography of the genus *Halomonas*.** XIII Reunión del Grupo de Taxonomía Filogenia y Biodiversidad Microbiana (SEM). Sevilla, España, 2010.

6. Nahid Oueriaghli, Rocío Luque, Inmaculada Llamas, Fernando Martínez-Checa y Victoria Béjar. **Procaryote dans le parc naturel Rambla Salada (Murcia. Espagne)**. 8<sup>ème</sup> Congreso nacional de la Sociedad Francesa de Microbiología (SFM). Marsella, Francia, 2010
7. Nahid Oueriaghli, Carmen María González-Domenech, Fernando Martínez-Checa, Gerard Muyzer, Emilia Quesada Arroquia y Victoria Béjar. **Estudio molecular de la diversidad del género *Halomonas* en Rambla Salada mediante DGGE, CARD-FISH y análisis multivariable**. XIV Reunión del Grupo de Taxonomía Filogenia y Biodiversidad Microbiana (SEM) Granada, España, 2012.
8. Nahid Oueriaghli, Kadiya Calderón, Victoria Béjar, Emilia Quesada Arroquia y Fernando Martínez-Checa. **Estudio estacional de la diversidad de arqueas en Rambla Salada (Murcia) mediante DGGE, CARD-FISH y análisis multivariable**. XIV Reunión del Grupo de Taxonomía Filogenia y Biodiversidad Microbiana (SEM) Granada, España, 2012.
9. Nahid Oueriaghli, Victoria Béjar, Emilia Quesada Arroquia y Fernando Martínez-Checa. **Influence of environmental variables on bacterial community composition in Rambla Salada, a hypersaline environment in south-eastern Spain**. 9<sup>th</sup> International Congress on Extremophiles Sevilla, España, 2012.
10. Carmen María González-Domenech, Nahid Oueriaghli, Fernando Martínez-Checa, Emilia Quesada Arroquia, Gerard Muyzer, Melanie Mormile y Victoria Béjar. **Diversity and activity of the denitrification population of *Halomonas* in Rambla Salada**. 9<sup>th</sup> International Congress on Extremophiles Sevilla, España 2012.

- **Comunicaciones en panel**

1. Fernando Martínez-Checa, Rocío Luque y Nahid Oueriaghli. **Biodiversidad en Rambla Salada (Murcia)**. VII Reunión de la RED de Microorganismos Extremófilos. Alicante, España, 2007.
2. Nahid Oueriaghli, Victoria Béjar, Emilia Quesada Arroquia y Fernando Martínez-Checa. **Estudio molecular de la biodiversidad de procariotas en Rambla Salada (Murcia)**. XX Congreso Nacional de la Sociedad Española De Microbiología. Sevilla, España, 2007.
3. Nahid Oueriaghli, Fernando Martínez-Checa, Emilia Quesada Arroquia y Victoria Béjar. **Biodiversidad del género *Halomonas* en Rambla Salada (Murcia)**. XXIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Microbiología. Salamanca, España, 2011.
4. Rocío Luque, Nahid Oueriaghli, Margarita López Fernández, Emilia Quesada Arroquia e Inmaculada Llamas. ***Halomonas* es la bacteria heterótrofa aerobia que predomina en Rambla Salada (Murcia)**. XXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Microbiología. Almería, España, 2009.

5. Rocío Luque, Nahid Oueriaghli, Inmaculada Llamas, Fernando Martínez-Checa, Emilia Quesada Arroquia y Victoria Béjar. **Comparación entre las técnicas clásicas y las técnicas moleculares en el estudio de la biodiversidad procariota en Rambla Salada (Murcia)**. II Congreso Nacional de Biodiversidad. Santa Susana, Girona, España, 2009.
6. Nahid Oueriaghli, Rocío Luque, Victoria Béjar, y Fernando Martínez-Checa. DGGE y FISH para el estudio de la biodiversidad procariota en Rambla Salada (Murcia). XXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Microbiología. Almería, España, 2009.
7. Nahid Oueriaghli, Fernando Martínez-Checa, Emilia Quesada Arroquia y Victoria Béjar. **La biodiversidad microbiana como fuente de productos de interés biotecnológico**. XXIX Congreso Internacional de la Sociedad Farmacéutica del Mediterráneo Latino (SFML). Granada, España, 2010.
8. Nahid Oueriaghli, Rocío Luque, Inmaculada Llamas, Fernando Martínez-Checa y Victoria Béjar. **Procaryote dans le parc naturel Rambla Salada (Murcia. Espagne)**. 8ème Congreso nacional de la Sociedad Francesa de Microbiología (SFM). Marsella, Francia, 2010.
9. Nahid Oueriaghli, Fernando Martínez-Checa, Carmen María González-Domenech, Sergio Espinal, Emilia Quesada Arroquia y Victoria Béjar. **Diversidad de especies del género *Halomonas* en dos hábitats hipersalinos: Fuente de Piedra (Málaga) y Rambla Salada (Murcia)**. III Congreso Nacional de Biodiversidad. Granada, España, 2011.



## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Diversidad del mundo vivo (Pascual, 1997) .....	4
<b>Tabla 2.</b> Géneros del phylum <i>Euryarchaeota</i> que contienen especies halófilas .....	22
<b>Tabla 3.</b> Géneros del Dominio <i>Bacteria</i> que contienen especies halófilas moderadas .....	24
<b>Tabla 4.</b> Géneros de la familia <i>Halomonadaceae</i> válidamente publicados hasta febrero de 2013.....	29
<b>Tabla 5.</b> Hábitats estudiados y tipo de muestras.....	40
<b>Tabla 6.</b> Reactivos empleados en la reacción de PCR.....	46
<b>Tabla 7.</b> Cebadores usados para amplificar el gen del ARNr 16S de bacterias, arqueas y del género <i>Halomonas</i> . .....	47
<b>Tabla 8.</b> Cebadores usados en los estudios de PCR-DGGE de la población desnitrificante del género <i>Halomonas</i> . .....	49
<b>Tabla 9.</b> Reactivos empleados en la reacción de RT-PCR. ....	50
<b>Tabla 10.</b> Especies tipo utilizadas como “outgroups” y cepas analizadas por Luque y col. (2012a) en Rambla Salada.....	55
<b>Tabla 11.</b> Sondas de oligonucleótidos usadas para CARD-FISH. ....	63
<b>Tabla 12.</b> Fluorocromos utilizados para la detección de las comunidades microbianas. ....	64
<b>Tabla 13.</b> Identificación de las secuencias del gen ARNr 16S del Dominio <i>Bacteria</i> obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE. ....	75
<b>Tabla 14.</b> Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio <i>Archaea</i> obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE. ....	79
<b>Tabla 15.</b> Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S del género <i>Halomonas</i> obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE. ....	82
<b>Tabla 16.</b> Rango ponderado de la riqueza ( <i>Rr</i> ), índices de <i>Shannon-Weaver</i> ( <i>H'</i> ) y <i>Simpson</i> ( <i>SI</i> ) en la comunidad de bacterias, arqueas y <i>Halomonas</i> en Cabo de Gata (Almería).....	83
<b>Tabla 17.</b> Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio <i>Bacteria</i> obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE. ....	87
<b>Tabla 18.</b> Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio <i>Archaea</i> obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE. ....	90
<b>Tabla 19.</b> Rango ponderado de la riqueza ( <i>Rr</i> ), índices de <i>Shannon-Weaver</i> ( <i>H'</i> ) y <i>Simpson</i> ( <i>SI</i> ) en la comunidad de bacterias y arqueas en La Malahá (Granada). ....	92
<b>Tabla 20.</b> Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio <i>Bacteria</i> obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE. ....	96
<b>Tabla 21.</b> Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio <i>Archaea</i> obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE. ....	102
<b>Tabla 22.</b> Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S del género <i>Halomonas</i> obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE. ....	108



<b>Tabla 23.</b> Rango ponderado de la riqueza ( <i>Rr</i> ), índices de <i>Shannon-Weaver</i> ( <i>H'</i> ) y <i>Simpson</i> ( <i>SI</i> ) en la comunidad de bacterias, arqueas y <i>Halomonas</i> en las salinas de Larache, Souk larbaâ y Asilah.....	111
<b>Tabla 24.</b> Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio <i>Bacteria</i> obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE. ....	116
<b>Tabla 25.</b> Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio <i>Archaea</i> obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE. ....	120
<b>Tabla 26.</b> Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S del género <i>Halomonas</i> obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE. ....	123
<b>Tabla 27.</b> Rango ponderado de la riqueza ( <i>Rr</i> ), índices de <i>Shannon-Weaver</i> ( <i>H'</i> ) y <i>Simpson</i> ( <i>SI</i> ) en la comunidad de bacterias, arqueas y <i>Halomonas</i> en los suelos agrícolas de Motril (Granada).....	126
<b>Tabla 28.</b> Parámetros físico-químicos en cada zona y época de muestreo. ....	135
<b>Tabla 29.</b> Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE .....	144
<b>Tabla 30.</b> Abundancia relativa (en %) de los grupos taxonómicos (intensidad de bandas de DGGE) identificados en las tres épocas de muestreo.....	150
<b>Tabla 31.</b> Rango ponderado de la riqueza ( <i>Rr</i> ) en cada sitio y época de muestreo. ....	151
<b>Tabla 32.</b> Índices de <i>Shannon-Weaver</i> y <i>Simpson</i> en cada sitio y época de muestreo. ....	153
<b>Tabla 33.</b> Valores de <i>Fo</i> (en %) obtenidos en cada zona y época de muestreo.....	156
<b>Tabla 34.</b> Valores del análisis estadístico Canoco.....	157
<b>Tabla 35.</b> Cuantificación de células microbianas totales y de bacterias en cada zona y época de muestreo. ....	162
<b>Tabla 36.</b> Valores de ausencia-presencia de las bandas encontradas en los perfiles de DGGE de la comunidad de bacterias en las tres zonas y épocas de muestreo (matriz cualitativa)..	175
<b>Tabla 37.</b> Intensidades relativas de las bandas encontradas en los perfiles de DGGE de la comunidad de bacterias en las tres zonas y épocas de muestreo (matriz cuantitativa).....	176
<b>Tabla 38.</b> Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE .....	184
<b>Tabla 39.</b> Abundancia relativa (en %) de los grupos taxonómicos (intensidad de bandas de DGGE) identificados en las tres épocas de muestreo.....	189
<b>Tabla 40.</b> Rango ponderado de la riqueza ( <i>Rr</i> ) en cada sitio y época de muestreo. ....	190
<b>Tabla 41.</b> Índices de <i>Shannon-Weaver</i> y <i>Simpson</i> en cada sitio y época de muestreo. ....	191
<b>Tabla 42.</b> Valores de <i>Fo</i> (en %) obtenidos en cada zona y época de muestreo.....	194
<b>Tabla 43.</b> Valores del análisis estadístico Canoco.....	195
<b>Tabla 44.</b> Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE. ....	200
<b>Tabla 45.</b> Abundancia relativa (en %) de los grupos taxonómicos (intensidad de bandas de DGGE) identificados en las tres épocas de muestreo.....	205
<b>Tabla 46.</b> Rango ponderado de la riqueza ( <i>Rr</i> ) en cada sitio y época de muestreo. ....	207
<b>Tabla 47.</b> Índices de <i>Shannon-Weaver</i> y <i>Simpson</i> en cada sitio y época de muestreo. ....	209

<b>Tabla 48.</b> Valores de <i>Fo</i> (en %) obtenidos en cada zona y época de muestreo.....	211
<b>Tabla 49.</b> Valores del análisis estadístico Canoco.....	212
<b>Tabla 50.</b> Cuantificación de células microbianas totales y de arqueas en cada zona y época de muestro. ....	217
<b>Tabla 51.</b> Valores de ausencia-presencia de las bandas encontradas en los perfiles de DGGE de la comunidad de arqueas (a partir de ADN) en las tres zonas y épocas de muestreo (matriz cualitativa).....	239
<b>Tabla 52.</b> Intensidades relativas de las bandas encontradas en los perfiles de DGGE de la comunidad de arqueas (a partir de ADN) en las tres zonas y épocas de muestreo (matriz cuantitativa).....	240
<b>Tabla 53.</b> Valores de ausencia-presencia de las bandas encontradas en los perfiles de DGGE de la comunidad de arqueas (a partir de ARN) en las tres zonas y épocas de muestreo (matriz cualitativa).....	241
<b>Tabla 54.</b> Intensidades relativas de las bandas encontradas en los perfiles de DGGE de la comunidad de arqueas (a partir de ARN) en las tres zonas y épocas de muestreo (matriz cuantitativa).....	242
<b>Tabla 55.</b> Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE. ....	251
<b>Tabla 56.</b> Abundancia relativa (en %) de las especies de <i>Halomonas</i> (intensidad de bandas de DGGE) identificados en las tres épocas de muestreo.....	255
<b>Tabla 57.</b> Identificación de las secuencias de los genes <i>nirS</i> y <i>nosZ</i> obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE. ....	260
<b>Tabla 58.</b> Rango ponderado de la riqueza ( <i>Rr</i> ) en cada sitio y época de muestreo.....	261
<b>Tabla 59.</b> Índice de <i>Shanon-Weaver</i> y <i>Simpson</i> en cada sitio y la época de muestreo.....	262
<b>Tabla 60.</b> Valores de <i>Fo</i> (en %) obtenidos en cada zona y época de muestreo.....	263
<b>Tabla 61.</b> Valores del análisis estadístico Canoco.....	266
<b>Tabla 62.</b> Cuantificación de células microbianas totales, bacterias, arqueas y <i>Halomonas</i> en cada zona y época de muestreo. ....	271
<b>Tabla 63.</b> Valores de ausencia y presencia de las bandas encontradas en los perfiles de DGGE de la comunidad de <i>Halomonas</i> en las tres zonas y épocas de muestreo (matriz cualitativa).....	283
<b>Tabla 64.</b> Intensidades relativas de las bandas encontradas en los perfiles de DGGE de la comunidad de <i>Halomonas</i> en las tres zonas y épocas de muestreo (matriz cuantitativa). ...	284



## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Análisis espacial y temporal de la diversidad (González y col., 2012) .....	6
<b>Figura 2.</b> Estructura y componentes del ribosoma procariota (María del Rosario y col., 2004). .....	8
<b>Figura 3.</b> Esquema de la aplicación de la técnica de DGGE para el estudio de la biodiversidad microbiana de los ecosistemas.....	10
<b>Figura 4.</b> Esquema de la técnica CARD-FISH (Amann y Bernhard, 2008). .....	12
<b>Figura 5.</b> Diversos ambientes hipersalinos.....	15
<b>Figura 6.</b> Situación geográfica de Rambla Salada.....	16
<b>Figura 7.</b> Árbol filogenético y distribución de algunos de los microorganismos halófilos (Oren, 2008). .....	20
<b>Figura 8.</b> Imágenes de los hábitats estudiados. ....	39
<b>Figura 9.</b> Lugares de muestreo de Rambla Salada. ....	42
<b>Figura 10.</b> Fragmentos del gen del ARNr 16S utilizados (aproximadamente 500pb) .....	47
<b>Figura 11.</b> Programa de amplificación por PCR del ARNr 16S del Dominio Bacteria y del Dominio <i>Archaea</i> . .....	48
<b>Figura 12.</b> Programa de amplificación por PCR del ARNr 16S del género <i>Halomonas</i> .....	48
<b>Figura 13.</b> Programa de amplificación por PCR de los genes <i>nirS</i> (a) y <i>nosZ</i> (b).....	49
<b>Figura 14.</b> Programa de amplificación por PCR del ARNr 16S del Dominio <i>Archaea</i> . ....	51
<b>Figura 15.</b> Preparación de un gel de DGGE.....	53
<b>Figura 16.</b> Condiciones de la electroforesis. ....	54
<b>Figura 17.</b> Curva de Pareto-Lorenz (PL).....	58
<b>Figura 18.</b> Protocolo de la técnica CARD-FISH. ....	61
<b>Figura 19.</b> Productos de amplificación del gen del ARNr 16S (500pb).....	73
<b>Figura 20.</b> Perfiles obtenidos por la técnica de DGGE de los fragmentos del gen del ARNr 16S.....	74
<b>Figura 21.</b> Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio <i>Bacteria</i> obtenido mediante el método Neighbour-Joining. ....	77
<b>Figura 22.</b> Abundancia relativa de la comunidad bacteriana en Cabo de Gata (Almería). ...	78
<b>Figura 23.</b> Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio <i>Archaea</i> btenido mediante el método Neighbour-Joining.....	80
<b>Figura 24.</b> Abundancia relativa de la comunidad de arqueas en Cabo de Gata (Almería)....	81
<b>Figura 25.</b> Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S del género <i>Halomonas</i> obtenido mediante el método Neighbour-Joining.....	82
<b>Figura 26.</b> CARD-FISH de muestras de Cabo de Gata. ....	84
<b>Figura 27.</b> Productos de amplificación del gen del ARNr 16S (500pb).....	85
<b>Figura 28.</b> Perfiles obtenidos por la técnica de DGGE de los fragmentos del gen del ARNr 16S. ....	86
<b>Figura 29.</b> Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio <i>Bacteria</i> obtenido mediante el método Neighbour-Joining. ....	89
<b>Figura 30.</b> Abundancia relativa de la comunidad bacteriana en La Malahá (Granada). ....	90

<b>Figura 31.</b> Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio <i>Archaea</i> obtenido mediante el método Neighbour-Joining .....	91
<b>Figura 32.</b> Abundancia relativa de la comunidad de arqueas en La Malahá (Granada).....	92
<b>Figura 33.</b> CARD-FISH de muestras de La Malahá.. .....	93
<b>Figura 34.</b> Productos de amplificación del gen del ARNr 16S (500pb).....	94
<b>Figura 35.</b> Perfiles obtenidos por la técnica de DGGE de los fragmentos del gen del ARNr 16S.....	95
<b>Figura 36.</b> Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio <i>Bacteria</i> obtenido mediante el método Neighbour-Joining.....	99
<b>Figura 37.</b> Abundancia relativa de la comunidad bacteriana en las salinas de Larache (a), Souk larbaâ (b) y Asilah (c). .....	101
<b>Figura 38.</b> Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio <i>Archaea</i> obtenido mediante el método Neighbour-Joining.....	105
<b>Figura 39.</b> Abundancia relativa de la comunidad de arqueas en las salinas de Larache (a), Souk larbaâ (b) y Asilah (c). .....	107
<b>Figura 40.</b> Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S del género <i>Halomonas</i> obtenido mediante el método Neighbour-Joining. ....	109
<b>Figura 41.</b> Abundancia relativa de la comunidad de <i>Halomonas</i> en las salinas de Larache (a), Souk larbaâ (b) y Asilah (c). .....	110
<b>Figura 42.</b> CARD-FISH de muestras de las salinas de Marruecos.....	113
<b>Figura 43.</b> Productos de amplificación del gen del ARNr 16S (500pb).....	114
<b>Figura 44.</b> Perfiles obtenidos por la técnica de DGGE de los fragmentos del gen del ARNr 16S.....	115
<b>Figura 45.</b> Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio <i>Bacteria</i> obtenido mediante el método Neighbour-Joining.....	118
<b>Figura 46.</b> Abundancia relativa de la comunidad bacteriana en los suelos agrícolas de Motril (Granada).....	119
<b>Figura 47.</b> Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio <i>Archaea</i> obtenido mediante el método Neighbour-Joining.....	121
<b>Figura 48.</b> Abundancia relativa de la comunidad de arqueas en los suelos agrícolas de Motril (Granada).....	122
<b>Figura 49.</b> Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S del género <i>Halomonas</i> obtenido mediante el método Neighbour-Joining .....	124
<b>Figura 50.</b> Abundancia relativa de la comunidad de <i>Halomonas</i> en los suelos agrícolas de Motril (Granada). .....	125
<b>Figura 51.</b> CARD-FISH de muestras de los suelos agrícolas de Motril.....	127
<b>Figura 52.</b> Parámetros físico-químicos en las tres zonas y épocas de muestreo. ....	136
<b>Figura 53.</b> Productos de amplificación del gen del ARNr 16S (500pb).....	141
<b>Figura 54.</b> Análisis de los perfiles de DGGE basado en el coeficiente de Pearson y el método de unión de enlace medio (UPGMA).. .....	142
<b>Figura 55.</b> Análisis de los perfiles de DGGE basado en el coeficiente de Dice y el método de unión de enlace medio (UPGMA).....	143
<b>Figura 56.</b> Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método Neighbour-Joining. ....	147
<b>Figura 57.</b> Abundancia relativa de bacterias en los tres muestreos. ....	149
<b>Figura 58.</b> Abundancia relativa de bacterias en cada época de muestreo.....	150
<b>Figura 59.</b> Curvas de distribución de Pareto-Lorenz basadas en los perfiles de DGGE. ....	155

<b>Figura 60.</b> Biplot de la ordenación ACC, basado en los datos cualitativos generados por DGGE, que representa la correlación entre los factores ambientales y las zonas y épocas de muestreo. ....	158
<b>Figura 61.</b> Biplot de la ordenación ACC, basado en los datos cualitativos generados por DGGE, que representa la correlación entre los factores ambientales y la comunidad de bacterias.....	159
<b>Figura 62.</b> CARD-FISH de muestras de Rambla Salada. ....	160
<b>Figura 63.</b> Recuentos de la población total (DAPI) y la población de bacterias (FITC) en las tres épocas de muestreo.....	160
<b>Figura 64.</b> Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método Maximum-Likelihood.....	173
<b>Figura 65.</b> Productos de amplificación del gen del ARNr 16S (500pb).....	181
<b>Figura 66.</b> Análisis de los perfiles de DGGE basado en el coeficiente de Pearson y el método de unión de enlace medio (UPGMA).....	182
<b>Figura 67.</b> Análisis de los perfiles de DGGE basado en el coeficiente de Dice y el método de unión de enlace medio (UPGMA).....	183
<b>Figura 68.</b> Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método Neighbour-Joining. ....	186
<b>Figura 69.</b> Abundancia relativa de arqueas en los tres muestreos.....	187
<b>Figura 70.</b> Abundancia relativa de arqueas en cada época de muestreo. ....	188
<b>Figura 71.</b> Curvas de distribución de Pareto-Lorenz basadas en los perfiles de DGGE. ....	193
<b>Figura 72.</b> Biplot de la ordenación ACC, basado en los datos cualitativos generados por DGGE, que representa la correlación entre los factores ambientales y zonas y épocas de muestreo.....	196
<b>Figura 73.</b> Biplot de la ordenación ACC, basado en los datos cualitativos generados por DGGE, que representa la correlación entre los factores ambientales y las comunidades de arqueas.....	197
<b>Figura 74.</b> Productos de amplificación por RT-PCR del gen del ARNr 16S (500pb). ....	198
<b>Figura 75.</b> Análisis de los perfiles de DGGE basado en el coeficiente de Pearson y el método de unión de enlace medio (UPGMA). La escala indica el porcentaje de similitud. ....	199
<b>Figura 76.</b> Análisis de los perfiles de DGGE basado en el coeficiente de Dice y el método de unión de enlace medio (UPGMA).....	200
<b>Figura 77.</b> Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método de Neighbour-Joining. ....	203
<b>Figura 78.</b> Abundancia relativa de arqueas metabólicamente activas en los tres muestreos.....	204
<b>Figura 79.</b> Abundancia relativa de arqueas metabólicamente activas en cada época de muestreo. ....	206
<b>Figura 80.</b> Curvas de distribución de Pareto-Lorenz basadas en los perfiles de DGGE. ....	210
<b>Figura 81.</b> Biplot de la ordenación ARD, basado en los datos cualitativos generados por DGGE, que representa la correlación entre los factores ambientales, zonas y épocas de muestreo. ....	213
<b>Figura 82.</b> Biplot de la ordenación ACC, basado en los datos cualitativos generados por DGGE, que representa la correlación entre los factores ambientales y las comunidades de arqueas.....	214
<b>Figura 83.</b> CARD-FISH de muestras de Rambla Salada. ....	215
<b>Figura 84.</b> Recuentos de la población total (DAPI) y la población de arqueas (FITC) en las tres épocas de muestreo.....	216

<b>Figura 85.</b> Imagen de arqueas visualizadas con un microscopio láser confocal Leica TCS-SP5 (CLSM).....	219
<b>Figura 86.</b> Diversidad de arqueas predominantes (a) y metabólicamente activas (b) y determinadas por métodos clásicos de cultivo (c) (Luque y col., 2012a).....	231
<b>Figura 87.</b> Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método Maximum-Likelihood.....	237
<b>Figura 88.</b> Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método de Maximum-Likelihood.....	238
<b>Figura 89.</b> Productos de amplificación del gen ARNr 16S (500pb).....	248
<b>Figura 90.</b> Análisis de los perfiles de DGGE basado en el coeficiente de Pearson y el método de unión de enlace medio (UPGMA).....	249
<b>Figura 91.</b> Análisis de los perfiles de DGGE basado en el coeficiente de Dice y el método de unión de enlace medio (UPGMA).....	250
<b>Figura 92.</b> Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método de Neighbour-Joining.....	253
<b>Figura 93.</b> Abundancia relativa de especies de <i>Halomonas</i> (a) y especies desnitrificantes (b) en los tres muestreos.....	254
<b>Figura 94.</b> Abundancia relativa de <i>Halomonas</i> en cada época de muestreo.....	256
<b>Figura 95.</b> Abundancia relativa de la población desnitrificante en las tres zonas de muestreo.....	257
<b>Figura 96.</b> Productos de amplificación de los fragmentos de los genes <i>nirS</i> y <i>nosZ</i> (500pb).....	258
<b>Figura 97.</b> Árbol filogenético basado en las secuencias del gen <i>nirS</i> y las de referencia, obtenido mediante el método de Neighbour-Joining.....	258
<b>Figura 98.</b> Árbol filogenético basado en las secuencias del gen <i>nosZ</i> y las de referencia, obtenido mediante el método de Neighbour-Joining.....	259
<b>Figura 99.</b> Curvas de distribución de Pareto-Lorenz basadas en los perfiles de DGGE.....	264
<b>Figura 100.</b> Biplot de la ordenación ACC, basados en los datos cualitativos generados por DGGE, que representa la correlación entre los factores ambientales y zonas y épocas de muestreo.....	266
<b>Figura 101.</b> Biplot de la ordenación ACC, basados en los datos cualitativos generados por DGGE, que representa la correlación entre los factores ambientales y las especies de <i>Halomonas</i> .....	267
<b>Figura 102.</b> CARD-FISH de muestras de Rambla Salada.....	269
<b>Figura 103.</b> CARD-FISH de <i>Cobetia marina</i> 219 <sup>T</sup> (a) y de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AJ 2116 <sup>T</sup> (b).....	269
<b>Figura 104.</b> Recuentos de la población microbiana total (DAPI), bacterias, arqueas y <i>Halomonas</i> (FITC) en las tres épocas de muestreo.....	273
<b>Figura 105.</b> Imagen en 3D montada con el programa ImageJ de tres imágenes visualizadas con un microscopio de láser confocal Leica TCS-SP5 (CLSM).....	273
<b>Figura 106.</b> Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método de Maximum-Likelihood.....	282

## Abreviaturas

<b>ACC</b>	análisis de correspondencia canónica
<b>ACD</b>	análisis de correspondencia sin tendencias
<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>ARN</b>	ácido ribonucleico
<b>ARD</b>	análisis de redundancia canónica
<b>ARNasa</b>	ribonucleasa
<b>CARD-FISH</b>	hibridación in situ de fluorescencia con un sistema de deposición del receptor catalizado
<b>c.s.p</b>	cantidad suficiente para
<b>C</b>	citosa
<b>cel</b>	célula
<b>col</b>	colaboradores
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DGGE</b>	electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante
<b>DEPC</b>	dietil pirocarbonato
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>dNTPs</b>	desoxinucleótidos trifosfato
<b>D.O.600nm</b>	densidad óptica a 600nm
<b>ed</b>	editor
<b>EDTA</b>	ácido etilén-diamino-tetraacético
<b>EMBL</b>	european molecular biology laboratory
<b>EPS</b>	exopolisacárido
<b>FA</b>	formaldehido
<b>Fo</b>	organización funcional
<b>FITC</b>	fluorescein isothiocyanate
<b>g</b>	gramo
<b>G</b>	guanina
<b>GC</b>	contenido en guanina y citosina
<b>H'</b>	Shannon-Weaver
<b>HRP</b>	peroxidasa de rábano
<b>IJSEM:</b>	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology
<b>kb</b>	kilobase
<b>l</b>	litro
<b>LIC</b>	lugar de importancia comunitaria
<b>M</b>	molar
<b>MEGA</b>	molecular evolutionary genetics analysis
<b>mg</b>	miligramo
<b>min</b>	minuto



<b>ml</b>	mililitro
<b>mm</b>	milímetro
<b>mM</b>	milimolar
<b>NCBI</b>	National center for biotechnology information
<b>ng</b>	nanogramo
<b>nm</b>	nanómetro
<b>°C</b>	grados centígrados
<b>p/v</b>	peso/volumen
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PBS</b>	tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction
<b>PL</b>	Pareto-Lorenz
<b>r.c.f</b>	fuerza de centrifugación relativa
<b>Rr</b>	rango ponderado de riqueza
<b>SDS</b>	sodium dodecyl sulfate
<b>SI</b>	Simpson
<b>sp</b>	especie
<b>TAE</b>	tris acetato edta
<b>TBE</b>	tris borato edta
<b>Tm</b>	temperatura de desnaturalización
<b>µg</b>	microgramo
<b>µl</b>	microlitro
<b>µM</b>	micromolar
<b>UPGMA</b>	unweighted pair group mean average
<b>UV</b>	ultravioleta
<b>U</b>	unidad
<b>vol</b>	volumen
<b>v/v:</b>	volumen/volumen
<b>ZEPA</b>	zona de especial protección para las aves

# INTRODUCCIÓN



## I. Biodiversidad

### I. 1. Concepto de biodiversidad

El término biodiversidad fue acuñado por primera vez en 1986 por Walter Rosen (Sarkar y Margules, 2002) durante la organización del foro nacional de la biodiversidad celebrado en Washington.

Edward O. Wilson, reputado entomólogo norteamericano, pronunciaba por primera vez la palabra “biodiversidad” en 1986 para referirse a la variedad de formas vivas existentes en la Tierra. El estudio de la diversidad procariota es objeto de muchas investigaciones por parte de distintas ramas de la ciencia ya que la diversidad no conocida oculta una información trascendental sobre las especies desconocidas, y los metabolismos de las mismas que pueden ayudarnos a entender la evolución (Pedrós-Alió, 2006). Actualmente este término es sinónimo de la riqueza natural de cualquier área.

El término biodiversidad nació de la contracción de las palabras inglesas “biological diversity”. Si el concepto de diversidad hace referencia al grado de variabilidad o diferencia en un conjunto de entidad, la diversidad biológica o biodiversidad se refiere a la jerarquía biológica de moléculas, a ecosistemas, a la jerarquía taxonómica de alelos, a reinos, es decir, a todas las clases lógicas (individuos, genotipos, poblaciones, especies, etc.), y a todos los miembros diferentes de todas aquellas clases.

El término biodiversidad también incluye la diversidad de interacciones vivas y procesos en todos estos niveles de organización. Según el convenio sobre la diversidad biológica elaborado durante la conferencia de las Naciones Unidas sobre el medio ambiente y el desarrollo, celebrado en Brasil en Junio de 1992 y suscrito por 157 países, por “diversidad biológica” se entiende la variabilidad de organismos vivos de cualquier fuente, incluidos, entre otras cosas, los ecosistemas terrestres, marinos, otros ecosistemas acuáticos y los complejos ecológicos de los que forman parte; comprende la diversidad dentro de cada especie, entre las especies y de los ecosistemas. Por lo tanto, se entiende por “*ecosistema*” un complejo dinámico de comunidades vegetales, animales, microorganismos y de su medio no viviente que interactúan como una unidad funcional.

La biodiversidad se puede definir, por lo tanto, en términos de genes, especies, o ecosistemas correspondiendo a tres niveles jerárquicos de organización:

- **Diversidad específica.** Es la variedad existente entre los organismos vivos de un sistema ecológico o ecosistema. También se le denomina riqueza de especies en un ecosistema.

- **Diversidad genética.** Es la cantidad total de información y variación genética que existe dentro de cada especie. Existen distintos genes y muchos de ellos se expresan en el ámbito individual; son heredables y resultan ser la materia prima de la selección natural.
- **Diversidad de ecosistemas.** Es entendida como la diversidad de comunidades bióticas (vivas) y los procesos ecológicos que ocurren en determinadas áreas; incluye a las especies que las componen, los procesos ecológicos que desempeñan y los cambios en la composición de especies de una región a otra.

Entendido en su acepción más amplia, la biodiversidad tiene como principal objeto de estudio las poblaciones (conjunto de individuos de una misma especie que viven en un lugar determinado), porque sobre ellas convergen tanto la diversidad genética como la taxonómica o la ecológica (Tabla 1). Tradicionalmente, la base para el conocimiento de la biodiversidad está constituida por la taxonomía y sistemáticas biológicas. Quizá por esta razón y por el hecho de que el mundo viviente ha sido considerado mayoritariamente por los biólogos y ecólogos en términos de especies, el término biodiversidad encuentra su uso más común como sinónimo de la diversidad taxonómica, en particular la riqueza de especies en distintos grupos taxonómicos que forman parte de un determinado hábitat.

**Tabla 1.** Diversidad del mundo vivo (Pascual, 1997)

Diversidad dentro de cada especie (Genética)	Diversidad de las especies (Taxonómica)	Diversidad de los ecosistemas (Ecológica)
	Dominios	Bioregiones
	Phyla	Paisajes
	Familias	Ecosistemas
	Géneros	Hábitats
	Especies	Nichos
Poblaciones	Poblaciones	Poblaciones
Individuos	Individuos	
Cromosomas		
Genes		

### *I. 2. Diversidad microbiana*

La mayor parte de la diversidad microbiana se encuentra en la biomasa del suelo (Ashby y col., 2007; Elshahed y col., 2008) y en los ecosistemas marinos (Pedrós-Alió, 2006). Estas comunidades se caracterizan por la existencia de unos taxa dominantes que son fácilmente detectados con la mayoría de las técnicas moleculares, por lo que se cree que son

los más activos e importantes en los flujos de materia orgánica (Cottrell y Kirchman, 2003), y representan una pequeña porción de la diversidad microbiana total (Galand y col., 2009). Además, existen un gran número de taxa que son poco abundantes llamados “biosfera rara” (Curtis y Sloan, 2004; Sogin y col., 2006). Los taxa o las especies raras constituyen una fuente de diversidad genética y pueden cambiar rápidamente bajo las condiciones ambientales apropiadas pasando a tener una alta abundancia (Gilbert y col., 2011; Caporaso y col., 2011a, 2011b y 2011c).

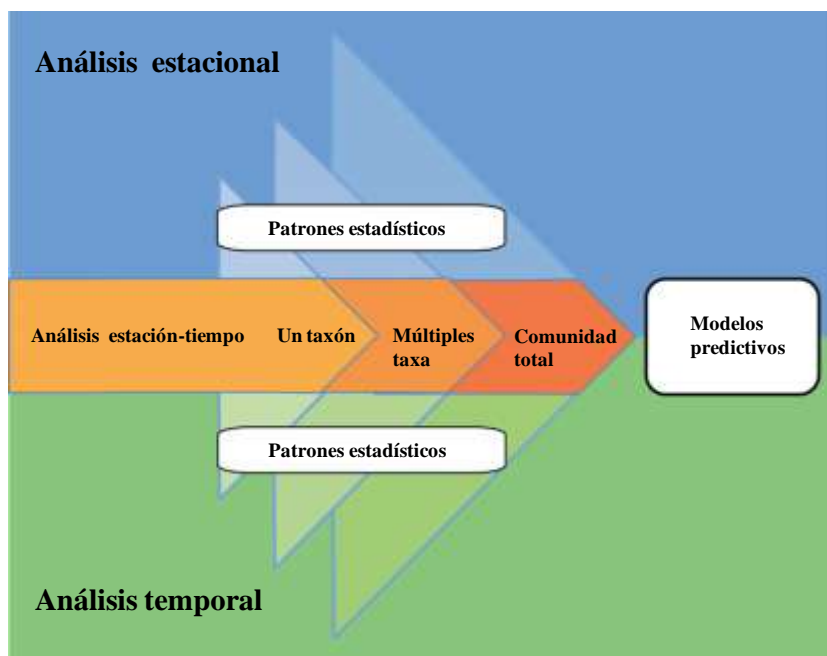
La clasificación de microorganismos en función de características fisiológicas y bioquímicas es casi imposible, debido a que cerca del 99% de todos los microorganismos que existen en la naturaleza no han sido aislados ni cultivados en condiciones de laboratorio (Muyzer, 1999). Esto se debe en gran parte a la falta de conocimientos sobre las condiciones de cultivos bajo las cuales estos microorganismos prosperan en su ambiente natural (Muyzer y Smalla, 1998). Por tanto el estudio de la diversidad microbiana con técnicas dependientes de cultivo que consisten en el desarrollo de métodos que permitan el aislamiento y el cultivo de los microorganismos de interés (Pace, 1996; Ranjard y col., 2000; Rappé y Giovannoni, 2003; Madigan y col., 2003;) es limitado por la capacidad de cultivar solamente el 1% de la microbiota presente en el ambiente (Torsvik y Øvreas, 2002; Malik y col., 2008).

Los estudios actuales de la diversidad microbiana emplean métodos basados en el análisis de las secuencias del ácido nucleico, especialmente los genes del ARNr 16S. La revolución de la diversidad microbiana es el resultado directo de la introducción de estos nuevos métodos que permiten a los investigadores detectar y cuantificar filotipos que son difíciles de cultivar y por lo tanto obtener así una evaluación más amplia de la diversidad microbiana en ecosistemas complejos. Esto ha llevado a una mejor comprensión de la extraordinaria riqueza de la biodiversidad microbiana (Woese, 1987; DeLong y Pace, 2001; Wellington y col., 2003; Oremland y col., 2005), así como a evaluar la dinámica y la variabilidad espacial y temporal de la diversidad microbiana y los factores que impulsan esta variabilidad (Christen, 2008; Hamady y Knight, 2009; Hirsch y col., 2010; Tamames y col., 2010).

### *1. 3. Diversidad microbiana en la escala espacio-tiempo*

El conocimiento de la diversidad microbiana tiene un papel importante ya que los microorganismos son los responsables de la descomposición de la materia, del reciclaje de los nutrientes, y ayudan a los animales "superiores" en la digestión de los alimentos entre otras muchas importantes funciones (Colwell, 1997). Sin embargo, para comprender y manipular los procesos mediados por los microorganismos y para poder inferir sobre los mecanismos subyacentes que generan y mantienen la biodiversidad (Green y Bohannon, 2006) es fundamental comprender los patrones de distribución espacial y temporal de la diversidad microbiana a distintos niveles (González y col., 2012) (Figura 1).

En este sentido, la búsqueda de patrones en la distribución de los microorganismos se ha convertido en un objetivo primordial dentro del estudio de la diversidad microbiana (Van der Gucht y col., 2007). En particular, determinar los factores implicados en la distribución de perfiles bacterianos resulta de gran importancia dada la gran diversidad de este grupo de procariotas, su papel fundamental en diversos procesos ambientales y su gran importancia dentro de las ciencias aplicadas en áreas tales como la biorremediación y la bioprospección (Horner-Devine y col., 2004).



**Figura 1.** Análisis espacial y temporal de la diversidad (González y col., 2012)

Durante siglos, los ecólogos y biólogos han descrito la biodiversidad en la Tierra. Sin embargo, y a pesar de estos esfuerzos, todavía carecemos de estimaciones robustas de la riqueza de especies para la mayoría de los taxa en los distintos ecosistemas. Además, es difícil determinar los factores que son más importantes en la distribución de los patrones de diversidad de especies en una escala de tiempo y espacio (May, 1988; Pennisi, 2005).

Para mejorar nuestra comprensión de la variabilidad de las comunidades microbianas, es imprescindible realizar estudios espaciales y temporales que van de una escala de un solo taxón, a múltiples taxa y hasta una comunidad total (González y col., 2012). Estos estudios nos permiten detectar patrones de distribución. Sin embargo, y para comprender más aún la naturaleza y los rangos de la variabilidad en los sistemas microbianos, se necesita realizar estudios para predecir la comunidad existente a través del espacio heterogéneo y del tiempo,

esto nos ayudará a pasar de una simple descripción de los patrones estadísticos a desarrollar mejores modelos predictivos (Figura 1).

La acumulación de los estudios de las variaciones espaciales y temporales de las comunidades microbianas en diferentes ecosistemas proporcionan informaciones importantes que permiten una mejor interpretación biológica y ecológica de las desviaciones de la variabilidad (González y col., 2012).

La combinación de los estudios espaciales con los temporales puede revelar características claves dentro de un sistema. Caporaso y col. (2011c) combinaron componentes espaciales y temporales para evaluar la variación de las comunidades microbianas de la microbiota humano. La adición de un muestreo temporal a un estudio previo llevó a una nueva perspectiva: aunque el cuerpo humano tiene una composición diferente en los distintos lugares o ubicaciones, las comunidades dentro de cada ubicación cambia con el tiempo (Costello y col., 2009). Es decir, cada lugar conserva sólo un pequeño "núcleo temporal" de filotipos a nivel de especie dentro de una comunidad en el tiempo

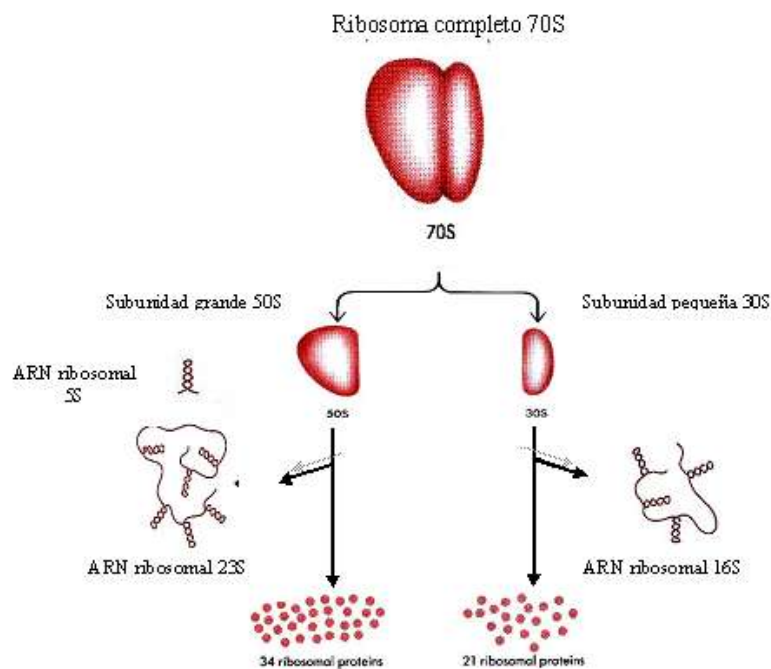
La diversidad y los patrones de distribución de las especies se conocen bastante bien en los macroorganismos, pero no están claros en los microorganismos (Tamames y col., 2010). En la actualidad existe un debate intenso en cuanto a si las comunidades microbianas disponen de patrones de distribución y de diversidad similares a aquellos descritos para los macroorganismos. Frente a este debate, los microbiólogos mantienen una hipótesis tradicional sobre la ubicuidad de los microorganismos "everything is everywhere but environment selects" (Baas-Becking, 1934).

Las tendencias ecológicas a favor de esta hipótesis se basan en la alta abundancia de los microorganismos, su rápida proliferación, sus altas tasas de dispersión y la baja probabilidad de extinción a nivel local debido a la presencia de estadios de resistencia (Finlay y Clarke 1999; Curtis y col., 2002; Torsvik y col., 2002; Fenchel y Finlay 2004).

## II. Aplicación de técnicas moleculares en el estudio de la diversidad microbiana

El desarrollo de las técnicas moleculares ha permitido la detección y la identificación de los microorganismos que existen en comunidades complejas. La aproximación más extendida para explorar la diversidad procariota a nivel genético se basa en la clonación y secuenciación de los genes que codifican el gen del ARNr (Figura 2) de la subunidad pequeña del ribosoma bacteriano gracias a que esta estructura está presente en los tres dominios de la vida: *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*. (Woese, 1987, Woese y col., 1990).





**Figura 2.** Estructura y componentes del ribosoma procariota (María del Rosario y col., 2004)

El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonómica procariota. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese a principios de la década de 1970 (Olsen y Woese, 1993). Una de las características que posee este gen, y por medio de la cual ha sido posible definir relaciones filogenéticas entre organismos tan diferentes, es que la tasa de cambio es muy distinta a lo largo de su secuencia (Woese, 1987).

Los sitios más conservados se deben a la función del ARN en el ribosoma; éstos son los sitios que interactúan directamente con el ARN mensajero y con los ARN de transferencia (Ramakrishnan y Moore, 2000). Debido a estas regiones conservadas del gen ribosomal ARNr 16S, ha sido fácil el diseño de oligonucleótidos iniciadores para la aplicación de estrategias de PCR (Weisburg y col., 1991), que permiten la clonación de los fragmentos del gen del ARNr 16S amplificados a partir de ADN total extraído de diferentes hábitats naturales. De esta forma se puede comprobar la enorme riqueza de la diversidad microbiana y también estudiar la biodiversidad, cuyo análisis estaba limitado con las técnicas tradicionales (Muyzer y Smalla, 1998).

## II. 1. Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE)

Para determinar la diversidad microbiana en distintos ecosistemas y supervisar el comportamiento microbiano de la comunidad en un cierto período de tiempo, se han desarrollado varias herramientas que permiten obtener un “perfil genético” o “huella genética” (fingerprinting) de la comunidad microbiana (Muyzer, 1999).

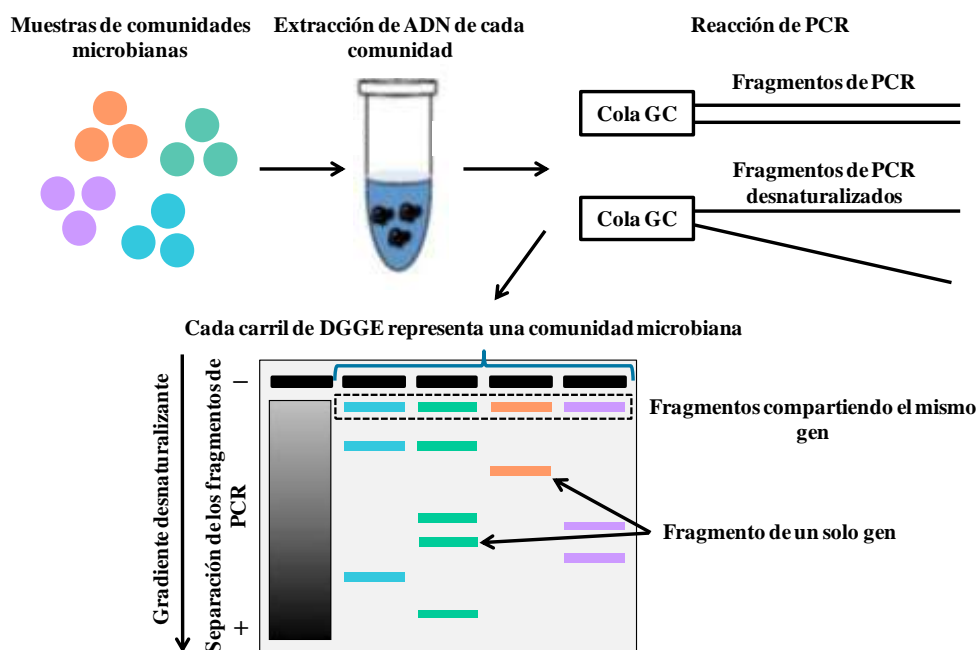
Entre los métodos de “huella genética” más utilizados podemos mencionar la técnica de “electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante” (DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Muyzer y col., 1993 y 1998). Esta técnica fue inicialmente publicada por Fischer y Lerman en 1979 para detectar mutaciones genéticas y separar fragmentos de ADN del mismo tamaño pero de distinta secuencia de nucleótidos.

La técnica de DGGE ha sido ampliamente utilizada en ecología microbiana (Niederberger y col., 2009; Buesing y col., 2009). En particular esta técnica se basa en la disminución de la velocidad electroforética de las moléculas de ADN de doble cadena cuando se encuentran parcialmente desnaturalizadas, debido a cambios en la estructura de la molécula que afectan su movilidad cuando migran en un gel que contienen un gradiente lineal desnaturalizante del ADN.

La técnica de DGGE se basa en las propiedades de fusión del ADN de doble cadena, de manera que una molécula de ADN se desnaturalizará en regiones discretas llamadas dominios o puntos de fusión (melting point) en un gel de poliacrilamida que posee un gradiente desnaturalizante generado a partir de una concentración adecuada de formamida y urea. Cada punto se desnaturaliza a una temperatura (temperatura de fusión o  $T_m$ ) en la que cada par de bases de ADN (dúplex) está en un equilibrio entre el estado helicoidal y el desnaturalizado.

Debido a que las interacciones entre bases adyacentes tienen una influencia significativa en la estabilidad de la doble hélice, se alcanzará un punto donde la concentración de agente desnaturalizante iguale a la  $T_m$  de su dominio de menor temperatura de fusión, causando una desnaturalización parcial y consecuentemente un marcado retraso en su movilidad electroforética (Muyzer y Smalla, 1998).

Cuando la electroforesis de una mezcla de fragmentos de ADN amplificados con cebadores universales mediante PCR, a partir de ADN total extraído de una muestra ambiental, se realiza en condiciones adecuadas en geles de poliacrilamida bajo un gradiente lineal de desnaturalización, las moléculas de ADN con distinta secuencia se desnaturalizan parcialmente a distintas alturas del gradiente (Figura 3) y por lo tanto, se detienen en su migración electroforética en distintas posiciones en el gel (Muyzer y Smalla, 1998; Muyzer, 1999).



**Figura 3.** Esquema de la aplicación de la técnica de DGGE para el estudio de la biodiversidad microbiana de los ecosistemas

De esta forma se obtienen perfiles de bandas que se corresponden con el número de miembros predominantes en la comunidad microbiana. Una vez separadas, las bandas correspondientes a distintas secuencias de ADN pueden reamplificarse con los mismos cebadores y ser secuenciadas, permitiendo la comparación de las nuevas secuencias con las ya depositadas en las bases de datos, siendo posible establecer su afiliación taxonómica.

La técnica de DGGE representa uno de los métodos de elección para el análisis de mutaciones de ADN de doble cadena y ha sido empleado en un amplio espectro de aplicaciones.

Entre las ventajas del DGGE se encuentran la gran sensibilidad de detección de mutaciones (90%) y la posibilidad de investigar la diversidad de una población microbiana natural sin necesidad de aislar y estudiar individualmente sus componentes.

El DGGE permite el análisis simultáneo de las muestras múltiples que permiten seguir cambios de la comunidad en un cierto plazo, y también permite la comparación de los perfiles de biodiversidad de la población, evaluando diferencias espaciales y temporales en un determinado nicho ecológico. Hoy en día se considera una técnica de elección para la caracterización de poblaciones naturales, en las que un porcentaje alto de los microorganismos presentes pueden ser no cultivables (Muyzer, 1999). Por otra parte, esta

técnica ha resultado particularmente útil para la identificación de los miembros dominantes en la comunidad (Lindström y Leskinen, 2002).

Sin embargo, la técnica de DGGE presenta varias desventajas. La primera de ellas está relacionada con los errores introducidos por los procedimientos de la extracción del ADN total de la muestra y su posterior amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) (Suzuki y Giovannoni 1996; Wintzingerode y col., 1997; Crosby y Criddle, 2003) ya que son los principales procedimientos en que se basa la técnica de DGGE.

Se estima que la técnica de DGGE sólo puede detectar entre 1 y 2% de las especies totales de una comunidad, es decir, sólo las especies dominantes (MacNaughton y col., 1999; Muyzer, 1999). Además, los distintos fragmentos de ADN que difieren en su secuencia pueden presentar características similares de movilidad dentro del gel de poliacrilamida, por tanto, los diferentes fragmentos migran juntos, dificultando la diferenciación (Gelsomino y col., 1999). Por otro lado, una misma especie puede llegar a generar más de una banda en el perfil de DGGE debido a la existencia de múltiples copias del gen del ARNr 16S que difieren ligeramente en sus secuencias (Gelsomino y col., 1999; Niemi y col., 2001).

Otro inconveniente es la limitación relativa al tamaño máximo de los fragmentos a separar (500pb). La opción inicial se basa en la amplificación de fragmentos del gen del ARNr 16S y específicamente la región hipervariable V1-V3 diseñando parejas de cebadores universales (Heuer y col., 1997).

Por lo tanto el empleo de estos cebadores universales para el análisis del gen del ARNr 16S tiene una gran limitación en caso de muestras con elevada diversidad, siendo muy difícil el aislamiento de bandas individuales para su reamplificación y secuenciación (Muyzer y Smalla, 1998). Sin embargo y en numerosos casos, se han diseñado parejas de cebadores para la amplificación selectiva de fragmentos del gen del ARNr 16S de distintos grupos microbianos como por ejemplo: *Cyanobacteria* (Nubel y col., 1997); bacterias oxidadoras de amonio (Kowalchuk y col., 1997); *Agrobacterium-Rhizobium* (Muyzer y Smalla, 1998); actinomicetos (Heuer y col., 1997) y bacterias reductoras de sulfato (Teske y col., 1996).

Igualmente empleando genes funcionales como base del estudio de la biodiversidad, el DGGE proporciona patrones de diversidad genética para el gen funcional estudiado, permitiendo el análisis de actividades determinadas de comunidades específicas.

Este tipo de investigación ha facilitado la discriminación entre microorganismos filogenéticamente cercanos pero con diferentes papeles ecológicos (Muyzer, 1999; Muyzer y Smalla, 1998). Por ejemplo se han podido diferenciar reductores de sulfato, mediante amplificación de fragmentos del gen codificante de la enzima hidrogenasa [NiFe] (Wawer y col., 1997); degradadores de fenol, mediante amplificación del gen que codificante de la enzima fenol-hidrolasas [LmPH] (Watanabe y col., 1998) y oxidadores de amonio, mediante

amplificación del gen *amoA* codificante de la enzima amonio-monooxigenasa (Rotthauwe y col., 1997).

## II. 2. Hibridación *in situ* de fluorescencia con un sistema de deposición del receptor catalizado (CARD-FISH)

Otras alternativas para estudiar la diversidad microbiana y más precisamente cuantificar la comunidad microbiana en un ecosistema, es usar sondas de oligonucleótidos para detectar y cuantificar una población microbiana sin la necesidad de cultivarla. Una de las técnicas más avanzadas en este campo es la técnica de hibridación *in situ* de fluorescencia con un sistema de deposición del receptor catalizado también llamada CARD-FISH (Catalysed Reporter Deposition *In Situ* Fluorescence Hybridization) (Amann y col., 1990; DeLong y col., 1989).

Esta técnica consiste en la unión de la técnica CARD (Catalyzed Reporter Deposition) (Bobrow y col., 1989) y la técnica FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) (Perenthaler y col., 2002) (Figura 4).

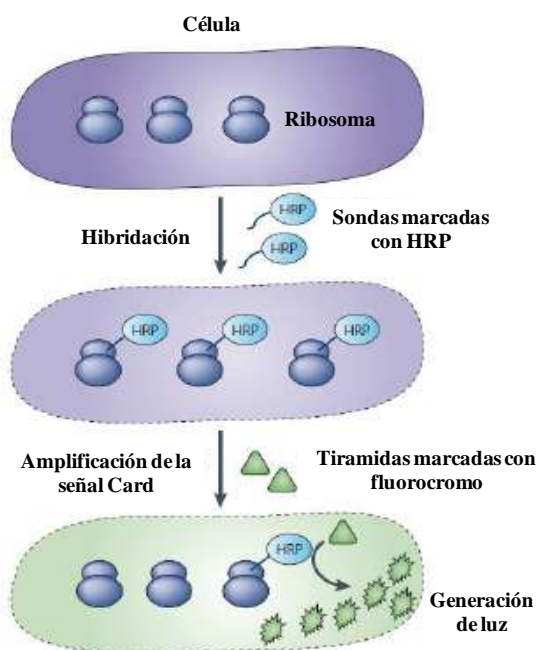


Figura 4. Esquema de la técnica CARD-FISH (Amann y Bernhard, 2008)

En esta técnica se utilizan sondas de ARNr específicas para un microorganismo, marcadas con la enzima HRP (peroxidasa de rábano o horseradish peroxidase). A continuación, se añaden moléculas de tiramida marcadas con un fluorocromo, produciendo intermediarios altamente reactivos que son capaces de unirse a motivos de proteínas tales como tirosinas que se encuentran cerca del sitio de la unión de la sonda, de modo que existieran muchas moléculas fluorescentes en la proximidad del sitio de unión de la sonda y, por tanto, se producirá una alta intensidad de la señal, lo cual mejora la sensibilidad (Pernthaler y col., 2002).

Sin embargo, al igual que ocurre con todas las técnicas de biología molecular, los procedimientos que se llevan a cabo para realizar la técnica CARD-FISH también presentan algunas desventajas con respecto a la técnica FISH que hay que tener en cuenta. En el paso de fijación de las células, la penetración de las sondas marcadas con peroxidasa de rábano es más difícil debido a que estas peroxidases tienen un tamaño mayor que los fluorocromos utilizados en la técnica FISH. Este hecho llevó a cabo a la elaboración de varios protocolos de fijación de las células, los cuales incluyen tratamientos enzimáticos con lisozima, proteinasa K y acromopeptidasa (Kubota y col., 2008) según el tipo de células a estudiar.

### **III. Ambientes hipersalinos**

#### *III. 1. Concepto*

El concepto de ambiente extremo ha sido tradicionalmente difícil de definir debido a la complejidad y subjetividad del término. En 1979 Brock introdujo la definición de los ambientes extremos, desde un punto de vista taxonómico, como ambientes en los que existe una escasa diversidad de especies y en los que están ausentes algunos grupos taxonómicos.

Los ambientes hipersalinos se consideran ambientes extremos y son aquellos que presentan una elevada concentración de sales (mucho más alta que la del agua del mar). Además del alto contenido en iones, estos ambientes se pueden caracterizar por valores extremos de otros factores ambientales tales como la temperatura, pH, oxígeno, radiaciones solares y concentración de nutrientes, y la presencia de metales pesados y otros compuestos tóxicos (Rodríguez-Valera, 1988).

Los ambientes hipersalinos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y representados principalmente por hábitats acuáticos y suelos hipersalinos (Ventosa y col., 2008) aunque también se engloban en esta categoría las áreas salobres próximas a los yacimientos petrolíferos, algunas plantas del desierto, las minas de sal y una gran variedad de productos en salmuera o salazón (Grant y col., 1998; Ventosa, 2006).

Se consideran aguas hipersalinas aquellas que tienen un contenido en sales superior al agua del mar (Rodríguez-Valera, 1988), es decir, superiores a un 3,5%, (p/v) de sales totales, aproximadamente. Dependiendo de la composición salina, según sea cualitativamente similar a la de los océanos o diferente, los hábitats acuáticos hipersalinos se clasifican en talasohalinos o atalasohalinos (Rodríguez-Valera, 1988).

Los ambientes talasohalinos como las salinas se originan por procesos de evaporación del agua de mar y reflejan la composición iónica de ésta durante los pasos iniciales de evaporación. La composición iónica comienza a cambiar significativamente cuando los procesos de evaporación alcanzan el límite de solubilidad del sulfato de calcio ( $\text{CaSO}_4$ ). Durante la subsecuente precipitación de cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) la composición iónica cambia nuevamente, y la concentración relativa de potasio ( $\text{K}^+$ ) y magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) se incrementa. Los ambientes talasohalinos se caracterizan por presentar pH neutro o ligeramente alcalino (Oren, 2006a).

Los ambientes atalasohalinos destacan por presentar una composición iónica que puede variar significativamente con respecto al agua de mar. Podemos citar el Mar Muerto como ejemplo de este tipo de hábitats, donde dominan los cationes divalentes, con concentraciones de magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) que exceden las concentraciones de sodio ( $\text{Na}^+$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ) (Oren, 2006a).

Dentro de los ambientes atalasohalinos se encuentran hábitats con altas concentraciones de sal y valores de pH elevados, como el Lago Magadi en Kenia, el Wadi Natrun en Egipto, el lago Mono y el lago Owens en los Estados Unidos.

Según Kaurichev (1980), los suelos salinos son aquellos que contienen una concentración de sales superior al 0,2%, (p/v). Entre ellos se encuentran las zonas aledañas a diversos ambientes de aguas hipersalinas.

En España existen numerosas salinas litorales en todas las provincias con costa y otras interiores que se alimentan de manantiales salinos. A modo de ejemplo podemos citar las salinas de Cabo de Gata (Almería), Coto de Doñana (Huelva), Torrevieja (Alicante) y la salina interior de La Malahá (Granada) (Figura 5).

Igualmente en Marruecos, también hay numerosas salinas, como por ejemplo las salinas de Larache, Souk larbaâ, Asilah y la salina Brikcha en Chefchaouen. La mayoría de los lugares citados han sido objeto de estudio de la presente tesis doctoral.

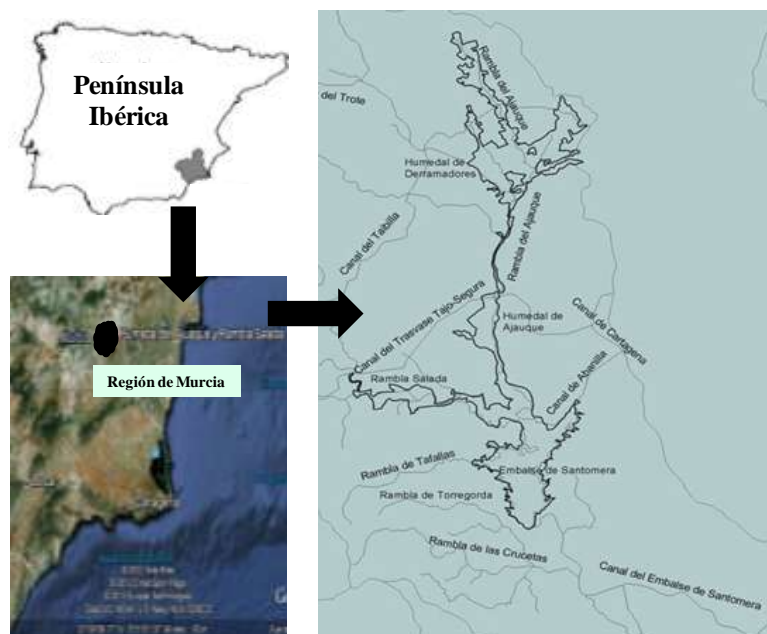


**Figura 5.** Diversos ambientes hipersalinos. **a.** Salinas de cabo de Gata (Almería). **b.** Salina de La Malahá (Granada) **c.** Salinas de Brikcha en Chefchaouen (Marruecos). **d.** Salinas de Larache (Marruecos). **e.** Coto de Doñana (Huelva). **f.** Salina de Torrevieja (Alicante)

### *III. 2. Rambla Salada*

Rambla Salada pertenece al Humedal de Ajauque y Rambla Salada y representa un ambiente hipersalino de gran valor ecológico; este paisaje está protegido por la Ley 4/1992 de Ordenación y Protección del Territorio de la Región de Murcia. En el año 2000 Rambla Salada fue declarada Zona de Especial Protección para las Aves (ZEPA, ES0000195) por la importante colonia de cigüeñuelas, además de Lugar de Importancia Comunitaria (LIC, ES6140005). Por otra parte, Rambla Salada es un hábitat atalasohalino con ambientes acuáticos y terrestres de distinta concentración y composición salina, en los que nunca antes se había realizado un estudio de la diversidad procariota.





**Figura 6.** Situación geográfica de Rambla Salada. Imagen tomada de la Dirección General de Patrimonio Natural y Biodiversidad de la Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia

El Humedal de Ajaque y Rambla Salada tiene una extensión de 1.632 hectáreas que pertenecen a los municipios de Abanilla, Fortuna, Santomera y Molina de Segura (Figura 6). Este paisaje se inicia en Los Baños de Fortuna. En este sector predominan los cauces fluviales, los barrancos, y las vaguadas, encajadas entre conglomerados y margas.

Respecto a Rambla Salada, ésta nace en el término municipal de Molina de Segura, aunque en el LIC sólo se incluye su último tramo, un poco antes de su paso por el paraje conocido como La Hoya de los Rayos, donde se cruza la Rambla con el canal del Tránsito Tajo-Segura. Se trata de un cauce de aguas permanentes hipersalinas con la margen derecha excavada en yesos, y la margen izquierda en relieves margosos y conglomerados. Sobre los yesos son frecuentes los procesos de disolución kárstica.

La salinidad en Rambla Salada se debe principalmente al mioceno evaporítico y yesífero y a los depósitos margosos de la cuenca (Muller y Hsü, 1987). Los iones dominantes en la corriente de agua son el sodio y el cloro, seguido por el sulfato y el calcio (Ramírez-Díaz y col., 1995).

Este complejo hábitat es considerado un tipo de humedal asociado a las ramblas que constituyen el sistema de cabecera de Ajaque, y presenta una compleja red de drenaje con tramos de aguas permanentes y temporales y una gran variedad en los valores de salinidad del agua, como consecuencia del sustrato geológico-litológico.

Este humedal se asienta sobre materiales sedimentarios blandos que favorecen la presencia de fenómenos de erosión muy peculiares en algunos casos, con paisajes geomorfológicos de gran valor natural formados por numerosas galerías bajo unas condiciones de sequía extrema y una gran irregularidad interanual en las precipitaciones y ocasionales lluvias torrenciales.

Podemos destacar también las formaciones geológicas que tienen un gran valor como por ejemplo, los afloramientos volcánicos de fortunitas en los Cabecicos Negros de Fortuna y el yacimiento geotérmico, que da origen a las aguas termales en los Baños de Fortuna.

El agua suele ser bastante salina como consecuencia del sustrato geológico-litológico alcanzando valores de hasta 40g/l. Los suelos salinos presentan en algunos casos características especiales como los presentes en la zona de los Baños de Fortuna, con aguas termales o los de Fortunitas de Cabecicos Negros con rocas volcánicas.

La flora y la fauna son un tanto singulares y es en muchos casos endémica. En los tramos de aguas permanentes, las condiciones de salinidad limitan en gran medida la presencia de vegetación acuática sumergida, representada por diversas algas y la planta *Ruppia marítima*. En las zonas encharcadas de los humedales abundan las quenopodiáceas, *Anthrocnemum macrostachyum* y *Sacocornia fruticosa*, y más alejadas del agua se encuentran *Anabasis hispanica*, las siemprevivas (*Limonium* spp.) y los tarajes (*Tamarix canariensis* y *T. boveana*). En los taludes de las ramblas se encuentran formaciones halonitrófilas constituidas por *Atriplex glauca*, *Suaeda vera* (sosa), *Thymelaea hirsuta* (bolaga), *Lygeum spartum* (albardín), acompañados por diferentes especies de *Artemisa*, *Atriplex halimus* (orgaza), *Frankenia corymbosa*, etc.

La fauna presente en este hábitat es muy rica y variada. Entre ellas, hay que destacar los invertebrados acuáticos, siendo las larvas de dípteros los más abundantes, aunque las especies más interesantes pertenecen al grupo de los heterópteros y coleópteros. El inventario faunístico de este paisaje lo constituyen 145 especies de aves, 18 especies de mamíferos, 14 de reptiles y 3 de anfibios. Dos especies (*Porrón pardo* y *Malvasía cabeciblanca*) están catalogadas como globalmente amenazadas a nivel mundial.

El embalse de Santomera y zonas encharcadas de Rambla Salada y Ajauque acogen poblaciones de aves acuáticas como el ánade real y la garza real que permanecen todo el año; otros son especies habituales como el chorlitejo patinegro y la cigüeñuela, sin embargo, otras especies aparecen en otoño e invierno como el zampullín cuellinegro.

Una información más exhaustiva acerca de este Paisaje Protegido puede obtenerse de la Dirección General de Patrimonio Natural y Biodiversidad, Consejería de Agricultura y Agua, de la Región de Murcia (<http://www.murcianatural.carm.es>).

Actualmente se sabe que los medios atalasoalinos (aguas y suelos) son fuente de nuevos microorganismos, y también que es en la rizosfera donde existe una gran concentración de

microorganismos que juegan un papel importante en la fertilidad de los suelos. Además, Rambla Salada se caracteriza por presentar grandes cambios estacionales; por ejemplo, grandes variaciones en la concentración de salinidad por la entrada de agua dulce procedente de la desviación de canales de agua para riego. Esto puede provocar cambios importantes en el funcionamiento de este complejo sistema biológico. Por ejemplo, ha registrado una disminución de la biomasa de algas epipélicas y el incremento de *Cladosphora glomerata*; estos cambios podrían dar lugar a un aumento de los productores primarios lo que incrementará la biomasa de macroinvertebrados (Velasco y col., 2003 y 2006; Gutierrez-Cánovas y col., 2009).

Nuestro grupo de investigación ha realizado en este hábitat varios estudios que han permitido la descripción de un gran número de nuevas especies bacterianas halófilas: *Idiomarina ramblicola* (Martínez-Cánovas y col., 2004c), *Halomonas cerina* (González-Domenech y col., 2008b) y *Halomonas ramblicola* (Luque y col., 2012b). Recientemente, también se ha descrito la diversidad de arqueas cultivables en este hábitat (Luque y col., 2012a). A la vista de toda esta información y las razones mencionadas anteriormente, nos planteamos llevar a cabo un estudio molecular de la diversidad procariota utilizando Rambla Salada como ambiente modelo de los hábitats hipersalinos.

### III. 3. Biodiversidad en ambientes hipersalinos

La mayoría de los estudios de biodiversidad de los ambientes hipersalinos realizados hasta la fecha, se han centrado en las aguas de las salinas litorales y de los lagos hipersalinos.

En los años noventa, el grupo de investigación dirigido por el profesor Rodríguez-Valera de la Universidad de Alicante fue el primero que analizó la comunidad microbiana existente en los cristalizadores (estanques donde precipita la sal) de las salinas “Bras de Port”, usando la técnica PCR y la posterior clonación del fragmento de ADN que codifica el gen del ARNr 16S. Este grupo ha podido determinar que la mayoría de las bacterias presentes eran *Proteobacterias* y que estaban relacionadas con el género *Rhodospseudomonas*, encontrando también nuevos miembros de arqueas del género *Haloarcula* (Benlloch y col., 1995).

En los hábitats hipersalinos están presentes una gran variedad de microorganismos halófilos que crecen en un amplio rango de salinidades (Rodríguez-Valera, 1988; Oren, 2002a; Benlloch y col., 2002; Casamayor y col., 2002a; Litchfield y Gillevet, 2002; Burns y col., 2004; Maturrano y col., 2006a; Feazel y col., 2008; Ventosa y col., 2008; Rosselló-Mora y col., 2008).

El estudio de la diversidad microbiana de ambientes hipersalinos reveló una alta densidad celular ( $10^6$ - $10^8$  células/ml), y una productividad muy elevada (Oren, 2002a; Burns y col., 2004; Demergasso y col., 2008; Clementino y col., 2008). Los microorganismos que

dominan en los ambientes hipersalinos pertenecen al Dominio *Archaea*, concretamente al orden *Halobacteriales* (Ochsenreiter y col., 2002; Burns y col., 2004).

Respecto al Dominio *Bacteria*, se han encontrado especies de bacterias pertenecientes a los phyla *Proteobacteria* (Maturrano y col., 2006a; Pagaling y col., 2009) y *Bacteroidetes* (Antón y col., 2000; Jiang y col., 2006; Antón y col., 2008; Baati y col., 2008; Demargasso y col., 2008; Clementino y col., 2008; Sabet y col., 2009). Las bacterias pertenecientes al phylum *Cyanobacteria* encontradas se han relacionado filogenéticamente con los géneros *Euhalothece*, *Cyanothece* y *Microcoleus* (Clementino y col., 2008).

De todos estos estudios se puede deducir que la composición de la comunidad microbiana es diferente dependiendo del hábitat y se puede concluir que estas variaciones en la diversidad microbiana están relacionadas con los factores ambientales locales (Barberán y Casamayor, 2010).

Finalmente, cabe mencionar que la mayoría de los estudios de diversidad de microorganismos halófilos se han hecho basándose en las técnicas clásicas de cultivo. La introducción de estas técnicas en estudios de ecología microbiana da lugar a nuevas perspectivas y muestra que los microorganismos que se aíslan por métodos de cultivo no son en realidad los que predominan en los ambientes naturales y que la mayoría de los organismos predominantes están aún por cultivar (Antón y col., 2000; Belloch y col., 2001 y 2002; Casamayor y col., 2000a, 2002a y 2002b; Maturrano y col., 2006a; Pašić y col., 2009; Wu y col., 2010).

### III. 4. Microorganismos halófilos

Los microorganismos halófilos son organismos que están adaptados a vivir en ambientes salinos (Ventosa y Arahál, 2002). El término halófilo proviene del griego *hals* (sal) y *phil* (amigo, amor), por lo que literalmente halófilo significa *amante de la sal*, de forma más específica y aplicada a los organismos vivos, este término hace referencia a la necesidad fisiológica de sales por encima de los valores usuales para otros seres vivos.

Según Kushner y Kamekura (1988), los microorganismos se clasifican en no halófilos, halófilos débiles, moderados y extremos en función de la concentración de NaCl requerida para su desarrollo óptimo.

- **Microorganismos no halófilos**, crecen óptimamente en medios con menos de 0,2M de NaCl (>1%, p/v). Algunos pueden tolerar elevadas concentraciones de sal y se les denominan halotolerantes. Si toleran hasta una concentración salina de 2,5M de NaCl (15%, p/v), se denominan microorganismos halotolerantes extremos.



Los microorganismos halófilos extremos se encuentran fundamentalmente en el Dominio *Archaea*, orden *Halobacteriales*, familia *Halobacteriaceae* (Oren, 2006b).

Por otra parte, dentro del Dominio *Bacteria*, la familia *Halomonadaceae* (clase *Gammaproteobacteria*, orden *Oceanospirillales*) es la que incluye mayor número de halófilos moderados (Arahal y Ventosa, 2006).

➤ **Microorganismos del Dominio *Eukarya***

El Dominio *Eukarya* incluye los primeros halófilos que se descubrieron, las algas, posiblemente debido a su mayor tamaño, aunque son menos predominantes que los procariontes. En la literatura podemos encontrar un número reducido de publicaciones sobre la diversidad de estos organismos en ambientes hipersalinos (Feazel y col., 2008; Gunde-Cimerman y col., 2004, 2005a y 2005b; Javor, 1989; Pedrós-Alió, 2004; Rodríguez-Valera, 1988; Wu y col., 2009).

En general, la presencia de estos organismos y su abundancia disminuye cuanto incrementa la concentración salina en el hábitat (Ventosa, 2006).

El representante más importante de estos halófilos es el alga verde *Dunaliella* que incluye las especies halófilas moderadas *Dunaliella viridis*, *Dunaliella parva* y la especie halófila extrema *Dunaliella salina*. Esta última produce  $\beta$ -caroteno responsable en parte del color de las salinas y cuyas propiedades son explotadas en biotecnología (Oren, 2005).

Por otra parte, el alga verde *Dunaliella* se ha considerado como un excelente modelo para el estudio de la adaptación salina de las algas. Además de este alga, se han descrito otros organismos eucariotas presentes en ambientes hipersalinos como el crustáceo *Artemia salina*, las larvas de mosca del género *Ephydra*, el alga flagelada *Asteromonas gracilis*, diatomeas, hongos filamentosos (pertenecientes a los géneros *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Gymnascella*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Stachybotrys*, *Ulocladium* y *Wallemia*) y levaduras halófilas o halotolerantes (Cantrell y col., 2006; Feazel y col., 2008; Gunde-Cimerman y col., 2005b; Pedrós-Alió, 2004; Wu y col., 2009).

➤ **Microorganismos del Dominio *Archaea***

La mayor representación de los microorganismos halófilos extremos se encuentra en el Dominio *Archaea*, phylum *Euryarchaeota*, orden *Halobacteriales* (Grant y Larsen, 1989) y familia *Halobacteriaceae* (Gibbons, 1974; Tindall, 1992). Hoy en día, esta familia incluye más de 100 especies agrupadas en 27 géneros diferentes (Oren y col., 2009; de la Haba y col., 2011) (Tabla 2), entre ellos, los más estudiados son *Halobacterium*, *Halococcus*, *Haloarcula*, *Haloferax*, *Natronococcus* y *Natronobacterium*.

## Introducción

Las arqueas son los principales componentes de la biomasa microbiana que se encuentra en los ambientes hipersalinos extremos (concentración de sal superior al 20%, p/v) y son consideradas como los microorganismos halófilos extremos por excelencia. Además, debido a los pigmentos carotenoides C<sub>50</sub> (bacteriorruberrina) que se encuentran en grandes cantidades en la membrana de la mayoría de las arqueas de esta familia (Oren, 1994), estos microorganismos se consideran también los responsables de la coloración roja-anaranjada observada en la mayoría de los hábitats salinos.

**Tabla 2.** Géneros del phylum *Euryarchaeota* que contienen especies halófilas

Clase	Orden	Familia	Género
<b><i>Halobacteria</i></b>	<i>Halobacteriales</i>	<i>Halobacteriaceae</i>	<i>Haladaptatus</i>
			<i>Halalkalicoccus</i>
			<i>Halarchaeum</i>
			<i>Haloarcula</i>
			<i>Halobacterium</i> *
			<i>Halobaculum</i>
			<i>Halobiforma</i>
			<i>Halococcus</i>
			<i>Haloferax</i>
			<i>Halogeometricum</i>
			<i>Halogramum</i>
			<i>Halolamina</i>
			<i>Halomarina</i>
			<i>Halomicrobium</i>
			<i>Halonotius</i>
			<i>Halopelagius</i>
			<i>Halopiger</i>
<i>Haloplanus</i>			
<i>Haloquadratum</i>			
<i>Halorhabdus</i>			
<i>Halorubrum</i>			
<i>Halosarcina</i>			

\*, género tipo

Tabla 2. Continuación

Clase	Orden	Familia	Género
<b>Halobacteria</b>	<i>Halobacteriales</i>	<i>Halobacteriaceae</i>	<i>Halosimplex</i>
			<i>Halostagnicola</i>
			<i>Haloterrigena</i>
			<i>Halovivax</i>
			<i>Natrialba</i>
			<i>Natrinema</i>
			<i>Natronoarchaeum</i>
			<i>Natronobacterium</i>
			<i>Natronococcus</i>
			<i>Natronolimnobius</i>
			<i>Natronomonas</i>
			<i>Natronorubrum</i>
			<i>Methanohalobium</i>
			<i>Methanohalophilus</i>
			<i>Methanosalsum</i>
			<i>Methanocalculus</i>
	<i>Methanomicrobiales</i>		

\*. género tipo

Además de las haloarqueas, se han descrito también arqueas halófilas metanógenas; estas arqueas son anaerobias estrictas productoras de metano y juegan un papel importante en los ambientes hipersalinos (Balch y col., 1979). Como arqueas halófilas metanógenas se han descrito las especies de los géneros *Methanohalobium* (Zhilina y Zavarzin, 1987), *Methanohalophilus* (Paterek y Smith, 1988) y *Methanosalsum* (Boone y Baker, 2001), pertenecientes a la familia *Methanosarcinaceae*, dentro del orden *Methanosarcinales*.

Cabe resaltar que la especie *Methanocalculus halotolerans* ha sido descrita como una arquea metanógena halotolerante (Ollivier y col., 1998); hasta la fecha no ha sido asignada a ninguna familia aunque pertenece al orden *Methanomicrobiales*, por lo que se considera *incertae sedis* dentro de este orden.

Las haloarqueas se caracterizan por requerir un mínimo del 1,5M de NaCl para crecer, siendo el óptimo del 3,5 al 4,5M de NaCl; muchas de ellas son capaces de crecer a concentraciones extremas de NaCl (5,2M). Sin embargo y sorprendente, se han descrito



arqueas halófilas en hábitats con concentraciones salinas medias e incluso bajas (Purdy col., 2004).

➤ **Microorganismos del Dominio *Bacteria***

El Dominio *Bacteria* esta subdividido en más de treinta phyla de bacterias cultivables. Las especies de las bacterias halófilas moderadas y extremas se incluyen principalmente en los phyla: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes*, *Bacteroidetes*, *Thermotogae*, *Cyanobacteria* y *Tenericutes*. La mayoría son organismos de vida libre, pero también existen posibles patógenos del hombre y de otros animales, endosimbiontes de distintos organismos y formas que viven íntimamente asociadas a las plantas que habitan los suelos salinos. En la Tabla 3 se incluyen los órdenes y familias de los phyla *Proteobacteria* y *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* y *Thermotogae* que alojan la mayoría de las bacterias halófilas cultivadas hasta el momento (de la Haba y col., 2010 y <http://www.bacterio.cict.fr>).

**Tabla 3.** Géneros del Dominio *Bacteria* que contienen especies halófilas moderadas

Clase	Orden	Familia	Género
<b><i>Alfaproteobacteria</i></b>	<i>Caulobacterales</i>	<i>Hyphomonadaceae</i>	<i>Hyphomonas*</i> , <i>Maribaculum</i> <i>Rhodovulum</i> , <i>Antarctobacter</i> <i>Citreimonas</i> , <i>Jannaschia</i> <i>Maribius</i> , <i>Marivita</i> <i>Methylarcula</i> , <i>Oceanibulbus</i> <i>Oceanicola</i> , <i>Palleronia</i> <i>Paracoccus</i> , <i>Ponticoccus</i> <i>Rhodothalassium</i> , <i>Rhodovulum</i> <i>Roseinatronobacter</i> , <i>Roseisalinus</i> , <i>Sediminimonas</i> , <i>Shimia</i> , <i>Sulfitobacter</i> , <i>Tropicibacter</i> , <i>Woodsholea</i> , <i>Yangia</i>
	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	
		<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Dichotomicrobium</i>
		<i>Rhodobiaceae</i>	<i>Rhodobium*</i>
	<i>Rhodospirillales</i>	<i>Rhodospirillaceae</i>	<i>Marispirillum</i> , <i>Fodinicurvata</i> <i>Rhodovibrio</i> , <i>Roseospira</i>
<b><i>Gammaproteobacteria</i></b>	<i>Alteromonadales</i>	<i>Alteromonadaceae</i>	<i>Alteromonas*</i> , <i>Aestuariibacter</i> <i>Glaciecola</i> , <i>Haliea</i> , <i>Marinobacter</i> , <i>Marinobacterium</i> , <i>Melitea</i> , <i>Microbulbifer</i>

\*, género tipo

Tabla 3. Continuación

Clase	Orden	Familia	Género
<b>Gammaproteobacteria</b>	<i>Alteromonadales</i>	<i>Idiomarinaceae</i>	<i>Idiomarina</i> *, <i>Pseudidiomarina</i>
		<i>Pseudoalteromonadaceae</i>	<i>Pseudoalteromonas</i> *
		<i>Psychromonadaceae</i>	<i>Psychromonas</i> *
	<i>Chromatiales</i>	<i>Chromatiaceae</i>	<i>Halochromatium</i> , <i>Marichromatium</i> , <i>Thiohalocapsa</i>
		<i>Ectothiorhodospiraceae</i>	<i>Ectothiorhodospira</i> *, <i>Alkalilimnicola</i> , <i>Aquisalimonas</i> , <i>Arhodomonas</i> , <i>Ectothiorhodosinus</i> , <i>Thioalkalivibrio</i>
		<i>Halothiobacillae</i>	<i>Halothiobacillus</i> * <i>Thioalkalibacter</i>
		<i>Oceanospirillales</i>	<i>Oceanospirillaceae</i>
	<i>Oceanospirillales</i>	<i>Alcanivoraceae</i>	<i>Alcanivorax</i> *
		<i>Hahellaceae</i>	<i>Halospina</i>
		<i>Halomonadaceae</i>	<i>Halomonas</i> *, <i>Aidingimonas</i> , <i>Carnimonas</i> , <i>Chromohalobacter</i> , <i>Cobetia</i> , <i>Kushneria</i> , <i>Modicisalibacter</i> , <i>Salinicola</i>
		<i>Saccharospirillaceae</i>	<i>Saccharospirillum</i> *
		<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
	<i>Salinisphaerales</i>	<i>Salinisphaeraceae</i>	<i>Salinisphaera</i> *
	<i>Thiotrichales</i>	<i>Piscirickettsiaceae</i>	<i>Thiomicrospira</i>
<i>Vibrionales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Salinivibrio</i>	
<b>Gammaproteobacteria no clasificadas</b>			<i>Methylohalomonas</i> , <i>Gilvimarinus</i> , <i>Thiohalomonas</i> <i>Thiohalophilus</i>
<b>Deltaproteobacteria</b>	<i>Desulfobacterales</i>	<i>Desulfobacteraceae</i>	<i>Desulfocella</i>
		<i>Desulfobulbaceae</i>	<i>Desulfurivibrio</i>
	<i>Desulfovibrionales</i>	<i>Desulfohalobiaceae</i>	<i>Desulfohalobium</i> * <i>Desulfonatronospira</i>

\*, género tipo

**Tabla 3.** Continuación

Clase	Orden	Familia	Género	
<b>Deltaproteobacteria</b>	<i>Desulfovibrionales</i>	<i>Desulfohalobiaceae</i>	<i>Desulfovermiculus</i>	
		<i>Desulfovibrionaceae</i>	<i>Desulfovibrio*</i>	
<b>Epsilonproteobacteria</b>	<i>Campylobacterales</i>	<i>Campylobacteraceae</i>	<i>Arcobacter</i>	
		<i>Helicobacteraceae</i>	<i>Sulfurimonas Sulfurovum</i>	
<b>Bacilli</b>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Halobacillus, Bacillus*</i> , <i>Alkalibacillus,</i> <i>Aquisalibacillus,</i> <i>Filobacillus,</i> <i>Gracilibacillus,</i> <i>Halalkalibacillus,</i> <i>Halolactibacillus,</i> <i>Lentibacillus,</i> <i>Marinococcus,</i> <i>Oceanobacillus,</i> <i>Ornithinibacillus,</i> <i>Paraliobacillus,</i> <i>Pontibacillus,</i> <i>Salimicrobium,</i> <i>Salinibacillus, Salirhabdus,</i> <i>Salsuginibacillus,</i> <i>Sediminibacillus,</i> <i>Tenuibacillus,</i> <i>Thalassobacillus,</i> <i>Virgibacillus</i>	
			<i>Planococcaceae</i>	<i>Jeotgalibacillus</i>
			<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Salinicoccus</i>
			<i>Halanaerobiales</i>	<i>Halanaerobiaceae</i>
<b>Clostridia</b>		<i>Halobacteroidaceae</i>	<i>Halobacteroides*</i> , <i>Halanaerobacter,</i> <i>Halonatronum,</i> <i>Natrionella, Orenia,</i> <i>Selenihalanaerobacter,</i> <i>Sporohalobacterr</i>	
<b>Spirochaetes</b>	<i>Spirochaetales</i>	<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Spirochaeta*</i>	
<b>Mollicutes</b>	<i>Haloplasmatales</i>	<i>Haloplasmataceae</i>	<i>Haloplasma*</i>	
<b>Thermotogae</b>	<i>Thermotogales</i>	<i>Thermotogaceae</i>	<i>Petrotoga</i>	
<b>Actinobacteria</b>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Bogoriellaceae</i>	<i>Georgenia</i>	
		<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium*</i>	

\* , género tipo

Tabla 3. Continuación

Clase	Orden	Familia	Género
<b>Actinobacteria</b>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Glycomycaceae</i>	<i>Haloglycomyces</i>
		<i>Micrococcaceae</i>	<i>Nesterenkonia</i>
		<i>Nocardiopsaceae</i>	<i>Nocardiopsis*</i>
			<i>Haloactinospora</i>
		<i>Streptomonospora</i>	
		<i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Isoptericola</i>
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Amycolatopsis, Prauserella</i>		
	<i>Saccharomonospora</i>		
		<i>Saccharopolyspora</i>	
		<i>Ruaniaceae</i>	<i>Haloactinobacterium</i>
<b>Bacteroidia</b>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Marinilabiaceae</i>	<i>Anaerophaga</i>
<b>Flavobacteria</b>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Gramella, Psychroflexus</i>
<b>Sphingobacteria</b>	<i>Sphingobacteriales</i>	<i>Rhodothermaceae</i>	<i>Salisaeta</i>

\*, género tipo

En general, la mayoría de las bacterias halófilas son quimioorganotrofas, excepto algunas que son fotótrofas (Pedrós-Alió y col., 2000; Oren, 2002a y 2002b; Srinivas y col., 2007; Gorlenko y col., 2009).

Dentro de los phyla citados anteriormente, existen grupos taxonómicos que incluyen un elevado número de especies halófilas como es el caso de la familia *Halomonadaceae* (Arahal y Ventosa, 2006) o del orden *Halanaerobiales*.

Actualmente, el género *Halomonas* es el tipo de la familia *Halomonadaceae* y sin duda el que aloja más bacterias halófilas; contiene más de ochenta especies (<http://www.bacterio.cict.fr/h/halomonas.html>) (Euzéby, 2013). La mayoría de las especies de *Halomonas* han sido aisladas de los distintos hábitats salinos que existen en la naturaleza, aunque también existen otras que han sido aislados de alimentos, pinturas murales, etc. Este género ha sido un objetivo de estudio de la presente tesis y de él hablaremos con más detalle más adelante.

Cabe mencionar que algunas bacterias halófilas son extremas, es decir requieren altas concentraciones de sal para su crecimiento. Entre ellas citamos la bacteria halófila extrema *Salinibacter ruber* (Antón y col., 2000) que es un *Bacteroidete* aislado inicialmente de los cristalizadores de salinas de Alicante y Mallorca; esta bacteria ha sido estudiada con profundidad con el objeto de conocer su distribución, abundancia, diversidad y fisiología (Antón y col., 2000, 2002, 2005 y 2008; Bidle y col., 2005; Balashov y Lanyi, 2007; Lanyi y Balashov, 2011; Oren, 2004 y 2013). Otros estudios se enfocaron en estudiar los pigmentos

que produce esta bacteria (Oren y Rodríguez-Valera, 2001; Lutnaes y col., 2002; Balashov y col., 2005; Mongodin y col., 2005), la composición de los aminoácidos y los lípidos (Oren y Mana, 2002; Oren y Mana, 2003; Baronio y col., 2010; Lattanzio y col., 2009; Antón y col., 2010), los mecanismos de osmoadaptación (Oren y col., 2002b) y la metagenómica (Mongodin y col., 2005; Pâsić y col., 2009).

Actualmente, el género *Salinibacter* incluye tres especies (Oren, 2013) y comparte hábitats en los cristalizadores de las salinas con las arqueas halófilas de la familia *Halobacteriaceae*; de hecho coincide con ellas en muchas de sus características más significativas. Recientemente, dos nuevas especies pertenecientes a este género; *Salinibacter iranicus* y *Salinibacter luteus* han sido aisladas del lago Aran-Bidgol, (Makhdoumi-Kakhki y col., 2012a) con características de requerimiento y tolerancia a la sal semejantes a las de *Salinibacter ruber* (Makhdoumi-Kahki y col., 2012a).

*Salinibacter* no sólo representa del 5 al 30% de la población procariota de los cristalizadores, sino que es un microorganismo diverso y bastante ubicuo. Así, constituye una fracción importante de la microbiota de las salinas de España (Antón y col., 2002; Benloch y col., 2002), Turquía (Mutlu y col., 2008), Brasil y México (Clementino y col., 2008; Sabet y col., 2009; Spear y col., 2003), India (Manikandan y col., 2009), Israel (Elevi Bardavid y col., 2007; Sørensen y col., 2005) y de los Estados Unidos (Elevi Bardavid y col., 2007; Pašić y col., 2009).

Existen otras bacterias halófilas extremas como por ejemplo las bacterias púrpuras fotótrofas del género *Halorhodospira* (Imhoff y Süling, 1996; Hirschler-Réa y col., 2003), las especies pertenecientes al género *Salicola*; por ejemplo *Salicola marasensis* (Maturrano y col., 2006b) y *Salicola salis* (Kharroub y col., 2006), la bacteria oxidadora del azufre *Thiohalorhabdus denitrificans* (Sorokin y col., 2008) y algunos microorganismos anaerobios del orden *Halanaerobiales* como *Halanaerobacter lacunarum* (Rainey y col., 1995).

Para una revisión más completa sobre los microorganismos halófilos pertenecientes al Dominio *Bacteria*, se pueden consultar los trabajos publicados por de la Haba y col. (2011); Dworkin y col. (2007); Garrity y col. (2005a y 2005b); Oren y col. (2002a) y Ventosa y col. (2008).

Finalmente, cabe resaltar también la presencia de virus en los ambientes hipersalinos (Porter y col., 2005; Seaman y Day, 2007) fundamentalmente los virus de haloarqueas (denominados halovirus) y los bacteriófagos de bacterias halófilas moderadas. Recientemente, se han publicado trabajos sobre el metaviroma de la salina “Bras del Port”, en Alicante, (Santos y col., 2010; García-Heredia y col., 2012); en la cual se recuperó el halofago CR30, cuyas características en contenido en guanina y citosina y en el uso de codones son similares a las de *Haloquadratum walsbyi* (Santos y col., 2007).

➤ El género *Halomonas*

Fue descrito por Vreeland y col en 1980 para acomodar una nueva especie, *Halomonas elongata*. En los años noventa, se propuso la reunión de los miembros de los géneros *Deleya*, *Halovibrio* y *Volcaniella*, así como la especie *Paracoccus halodenitrificans* en un solo género, el género *Halomonas*, dentro de la familia *Halomonadaceae* que fue creada en 1988 para englobar los géneros *Deleya* y *Halomonas* (Franzmann y col., 1988). Esta reclasificación se basó fundamentalmente en el análisis de las secuencias del gen del ARNr 16S (Mellado y col., 1995; Dobson y Franzmann, 1996).

Posteriormente, otros estudios de filogenia basados en el gen del ARNr 23S (Arahal y col., 2002b) condujeron a nuevas reordenaciones en el género *Halomonas*, transfiriéndose la especie *Halomonas marina* a un nuevo género dentro de la familia *Halomonadaceae* al cual se denominó *Cobetia* (Arahal y col., 2002a). En este mismo estudio se vio que dentro del género *Halomonas* se podían distinguir dos filotipos, y que algunas especies como *Halomonas marisflavi* no podían ser asignadas a ninguno de ellos filogenéticamente. En la Tabla 4, se muestran los miembros actuales de la familia *Halomonadaceae*, perteneciente a la clase *Gammaproteobacteria*.

**Tabla 4.** Géneros de la familia *Halomonadaceae* válidamente publicados hasta febrero de 2013

Género	Nº de especies	Referencia especie Tipo
<i>Carnimonas</i>	1	Arahal y col. (2002b)
<i>Chromohalobacter</i>	10	Ventosa y col. (1989)
<i>Cobetia</i>	6	Arahal y col. (2002a)
<i>Halomonas</i>	84	Vreeland y col. (1980)
<i>Halotalea</i>	1	Ntougias y col. (2007)
<i>Halovibrio</i>	3	Fendrich (1989)
<i>Kushneria</i>	5	Sánchez-Porro y col. (2009)
<i>Modicisalibacter</i>	1	Ben Ali Gam y col. (2007)
<i>Salicola</i>	2	Maturrano y col. (2006b)
<i>Zymbacter</i>	1	Okamoto y col. (1995)

Actualmente, el género *Halomonas* como ya indicamos anteriormente contiene más de ochenta especies (<http://www.bacterio.cict.fr/h/halomonas.html>), doce de las cuales han sido descritas por nuestro grupo de investigación (Euzéby, 2013), produciéndose un incremento notable en el número de especies pertenecientes a este taxón cada año.

La heterogenicidad observada en cuanto a las características del género *Halomonas*, se ha hecho aún más acusada con la incorporación de nuevas especies. Fenotípicamente esta diversidad fue recogida hace unos años en el trabajo de Mata y col. (2002). Las especies de este género son bacilos o cocobacilos quimioheterótrofos Gram negativos, presentan un óptimo de crecimiento en medios con una concentración salina comprendida entre el 0,5 y 2,5M de NaCl (Arahal y col., 2007), son catalasa positivos y no forman esporas. Tienen un metabolismo respiratorio, utilizando el oxígeno como aceptor final de electrones, si bien algunos de sus miembros pueden crecer en anaerobiosis en presencia de nitrato e incluso nitrito, y algunas especies pueden presentar un metabolismo fermentador. Las especies de *Halomonas* son muy versátiles desde el punto de vista ecológico, fisiológico y metabólico. En cuanto al contenido en guanina y citosina, la variación es muy superior a 10 moles %, que es lo recomendado por Owen y Pitcher (1985) para miembros de un mismo género.

El género *Halomonas* representa uno de los taxones que se aísla más frecuentemente en todos los ambientes acuáticos hipersalinos como las salinas solares de Australia, Sinaí y Egipto, el Mar Rojo y los lagos salinos alcalinos del Valle del Rift en África (Vreeland, 1992; Grant y col., 1998; Litchfield, 2004), y en suelos hipersalinos (Bouchotroch y col., 2001; Martínez-Cánovas y col., 2004a y 2004b; Ventosa y col., 2008; González-Domenech y col., 2008a; 2008b y 2009; Amjres y col., 2011; Llamas y col., 2011; Luque y col., 2012b). Se ha encontrado también en alto número en el Océano Pacífico (Kaye y Baross, 2000).

*Halomonas* representa un de los taxones más interesantes por su capacidad de producir exoenzimas, exopolisacáridos y otros productos valiosos desde el punto de vista biotecnológico (Mellado y col., 2004; Oren, 2010; Quesada y col., 2004; Ventosa, 2004). Podemos citar como ejemplo la especie *Halomonas eurihalina* (Béjar y col., 1998; Martínez-Checa y col., 2007,) y la especie *Halomonas maura* (Arias y col., 2003; Llamas y col., 2006) que son especies productoras de exopolisacáridos de gran interés biotecnológico.

El maurano, producido por *Halomonas maura*, es un EPS de propiedades semejantes a las del xantano; es decir, produce soluciones de alta viscosidad (Bouchotroch y col., 2000; Arias y col., 2003; Quesada y col., 2004). Los EPS de las cepas de *Halomonas eurihalina* son capaces de gelificar a pH ácido y poseen capacidad emulsionante (Quesada y col., 1993; Calvo y col., 1995; Béjar y col., 1996 y 1998; Calvo y col., 1998; Quesada y col., 2004). Los EPSs producidos por *Halomonas ventosae* y *Halomonas anticariensis* tienen una capacidad emulgente excelente (Mata y col., 2006 y 2008). El EPS de la cepa HK30 de *Halomonas stenophila* presenta una elevada actividad viscosizante y emulgente (Amjres y col., 2010), y el de la cepa M8<sup>T</sup> de *Halomonas almeriensis* tiene una alta capacidad emulgente y desintoxicante (Llamas y col., 2012). Finalmente el polímero B100 de *Halomonas stenophila* induce selectivamente la apoptosis en células T de leucemia humana (Ruiz-Ruiz y col., 2011).

Otros de los productos que se obtienen a nivel industrial a partir de especies de *Halomonas* es la ectoína (Oren, 2010). También se han realizado diferentes estudios en los que se seleccionaron cepas correspondientes al género *Halomonas* productoras de amilasas, DNasas, lipasas, proteasas y pululanasas (Sánchez-Porro y col., 2003).

A la vista de la importancia del género *Halomonas*, además de su gran interés biotecnológico, su versatilidad y su ubicuidad en todos los ambientes hipersalinos, en la presente tesis, hemos realizado estudios moleculares sobre la diversidad de este género en varios ambientes salinos y no salinos.





## **OBJETIVOS**



Nuestro grupo de investigación ha estudiado desde los años ochenta los hábitats hipersalinos por métodos clásicos de cultivo y ha descrito en ellos una veintena de especies y dos géneros de bacterias halófilas.

En 2005, gracias al proyecto “Estudio de la comunidad de procariotas de Rambla Salada (Murcia), un espacio protegido de interés ecológico y comunitario. Selección de bacterias de utilidad industrial y ecológica” CGL2005-05947 comenzamos a estudiar la diversidad procariota en Rambla Salada por métodos moleculares, así como la de otros hábitats de España y del norte de Marruecos. Con el proyecto “Origen, biodiversidad y biogeografía de las especies del género *Halomonas*” CGL2008-02399/BOS, analizamos en dichos hábitats la diversidad de un género frecuentemente aislado por técnicas clásicas de cultivo en ambientes hipersalinos, *Halomonas*.

Esta tesis doctoral engloba parte de la investigación realizada en ambos proyectos. En ella se analiza la diversidad de bacterias, arqueas y *Halomonas* en seis hábitats salinos de España y Marruecos.

Los objetivos son los siguientes

1. Estudiar la comunidad procariota de hábitats salinos de diferentes localizaciones de España y Marruecos.
2. Profundizar en el estudio de Rambla Salada y en el efecto que diferentes parámetros ambientales y temporales tienen en la misma.

Durante el desarrollo del objetivo 1 incluimos en nuestro trabajo el estudio de un hábitat no salino, un suelo agrícola de la provincia de Granada, que fue estudiado con fines comparativos.

El estudio de Rambla Salada puede abordarse con más profundidad porque este ambiente ha sido estudiado extensamente por nuestro grupo de investigación con métodos clásicos de cultivo.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## I. Selección de los hábitats y toma de muestras

Los hábitats objeto de estudio se han seleccionado de acuerdo a su situación geográfica y a sus características físico-químicas. Escogimos tres hábitats hipersalinos de España, la salina de Cabo de Gata (Almería), la salina interior de La Malahá (Granada), y Rambla Salada (Murcia), así como tres hábitats hipersalinos del norte de Marruecos (salinas de Larache, Souk larbaâ y Asilah). El hábitat no salino fue un suelo agrícola situado en Motril (Granada). Los hábitats estudiados se muestran en la Figura 8.



**Figura 8.** Imágenes de los hábitats estudiados. **a**, Salinas de Cabo de Gata (Almería); **b**, Salina interior de La Malahá (Granada); **c**, Rambla Salada (Murcia); **d**, Suelos agrícolas de Motril (Granada); **e**, Salinas de Larache (Marruecos); **f**, Salinas de Souk larbaâ (Marruecos) y **g**, Salinas de Asilah (Marruecos)



Se analizaron un total de 38 muestras procedentes de suelos, aguas y sedimentos acuosos. El tipo y el número de las muestras se describen en la Tabla 5. En las muestras estudiadas se determinaron los valores de concentración salina y del pH. La conductividad de las muestras se realizó en el departamento de Edafología de la Facultad de Farmacia, de la Universidad de Granada.

**Tabla 5.** Hábitats estudiados y tipo de muestras

Hábitat	Muestra	Tipo de muestra	Época
Salina de Cabo de Gata (Almería)	1C	Suelo	Febrero de 2009
	2C	Sedimento	
	3C	Suelo	
Salina interior de La Malahá (Granada)	1G	Agua	Febrero de 2009
	2G	Agua	
	3G	Agua	
Rambla Salada (Murcia)	S1	Suelo	Junio de 2006, febrero de 2007 y noviembre de 2007
	S2	Suelo	
	S3	Sedimento acuoso	
	S4	Sedimento acuoso	
	S7	Sedimento acuoso	
	S8	Sedimento acuoso	
Salina de Larache	1L	Suelo	Julio de 2010
	2L	Agua	
	3L	Suelo	
Salina de Souk larbaâ	1S	Sedimento acuoso	Julio de 2010
	2S	Sedimento acuoso	
	3S	Agua	
Salina de Asilah	1A	Agua	Julio de 2010
	2A	Agua	
Suelos agrícolas de la provincia de Motril (Granada)	1M	Suelo	Noviembre de 2009
	2M	Suelo	
	3M	Suelo	
	4M	Sedimento	
	5M	Suelo	
	6M	Suelo	

Como puede observarse, de todos los hábitats se tomaron muestras de suelo, sedimentos acuosos y agua salada. En las salinas de La Malahá y Asilah se tomaron muestras de agua salada porque la primera esta rodeada por una serie de elevaciones formadas por depósitos de yesos, mientras que la tierra rodea la segunda salina. Las muestras de sedimentos acuosos fueron tomadas a una profundidad no superior a los 5cm y en lugares aledaños de las aguas salinas.

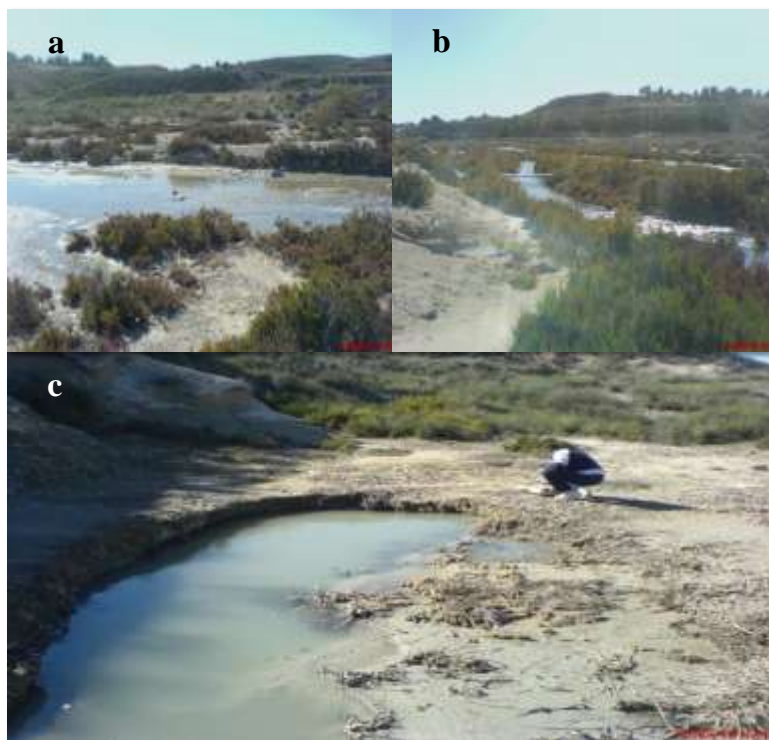
Las salinas de Asilah, Larache y Souk Iarbaâ se encuentran a 44, 78 y 140km respectivamente de la ciudad de Tánger en Marruecos. Dichas salinas están formadas por estanques de poca profundidad y dispuestos en series. El agua de las salinas de Souk Iarbaâ procede de un manantial salado subterráneo, mientras que la de las salinas de Larache y Asilah proviene del mar.

Las muestras de los suelos agrícolas (hábitat no salino) fueron tomadas del Camino Cerro del Toro, en un área agrícola a 1,5km del municipio de Motril (Granada).

La extracción del ADN genómico y en su caso del ARN que se realizó en todas las muestras en el menor plazo de tiempo posible.

## **Rambla Salada (Murcia)**

Se realizaron tres muestreos en junio de 2006, febrero de 2007 y noviembre de 2007 en los mismos lugares analizados por Rocío Luque Aznar en su tesis doctoral en la que emplearon técnicas clásicas de cultivo, defendida en 2011. Concretamente estos puntos de muestreo están localizados en la Finca la Salina, aguas abajo del canal del Trasvase Tajo-Segura y en una surgencia de agua sulfurosa salina (Figura 2). En cada uno de estos lugares se tomaron muestras de suelos y de sedimentos acuosos



**Figura 9.** Lugares de muestreo de Rambla Salada. **a**, Finca la Salina; **b**, Canal Trasvase Tajo-Segura y **c**, Surgencia de agua sulfurosa salina

En todas las muestras procedentes de Rambla Salada, se midieron *in situ* los siguientes parámetros físico-químicos: concentración de sales, pH y contenido en oxígeno. La salinidad se determinó a partir de la conductividad que fue medida utilizando un ECmeter (TetraConR 325).

## **II. Análisis de la diversidad microbiana mediante PCR-DGGE**

Para estudiar la diversidad de las comunidades microbianas existentes, se amplificó la región hipervariable V1-V3 del gen que codifica el ARN ribosómico 16S para el Dominio *Bacteria* y para el género *Halomonas*, mientras que en el caso del Dominio *Archaea* se utilizó la región hipervariable V3-V6 de dicho gen. Posteriormente, se empleó la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE), para analizar la diversidad microbiana de las distintas muestras. La metodología seguida se indica a continuación.

## *II. 1. Extracción de ADN*

El proceso de extracción del ADN genómico de las muestras de suelo, agua y sedimento acuoso objeto de estudio se llevó a cabo mediante el kit comercial de extracción de ADN PowerMax™ Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, INC), siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante, que se detalla a continuación. Este kit aumenta el rendimiento de la extracción ya que parte de cantidades de muestra de 10g (10ml para las muestras de agua). Por otra parte, el método empleado por el Kit facilita la eliminación de compuestos que inhiben la PCR, como las sustancias húmicas.

### **Protocolo de extracción:**

---

1. Añadir 15ml de la solución PowerBead Solution en los tubos PowerBead, estos tubos ahora se conocen como tubos de solución PowerMax®.
  2. Añadir 10g de muestra (suelo, sedimento y agua) en los tubos de solución PowerMax® y agitar vigorosamente con vórtex durante 1 minuto.
  3. Añadir 1,2ml de la solución C1 a los tubos de solución PowerMax® y agitar vigorosamente con vórtex durante 30 segundos.
  4. Colocar los tubos de solución PowerMax® en un adaptador de vórtex y agitar durante 10 minutos a máxima velocidad.
  5. Centrifugar a 2.500 r.c.f durante 3 minutos a temperatura ambiente.
  6. Transferir el sobrenadante a un tubo de recolección y luego añadir 5ml de la solución C2. Mezclar dos veces por inversión e incubar durante 10 minutos a 4°C.
  7. Centrifugar a 2.500 r.c.f durante 4 minutos a temperatura ambiente.
  8. Desechar el precipitado y luego transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de recolección.
  9. Añadir 4ml de la solución C3 y mezclar dos veces por inversión. Incubar durante 10 minutos a 4°C.
  10. Centrifugar a 2500 r.c.f durante 4 minutos a temperatura ambiente.
  11. Eliminar el precipitado y transferir de nuevo el sobrenadante a un nuevo tubo de recolección.
  12. Añadir 30ml de la solución C4 al sobrenadante y mezclar dos veces por inversión; este paso requiere tres centrifugaciones. Colocar la columna de filtración en un nuevo tubo de recolección y llenar con un volumen de la solución resultante de la etapa 12. Centrifugar a 2.500 r.c.f durante 2 minutos a temperatura ambiente. Desechar el líquido y colocar de nuevo la columna en el tubo de recolección y agregar el segundo volumen de la misma solución y luego centrifugar a 2.500 r.c.f durante 2 minutos a temperatura ambiente. Desechar el líquido y repetir esta operación hasta que el volumen total se haya procesado.
  13. Aplicar 10ml de la solución C5 en la columna del filtro. Centrifugar a 2.500 r.c.f durante 3 minutos a temperatura ambiente y desechar el líquido.
  14. Centrifugar a 2.500 r.c.f durante 5 minutos a temperatura ambiente.
  15. Colocar cuidadosamente la columna del filtro en un nuevo tubo de recolección y evitar el contacto del final de la columna con el líquido a desechar.
  16. Aplicar 5ml de la solución estéril C6 directamente en el centro de la membrana en la columna y centrifugar a 2.500 r.c.f durante 3 minutos a temperatura ambiente.
  17. Desechar la columna del filtro. Inmediatamente después, guardar el ADN a -20°C para evitar su degradación.
-

### II. 2. Extracción de ARN

Para estudiar la población metabólicamente activa, se procedió a extraer el ARN total de las muestras a través del kit comercial de extracción de ARN FastRNA<sup>®</sup> Pro Blue Kit MP (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante y aplicando unas las modificaciones que se detallan a continuación. La cantidad utilizada en cada extracción fue de 1g de suelo o de sedimento acuoso o de 1ml de agua. Las muestras se sometieron posteriormente a un tratamiento con ADNasa I con el fin de eliminar la contaminación residual con ADN genómico. Para ello se utilizó el kit Turbo DNA-free<sup>™</sup> (Ambion). A continuación, las muestras se pasaron por las columnas del Kit de purificación RNeasy Mini Kit (Qiagen) siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante y posteriormente se congelaron a -80°C para su uso posterior en experiencias de RT-PCR.

#### Protocolo de extracción

---

1. Añadir 500µl de la solución RNApro<sup>™</sup> a 1g de suelo o sedimento acuoso (o 1ml en caso de agua) en tubos eppendorf y mezclar por inversión doble.
  2. Añadir de nuevo 500µl de la solución RNApro<sup>™</sup> a la mezcla y agitar por inversión doble. Después transferir cada mitad de la mezcla a un tubo de lisis (Lysin Matrix tube).
  3. Colocar los tubos en el FastPrep<sup>®</sup>-24 (*MP-Bio*) y agitar durante 40 segundos a 6,5 de potencia.
  4. Introducir los tubos 5 minutos en hielo y volver a repetir el paso 3.
  5. Centrifugar a 21.952 r.c.f durante 3 minutos a 4°C.
  6. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo estéril e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
  7. Añadir 300µl de cloroformo y agitar con vórtex durante 10 segundos. Después incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
  8. Centrifugar a 21.952 r.c.f durante 5 minutos a 4°C y volver a repetir la etapa 7, pero en este caso, añadir solamente 100µl de cloroformo. Observar un precipitado que no afectará al proceso.
  9. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo estéril.
  10. Añadir 500µl de etanol al 100% (v/v) y mezclar 5 veces por inversión suave.
  11. Incubar durante 30 minutos a -20°C.
  12. Centrifugar a 21.952 r.c.f durante 15 minutos a 4°C.
  13. Desechar el sobrenadante y lavar el precipitado con 500µl de etanol a 75% (v/v). Después desechar cuidadosamente el líquido y dejar secar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
  14. Resuspender el precipitado con 100µl de agua libre de nucleasas e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 

#### Protocolo de digestión

---

1. Preparar la mezcla de reacción de la ADNasa en un tubo estéril. Para cada extracción (100µl de ARN), añadir 10µl de buffer turbo ADNasa al 10X y 1µl de la solución de reacción ADNasa (TURBO DNA-free<sup>™</sup>), mezclar y, posteriormente, incubar durante 30 minutos a 37°C en un termociclador a 28 r.c.f.

2. Añadir de nuevo 10µl de buffer turbo ADNasa al 10X y 1µl de la solución de reacción ADNasa (TURBO DNA-*free*<sup>TM</sup>) e incubar de nuevo durante 30 minutos a 37°C en un termociclador a 28 r.c.f.
  3. Añadir 10µl de la solución de reactivo de inactivación e incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente.
  4. Centrifugar durante 15 minutos y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf estéril.
- 

### **Protocolo de purificación**

---

1. Para cada 100µl de muestra, añadir 350µl del buffer RTL y mezclar bien por inversión.
  2. Añadir 250µl de etanol (96%-100%, v/v) a la solución del paso anterior, mezclar por vórtex o pipeteo.
  3. Transferir la mezcla a una columna (RNeasy Mini Spin) de unión de ARN puesta en un tubo de recolección.
  1. Centrifugar a 11.200 r.c.f durante 15 segundos. Desechar el líquido y colocar la columna en un nuevo tubo de recolección.
  2. Añadir 500µl del buffer RPE en la columna de unión de ARN y centrifugar a 11.200 r.c.f durante 15 segundos. Después desechar el líquido.
  4. Añadir de nuevo 500µl del buffer RPE en la columna de unión de ARN y centrifugar a 11.200 r.c.f durante 2 minutos. Después desechar el líquido y evitar el contacto del final de la columna con el líquido a desechar.
  5. Transferir la columna a un nuevo tubo de recolección y centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto para secar completamente la membrana de la columna.
  6. Transferir de nuevo la columna a un nuevo tubo de recolección y añadir 30-50µl de agua libre de ARNasas y centrifugar a 11.200 r.c.f durante 1 minuto para eluir el ARN.
  7. Inmediatamente después, poner el ARN eluido en hielo y guardar a -80°C para evitar su degradación.
- 

## ***II. 3. Determinación de la concentración de ADN y ARN***

La concentración de ADN y ARN se determinó mediante la medida de la absorbancia de las soluciones utilizando un espectrofotómetro Nano-Drop<sup>®</sup> 2000c (Thermo Scientific), siguiendo el manual de Sambrook y Russell (2001). Cada unidad de DO<sub>260</sub> equivale a una concentración de la solución de ADN o ARN de 50µg/ml.

La pureza de la muestra se determina por la relación DO<sub>260</sub>/DO<sub>280</sub>, de forma que si el valor de esta relación está por debajo de 1,8 indica contaminación por proteínas y/o polisacáridos en la muestra.

## II. 4. Amplificación mediante PCR de fragmentos del gen del ARNr 16S

Las diferentes reacciones de PCR se realizaron en un termociclador automático MyCycler™ (Bio-rad®), usando como polimerasa la AmpliTaq Gold polymerase (Applied Biosystems). La composición de la mezcla de la reacción de PCR se muestra en la Tabla 6.

El volumen de ADN de partida se modificó dependiendo de la muestra. Para las procedentes de Rambla Salada se utilizaron 50ng de las soluciones de ADN, mientras que para las de la salina de Cabo de Gata (Almería), salina interior de La Malahá (Granada), los suelos agrícolas de la provincia de Granada (Motril) y los hábitats del norte de Marruecos (salinas de Larache, Souk Iarbaâ y Asilah), las suspensiones originales se diluyeron diez veces para reducir la presencia de inhibidores, a partir de estas diluciones se tomó 50ng de ADN. En todos los casos, se incluyeron controles negativos en cada reacción sin añadir ADN. Todas las reacciones de PCR fueron realizadas por triplicado.

**Tabla 6.** Reactivos empleados en la reacción de PCR

Componentes	Volumen
ADN muestra	Variable (véase el texto anterior)
Cebadores (10pmol)	2µl
Tampón (10X)	5µl
MgCl <sub>2</sub> (25Mm)	4µl
dNTPs (10mM)	1µl
DMSO	1µl
BSA	0,25µl
Taq polimerasa (Eppendorf®) (2,5U)	0,3µl
Agua bidestilada estéril c.s.p.	50µl

Para amplificar el gen que codifica el ARNr 16S, se seleccionó para el Dominio *Bacteria* una región que comprendía tres regiones hipervariables (V1-V3) y se utilizaron los cebadores Bact-8F y Bact-518R (Edwards y col., 1989; Muyzer y col., 1993).

Para el gen del ARNr 16S del género *Halomonas*, seleccionamos la sonda Hlm-474R que Yoshie y col. (2004) habían diseñado y empleado en estudios ecológicos mediante FISH. Como pareja de este cebador en la PCR se empleó el cebador 16F27, ya usado por Lane (1991).

En el caso de las arqueas, se amplificaron las regiones hipervariables V3-V6 del gen del ARNr 16S, empleándose los cebadores Arc-344F y Arc-915R (Raskin y col., 1994; Stahl y Amann, 1991).

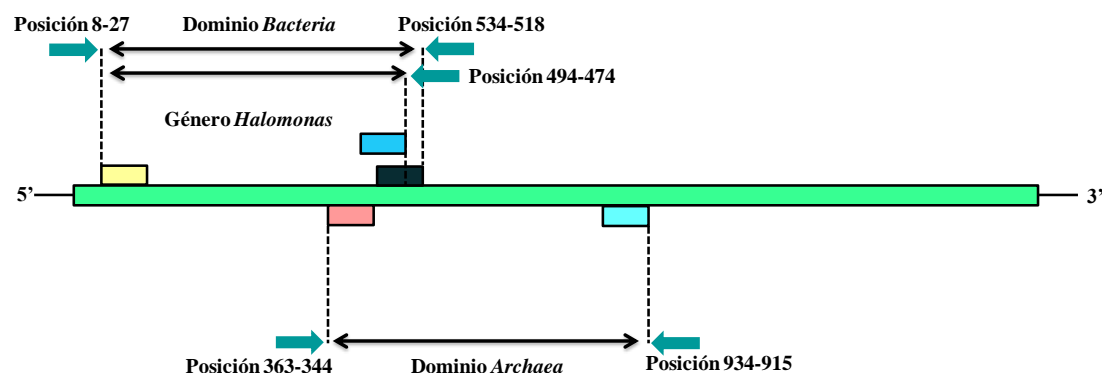
En todos los casos, a uno de los cebadores de cada pareja se le incorporó una extensión de guanina-citosina (GC) en el extremo 5', con el fin de aumentar la resolución de la técnica DGGE (Muyzer y col., 1998).

Todos los cebadores empleados en este estudio fueron sintetizados por Sigma-Genosys® y sus características se muestran en la Tabla 7 y la Figura 10.

**Tabla 7.** Cebadores usados para amplificar el gen del ARNr 16S de bacterias, arqueas y del género *Halomonas*

Cebador	Tipo de cebador	Secuencia (5'→3')	T <sub>m</sub> (°C)	Referencia
Bact-8F	Directo	*AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	55	Edwards y col. (1989)
Bact-518R	Inverso	ATTACCGCGGCTGCTGG	55	Muyzer y col. (1993)
Arc-344F	Directo	*ACGGGGYGCAGCAGGCGCGA	56	Raskin y col. (1994)
Arc-915R	Inverso	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	54	Stahl y Amann (1991)
16F-B27	Directo	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	55	Lane (1991)
Hlm-474R	Inverso	*CTGTGRGTGATGTCCTTCCT	60	Yoshie y col. (2004)

\*Cola de GC unida al extremo 5': CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G.

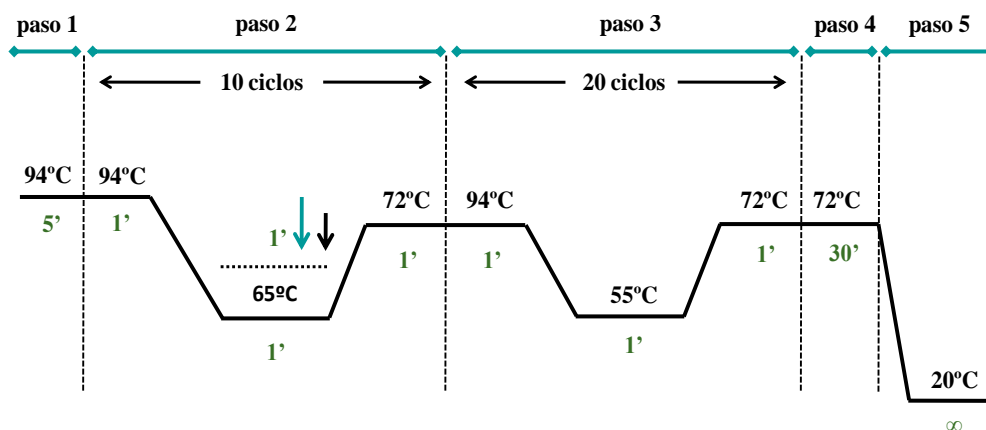


**Figura 10.** Fragmentos del gen del ARNr 16S utilizados (aproximadamente 500pb)

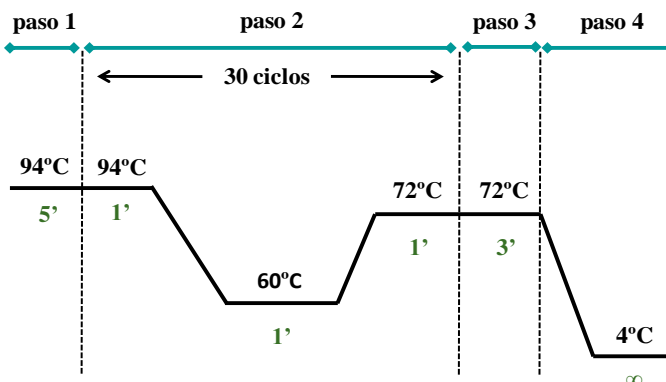
La amplificación del gen ribosomal 16S se llevó a cabo utilizando el programa conocido como “Touch-down”(Muyzer y col., 1993) tanto para el Dominio *Bacteria* como para el Dominio *Archaea* (Figura 11). En el caso del género *Halomonas*, el programa desarrollado



para amplificar el gen del ARNr 16S se detalla en la Figura 12 (Janse y col., 2004). Este programa evita la formación de heteroduplex.



**Figura 11.** Programa de amplificación por PCR del ARNr 16S del Dominio *Bacteria* y del Dominio *Archaea*. Las flechas indican que la temperatura disminuye un grado por ciclo



**Figura 12.** Programa de amplificación por PCR del ARNr 16S del género *Halomonas*

## II. 5. Amplificación mediante PCR de los genes *nirS* y *nosZ* del género *Halomonas*

Basándonos en las secuencias de los genes *nirS* y *nosZ* obtenidas por González-Domenech y col. (2010) para el género *Halomonas*, se diseñaron cebadores específicos para amplificar los genes de desnitrificación *nirS* y *nosZ* de este género (González-Domenech y col., 2010; Oueriaghli y col., 2012a). En el diseño de los cebadores, se valoró la longitud del fragmento a amplificar, siendo preferible que éste estuviera comprendido entre 300 y 500pb,

con objeto de llegar a un equilibrio entre la información suministrada y la resolución de la técnica DGGE (Sheffield y col., 1989). Las características de los cebadores usados se detallan en la Tabla 8.

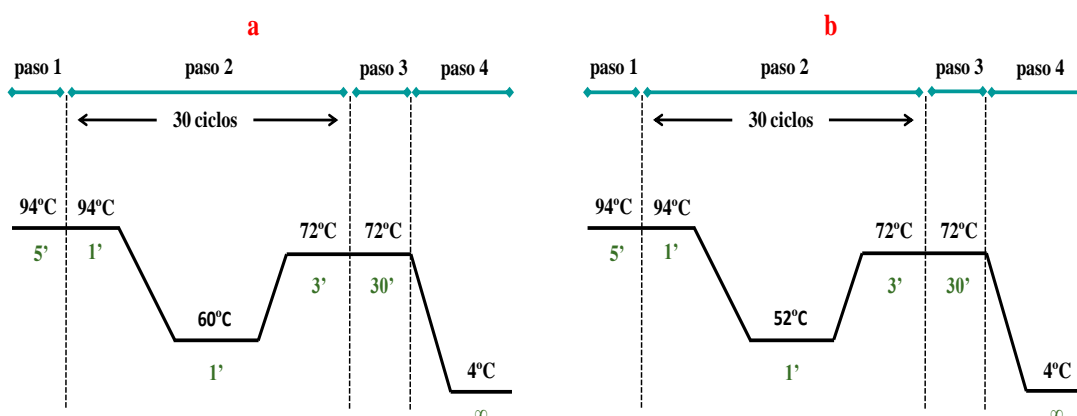
**Tabla 8.** Cebadores usados en los estudios de PCR-DGGE de la población desnitrificante del género *Halomonas*

Gen	Cebador	Secuencia (5'→3')	T <sub>m</sub> (°C)	Referencia
<i>nirS</i>	Sdgge-F	GAGTCCAACCAGATCGT	55°C	Oueriaghli y col. (2012a)
	Sdgge-R	*GGAGGTCTCGTCCATGGT		Oueriaghli y col. (2012a)
<i>nosZ</i>	Zdgge-F	*CGACATCATGAAGACG	52°C	Oueriaghli y col. (2012a)
	Zdgge-R	GATRTAGCGGGTCAGCT		Oueriaghli y col. (2012a)

\*Cola de GC unida al extremo 5': CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G

Como se puede observar en la Tabla 8, a uno de los cebadores de cada pareja se le incorporó en el extremo 5' una extensión de guanina-citosina (GC), ya que este procedimiento aumenta la resolución de la técnica DGGE (Muyzer y col., 1998).

La reacción de PCR se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita anteriormente en la Tabla 6 del apartado II. 4. El volumen de ADN de partida varió dependiendo de la muestra de que se tratase. Las condiciones de amplificación seleccionadas para trabajar con los genes de desnitrificación *nirS* y *nosZ* se detallan en la Figura 13.



**Figura 13.** Programa de amplificación por PCR de los genes *nirS* (a) y *nosZ* (b)

## **II. 6. RT-PCR**

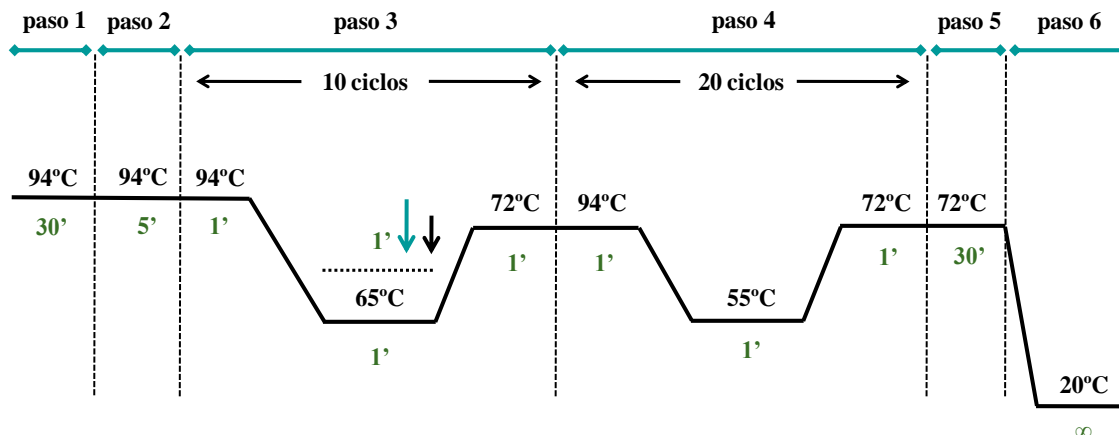
Para determinar la diversidad de la población metabólicamente activa, después de extraer el ARN y comprobar su pureza (apartado II. 2), se realizó una RT-PCR. Las reacciones de transcripción inversa se realizaron utilizando el kit SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) a partir de 50ng de ARN total, libre de ADN genómico, en un volumen final de reacción de 50µl. De cada una de las muestras se realizaron controles negativos a los que no se añadió la enzima transcriptasa inversa. La mezcla de reacción contiene los componentes mostrados en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Reactivos empleados en la reacción de RT-PCR

<b>Componentes</b>	<b>Volumen</b>
Tampón Reaction Mix 2X	25µl
ARN muestra	2µl
Cebadores (10 pmol)	1µl
SuperScript® III RT/Platinum® Taq Mix	2µl
Agua DEPC c.s.p.	50µl

Los cebadores empleados en la reacción de la transcripción inversa y en la PCR para el Dominio *Archaea*, fueron los descritos en la Tabla 7.

La PCR se llevó a cabo siguiendo el programa conocido como “Touch-down” (Muyzer y col., 1993) que consta de un paso previo para la síntesis de ADNc durante 30 minutos a 55°C. Las condiciones finales de este programa se detallan en la Figura 14.



**Figura 14.** Programa de amplificación por PCR del ARNr 16S del Dominio *Archaea*. Las flechas indican que la temperatura disminuye un grado por ciclo

Con la finalidad de comprobar si el ARN está contaminado con ADN, se realizó previamente amplificaciones mediante PCR convencional empleando los cebadores Arc-344F y Arc-915R descritos en la Tabla 7 y la Figura 10. Estos cebadores amplifican un fragmento de aproximadamente 500pb del gen del ARNr 16S del Dominio *Archaea* en una muestra, de manera que si se obtiene un fragmento de aproximadamente 500pb en el ARN total de la misma muestra es debido a que la solución de ARN de esta muestra estará contaminada con ADN genómico. En todos los controles negativos realizados para cada muestra, no se obtuvieron productos de amplificación, lo que demostró la ausencia de contaminación con ADN genómico.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo con las condiciones descritas en el apartado II. 4. Estas reacciones fueron realizadas en un volumen final de 50µl.

## II. 7. Análisis de los productos de PCR mediante electroforesis convencional

Para comprobar que las bandas amplificadas eran del tamaño esperado (500pb) las muestras se analizaron en geles horizontales de agarosa (Seakem GTG<sup>®</sup>, FMC Corp.) a una concentración del 1,5%, (p/v) en tampón TBE 1X (anexo 1).

La separación de los productos de PCR se llevó a cabo a 100V durante 30 minutos. Como tampón de carga se utilizó el tampón Loading Buffer Blue (Bioline<sup>®</sup>), adicionando 1µl por cada 5µl de ADN. Finalizada la electroforesis, los geles se sumergieron durante 20 minutos en una solución de bromuro de etidio (1µg/ml) en TBE 1X. Los fragmentos de ADN se

observaron mediante transiluminación de los geles con luz ultravioleta (245nm) en un transiluminador modelo Universal Hood II (Bio-Rad®). Como referencia del tamaño de los fragmentos se usó el marcador comercial HyperLadder I (Bioline®) de 10Kb.

### II. 8. Purificación y concentración de los productos de PCR

Los productos finales de PCR se concentraron aproximadamente 3 veces, empleando las membranas Microcon YM-100 (Millipore®), siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante. El uso de estas membranas permitió además purificar los productos de PCR eliminando las sales y otros componentes de baja masa molecular.

### II. 9. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

Los productos de PCR se analizaron en geles de poliacrilamida al 8% (p/v) con el sistema DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad®). Para la separación de los distintos fragmentos (de aproximadamente 500pb) se empleó un gradiente desnaturizante de formamida-urea en el sentido de migración electroforética, que osciló entre el 45% (parte superior del gel) y el 60% (parte inferior del gel).

Para la separación de los fragmentos del gen ribosomal del género *Halomonas*, se empleó un gradiente que osciló del 35% al 60%. El gradiente desnaturizante utilizado para separar los fragmentos amplificados de los genes *nirS* y *nosZ* fue del 40% al 70%. Estos gradientes fueron previamente establecidos por González-Domenech y col. (2010) y Oueriaghli y col. (2012a).

Para la preparación del gel de DGGE, se utilizaron dos soluciones stocks al 8% (p/v) de acrilamida, una de ellas sin sustancias desnaturizantes (solución 0%) y la otra con un 80% de estas sustancias (su composición se describe en el anexo 2). Para facilitar la disolución de la urea, la solución al 80% se agitó suavemente en un baño-María a 60°C. Antes de su uso, ambas soluciones fueron desgasificadas durante 15 minutos con el sistema Bandelin (Sonorex Digitec), filtradas mediante membranas de nitrocelulosa de 0,45µ (Millipore®) y conservadas a 4°C hasta su posterior utilización.

A partir de las soluciones del 0% y 80% de las sustancias desnaturizantes, se procedió a la elaboración del gel de poliacrilamida y a la generación del gradiente desnaturizante mediante el empleo de una bomba peristáltica (Watson Marlow 101 U/R) y una cubeta, tipo vasos comunicantes, generadora de gradiente, tal y como se puede observar en la Figura 15. A la solución más concentrada se le adicionó 50µl de tampón de carga 6X (anexo 1) para visualizar la formación del gradiente. En el momento de preparar el gel, a ambas soluciones se les adicionó como agentes polimerizantes TEMED y APS, cuya composición se describe en el anexo 2. El volumen total de cada solución fue de 15ml por gel y posteriormente se

adicionaron 5ml de acrilamida 8% (p/v) con un 0% de formamida-urea para formar los pocillos. La solución de mayor concentración desnaturizante se vertió en el compartimento más próximo al punto de salida de la cubeta generadora de gradiente y la solución de menor concentración se introdujo en el otro compartimento, tal como se indica en la Figura 15.



**Figura 15.** Preparación de un gel de DGGE

Los geles se dejaron polimerizar durante 3 horas a temperatura ambiente (25°C) antes de llevar a cabo la electroforesis. Durante este tiempo, se procedió a calentar la cubeta de electroforesis, que contiene el tampón TAE 1X (anexo 2), hasta alcanzar 64°C.

En cada pocillo, se cargó una concentración de ADN que osciló entre 1.000 y 1.600ng/μl por muestra, junto con 4μl del tampón de carga 6X (anexo 1). Para determinar el volumen de ADN necesario, previamente calculamos la concentración del producto de PCR en cada muestra, utilizando un espectrofotómetro Nano-Drop® 2000c (Thermo Scientific).

En cada gel de DGGE, se ocuparon dos carriles con productos de amplificación de los genes ribosomiales de bacterias control previamente cultivadas en nuestro laboratorio. Esta mezcla se cargó en todos los geles de DGGE para servir como marcador a la hora de realizar los análisis de la estructura de la comunidad procariota mediante el software FPquest, del cual hablaremos con más detalles en los próximos apartados.

Las condiciones de la electroforesis en las cuales se consiguió la adecuada separación de los fragmentos del gen del ARNr 16S se resumen en la Figura 16. Para facilitar la salida de las muestras de los pocillos, se aplicó un voltaje de 200V durante los primeros 20 minutos de la electroforesis, tras lo cual se bajó a 100V, manteniéndose este voltaje durante 16 horas.

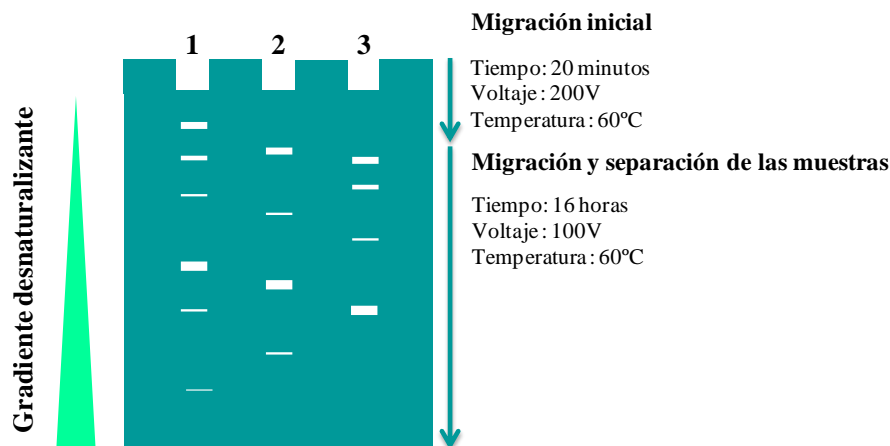


Figura 16. Condiciones de la electroforesis

Para la tinción del gel de DGGE se utilizaron 25µl de SyberGold® (stock 10.000X, Invitrogen) en 250ml de TAE 1X. El producto se extendió sobre el gel y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, el gel se lavó en 250ml de agua bidestilada con agitación suave durante 30 minutos y se visualizó mediante exposición a la luz U.V. (245nm) en un transiluminador modelo Universal Hood II (Bio-Rad®) empleando el software Quantity one 4.1 (Bio-Rad®).

## II. 10. Secuenciación y análisis de las bandas del DGGE

Las distintas bandas fueron escindidas del gel de DGGE empleando puntas de pipeta estériles rectangulares (Gel cutting Tips, Axygen). Todas las bandas se incubaron durante 24 horas a 4°C en 10µl de agua bidestilada estéril. Partiendo de alícuotas de 2µl del sobrenadante, se efectuó la reamplificación de cada banda mediante PCR utilizando las mismas condiciones empleadas en cada caso y usando los mismos cebadores (sin la cola de GC) descritos anteriormente en el apartado II. 4 y II. 5.

El producto de cada reamplificación fue comprobado por electroforesis convencional en geles de agarosa al 1,5%, (p/v) (apartado II. 7) y posteriormente purificado mediante el kit Illustra® GFX ADN and Gel Band Purification (GE Healthcare®), según las instrucciones del fabricante.

Los productos de ADN de doble cadena purificados se secuenciaron empleando en este caso los mismos cebadores citados para la reacción de amplificación. La secuenciación de ADN se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación Automática del Instituto de Parasitología y

Biomedicina Lopez-Neyra de Granada (CSIC), utilizando el secuenciador Applied Biosystems (modelo 373 Strecht). Como método de secuenciación se empleó el comercializado por Perkin Elmer, ABI PRISM TM Big Dye Terminators, que utiliza en la reacción de extensión la enzima AmpliTaq ADN polimerasa y didesoxinucleótidos marcados con cromóforos fluorescentes.

El análisis de la homología de las secuencias de nucleótidos obtenidas se llevó a cabo online usando el programa Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/)) (Altschul y col., 1997). Posteriormente, las secuencias obtenidas se alinearon con la misma región de las secuencias depositadas en el Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante el programa ClustalX versión 4.0; concretamente, se comparó una región de aproximadamente 500pb.

La relación filogenética se estableció por el método de distancias, en este caso, se utilizó la metodología de los vecinos próximos conocido como Neighbour-Joining y el método de probabilidad conocido como Máximo-Likelihood. Los árboles filogenéticos se construyeron a partir de la matriz de distancias aplicando el algoritmo de Jukes Cantor (Jukes y Cantor, 1969) mediante el software Mega (Molecular Evolutionary Genetics Análisis) versión 4.0.2 (Tamura y col., 2004) y el software Phylip en su versión 3.69 (Felsenstein, 2008). El valor de remuestreo o “bootstrap” fue calculado por los mismos programas y se basó en 1.000 remuestreos (los porcentajes superiores al 50% aparecen reflejados en los árboles correspondientes). Por último, para corregir posibles sesgos en las relaciones de parentesco entre las secuencias en estudio, se utilizaron las secuencias del gen del ARNr 16S de especies tipo de referencia que se incluyeron como externas u “outgroups”.

También se incluyeron en el análisis filogenético las secuencias de la región variable V3-V6 (aproximadamente 400pb) de las cepas más afines, aisladas previamente por nuestro grupo de investigación en el mismo hábitat (Luque y col., 2012a). Estas secuencias se reflejan en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Especies tipo utilizadas como “outgroups” y cepas analizadas por Luque y col. (2012a) en Rambla Salada

Especie	Referencia
<i>Aquifex pyrophilus</i> Kol5a <sup>T</sup> (M83548)	Huber y col. (1992)
<i>Carnimonas nigrifaciens</i> CTCBS1 <sup>T</sup> (Y13299)	Garriga y col. (1998)
<i>Cobetia marina</i> DSM 4741 <sup>T</sup> (AJ306890)	Arahal y col. (2002a)
<i>Desulfurococcus amylolyticus</i> Z533 (AF250331)	Bonch-Osmolovskaya y col. (2001)
<i>Metallosphaera cuprina</i> Ar-4 <sup>T</sup> (FN796482)	Liu y col. (2011)

Los números de acceso en el Genbank se muestran entre paréntesis



**Tabla 10.** Continuación

Especie	Referencia
M3-7b (HQ659152)	Luque y col. (2012a)
M3-9b (HQ659156)	Luque y col. (2012a)
M2-7a (HQ659136)	Luque y col. (2012a)
M3-1c (HQ659148)	Luque y col. (2012a)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RH 815 <sup>T</sup> (X06684)	Schroeter (1872)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01 (NP_249210)	Winsor y col. (2009)
<i>Salinicola socius</i> SMB35 <sup>T</sup> (DQ979342)	Anan'ina y col. (2008)
<i>Zymobacter palmae</i> T109 <sup>T</sup> (AF211871)	Okamoto y col. (1995)

Los números de acceso en el Genbank se muestran entre paréntesis

### III. Análisis de la diversidad y métodos estadísticos

#### III. 1. Análisis de la comunidad microbiana con FPquest

Para llevar a cabo este análisis, se procedió a digitalizar las imágenes de los perfiles de DGGE mediante el software FPquest versión 5.10 (Bio-Rad®). Este último permite, además de detectar bandas, generar perfiles de densidad en cada carril de DGGE y calcular automáticamente la intensidad relativa de cada banda frente a la señal total de todas las bandas del carril.

Una vez cargadas las imágenes de los geles en la base de datos del software FPquest, se procedió a normalizar los perfiles de DGGE utilizando los marcadores previamente cargados en los geles. Todas las bandas presentes en un gel de DGGE fueron detectadas automáticamente por el software. Dado que el alineamiento automático de bandas genera algunos errores, se procedió a corregirlos manualmente.

Tras finalizar el análisis de las imágenes, se generaron dos matrices de datos. Una de ellas representa los datos cualitativos basados en la presencia-ausencia de bandas que se detectaron en cada carril de DGGE. La otra matriz tiene en consideración las intensidades relativas de bandas, generando una matriz cuantitativa de datos. Asimismo, se obtuvieron los índices de similitud (cualitativo y cuantitativo) a partir de las matrices de datos.

Como índice cualitativo, se optó por la utilización del índice de Dice (basado en la matriz de presencia-ausencia) que da un peso doble a la doble presencia de bandas en dos sitios determinados (Legendre y Legendre, 1998). Se estimó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$S_D = \frac{2A}{2A + B + C}$$

Donde:

**A** ⇨ Número de bandas presentes simultáneamente en las muestras 1 y 2.

**B** ⇨ Número de bandas presentes en la muestra 1 y ausentes en la muestra 2.

**C** ⇨ Número de bandas presentes en la muestra 2 y ausentes en la muestra 1.

Paralelamente se estimó el coeficiente de correlación de Pearson como índice cuantitativo, utilizando la matriz de intensidades relativas de bandas (Legendre y Legendre, 1998). Por medio de este coeficiente, se determina la relación lineal entre dos variables cuantitativas y fue estimado a partir de la siguiente fórmula:

$$r = \frac{S_{xy}}{S_x S_y}$$

Donde:

**S<sub>xy</sub>** ⇨ Covarianza muestral entre x e y.

**S<sub>x</sub>, S<sub>y</sub>** ⇨ Desviaciones estándar de x e y respectivamente.

Tras determinar los índices mencionados anteriormente, se procedió a realizar el alineamiento de las bandas empleando como método de agrupamiento el UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), con la finalidad de analizar la semejanza entre las muestras de diferentes fechas y lugares.

### III. 2. Índices de diversidad

Las matrices de abundancia relativa (intensidades) y de presencia-ausencia de bandas obtenidas a partir de los perfiles de DGGE fueron exportadas a plantillas de EXCEL (Microsoft) para los análisis que se indican a continuación.

#### III. 2. 1. Rango Ponderado (*R<sub>r</sub>*) de la riqueza

La riqueza de una población, es decir, el número de especies de una muestra, se expresó matemáticamente mediante el índice de la riqueza *R<sub>r</sub>* (*Rango Ponderado*) que tiene en cuenta el número de bandas que origina la muestra y el valor del gradiente desnaturizante del DGGE en el que se distribuyen dichas bandas (Marzorati y col., 2008). Este índice fue calculado de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$R_r = (N^2 \times Dg)$$

Donde:

$N$  ⇒ Número de bandas en un carril de DGGE.

$Dg$  ⇒ Gradiente desnaturalizante entre la primera banda y la última banda del mismo carril de DGGE.

### III. 2. 2. Organización funcional de la comunidad ( $F_o$ )

La organización funcional ( $F_o$ ) refleja la adaptación de los microorganismos a las condiciones ambientales (Marzorati y col., 2008). Este índice permite determinar la uniformidad de la comunidad y está relacionado con el número de individuos de cada especie.

Para interpretar este índice, se construyen las curvas de *Pareto-Lorenz* (Lorenz, 1905). Se representan los números de las bandas (acumuladas y normalizadas) en el eje X, y sus respectivas intensidades (acumuladas y normalizadas) en el eje Y (Figura 17). La diagonal de 45° representa la perfecta uniformidad de una comunidad. Para calcular el índice ( $F_o$ ) se utiliza la proyección vertical en el 20% del eje X que determina la intensidad del 20% de las bandas. Una comunidad es más uniforme cuanto más se aproxima a la diagonal de 45°.

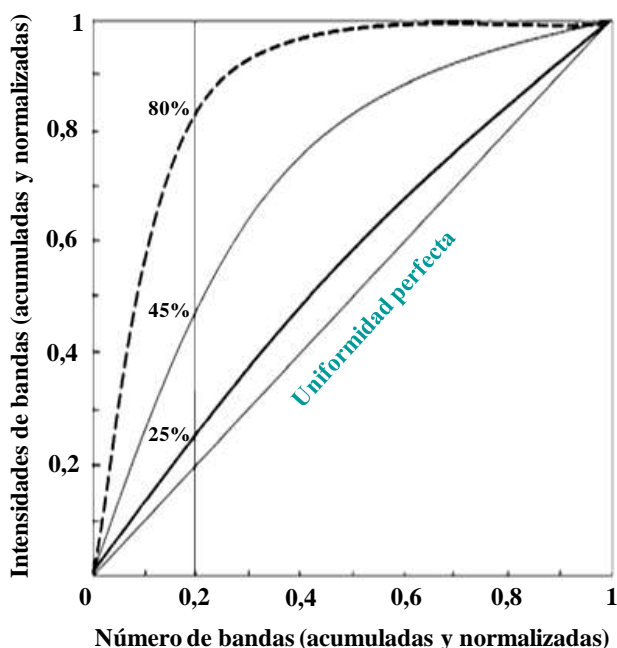


Figura 17. Curva de Pareto-Lorenz (PL)

### III. 2. 3. Índice de Shannon-Weaver ( $H'$ )

La diversidad está formada por dos componentes, el número de especies presentes en una muestra (riqueza) y la abundancia relativa de cada especie (uniformidad). El índice de *Shannon-Weaver* ( $H'$ ) contempla esos dos componentes (Shannon y Weaver, 1949). Para calcular este índice  $H'$  se utilizó la fórmula siguiente:

$$H' = -\sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

$$p_i = N_i / N$$

Donde:

$S$  ⇒ Número total de bandas en un carril de DGGE.

$p_i$  ⇒ Contribución relativa de una banda a la intensidad total de las bandas de un carril de DGGE (intensidad relativa).

$N_i$  ⇒ Intensidad de una banda en un carril.

$N$  ⇒ Suma de las intensidades de las bandas en el mismo carril de DGGE.

### III. 2. 4. Índice de Simpson ( $SI$ )

El índice de *Simpson* (Simpson, 1949) refleja la dominancia de las especies y se calculó de acuerdo a la fórmula:

$$SI = \sum (p_i)^2$$

Donde  $p_i$  tiene el significado mencionado más arriba. Este índice es inversamente proporcional al índice de *Shannon-Weaver* ( $H'$ ).

## III. 3. Análisis estadísticos

### III. 3. 1. Análisis de varianza

Para determinar la significación de las diferencias en los índices de diversidad en las diferentes muestras se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, a través del

paquete estadístico provisto en el software StatGraphics Plus versión 3.1. En este caso, la probabilidad de significancia se estableció en un nivel del 95% de confianza ( $p \leq 0,05$ ).

### *III. 3. 2. Análisis multivariable mediante Canoco*

Con la finalidad de determinar la relación entre la estructura de la comunidad microbiana y los factores ambientales se aplicó un análisis multivariable con el programa estadístico Canoco para Windows en su versión 4.5 (Ter Braak, 1987 y 1990), empleando dos conjuntos de datos (matrices cualitativa o cuantitativa y factores ambientales).

Para llevar a cabo este análisis se incluyeron los datos numéricos de la salinidad, el oxígeno y el pH como variables cuantitativas ambientales (variables independientes). Los datos de la salinidad y el oxígeno fueron normalizados mediante la transformación  $x = \text{Log}(x + 1)$ .

Para determinar el tipo de modelo, unimodal (ACC) o lineal (ADR), adecuado para nuestros datos, se realizó un análisis previo denominado Análisis de Correspondencia sin tendencias (ACD) de las matrices de datos. En función de la longitud del gradiente de los ejes de ordenación (Ter Braak, 1995) se utilizó un modelo u otro (ACC o ADR).

El porcentaje de variabilidad del sistema por efecto de las variables ambientales se determinó a partir de la información estadística aportada por el análisis de ACC o ADR. Para determinar las variables ambientales estadísticamente significativas se aplicó el test de *Monte Carlo* con 999 permutaciones ( $p \leq 0,05$ ).

## **IV. Análisis cuantitativo de las comunidades microbianas mediante CARD-FISH**

Como ya hemos explicado en la introducción esta técnica consiste en la unión de dos técnicas: CARD (Catalyzed Reporter Deposition) y FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) (Pernthaler y col., 2004). Esta técnica se basa en el uso de sondas marcadas con peroxidasa de rábano (HRP), que posteriormente se activan mediante moléculas de tiramida marcadas fluorescentemente. Las sondas se unen al ARNr 16S.

En la Figura 18 se muestran los pasos que se llevaron a cabo en el análisis mediante CARD-FISH se realizó según el protocolo descrito por Pernthaler y col. (2004), aunque se llevaron a cabo algunas modificaciones, principalmente en cuanto a los volúmenes empleados como se explica más adelante.

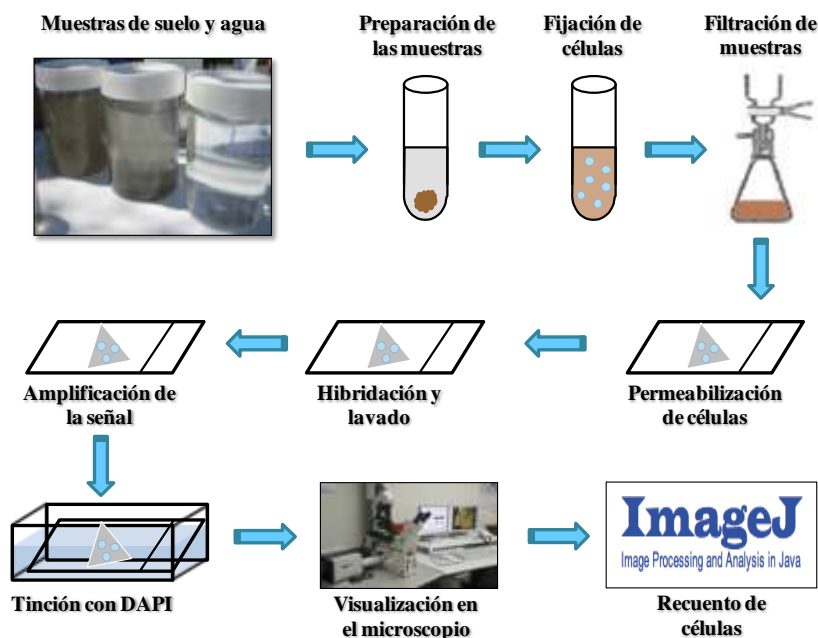


Figura 18. Protocolo de la técnica CARD-FISH

#### IV. 1. Preparación y fijación de las muestras

La preparación de las muestras se llevó a cabo mediante la suspensión de 0,5g de suelo o sedimento acuoso o 0,5ml de agua en 10ml de tampón PBS 1X, cuya composición se describe en el anexo 3.

En el caso de suelo o sedimento acuoso, la suspensión resultante se trituró mediante el sistema Bandelin (Sonorex Digitec) durante 20 minutos para eliminar los sólidos voluminosos. Tras lo cual, a 1ml de esta suspensión, se le adicionó formaldehído al 2% (v/v), para fijar las células, y se incubó 24 horas a 4°C. Posteriormente, se procedió a realizar diluciones de cada muestra y a filtrar las por membranas de 0,2µm de policarbonato Isopore™ membrane filters, GTTP (Millipore®). Las células suspendidas en la solución se unieron así a un soporte, en este caso el filtro de policarbonato. Para eliminar el efecto del formaldehído, se lavó el filtro en el sistema de filtración (Figura 11) con 10ml de PBS 1X (anexo 3) seguido por 10ml de agua bidestilada.

Con la finalidad de proteger la integridad de las células a lo largo del proceso del CARD-FISH, cada filtro se sumergió en una solución de agarosa al 0,1% (p/v) (Seakem GTG®, FMC Corp), por ambas caras, y se dejó secar sobre una placa de Petri de vidrio durante 30

minutos a 37°C. Los filtros se deshidrataron mediante pipeteo de etanol al 96% (v/v), durante 1 min a temperatura ambiente secándose al aire.

### IV. 2. Inactivación de peroxidasas y permeabilización de las células

Debido a que algunos microorganismos tienen sus propias peroxidasas o proteínas con actividad pseudoperoxidasa, se procedió a su inactivación mediante la incubación de los filtros en 50ml de solución de HCl 0,01M (anexo 3) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras ello, los filtros se lavaron con un exceso de agua bidestilada y se dejaron secar al aire.

Para facilitar el acceso de las sondas marcadas, se permeabilizan las células. Para ello, los filtros se sumergieron en 50ml de solución de lisozima (10mg/ml en 0,05M EDTA, 0,1M Tris-HCl, pH 7,5) (anexo 3) dentro de una placa Petri durante 60 minutos a 37°C. Tras ello, los filtros se lavaron dos veces en 50ml de agua bidestilada y después en etanol absoluto. Una vez que se secaron los filtros con papel de filtro, se almacenaron a -20°C hasta su posterior utilización.

### IV. 3. Hibridación con sondas marcadas con HRP

Para llevar a cabo la hibridación, los filtros se cortaron en 4 secciones de 4 x 4 mm aproximadamente. Las secciones obtenidas fueron depositadas en un portaobjetos. Paralelamente, las sondas marcadas con peroxidasa de rábano (HRP) (50ng/μl) se mezclaron con el buffer de hibridación (2μl de cada sonda y 20μl del buffer de hibridación, cuya composición se describe en el anexo 3). A continuación se aplicaron 20μl de dicha solución a cada sección. Como control negativo, se utilizó la sonda Non338. Todas las sondas empleadas en este análisis fueron sintetizadas por Thermo Scientific, y sus características se muestran en la Tabla 11.

Para comprobar la especificidad de la sonda Hlm474 de *Halomonas*, utilizamos la cepas de colección *Cobetia marina* 219<sup>T</sup> (Arhal y col., 2002a) y *Pseudomonas aeruginosa* RH 815<sup>T</sup> (Schroeter, 1872) como controles negativos, procesándose de igual manera que las demás muestras.

Seguidamente, se preparó una cámara húmeda, introduciendo una lámina de papel absorbente humedecido con la solución de hibridación en un tubo falcón de 50ml con una forma específica para soportar los portaobjetos. Los filtros se introdujeron en esta cámara y se incubaron a 35°C durante 2 horas y 30 minutos. Una vez finalizada la incubación, se sumergieron los filtros durante 5 minutos en 50ml de buffer de lavado (anexo 3), previamente preparado y precalentado a 37°C.

Tabla 11. Sondas de oligonucleótidos usadas para CARD-FISH

Sonda	Secuencia (5'→3')	Especificidad	Referencia
Eub338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT*	Dominio <i>Bacteria</i>	Amann y col. (1995)
Arc915	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT*	Dominio <i>Archaea</i>	Stahl y Amann (1991)
Hlm474	CTGTGRGTGATGTCCTTCCT*	<i>Halomonas</i>	Yoshie y col. (2004)
Non338	ACTCCTACGGGAGGCAGC*	No específica	Amann y col. (1990)

\*Las sondas fueron marcadas por el extremo 5' con HRP

#### IV. 4. Amplificación de la señal CARD

Con la finalidad de proteger la actividad de las peroxidasa, transcurrido el proceso del lavado, los filtros se pusieron en placas Petri y se incubaron en 1ml de PBS 1X a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, se procedió a cubrir la superficie brillante de las secciones de los filtros con una solución que contenía el buffer de amplificación (anexo 3) y tiramida marcada con el fluorocromo FITC (1 parte de tiramida (1mg/ml) en 10 partes de buffer de amplificación, aproximadamente 50µl por sección). Las secciones se dejaron incubarse durante 15 minutos a 46°C en la oscuridad.

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a lavar los filtros en 50ml de PBS 1X durante 15 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Finalmente, se realizaron dos lavados; el primero nuevamente con 50ml de agua bidestilada y el último lavado con 50ml de etanol absoluto.

#### IV. 5. Tinción con DAPI y observación al microscopio

Una vez secos los filtros, se procedió a la tinción con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) a una concentración final de 1µg/ml. Para ello se le aplicó a cada sección del filtro, previamente colocada sobre un portaobjetos, 20µl de la solución de DAPI (1µg/ml) durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo de tinción, las secciones se lavaron con agua bidestilada y etanol absoluto y se dejaron secar al aire.

Para el montaje de las preparaciones, cada sección de filtro se depositó sobre un portaobjetos, se le adicionó una gota de Citifluor™ (Citifluor Ltd., London, U.K.) y se le colocó encima un cubreobjetos procurando que la sección del filtro quedara plana para su correcta observación. Las preparaciones se conservaron a -20°C.

La observación se realizó con un microscopio láser confocal TCS-SP5 (Leica Microsystems), en el centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, que



ofrece la posibilidad de realizar secciones ópticas y analizar imágenes con mayor resolución y contraste que los microscopios tradicionales, así como realizar reconstrucciones en 3D.

Para visualizar las células totales presentes en una sección del filtro, se utilizó el láser Diodo Ultravioleta que permite ver las células que han sido teñidas con DAPI (células totales). Por otro lado, las células de la misma sección del filtro que han sido marcadas con FITC se visualizaron con el láser de Argón. Todas las células fueron visualizadas con el objetivo de 100X en un plano (XYZ) y aplicando un aumento de 2,5X. De cada imagen, se tomaron 30 series de secciones transversales aproximadamente. Se eligieron al azar un mínimo de 20 campos para realizar los recuentos y estos campos se obtuvieron a partir de la proyección suma en 2D tipo (Lote Z) de las series tomadas de cada campo. Los fluorocromos utilizados y sus respectivas longitudes de onda de emisión y absorción se reflejan en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Fluorocromos utilizados para la detección de las comunidades microbianas

Fluorocromo	Longitud de onda		Color
	Absorción (nm)	Emisión (nm)	
FITC	488	519	Verde
DAPI	350	470	Azul

Las imágenes obtenidas facilitaron el recuento ya que los microorganismos se pueden observar con facilidad en el monitor del ordenador. Todas las imágenes se contaron empleando el programa ImageJ en su versión 1.43u (Rasband, 2010), el cual está disponible en la dirección <http://rsb.info.nih.gov/ij>.

#### *IV. 6. Determinación de la abundancia relativa*

Para determinar la densidad celular se tuvo en cuenta la siguiente ecuación, en la que se considera el área del filtro, que fue de  $1,8 \times 10^8 \mu\text{m}^2$  y el área de observación, que fue de  $3600 \mu\text{m}^2$ .

$$\text{Densidad celular (Cel. ml}^{-1}\text{)} = \frac{\bar{X}}{\text{Área de observación}} \times \frac{\text{Área de filtración}}{\text{1 Filtro}} \times \frac{\text{1 Filtro}}{\text{Vol. de muestra filtrado (ml)}} \times \frac{\text{Vol. filtrado + FA (ml)}}{\text{Vol. de muestra fijada (ml)}}$$

Donde:

$\bar{X}$   $\Rightarrow$  Promedio del número de células en una sección del filtro.

**FA (ml)**  $\Rightarrow$  Volumen de formaldehído adicionado a cada muestra.

**Vol.**  $\Rightarrow$  Volumen.

Para determinar la abundancia relativa de cada población por medio de CARD-FISH, fue necesario realizar varios recuentos de las células hibridadas con la sonda marcada con FITC que corresponde al ARNr 16S de las comunidades de bacterias, arqueas y *Halomonas* y de las células totales teñidas con DAPI. El porcentaje de las células correspondientes a cada comunidad fue determinado por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Células}_{\text{Comunidad x}} = \frac{\text{Células marcadas con FITC}}{\text{Células teñidas con DAPI}} \times 100$$

Se aplicó la fórmula anterior para determinar el porcentaje de las células presentes en cada muestra estudiada o abundancia relativa de la muestra estudiada.



## **RESULTADOS Y DISCUSION**



# **I. CAPITULO 1**

## **Diversidad procariota en hábitats hipersalinos**



# Resumen

En este Capítulo, se analizó la diversidad procariota en cinco hábitats salinos empleando técnicas moleculares y análisis de distintos índices de diversidad. Los ambientes seleccionados, de acuerdo a sus diferentes características físico-químicas y localización, han sido dos hábitats hipersalinos de España, las salinas de Cabo de Gata (Almería) y La Malahá (Granada), así como otros tres ambientes hipersalinos situados al norte de Marruecos, las salinas de Asilah, Larache y Souk larbaâ. Con fines comparativos hemos incluido en este capítulo, un hábitat no salino, suelos tomados de una área agrícola en Motril (Granada).

Los resultados obtenidos a partir de los perfiles de DGGE indicaron variaciones en la diversidad procariota según el hábitat estudiado y su salinidad, mostrando la existencia de una alta diversidad de bacterias y una diversidad media de arqueas en todos los hábitats analizados. Por otra parte hemos detectado un número significativo de filotipos asignados a phyla que nunca han sido aislados a partir de los ambientes salinos.

En cuanto a las comunidades de bacterias, hemos hallado que los microorganismos más abundantes en el conjunto de los hábitats estudiados pertenecen a los phyla *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*, no obstante, también encontramos otros phyla con menos abundancia como es el caso de *Cyanobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi* y *Firmicutes*. Por otro lado, hemos descubierto que la comunidad de arqueas encontrada en todos los ambientes salinos estudiados, ha sido dominada por miembros del phylum *Euryarchaeota*, siendo el orden *Halobacteriales* el más dominante.

El análisis de la comunidad de *Halomonas* reveló la presencia del mismo en todos los hábitats estudiados excepto en la salina de La Malahá, mostrando asimismo la ubicuidad de dicho género.

Respecto al hábitat no salino incluido en este estudio con fines comparativos, se demostró que el phylum *Proteobacteria* dominaba en todas las muestras analizadas. Sin embargo la comunidad de arqueas hallada en estos suelos agrícolas pertenecían mayoritariamente al phylum *Thaumarchaeota* y al orden *Thermoplasmatales*. Finalmente, y teniendo en cuenta la presencia de especies del género *Halomonas* en el hábitat no salino, la especie más predominante ha sido *H. ventosae*.





## I. 1. Resultados

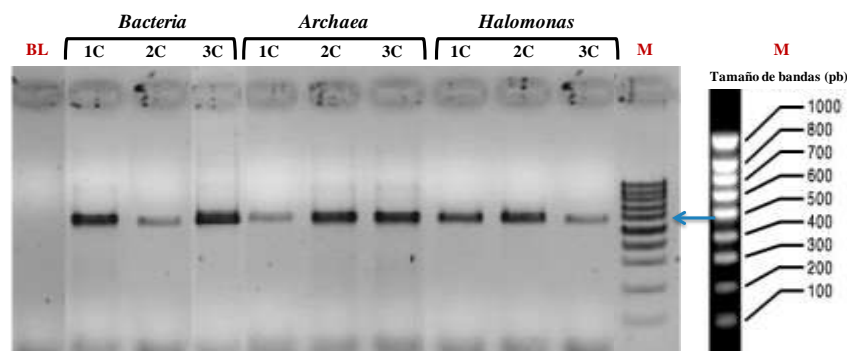
El estudio de la diversidad microbiana se llevó a cabo mediante la técnica PCR-DGGE. Se analizó la diversidad del Dominio *Bacteria*, del Dominio *Archaea* y del género *Halomonas* utilizando cebadores específicos para cada grupo. Por otro lado, las muestras correspondientes a los hábitats seleccionados fueron analizadas mediante la técnica CARD-FISH.

### I. 1. 1. Salina de Cabo de Gata (Almería)

Se estudiaron tres muestras de suelos y sedimentos de la salina de cabo de Gata con una concentración de sales del 7,5%, (p/v), 17,4%, (p/v) y 6,7%, (p/v) y de pH de 6,4, 8,2 y 6,3 en las muestras 1C, 2C y 3C respectivamente.

#### *Amplificación por PCR del gen del ARNr 16S*

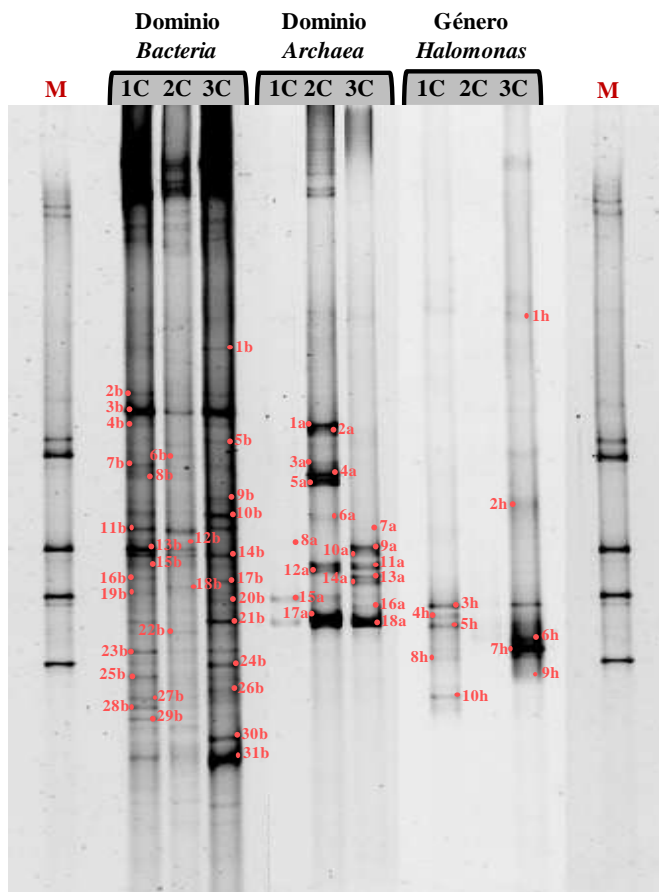
Los amplicones del gen ribosomal 16S de la población de bacterias, arqueas y del género *Halomonas* se muestran en la Figura 19. Como se puede apreciar en dicha figura, todas las muestras presentaron una banda del tamaño esperado (aproximadamente 500pb); además, no se obtuvieron bandas en el control negativo; estas amplificaciones se realizaron por triplicado.



**Figura 19.** Productos de amplificación del gen del ARNr 16S (500pb). 1C, 2C y 3C: Muestras tomadas de la salina de Cabo Gata (Almería). M: Marcador Molecular (1000pb). BL: Blanco

DGGE

La Figura 20 muestra los perfiles de DGGE obtenidos para las tres muestras tomadas de la salina de Cabo de Gata (Almería) después de amplificar el gen del ARNr 16S para bacterias, arqueas y el género *Halomonas*.



**Figura 20.** Perfiles obtenidos por la técnica de DGGE de los fragmentos del gen del ARNr 16S. **M:** Marcador. **1b** a **31b:** bandas de bacterias, **1a** a **18a:** bandas de arqueas, **1h** a **10h:** bandas de *Halomonas*. 1C, 2C y 3C: Muestras tomadas de la salina de Cabo Gata (Almería)

En las muestras estudiadas se detectaron un total de 31, 18 y 10 bandas en los perfiles de DGGE de bacterias, de arqueas y del género *Halomonas* respectivamente.

## Análisis de las secuencias

Con la finalidad de identificar las poblaciones objeto de estudio, se llevó a cabo un análisis filogenético de las secuencias obtenidas a partir de las bandas escindidas de los patrones de DGGE tras compararlas con las mismas regiones de los genes del ARNr 16S depositados en la base de datos Genbank.

La Tabla 13 muestra las asignaciones de las bandas secuenciadas correspondientes al Dominio *Bacteria* en las tres muestras analizadas por DGGE.

**Tabla 13.** Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio *Bacteria* obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE

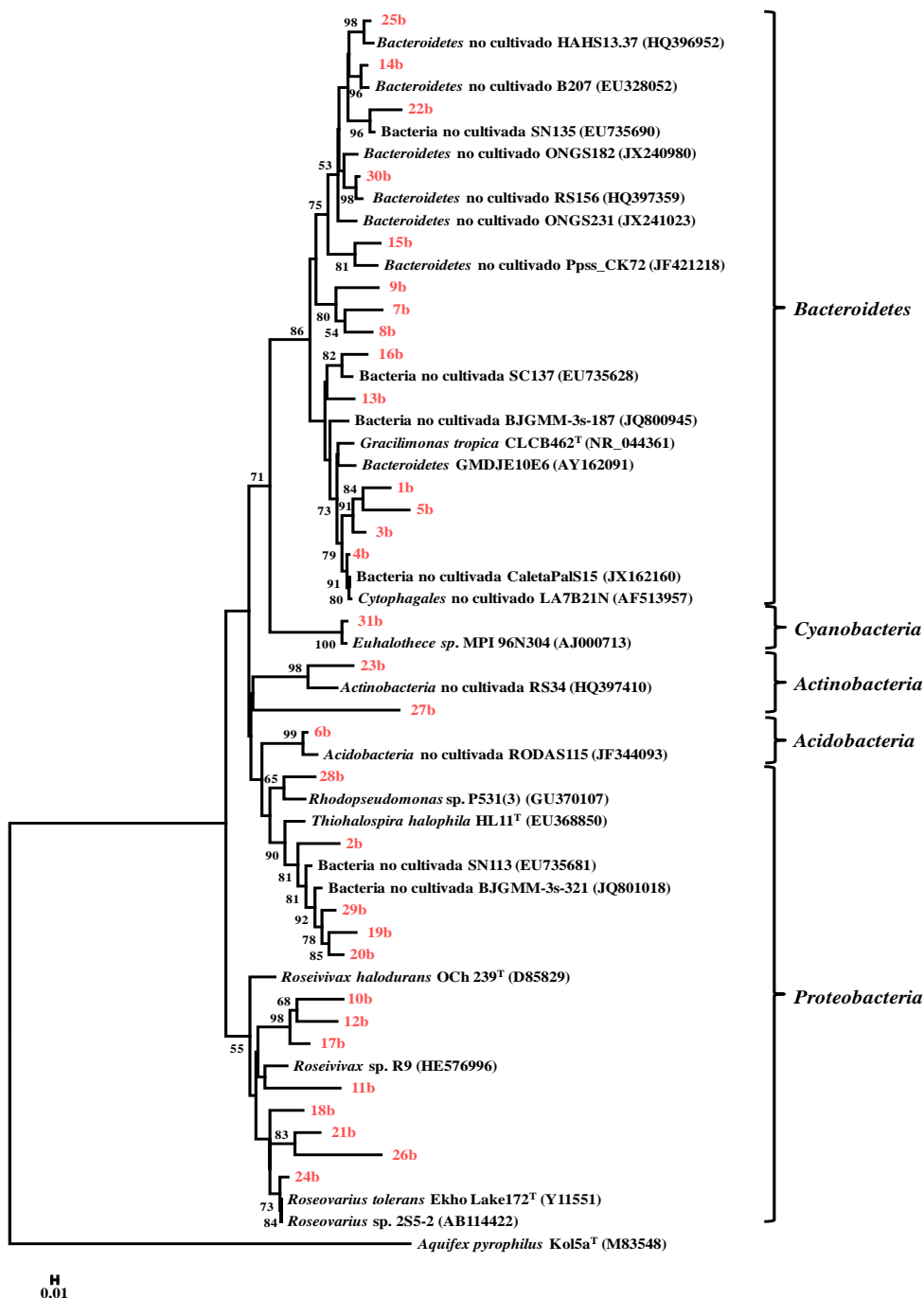
Banda	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
1b	Bacteria no cultivada CaletaPalS15 (JX162160)	89
2b	<i>Thiohalospira halophila</i> HL11 <sup>T</sup> (EU368850)	89
3b	Bacteria cultivada CaletaPalS15 (JX162160)	90
4b	Bacteria no cultivada CaletaPalS15 (JX162160)	100
5b	<i>Cytophagales</i> no cultivado LA7B21N (AF513957)	93
6b	<i>Acidobacteria</i> no cultivada RODAS115 (JF344093)	100
7b	<i>Bacteroidetes</i> no cultivado ONGS231 (JX241023)	97
8b	<i>Bacteroidetes</i> no cultivado ONGS231 (JX241023)	96
9b	<i>Bacteroidetes</i> no cultivado ONGS231 (JX241023)	95
10b	<i>Roseivivax</i> sp. R9 (HE576996)	89
11b	<i>Roseivivax</i> sp. R9 (HE576996)	98
12b	<i>Roseivivax</i> sp. R9 (HE576996)	86
13b	Bacteria no cultivada BJGMM-3s-187 (JQ800945)	99
14b	<i>Bacteroidetes</i> no cultivado B207 (EU328052)	98
15b	<i>Bacteroidetes</i> no cultivado Ppss_CK72 (JF421218)	99
16b	Bacteria no cultivada SC137 (EU735628)	98
17b	<i>Roseivivax</i> sp. R9 (HE576996)	87
18b	<i>Roseovarius</i> sp. 2S5-2 (AB114422)	89
19b	Bacteria no cultivada BJGMM-3s-321 (JQ801018)	100
20b	Bacteria no cultivada BJGMM-3s-321 (JQ801018)	100
21b	<i>Roseovarius</i> sp. 2S5-2 (AB114422)	95

Tabla 13. Continuación

Banda	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
22b	Bacteria no cultivada SN135 (EU735690)	88
23b	<i>Actinobacteria</i> no cultivada RS34 (HQ397410)	95
24b	<i>Roseovarius</i> sp. 2S5-2 (AB114422)	93
25b	<i>Bacteroidetes</i> no cultivado HAHS13.37 (HQ396952)	100
26b	<i>Roseovarius tolerans</i> Ekho Lake172 <sup>T</sup> (Y11551)	88
27b	<i>Actinobacteria</i> no cultivada RS34 (HQ397410)	90
28b	<i>Rhodopseudomonas</i> sp. P531(3) (GU370107)	93
29b	Bacteria no cultivada BJGMM-3s-321 (JQ801018)	92
30b	<i>Bacteroidetes</i> no cultivado RS156 (HQ397359)	100
31b	<i>Euhalothece</i> sp. MPI 96N304 (AJ000713)	92

Una vez identificadas las secuencias de las bandas del gel de DGGE para el Dominio *Bacteria*, se procedió a la construcción del árbol filogenético usando el algoritmo Neighbour-Joining, tal y como se mencionó en el apartado II. 10 de Material y Métodos. Se incluyeron en el análisis filogenético las secuencias de los microorganismos más idénticos (Tabla 13) y las de las especies tipo del género al que pertenecen las secuencias objeto de estudio.

En la Figura 21 se muestra el árbol filogenético obtenido, en el cual se puede observar como todas las secuencias de este estudio se distribuyen claramente en cinco clústers correspondientes a los phyla *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria* y *Acidobacteria*.

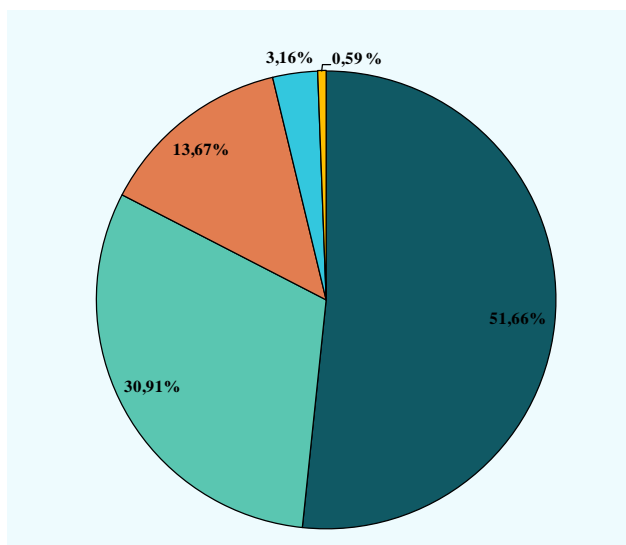


**Figura 21.** Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio *Bacteria* obtenido mediante el método Neighbour-Joining. Los números de acceso en la base de datos Genbank de las secuencias de referencia se encuentran entre paréntesis. Se indican los valores de “bootstrap” mayores del 50%. 1b a 31b: bandas secuenciadas de bacterias

La distribución porcentual de los phyla encontrados en las tres muestras analizadas de la salina de Cabo de Gata se muestra en la Figura 22.

En todas las muestras estudiadas predominan los phyla *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* y *Actinobacteria*. El phylum *Bacteroidetes* se caracterizó por presentar mayores porcentajes de representantes en las tres muestras analizadas (51,66% del total de las intensidades relativas de las bandas), seguido por los phyla *Proteobacteria* (30,91%), *Cyanobacteria* (13,67%) y *Actinobacteria* (3,16%). No se observó la presencia del phylum *Acidobacteria* (banda 6b) en las muestras 1C y 3C; su presencia se detectó únicamente en la muestra 2C y con un porcentaje muy bajo (0,59%).

■ *Bacteroidetes*      ■ *Proteobacteria*      ■ *Cyanobacteria*  
■ *Actinobacteria*      ■ *Acidobacteria*



**Figura 22.** Abundancia relativa de la comunidad bacteriana en Cabo de Gata (Almería)

En cuanto a la comunidad de arqueas hallada en la salina de Cabo de Gata, el perfil de DGGE mostrado en la Figura 20 dió lugar a 18 bandas en diferentes posiciones del gel de DGGE. La secuenciación y la posterior comparación de dichas bandas con las depositadas en la base de datos Genbank se muestra en la Tabla 14, donde se observa la afiliación de las secuencias obtenidas en las tres muestras analizadas.

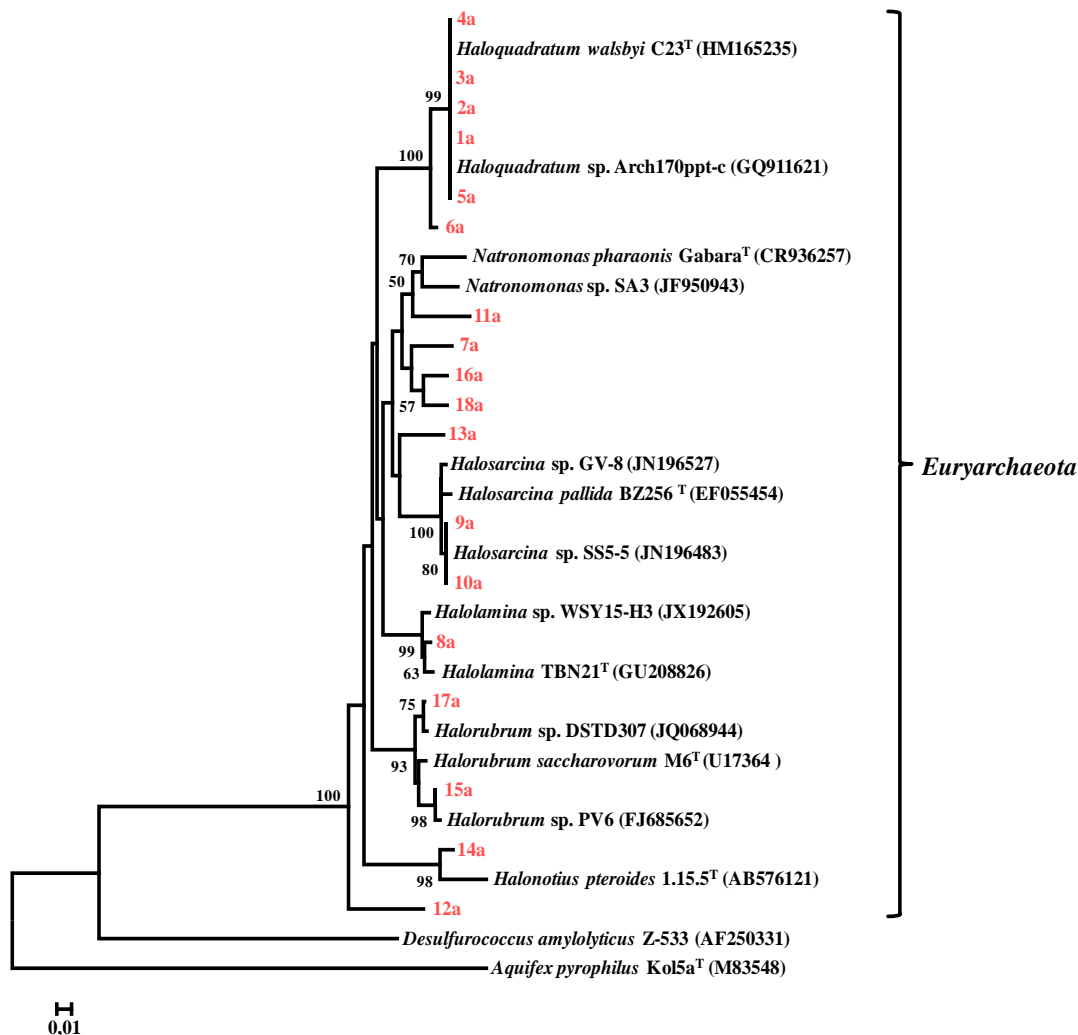
**Tabla 14.** Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio *Archaea* obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE

Banda	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
1a	<i>Haloquadratum walsbyi</i> C23 <sup>T</sup> (HM165235)	99
2a	<i>Haloquadratum walsbyi</i> C23 <sup>T</sup> (HM165235)	100
3a	<i>Haloquadratum walsbyi</i> C23 <sup>T</sup> (HM165235)	100
4a	<i>Haloquadratum walsbyi</i> C23 <sup>T</sup> (HM165235)	100
5a	<i>Haloquadratum walsbyi</i> C23 <sup>T</sup> (HM165235)	100
6a	<i>Haloquadratum walsbyi</i> C23 <sup>T</sup> (HM165235)	97
7a	<i>Natronomonas</i> sp. SA3 (JF950943)	94
8a	<i>Halolamina</i> sp. WSY15-H3 (JX192605)	98
9a	<i>Halosarcina</i> sp. SS5-5 (JN196483)	100
10a	<i>Halosarcina</i> sp. SS5-5 (JN196483)	100
11a	<i>Natronomonas</i> sp. SA3 (JF950943)	94
12a	<i>Natronomonas pharaonis</i> Gabara <sup>T</sup> (CR936257)	92
13a	<i>Halosarcina</i> sp. GV-8 (JN196527)	94
14a	<i>Halonotius pteroides</i> 1.15.5 <sup>T</sup> (AB576121)	96
15a	<i>Halorubrum</i> sp. PV6 (FJ685652)	99
16a	<i>Natronomonas pharaonis</i> Gabara <sup>T</sup> (CR936257)	94
17a	<i>Halorubrum</i> sp. DSTD307 (JQ068944)	99
18a	<i>Natronomonas</i> sp. SA3 (JF950943)	95

Todas las secuencias identificadas mostraron más del 90% de identidad con las existentes en la base de datos Genbank.

La Figura 23 muestra el árbol filogenético construido a partir de las secuencias obtenidas de las bandas escindidas del gel de DGGE para el Dominio *Archaea* empleando el algoritmo Neighbour-Joining. Como se puede apreciar en la Figura 23, todas las secuencias se afiliaban con el phylum *Euryarchaeota*. No se obtuvieron secuencias relacionadas con el phylum *Crenarchaeota*.



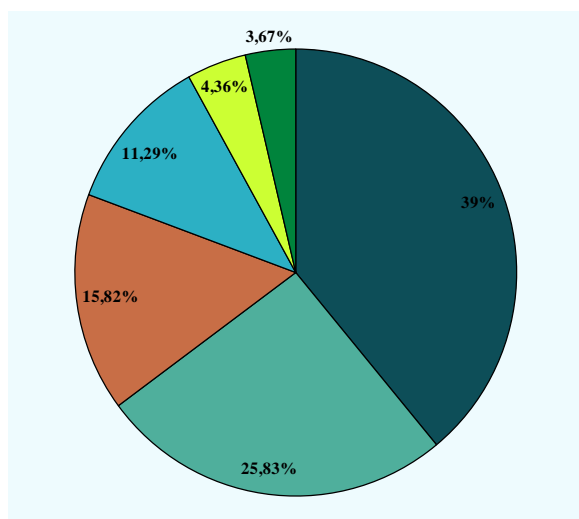


**Figura 23.** Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio *Archaea* obtenido mediante el método Neighbour-Joining. Los números de acceso en la base de datos Genbank de las secuencias de referencia se encuentran entre paréntesis. Se indican los valores de “bootstrap” mayores del 50%. 1a a 18a: bandas secuenciadas de arqueas

El árbol filogenético está formado por un único clúster que incluye seis géneros del phylum *Euryarchaeota*, los cuales son, *Haloquadratum*, *Natronomonas*, *Halorubrum*, *Halosarcina*, *Halonotius* y *Halolamina*. Las especies *Desulfurococcus amylolyticus* Z-533 (AF250331) y *Aquifex pyrophilus* Kol5a<sup>T</sup> (M83548) fueron incluidas en el análisis como “outgroup”.

El análisis de las intensidades relativas de las bandas correspondientes al Dominio *Archaea* (Figura 24) mostró que el 39% de los individuos (abundancia relativa) presentaron afiliación filogenética con el género *Natronomonas* y el 25,83% con el género *Halorubrum*. Por su parte, los géneros *Haloquadratum* y *Halosarcina* también presentaron porcentajes altos de abundancia relativa (15,82% y 11,29% respectivamente). Por el contrario, los géneros *Halolamina* y *Halonotius* mostraron valores bajos de abundancia relativa (4,36% y 3,67% respectivamente).

■ *Natronomonas*    ■ *Halorubrum*    ■ *Haloquadratum*  
 ■ *Halosarcina*    ■ *Halolamina*    ■ *Halonotius*



**Figura 24.** Abundancia relativa de la comunidad de arqueas en Cabo de Gata (Almería)

El análisis de la diversidad microbiana en la salina de Cabo de Gata (Almería) también incluye el análisis de la comunidad del género *Halomonas*, puesto que este último se aísla fácilmente en los ambientes salinos e hipersalinos.

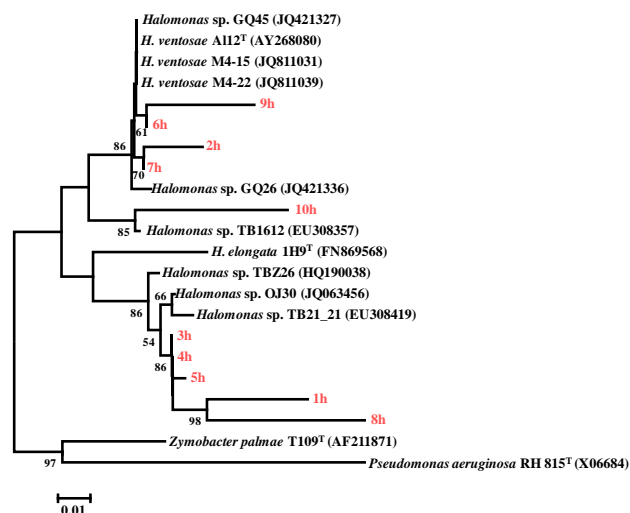
La separación de los fragmentos amplificados de los genes del ARNr 16S con los cebadores específicos para el género *Halomonas* mediante la técnica DGGE permitió seleccionar un total de 10 bandas situadas en distintas posiciones del gel de DGGE (Figura 20).

La asignación de las 10 secuencias obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE se muestra en la Tabla 15.

**Tabla 15.** Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S del género *Halomonas* obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE

Banda	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
1h	<i>Halomonas</i> sp. OJ30 (JQ063456)	98
2h	<i>Halomonas</i> sp. GQ45 (JQ421327)	98
3h	<i>Halomonas</i> sp. TB21_21 (EU308419)	100
4h	<i>Halomonas</i> sp. OJ30 (JQ063456)	100
5h	<i>Halomonas</i> sp. OJ30 (JQ063456)	99
6h	<i>Halomonas</i> sp. GQ45 (JQ421327)	99
7h	<i>Halomonas</i> sp. GQ45 (JQ421327)	99
8h	<i>Halomonas</i> sp. TB21_21 (EU308419)	96
9h	<i>Halomonas</i> sp. GQ45 (JQ421327)	96
10h	<i>Halomonas</i> sp. TB1612 (EU308357)	96

La Figura 25 muestra el árbol filogenético obtenido mediante el método Neighbour-Joining. Se incluyeron en el análisis filogenético, además de las secuencias objeto de estudio, las secuencias de referencia que presentaron mayor identidad y las secuencias de las especies *Zymobacter palmae* T109<sup>T</sup> (AF211871) y *Pseudomonas aeruginosa* RH 815<sup>T</sup> (X06684) como “outgroups”.



**Figura 25.** Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S del género *Halomonas* obtenido mediante el método Neighbour-Joining. Los números de acceso en la base de datos Genbank de las secuencias de referencia se encuentran entre paréntesis. Se indican los valores de “bootstrap” mayores del 50%. 1h a 18h: bandas secuenciadas de *Halomonas*

En la Figura 25 se observó la formación de dos clústers, el primero incluye las secuencias de las bandas 2h, 6h, 7h, 9h y 10h junto con las especies *H. ventosae* M4-22 (JQ811039), *H. ventosae* M4-15 (JQ811031) y la especie tipo *H. ventosae* A112<sup>T</sup> (AY268080). El segundo clúster está formado por las secuencias de las bandas 1h, 3h, 4h, 5h y 8h que mostraron identidad con *Halomonas* sp. OJ30 (JQ063456) y *Halomonas* sp. TB21\_21 (EU308419) las cuales pudieran constituir nuevas especies del género *Halomonas*.

### Rango ponderado de la riqueza (*Rr*), índices de Shannon-Weaver (*H'*) y de Simpson (*SI*)

El rango ponderado de la riqueza se determinó multiplicando el número de bandas en una muestra (carril de DGGE) por el gradiente desnaturalizante entre la primera y la última banda del carril de DGGE. Por otro lado, en este apartado se evaluó la diversidad mediante la relación entre el número de bandas en cada muestra y sus respectivas intensidades con el fin de determinar los índices de *Shannon-Weaver* y *Simpson*. En la Tabla 16 se muestran los resultados obtenidos.

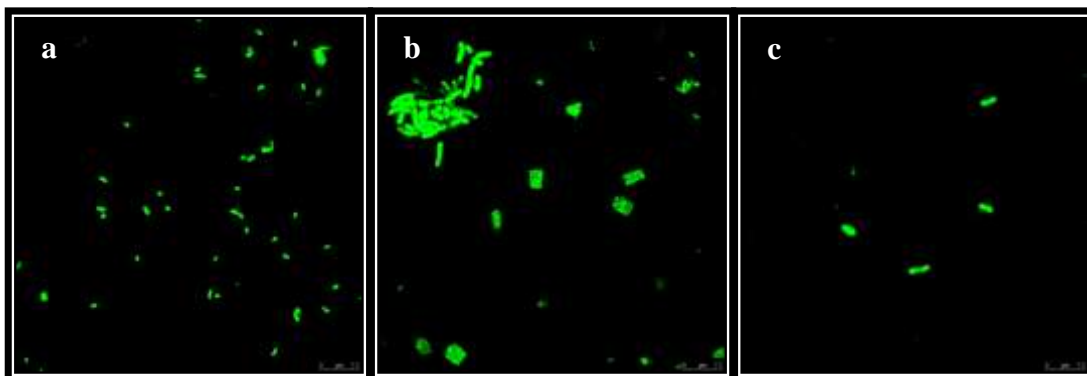
**Tabla 16.** Rango ponderado de la riqueza (*Rr*), índices de *Shannon-Weaver* (*H'*) y *Simpson* (*SI*) en la comunidad de bacterias, arqueas y *Halomonas* en Cabo de Gata (Almería)

Comunidad	Muestra	<i>Rr</i>	Promedio	<i>H'</i>	Promedio	<i>SI</i>	Promedio
<b>Bacterias</b>	1C	61,60		2,84		0,08	
	2C	30,16	46,81 ± 15,80	2,66	2,74 ± 0,09	0,08	0,08 ± 0,00
	3C	48,67		2,70		0,09	
<b>Arqueas</b>	1C	0,76		0,98		0,40	
	2C	4,87	2,53 ± 2,11	2,06	1,68 ± 0,60	0,14	0,23 ± 0,14
	3C	1,96		1,99		0,15	
<b>Halomonas</b>	1C	7,91		1,91		0,16	
	2C	0,96	6,11 ± 4,53	1,03	1,49 ± 0,44	0,37	0,28 ± 0,10
	3C	9,47		1,55		0,30	

Los mayores valores de *Rr* y del índice de *Shannon-Weaver* fueron obtenidos en la comunidad bacteriana, mientras que los valores del índice de *Simpson* fueron los más bajos (Tabla 16). Sin embargo, los datos de *Rr* y de *H'* obtenidos en las comunidades de arqueas y de *Halomonas* fueron más bajos y mostraron valores altos de dominancia.

## Análisis de la comunidad microbiana mediante CARD-FISH

Con la finalidad de confirmar la presencia de las comunidades de bacterias, arqueas, y *Halomonas* estudiadas mediante la técnica PCR/DGGE en la salina de Cabo de Gata, se llevó a cabo un análisis *in situ* de las mismas muestras empleando la técnica CARD-FISH. Los resultados obtenidos tras la hibridación de las muestras con las sondas correspondientes (véase el apartado IV de Material y Métodos) se muestran en la Figura 26.



**Figura 26.** CARD-FISH de muestras de Cabo de Gata. **a:** Bacterias marcadas con la sonda Eub338-HRP, FITC; **b:** Arqueas marcadas con la sonda Arc915-HRP, FITC; **c:** *Halomonas* marcadas con la sonda Hlm474-HRP, FITC. La escala es de 10  $\mu\text{m}$

Tal y como se puede apreciar en las imágenes a, b y c de la Figura 26, fue posible detectar fluorescencia en las muestras hibridadas con las sondas correspondientes al Dominio *Bacteria*, al Dominio *Archaea* y al género *Halomonas*. En la imagen b de la Figura 19, se observan arqueas cuadradas que podrían ser células pertenecientes a especies del género *Haloquadratum*.

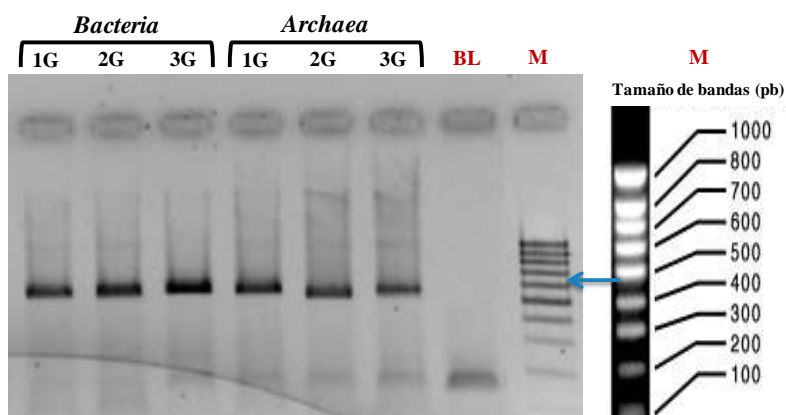
### I. 1. 2. Salina de La Malahá (Granada)

Se tomaron tres muestras de agua de una salina interior de la provincia de Granada de características atalasoalinas. La salinidad de las muestras 1G, 2G y 3G fue de 15,5%, (p/v), 17,5%, (p/v) y 16,6%, (p/v) y el pH de 6,9, 6,8 y 6,9 respectivamente.

## Amplificación por PCR del gen del ARNr 16S

Los productos de PCR utilizando cebadores generales para el Dominio *Bacteria*, y el Dominio *Archaea* y otros específicos para el género *Halomonas* se muestran en la Figura 27.

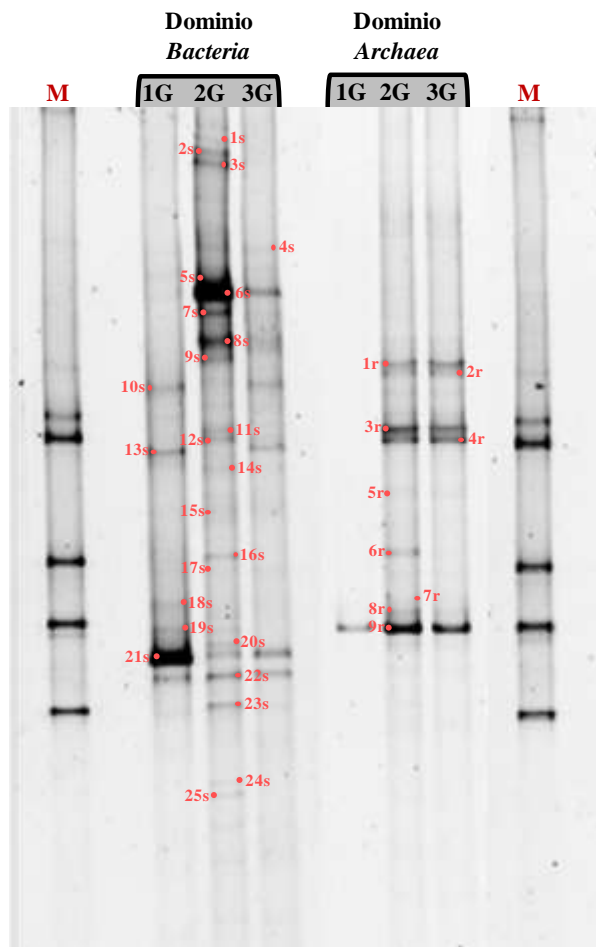
Todas las muestras presentaron una banda del tamaño esperado (aproximadamente 500pb) para la amplificación del gen del ARNr 16S de bacterias y arqueas, aunque no se obtuvo resultado en la reacción de amplificación del gen del ARNr 16S del género *Halomonas*. Además, no se obtuvieron bandas en el control negativo; estas amplificaciones se realizaron por triplicado.



**Figura 27.** Productos de amplificación del gen del ARNr 16S (500pb). 1G, 2G y 3G: Muestras tomadas de la salina de La Malahá (Granada). **M**: Marcador Molecular (1000pb). **BL**: Blanco

## DGGE

Tras la amplificación del gen del ARNr 16S del Dominio *Bacteria* y del Dominio *Archaea* en las muestras tomadas de la salina de La Malahá (Granada), se procedió a la separación de los amplicones obtenidos mediante DGGE. Los resultados de la separación se muestran en la Figura 28.



**Figura 28.** Perfiles obtenidos por la técnica de DGGE de los fragmentos del gen del ARNr 16S. **M:** Marcador. **1s** a **25s:** bandas secuenciadas de bacterias, **1r** a **9r:** bandas secuenciadas de arqueas. 1G, 2G y 3G: Muestras tomadas de la salina de La Malahá (Granada)

El patrón de DGGE de la comunidad bacteriana permitió detectar un total de 25 bandas en diferentes posiciones del gel y un total de 9 bandas en la comunidad de arqueas. Todas las bandas se cortaron del gel y fueron reamplificadas y secuenciadas con el fin de identificar su afiliación taxonómica.

### *Análisis de las secuencias*

La Tabla 17 muestra la asignación de las secuencias obtenidas a partir de las bandas escindidas del gel de DGGE de la población bacteriana después de compararlas con la misma región de los genes del ARNr 16S depositados en la base de datos Genbank.

**Tabla 17.** Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio *Bacteria* obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE

Banda	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
1s	<i>Cyanothece</i> sp. no cultivada SL19 (HQ914236)	91
2s	<i>Cyanothece</i> sp. no cultivada SL19 (HQ914236)	96
3s	<i>Cyanothece</i> sp. no cultivada SL19 (HQ914236)	97
4s	<i>Cyanothece</i> sp. no cultivada SL19 (HQ914236)	98
5s	<i>Cyanothece</i> sp. 115 (DQ243690)	97
6s	<i>Cyanothece</i> sp. 109 (DQ243688)	98
7s	<i>Cyanothece</i> sp. no cultivada SL19 (HQ914236)	94
8s	<i>Cyanothece</i> sp. no cultivada SL19 (HQ914236)	93
9s	Bacteria no cultivada SINI723 (HM127068)	94
10s	<i>Salinibacter</i> sp. no cultivada AAA188_E23 (JN839857)	97
11s	<i>Salinibacter ruber</i> POLA 13 (AF323503)	93
12s	<i>Salinibacter</i> sp. no cultivada SFC1F091 (AM981384)	85
13s	<i>Salinibacter</i> sp. no cultivada AAA188_E23 (JN839857)	98
14s	<i>Salinibacter</i> sp. no cultivada SFC1F091 (AM981384)	90
15s	Bacteria no cultivada SINI723 (HM127068)	94
16s	Bacteria no cultivada SINH536 (HM128083)	94
17s	Bacteria no cultivada SINH984 (HM128402)	94
18s	<i>Palleronia marisminoris</i> M3-89 (JQ811009)	93
19s	<i>Ectothiorhodospiraceae</i> IMCC2352B (GU570138)	92
20s	Bacteria no cultivada LGH02-B-157 (JN811706)	96
21s	Bacteria no cultivada LGH02-B-157 (JN811706)	100
22s	Bacteria no cultivada LGH02-B-157 (JN811706)	95
23s	Bacteria no cultivada LGH02-B-157 (JN811706)	99
24s	<i>Halothiobacillus</i> sp. NP36 (EU196319)	94
25s	Bacteria no cultivada LGH02-B-157 (JN811706)	93

Como se puede apreciar en la Tabla 17, todas las secuencias mostraron más del 90% de identidad con las secuencias de referencia excepto la secuencia de la banda 12s que mostró un porcentaje menor de identidad, 85% con *Salinibacter* sp.

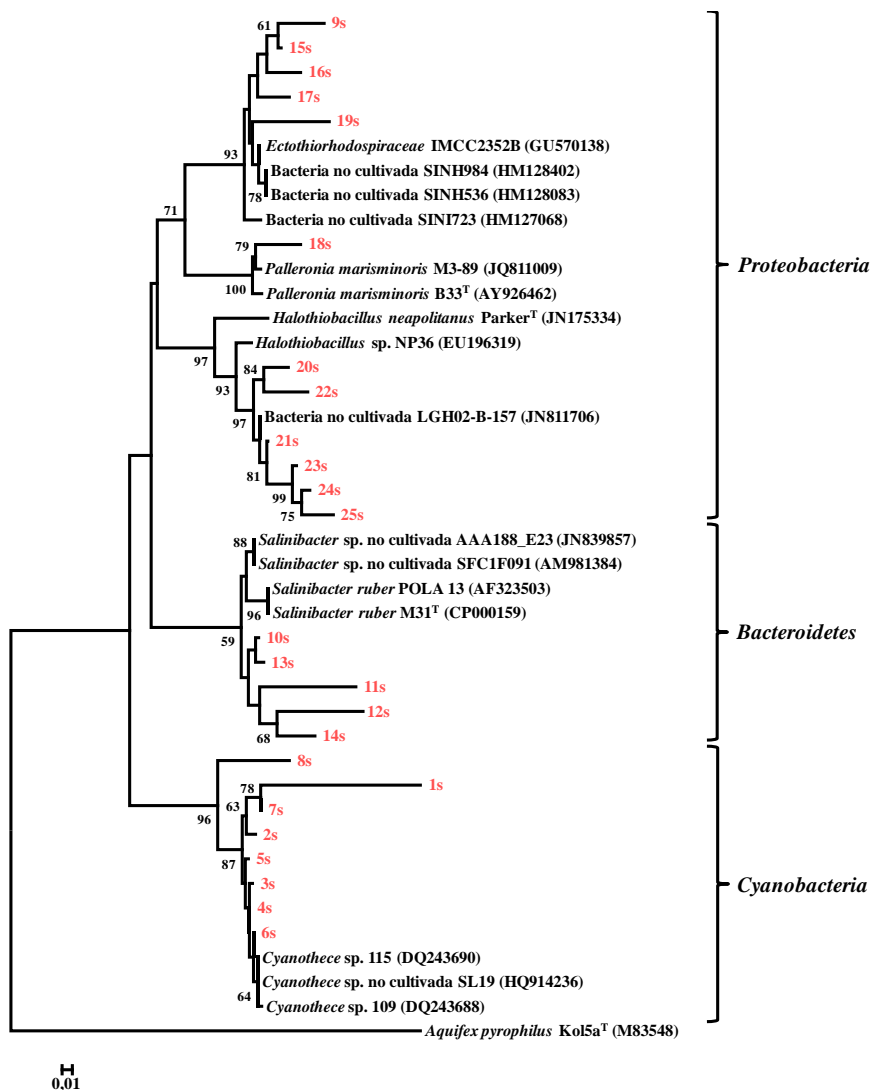


Para determinar la distribución filogenética de las secuencias del gen del ARNr 16S de la población de bacterias, se llevó a cabo la construcción del árbol filogenético basado en el algoritmo Neighbour-Joining. Se utilizaron además de las secuencias de las bandas que se extrajeron del DGGE, las secuencias del gen del ARNr 16S de los microorganismos con porcentajes de identidad más elevados (Tabla 17), así como las secuencias de las especies tipo de los géneros relacionados.

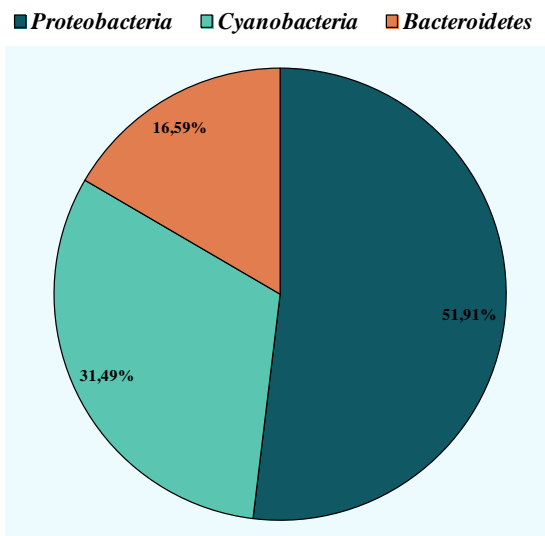
La Figura 29 muestra el árbol filogenético obtenido de la comunidad bacteriana, donde se observó la formación de tres clústers. El primer clúster, mayoritario, incluye las secuencias identificadas como bacterias del phylum *Proteobacteria*, el segundo está compuesto por secuencias relacionadas con el phylum *Bacteroidetes* y el tercer clúster reunió las secuencias afiliadas con el phylum *Cyanobacteria*.

La Figura 30 representa gráficamente los porcentajes de las abundancias relativas (intensidades de bandas) de la comunidad bacteriana obtenida en las tres muestras analizadas de la salina de La Malahá. El phylum *Proteobacteria* fue el más abundante con un 51,91% de abundancia relativa respecto al total de las intensidades relativas de las bandas.

Por su parte, el phylum *Cyanobacteria* representado por especies del género *Cyanothece* mostró un 31,49% de abundancia relativa seguido por el phylum *Bacteroidetes*, representado por un solo género, *Salinibacter*, con un 16,59% de abundancia relativa respecto al total de la diversidad de bacterias.



**Figura 29.** Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio *Bacteria* obtenido mediante el método Neighbour-Joining. Los números de acceso en la base de datos Genbank de las secuencias de referencia se encuentran entre paréntesis. Se indican los valores de “bootstrap” mayores del 50%. 1s a 25s: bandas secuenciadas de bacterias



**Figura 30.** Abundancia relativa de la comunidad bacteriana en La Malahá (Granada)

En cuanto a la comunidad de arqueas encontrada en la salina de La Malahá, el perfil de DGGE mostrado en la Figura 28 nos permitió cortar y secuenciar un total de 9 bandas.

Con la finalidad de realizar un estudio filogenético, se compararon las secuencias obtenidas a partir de las bandas escindidas del perfil de DGGE con la misma región de los genes del ARNr 16S recuperados de la base de datos Genbank. La asignación taxonómica de las bandas secuenciadas se resume en la Tabla 18. Todas las secuencias fueron relacionadas con el phylum *Euryarchaeota* y mostraron más del 90% de identidad con las secuencias de referencia. No se obtuvieron secuencias relacionadas con el phylum *Crenarchaeota*.

**Tabla 18.** Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio *Archaea* obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE

Banda	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
1r	<i>Haloquadratum walsbyi</i> C23 <sup>T</sup> (HM165235)	100%
2r	<i>Haloquadratum walsbyi</i> C23 <sup>T</sup> (HM165235)	99%
3r	<i>Haloquadratum walsbyi</i> C23 <sup>T</sup> (HM165235)	99%
4r	<i>Haloquadratum walsbyi</i> C23 <sup>T</sup> (HM165235)	99%
5r	<i>Halorubrum</i> sp. LYG-1 16S (JX188265)	98%

Tabla 18. Continuación

Banda	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
6r	<i>Haloquadratum walsbyi</i> C23 <sup>T</sup> (HM165235)	91%
7r	<i>Halorubrum</i> sp. LYG-1 16S (JX188265)	99%
8r	<i>Halorubrum</i> sp. LYG-1 16S (JX188265)	100%
9r	<i>Halorubrum</i> sp. LYG-1 16S (JX188265)	99%

La Figura 31 representa el árbol filogenético construido a partir de las secuencias de las bandas escindidas del DGGE y las secuencias de referencia (Tabla 18). En el árbol se observó la formación de dos clústers. En el primer grupo se encuentran las secuencias afiliadas con el género *Haloquadratum*, mientras que el segundo clúster agrupa las secuencias relacionadas con el género *Halorubrum*.

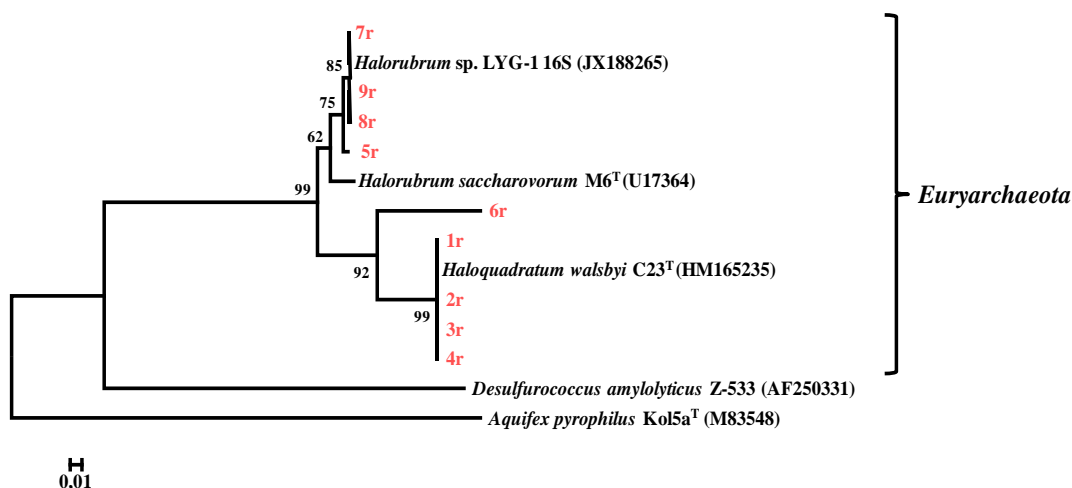
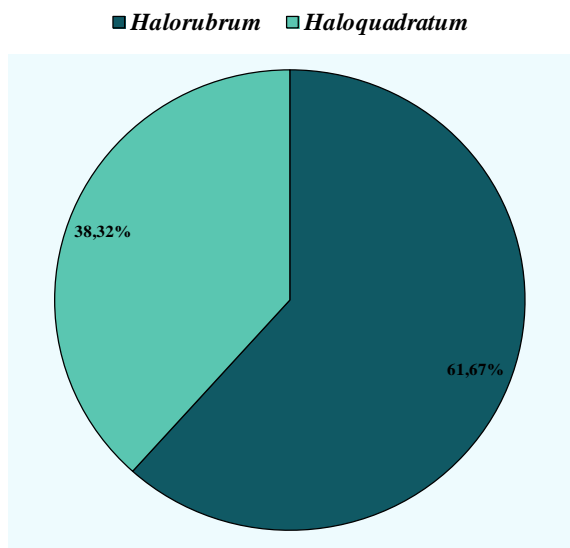


Figura 31. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio *Archaea* obtenido mediante el método Neighbour-Joining. Los números de acceso en la base de datos Genbank de las secuencias de referencia se encuentran entre paréntesis. Se indican los valores de “bootstrap” mayores del 50%. 1r a 9r: bandas secuenciadas de arqueas

La Figura 32 representa la distribución gráfica de las abundancias relativas de la comunidad de arqueas hallada en las tres muestras analizadas de la salina de La Malahá (Granada). Como se puede apreciar en dicha figura, sólo se detectaron dos géneros en la comunidad de arqueas. El género *Halorubrum* fue el más abundante y constituyó el 61,67% de abundancia relativa respecto al total de intensidades de bandas, mientras que el 38,32% de abundancia relativa restante correspondió a miembros del género *Haloquadratum*.



**Figura 32.** Abundancia relativa de la comunidad de arqueas en La Malahá (Granada)

### *Rango ponderado de la riqueza (Rr), índices de Shannon-Weaver (H') y de Simpson (SI)*

Los resultados del análisis del rango ponderado de la riqueza, de la diversidad y de la dominancia se muestran en la Tabla 19.

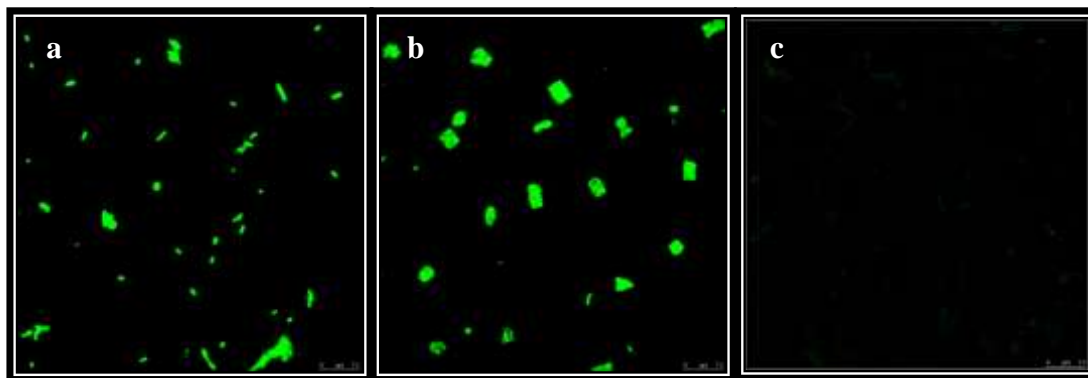
**Tabla 19.** Rango ponderado de la riqueza (*Rr*), índices de *Shannon-Weaver* (*H'*) y *Simpson* (*SI*) en la comunidad de bacterias y arqueas en La Malahá (Granada)

Comunidad	Muestra	<i>Rr</i>	Promedio	<i>H'</i>	Promedio	<i>SI</i>	Promedio
<b>Bacterias</b>	1G	4,14		1,10		0,49	
	2G	48,82	19,04 ± 25,79	2,71	1,88 ± 0,80	0,08	0,25 ± 0,19
	3G	4,14		1,83		0,17	
<b>Arqueas</b>	1G	0		0		1	
	2G	10,96	10,62 ± 6,14	1,78	1,70 ± 0,98	0,21	0,47 ± 0,38
	3G	10,28		1,61		0,22	

El promedio de *Rr* y del índice de *H'* fue mayor en la comunidad de bacterias. Por el contrario, el valor medio de la dominancia (*SI*) fue mayor en la comunidad de arqueas.

## Análisis de la comunidad microbiana mediante CARD-FISH

Los resultados de las hibridaciones con las sondas correspondientes a cada población se muestran en la Figura 33.



**Figura 33.** CARD-FISH de muestras de La Malahá. **a:** Bacterias marcadas con la sonda Eub338-HRP, FITC. **b:** Arqueas marcadas con la sonda Arc915-HRP, FITC; **c:** Resultado negativo con la sonda de *Halomonas* Hlm474-HRP, FITC; La escala es de 10 µm

En las imágenes a y b de la Figura 33, fue posible detectar fluorescencia en las muestras hibridadas con las sondas correspondientes al Dominio *Bacteria* y al Dominio *Archaea*. Sin embargo, no se detectaron señales en la imagen c (Figura 33) correspondiente a la hibridación con la sonda Hlm474-HRP específica para el género *Halomonas*, lo que apoya los resultados obtenidos mediante la técnica PCR/DGGE, en la que no se obtuvieron amplicones en la reacción de PCR del gen del ARNr 16S.

### I. 1. 3. Salinas de Larache, Souk larbaâ y Asilah (Marruecos)

En este apartado se describe el estudio de la diversidad procariota en dos hábitats talasohalinos y uno atalasalino situados en el norte de Marruecos, concretamente, las salinas de Larache, Souk larbaâ y Asilah. Puesto que las muestras de dichas salinas mostraron perfiles de diversidad procariota similares, los resultados de DGGE se mostraron en la misma Figura, no obstante, los resultados obtenidos de la abundancia de los taxa identificados, la riqueza de especies y de la diversidad fueron mostrados en este apartado por cada salina.

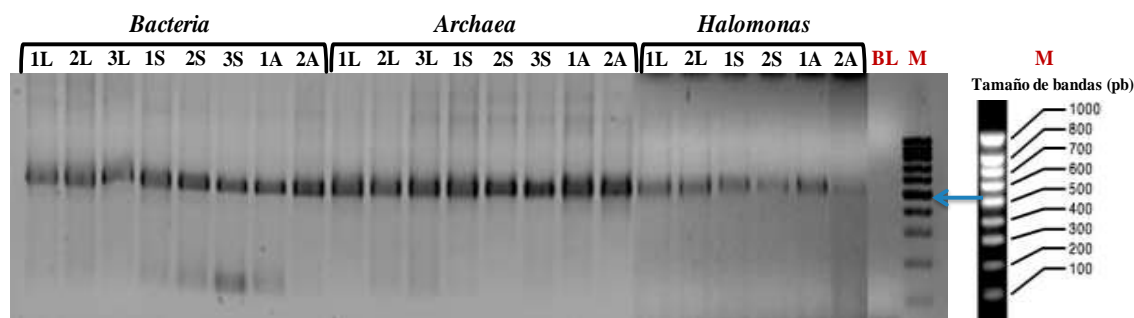
La concentración de sal que presentaron estas muestras fue de 14,8%, (p/v), 7,8%, (p/v) y de 2,1%, (p/v) en las muestras 1L, 2L y 3L correspondientes a la salina de Larache y de 3,9%, (p/v), 16%, (p/v) y de 3,5%, (p/v) en las muestras 1S, 2S y 3S pertenecientes a la salina de

Souk Iarbaâ respectivamente, mientras que la salinidad de las muestras 1A y 2A tomadas de la salina de Asilah fue de 14,6%, (p/v) y 14%, (p/v) respectivamente.

Asimismo, los valores de pH fueron 6,6, 8,0, 7,6, 7,3, 7,5, 8,3, 6,6 y de 6,6 en las muestras 1L, 2L, 3L, 1S, 2S, 3S, 1A y 2A correspondientes a las salinas de Larache, Souk Iarbaâ y Asilah.

### Amplificación por PCR del gen del ARNr 16S

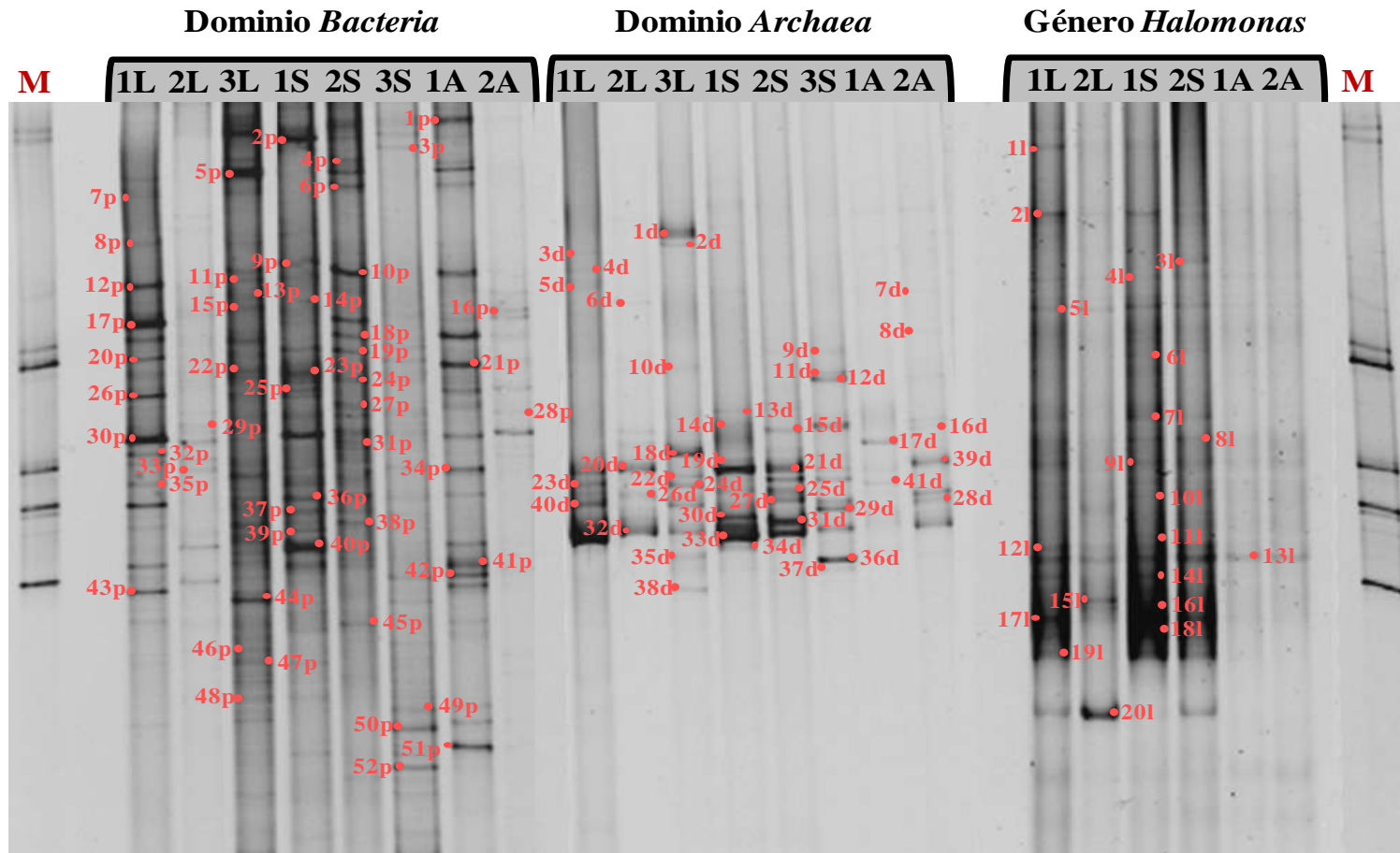
Las condiciones de PCR mencionadas en el apartado II. 4 de Material y Métodos dieron lugar a amplificaciones de los genes del ARNr 16S del Dominio *Bacteria* y del Dominio *Archaea*, mostrándose una banda del tamaño esperado (500pb) en todas las muestras. En el caso del gen del ARNr 16S del género *Halomonas*, se obtuvieron amplicones en las muestras 1L, 2L, 1S, 2S, 1A y 2A (Figura 34). No se obtuvieron bandas en el control negativo. Todas las amplificaciones se realizaron por triplicado.



**Figura 34.** Productos de amplificación del gen del ARNr 16S (500pb). 1L, 2L y 3L: Muestras tomadas de la salina de Larache, 1S, 2S y 3S: Muestras tomadas de la salina de Souk Iarbaâ, 1A y 2A: Muestras tomadas de la salina de Asilah. **M:** Marcador Molecular (1000pb). **BL:** Blanco

### DGGE

Los perfiles obtenidos se muestran en la Figura 35. Se analizaron 52 bandas en el perfil de DGGE de la comunidad bacteriana, 41 bandas de la comunidad de arqueas y 20 bandas de la comunidad de *Halomonas*.



**Figura 35.** Perfiles obtenidos por la técnica de DGGE de los fragmentos del gen del ARNr 16S. **M:** Marcador. **1p a 52p:** bandas secuenciadas de bacterias, **1d a 41d:** bandas secuenciadas de arqueas, **1l a 20l:** bandas secuenciadas de *Halomonas*. 1L, 2L y 3L: Muestras tomadas de la salina de Larache, 1S, 2S y 3S: Muestras tomadas de la salina de Souk Iarbaâ, 1A y 2A: Muestras tomadas de la salina de Asilah



Todas las bandas marcadas en los perfiles de DGGE fueron cortadas y posteriormente se secuenciaron y se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos Genbank con el fin de identificar su afiliación taxonómica.

### Análisis de las secuencias

La Tabla 20 muestra las asignaciones de las bandas secuenciadas correspondientes al Dominio *Bacteria* en las ocho muestras analizadas por DGGE. Todas las secuencias obtenidas mostraron más del 90% de identidad con las secuencias de referencia a excepción de las secuencias 9p y 42p que mostraron porcentajes inferiores. Tras la identificación de dichas secuencias como microorganismos pertenecientes al Dominio *Bacteria*, se procedió a la construcción del árbol filogenético usando el método Neighbour-Joining mostrado en la Figura 36. Además de las secuencias objeto de estudio, se incluyeron en el análisis filogenético las secuencias (aproximadamente 400pb) de los microorganismos más próximos (Tabla 20) y las de las especies tipo de los géneros a los que pertenecían.

**Tabla 20.** Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio *Bacteria* obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE

Banda	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
<b>Salina de Larache</b>		
5p	Bacteria no cultivada A0-039 (JN977175)	99
7p	<i>Thiohalophilus thiocyanatoxydans</i> HRhD 2 <sup>T</sup> (DQ469584)	91
8p	<i>Thiohalophilus thiocyanatoxydans</i> HRhD 2 <sup>T</sup> (DQ469584)	99
11p	<i>Thiohalophilus thiocyanatoxydans</i> HRhD 2 <sup>T</sup> (DQ469584)	97
12p	<i>Thiohalophilus thiocyanatoxydans</i> HRhD 2 <sup>T</sup> (DQ469584)	97
13p	<i>Thiohalophilus thiocyanatoxydans</i> HRhD 2 <sup>T</sup> (DQ469584)	97
15p	<i>Thiohalophilus thiocyanatoxydans</i> HRhD 2 <sup>T</sup> (DQ469584)	96
17p	<i>Salinibacter</i> sp. DGO (HQ197983)	97
20p	<i>Bacillus subtilis</i> BS3902 (EU047884)	99
22p	<i>Parvularculaceae</i> no cultivada NdGal179 (FJ752919)	97
26p	<i>Stenotrophomonas</i> sp. TP-Snow-C47 (HQ327153)	99
29p	<i>Agrobacterium</i> sp. 2331 (JX174208)	99
30p	<i>Agrobacterium</i> sp. 2331 (JX174208)	100

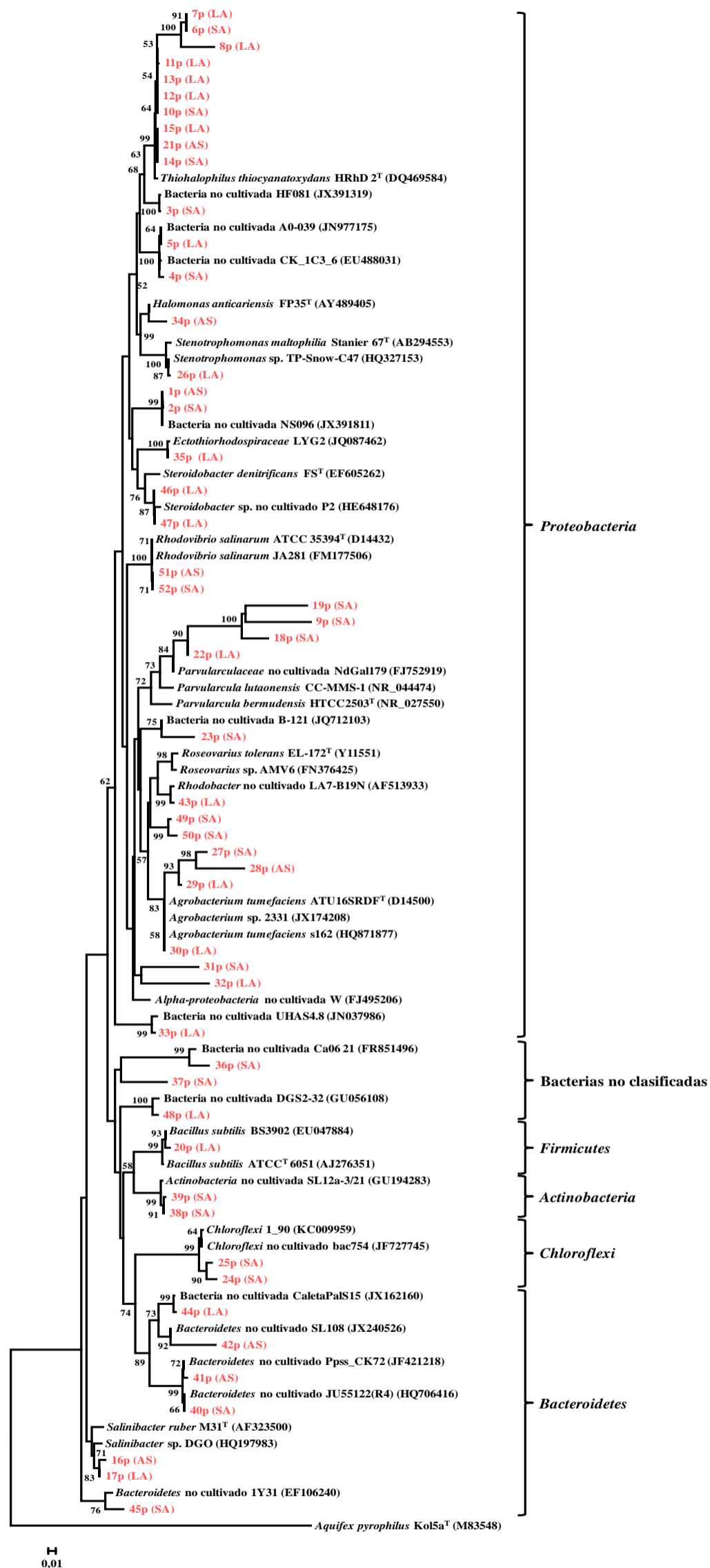
Tabla 20. Continuación

Banda	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
32p	<i>Alpha-proteobacteria</i> no cultivada W (FJ495206)	90
33p	Bacteria no cultivada UHAS4.8 (JN037986)	99
35p	<i>Ectothiorhodospiraceae</i> LYG2 (JQ087462)	99
43p	<i>Rhodobacter</i> no cultivado LA7-B19N (AF513933)	99
44p	Bacteria no cultivada CaletaPalS15 (JX162160)	99
46p	<i>Steroidobacter</i> sp. no cultivado P2 (HE648176)	99
47p	<i>Steroidobacter</i> sp. no cultivado P2 (HE648176)	99
48p	Bacteria no cultivada DGS2-32 (GU056108)	96
<b>Salina de Souk Iarbaâ</b>		
2p	Bacteria no cultivada NS096 (JX391811)	100
3p	Bacteria no cultivada HF081 (JX391319)	99
4p	Bacteria no cultivada CK_1C3_6 (EU488031)	98
6p	<i>Thiohalophilus thiocyanatoxydans</i> HRhD 2 <sup>T</sup> (DQ469584)	99
9p	<i>Parvularculaceae</i> no cultivada NdGal179 (FJ752919)	87
10p	<i>Thiohalophilus thiocyanatoxydans</i> HRhD 2 <sup>T</sup> (DQ469584)	97
14p	<i>Thiohalophilus thiocyanatoxydans</i> HRhD 2 <sup>T</sup> (DQ469584)	96
18p	<i>Parvularculaceae</i> no cultivada NdGal179 (FJ752919)	93
19b	<i>Parvularculaceae</i> no cultivada NdGal179 (FJ752919)	91
23p	Bacteria no cultivada B-121 (JQ712103)	98
24p	<i>Chloroflexi</i> no cultivado bac754 (JF727745)	97
25p	<i>Chloroflexi</i> no cultivado bac754 (JF727745)	97
27p	<i>Agrobacterium</i> sp. 2331 (JX174208)	95
31p	<i>Alpha-proteobacteria</i> no cultivada W (FJ495206)	90
36p	Bacteria no cultivada Ca06 21 (FR851496)	94
37p	Bacteria no cultivada Ca06 21 (FR851496)	90
38p	<i>Actinobacteria</i> no cultivada SL12a-3/21 (GU194283)	99
39p	<i>Actinobacteria</i> no cultivada SL12a-3/21 (GU194283)	99
40p	<i>Bacteroidetes</i> no cultivado JU55122(R4) (HQ706416)	99

Tabla 20. Continuación

Banda	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
45p	<i>Bacteroidetes</i> no cultivado 1Y31 (EF106240)	93
49p	<i>Roseovarius</i> sp. AMV6 (FN376425)	92
50p	<i>Roseovarius</i> sp. AMV6 (FN376425)	92
52p	<i>Rhodovibrio salinarum</i> JA281 (FM177506)	99
<b>Salina de Asilah</b>		
2p	Bacteria no cultivada NS096 (JX391811)	100
3p	Bacteria no cultivada HF081 (JX391319)	99
4p	Bacteria no cultivada CK_1C3_6 (EU488031)	98
6p	<i>Thiohalophilus thiocyanatoxydans</i> HRhD 2 <sup>T</sup> (DQ469584)	99
9p	<i>Parvularculaceae</i> no cultivada NdGal179 (FJ752919)	87
10p	<i>Thiohalophilus thiocyanatoxydans</i> HRhD 2 <sup>T</sup> (DQ469584)	97
14p	<i>Thiohalophilus thiocyanatoxydans</i> HRhD 2 <sup>T</sup> (DQ469584)	96
18p	<i>Parvularculaceae</i> no cultivada NdGal179 (FJ752919)	93
19b	<i>Parvularculaceae</i> no cultivada NdGal179 (FJ752919)	91
23p	Bacteria no cultivada B-121 (JQ712103)	98

Como se puede apreciar en la Figura 36, las secuencias objeto de estudio se agruparon en varios clústers correspondientes a los phyla *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Chloroflexi*.



**Figura 36.** Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio *Bacteria* obtenido mediante el método Neighbour-Joining. Los números de acceso en la base de datos Genbank de las secuencias de referencia se encuentran entre paréntesis. Se indican los valores de “bootstrap” mayores del 50%. **1p a 52p:** bandas secuenciadas de bacterias. **(LA):** Salina de Larache, **(SA):** Salina de Souk larbaâ, **(AS):** Salina de Asilah





La Figura 37 muestra la distribución global de las abundancias relativas de todas las secuencias identificadas como bacterias en las salinas de Larache (Figura 37a), Souk larbaâ (Figura 37b) y Asilah (Figura 37c). Como se puede observar en dicha figura, el phylum *Proteobacteria* constituye el grupo más abundante y engloba el 72,79%, 64,33% y 60,16% de la diversidad bacteriana total obtenida en las salinas de Souk larbaâ, Asilah y Larache respectivamente. En segundo lugar, el phylum *Bacteroidetes* mostró un 32,11%, 29,05% y un 14,72% de abundancia relativa en las salinas de Larache, Asilah y Souk larbaâ respectivamente, mientras que las secuencias correspondientes a los phyla *Chloroflexi*, *Actinobacteria* y *Firmicutes* y un grupo de bacterias no clasificadas mostraron porcentajes más bajos.

En relación con la comunidad de arqueas hallada en las muestras tomadas de las salinas situadas al norte de Marruecos, el perfil de DGGE mostrado en la Figura 35 nos permitió seleccionar y escindir un total de 41 clases de bandas que fueron reamplificadas y secuenciadas.

Los resultados obtenidos del análisis se muestran en la Tabla 21, donde se observó que todas las secuencias presentaban más del 90% de identidad con las secuencias de referencia depositadas en la base de datos Genbank, excepto las secuencias 11d, 19d y 38d que mostraron menores porcentajes.

**Tabla 21.** Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio *Archaea* obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE

Banda	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
<b>Salina de Larache</b>		
1d	Arquea no cultivada GNA10H07 (EU731608)	99
2d	Arquea no cultivada SAS_D8 (FJ655596)	99
3d	<i>Halorubrum</i> sp. RBCA-103 (EU931309)	97
4d	<i>Halorubrum</i> sp. LYG-1 (JX188265)	99
5d	<i>Halorubrum</i> sp. LYG-1 (JX188265)	99
6d	<i>Haloarcula marismortui</i> rrnB HH10 (X61689)	94
10d	<i>Halobacterium</i> sp. no cultivada SFH1F071 (FN391286)	98
18d	<i>Haloarcula</i> sp. MGG3 (GU361138)	93
20d	<i>Halomicrobium zhouii</i> (HQ215546)	97
22d	<i>Haloarcula californiae</i> 8912 rrnA (AB477984)	94
23d	<i>Halonotius pteroides</i> 1.15.5 <sup>T</sup> (AY498641)	92

Tabla 21. Continuación

Banda	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
24d	<i>Halonotius pteroides</i> 1.15.5 <sup>T</sup> (AY498641)	97
26d	<i>Halobacterium noricense</i> 714 (JX481771)	91
40d	<i>Halomicrobium zhouii</i> (HQ215546)	93
32d	<i>Haloferax</i> sp. D107 (DQ373057)	98
35d	<i>Haloferax</i> sp. D107 (DQ373057)	99
38d	<i>Crenarchaeota</i> no cultivada D_H09 (AY454688)	88
<b>Salina de Souk Iarbaâ</b>		
9d	<i>Crenarchaeota</i> no cultivada D_H09 (AY454688)	95
11d	<i>Crenarchaeota</i> no cultivada D_H09 (AY454688)	87
12d	<i>Crenarchaeota</i> no cultivada D_H09 (AY454688)	94
13d	<i>Halorubrum</i> sp. LYG-1 (JX188265)	95
14d	<i>Halorubrum</i> sp. LYG-1 (JX188265)	98
15d	<i>Haloarcula marismortui</i> R5 (AY994193)	96
19d	<i>Crenarchaeota</i> no cultivada D_H09 (AY454688)	89
21d	<i>Haloarcula hispanica</i> SWI51 rrnB (JQ281794)	99
25d	<i>Haloarcula</i> sp. MGG3 (GU361138)	94
27d	<i>Haloferax</i> sp. D107 (DQ373057)	99
29d	<i>Halogramum gelatinilyticum</i> TNN44 (GQ282624)	100
30d	<i>Halorubrum</i> sp. GV-4 (JN196523)	95
31d	<i>Halorubrum coriense</i> DSTD103 (JQ068942)	99
33d	<i>Halorubrum</i> sp. LYG-1 (JX188265)	99
34d	<i>Halorubrum</i> sp. RBCA-103 (EU931309)	99
36d	<i>Halorubrum</i> sp. LYG-1 (JX188265)	99
37d	<i>Halorubrum</i> sp. LYG-1 (JX188265)	99
<b>Salina de Asilah</b>		
7d	Arquea no cultivada LL17 (JQ071779)	98
8d	<i>Halobacterium noricense</i> 714 (JX481771)	90
16d	<i>Halolamina</i> sp. WSY15-H3 (JX192605)	97

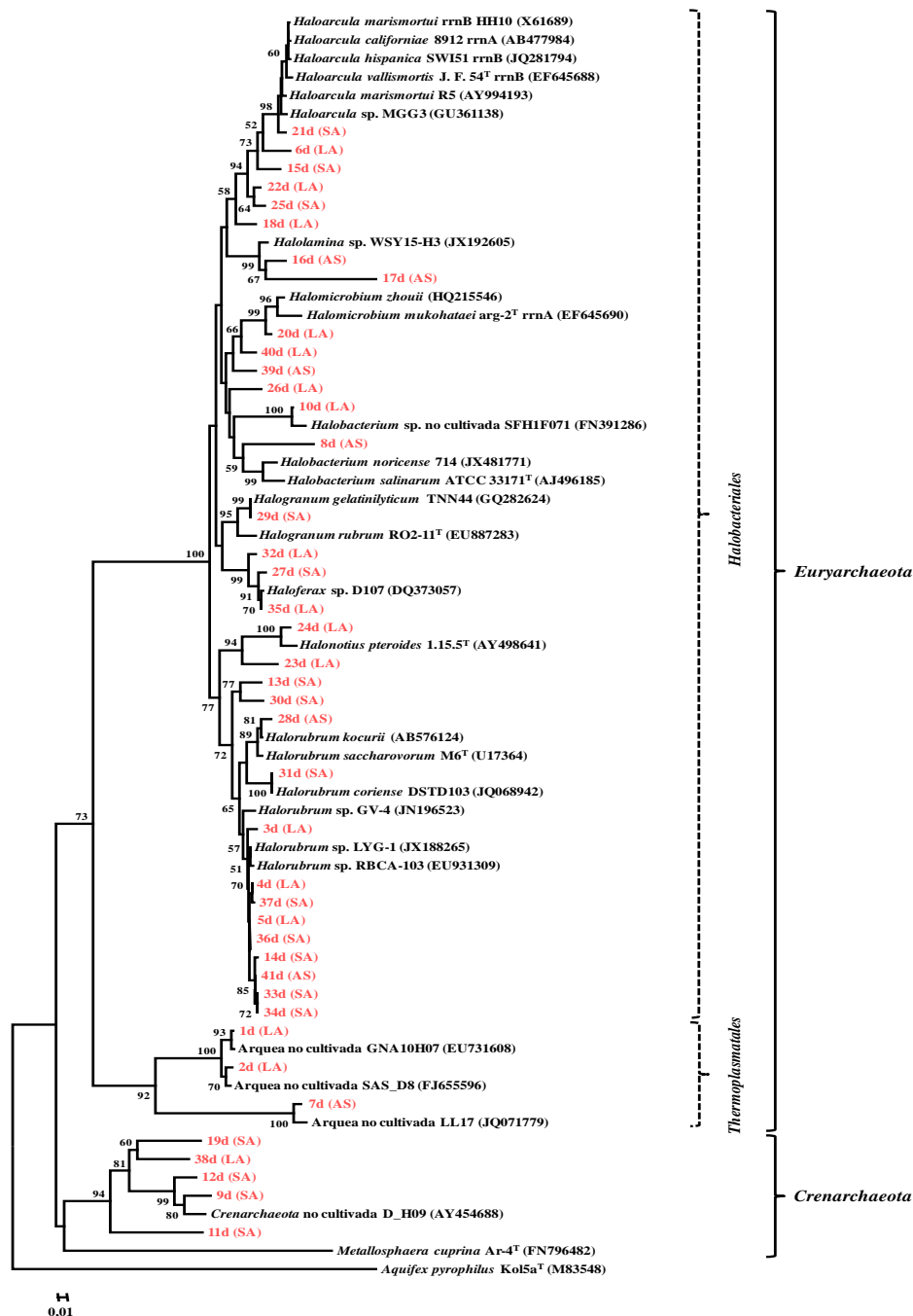


Tabla 21. Continuación

Banda	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
17d	<i>Halolamina</i> sp. WSY15-H3 (JX192605)	96
28d	<i>Halorubrum kocurii</i> (AB576124)	99
39d	<i>Halomicrobium zhouii</i> (HQ215546)	93
41d	<i>Halorubrum</i> sp. LYG-1 (JX188265)	99

En la Figura 38 se muestra el árbol filogenético obtenido con el algoritmo Neighbour-Joining, en el cual se puede observar como todas las secuencias obtenidas se distribuyen claramente en dos clústers que engloban especies pertenecientes a los phyla *Euryarchaeota* y *Crenarchaeota*.

A su vez, las secuencias pertenecientes al phylum *Euryarchaeota* se dividen en dos grupos que se corresponden con los órdenes *Halobacteriales* y *Thermoplasmatales*.



**Figura 38.** Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio *Archaea* obtenido mediante el método Neighbour-Joining. Los números de acceso en la base de datos Genbank de las secuencias de referencia se encuentran entre paréntesis. Se indican los valores de “bootstrap” mayores del 50%. 1d a 41d: bandas secuenciadas de arqueas. (LA): Salina de Larache, (SA): Salina de Souk larbaâ, (AS): Salina de Asilah

La Figura 39 muestra el análisis global de las abundancias relativas de todas las secuencias identificadas como arqueas en las salinas del norte de Marruecos (Larache (a), Souk larbaâ (b) y Asilah (c)).

Como hemos indicado anteriormente, el phylum *Euryarchaeota* constituye el grupo más abundante y engloba el 99,72%, el 98,97% y el 92,11% de la comunidad total de arqueas obtenida en las salinas de Asilah, Larache y Souk larbaâ respectivamente, mientras que las secuencias correspondientes al phylum *Crenarchaeota* incluyen el 1,02% y el 0,27% del total de la comunidad en la salina de Larache y Asilah respectivamente.

Dentro del phylum *Euryarchaeota*, el 86,09%, el 92,11% y el 99,46% de las secuencias se relacionan con el orden *Halobacteriales* en las salinas de Larache, Souk larbaâ y Asilah respectivamente, siendo el género *Haloferax* el grupo mayoritario con el 29,86% de abundancia relativa en la salina de Larache, seguido por los géneros *Halomicrobium*, *Haloarcula*, *Halorubrum*, *Halonotius*, *Halobacterium* y *Halolamina*, mientras que en la salina de Souk larbaâ, el género *Haloferax* y *Halorubrum* fueron los más abundantes.

Por su parte, el género *Halogramum* predomina en la salina de Asilah seguido por los géneros *Haloferax*, *Halorubrum*, *Haloarcula* y *Halobacterium*.

El orden *Thermoplasmatales*, fue encontrado con una mayor abundancia en la salina de Larache representando el 12,89% de abundancia relativa respecto al total de la comunidad de arqueas, mientras que en la salina de Asilah, los valores fueron mucho más bajos (0,27%).

Las secuencias relacionadas con el phylum *Crenarchaeota*, fueron encontradas con mayor abundancia en la salina de Souk larbaâ (7,89%), mientras que los valores fueron más bajos en la salina de Larache y de Asilah (1,02% y 0,27% respectivamente).

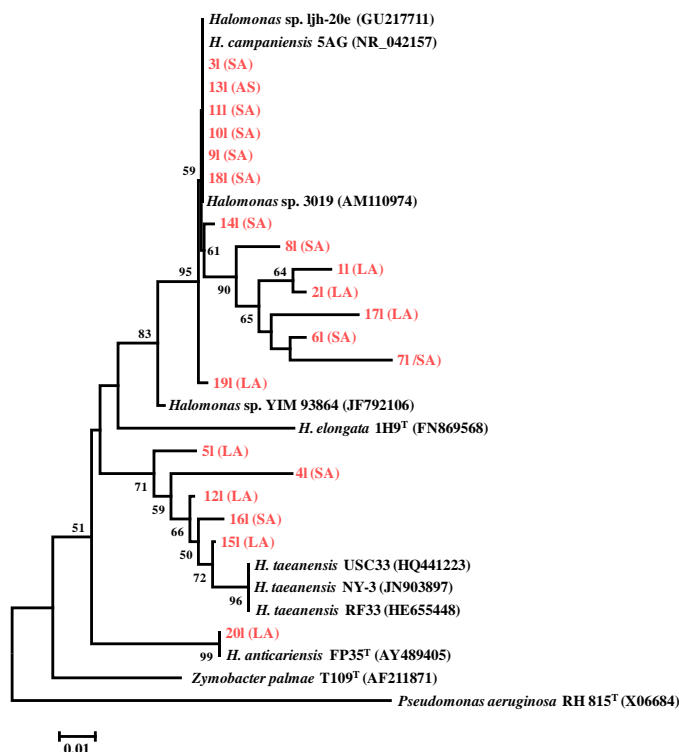


El estudio de la comunidad microbiana por la técnica PCR-DGGE en las salinas del norte de Marruecos incluyó también el análisis de la diversidad del género *Halomonas*. Los resultados de DGGE de *Halomonas* mostrado en la Figura 35 nos permitieron seleccionar un total de 20 bandas distribuidas en distintas posiciones del gel. La posterior secuenciación e identificación de dichas bandas se muestra en la Tabla 22.

**Tabla 22.** Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S del género *Halomonas* obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE

Banda	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
<b>Salina de Larache</b>		
11	<i>Halomonas</i> sp. 3019 (AM110974)	96
21	<i>Halomonas</i> sp. ljh-20e (GU217711)	97
51	<i>H. taeanensis</i> RF33 (HE655448)	97
121	<i>H. taeanensis</i> RF33 (HE655448)	99
151	<i>H. taeanensis</i> NY-3 (JN903897)	99
171	<i>Halomonas</i> sp. 3019 (AM110974)	95
191	<i>Halomonas</i> sp. ljh-20e (GU217711)	99
201	<i>H. anticariensis</i> FP35 <sup>T</sup> (AY489405)	100
<b>Salina de Souk larbaâ</b>		
31	<i>Halomonas</i> sp. ljh-20e (GU217711)	99
41	<i>H. taeanensis</i> USC33 (HQ441223)	97
61	<i>Halomonas</i> sp. ljh-20e (GU217711)	97
71	<i>Halomonas</i> sp. 3019 (AM110974)	94
81	<i>Halomonas</i> sp. 3019 (AM110974)	97
91	<i>H. campaniensis</i> 5AG (NR_042157)	99
101	<i>H. campaniensis</i> 5AG (NR_042157)	99
111	<i>Halomonas</i> sp. ljh-20e (GU217711)	99
141	<i>H. campaniensis</i> 5AG (NR_042157)	99
161	<i>H. taeanensis</i> NY-3 (JN903897)	99
181	<i>H. campaniensis</i> 5AG (NR_042157)	99
<b>Salina de Asilah</b>		
131	<i>H. campaniensis</i> 5AG (NR_042157)	99

Como se puede apreciar, todas las secuencias mostraron más del 90% de identidad con las secuencias de referencia de la base de datos Genbank. Tras la identificación de las secuencias, se procedió a la construcción del árbol filogenético usando el método Neighbour-Joining (Figura 40). Como se muestra en el árbol, hay dos clústers principales, uno relacionado con la especie *H. taeanensis* (bandas 4l, 5l, 12l, 15l y 16l) y otro relacionado con *H. campaniensis* y otras especies no identificadas de *Halomonas*, excepto la banda 20l que se relaciona con *H. anticariensis* (100%).



**Figura 40.** Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S del género *Halomonas* obtenido mediante el método Neighbour-Joining. Los números de acceso en la base de datos Genbank de las secuencias de referencia se encuentran entre paréntesis. Se indican los valores de “bootstrap” mayores del 50%. 11 a 20l: bandas secuenciadas de *Halomonas*. (LA): Salina de Larache, (SA): Salina de Souk larbaâ, (AS): Salina de Asilah

El análisis de la abundancia relativa de la comunidad de *Halomonas* se muestra en la Figura 41, en la cual se observó que en Larache y Souk larbaâ, alrededor de un 32% corresponde a especies no identificadas de *Halomonas*, seguido por *H. campaniensis*, *H. taeanensis* y *H. anticariensis* que mostraron una abundancia que oscila entre el 21% y el 23% respecto al total de la comunidad de *Halomonas*. En Asilah, la especie más abundante fue *H. campaniensis* con 76,94% de abundancia relativa.

■ *Halomonas* spp ■ *H. campaniensis* ■ *H. taeanaensis* ■ *H. anticariensis*

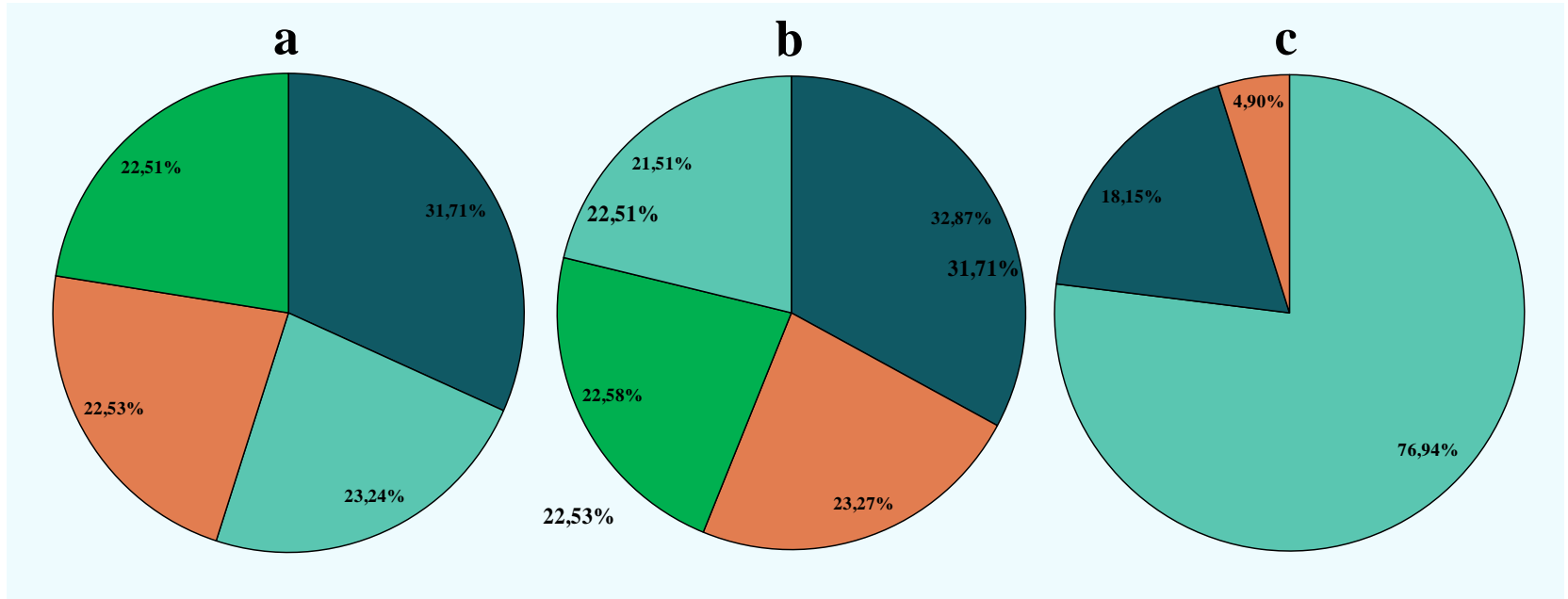


Figura 41. Abundancia relativa de la comunidad de *Halomonas* en las salinas de Larache (a), Souk larbaâ (b) y Asilah (c)

*Rango ponderado de la riqueza (Rr), índices de Shannon-Weaver (H') y de Simpson (SI)*

En la Tabla 23 se muestran los valores del rango ponderado de la riqueza determinada en cada muestra tomada de las salinas objeto de estudio. Igualmente se muestran los valores de los índices de *Shannon-Weaver* y *Simpson* en las tres comunidades estudiadas.

**Tabla 23.** Rango ponderado de la riqueza (*Rr*), índices de *Shannon-Weaver* (*H'*) y *Simpson* (*SI*) en la comunidad de bacterias, arqueas y *Halomonas* en las salinas de Larache, Souk larbaâ y Asilah

Comunidad	Hábitat	Muestra	<i>Rr</i>	Promedio	<i>H'</i>	Promedio	<i>SI</i>	Promedio
<b>Bacterias</b>	Larache	1L	64,8	61,81 ± 49,75	2,62	2,35 ± 0,72	0,09	0,13 ± 0,08
		2L	10,6		1,54		0,22	
		3L	110		2,90		0,07	
	Souk larbaâ	1S	66,2	55,7 ± 10,99	2,52	2,58 ± 0,34	0,11	0,10 ± 0,03
		2S	56,9		2,95		0,06	
		3S	44,2		2,27		0,12	
	Asilah	1A	78,1	44,3 ± 42,72	2,92	2,49 ± 0,60	0,06	0,10 ± 0,05
		2A	10,6		2,07		0,14	
	<b>Arqueas</b>	Larache	1L	4,44	5,18 ± 1,36	1,56	1,64 ± 0,22	0,24
2L			4,35	1,46		0,26		
3L			6,75	1,90		0,20		
Souk larbaâ		1S	4,96	5,32 ± 1,42	1,80	1,88 ± 0,21	0,22	0,19 ± 0,04
		2S	4,11		1,72		0,21	
		3S	6,89		2,12		0,14	
Asilah		1A	1,10	3,67 ± 3,55	0,88	1,28 ± 0,56	0,48	0,34 ± 0,19
		2A	6,25		1,68		0,20	
<b>Halomonas</b>		Larache	1L	26,1	18,28 ± 10,95	1,99	1,57 ± 0,58	0,19
	2L		10,5	1,15		0,44		
	Souk larbaâ	1S	55,6	42,88 ± 17,95	1,88	1,95 ± 0,10	0,20	0,20 ± 0,00
		2S	30,2		2,03		0,20	
	Asilah	1A	5,54	5,54 ± 0,00	0,64	0,66 ± 0,03	0,67	0,63 ± 0,06
		2A	5,54		0,69		0,58	



Respecto a la comunidad de bacterias, se obtuvo una mayor riqueza de especies en la salina de Larache ( $61,81 \pm 49,75$ ) pero no fue la salina que presentó mayor diversidad ( $2,35 \pm 0,72$ ).

La Salina de Souk larbaâ presentó el valor más alto de diversidad bacteriana ( $2,58 \pm 0,34$ ) y el más bajo de dominancia ( $0,10 \pm 0,03$ ). En cuanto a la comunidad de arqueas, la encontrada en la salina de Souk larbaâ fue también la más rica y diversa ( $Rr = 5,32 \pm 1,42$  y  $H' = 1,88 \pm 0,21$ ).

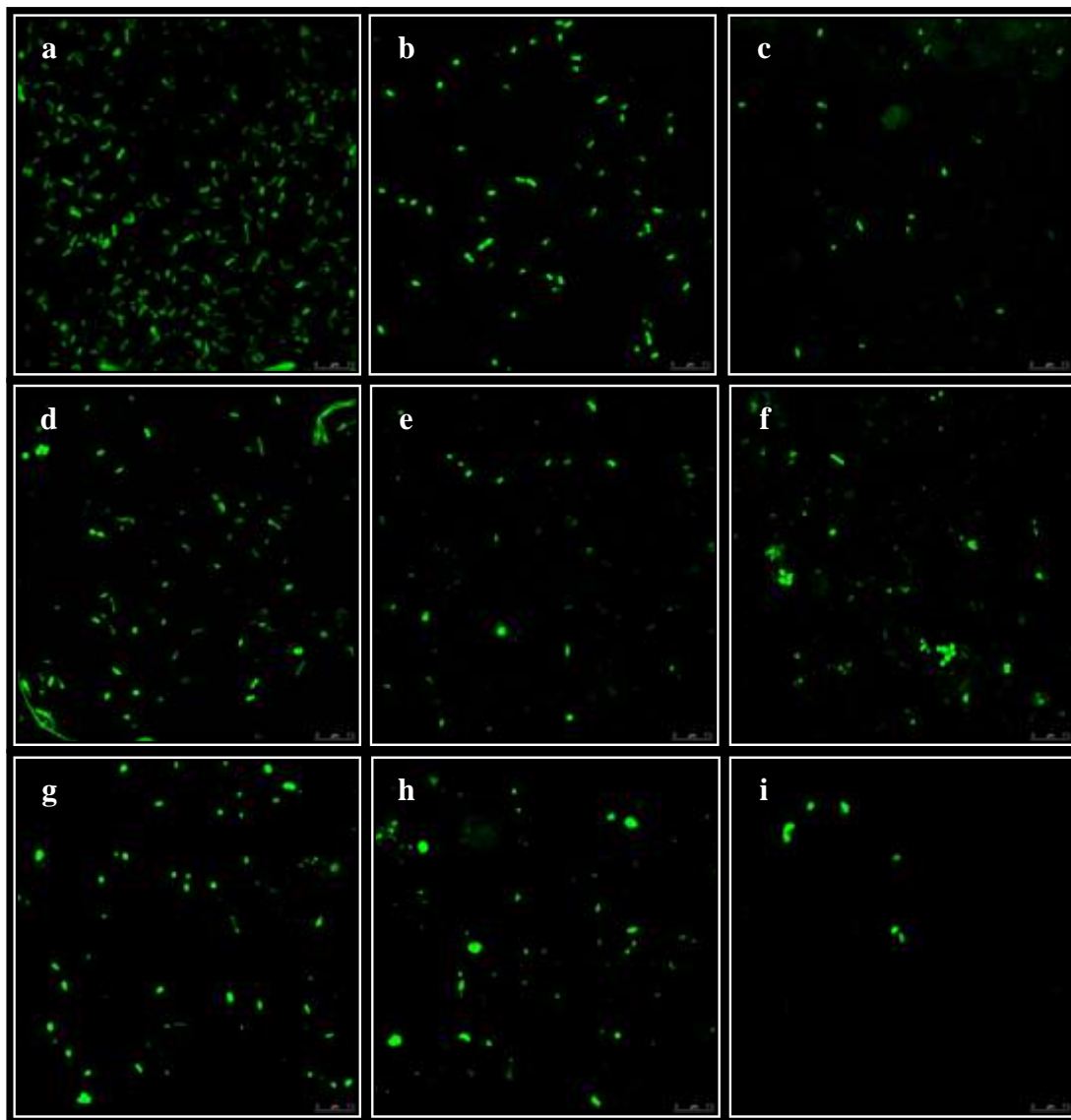
En relación con la comunidad de *Halomonas*, también la salina de Souk larbaâ destacó por presentar los valores mayores de riqueza ( $42,88 \pm 17,95$ ) y de diversidad ( $1,95 \pm 0,10$ ) y los valores bajos de dominancia ( $0,20 \pm 0,00$ ).

Los resultados obtenidos mostraron que la población procariota mayoritaria era la comunidad de bacterias en las tres salinas estudiadas.

### *Análisis de la comunidad microbiana mediante CARD-FISH*

El análisis de hibridación *in situ* empleando la técnica CARD-FISH dió lugar a las imágenes que se muestran en la Figura 42.

Se puede apreciar en la Figura 42 que la población procariota mayoritaria está constituida por bacterias, seguida por arqueas y *Halomonas*.



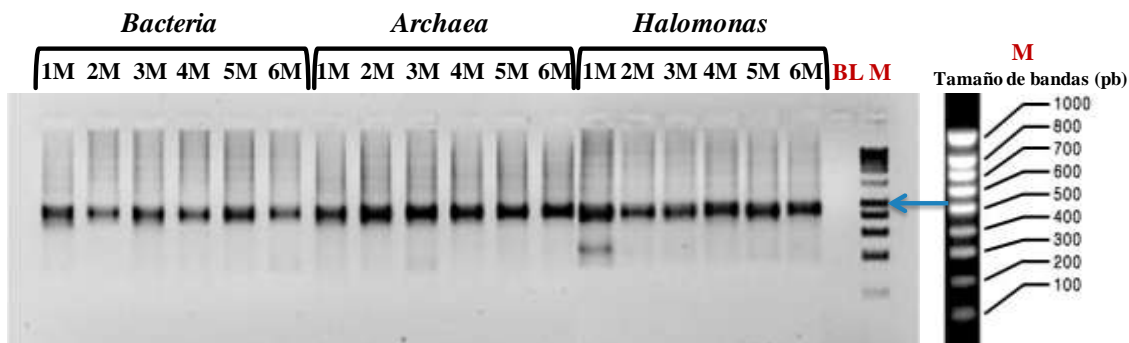
**Figura 42.** CARD-FISH de muestras de las salinas de Marruecos. **a, d y g:** Bacterias marcadas con la sonda Eub338-HRP, FITC; **b, e y h:** Arqueas marcadas con la sonda Arc915-HRP, FITC; **c, f e i:** *Halomonas* marcadas con la sonda Hlm474-HRP, FITC en Larache, Souk larbaâ y Asilah respectivamente. La escala es de 10 µm

#### *I. 1. 4. Suelos agrícolas de Motril (Granada)*

Se obtuvieron seis muestras 1M, 2M, 3M, 4M, 5M y 6M procedentes de tierras de cultivo de aguacates y de chirimoyos. Los valores de la salinidad y pH fueron 1M: 0,04%, (p/v) y 7,8; 2M: 0,03%, (p/v) y 7,9; 3M: 0,01%, (p/v) y 7,9; 4M: 0,1%, (p/v) y 8,4; 5M: 0,07%, (p/v) y 7,9 y 6M: 0,01%, (p/v) y 8,1.

## Amplificación por PCR del gen del ARNr 16S

Los amplicones obtenidos con la pareja de cebadores mencionados en la Tabla 7 para amplificar el gen del ARNr 16S de bacterias, arqueas y *Halomonas* se muestran en la Figura 43. Como se puede apreciar en dicha figura, todas las muestras presentaron una banda del tamaño esperado (aproximadamente 400pb); además, no se obtuvieron bandas en el control negativo; estas amplificaciones se realizaron por triplicado.

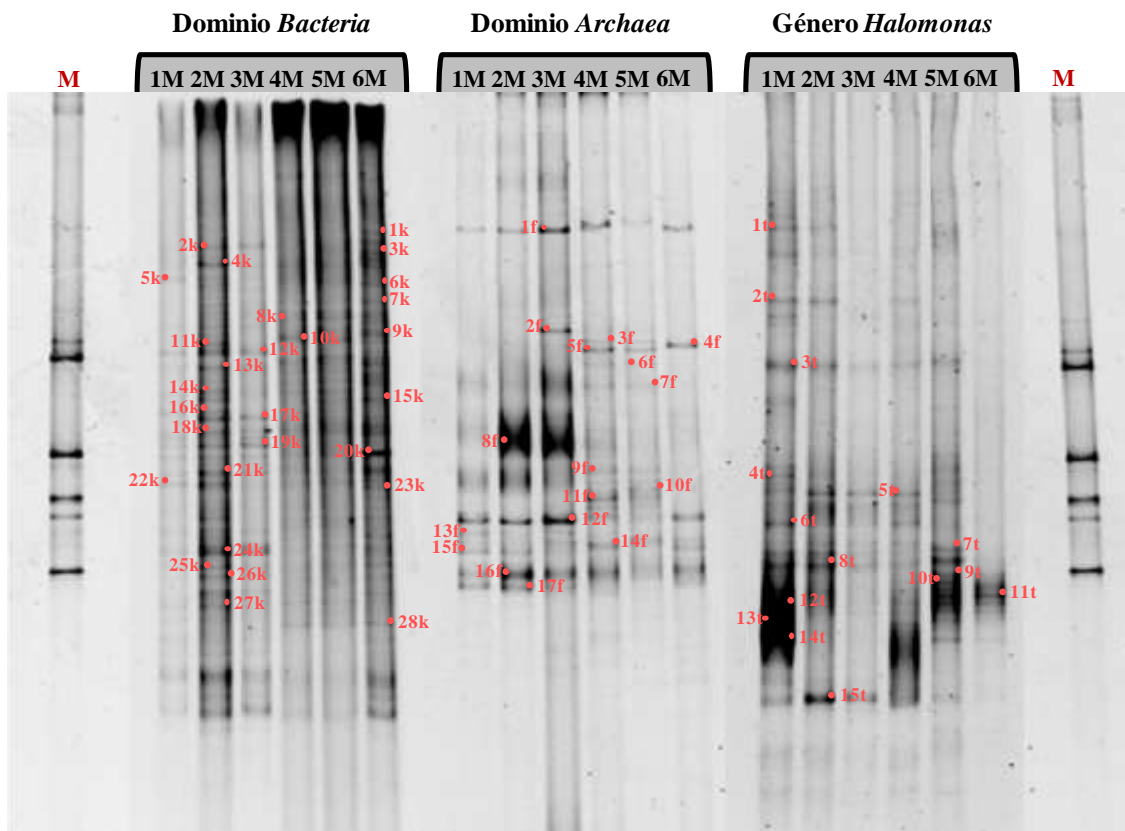


**Figura 43.** Productos de amplificación del gen del ARNr 16S (500pb). 1M, 2M, 3M, 4M, 5M y 6M: Muestras tomadas de los suelos agrícolas de Motril. **M:** Marcador Molecular (1000pb). **BL:** Blanco

## DGGE

La Figura 44 muestra la separación de los amplicones obtenidos en las seis muestras de los suelos agrícolas de Motril (Granada) mediante la técnica DGGE.

Como se puede apreciar, los patrones de DGGE de las comunidades de bacterias, arqueas y *Halomonas* dieron lugar a un total de 28, 17 y 15 clases de bandas respectivamente. Todas las bandas marcadas en dicha figura fueron cortadas, reamplificadas y secuenciadas.



**Figura 44.** Perfiles obtenidos por la técnica de DGGE de los fragmentos del gen del ARNr 16S. **M:** Marcador. **1k a 28k:** bandas secuenciadas de bacterias, **1f a 17f:** bandas secuenciadas de arqueas, **1t a 15t:** bandas secuenciadas de *Halomonas*. 1M, 2M, 3M, 4M, 5M y 6M: Muestras tomadas de los suelos agrícolas de Motril (Granada)

### *Análisis de las secuencias*

Con el fin de identificar la comunidad procariota que existe en los suelos agrícolas de Motril, todas las secuencias obtenidas de las bandas marcadas en la Figura 44 fueron comparadas mediante el programa Blast con las mismas regiones de los genes del ARNr 16S depositados en la base de datos Genbank.

La Tabla 24 muestra la asignación taxonómica de las secuencias de las bandas escindidas del perfil de DGGE de la comunidad bacteriana, donde se observó que todas las secuencias mostraron más del 90% de identidad con las secuencias de referencia.

**Tabla 24.** Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio *Bacteria* obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE

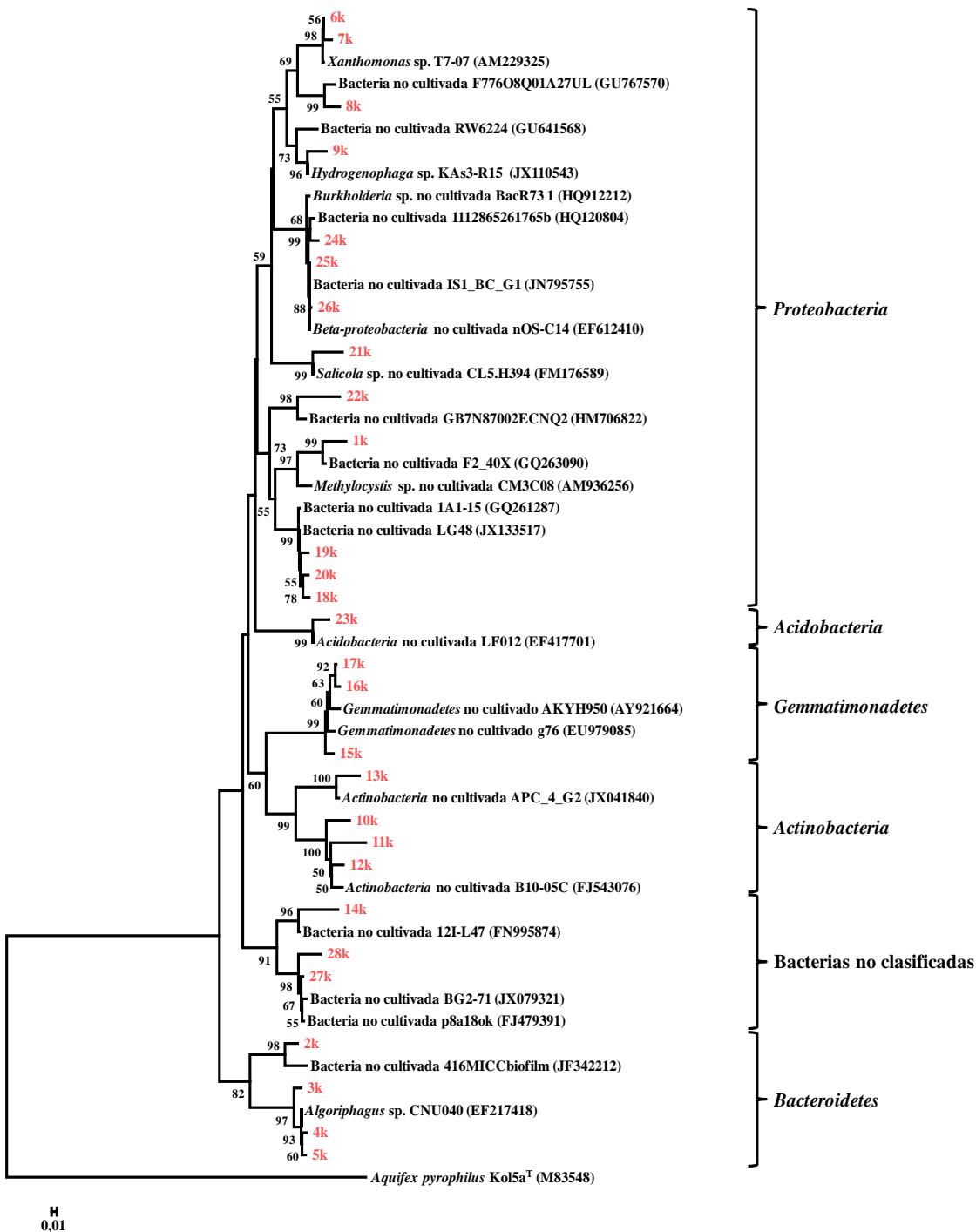
Banda	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
1k	Bacteria no cultivada F2_40X (GQ263090)	99
2k	Bacteria no cultivada 416MICCbiofilm (JF342212)	95
3k	<i>Algoriphagus</i> sp. CNU040 (EF217418)	97
4k	<i>Algoriphagus</i> sp. CNU040 (EF217418)	99
5k	<i>Algoriphagus</i> sp. CNU040 (EF217418)	99
6k	<i>Xanthomonas</i> sp. T7-07 (AM229325)	99
7k	<i>Xanthomonas</i> sp. T7-07 (AM229325)	98
8k	Bacteria no cultivada F776O8Q01A27UL (GU767570)	96
9k	<i>Hydrogenophaga</i> sp. KAs3-R15 (JX110543)	97
10k	<i>Actinobacteria</i> no cultivada B10-05C (FJ543076)	90
11k	<i>Actinobacteria</i> no cultivada B10-05C (FJ543076)	92
12k	<i>Actinobacteria</i> no cultivada B10-05C (FJ543076)	95
13k	<i>Actinobacteria</i> no cultivada APC_4_G2 (JX041840)	95
14k	Bacteria no cultivable 12I-L47 (FN995874)	95
15k	<i>Gemmatimonadetes</i> no cultivado g76 (EU979085)	96
16k	<i>Gemmatimonadetes</i> no cultivado AKYH950 (AY921664)	97
17k	<i>Gemmatimonadetes</i> no cultivado AKYH950 (AY921664)	96
18k	Bacteria no cultivada LG48 (JX133517)	97
19k	Bacteria no cultivada LG48 (JX133517)	99
20k	Bacteria no cultivada 1A1-15 (GQ261287)	98
21k	<i>Salicola</i> sp. no cultivada CL5.H394 (FM176589)	96
22k	Bacteria no cultivada GB7N87002ECNQ2 (HM706822)	91
23k	<i>Acidobacteria</i> no cultivada LF012 (EF417701)	95
24k	Bacteria no cultivada 1112865261765b (HQ120804)	96
25k	Bacteria no cultivada IS1_BC_G1 (JN795755)	100
26k	<i>Beta-proteobacteria</i> no cultivada OS-C14 (EF612410)	99
27k	Bacteria no cultivada BG2-71 (JX079321)	98
28k	Bacteria no cultivada p8a18ok (FJ479391)	93

Una vez conocido el porcentaje de identidad de las secuencias de las distintas bandas, se procedió a la construcción del árbol filogenético empleando el método Neighbour-Joining.

En el análisis se incluyeron además de las secuencias objeto de estudio, las secuencias (aproximadamente 500pb) de las bacterias relacionadas filogenéticamente que fueron recuperadas de la base de datos. Igualmente se incluyeron las secuencias de las especies tipo de cada género.

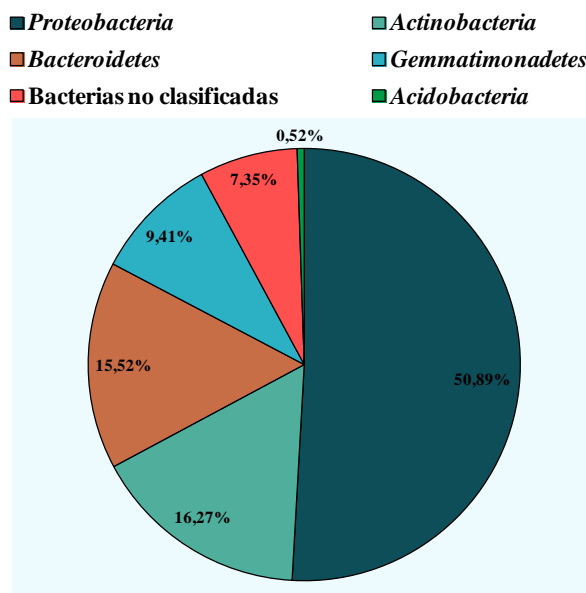
En la Figura 45 se muestra el árbol filogenético obtenido, en el cual se puede observar como todas las secuencias obtenidas en este estudio se distribuyen en seis clústers correspondientes a los phyla *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Gemmatimonadates*, *Acidobacteria* y un grupo de bacterias no clasificadas.

El phylum *Acidobacteria* estaba representado por una sola banda (23k), mientras que el resto de los phyla agruparon más de tres bandas, excepto el phylum *Proteobacteria* que engloba la mayoría de las bandas marcadas en el perfil de DGGE y que curiosamente fueron asignadas a bacterias no cultivadas (Figura 45).



**Figura 45.** Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio *Bacteria* obtenido mediante el método Neighbour-Joining. Los números de acceso en la base de datos Genbank de las secuencias de referencia se encuentran entre paréntesis. Se indican los valores de “bootstrap” mayores del 50%. 1k a 28k: bandas secuenciadas de bacterias

La Figura 46 muestra el análisis de las abundancias relativas de los grupos taxonómicos del Dominio *Bacteria* identificados en los suelos agrícolas de Motril.



**Figura 46.** Abundancia relativa de la comunidad bacteriana en los suelos agrícolas de Motril (Granada)

Como hemos indicado anteriormente, el phylum *Proteobacteria* fue el más abundante con un 50,89% del total de los grupos taxonómicos identificados en todas las muestras analizadas, seguido por los phyla *Actinobacteria* (16,27%), *Bacteroidetes* (15,52%) y *Gemmatimonadetes* (9,41%). Un grupo de bacterias no clasificadas mostró el 7,35% de abundancia relativa respecto al total de la comunidad de bacterias. Finalmente, el phylum *Acidobacteria* presentó una abundancia relativa muy baja (0,52%).

Con la finalidad de identificar la comunidad de arqueas que predomina en los suelos agrícolas de Motril (Granada), se procedió a escindir las distintas bandas obtenidas en el DGGE que se muestra en la Figura 44. Posteriormente, dichas bandas se reamplificaron y se secuenciaron.

Se secuenciaron un total de 17 bandas y se compararon mediante el programa Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/)) con las secuencias depositadas en la base de datos Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para determinar su afiliación taxonómica.

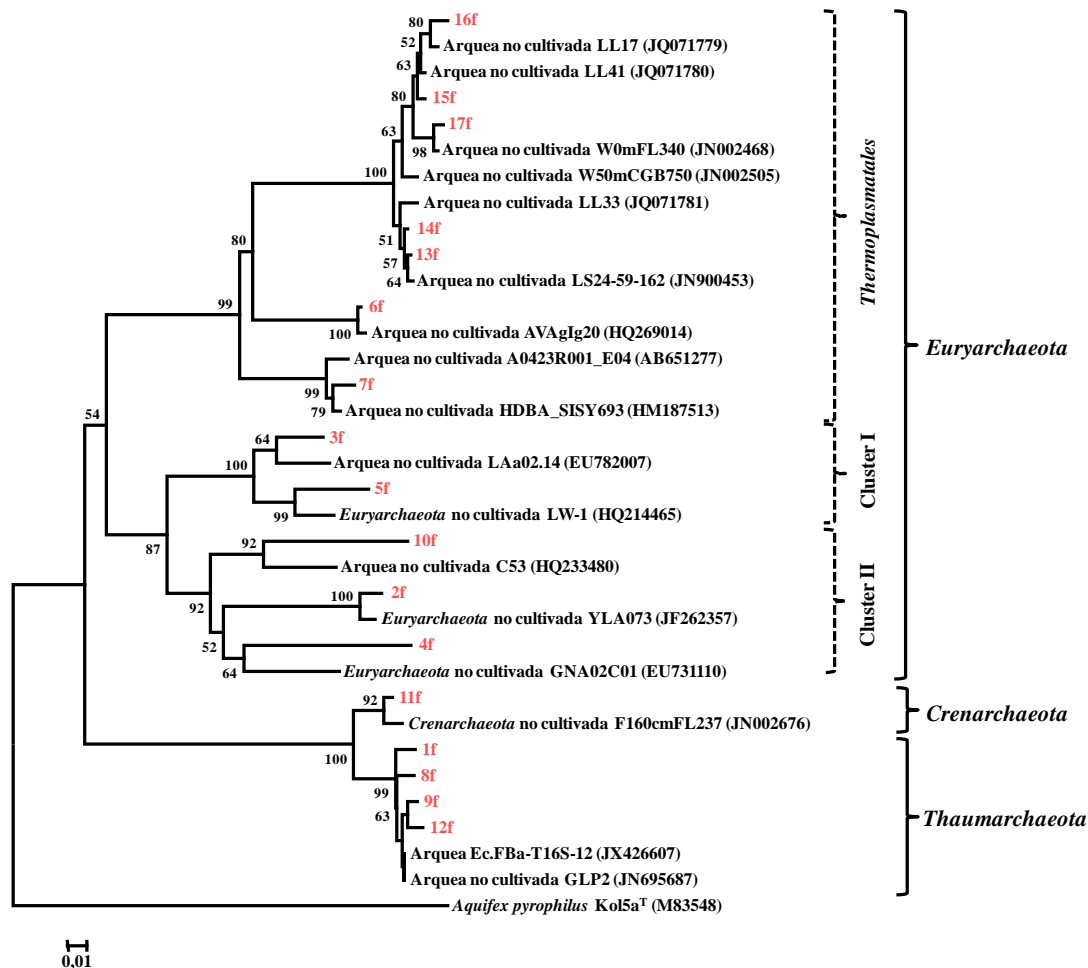
La Tabla 25 muestra los resultados de la identificación de las bandas secuenciadas. Se observó que todas las secuencias mostraron más del 90% de identidad con las secuencias de referencia, con la excepción de la secuencia 4f identificada como una arquea no cultivada que mostró un porcentaje de identidad inferior.



**Tabla 25.** Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio *Archaea* obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE

Banda	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
1f	Arquea no cultivada GLP2 (JN695687)	97
2f	<i>Euryarchaeota</i> no cultivada YLA073 (JF262357)	99
3f	Arquea no cultivada LAa02.14 (EU782007)	93
4f	<i>Euryarchaeota</i> no cultivada GNA02C01 (EU731110)	87
5f	<i>Euryarchaeota</i> no cultivada LW-1 (HQ214465)	91
6f	Arquea no cultivada AVAgIg20 (HQ269014)	99
7f	Arquea no cultivada HDBA_SISY693 (HM187513)	97
8f	Arquea no cultivada GLP2 (JN695687)	98
9f	Arquea no cultivada GLP2 (JN695687)	99
10f	Arquea no cultivada C53 (HQ233480)	90
11f	<i>Crenarchaeota</i> no cultivada F160cmFL237 (JN002676)	98
12f	Arquea no cultivada GLP2 (JN695687)	99
13f	Arquea no cultivada LL33 (JQ071781)	99
14f	Arquea no cultivada LL33 (JQ071781)	98
15f	Arquea no cultivada LL41 (JQ071780)	99
16f	Arquea no cultivada LL17 (JQ071779)	98
17f	Arquea no cultivada W0mFL340 (JN002468)	99

La Figura 47 muestra el árbol filogenético obtenido con el algoritmo Neighbour-Joining, en el cual se puede observar como todas las secuencias obtenidas en este estudio se distribuyen claramente en dos clústers, el primero agrupa secuencias correspondientes al phylum *Euryarchaeota*, mientras que el segundo clúster se divide en dos grupos que incluyen los phyla *Crenarchaeota* y *Thaumarchaeota*. El phylum *Euryarchaeota* a su vez se divide en tres grupos, los cuales se afilian con el orden *Thermoplasmatales* y otros dos grupos de arqueas al que denominamos Cluster I y Cluster II que incluyen respectivamente arqueas encontradas en cultivos de arroz y en respiraderos hidrotermales en otros estudios. No se encontraron bandas asignadas al orden *Halobacteriales*.



**Figura 47.** Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S del Dominio *Archaea* obtenido mediante el método Neighbour-Joining. Los números de acceso en la base de datos Genbank de las secuencias de referencia se encuentran entre paréntesis. Se indican los valores de “bootstrap” mayores del 50%. 1f a 17f: bandas secuenciadas de arqueas

El análisis global de las abundancias relativas de los grupos taxonómicos encontrados en la comunidad de arqueas hallada en los suelos agrícolas de Motril (Granada) se muestra en la Figura 48.

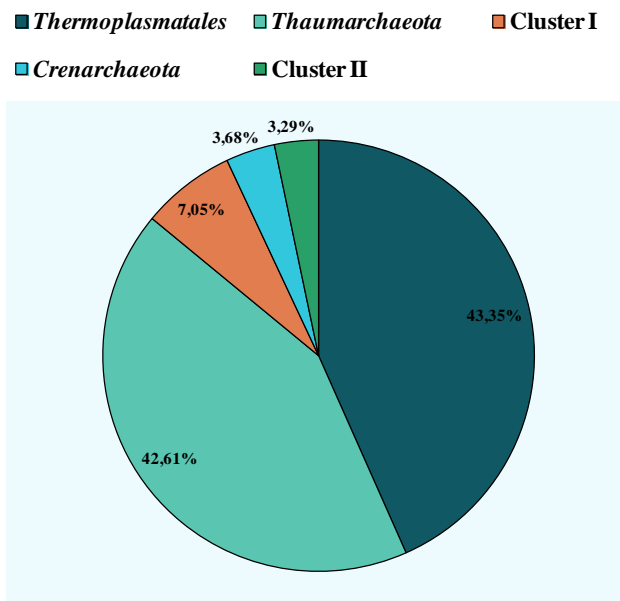


Figura 48. Abundancia relativa de la comunidad de arqueas en los suelos agrícolas de Motril (Granada)

En términos generales, el grupo más abundante en la comunidad de arqueas en las seis muestras analizadas, con un 52,96% de abundancia relativa respecto al total de la comunidad, lo constituyen arqueas del phylum *Euryarchaeota*. Dentro de este phylum, el orden *Thermoplasmatales* resultó ser el predominante (43,35%).

El segundo grupo mayoritario fue el phylum *Thaumarchaeota* con un 42,61% de abundancia relativa respecto al total de la diversidad. Las secuencias afiliadas con el Cluster I y el Cluster II presentaron un 7,05% y 3,29% de abundancia relativa respectivamente. Finalmente el phylum *Crenarchaeota* mostró un porcentaje bajo, con un 3,68% de abundancia relativa.

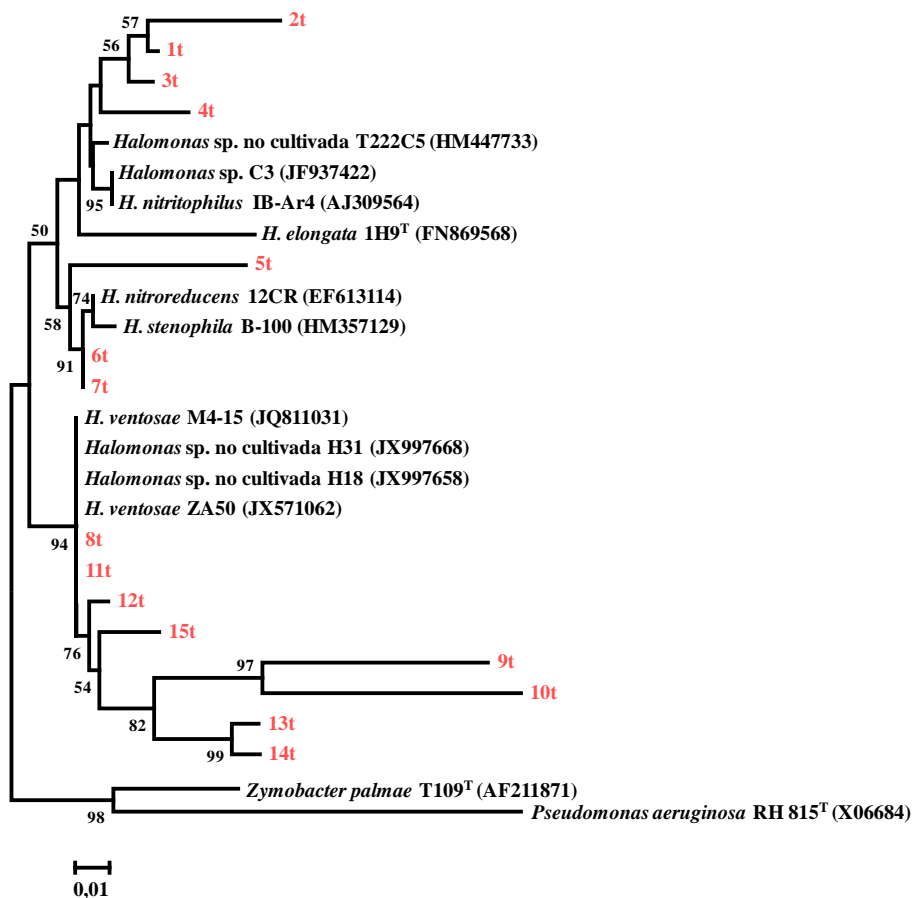
Los patrones de DGGE mostrados en la Figura 44 de las distintas muestras tomadas de los suelos agrícolas de Motril nos permitieron seleccionar y cortar un total de 15 bandas distribuidas en el perfil de DGGE correspondiente a la comunidad del género *Halomonas*.

Posteriormente, todas las bandas fueron secuenciadas e identificadas mediante su comparación (Blast) con las secuencias depositadas en la base de datos Genbank. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 26.

**Tabla 26.** Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S del género *Halomonas* obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE

Banda	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
1t	<i>H. nitritophilus</i> IB-Ar4 (AJ309564)	98
2t	<i>Halomonas</i> sp. C3 (JF937422)	96
3t	<i>H. nitritophilus</i> IB-Ar4 (AJ309564)	98
4t	<i>Halomonas</i> sp. no cultivada T222C5 (HM447733)	98
5t	<i>H. nitroreducens</i> 12CR (EF613114)	95
6t	<i>H. nitroreducens</i> 12CR (EF613114)	99
7t	<i>H. stenophila</i> B-100 (HM357129)	99
8t	<i>H. ventosae</i> ZA50 (JX571062)	99
9t	<i>Halomonas</i> sp. no cultivada H31 (JX997668)	95
10t	<i>Halomonas</i> sp. no cultivada H18 (JX997658)	92
11t	<i>H. ventosae</i> M4-15 (JQ811031)	100
12t	<i>H. ventosae</i> M4-15 (JQ811031)	99
13t	<i>H. ventosae</i> M4-15 (JQ811031)	98
14t	<i>H. ventosae</i> ZA50 (JX571062)	98
15t	<i>H. ventosae</i> ZA50 (JX571062)	97

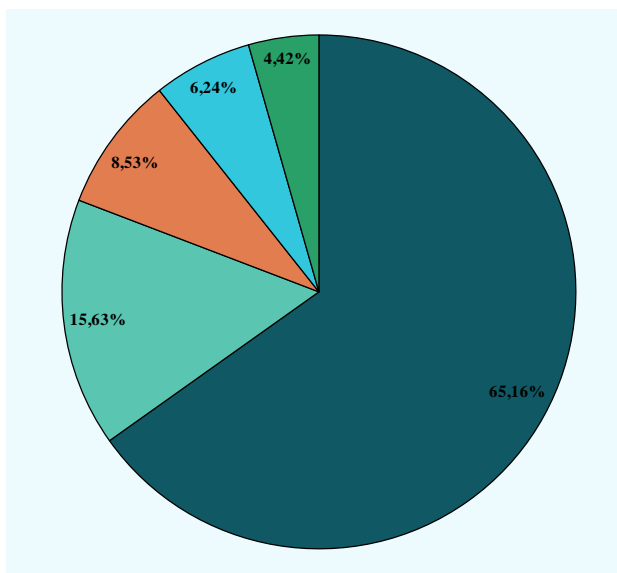
Todas las secuencias mostradas en la Tabla 26 junto con las secuencias de los microorganismos más idénticos y las especies tipo de los géneros fueron incluidas en el análisis filogenético que se muestra en la Figura 49. En dicha figura se pueden observar tres grupos filogenéticos relacionados con distintas especies del género *Halomonas*.



**Figura 49.** Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S del género *Halomonas* obtenido mediante el método Neighbour-Joining. Los números de acceso en la base de datos Genbank de las secuencias de referencia se encuentran entre paréntesis. Se indican los valores de “bootstrap” mayores del 50%. 1t a 15t: bandas secuenciadas de *Halomonas*

Uno de los clústers formado a partir de las secuencias recuperadas de las bandas de DGGE de la comunidad de *Halomonas* fue asociado con *H. ventosae* (bandas 8t, 11t, 12t, 13t, 14t y 15t). La especie más abundante fue *H. ventosae* (65,16% de abundancia relativa) (Figura 50).

■ *H. ventosae*    ■ *Halomonas* spp    ■ *H. nitroreducens*  
 ■ *H. nitritophilus*    ■ *H. stenophila*



**Figura 50.** Abundancia relativa de la comunidad de *Halomonas* en los suelos agrícolas de Motril (Granada)

Por otro lado, las especies *H. nitroreducens*, *H. nitritophilus* y *H. stenophila* mostraron el 8,53%, 6,24% y 4,42% de abundancia relativa respectivamente. Las bandas 2t, 4t, 9t y 10t correspondientes a *Halomonas* spp mostraron un 15,63% de abundancia relativa respecto al total de la diversidad de *Halomonas* en las seis muestras analizadas.

### *Rango ponderado de la riqueza (Rr), índices de Shannon-Weaver (H') y de Simpson (SI)*

Para las seis muestras de los suelos agrícolas de Motril (Granada), se determinaron los valores del rango ponderado de la riqueza, de los índices de *Shannon-Weaver* y *Simpson* en las tres comunidades estudiadas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 27.

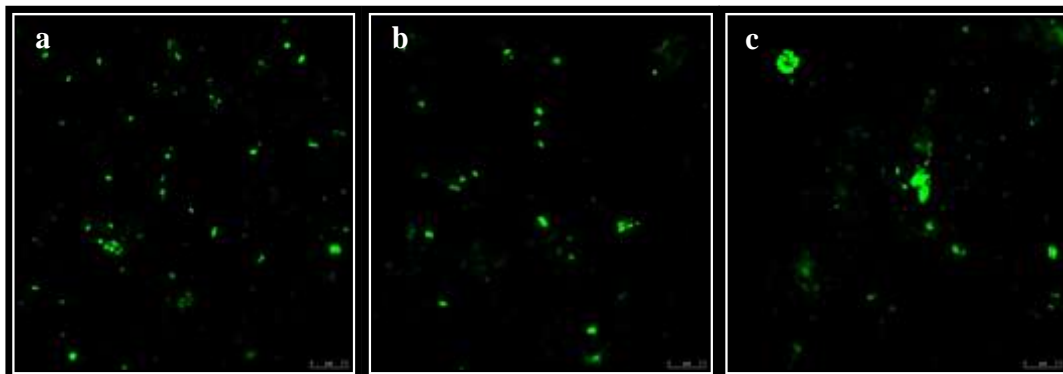
**Tabla 27.** Rango ponderado de la riqueza (*Rr*), índices de *Shannon-Weaver* (*H'*) y *Simpson* (*SI*) en la comunidad de bacterias, arqueas y *Halomonas* en los suelos agrícolas de Motril (Granada)

Comunidad	Muestra	<i>Rr</i>	Promedio	<i>H'</i>	Promedio	<i>SI</i>	Promedio
<b>Bacterias</b>	1M	10,93	45,49 ± 27,01	2,13	2,42 ± 0,30	0,12	0,10 ± 0,02
	2M	61,93		2,87		0,06	
	3M	37,44		2,16		0,14	
	4M	34,53		2,24		0,13	
	5M	38,48		2,45		0,09	
	6M	89,65		2,70		0,08	
<b>Arqueas</b>	1M	8,93	8,96 ± 2,95	1,91	1,81 ± 0,37	0,16	0,22 ± 0,12
	2M	6,43		1,16		0,47	
	3M	8,93		1,64		0,25	
	4M	13,71		2,17		0,15	
	5M	10,38		2,12		0,13	
	6M	5,39		1,87		0,16	
<b>Halomonas</b>	1M	68,79	27,77 ± 22,88	2,10	1,78 ± 0,30	0,26	0,21 ± 0,06
	2M	22,46		1,65		0,15	
	3M	7,56		1,68		0,20	
	4M	24,05		1,98		0,20	
	5M	40,27		2,01		0,16	
	6M	3,54		1,28		0,31	

Como se puede apreciar en la Tabla 27, el promedio de *Rr* y del índice de *H'* fue mayor en la comunidad de bacterias respecto a los valores obtenidos en la comunidad de arqueas y la de *Halomonas*. Por el contrario, el valor medio de la dominancia (*SI*) fue mayor en la comunidad de arqueas y la de *Halomonas* ( $0,22 \pm 0,12$  y  $0,21 \pm 0,06$  respectivamente).

### *Análisis de la comunidad microbiana mediante CARD-FISH*

La Figura 51 muestra los resultados obtenidos después de hibridar las diferentes muestras con las sondas Eub338-HRP, Arq915-HRP y Hlm474-HRP específicas de las poblaciones de bacterias, arqueas y *Halomonas* respectivamente.



**Figura 51.** CARD-FISH de muestras de los suelos agrícolas de Motril. **a:** Bacterias marcadas con la sonda Eub338-HRP, FITC; **b:** Arqueas marcadas con la sonda Arc915-HRP, FITC; **c:** *Halomonas* marcadas con la sonda Hlm474-HRP, FITC. La escala es de 10 µm

La visualización de las células hibridadas mediante microscopía láser confocal permitió detectar fluorescencia en las células de bacterias (imagen a), arqueas (imagen b) y *Halomonas* (imagen c) hibridadas con las sondas mencionadas anteriormente, emitiendo una luz de color verde.



## I. 2. Discusión

En este capítulo se ha abordado el estudio de la población procariota que existe en cinco hábitats salinos determinando su diversidad. Para ello se han empleado técnicas moleculares y análisis estadísticos.

Los ambientes seleccionados, de acuerdo a sus diferentes características físico-químicas y localización, han sido dos hábitats hipersalinos de España, las salinas de Cabo de Gata (Almería) y La Malahá (Granada), así como otros tres ambientes hipersalinos situados al norte de Marruecos, las salinas de Asilah, Larache y Souk larbaâ. Todas ellas son salinas costeras y por tanto medios talasosalinos, con la excepción de las salinas de La Malahá y Souk larbaâ, que son hábitats atalasoalinos que se alimentan de un manantial subterráneo de agua salina con un contenido total de sales del 15,5 al 17,5% (p/v) en La Malahá y del 3,9 al 16% (p/v) en la salina de Souk larbaâ.

En nuestro estudio hemos asumido que el tipo de muestra analizado (agua, suelos o sedimentos acuosos) no ha influido en los resultados puesto que fueron tomadas en lugares muy próximos entre sí dentro del mismo hábitat salino, y nunca alcanzando profundidades superiores a los 5cm de profundidad en el caso de los suelos o sedimentos acuosos, por lo que descartamos la zonas con baja tensión de oxígeno.

Con fines comparativos hemos incluido en este capítulo, seis muestras de un suelo no salino, tomadas del Camino Cerro del Toro, en un área agrícola a 1,5km del municipio de Motril (Granada).

En su conjunto nuestros resultados han demostrado la presencia de una diversidad media de arqueas y una alta diversidad de bacterias en todos los hábitats estudiados. Por otra parte hemos detectado en ellos la existencia de procariotas asignados a phyla que nunca han sido aislados a partir de los ambientes salinos y de los que desconocemos si son microorganismos halófilos o halotolerantes. También ha sido frecuente el hallazgo de clones que sólo se conocen a través de los estudios de ecología molecular y que no han sido cultivados hasta la fecha. Por último en algunos hábitats se han encontrado secuencias que no han podido ser asignada a ningún taxón conocido.

Los resultados extraídos a partir de los perfiles de DGGE indicaron variaciones en los procariotas y su diversidad dependiendo del hábitat estudiado y su salinidad, lo que está en consonancia con lo descrito en la bibliografía. Así diversos trabajos han estudiado la influencia de la concentración de sales sobre la diversidad microbiana en sistemas salinos temporalmente dinámicos como por ejemplo los estuarios (Hewson y Fuhrman, 2004; Bernhard y col., 2005; Silveira y col., 2011) y las salinas costeras (Casamayor y col., 2002a), y en lagos de salinidad constante (Wu y col., 2006; Xing y col., 2009; Wang y col., 2011).

En todos estos ambientes se ha demostrado que la concentración de sales influye sobre la distribución de la comunidad microbiana.

De la misma forma Lozupone y Knight (2007) estudiaron la diversidad de bacterias en ambientes salinos y no salinos, demostrando que la concentración de sales es el factor que más influye en la composición de la comunidad. Resultados similares se han descrito en otras publicaciones de bacterias (Barberán y Casamayor, 2010; Hollister y col., 2010), y de arqueas (Auguet y col., 2010). Por otra parte existen diversos trabajos en los que se afirma que las bacterias son numéricamente dominantes en algunos hábitats salinos e hipersalinos, siendo las más abundantes aquellas que pertenecen los phyla *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (Mouné y col., 2003; Dong y col., 2006; Mesbah y col., 2007; Hollister y col., 2010).

Por lo que respecta a las comunidades de bacterias, en nuestro estudio hemos hallado que los microorganismos más abundantes son los miembros de los phyla *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, y *Cyanobacteria* en la salina de Cabo de Gata; *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* y *Bacteroidetes* (casi el 17% de la secuencias asignadas al género *Salinibacter*) en la Salina de La Malahá; *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* en las salinas de Larache; Souk larbaâ y Asilah respectivamente. En el conjunto de los hábitats investigados, los miembros del phylum *Proteobacteria* fueron los más abundantes. También se han detectado, miembros de otros phyla menos numerosos como, *Gemmatimonadetes*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi* y *Firmicutes*, y un grupo considerable de secuencias no identificadas en las salinas de Larache; Souk larbaâ y Asilah.

Sin embargo, como se puede apreciar en las figuras 22, 24, 30, 32, 37 y 39 cada hábitat salino tuvo una abundancia relativa de especies particular, tanto en lo que se refiere a la comunidad bacteriana, como en lo referente a las arqueas como discutiremos más adelante.

En la salina de La Malahá hemos detectado secuencias afiliadas con el género *Salinibacter*; es útil recordar a este respecto que las muestras de esta salina presentaron las concentraciones más altas de salinidad de este estudio, lo que podría explicar la abundancia de esta bacteria halófila extrema. En la literatura se describe al género *Salinibacter* como el taxón más abundante en los cristalizadores de algunas salinas litorales, tales como las de Mallorca (Rosselló-Mora y col., 2003) y de Alicante (Antón y col., 1999 y 2000) en el lago Aran-Bidgol en Irán (Makhdoumi-Kakhki y col., 2012b) y en otros hábitats hipersalinos (Maturrano y col., 2006a; Mutlu y col., 2008).

En el análisis global de la diversidad y riqueza bacteriana, hallamos altos valores en la salina de Cabo de Gata y, especialmente, en las salinas marroquíes, como se deduce de las estimaciones, tanto del rango ponderado de riqueza (Marzorati y col., 2008) como del índice de diversidad de Shannon-Weaver (Shannon y Weaver, 1949); dicha diversidad bacteriana fue mayor en todos estos hábitats que la de arqueas (véase más adelante). Por el contrario, la

salina de La Malahá mostró los valores más bajos y en consecuencia los más elevados de dominancia. Este hecho confirma que la dominancia de las especies disminuye cuando aumenta su diversidad (Magurran y col., 1996).

Por lo que concierne a las poblaciones de arqueas, se descubrió la dominancia del phylum *Euryarchaeota*, en todos los ambientes estudiados, siendo el orden *Halobacteriales* el más dominante. Este hecho también ha sido descrito por otros autores que han estudiado distintos hábitats salinos e hipersalinos (Jiang y col., 2006, 2007 y 2009; Dong y col., 2006; Liu y col., 2011).

Sin embargo la distinta salinidad de los ambientes investigados en este capítulo influyó en la distribución de las comunidades de los miembros del orden *Halobacteriales*, predominado los géneros *Halorubrum*, *Haloquadratum*, *Haloarcula*, *Halogramum*, *Halomicrobium*, *Natronomonas*, *Halobacterium*, *Halonotius*, *Halosarcina* y *Halolamina* que se detectaron en la mayoría de las salinas analizadas y en las muestras de baja, media y alta concentración salina.

Así, el género *Halorubrum* fue hallado en todos los ambientes estudiados, representando desde más del 61% de abundancia relativa en las salinas de La Malahá hasta aproximadamente el 11% en la de Larache que fue la que arrojó los menores valores (su abundancia fue mayor en las salinas donde habían sido tomadas muestras de mayor salinidad). Recientemente Meuser y col. (2013) han publicado resultados similares al analizar la estructura filogenética y la composición de las comunidades de arqueas, bacterias y microorganismos eucariotas en un lago salado de Utah, Estados Unidos.

Por otro lado, el género *Haloquadratum* constituye unos de los taxones que se encuentra más ampliamente distribuido en los hábitats hipersalinos, representando desde el 40% hasta el 80% del total de la comunidad en las aguas de los lagos salados y cristalizadores de salinas (Burns y col., 2004; Antón y col., 1999 y 2000; Maturrano y col., 2006; Oh y col., 2010). En nuestro estudio, sin embargo, *Haloquadratum* fue encontrado únicamente en las salinas de La Malahá y de Cabo de Gata con una abundancia relativa considerable (38,32 y 15,82% respectivamente).

Para la comunidad de arqueas, no se obtuvieron valores altos del rango ponderado de riqueza Marzorati y col. (2008) ni de dominancia, salvo en la salina de La Malahá, cuyas muestras dieron lugar a valores de  $R_r$  por encima de 10 y a un  $SI$  próximo a 0,5. En este hábitat la comunidad de arqueas estaba dominada por los géneros *Halorubrum* y *Haloquadratum*. Según Marzorati y col. (2008), los valores de  $R_r$  que están comprendidos entre 10 y 30 son típicos de ambientes caracterizados por una diversidad microbiana media. Sin embargo, los valores más altos de diversidad fueron obtenidos en las muestras correspondientes a la salina de Souk larbaâ situada al norte de Marruecos ( $H' = 1,88 \pm 0,21$ ).

Por los motivos ya explicados en la introducción de esta memoria, nuestro equipo de investigación está interesado especialmente en conocer la distribución de *Halomonas* en el medio ambiente y su diversidad. Por ello en todos los hábitats salinos se analizó su presencia siguiendo la misma metodología que empleamos para estudiar las comunidades de arqueas y bacterias. Su comunidad se detectó en todos los hábitats estudiados excepto en la salina de La Malahá lo que indica su elevada ubicuidad. Cabe mencionar que los valores más altos de riqueza y de diversidad fueron obtenidos en la salina de Souk Iarbaâ situada al norte de Marruecos ( $Rr = 42,88$ ,  $H' = 1,95$ ) y en los suelos agrícolas de Motril como describiremos más adelante.

Como ya hemos explicado en secciones anteriores, *Halomonas* es el género en el que se han descrito hasta la fecha el mayor número de especies halófilas, no sólo dentro de las proteobacterias sino también considerando otros taxa donde se clasifican bacterias halófilas (de la Haba y col., 2010 y 2011). En la actualidad incluye 83 especies (<http://www.bacterio.cict.fr/h/halomonas.html>) (Euzéby, 2013) y constituye unos de los taxones que se aíslan con más frecuencia por métodos tradicionales de cultivo en ambientes salinos e hipersalinos (Xu y col., 2007; Guzmán y col., 2010; Poli y col., 2011; Wang y col., 2012; Luque y col., 2012b; Poli y col., 2013). Además también se ha descrito en hábitats no salinos (Kim y col., 2010) y en muestras de alimentos y clínicas, entre otras. Por otra parte ya se ha empezado a demostrar su presencia por métodos moleculares en algunos ambientes. Así, recientemente, Phillips y col. (2012) lo han descrito en el lago la Sal del Rey en Texas, Estados Unidos y Wani y col. (2006) en un lago alcalino en la India.

Por último consideremos los resultados obtenidos en las muestras de suelos no salinos, comparándolas con los descritos con anterioridad en los ambientes salinos. Recordemos que se analizaron seis muestras procedentes de suelos agrícolas del área de Motril, Granada.

En dichos suelos se halló que el phylum *Proteobacteria* representaba el 50,89% del total de los grupos taxonómicos identificados en todas las muestras analizadas, seguido por los phyla *Actinobacteria* (16,27%), *Bacteroidetes* (15,52%), *Gemmatimonadetes* (9,41%) y *Acidobacteria* (0,52%). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Shange y col. (2012), quienes encontraron, analizando los suelos de una finca situada en Alabama, Estados Unidos, que la comunidad bacteriana estaba dominada por el phylum *Proteobacteria* con valores medios de abundancia relativa que oscilaron desde el 39,9% hasta el 45,5%, según el tipo de suelo estudiado. Por otra parte, estos autores mostraron también la presencia de otros grupos, tales como los phyla *Actinobacteria*, *Acidobacteria* y *Gemmatimonadetes*. En otros trabajos se describen resultados similares (Tripathi y col., 2012).

Además merece la pena destacar el elevado número de secuencias que se correspondían con bacterias aún no cultivadas (7,35%) o clones no identificables.

Cabe mencionar que las muestras correspondientes a los suelos agrícolas de Motril mostraron valores elevados de rango ponderado de riqueza ( $Rr = 45,49$ ), y de diversidad ( $H' = 2,42$ ). Según Marzorati y col. (2008), cuando el valor de  $Rr$  es superior a 30 quiere decir que este ambiente se caracteriza por una riqueza muy alta. Por otro lado, el valor medio de la diversidad también fue elevado indicando una diversidad alta de especies.

En el presente trabajo, hemos demostrado, además, la presencia de arqueas en los suelos no salinos. Estos resultados son concordantes con los obtenidos por otros autores y que han puesto de manifiesto la presencia de estos procariontes en diversos hábitats con baja salinidad (Purdy y col., 2004; Elshahed y col., 2004; Walsh y col., 2005). Sin embargo las arqueas pertenecían mayoritariamente al phylum *Thaumarchaeota* (42,61% de abundancia relativa) y al orden *Thermoplasmatales* (43,35% de abundancia relativa) del phylum *Euryarchaeota*. También se detectó algún representante del phylum *Crenarchaeota*, mientras que no se hallaron miembros del orden *Halobacteriales*. En relación los hábitats salinos de nuestro estudio los *Thermoplasmatales* se hallaron también en la salina de Larache con una abundancia relativa del 12,89%.

Los *Thermoplasmatales* han sido descritos en distintos hábitats hipersalinos (Cytryn y col., 2000; Jiang y col., 2006 y 2007) y en suelos de la isla “Salt Spring” en Canadá (Walsh y col., 2005). Además, también se han encontrado en suelos forestales de Suiza (Pesaro y Widmer, 2002), en suelos de un bosque en Alemania (Kemnitz y col., 2007) y en la superficie de diferentes suelos australianos (Midgley y col., 2007).

El phylum *Thaumarchaeota* fue descrito por Brochier-Armanet y col. (2008). Incluye tres arqueas no cultivadas, *Candidatus Nitrosopumilus maritimus* (Könneke y col., 2005), *Candidatus Nitrososphaera viennensis* (Tourna y col., 2011) y *Candidatus Nitrososphaera gargensis* (Hatzenpichler y col., 2008) además de la especie tipo *Cenarchaeum symbiosum* (Preston y col., 1996). Todas ellas son quimiolitotrofas oxidadoras de amonio por lo que deben desempeñar importantes funciones en los ciclos biogeoquímicos del nitrógeno y del carbono (Brochier-Armanet y col., 2008; Leininger y col., 2006). Recientemente, Sauder y col. (2012) confirmaron la presencia de los miembros del phylum *Thaumarchaeota* en plantas de tratamiento de aguas residuales. Mendes y col. (2012) han descrito su presencia en los sedimentos de unos manglares de Brasil.

Finalmente algunas consideraciones respecto a los representantes del género *Halomonas*. Como ya se ha escrito antes, también hallamos una amplia comunidad de este microorganismo en los suelos no salinos, siendo la especie predominante *Halomonas ventosae* (más del 65% de abundancia relativa). Asimismo hemos hallado un número considerable de secuencias (15,63%) que no pudieron ser identificadas a nivel de especie de *Halomonas* en los suelos agrícolas de Motril y en las salinas de Cabo de Gata (Almería) (100% de las secuencias). Tanto la abundancia como la diversidad de esta comunidad fueron significativas.

## **II. CAPITULO 2**

### **Diversidad procariota en Rambla Salada**



## II. 1. Resultados

### II. 1. 1. Parámetros físico-químicos de Rambla Salada

En la Tabla 28 se muestran las características físico-químicas de los lugares de muestreo en las distintas épocas estudiadas.

**Tabla 28.** Parámetros físico-químicos en cada zona y época de muestreo

Época	Zona	Muestra	Tipo de muestra	Salinidad (g l <sup>-1</sup> )	pH	Oxígeno (mg l <sup>-1</sup> )
<b>Junio 2006</b>	Finca la Salina	S1A	Suelo	44,4	6,3	10,2
		S2A	Suelo	44,4	6,3	10,2
		S4A	Sedimento acuoso	83,0	6,8	4,5
	Trasvase Tajo-Segura	S3A	Sedimento acuoso	62,1	8,7	1,5
	Surgencia	S7A	Sedimento acuoso	140,0	7,1	1,0
		S8A	Sedimento acuoso	140,0	7,1	1,0
<b>Febrero 2007</b>	Finca la Salina	S1B	Suelo	18,6	8,2	17,2
		S2B	Suelo	18,6	8,2	17,2
		S4B	Sedimento acuoso	20,2	8,1	14,2
	Trasvase Tajo-Segura	S3B	Sedimento acuoso	34,0	8,1	10,5
	Surgencia	S7B	Sedimento acuoso	157,6	6,7	0,6
		S8B	Sedimento acuoso	157,6	6,7	0,6
<b>Noviembre 2007</b>	Finca la Salina	S1C	Suelo	11,8	8,3	13,0
		S2C	Suelo	11,8	8,3	13,0
		S4C	Sedimento acuoso	22,2	8,0	7,9
	Trasvase Tajo-Segura	S3C	Sedimento acuoso	29,0	8,3	20,6
	Surgencia	S7C	Sedimento acuoso	151,2	7,2	4,0
		S8C	Sedimento acuoso	151,2	7,2	4,0

En general, los parámetros físico-químicos (salinidad, pH, y oxígeno) mostraron una variabilidad espacial (zona de muestreo) y temporal (época de muestreo). La salinidad de las muestras de la Finca la Salina (muestras S1, S2 y S4) y del canal Trasvase Tajo-Segura (muestra S3) fue inferior a la de la surgencia (muestras S7 y S8). (Figura 52 y Tabla 28).



En cuanto a los valores de pH, presentaron una variación temporal en la zona de la Finca la Salina (S1, S2 y S4), con un descenso de pH en junio de 2006 (pH entre 6,3 y 6,8), sin embargo, los valores obtenidos en febrero y noviembre de 2007 fueron ligeramente alcalinos. Resultados similares se obtuvieron en la muestra S3 del canal Traslase Tajo-Segura (Tabla 28, Figura 52).

Los parámetros físico-químicos de la surgencia no registraron grandes variaciones de pH en las distintas épocas muestreadas.

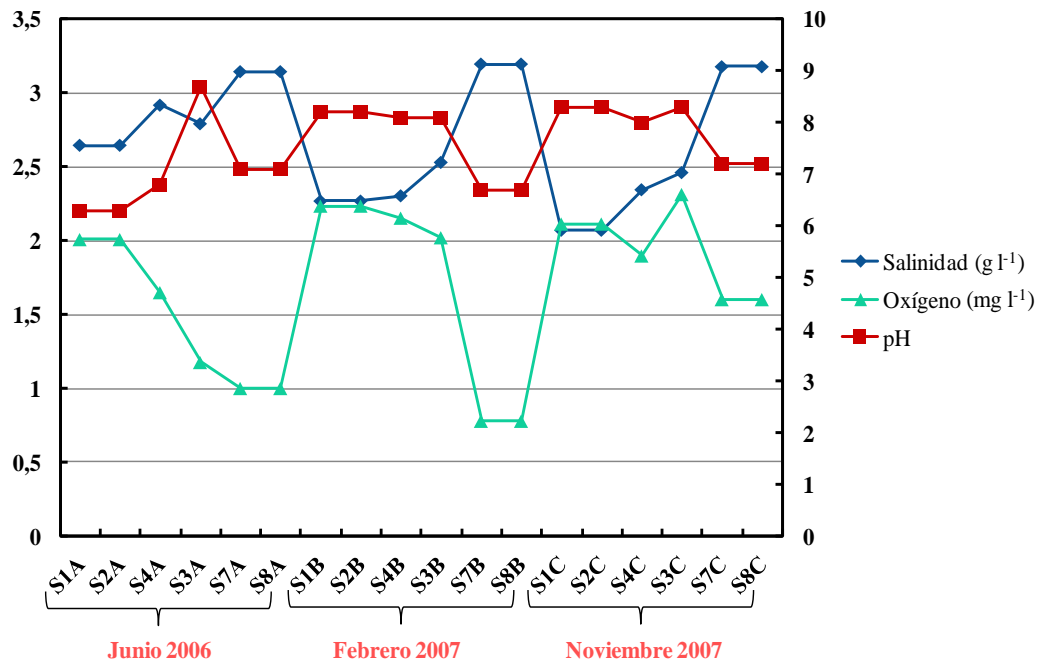


Figura 52. Parámetros físico-químicos en las tres zonas y épocas de muestreo

Respecto a la concentración del oxígeno, se registraron variaciones temporales y espaciales, obteniéndose especialmente un descenso de los valores del oxígeno en la zona de la surgencia (S7 y S8) y en la zona del canal Traslase Tajo-Segura (S3) correspondientes al muestreo de junio de 2006.

## **II. 2. Diversidad de bacterias en Rambla Salada**



# Resumen

En este apartado se muestran los resultados obtenidos del análisis de la comunidad de bacterias y la influencia de distintos parámetros ambientales, temporales y espaciales.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de los perfiles de DGGE indicaron variaciones temporales (según la época de muestreo) en la composición de la comunidad de bacterias en Rambla Salada. El análisis filogenético demostró que el phylum *Bacteroidetes* fue el mayoritario en las tres épocas muestreadas y en las zonas estudiadas. El phylum *Proteobacteria* fue el segundo clasificado en abundancia y se encontró en todos los lugares de muestreo. También se detectaron secuencias pertenecientes a los phyla *Firmicutes* y *Cyanobacteria*. Los muestreos realizados en las épocas de noviembre y febrero de 2007 caracterizados por la baja concentración de sal fueron los que presentaron la mayor diversidad.

Mediante el análisis de ordenación con el programa Canoco, se comprobó que ambos factores ambientales; salinidad y oxígeno tienen un efecto significativo en la distribución de la comunidad bacteriana, sin embargo el pH tiene una escasa influencia.

Los resultados obtenidos por la técnica CARD-FISH mostraron que la comunidad de bacterias representa hasta el 66% de la población total de microorganismos, siendo los recuentos obtenidos en febrero y noviembre de 2007, con valores de  $4,8 \times 10^8$  y  $4,3 \times 10^8$  respectivamente de bacterias por ml, los más elevados.

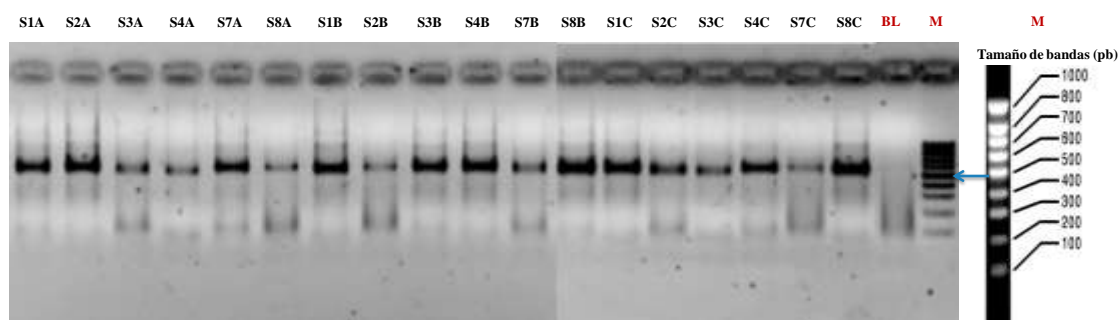
La biodiversidad de bacterias encontrada por métodos moleculares fue distinta a la determinada por Luque y col. (2013) empleando métodos tradicionales de cultivo, indicando que, en Rambla Salada existen una serie de filotipos que aún quedan para cultivar.



## II. 2. 1. Diversidad de bacterias

### *Amplificación por PCR del gen del ARNr 16S*

Los productos de la amplificación del gen del ARNr 16S de la población bacteriana, obtenidos con la pareja de cebadores correspondiente, se muestran en la Figura 53. Todas las muestras presentaron una banda con un tamaño de aproximadamente 500pb; no se obtuvieron bandas en los controles negativos. Todas las amplificaciones se realizaron por triplicado.



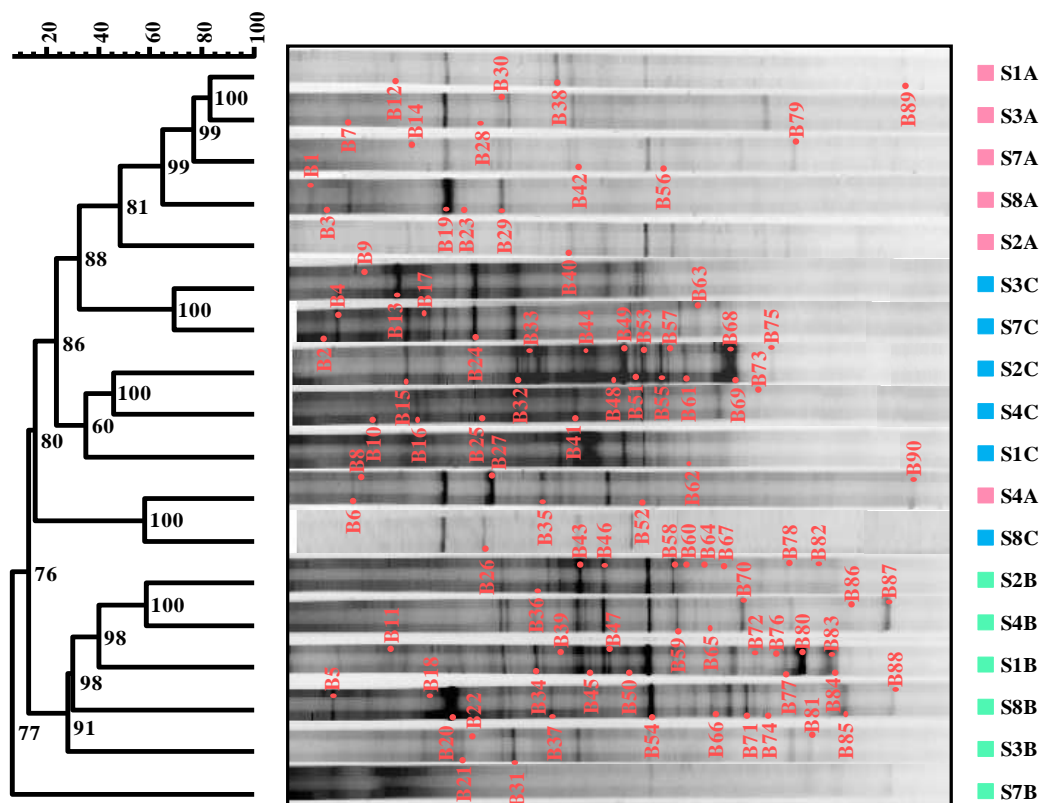
**Figura 53.** Productos de amplificación del gen del ARNr 16S (500pb). **SA:** Muestras tomadas en junio de 2006, **SB:** Muestras tomadas en febrero de 2007, **SC:** Muestras tomadas en noviembre de 2007. **M:** Marcador Molecular (1000pb). **BL:** Blanco

### *DGGE*

Con la finalidad de comparar los perfiles de las poblaciones bacterianas, los patrones de DGGE obtenidos en cada época de muestreo se sometieron en un análisis mediante el programa informático FPquest, aplicando tanto el índice de similitud cuantitativo (coeficiente de Pearson) basado en la intensidad de las bandas, como el índice de similitud cualitativo (coeficiente de Dice) que tiene en cuenta la presencia-ausencia de bandas.

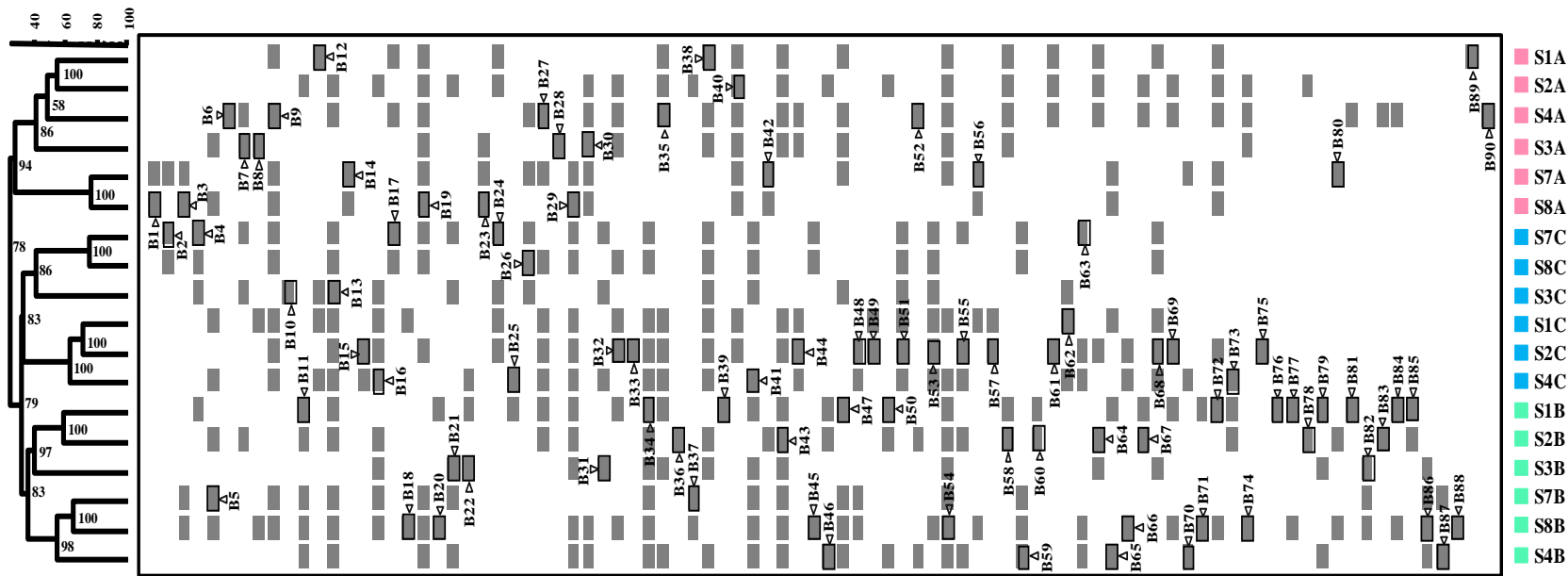
El dendograma obtenido a partir de la matriz de similitud confeccionada con el índice de Pearson se muestra en la Figura 54, donde se observa que la temporalidad (época de muestreo) es más importante que la zona de muestreo. Se obtienen dos clústers con un nivel de similitud del 15%. El primero incluye las muestras tomadas en junio de 2006 y noviembre de 2007. El segundo agrupa las muestras que se tomaron en febrero de 2007.

Por otro lado, las muestras tomadas en febrero de 2007 muestran un 30% de similitud entre sí, mientras que las obtenidas en junio de 2006 y noviembre de 2007 sólo mostraron el 18% de similitud.



**Figura 54.** Análisis de los perfiles de DGGE basado en el coeficiente de Pearson y el método de unión de enlace medio (UPGMA). La escala indica el porcentaje de similitud. Los números en los nodos representan los valores del coeficiente de correlación cofenético. **SA** ■: Muestras tomadas en junio de 2006, **SB** ■: Muestras tomadas en febrero de 2007, **SC** ■: Muestras tomadas en noviembre de 2007

El dendrograma obtenido mediante el coeficiente de Dice (Figura 55) muestra resultados diferentes a los determinados mediante el coeficiente de Pearson, aunque sigue siendo la temporalidad más importante que la zona de muestreo. El perfil de la comunidad de baceterias de junio de 2006 se separó de manera significativa de los perfiles correspondientes a las épocas de febrero y noviembre de 2007, estas últimas se agruparon en dos clústers, el primero agrupa las muestras tomadas en junio de 2006, mientras que el segundo, incluye las muestras de la época de noviembre de 2007. Además, el dendrograma de Dice muestra la separación de las muestras pertenecientes a la zona de surgencia (S7 y S8) del resto de las muestras analizadas.



**Figura 55.** Análisis de los perfiles de DGGE basado en el coeficiente de Dice y el método de unión de enlace medio (UPGMA). La escala indica el porcentaje de similitud. Los números en los nodos representan los valores del coeficiente de correlación cofenética. >/< Bandas cortadas, reamplificadas y secuenciadas. SA ■: Muestras tomadas en junio de 2006, SB ■: Muestras tomadas en febrero de 2007, SC ■: Muestras tomadas en noviembre de 2007



## Análisis de las secuencias

Se consiguió secuenciar 67 bandas escindidas de los perfiles de DGGE a partir de un total de 90 clases de bandas (bandas marcadas en la Figura 55). Posteriormente, las secuencias se compararon mediante el programa Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/)), con las secuencias depositadas en el Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para determinar su afiliación taxonómica.

En la Tabla 29, se muestran los resultados obtenidos tras la identificación de las secuencias objeto de estudio. La mayoría de las secuencias mostraron más del 90% de identidad con las secuencias depositadas en el Genbank.

**Tabla 29.** Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE, (las bandas B3, B5, B6, B8, B9, B28, B18, B45, B47, B59, B65, B66, B67, B70, B81, B82, B83, B84, B86, B87, B88, B89 y B90 no pudieron ser secuenciadas)

Banda	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
B1	<i>Halothiobacillus</i> sp. HL27 (DQ469574)	99%
B2	<i>Comamonas</i> sp. PHD-10 (DQ301787)	97%
B4	<i>Halothiobacillus</i> sp. HL27 (DQ469574)	98%
B7	Bacteria no cultivada EJ97 (FM210936)	100%
B10	<i>Cyanobacteria</i> no cultivada 2P352 (EF106449)	98%
B11	<i>Phormidium</i> sp. HBC9 (EU249125)	99%
B12	<i>Halanaerobium alcaliphilum</i> DSM8275 <sup>T</sup> (HE582777)	99%
B13	<i>Halanaerobium</i> sp. AN-BI5B (AM157647)	99%
B14	<i>Halanaerobium</i> sp. AN-BI5B (AM157647)	95%
B15	<i>Halanaerobium</i> sp. AN-BI5B (AM157647)	94%
B16	<i>Bacteroidetes</i> no cultivado Ppss_CK72 (JF421218)	96%
B17	<i>Bacteroidetes</i> no cultivado NdSurf156 (FJ753206)	97%
B19	<i>Cytophagales</i> no cultivado LA7-B21N (AF513957)	99%
B20	<i>Bacteroidetes</i> no cultivado BPS_L224 (HQ857722)	98%
B21	<i>Halothiobacillus</i> sp. BI24 (AM157650)	99%
B22	<i>Halothiobacillus</i> sp. HL27 (DQ469574)	98%
B23	<i>Salipiger mucosus</i> A3 <sup>T</sup> (NR_029116)	99%
B24	<i>Roseivivax</i> sp. Y5 (EF177677)	95%
B25	<i>Halothiobacillus</i> sp. HL27 (DQ469574)	99%
B26	<i>Halothiobacillus</i> sp. BI24 (AM157650)	94%

Tabla 29. Continuación

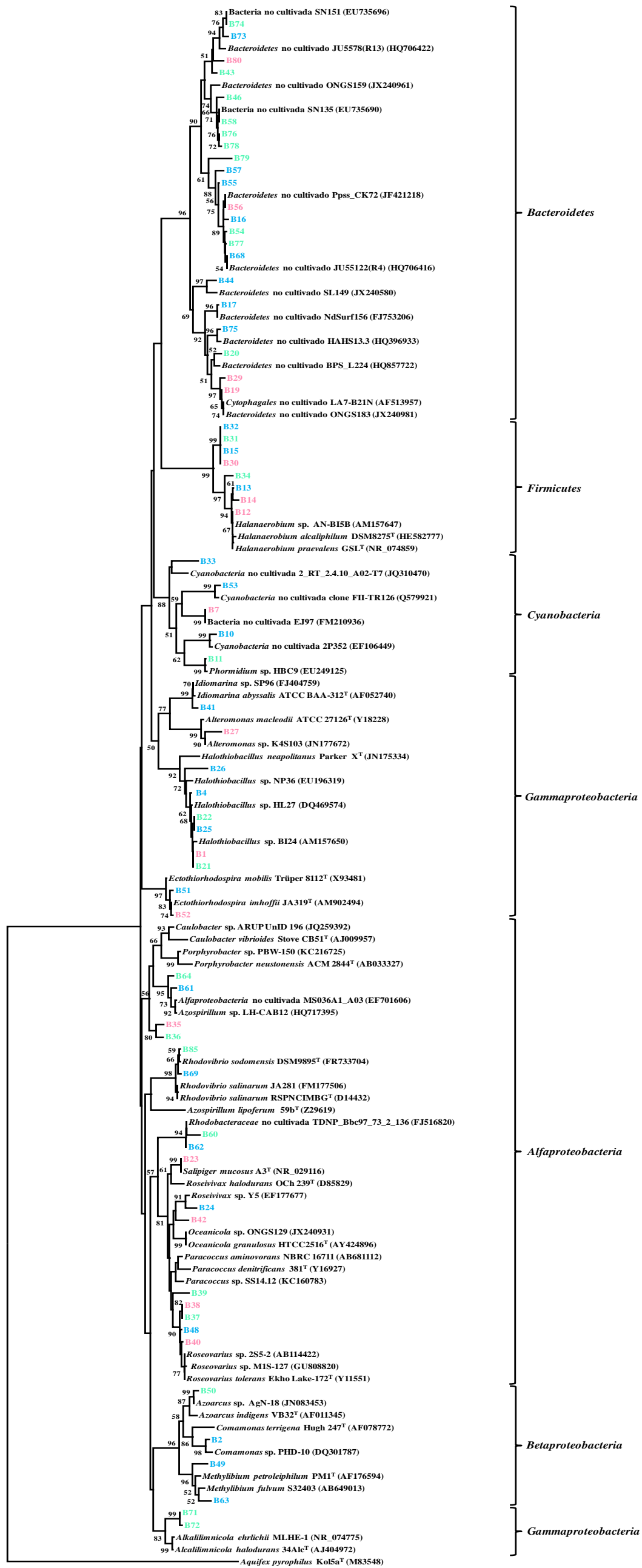
Banda	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
B27	<i>Alteromonas</i> sp. K4S103 (JN177672)	98%
B29	<i>Bacteroidetes</i> no cultivado ONGS183 (JX240981)	95%
B30	<i>Halanaerobium</i> sp. AN-BI5B (AM157647)	94%
B31	<i>Halanaerobium</i> sp. AN-BI5B (AM157647)	99%
B32	<i>Halanaerobium</i> sp. AN-BI5B (AM157647)	94%
B33	<i>Cyanobacteria</i> no cultivada 2_RT_2.4.10_A02-T7 (JQ310470)	94%
B34	<i>Halanaerobium praevalens</i> GSL <sup>T</sup> (NR_074859)	95%
B35	<i>Caulobacter</i> sp. ARUP UnID 196 (JQ259392)	94%
B36	<i>Porphyrobacter</i> sp. PBW-150 (KC216725)	94%
B37	<i>Roseovarius</i> sp. 2S5-2 (AB114422)	98%
B38	<i>Roseovarius</i> sp. M1S-127 (GU808820)	99%
B39	<i>Paracoccus</i> sp. SS14.12 (KC160783)	94%
B40	<i>Roseovarius tolerans</i> Ekho Lake-172 <sup>T</sup> (Y11551)	99%
B41	<i>Idiomarina</i> sp. SP96 (FJ404759)	98%
B42	<i>Oceanicola</i> sp. ONGS129 (JX240931)	95%
B43	<i>Bacteroidetes</i> no cultivado JU5578(R13) (HQ706422)	95%
B44	<i>Bacteroidetes</i> no cultivado SL149 (JX240580)	92%
B46	Bacteria no cultivada SN135 (EU735690)	97%
B48	<i>Roseovarius</i> sp. 2S5-2 (AB114422)	99%
B49	<i>Methylibium fulvum</i> S32403 (AB649013)	96%
B50	<i>Azoarcus</i> sp. AgN-18 (JN083453)	98%
B51	<i>Ectothiorhodospira imhoffii</i> JA319 <sup>T</sup> (AM902494)	99%
B52	<i>Ectothiorhodospira imhoffii</i> JA319 <sup>T</sup> (AM902494)	99%
B53	<i>Cyanobacteria</i> no cultivada clon FII-TR126 (Q579921)	97%
B54	<i>Bacteroidetes</i> no cultivado JU55122(R4) (HQ706416)	98%
B55	<i>Bacteroidetes</i> no cultivado Ppss_CK72 (JF421218)	96%
B56	<i>Bacteroidetes</i> no cultivado Ppss_CK72 (JF421218)	97%
B57	<i>Bacteroidetes</i> no cultivado Ppss_CK72 (JF421218)	95%
B58	Bacteria no cultivada SN135 (EU735690)	99%
B60	<i>Rhodobacteraceae</i> no cultivada TDNP_Bbc97_73_2_136 (FJ516820)	98%
B61	<i>Azospirillum</i> sp. LH-CAB12 (HQ717395)	96%
B62	<i>Rhodobacteraceae</i> no cultivada TDNP_Bbc97_73_2_136 (FJ516820)	99%

Tabla 29. Continuación

Banda	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
B63	<i>Methylibium fulvum</i> S32403 (AB649013)	94%
B64	<i>Alfaproteobacteria</i> no cultivada MS036A1_A03 (EF701606)	96%
B68	<i>Bacteroidetes</i> no cultivado JU55122(R4) (HQ706416)	99%
B69	<i>Rhodovibrio sodomensis</i> DSM9895 <sup>T</sup> (FR733704)	99%
B71	<i>Alkalilimnicola ehrlichii</i> MLHE-1 (NR_074775)	94%
B72	<i>Alkalilimnicola ehrlichii</i> MLHE-1 (NR_074775)	94%
B73	Bacteria no cultivada SN151 (EU735696)	96%
B74	Bacteria no cultivada SN151 (EU735696)	98%
B75	<i>Bacteroidetes</i> no cultivado HAHS13.3 (HQ396933)	98%
B76	Bacteria no cultivada SN135 (EU735690)	99%
B77	<i>Bacteroidetes</i> no cultivado JU55122(R4) (HQ706416)	97%
B78	Bacteria no cultivada SN135 (EU735690)	98%
B79	<i>Bacteroidetes</i> no cultivado Ppss_CK72 (JF421218)	94%
B80	<i>Bacteroidetes</i> no cultivado JU5578(R13) (HQ706422)	94%
B85	<i>Rhodovibrio salinarum</i> JA281 (FM177506)	98%

La construcción de los árboles filogenéticos se llevó a cabo usando los métodos Neighbour-Joining y Maximum-Likelihood, donde se incluyeron además de las secuencias obtenidas en este estudio, las secuencias de las bacterias más semejantes (Tabla 29) y las de las especies tipo del género al que pertenecen.

El árbol filogenético obtenido con el algoritmo Neighbour-Joining se muestra en la Figura 56. Se observó que las secuencias objeto de estudio se distribuyen claramente en cuatro clústers correspondientes a los phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Cyanobacteria* y *Proteobacteria*. A su vez, las secuencias pertenecientes al phylum *Proteobacteria* se dividen en varios clústers que se afilian con las clases *Gammaproteobacteria*, *Alfaproteobacteria* y *Betaproteobacteria*. El árbol filogenético obtenido mediante el algoritmo Maximum-Likelihood mostró una topología similar (véase el apartado de material suplementario).



H  
0,01

**Figura 56.** Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método Neighbour-Joining. Los números de acceso en la base de datos Genbank de las secuencias de referencia se encuentran entre paréntesis. Se indican los valores de “bootstrap” mayores del 50%. Secuencias obtenidas en junio de 2006 (B), febrero de 2007 (B) y noviembre de 2007 (B)



En la Figura 57 se muestra la abundancia relativa de las secuencias identificadas en las tres épocas de muestreo de Rambla Salada. En esta figura, se observó la predominancia del phylum *Bacteroidetes* que engloba el 37,85% de la diversidad total obtenida en todos los muestreos. En segundo lugar, el phylum *Proteobacteria* presenta un 30,26% de abundancia relativa, seguido por los phyla *Firmicutes* y *Cyanobacteria*. Otro grupo de bacterias no identificadas mostró un 14,36% de abundancia relativa respecto al total de la comunidad.

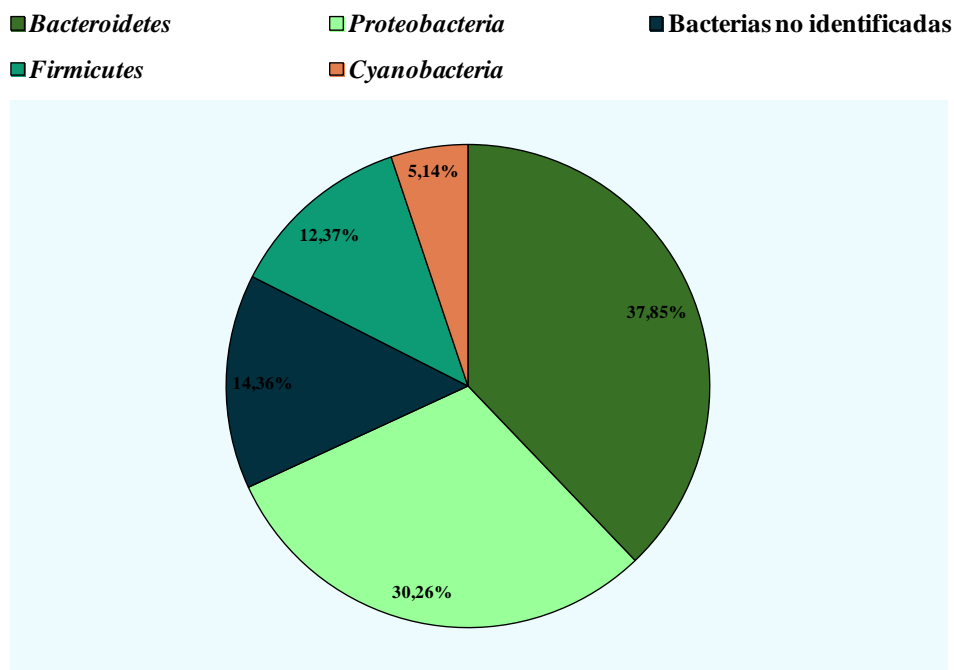


Figura 57. Abundancia relativa de bacterias en los tres muestreos

En la Tabla 30 se muestran los grupos taxonómicos encontrados en las tres épocas de muestreo y su representación gráfica se muestra en la Figura 58, donde se observa que todos los phyla identificados en este estudio se encontraron en las tres épocas de muestreo.

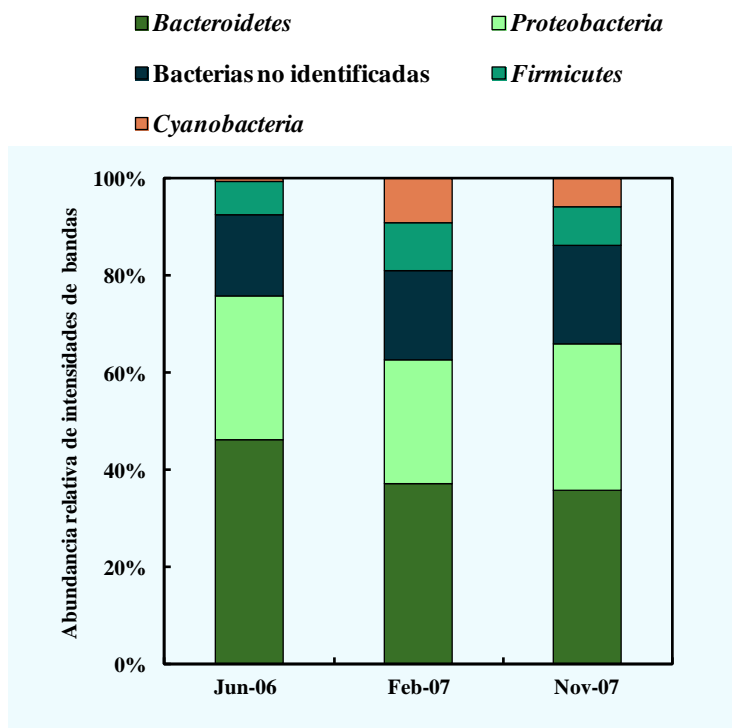


Figura 58. Abundancia relativa de bacterias en cada época de muestreo.

Como ya indicamos anteriormente, *Bacteroidetes* es el phylum más abundante y se halló en las tres épocas de muestreo con un 46,07%, 37,42% y 35,72% en junio de 2006, febrero y noviembre de 2007 del total de la población respectivamente. El phylum *Proteobacteria*, el segundo en abundancia, mostró los porcentajes mayores en noviembre de 2007 (30,23%). Por su parte, los phyla *Firmicutes* y *Cyanobacteria* mostraron porcentajes mayores en la época de febrero de 2007 (9,73% y 9,13% respectivamente)

Tabla 30. Abundancia relativa (en %) de los grupos taxonómicos (intensidad de bandas de DGGE) identificados en las tres épocas de muestreo

Grupos taxonómicos	Junio 2006	Febrero 2007	Noviembre 2007
<i>Bacteroidetes</i>	46,07	37,42	35,72
<i>Proteobacteria</i>	29,72	25,35	30,23
Bacterias no identificadas	16,64	18,53	20,31
<i>Firmicutes</i>	7,06	9,73	7,91
<i>Cyanobacteria</i>	0,49	9,13	5,80

El phylum *Firmicutes* estaba representado por un solo género; *Halanaerobium*, mientras que el phylum *Cyanobacteria* incluye bacterias no cultivadas. Todas las secuencias pertenecientes al phylum *Bacteroidetes* están relacionadas con bacterias no cultivadas, sin embargo y en el caso del phylum *Proteobacteria* se encontraron varios géneros; *Idiomarina*, *Alteromonas*, *Halothiobacillus*, *Ectothiorhodospira*, *Caulobacter*, *Porphyrobacter*, *Azospirillum*, *Rhodovibrio*, *Azoarcus*, *Comamonas*, *Methylibium*, *Alkalilimnicola*, *Salipiger*, *Roseivivax*, *Oceanicola*, *Paracoccus* y *Roseovarius*. Cabe resaltar que en el análisis de las secuencias escindidas de los perfiles de DGGE de la comunidad bacteriana, se hallaron varias secuencias que no fueron identificadas (bandas B3, B5, B6, B8, B9, B28, B18, B45, B47, B59, B65, B66, B67, B70, B81, B82, B83, B84, B86, B87, B88, B89 y B90), este grupo bacteriano mostró porcentajes mayores en las tres épocas de muestreo (Tabla 30).

### Índices de diversidad

La diversidad de bacterias en las distintas zonas y épocas de muestreo se comparó mediante los índices de diversidad. A continuación se muestran los resultados obtenidos.

### Rango ponderado de la riqueza (*Rr*)

Para determinar el rango ponderado de la riqueza se multiplicó el número de bandas en una muestra (carril de DGGE) por el gradiente desnaturalizante entre la primera y la última banda del carril de DGGE. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 31.

**Tabla 31.** Rango ponderado de la riqueza (*Rr*) en cada sitio y época de muestreo

Época	Zona	Muestra	Nº de bandas	<i>Rr</i>	Promedio	
Junio 2006*	Finca la salina	S1A	17	29,24	41,36 ± 25,95	
		S2A	23	39,56		
		S4A	29	91,87		
	Trasvase Tajo-Segura	S3A	16	31,74		
		Surgencia	S7A	20		38,20
			S8A	14		17,59

\* Época de muestreo en la que hay diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con respecto al resto de las épocas. MDS: Mínima diferencia significativa



Tabla 31. Continuación

Época	Zona	Muestra	Nº de bandas	Rr	Promedio
<b>Febrero 2007</b>	Finca la salina	S1B	32	123,69	74,14 ± 38,31
		S2B	26	78,55	
		S4B	24	59,61	
	Trasvase Tajo-Segura	S3B	16	22,37	
	Surgencia	S7B	19	46,49	
		S8B	36	114,13	
<b>Noviembre 2007</b>	Finca la salina	S1C	26	60,63	58,73 ± 26,86
		S2C	30	92,07	
		S4C	28	85,61	
	Trasvase Tajo-Segura	S3C	16	24,42	
	Surgencia	S7C	22	55,07	
		S8C	18	34,63	
<b>MDS</b>					0,0365

\* Época de muestreo en la que hay diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con respecto al resto de las épocas. MDS: Mínima diferencia significativa

El promedio del número de bandas por muestra fue 25, con un mínimo de 14 bandas, encontrado en la muestra correspondiente a la zona de la surgencia (S8) tomada en junio de 2006, y un máximo de 36 bandas, en la misma zona (S8), tomada en febrero de 2007. Los valores medios de riqueza oscilaron entre el  $41,36 \pm 25,95$  en las muestras tomadas en junio de 2006 y  $74,14 \pm 38,31$  en febrero de 2007 (Tabla 31). Según los datos obtenidos, el muestreo con mayor riqueza de especies fue el de febrero de 2007 mostrando valores altos de riqueza ( $Rr > 30$ ).

El análisis de varianza (ANOVA) de los datos de riqueza mostró diferencias entre las tres épocas de muestreo (MDS = 0,0365), siendo el muestreo de junio de 2006 el más distinto respecto al resto de las épocas de muestreo ( $p \leq 0,05$ ), sin embargo, no hubo diferencias significativas a nivel espacial (zona de muestreo).

## Índices de Shannon-Weaver y de Simpson

Los valores de los índices de diversidad de *Shannon-Weaver* ( $H'$ ) y de *Simpson* ( $SI$ ) obtenidos en cada zona y época de muestreo se muestran en la Tabla 32. Con la finalidad de determinar estos valores se evaluó la relación entre el número de bandas en cada muestra y sus respectivas intensidades. En dicha tabla se muestran también los valores del análisis ANOVA que determinan las diferencias significativas de diversidad y dominancia entre las épocas y zonas de muestreo.

**Tabla 32.** Índices de *Shannon-Weaver* y *Simpson* en cada sitio y época de muestreo

Época	Zona	Muestra	$H'$	Promedio	$SI$	Promedio	
<b>Junio 2006*</b>	Finca la Salina	S1A	2,43	2,22 ± 0,34	0,11	0,13 ± 0,07	
		S2A	2,71		0,09		
		S4A	2,18		0,11		
	Trasvase Tajo-Segura	S3A	2,28		0,13		
		Surgencia	S7A		2,00		0,09
			S8A		1,72		0,28
<b>Febrero 2007</b>	Finca la Salina	S1B	2,94	2,60 ± 0,36	0,07	0,11 ± 0,06	
		S2B	2,66		0,10		
		S4B	2,63		0,09		
	Trasvase Tajo-Segura	S3B	2,59		0,08		
		Surgencia	S7B		1,91		0,24
			S8B		2,88		0,09
<b>Noviembre 2007</b>	Finca la Salina	S1B	2,75	2,63 ± 0,24	0,09	0,09 ± 0,02	
		S2B	2,71		0,10		
		S4B	2,93		0,07		
	Trasvase Tajo-Segura	S3B	2,36		0,11		
		Surgencia	S7B		2,73		0,08
			S8B		2,30		0,14
<b>MDS</b>				0,0385		0,0251	

\* Época de muestreo en la que hay diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con respecto al resto de las épocas. MDS: Mínima diferencia significativa

En general, las época de muestreo en las que se obtuvo mayor diversidad fue las de noviembre y febrero de 2007 con un índice de *Shannon-Weaver* ( $H'$ ) de  $2,63 \pm 0,24$  y  $2,60 \pm 0,36$  respectivamente. En cuanto al índice de *Simpson* ( $SI$ ) que es inverso al de *Shannon-Weaver*, el valor más bajo es el de la época de noviembre de 2007;  $0,09 \pm 0,02$ . Este índice refleja la dominancia de las comunidades de bacterias.

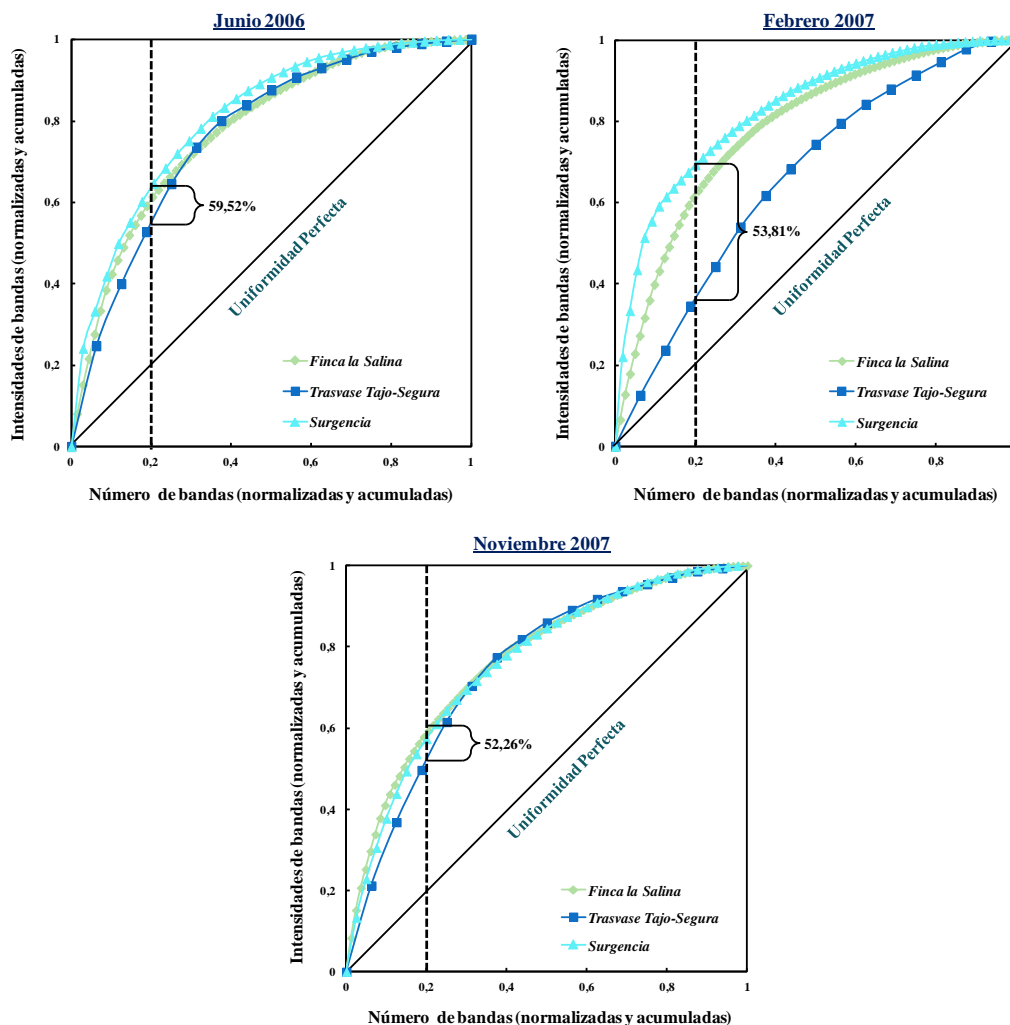
Mediante el análisis ANOVA se compararon los resultados obtenidos, mostrando que existen diferencias significativas en la diversidad y la dominancia de bacterias entre las tres épocas de muestreo, y que el muestreo de junio de 2006 es el más distinto. Por el contrario, no se detectaron diferencias significativas entre las zonas estudiadas.

### *Organización funcional (Fo)*

La organización funcional ( $Fo$ ) o la uniformidad de las comunidades bacterianas se estudió mediante el cálculo del índice  $Fo$  a partir de las curvas de distribución de *Pareto-Lorenz* ( $PL$ ) de las muestras tomadas en las tres épocas de muestreo.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 59 donde se puede observar como en la época de junio de 2006, el 20% del número de bandas (acumuladas y normalizadas) presentó los valores de  $Fo$  (intensidades de las bandas acumuladas y normalizadas) de 60,50%, 55,04% y 63,02% (59,52% en promedio) en las zonas de la Finca la Salina, el canal Traslase Tajo-Segura y la surgencia respectivamente (Tabla 33).

En la época de febrero de 2007, los valores de  $Fo$  obtenidos fueron 60,55%, 35,77% y 65,13% (53,81% de promedio) para el 20% de las bandas obtenidas en las zonas de la Finca la Salina, el canal Traslase Tajo-Segura y la surgencia respectivamente. Por otro lado, el 20% de las bandas representó el 60,55%, 52,29% y el 55,96 % (52,26% de promedio) de intensidad acumulada ( $Fo$ ) en las muestras tomadas en noviembre de 2007.



**Figura 59.** Curvas de distribución de Pareto-Lorenz basadas en los perfiles de DGGE. La proyección de la línea vertical del valor 0,2 del eje X se utiliza para determinar los valores de  $F_o$

En términos generales, se observó que el valor medio de  $F_o$  obtenido en junio de 2006 fue superior respecto al resto de las épocas de muestreo. Específicamente en la zona de la surgencia de dicha fecha, la comunidad de bacterias resultó ser la más específica y menos uniforme, puesto que el valor de  $F_o$  obtenido superó el 60%, es decir, el 20% de las bandas de esa muestra representaban el 63,02% de las intensidades de todas las bandas (Tabla 33).

**Tabla 33.** Valores de  $F_o$  (en %) obtenidos en cada zona y época de muestreo

Época	Zona	$F_o$	Promedio
<b>Junio 2006*</b>	Finca la Salina	60,50	59,52
	Trasvase Tajo-Segura	55,04	
	Surgencia	63,02	
<b>Febrero 2007</b>	Finca la Salina	60,55	53,81
	Trasvase Tajo-Segura	35,77	
	Surgencia	65,13	
<b>Noviembre 2007</b>	Finca la Salina	60,55	52,26
	Trasvase Tajo-Segura	52,29	
	Surgencia	55,96	
<b>MDS</b>			0,0128

\* Época de muestreo en la que hay diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con respecto al resto de las épocas. MDS: Mínima diferencia significativa

Para detectar qué sitio y qué época de muestreo tenía una diferencia significativa de los datos de  $F_o$  con respecto al resto, se llevó a cabo un análisis ANOVA, que permitió determinar los valores de  $F_o$  significativos ( $p \leq 0,05$ ). Los resultados obtenidos indicaron que los datos correspondientes a junio de 2006 fueron los que presentaron diferencias significativas con respecto a febrero y noviembre de 2007. Sin embargo, a nivel espacial, el análisis de ANOVA no mostró diferencias significativas.

### *Influencia de los factores ambientales en la diversidad de bacterias*

Para determinar la influencia de los parámetros ambientales en la comunidad de bacterias, se realizó un análisis de correspondencia sin tendencias (ACD) mediante el programa Canoco empleando la matriz cualitativa de datos de las especies de bacterias (Tabla 42 de material suplementario). Los resultados obtenidos a través de este análisis (longitud del gradiente = 2,841) sugieren que ambas respuestas, unimodal o lineal de las especies de bacterias respecto a los factores ambientales, son adecuadas, por tanto, se aplicó un análisis de correspondencia canónica (ACC).

Los resultados obtenidos mediante el análisis estadístico con el programa Canoco (Tabla 34) mostraron que los dos primeros ejes de ordenación canónica (1 y 2) explicaron el 9,7% y el 17,7% respectivamente de la variabilidad en la distribución de la comunidad bacteriana.

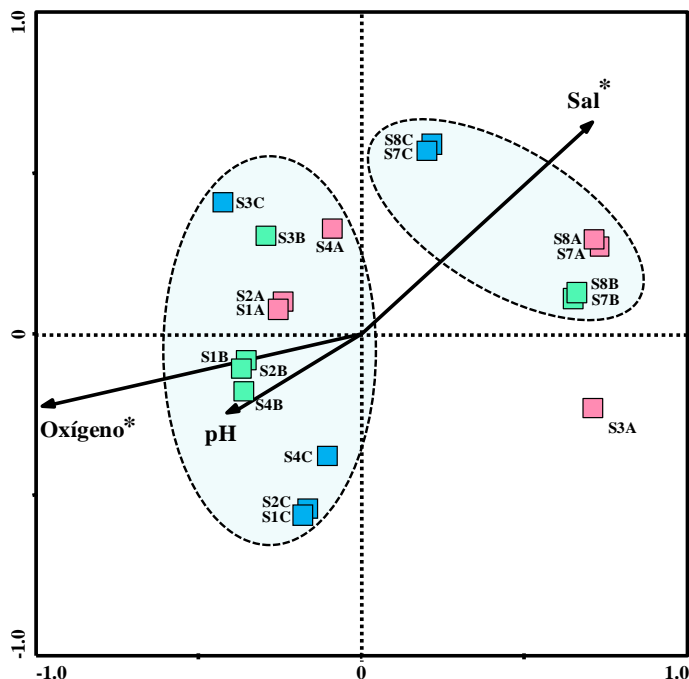
En cuanto a la relación especies-variables ambientales, se observó que el primer eje explicó el 41,2% y el segundo explicó el 75% de dicha variabilidad acumulada con la del primer eje, lo que indica que el total de la variabilidad se explica con los dos primeros ejes del ACC. Al aplicar el test de *Monte Carlo* se evaluó el efecto de cada variable ambiental considerando valores inferiores a 0,05 como significativos. Los resultados obtenidos mostraron una alta correlación del oxígeno (*Monte Carlo*,  $F = 1,70$ ,  $P = 0,0080$ ) y la salinidad (*Monte Carlo*,  $F = 1,39$ ,  $P = 0,0460$ ).

**Tabla 34.** Valores del análisis estadístico Canoco

Ejes de ordenación	1	2	3	Inercia total
Valores propios (eigenvalor)	0,277	0,277	0,168	2,841
Correlación especies-variables ambientales	0,943	0,973	0,930	
Porcentaje acumulado de la variabilidad de especies	9,7	17,7	23,6	
Porcentaje acumulado de la variabilidad de la relación especies-variables ambientales	41,2	75,0	100,0	

En el biplot de la Figura 60 se observó la relación de las variables ambientales con la diversidad en las distintas zonas y épocas de muestreo en dos grupos. El primero está compuesto por las muestras de la zona de surgencia (S7 y S8) de las tres épocas de muestreo, correlacionándose positivamente y significativamente con la salinidad y negativamente con el oxígeno y el pH. En el segundo grupo se incluyen las muestras provenientes de la zona de la Finca la Salina (S1B, S2B, S4B, S1C, S2C, S4C, S1A, S2A, S4A) y el canal Trasvase Tajo-Segura (S3B y S3C) tomadas en las tres épocas de muestreo, mostrándose una correlación positiva con el pH y el oxígeno. La muestra S3A se relacionó positivamente con la salinidad y negativamente con el oxígeno y el pH.

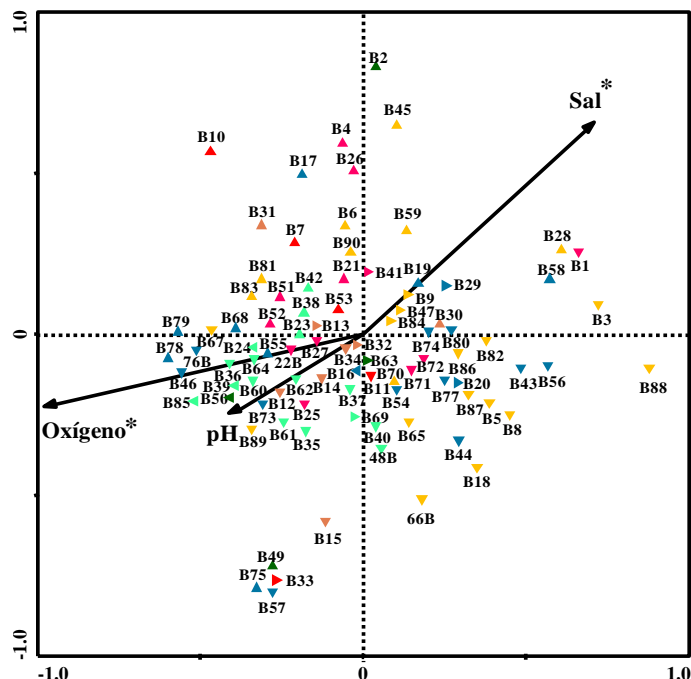
Aplicando el test de permutaciones de *Monte Carlo*, se confirmó que el primer eje canónico representó la influencia de ambos factores, la salinidad y el oxígeno, mientras que el segundo eje representó la influencia del pH.



**Figura 60.** Biplot de la ordenación ACC, basado en los datos cualitativos generados por DGGE, que representa la correlación entre los factores ambientales y las zonas y épocas de muestreo. SA ■: Muestras tomadas en junio de 2006, SB ■: Muestras tomadas en febrero de 2007, SC ■: Muestras tomadas en noviembre de 2007. (S1, S2 y S4: Finca la Salina, S3: Canal Trasvase Tajo-Segura, S7 y S8: Surgencia). Las flechas indican el sentido de correlación de las variables ambientales (sal, oxígeno y pH). Las variables ambientales marcadas con el símbolo \* son significativas ( $p \leq 0,05$ )

La Figura 61 muestra la ordenación de las comunidades bacterianas utilizando la matriz de presencia-ausencia de bandas (Tabla 42 de material suplementario) y los datos de los factores ambientales (salinidad, oxígeno y pH).

Se observó en el análisis ACC una correlación positiva entre la salinidad y la mayoría de los miembros pertenecientes al phylum *Bacteroidetes* (bandas B17, B19, B20, B29, B43, B44, B54, B56, B58, B74, B77 y B80) y a la clase *Gammaproteobacteria* (bandas B1, B4, B21, B26, B41, B71, B72); también la mayoría de las bacterias no identificadas fueron relacionadas positivamente con la salinidad (bandas B3, B5, B6, B8, B9, B18, B28, B45, B47, B59, B70, B82, B84, B86, B87, B88 y B90). Sin embargo, todas las secuencias del phylum *Proteobacteria* relacionadas con las clases *Alfaproteobacteria* y *Betaproteobacteria* mostraron una correlación positiva con el oxígeno y el pH y negativa con la salinidad, excepto la banda B2.



**Figura 61.** Biplot de la ordenación ACC, basado en los datos cualitativos generados por DGGE, que representa la correlación entre los factores ambientales y la comunidad de bacterias. ▲ *Bacteroidetes*; ▲ *Gammaproteobacteria*; ▲ *Alfaproteobacteria*; ▲ *Betaproteobacteria*; ▲ *Firmicutes*; ▲ *Cyanobacteria*; ▲ Bacterias no identificadas. Las flechas indican el sentido de correlación de las variables ambientales (sal, oxígeno y pH). Las variables ambientales marcadas con el símbolo \* son significativas ( $p \leq 0,05$ )

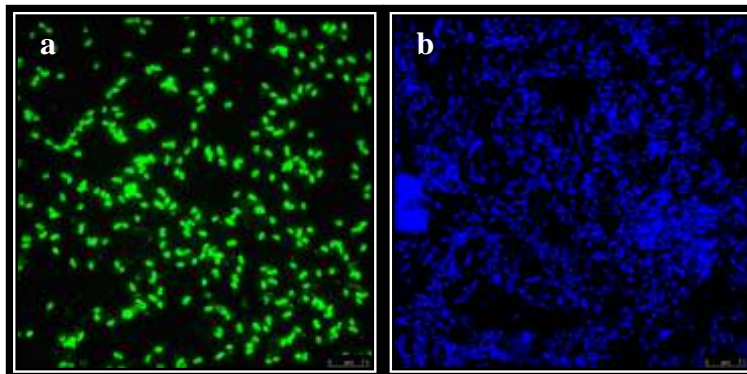
Igualmente ocurrió con todas las secuencias afiliadas con el phylum *Firmicutes* que se correlacionaron positivamente con el pH y el oxígeno y negativamente con la salinidad, excepto la banda B30. Cabe resaltar que las bandas B7, B10 y B33 relacionadas con el phylum *Cyanobacteria* mostraron una escasa influencia por los parámetros ambientales.

## II. 2. 2. Análisis de la comunidad de bacterias mediante CARD-FISH

Mediante el uso de la técnica CARD-FISH, se hibridaron *in situ* (FISH) las muestras objeto de estudio con una sonda específica para bacterias que fue marcada con peroxidasa de rábano (HRP). De igual manera, todas las muestras tratadas se tiñeron con DAPI para determinar el número total de microorganismos existentes. Tras la hibridación de las muestras, se procedió a la amplificación de la señal fluorescente (CARD) y la visualización de las células bacterianas mediante microscopía láser confocal.

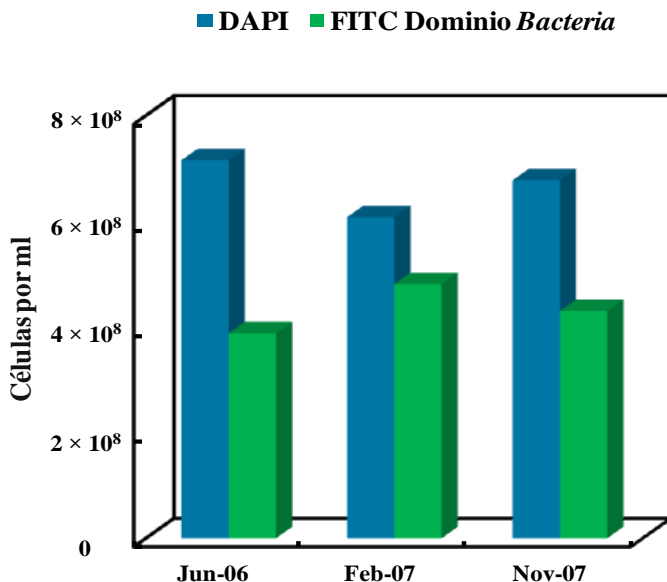


La Figura 62 muestra células de bacterias marcadas con la sonda correspondiente (a) emitiendo fluorescencia de color verde y células totales (b).



**Figura 62.** CARD-FISH de muestras de Rambla Salada. a: Bacterias marcadas con la sonda Eub338-HRP, FITC; b: Células teñidas con DAPI. La escala es de 10  $\mu\text{m}$

La Figura 63 presenta gráficamente los resultados obtenidos en los recuentos de bacterias y de células totales.



**Figura 63.** Recuentos de la población total (DAPI) y la población de bacterias (FITC) en las tres épocas de muestreo

Los recuentos de bacterias oscilaron entre  $3,9 \times 10^8$  y  $4,8 \times 10^8$  células/ml, siendo el mayor recuento el obtenido en la época de febrero de 2007. Los porcentajes de bacterias con respecto al total de células en cada zona y época de muestreo se indican en la Tabla 35.

Los valores de recuentos de células totales en las tres épocas de muestreo variaron entre  $6,1 \times 10^8$  y  $7,1 \times 10^8$ . El promedio de células totales microbianas obtenido en Rambla Salada fue de  $6,7 \times 10^8$  células/ml.

Con respecto al análisis ANOVA, se comprobó que los recuentos obtenidos de las células totales y de las células bacterianas no presentaron diferencias significativas entre las diferentes zonas de muestreo, sin embargo, se detectaron diferencias significativas entre épocas de muestreo, siendo el muestreo tomado en junio de 2006 ( $P = 0,0002$  para DAPI,  $P = 0,0026$  para FITC) el más distinto con respecto al resto de las épocas de muestreo.

**Tabla 35.** Cuantificación de células microbianas totales y de bacterias en cada zona y época de muestreo

Época de muestreo	Zona	Muestra	Recuento de células totales (DAPI) (cel/ml)	Promedio (DAPI)	Recuento de bacterias (FITC) (cel/ml)	Promedio (FITC)	% de FITC/DAPI	Promedio (%) FITC/DAPI
<b>Junio 2006</b>	Finca la Salina	S1A	$7,51 \times 10^8$	$7,1 \times 10^8$	$3,79 \times 10^8$	$3,9 \times 10^{8*}$	50,46	54,3
		S2A	$6,77 \times 10^8$		$4,07 \times 10^8$		60,11	
		S4A	$6,78 \times 10^8$		$3,93 \times 10^8$		57,96	
	Trasvase Tajo-Segura	S3A	$7,26 \times 10^8$		$4,04 \times 10^8$		55,64	
	Surgencia	S7A	$6,79 \times 10^8$		$3,17 \times 10^8$		46,68	
		S8A	$7,77 \times 10^8$		$4,30 \times 10^8$		55,34	
<b>Febrero 2007*</b>	Finca la Salina	S1B	$6,53 \times 10^8$	$6,1 \times 10^8$	$5,50 \times 10^8$	$4,8 \times 10^8$	84,22	78,9
		S2B	$6,08 \times 10^8$		$4,62 \times 10^8$		75,98	
		S4B	$6,26 \times 10^8$		$5,04 \times 10^8$		80,51	
	Trasvase Tajo-Segura	S3B	$5,87 \times 10^8$		$4,31 \times 10^8$		73,42	
	Surgencia	S7B	$5,79 \times 10^8$		$4,70 \times 10^8$		81,17	
		S8B	$5,94 \times 10^8$		$4,65 \times 10^8$		78,28	

\* Época de muestreo en la que hay diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con respecto al resto de las épocas. MDS: Mínima diferencia significativa

**Tabla 35.** Continuación

Época de muestreo	Zona	Muestra	Recuento de células totales (DAPI) (cel/ml)	Promedio (DAPI)	Recuento de bacterias (FITC) (cel/ml)	Promedio (FITC)	% de FITC/DAPI	Promedio (%) FITC/DAPI
Noviembre 2007	Finca la Salina	S1C	$6,71 \times 10^8$	$6,7 \times 10^8$	$4,16 \times 10^8$	$4,3 \times 10^8$	61,99	63,5
		S2C	$6,76 \times 10^8$		$4,19 \times 10^8$		61,98	
		S4C	$6,66 \times 10^8$		$4,87 \times 10^8$		73,12	
	Trasvase Tajo-Segura	S3C	$7,15 \times 10^8$		$4,28 \times 10^8$		59,86	
		Surgencia	S7C		$6,42 \times 10^8$		$4,36 \times 10^8$	
	S8C		$7,01 \times 10^8$		$3,94 \times 10^8$		56,20	
<b>Promedio</b>				$6,7 \times 10^8$		$4,3 \times 10^8$		65,6
<b>MDS</b>				0,0002		0,0026		0,0440

\* Época de muestreo en la que hay diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con respecto al resto de las épocas. MDS: Mínima diferencia significativa

## II. 2. 3. Discusión

En este estudio, los análisis que permiten obtener un “perfil genético” u “huella genética” (*fingerprinting*) mediante la técnica DGGE proporcionan un adecuado enfoque independiente del cultivo para la detección rápida y completa de las especies microbianas predominantes. Por otro lado, la técnica DGGE permite el análisis simultáneo de múltiples muestras generando patrones de diversidad y números de bandas entre todas las muestras analizadas, lo cual indica un conjunto diverso de comunidades microbianas en un complejo ecosistema (Muyzer y col., 1993).

Los resultados obtenidos a partir de los análisis de los perfiles de DGGE mediante el programa FPquest revelaron diferencias temporales (época de muestreo) en la comunidad de bacterias. El dendograma de la Figura 54 basado en la intensidad de bandas (coeficiente de Pearson) agrupó las muestras tomadas en junio de 2006 y noviembre de 2007 en un clúster y las muestras tomadas en febrero de 2007 en otro. Por el contrario, el coeficiente de Dice (Figura 55) reveló una clara separación de las tres épocas de muestreo de la comunidad de bacterias en Rambla Salada. El perfil de diversidad de bacterias obtenido en junio de 2006 se separó de manera significativa de los obtenidos en febrero y noviembre de 2007 (Figura 55), en estas épocas, los perfiles de diversidad fueron similares tanto en lo que se refiere con la presencia-ausencia de especies como con la intensidad. En este sentido, merece la pena destacar que el método de agrupamiento UPGMA realizado con el coeficiente de Pearson es más sensible a las variaciones en las intensidades relativas de las bandas (Huys y Swings, 1999). Sin embargo, para los estudios de huella genética como por ejemplo la técnica DGGE se recomienda utilizar índices más conservativos, como el coeficiente de similitud de Dice (Schwalbach y col., 2005; Hewson, 2006a y 2006b).

Aunque la utilización de los diferentes índices de similitud mostraron resultados diferentes en la agrupación de las muestras objeto de estudio, tanto el índice de Pearson como el de Dice revelaron diferencias en la comunidad de bacterias en función de la época de muestreo. Sin embargo, no fue posible establecer una relación entre el tipo de muestra y un taxón en particular. Por lo tanto, se concluye que el tipo de muestra (suelo o sedimento acuoso) o el área de estudio no influye en la agrupación de las comunidades de bacterias. Sin embargo, las muestras correspondientes a la zona de la surgencia (S7 y S8) fueron la excepción puesto que en el dendograma obtenido a partir del índice de Dice, estas muestras quedaron agrupadas en las tres épocas de muestreo. En este caso, cabe destacar que la zona de surgencia es una poza de agua sulfurosa salina de peculiares características por su alto contenido en cloruro y elevada proporción de sulfatos procedentes del yeso. Este nacimiento de agua se mantiene constante a lo largo del año y presenta una concentración de sales constante, lo cual puede ser el responsable de que la biodiversidad encontrada en esta zona sea análoga.

El estudio estadístico llevado a cabo sobre las distintas zonas y épocas de muestreo utilizando varios índices de diversidad, confirmó la relación entre las comunidades de bacterias halladas y las épocas de muestreo, siendo la comunidad de junio de 2006 la que presentó diferencias más significativas. En cuanto al  $Rr$ , las fechas de febrero y noviembre de 2007 son las que mostraron los valores más elevados ( $74,14 \pm 38,31$  y  $58,73 \pm 26,86$  respectivamente (Tabla 31). Según Marzorati y col. (2008), los valores de  $Rr$  superiores a los treinta son típicos de ambientes caracterizados por una mayor diversidad microbiana.

Resultados similares se produjeron al aplicar el índice de diversidad de *Shannon-Weaver* ( $H'$ ) (Shannon y Weaver, 1949), que tiene en cuenta el número de especies presentes en el área de estudio (riqueza de especies) y el número de individuos de cada una de esas especies (abundancia). En este caso, se detectaron los valores más altos de diversidad en las muestras tomadas en febrero y noviembre de 2007 ( $2,60 \pm 0,36$  y  $2,63 \pm 0,24$  respectivamente), estos valores superan el 2,5, lo que nos indica una alta diversidad bacteriana en Rambla Salada. Luque y col. (2013) pusieron de manifiesto datos similares cuando analizaron la diversidad de bacterias cultivables en el mismo hábitat mediante métodos tradicionales de cultivo utilizándose las mismas zonas y épocas de muestreo.

El índice de *Simpson* ( $SI$ ) fue aplicado para determinar la dominancia de las especies en una muestra basándose en el número de especies y su abundancia. Los resultados obtenidos indican que el valor más bajo de dominancia fue hallado en la época de noviembre de 2007 ( $0,09 \pm 0,02$ ). Por el contrario, en el muestreo de junio de 2006 se registraron los valores más elevados de dominancia ( $0,13 \pm 0,07$ ). De acuerdo a estos datos, pudimos de nuevo confirmar que la dominancia disminuye cuando aumenta su diversidad (Magurran y col., 1996).

Queremos resaltar que los valores más elevados de riqueza y diversidad fueron detectados en las muestras de la Finca La Salina pertenecientes a las épocas de febrero y noviembre de 2007, estas muestras se caracterizaron por presentar bajas concentraciones de sal y altas de oxígeno. Teniendo en cuenta estos resultados podemos pensar que probablemente la alta riqueza y diversidad está relacionada con las condiciones ambientales y especialmente con el contenido de sal y oxígeno. En este sentido, el análisis estadístico mediante el programa Canoco confirmó esta observación, de hecho, en dicho análisis, la salinidad y el oxígeno representaron los factores ambientales que influyen significativamente en la distribución y la composición de la comunidad de bacterias. Jiang y col. (2007) mostraron en un estudio previo, que la salinidad fue el factor dominante que influye en la composición y la estructura de la diversidad de bacterias en el lago Tíbet. Los resultados publicados por estos autores indicaron que la muestra con mayor concentración salina exhibía la menor diversidad. Otros autores registraron resultados similares (Benlloch y col., 2002).

Mediante las curvas de *Pareto-Lorenz* ( $PL$ ), se determinó la uniformidad de las comunidades bacterianas, donde la mayoría de las muestras analizadas presentaron valores medios de  $Fo$

que oscilaban entre el 40% y el 60% (Figura 59 y Tabla 33), lo que indica que las comunidades de bacterias existentes en Rambla Salada son muy equilibradas y por tanto pueden conservar su funcionalidad en cuanto a las variaciones de las condiciones ambientales (Marzorati y col., 2008). Sin embargo, las muestras tomadas de la zona de surgencia en la época de junio de 2006 y febrero de 2007 parecen tener patrones biogeográficos similares y valores de *Fo* superiores al 60%, lo que indica que la comunidad de bacterias hallada en dichas muestras es más especializada pudiendo ser más susceptible a cambios ambientales puesto que se caracteriza por la existencia de un número pequeño de miembros dominantes, mientras que el resto de los miembros está representado por pocos individuos (Marzorati y col., 2008).

En este estudio se detectaron un total de 90 clases de bandas, de las cuales se secuenciaron 67 (Figuras 54 y 55). Se observó que las secuencias identificadas pertenecen a los phyla *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* (clases *Gammaproteobacteria*, *Alfaproteobacteria* y *Betaproteobacteria*), *Firmicutes* y *Cyanobacteria* (Figura 56). Muchos autores demostraron que las bacterias son numéricamente mayoritarias en hábitats salinos e hipersalinos, siendo los tres phyla más abundantes *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Firmicutes* (Benlloch y col., 2002; Mouné y col., 2003; Dong y col., 2006; Maturrano y col., 2006a; Mesbah y col., 2007; Jiang y col., 2006 y 2007; Mutlu y col., 2008; Hollister y col., 2010; Makhdoumi-Kakhki y col., 2012b).

Las bacterias cultivables de los suelos y los sedimentos tomados de diferentes áreas de los ambientes salinos e hipersalinos pertenecen fundamentalmente al phylum *Proteobacteria* (Swan y col., 2010; Hollister y col., 2010; López-López y col., 2010; Nemergut y col., 2011; Luque y col., 2013). Si embargo, nuestros resultados revelaron que la comunidad bacteriana determinada mediante las técnicas moleculares es diferente a la encontrada con las técnicas clásicas de cultivo. Igualmente Maturrano y col. (2006a) mostraron las diferencias entre la biodiversidad estudiada por métodos moleculares y métodos clásicos. Estos autores no pudieron cultivar los grupos bacterianos dominantes en los clones cuando analizaron la diversidad procariota en las salinas de Maras en los Andes peruanos.

En este trabajo, el 37% de abundancia relativa respecto al total de la comunidad de bacterias pertenece a miembros del phylum *Bacteroidetes*, lo cual indica que es el grupo predominante en la comunidad de bacterias. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Makhdoumi-Kakhki y col. (2012b) quienes publicaron que el 59% de las secuencias identificadas en el lago Aran-Bidgol en Irán correspondían con miembros del phylum *Bacteroidetes*, siendo la mayoría de estas secuencias (40%) afiliadas con el género *Salinibacter*. En la literatura, *Salinibacter* se describe como el taxón más abundante en las salinas de Mallorca (Rosselló-Mora y col., 2003) y de Alicante (Antón y col., 1999 y 2000) y se encuentra frecuentemente en los lago hipersalinos (Maturrano y col., 2006a; Mesbah y col., 2007; Mutlu y col., 2008; Makhdoumi-Kakhki y col., 2012b). Sin embargo, en nuestro

estudio, aunque el phylum *Bacteroidetes* fue el más abundante en la comunidad de bacterias hallada en los suelos y los sedimentos acuosos de Rambla Salada, no hemos encontrado especies relacionadas con este género y todas las secuencias afiliadas con *Bacteroidetes* fueron identificadas como especies no cultivadas. Probablemente las concentraciones de sales en Rambla Salada (entre el 1,1% y el 15,8%, p/v) no son adecuadas para el desarrollo de *Salinibacter*.

Es interesante comentar que hemos determinado que la salinidad y el oxígeno influyen en la distribución de las comunidades bacterianas pertenecientes al phylum *Bacteroidetes*, que se encuentran ampliamente distribuidos en todas las zonas y épocas de muestreo, incluso en zonas de baja, media y alta concentración salina. La influencia de la salinidad y el oxígeno se comprobó mediante el análisis estadístico Canoco, que reveló que la mayoría de las secuencias afiliadas con *Bacteroidetes* se distribuyen en el cuadrante de la salinidad (Figura 61). Varios autores mostraron la dominancia de este phylum en diferentes ambientes salinos e hipersalinos (Antón y col., 1999 y 2000; Rosselló-Mora y col., 2003). Otros autores publicaron que la presencia de taxa pertenecientes al phylum *Bacteroidetes* aumenta con el incremento de la salinidad (Benlloch y col., 2002, Demergasso y col., 2004; Jiang y col., 2006).

Hemos detectado que el phylum *Proteobacteria* se clasificó el segundo en abundancia incluyendo las clases *Gammaproteobacteria*, *Alfaproteobacteria* y *Betaproteobacteria*. Se observó en el análisis estadístico mediante el programa Canoco que la salinidad y el oxígeno son los factores principales que influyen de manera significativa en las comunidades de bacterias. Wu y col. (2006) demostraron que con el incremento de la salinidad, la abundancia relativa de las especies de la clase *Betaproteobacteria* disminuye, mientras la abundancia de los taxa pertenecientes a la clase *Alfaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* se incrementa. Esta observación es concordante con otros estudios sobre aguas continentales (Bockelmann y col., 2000; Brummer y col., 2000), sistemas dinámicos como los estuarios (del Giorgio y Bouvier, 2002; Kirchman y col., 2005; Henriques y col., 2006; Zhang y col., 2006) y salinas solares (Benlloch y col., 2002). Sin embargo, en nuestro estudio los grupos bacterianos relacionados con el phylum *Proteobacteria* no mostraron dicho comportamiento, de manera que todas las secuencias relacionadas con las clases *Alfaproteobacteria* y *Betaproteobacteria* mostraron una correlación negativa con la salinidad y positiva con el oxígeno y el pH, mientras que la mayoría de las secuencias afiliadas con la clase *Gammaproteobacteria* fueron relacionadas positivamente con la salinidad. Otros autores mostraron diferentes patrones de distribución de las bacterias del phylum *Proteobacteria* a lo largo de los gradientes de salinidad, por ejemplo, Langenheder y col. (2003) demostraron que las alfaproteobacterias, betaproteobacterias y gammaproteobacterias son más abundantes en condiciones de baja salinidad. Jiang y col. (2007) publicaron en un estudio de la diversidad microbiana existente en los lagos del Tíbet en el nordeste de China, que las bacterias pertenecientes al phylum *Proteobacteria*, especialmente las de la clase



*Betaproteobacteria*, se encontraron con mayor abundancia en las zonas caracterizadas con altas concentraciones salinas; en este estudio, los autores mostraron también que la abundancia relativa de los taxa afilados con *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* no mostró variaciones a lo largo de los gradientes de salinidad.

Un aspecto interesante en la diversidad de bacterias hallada en Rambla Salada es la detección de miembros del phylum *Firmicutes*, mostrando un 12,37% de abundancia relativa respecto al total de la comunidad de bacterias. En efecto, los taxa del phylum *Firmicutes* sólo representan entre el 11% y el 25% de todos los filotipos observados en la mayoría de los lagos de agua salada y alcalina estudiados hasta el momento (Scholten y col., 2005; Jiang y col., 2006; Mesbah y col., 2007). Makhdoumi-Kakhki y col. (2012b) también detectaron un 6% de abundancia relacionada con bacterias afiladas con el phylum *Firmicutes* en el lago Aran-Bidgol en Irán. En nuestro estudio, las bandas identificadas como miembros del phylum *Firmicutes* fueron relacionadas negativamente con la salinidad, excepto la banda B30, de manera que cuando aumenta la salinidad disminuye la abundancia de este phylum. Jiang y col. (2007) apoyaron nuestros resultados, observando que la abundancia de los taxa pertenecientes al phylum *Firmicutes* era alta en las zonas caracterizadas con baja salinidad, sin embargo, dicha abundancia menor o ausente en las zonas con altas concentraciones de sal. Otros autores publicaron que las bacterias afiliadas con el phylum *Firmicutes* están ausentes en ambientes hipersalinos de elevada salinidad (Li y col., 1999., Bowman y col., 2000; Benlloch y col., 2002; Demergasso y col., 2004).

Curiosamente, un 9,13% de abundancia relativa respecto al total de la comunidad de bacterias identificada en este estudio corresponde al phylum *Cyanobacteria*. Este porcentaje es análogo al encontrado por Makhdoumi-Kakhki y col. (2012b) quienes detectaron que un 8% de los clones recuperado del lago Aran-Bidgol en Irán estaba relacionado con miembros del phylum *Cyanobacteria*.

Luque y col. (2013) sin embargo determinaron que, en Rambla Salada, en los mismos lugares y épocas de muestreo, la población bacteriana cultivada se encuentra fundamentalmente representada por miembros del phylum *Proteobacteria* y *Firmicutes* con un 72,5% y 25,8% respectivamente. Dentro de las proteobacterias, los géneros *Halomonas*, *Marinobacter* y *Bacillus* son los predominantes (40%, 13% y 13% respectivamente). Estos autores no han detectado miembros del phylum *Cyanobacteria*. Este hecho es probablemente relacionado con las condiciones de cultivo utilizadas que no eran las adecuadas para estos microorganismos.

Para determinar el número de bacterias en Rambla Salada, se llevó a cabo un análisis cuantitativo mediante la técnica CARD-FISH utilizando sondas específicas para el Dominio *Bacteria*. Los resultados obtenidos revelaron los recuentos elevados en la época de febrero de 2007 ( $4,8 \times 10^8$  células/ml) representando el 78,9% de abundancia respecto al total de las células microbianas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos mediante la técnica

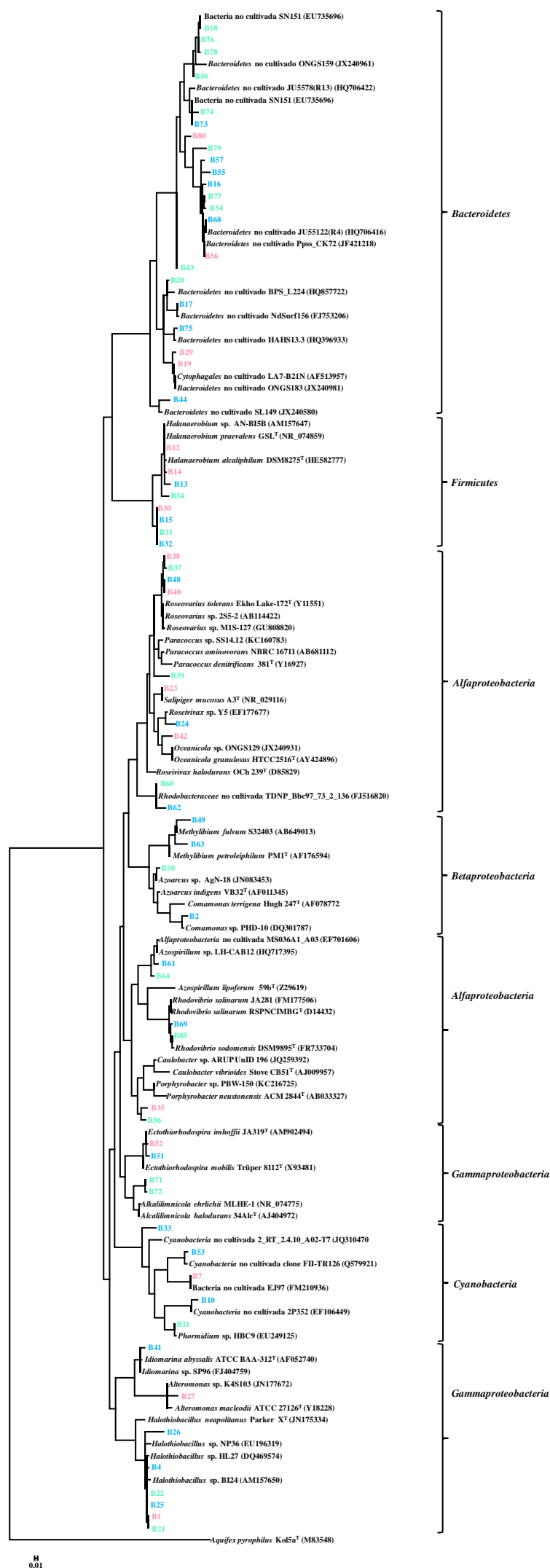
DGGE y los índices de diversidad. Merece la pena destacar que el porcentaje de abundancia relativa de la población de bacterias encontrado en Rambla Salada en las diferentes zonas y épocas de muestreo osciló entre el 54,3% y el 78,9% de la población total. El porcentaje de bacterias encontrado en Rambla Salada fue similar al encontrado por Niederberger y col. (2010) quienes analizaron la diversidad microbiana en un sedimento hipersalino en el Alto Ártico canadiense.

Por último, es de destacar que mediante la utilización de métodos moleculares para determinar la diversidad bacteriana y la aplicación de los métodos de agrupación y ordenación que permiten incluir los datos de los parámetros ambientales para analizar y evaluar el impacto de diferentes factores sobre la composición y la estructura de dicha comunidad (Besemer y col., 2005), los resultados obtenidos fueron más completos, indicando que con este estudio se logró obtener una descripción fiable de la composición de las comunidades bacterianas en los suelos y los sedimentos acuosos en Rambla Salada, los cuales son sin duda un importante reservorio de la diversidad microbiana, como se evidenció mediante los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación (Luque y col., 2013) cuando analizaron la diversidad de bacterias cultivables en las mismas zonas y épocas de muestreo.



## **Material suplementario**





**Figura 64.** Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método Maximum-Likelihood. Los números de acceso en la base de datos Genbank de las secuencias de referencia se encuentran entre paréntesis. Secuencias obtenidas en junio de 2006 (B), en febrero de 2007 (E) y en noviembre de 2007 (B)









## **II. 3. Diversidad de arqueas en Rambla Salada**



# Resumen

En este apartado se exponen los resultados obtenidos tras el análisis de la comunidad de arqueas así como la influencia de distintos parámetros ambientales, temporales y espaciales. Los resultados se han publicado recientemente en la revista *Microbial Ecology* (Oueriaghli y col., 2013); el artículo se adjunta en material suplementario.

El análisis de los perfiles de DGGE indicó que la composición de la comunidad de arqueas predominante, y de la población metabólicamente activa, se modifica en función de la época y de los sitios de muestreo. El análisis filogenético demostró que la población mayoritaria pertenece al orden *Halobacteriales* y *Thermoplasmatales*, siendo *Haloarcula* el género más abundantes. El phylum *Crenarchaeota* fue el menos abundante y fue encontrado solamente en los sitios con baja salinidad. En lo que respecta a la población de arqueas metabólicamente activa, el análisis filogenético puso de manifiesto que la mayoría de las secuencias se incluyen en el orden *Halobacteriales*, siendo también *Haloarcula* el género predominante. No se detectaron secuencias pertenecientes a *Thermoplasmatales* metabólicamente activas. El muestreo realizado en la temporada con la mayor concentración de sal (junio de 2006) fue el que presentó mayor diversidad.

El análisis de ordenación mediante el programa Canoco (ACC) demostró que la salinidad y el pH tienen un efecto significativo en la distribución de la comunidad predominante de arqueas y en las poblaciones metabólicamente activas, mientras que el oxígeno tiene una escasa influencia. La mayoría de las arqueas relacionadas con el orden *Halobacteriales* se correlacionaron positivamente con la salinidad, sin embargo, un gran número de arqueas afiliadas con el orden *Thermoplasmatales* se asociaron negativamente con el pH y la salinidad.

A través de la técnica CARD-FISH se determinó que la comunidad de arqueas representa hasta el 16% de la población total de microorganismos, siendo el recuento obtenido en junio de 2006, con valores de  $1,19 \times 10^8$  células de arqueas por ml, el más elevado.

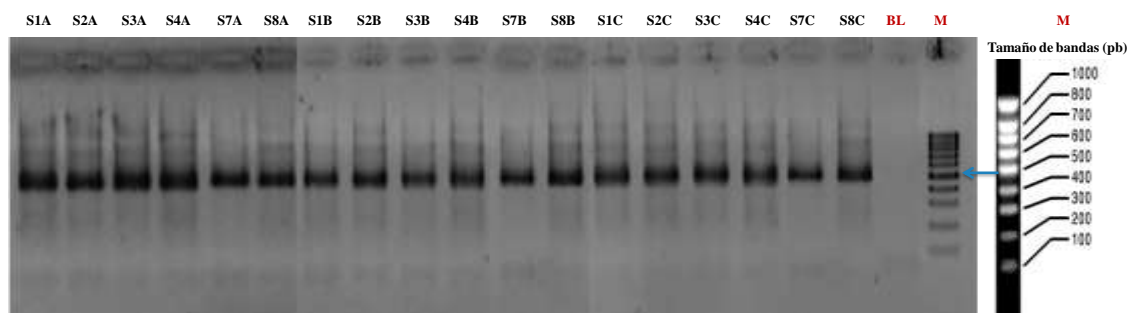
El análisis de la biodiversidad por métodos moleculares demostró que en Rambla Salada existen una serie de filotipos que no se habían encontrado previamente utilizando métodos tradicionales de cultivo. Sin embargo, *Haloarcula*, aislado en este hábitat por Luque y col. (2012a), ha sido detectada como género mayoritario tanto en los análisis realizados para determinar la población metabólicamente activa, como en los realizados para determinar la población predominante de arqueas.



## II. 3. 1. Diversidad de arqueas predominantes

### *Amplificación por PCR del gen del ARNr 16S*

Los amplicones de la población de bacterias, obtenidos con la pareja de cebadores para la amplificación del gen del ARNr 16S, se muestran en la Figura 65. Todas las muestras mostraron una banda con un tamaño de aproximadamente 500pb; no se obtuvieron bandas en los controles negativos. Todas las amplificaciones se realizaron por triplicado.



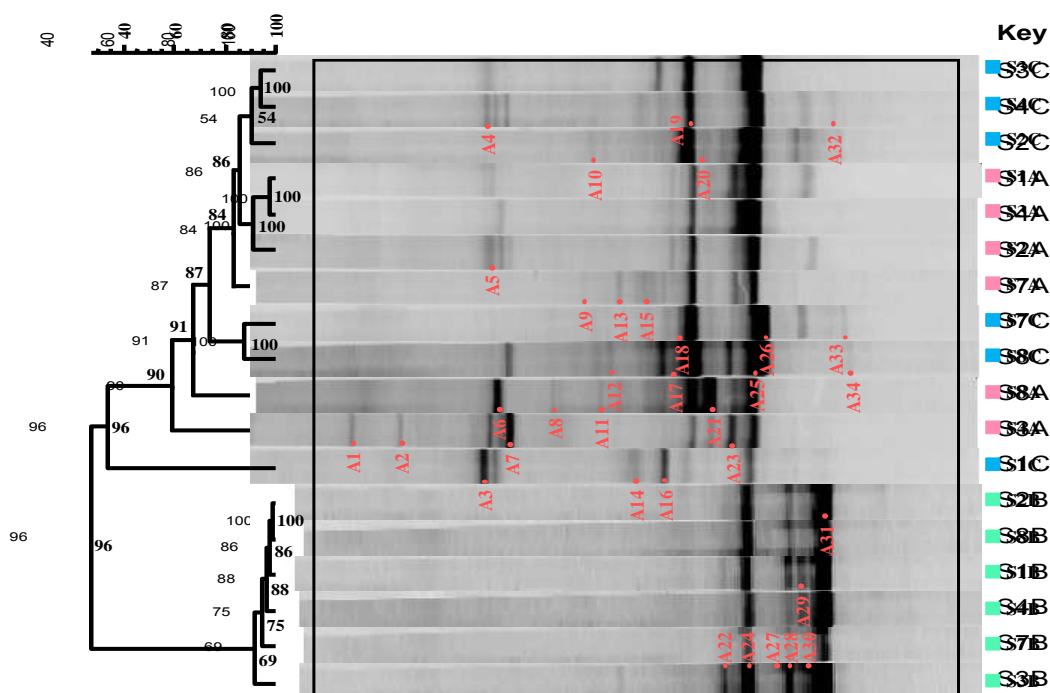
**Figura 65.** Productos de amplificación del gen del ARNr 16S (500pb). **SA:** Muestras tomadas en junio de 2006, **SB:** Muestras tomadas en febrero de 2007, **SC:** Muestras tomadas en noviembre de 2007. **M:** Marcador Molecular (1000pb). **BL:** Blanco

### *DGGE*

Los análisis de los perfiles de las bandas obtenidas por DGGE se realizaron con el programa informático FPquest. Se determinó tanto el índice de similitud cuantitativo (coeficiente de Pearson) que tiene en cuenta la intensidad de las bandas, como el índice de similitud cualitativo (coeficiente de Dice) que tiene en consideración la presencia-ausencia de bandas.

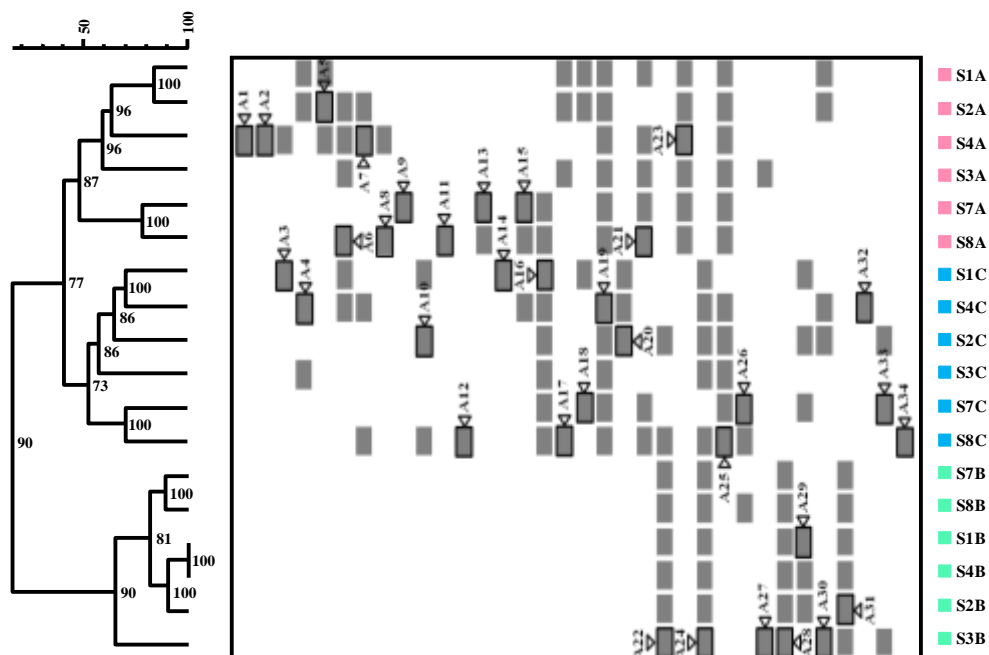
El dendograma obtenido a partir de la matriz de similitud confeccionada con el índice de Pearson se muestra en la Figura 66. El dendograma sugiere que la temporalidad (época de muestreo) es más importante que la zona de muestreo. Se obtienen dos clústers con un nivel de similitud del 27%. El primero incluye las muestras tomadas en junio de 2006 y noviembre de 2007. El segundo agrupa las muestras que se tomaron en febrero de 2007. El valor de similitud del 27% indica una baja relación entre los dos grupos de arqueas.

Por otro lado, las muestras tomadas en febrero de 2007 muestran una alta similitud (90%) entre sí, mientras que las obtenidas en junio de 2006 y noviembre de 2007 sólo mostraron el 35% de similitud.



**Figura 66.** Análisis de los perfiles de DGGE basado en el coeficiente de Pearson y el método de unión de enlace medio (UPGMA). La escala indica el porcentaje de similitud. Los números en los nodos representan los valores del coeficiente de correlación cofenético. SA ■: Muestras tomadas en junio de 2006, SB ■: Muestras tomadas en febrero de 2007, SC ■: Muestras tomadas en noviembre de 2007

El dendrograma correspondiente al análisis basado en el coeficiente de Dice (Figura 67) muestra resultados similares a los determinados mediante el coeficiente de Pearson, aunque la separación de las comunidades obtenidas en junio de 2006 y noviembre de 2007 es más clara. El perfil de la comunidad de arqueas de febrero de 2007 se separó igualmente y de manera significativa del resto de las muestras analizadas, con las que mostró una similitud de tan sólo el 16%. El resto de las muestras se segregaron en dos clústers a un nivel de similitud del 40%. El primer clúster agrupa las muestras tomadas en junio de 2006, mientras que el segundo, incluye las muestras correspondientes a la época de noviembre de 2007. Por otro lado, el dendrograma de Dice muestra también la separación de las muestras correspondientes a la zona de surgencia (S7 y S8) del resto de las muestras.



**Figura 67.** Análisis de los perfiles de DGGE basado en el coeficiente de Dice y el método de unión de enlace medio (UPGMA). La escala indica el porcentaje de similitud. Los números en los nodos representan los valores del coeficiente de correlación cofenética.  $\triangleright/\square$  Bandas cortadas, reamplificadas y secuenciadas. **SA** ■: Muestras tomadas en junio de 2006, **SB** ■: Muestras tomadas en febrero de 2007, **SC** ■: Muestras tomadas en noviembre de 2007

### Análisis de las secuencias

De un total de 34 clases de bandas (bandas marcadas en la Figura 67), se consiguió secuenciar 29. Las secuencias se compararon mediante el programa Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/)) con las secuencias depositadas en el Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para determinar su afiliación filogenética.

La Tabla 38 muestra el resultado de la identificación. La mayoría de las secuencias mostraron porcentajes superiores al 97% de identidad con las secuencias depositadas en el Genbank. Las bandas A9, A12, A20, A27 y A34 no se pudieron secuenciar. Las secuencias resultantes de las bandas de DGGE fueron depositadas en la base de datos Genbank y sus números de acceso aparecen en dicha tabla.



**Tabla 38.** Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE, (Las bandas A9, A12, A20, A27 y A34 no pudieron ser secuenciadas)

Banda	Número de acceso	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
A1	JX265978	Arquea no cultivada A103B06 (FJ455930)	97
A2	JX265979	Arquea no cultivada A103B06 (FJ455930)	97
A3	JX265980	Arquea no cultivada A103B06 (FJ455930)	100
A4	JX265981	Arquea no cultivada A103B06 (FJ455930)	99
A5	JX265982	Arquea no cultivada A103B06 (FJ455930)	99
A6	JX265983	Arquea no cultivada ET5_1E12 (EU585956)	98
A7	JX265984	Arquea no cultivada A103B06 (FJ455930)	97
A8	JX265985	Arquea no cultivada SAS_D8 (FJ655596)	99
A10	JX265986	Arquea no cultivada ss012b (AJ969749)	100
A11	JX265987	Arquea no cultivada ss012b (AJ969749)	99
A13	JX265988	<i>Natronomonas</i> sp. SA3 (JF950943)	93
A14	JX265989	Arquea no cultivada 113A21 (EF687601)	94
A15	JX265990	<i>Euryarchaeota</i> no cultivada ArcA01 (DQ103669)	98
A16	JX265991	<i>Natronomonas</i> sp. SA3 (JF950943)	90
A17	JX265992	Arquea no cultivada C8_1D8 (EU570122)	98
A18	JX265993	<i>Halosimplex carlsbadense</i> 2-9-1 <sup>T</sup> (AB072815)	93
A19	JX265994	<i>Halomicrobium zhouii</i> (HQ215546)	98
A21	JX265995	<i>Halobacterium</i> sp. SL-7 (N196520)	92
A22	JX265996	<i>Haloarcula vallismortis</i> J. F. 54 <sup>T</sup> (EF645688)	95
A23	JX265997	<i>Haloarcula salaria</i> HST01-2R (J429317)	94
A24	JX265998	<i>Haloarcula</i> sp. G41 (JN112010)	99
A25	JX265999	<i>Halorhabdus</i> sp no no cultivada (HQ110061)	97
A26	JX266000	<i>Halorhabdus utahensis</i> SFF1F051 (FN994968)	95
A28	JX266001	<i>Halorubrum</i> sp. IMCC2607 (GU367382)	99
A29	JX266002	<i>Haloterrigena</i> sp. A26 (FR690813)	98
A30	JX266003	<i>Crenarchaeota</i> no cultivada D_G08 (AY454571)	99
A31	JX266004	<i>Methanolobus taylorii</i> GS-16 (NR028238)	98
A32	JX266005	<i>Crenarchaeota</i> no cultivada D_G08 (AY454571)	99
A33	JX266006	<i>Crenarchaeota</i> no cultivada D_G08 (AY454571)	99

Una vez conocida la vinculación de las secuencias con microorganismos pertenecientes al Dominio *Archaea*, se procedió a la construcción de los árboles filogenéticos usando los métodos Neighbour-Joining y Maximum-Likelihood tal y como se mencionó en el apartado II. 10 de Material y Métodos. Además de las secuencias objeto de estudio, se incluyeron en el análisis filogenético las secuencias (aproximadamente 400pb) de las arqueas relacionadas filogenéticamente, que fueron aisladas previamente por nuestro grupo de investigación en el mismo hábitat, utilizando métodos tradicionales de cultivo (Luque y col., 2012a). Igualmente se incluyeron las secuencias de los microorganismos más similares (Tabla 38) y de las especies tipo del género al que pertenecían.

En la Figura 68 se muestra el árbol filogenético obtenido con el algoritmo Neighbour-Joining, en el cual se puede observar como todas las secuencias obtenidas de este estudio se distribuyen claramente en dos clústers correspondientes a los phyla *Euryarchaeota* y *Crenarchaeota*. A su vez, las secuencias pertenecientes al phylum *Euryarchaeota* se dividen en tres clústers que se afilian con los órdenes *Halobacteriales*, *Methanosarcinales* y *Thermoplasmatales* no cultivados; este último orden incluye las arqueas marinas bentónicas del grupo D (*MBGD*) y arqueas marinas del grupo III (*MGIII*).

El árbol filogenético obtenido mediante el algoritmo Maximum-Likelihood mostró una topología similar (véase el apartado de material suplementario).



**Figura 68.** Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método Neighbour-Joining. Los números de acceso en la base de datos Genbank de las secuencias de referencia se encuentran entre paréntesis. Se indican los valores de “bootstrap” mayores del 50%. ★ Secuencias de las arqueas aisladas por Luque y col. (2012a). Secuencias obtenidas en junio de 2006 (A), febrero de 2007 (A) y noviembre de 2007 (A)

La Figura 69 muestra la abundancia relativa de todas las secuencias identificadas en las tres épocas de muestreo de Rambla Salada. El phylum *Euryarchaeota* constituye el grupo predominante y engloba el 96,42% de la diversidad total obtenida en los tres muestreos, mientras que las secuencias correspondientes al phylum *Crenarchaeota* incluyen el 2,77% del total de la comunidad.

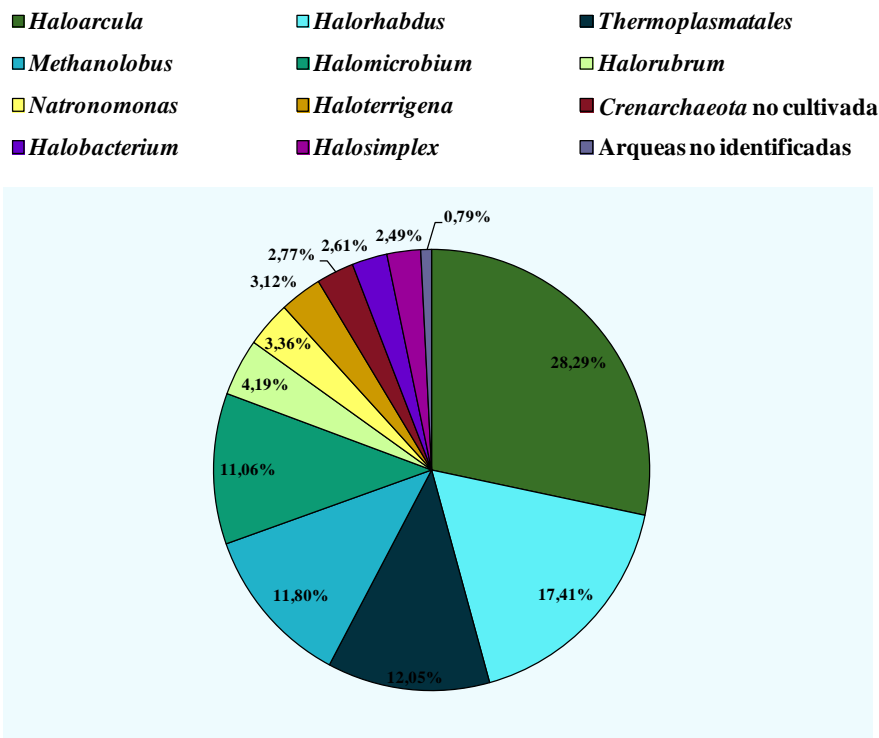


Figura 69. Abundancia relativa de arqueas en los tres muestreos

Dentro del phylum *Euryarchaeota*, el 72,56% de las secuencias se relacionan con el orden *Halobacteriales*, siendo el género *Haloarcula* el grupo mayoritario (28,29%), seguido por los géneros *Halorhabdus*, *Halomicrobium*, *Halorubrum*, *Natronomonas*, *Haloterrigena*, *Halobacterium* y *Halosimplex*. El orden *Methanosarcinales*, por su parte, incluyó un solo género, el género *Methanolobus*, con el 11,80% del total de la diversidad. Las secuencias identificadas como filotipos del orden *Thermoplasmatales* presentaron una abundancia bastante alta (12,05%). Por otro lado, cabe destacar que las secuencias que no pudieron ser identificadas presentaron sólo el 0,79% respecto al total de la comunidad de arqueas.

La Figura 70 muestra la abundancia relativa de los grupos taxonómicos (intensidad de las bandas de DGGE) identificados en las tres épocas en los que se hicieron los muestreos.

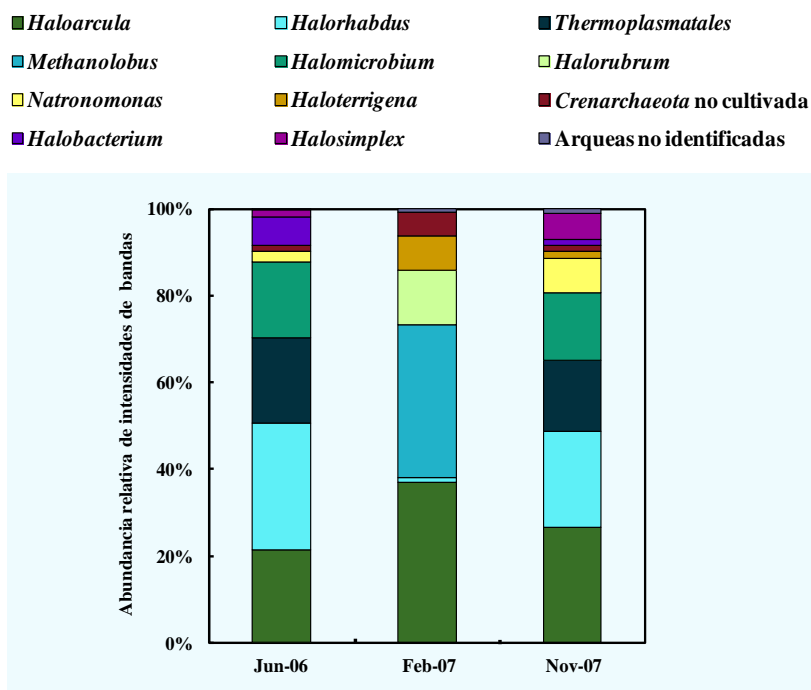


Figura 70. Abundancia relativa de arqueas en cada época de muestreo

En la Tabla 39 se detalla la abundancia relativa de los grupos taxonómicos (bandas de DGGE) en las tres épocas en las que se llevaron a cabo los muestreos. Algunos grupos taxonómicos estuvieron presentes en los tres muestreos, como es el caso del género *Haloarcula* y *Halorhabdus*. El primero (bandas A22, A23 y A24) se encuentra con mayor abundancia (37,06%) en las muestras tomadas en febrero de 2007, mientras que alcanza valores más bajos en las épocas de noviembre de 2007 y junio de 2006 (26,54% y 21,28% respectivamente). El género *Halorhabdus* (bandas A25 y A26) presentó mayor abundancia en junio de 2006 y noviembre de 2007 (29,25% y 22,11% respectivamente); sin embargo los valores fueron más bajos en febrero de 2007 (0,84%). Otros grupos taxonómicos sólo se encuentran en dos muestreos o en algunos casos en uno de ellos, como es el caso de los géneros *Halorubrum* y *Methanolobus*. Ambos géneros (bandas A28 y A31) presentaron el 12,58% y 35,43% respectivamente del total de la abundancia y se hallaron únicamente en febrero de 2007. Los géneros *Halobacterium* (banda A21), *Halomicrobium* (banda A19), *Halosimplex* (banda A18) y *Natronomonas* (banda A13 y A16) presentaron un porcentaje que osciló entre el 1,29% y el 17,55%.

Es interesante comentar que las secuencias afiliadas al orden *Thermoplasmatales* (bandas A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A10, A11, A14, y A17) y la banda A15 se detectaron únicamente en junio de 2006 y noviembre de 2007 (19,76% y 16,38% respectivamente). Por su parte, las bandas A30, A32 y A33 asignadas al phylum *Crenarchaeota* mostraron poca intensidad y fueron detectadas en las tres épocas en zonas con baja salinidad. Las bandas A9, A12, A20, A27 y A34 fueron detectadas en los tres muestreos pero no pudieron ser secuenciadas.

**Tabla 39.** Abundancia relativa (en %) de los grupos taxonómicos (intensidad de bandas de DGGE) identificados en las tres épocas de muestreo

Grupos taxonómicos	Junio 2006	Febrero 2007	Noviembre 2007
<i>Haloarcula</i>	21,28	37,06	26,54
<i>Halorhabdus</i>	29,25	0,84	22,11
<i>Thermoplasmatales</i>	19,76	0,00	16,38
<i>Methanobolus</i>	0,00	35,43	0,00
<i>Halomicrobium</i>	17,55	0,00	15,61
<i>Halorubrum</i>	0,00	12,58	0,00
<i>Natronomonas</i>	2,20	0,00	7,88
<i>Haloterrigena</i>	0,00	7,88	1,50
<i>Crenarchaeota</i> no cultivada	1,61	5,25	1,46
<i>Halobacterium</i>	6,54	0,00	1,29
<i>Halosimplex</i>	1,43	0,00	6,05
Arqueas no identificadas	0,34	0,92	1,12

### Índices de diversidad

Con la finalidad de comparar la diversidad de arqueas encontrada en las distintas zonas y épocas de muestreo, se aplicaron los índices de diversidad descritos anteriormente en el apartado III. 2 de Material y Métodos. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

### Rango ponderado de la riqueza (Rr)

Tal y como se describió anteriormente, el rango ponderado de la riqueza se determinó multiplicando el número de bandas en una muestra (carril de DGGE) por el

gradiente desnaturalizante entre la primera y la última banda del carril de DGGE. En la Tabla 40 se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 40.** Rango ponderado de la riqueza (*Rr*) en cada sitio y época de muestreo

Época	Zona	Muestra	Nº de bandas	<i>Rr</i>	Promedio	
<b>Junio 2006</b>	Finca la salina	S1A	9	14,83	12,73 ± 2,36	
		S2A	10	14,83		
		S4A	11	13,69		
	Trasvase Tajo-Segura	S3A	7	10,86		
		Surgencia	S7A	8		9,62
			S8A	10		12,55
<b>Febrero 2007*</b>	Finca la salina	S1B	5	2,33	2,72 ± 0,88	
		S2B	6	3,22		
		S4B	8	3,95		
	Trasvase Tajo-Segura	S3B	5	2,33		
		Surgencia	S7B	4		2,16
			S8B	5		2,33
<b>Noviembre 2007</b>	Finca la salina	S1C	9	14,44	8,91 ± 1,78	
		S2C	10	13,96		
		S4C	5	3,20		
	Trasvase Tajo-Segura	S3C	11	6,98		
		Surgencia	S7C	8		4,96
			S8C	12		9,96
<b>MDS</b>					0,0155	

\* Época de muestreo en la que hay diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con respecto al resto de las épocas. MDS: Mínima diferencia significativa

El promedio del número de bandas por muestra fue 8, con un mínimo de 4 bandas, encontrado en la muestra correspondiente a la zona de la surgencia (S7) tomada en febrero de 2007, y un máximo de 12 bandas, en la misma zona (S8), tomada en noviembre de 2007. Los valores medios de riqueza oscilaron entre el  $2,72 \pm 0,88$  en las muestras tomadas en febrero de 2007 y  $12,73 \pm 2,36$  en junio de 2006 (Tabla 40). Estos datos sugieren que el muestreo con mayor riqueza de especies es el de junio de 2006 mostrando valores medios de

riqueza ( $10 < Rr < 30$ ), mientras que los valores obtenidos en las épocas de noviembre y febrero de 2007 fueron más bajos.

El análisis de varianza (ANOVA) de los datos de riqueza mostró diferencias entre las tres épocas de muestreo ( $MDS = 0,0155$ ), siendo el de febrero de 2007 el más distinto respecto al resto de las épocas ( $p \leq 0,05$ ), mientras que, a nivel espacial (zona de muestreo) no hubo diferencias significativas.

### Índices de Shannon-Weaver y de Simpson

La Tabla 41 muestra los valores de los índices de diversidad de *Shannon-Weaver* ( $H'$ ) y de *Simpson* ( $SI$ ) obtenidos en cada zona y época de muestreo. En este análisis se evaluó la diversidad mediante la relación entre el número de bandas en cada muestra y sus respectivas intensidades; para ello se utilizó la matriz de datos obtenida mediante el análisis de los perfiles de DGGE (Tabla 52 de material suplementario). Los valores del análisis ANOVA para determinar las diferencias significativas de diversidad y dominancia entre los tres muestreos analizados se indican en la Tabla 41.

**Tabla 41.** Índices de *Shannon-Weaver* y *Simpson* en cada sitio y época de muestreo

Época	Zona	Muestra	$H'$	Promedio	$SI$	Promedio	
<b>Junio 2006</b>	Finca la Salina	S1A	1,75	$1,82 \pm 0,43$	0,24	$0,19 \pm 0,05$	
		S2A	2,01		0,20		
		S4A	2,13		0,13		
	Trasvase Tajo-Segura	S3A	1,33		0,28		
		Surgencia	S7A		1,80		0,14
			S8A		1,90		0,17
<b>Febrero 2007*</b>	Finca la Salina	S1B	1,48	$1,46 \pm 0,21$	0,24	$0,27 \pm 0,05$	
		S2B	1,53		0,25		
		S4B	1,49		0,24		
	Trasvase Tajo-Segura	S3B	1,74		0,24		
		Surgencia	S7B		1,14		0,37
			S8B		1,34		0,30



Tabla 41. Continuación

Época	Zona	Muestra	$H'$	Promedio	$SI$	Promedio	
<b>Noviembre 2007</b>	Finca la Salina	S1C	1,77	1,76 ± 0,22	0,19	0,20 ± 0,05	
		S2C	1,74		0,22		
		S4C	1,80		0,23		
	Trasvase Tajo-Segura	S3C	1,49		0,24		
		Surgencia	S7C		1,63		0,24
			S8C		2,16		0,13
<b>MDS</b>				0,0413	0,046		

\* Época de muestreo en la que hay diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con respecto al resto de las épocas. MDS: Mínima diferencia significativa

Teniendo en cuenta la diversidad de forma global, de las tres épocas de muestreo, la fecha en la que se obtuvo mayor diversidad fue la de junio de 2006 con un índice de *Shannon-Weaver* ( $H'$ ) de  $1,82 \pm 0,43$ . Respecto al índice de *Simpson* ( $SI$ ), que refleja la dominancia de las comunidades de arqueas, y que es inverso al de *Shannon-Weaver*, el valor más bajo fue el de dicha época,  $0,19 \pm 0,05$ .

Al aplicar un análisis ANOVA de comparación a los resultados obtenidos, se encontraron diferencias significativas en la diversidad y la dominancia de arqueas entre las tres épocas en las que se tomaron los muestreos, siendo el de febrero de 2007 el más distinto. Por el contrario, no se detectaron diferencias significativas entre las zonas estudiadas.

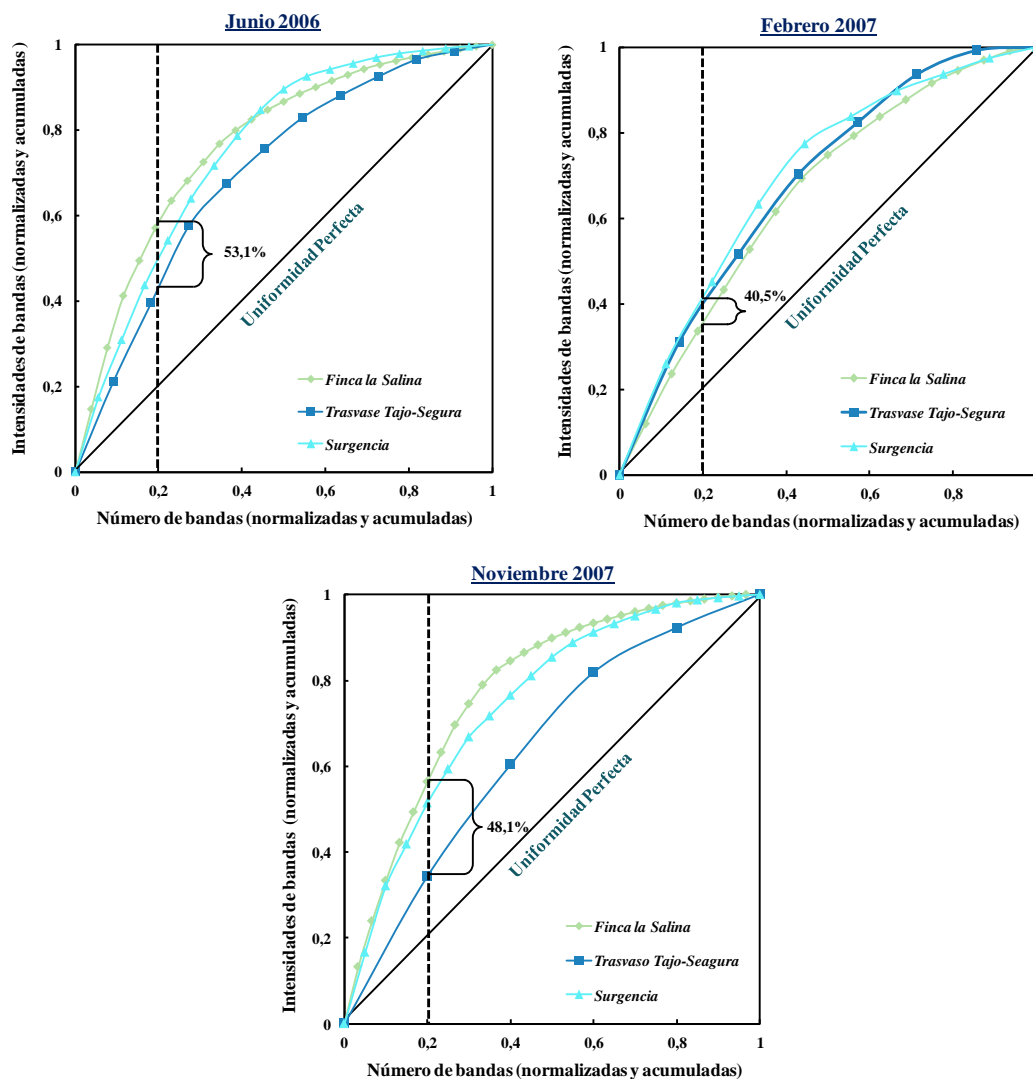
### Organización funcional ( $F_o$ )

Con la finalidad de determinar la organización funcional ( $F_o$ ) o la uniformidad de las comunidades de arqueas, se construyeron las curvas de distribución de *Pareto-Lorenz* ( $PL$ ) de las muestras tomadas en las tres épocas.

En la Figura 71 podemos observar como en la época de junio de 2006, el 20% del número de bandas (acumuladas y normalizadas) presentó los valores de  $F_o$  (intensidades de las bandas acumuladas y normalizadas) de 62,14%, 45% y 52,14% (53,1% en promedio) en las zonas de la Finca la Salina, el canal Trasvase Tajo-Segura y la surgencia respectivamente (Tabla 42).

En febrero de 2007, se obtuvieron los valores de  $F_o$  de 36,92%, 41,53% y 43,07% (40,5% de promedio) para el 20% de las bandas obtenidas en las zonas de la Finca la Salina, el canal Trasvase Tajo-Segura y la surgencia respectivamente. Por su parte, el 20% de las bandas

representó el 57,14%, 35% y el 52,14 % (48,1% de promedio) de intensidad acumulada ( $F_0$ ) en las muestras tomadas en noviembre de 2007.



**Figura 71.** Curvas de distribución de *Pareto-Lorenz* basadas en los perfiles de DGGE. La proyección de la línea vertical del valor 0,2 del eje X se utiliza para determinar los valores de  $F_0$

En términos generales, se observó que el valor medio de  $F_0$  obtenido en junio de 2006 fue superior respecto al resto de las épocas de muestreo. Por otra parte, la comunidad de arqueas encontrada en la zona de la Finca la Salina en esa fecha resultó ser la más específica y menos uniforme, puesto que el valor de  $F_0$  obtenido superó el 60%, es decir, el 20% de las bandas de esa muestra representaban el 62,14% de las intensidades de todas las bandas (Tabla 42).

Tabla 42. Valores de  $F_o$  (en %) obtenidos en cada zona y época de muestreo

Época	Zona	$F_o$	Promedio
<b>Junio 2006</b>	Finca la Salina	62,14	53,10
	Trasvase Tajo-Segura	45,00	
	Surgencia	52,14	
<b>Febrero 2007*</b>	Finca la Salina	36,92	40,50
	Trasvase Tajo-Segura	41,53	
	Surgencia	43,07	
<b>Noviembre 2007</b>	Finca la Salina	57,14	48,10
	Trasvase Tajo-Segura	35,00	
	Surgencia	52,14	
<b>MDS</b>			0,0162

\* Época de muestreo en la que hay diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con respecto al resto de las épocas. MDS: Mínima diferencia significativa

Para detectar entre qué sitios y época de muestreo había una diferencia significativa de los datos de  $F_o$ , se llevó a cabo un análisis ANOVA, que permitió determinar los valores de  $F_o$  significativos ( $p \leq 0,05$ ). Los resultados obtenidos indicaron que los datos correspondientes a febrero de 2007 fueron los que presentaron diferencias significativas con respecto a junio de 2006 y noviembre de 2007. Sin embargo, a nivel espacial, el análisis de ANOVA no mostró diferencias significativas.

### *Influencia de los factores ambientales en la diversidad de arqueas*

Con la finalidad de determinar la influencia de los factores ambientales en la comunidad de arqueas, se aplicó un análisis de correspondencia sin tendencias (ACD) a la matriz cualitativa de datos de las especies de arqueas (Tabla 51 de material suplementario). Este análisis mostró que la longitud del gradiente (4,277) sugiere una respuesta unimodal de las especies de arqueas frente a las variables ambientales, por lo que se aplicó un análisis de correspondencia canónica (ACC).

Los resultados del análisis estadístico mediante el programa Canoco se muestran en la Tabla 43. Los dos primeros ejes de ordenación canónica (1 y 2) explicaron el 9,5% y el 16,6% respectivamente de la variabilidad en la composición de las comunidades de arqueas.

Por su parte, el primer eje explicó el 46,1% de la variabilidad de la relación especies-variables ambientales y el segundo explicó el 80,3% de dicha variabilidad acumulada con la

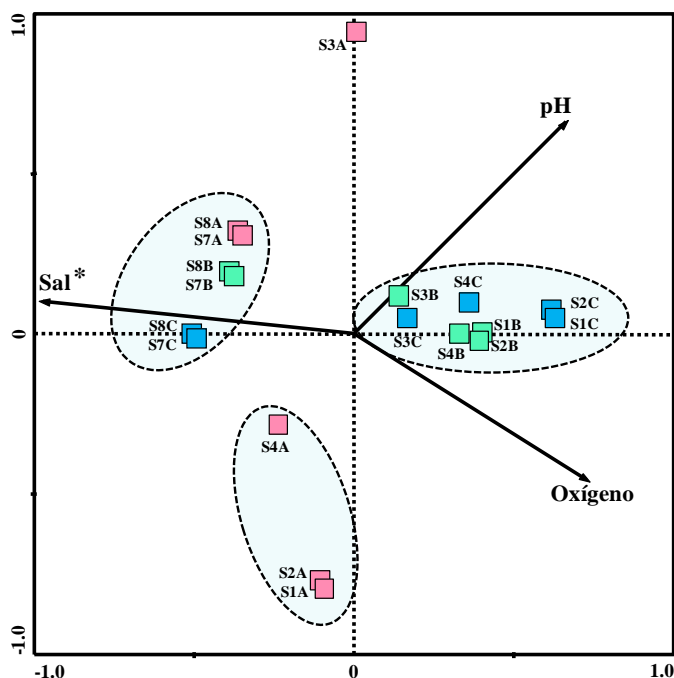
del primer eje, es decir, el 80,3% del total de la variabilidad está representada en los dos primeros ejes del ACC. Cuando se evaluó el efecto de cada variable ambiental, se encontró una alta correlación de la salinidad (*Monte Carlo*,  $F = 1,67$ ,  $P = 0,04$ ). La correlación de las variables ambientales se considera significativa si presenta valores inferiores a 0,05.

**Tabla 43.** Valores del análisis estadístico Canoco

Ejes de ordenación	1	2	3	Inercia total
Valores propios (eigenvalor)	0,283	0,209	0,121	
Correlación especies-variables ambientales	0,873	0,837	0,698	
Porcentaje acumulado de la variabilidad de especies	9,5	16,6	20,7	2,965
Porcentaje acumulado de la variabilidad de la relación especies-variables ambientales	46,1	80,3	100,0	

La fuerza del análisis canónico se reveló mediante los valores propios (eigenvalor), los cuales son 0,283 y 0,209 en el primero y el segundo eje respectivamente, siendo la inercia total de los valores propios igual a 2,965 (Tabla 43). Teniendo en cuenta los valores de correlación entre las especies de arqueas y los factores ambientales, se observó una alta correlación entre las mismas y las variables ambientales, según el coeficiente de correlación obtenido (0,873 y 0,837 respectivamente) en los primeros dos ejes de ordenación.

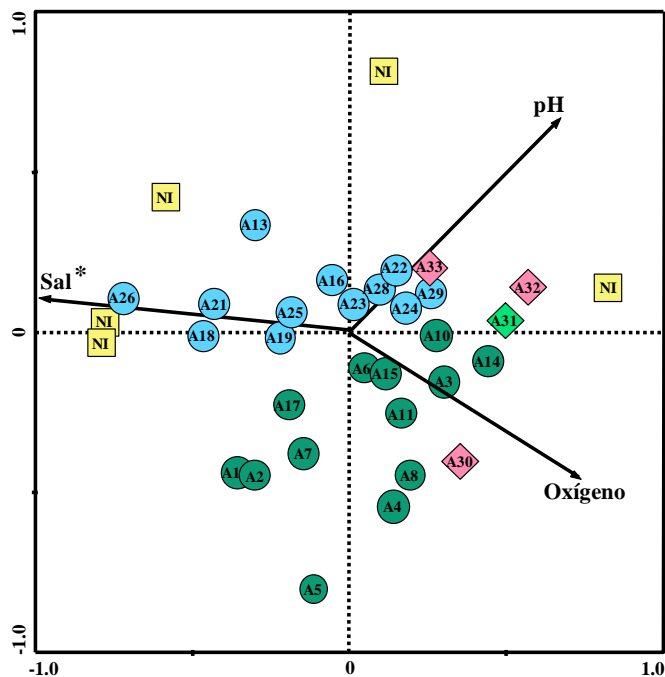
En la representación gráfica (Biplot) del ACC, que se muestra en la Figura 72, se representa el análisis de correlación de la diversidad de las zonas y épocas de muestreo respecto a sus parámetros físico-químicos. La ordenación de los sitios y épocas de muestreo de acuerdo a los ejes 1 y 2 resultó ser la que mejor segregó a los sitios de muestreo entre sí y permitió distinguir tres grupos diferentes basados en la composición de sus comunidades. El primer grupo incluye las muestras que provienen de la zona de la surgencia (S7 y S8) de las tres épocas de muestreo. Dado que estas muestras se encuentran más cerca del eje que representa la sal, se deduce una alta correlación positiva entre esta zona y la salinidad, de hecho la zona de surgencia se caracteriza por su alta concentración de sal (Tabla 28), entorno al 15% (p/v).



**Figura 72.** Biplot de la ordenación ACC, basado en los datos cualitativos generados por DGGE, que representa la correlación entre los factores ambientales y zonas y épocas de muestreo. **SA** ■: Muestras tomadas en junio de 2006, **SB** ■: Muestras tomadas en febrero de 2007, **SC** ■: Muestras tomadas en noviembre de 2007. (S1, S2 y S4: Finca la Salina, S3: Canal Traslase Tajo-Segura, S7 y S8: Surgencia). Las flechas indican el sentido de correlación de las variables ambientales (sal, oxígeno y pH). Las variables ambientales marcadas con el símbolo \* son significativas ( $p \leq 0,05$ )

El segundo grupo asocia las muestras correspondientes a la zona de la Finca la Salina y la del canal Traslase Tajo-Segura, tomadas en febrero y noviembre de 2007. La posición de estas muestras en el diagrama de la Figura 72 muestra su correlación positiva con el pH y el oxígeno y negativa con la salinidad (están en la parte opuesta de la flecha de la salinidad). El tercer grupo incluye las muestras que fueron tomadas de la zona de la Finca la Salina en junio de 2006, correlacionándose ligeramente y de forma positiva con la salinidad y el oxígeno, y negativamente con el pH. Cabe mencionar que la muestra S3A que proviene del canal traslase Tajo-Segura del mismo muestreo mostró un comportamiento diferente respecto a todas las muestras, por lo que no se ha tenido en consideración en nuestra interpretación de los resultados.

La Figura 73 muestra la ordenación de las comunidades de arqueas en base a la matriz de presencia-ausencia de bandas (Tabla 51 de material suplementario) y los factores ambientales (sal, oxígeno y pH).



**Figura 73.** Biplot de la ordenación ACC, basado en los datos cualitativos generados por DGGE, que representa la correlación entre los factores ambientales y las comunidades de arqueas. ●: *Thermoplasmatales* ●: *Halobacteriales* ◆: *Methanosarcinales* ◆: *Crenarchaeota* ■: Arqueas no identificadas. Las flechas indican el sentido de correlación de las variables ambientales (sal, oxígeno y pH). Las variables ambientales marcadas con el símbolo \* son significativas ( $p \leq 0,05$ )

El análisis ACC indicó una correlación significativa y positiva del eje 1 con la concentración de sal. El eje 2 correlacionó positivamente la flecha que representa el pH. En esta figura se observa una correlación significativamente positiva entre la sal y las especies pertenecientes a los géneros *Halorhabdus* (bandas A25 y A26), *Halobacterium* (banda A21), *Halomicrobium* (banda A19), *Halosimplex* (banda A18) y *Natronomonas* (bandas A13 y A16). Sin embargo, los géneros *Halorubrum* (banda A28), *Haloterrigena* (banda A29) y *Haloarcula* (bandas A22, A23 y A24) mostraron una correlación positiva con el pH. Por otro lado, la mayoría de las secuencias afiliadas con el orden *Thermoplasmatales* se correlacionaron negativamente con el pH. Las bandas A1, A2, A7, A17 se agruparon en el cuadrante inferior izquierdo situado en el sentido contrario de la flecha que representa el pH, mientras que las bandas A3, A4, A6, A8, A10, A11, A14 se distribuyen más próximas a la flecha que representa el oxígeno y en el sentido contrario de la flecha de la salinidad, por lo que este último grupo mostró una correlación negativa con la salinidad y positiva con el oxígeno.

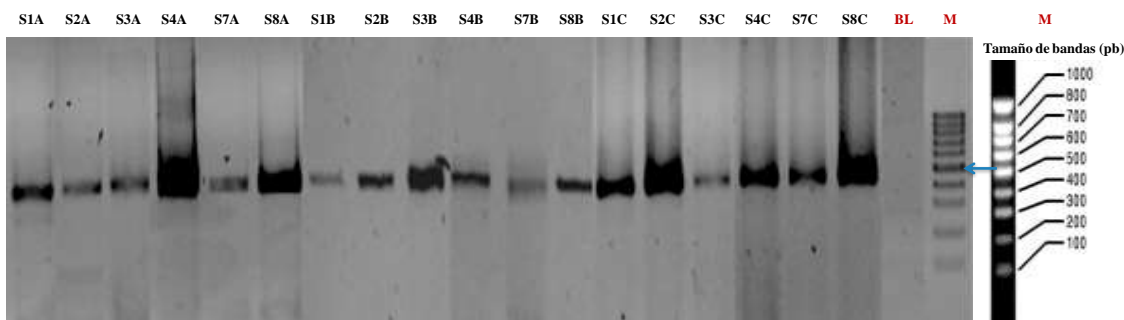
Como se puede apreciar en el diagrama de la Figura 73, las especies pertenecientes al phylum *Crenarchaeota* (bandas A30, A32 y A33) mostraron también una correlación

negativa con la sal, de hecho, estas bandas se encontraron en zonas de baja salinidad. Basándose en el nivel del 5% en el test de permutación de *Monte Carlo*, la sal representa el factor ambiental que influye más significativamente ( $p \leq 0,05$ ) en la composición de las comunidades de arqueas.

## II. 3. 2. Diversidad de arqueas metabólicamente activas

### *Amplificación por RT-PCR del gen del ARNr 16S*

Con la finalidad de determinar la población de arqueas metabólicamente activas presente en Rambla Salada, se extrajo el ARN de las muestras y se realizó una RT-PCR para amplificar el gen del ARNr 16S. Concretamente, se amplificó la región hipervariable V3-V6 después de pasar el ARN a ADNc con la transcriptasa reversa. Los productos de la amplificación de las distintas zonas y épocas se muestran en la Figura 74. En todos los casos se obtuvieron productos de amplificación de aproximadamente 500pb.



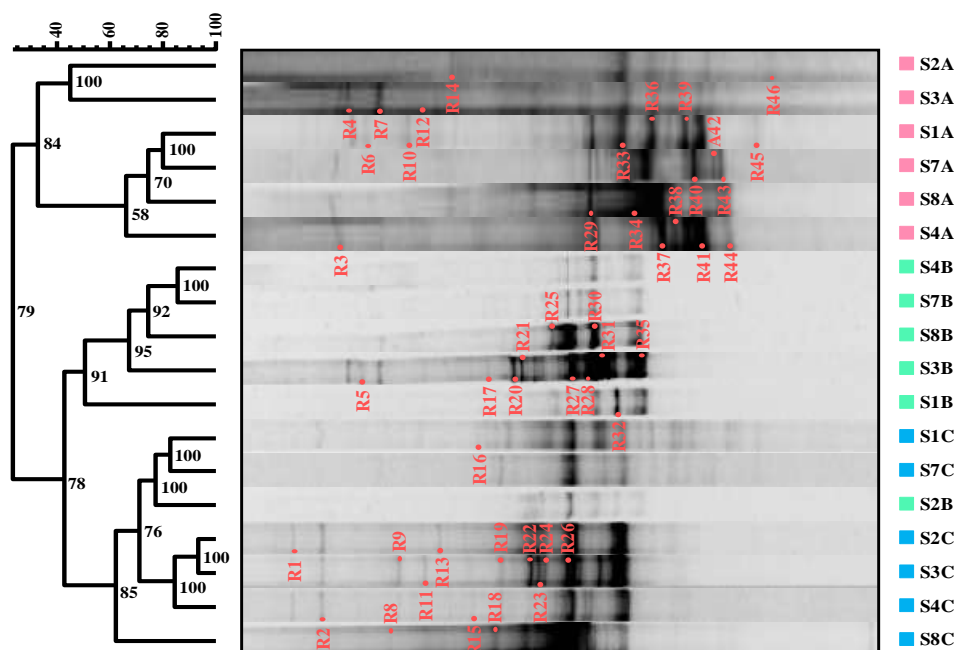
**Figura 74.** Productos de amplificación por RT-PCR del gen del ARNr 16S (500pb). **SA:** Muestras tomadas en junio de 2006, **SB:** Muestras tomadas en febrero de 2007, **SC:** Muestras tomadas en noviembre de 2007. **M:** Marcador Molecular (1000pb). **BL:** Blanco

### *DGGE*

La estructura de la población de arqueas metabólicamente activas fue analizada mediante DGGE.

Se observó que los perfiles obtenidos cambiaron considerablemente según la época de muestreo. El análisis de clúster mediante el coeficiente de Pearson, que tiene en cuenta las intensidades de bandas, mostró que a un nivel de semejanza del 25% se obtienen dos clústers, uno agrupa el muestreo realizado en junio de 2006 y el segundo incluye las muestras tomadas en febrero y noviembre de 2007 y que a su vez presentaron más del 40%

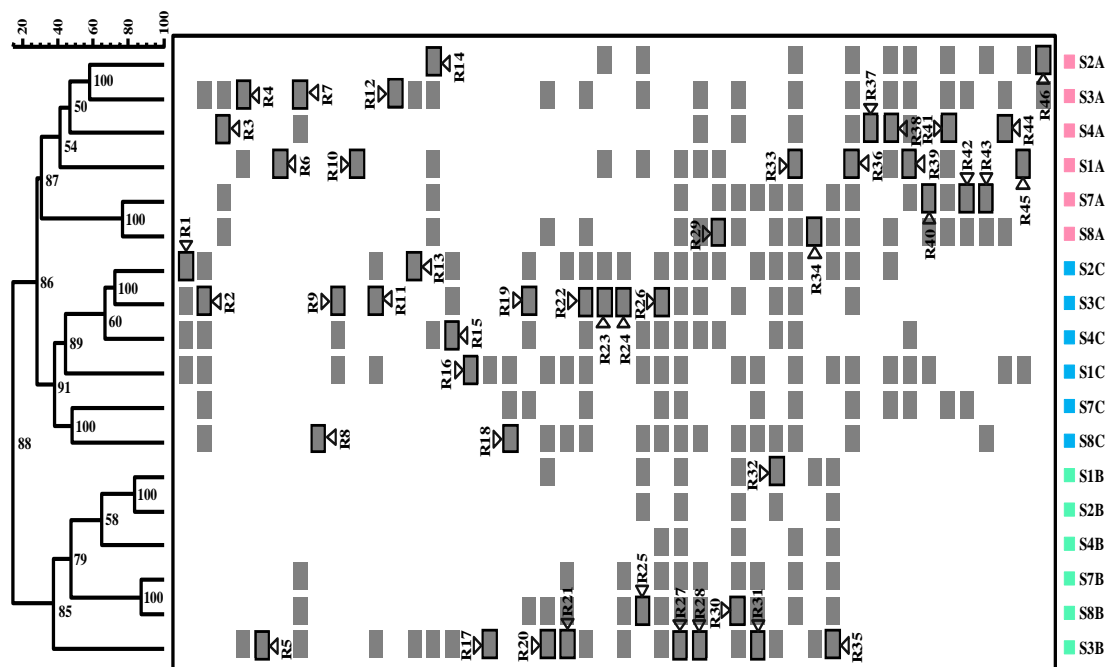
de similitud entre sí. Por otra parte, el dendograma demostró que no existía agrupación por zonas de muestreo (Figura 75).



**Figura 75.** Análisis de los perfiles de DGGE basado en el coeficiente de Pearson y el método de unión de enlace medio (UPGMA). La escala indica el porcentaje de similitud. Los números en los nodos representan los valores del coeficiente de correlación cofenético. **SA** ■: Muestras tomadas en junio de 2006, **SB** ■: Muestras tomadas en febrero de 2007, **SC** ■: Muestras tomadas en noviembre de 2007

El análisis de los perfiles de DGGE, mediante el coeficiente de Dice (Figura 76), mostró igualmente diferencias claras entre las comunidades de arqueas dependiendo de la fecha de muestreo. A un nivel de semejanza del 15% se obtuvieron tres clústers correspondientes a las tres épocas de muestreo. Por otra parte, el dendograma obtenido tras aplicar el coeficiente de Dice (presencia-ausencia de bandas) indicó que las muestras de la surgencia quedaban agrupadas en las tres épocas analizadas.





**Figura 76.** Análisis de los perfiles de DGGE basado en el coeficiente de Dice y el método de unión de enlace medio (UPGMA). La escala indica el porcentaje de similitud. Los números en los nodos representan los valores del coeficiente de correlación coefenético. >/< Bandas cortadas, reamplificadas y secuenciadas. **SA** ■: Muestras tomadas en junio de 2006, **SB** ■: Muestras tomadas en febrero de 2007, **SC** ■: Muestras tomadas en noviembre de 2007

### Análisis de las secuencias

Los resultados del análisis de las secuencias del gen del ARNr 16S de las bandas del DGGE se muestran en la Tabla 44.

**Tabla 44.** Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE, (Las bandas R6, R15, R16, R17, R42 y R46 no pudieron ser secuenciadas)

Banda	Número de acceso	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
<b>R1</b>	KC659957	<i>Methanosaeta</i> sp. LA_48 (JX088310)	96
<b>R2</b>	KC659958	<i>Halorussus rarus</i> TBN4 (GQ282618)	97
<b>R3</b>	KC659959	Haloarquea no cultivada Phy43Medsalt2C8 (FJ476778)	99
<b>R4</b>	KC659960	Haloarquea no cultivada Phy43Medsalt2C8 (FJ476778)	99

Tabla 44. Continuación

Banda	Número de acceso	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
R5	KC659961	<i>Halorussus rarus</i> TBN4 (GQ282618)	97
R7	KC659962	Haloarquea no cultivada Phy43Medsalt2C8 (FJ476778)	99
R8	KC659963	Haloarquea no cultivada Phy43Medsalt2C8 (FJ476778)	97
R9	KC659964	<i>Halorussus rarus</i> TBN4 (GQ282618)	97
R10	KC659965	<i>Crenarchaeota</i> no cultivada EI_B10 (AY454687)	92
R11	KC659966	<i>Halorussus rarus</i> TBN4 (GQ282618)	96
R12	KC659967	Haloarquea no cultivada Phy43Medsalt2C8 (FJ476778)	99
R13	KC659968	<i>Halorussus rarus</i> TBN4 (GQ282618)	96
R14	KC659969	Haloarquea no cultivada Phy43Medsalt2C8 (FJ476778)	100
R18	KC659970	Haloarquea no cultivada Phy43Medsalt2C8 (FJ476778)	99
R19	KC659971	<i>Halolamina</i> sp. WSY15-H3 (JX192605)	96
R20	KC659972	<i>Halolamina</i> sp. WSY15-H3 (JX192605)	98
R21	KC659973	<i>Halobacterium</i> sp. SL-6 (JN196519)	91
R22	KC659974	<i>Halobacterium</i> sp. SL-6 (JN196519)	93
R23	KC659975	<i>Haloarcula marismortui</i> rrnB HH10 (X61689)	99
R24	KC659976	<i>Haloarcula argentinensis</i> M2-7a (HQ659136) ★	96
R25	KC659977	<i>Haloarcula</i> sp. MGG3 (GU361138)	95
R26	KC659978	<i>Haloarcula</i> sp. G41 (JN112010)	99
R27	KC659979	<i>Haloarcula</i> sp. MGG2 (GU361137)	94
R28	KC659980	<i>Halomicrobium zhouii</i> (HQ215546)	95
R29	KC659981	<i>Halobaculum gomorrense</i> ATCC 700876 <sup>T</sup> rrnA (AB477982)	96
R30	KC659982	<i>Haloarcula</i> sp. G41 (JN112010)	99
R31	KC659983	<i>Halorhabdus</i> sp. DS75-R1 (JN196513)	95
R32	KC659984	<i>Haloterrigena hispanica</i> FP1 (NR_042532)	96
R33	KC659985	<i>Halorhabdus</i> sp. DS75-R1 (JN196513)	95
R34	KC659986	<i>Halorubrum</i> sp. GV-4 (JN196523)	99
R35	KC659987	<i>Halorubrum aidingense</i> JCM 13560 (AB477976)	91
R36	KC659988	<i>Natronomonas</i> sp. SA1 (JF950944)	99
R37	KC659989	<i>Natronomonas</i> sp. SA1 (JF950944)	99
R38	KC659990	Haloarquea no cultivada Phy43Medsalt2C8 (FJ476778)	99

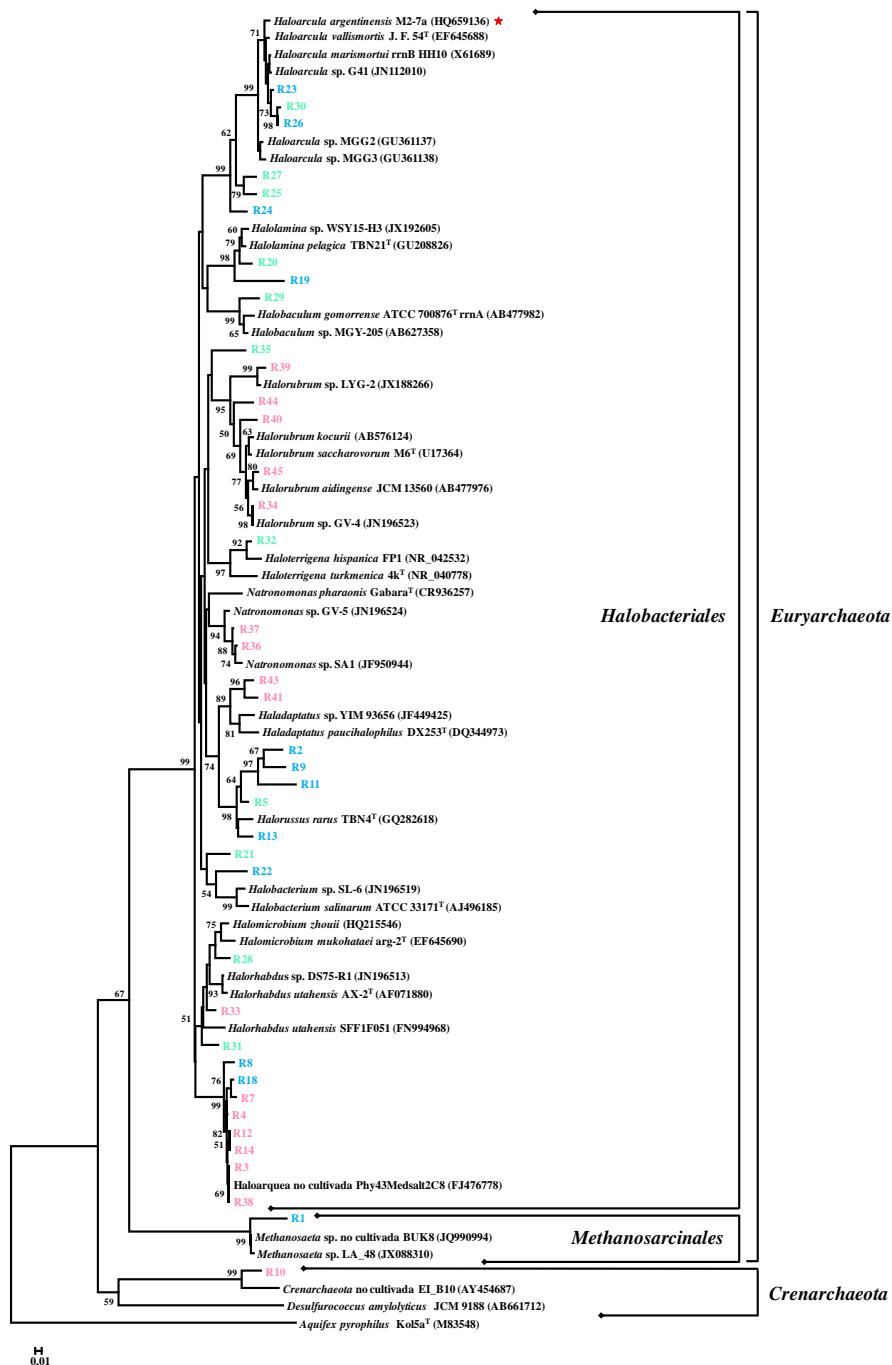
Tabla 44. Continuación

Banda	Número de acceso	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
R39	KC659991	<i>Halorubrum</i> sp. LYG-2 (JX188266)	99
R40	KC659992	<i>Halorubrum kocurii</i> (AB576124)	97
R41	KC659993	<i>Haladaptatus</i> sp. YIM 93656 (JF449425)	94
R43	KC659994	<i>Haladaptatus</i> sp. YIM 93656 (JF449425)	94
R44	KC659995	<i>Halorubrum kocurii</i> (AB576124)	97
R45	KC659996	<i>Halorubrum aidingense</i> JCM 13560 (AB477976)	99

★ Arqueas aislada por Luque y col. (2012a)

Para determinar la situación filogenética de las secuencias del gen del ARNr 16S, se llevó a cabo la construcción de los árboles filogenéticos basados en los algoritmos Neighbour-Joining y Maximum-likelihood. Se utilizaron además de las secuencias de las bandas que se extrajeron del DGGE, las secuencias del gen del ARNr 16S de los microorganismos con los porcentajes de semejanza más elevados (Tabla 44) así como las secuencias de las especies tipo de los géneros relacionados. Como se puede apreciar en la Tabla 44 se hallaron 12 taxa diferentes con porcentajes de identidad superiores al 94% con excepción de las bandas R10, R21, R22 y R35 que presentaron porcentajes de 92%, 91%, 93% y 91% respectivamente. Se detectó una banda, R10, correspondiente a una *Crenarchaeota* no cultivada y ocho bandas (R3, R4 R7, R8, R12, R14, R18 y R38) pertenecientes a la haloarquea no cultivada Phy43Medsalt2C8. Hay que destacar que la banda R24 presentó un porcentaje de identidad del 96% con *Haloarcula argentinensis* M2-7a, una cepa aislada previamente en Rambla Salada por Luque y col. (2012a).

Los resultados obtenidos, mostrados en la Figura 77, nos permitieron establecer la formación de dos clústers, correspondientes a los phyla *Euryarchaeota* y *Crenarchaeota*. En el árbol filogenético se puede observar como las secuencias correspondientes al phylum *Euryarchaeota* se agruparon en dos clústers. El primer clúster, el mayoritario, incluye las secuencias identificadas como arqueas del orden *Halobacteriales*, mientras que el segundo está compuesto por una sola secuencia, la R1, relacionada con el orden *Methanosarcinales*. El árbol filogenético obtenido mediante el algoritmo Maximum-Likelihood mostró una topología similar (Figura 88).



**Figura 77.** Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método de Neighbour-Joining. Los números de acceso en la base de datos Genbank de las secuencias de referencia se encuentran entre paréntesis. Se indican los valores de “bootstrap” mayores del 50%. ★ Arqueas aislada por Luque y col. (2012a). Secuencias obtenidas en junio de 2006 (R), febrero de 2007 (R) y noviembre de 2007 (R)

En la Figura 78 se muestran los grupos de arqueas metabólicamente activos hallados en el total del estudio realizado en Rambla Salada. Los porcentajes se han calculado teniendo en cuenta las intensidades de las bandas del DGGE.

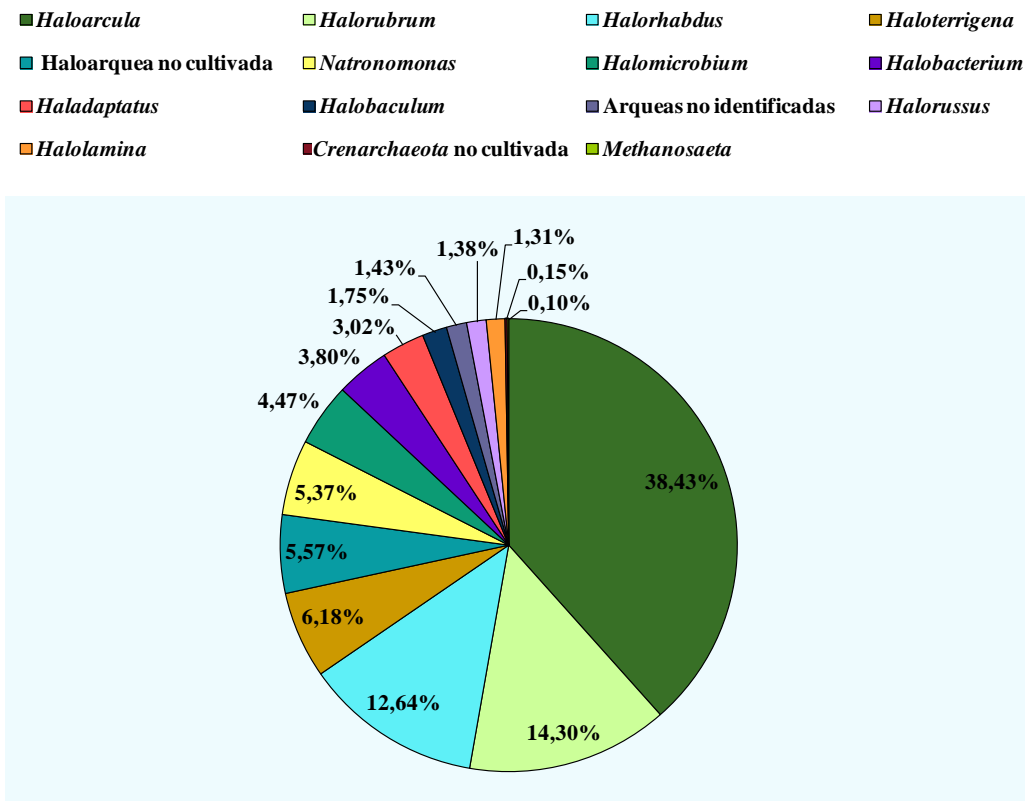


Figura 78. Abundancia relativa de arqueas metabólicamente activas en los tres muestreos

En términos generales, el phylum *Euryarchaeota* fue el más dominante con un 98,4% del total de los grupos taxonómicos identificados en las tres épocas de muestreo, siendo las arqueas del orden *Halobacteriales* las más abundantes de este phylum, con el 98,3%. Las arqueas del orden *Methanosarcinales* representaron el 0,10%. La abundancia relativa del phylum *Crenarchaeota* fue del 0,15%. El taxón más abundante fue el género *Haloarcula* representando un 38,43% de la abundancia total de arqueas, seguido por los géneros *Halorubrum*, *Halorhabdus*, *Haloterrigena*, *Natronomonas*, *Halomicrobium*, *Halobacterium*, *Haladaptatus*, *Halorussus*, *Halolamina* y *Methanosaeta*.

En la Tabla 45 se muestran los grupos taxonómicos encontrados en las tres épocas de muestreo y en la Figura 79 su representación gráfica. El género *Haloarcula* (bandas R23, R24, R25, R26, R27 y R30), el más abundante, se encontró en las tres épocas y

especialmente en febrero y noviembre de 2007 (55,97% y 52,65% del total de la población respectivamente). El género *Halorubrum* (bandas R34, R35, R39, R40, R44 y R45), el segundo en abundancia, evidenció porcentajes mayores en junio de 2006 y febrero de 2007 (21,29% y 19,82% respectivamente). Por su parte, el género *Halorhabdus* (bandas R31 y R33) también mostró porcentajes mayores en la época de noviembre de 2007 y junio de 2006 (17,30% y 14,18% respectivamente). Cabe destacar que el filotipo Phy43Medsalt2C8 (bandas R3, R4, R7, R8, R12, R14, R18, y R38), que representa una haloarquea no cultivada se halló mayoritariamente en todos los sitios de la época de junio de 2006 (13,88%), mientras que los valores fueron muy bajos en febrero y noviembre de 2007.

**Tabla 45.** Abundancia relativa (en %) de los grupos taxonómicos (intensidad de bandas de DGGE) identificados en las tres épocas de muestreo

Grupos taxonómicos	Junio 2006	Febrero 2007	Noviembre 2007
<i>Haloarcula</i>	6,68	55,97	52,65
<i>Halorubrum</i>	21,29	19,82	1,80
<i>Halorhabdus</i>	14,18	6,45	17,30
<i>Haloterrigena</i>	1,27	8,03	9,25
Haloarquea no cultivada Phy43Medsalt2C8	13,88	0,87	1,98
<i>Halobacterium</i>	15,34	0,00	0,77
Arqueas no identificadas	4,59	5,08	3,74
<i>Halolamina</i>	1,80	2,29	7,32
<i>Natronomonas</i>	8,86	0,00	0,21
<i>Halomicrobium</i>	4,59	0,00	0,65
<i>Haladaptatus</i>	3,54	0,10	0,67
<i>Halorussus</i>	2,32	0,27	1,56
<i>Halobaculum</i>	1,15	1,09	1,70
<i>Methanosaeta</i>	0,00	0,00	0,32
<i>Crenarchaeota</i> no cultivada	0,45	0,00	0,00

Los géneros *Haloterrigena* (banda R32), *Halolamina* (bandas R19 y R20), *Haladaptatus* (bandas R41 y R43), *Halorussus* (bandas R2, R5, R9, R11 y R13) y *Halobaculum* (banda R29) se encontraron en los tres muestreos, mientras que los géneros *Halobacterium* (bandas R21 y R22), *Halomicrobium* (banda R28) y *Natronomonas* (bandas R36 y R37) no fueron detectados en el muestreo de febrero de 2007 (Tabla 45).

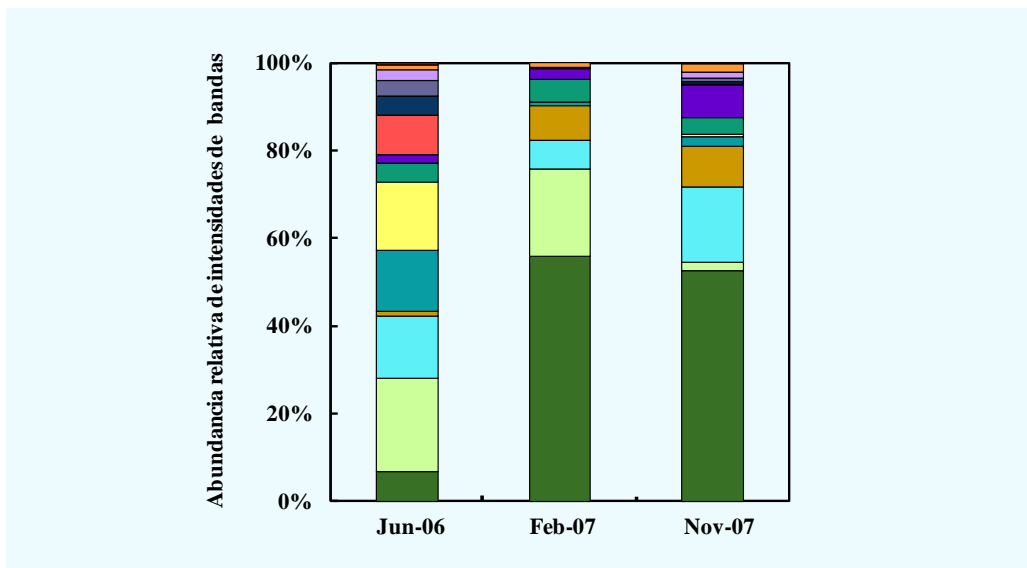
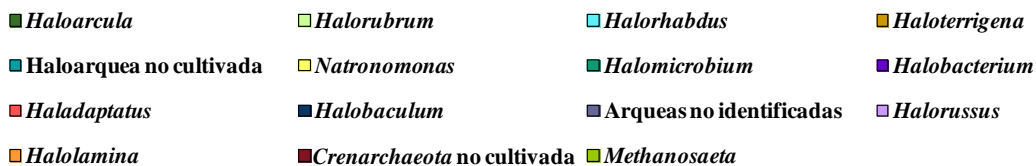


Figura 79. Abundancia relativa de arqueas metabólicamente activas en cada época de muestreo

El género *Methanosaeta* (banda R1) se detectó únicamente en noviembre de 2007 y con un porcentaje muy bajo 0,32%. Adicionalmente la banda R10 fue reconocida como *Crenarchaeota* no cultivada, encontrándose únicamente en junio de 2006 en una zona con baja salinidad, mostrando una abundancia relativa muy baja (0,45%) respecto al total de bandas detectadas en esta fecha. Cabe resaltar que las bandas R6, R15, R16, R17, R42 y R46 fueron frecuentes en los tres muestreos, aunque sin embargo su secuenciación no fue posible. Estas bandas fueron calificadas como arqueas no identificadas.

### Índices de diversidad

#### Rango ponderado de la riqueza (*Rr*)

Los resultados del rango ponderado de la riqueza se muestran a continuación.

**Tabla 46.** Rango ponderado de la riqueza ( $Rr$ ) en cada sitio y época de muestreo

Época	Zona	Muestra	Nº de bandas	$Rr$	Promedio
<b>Junio 2006</b>	Finca la Salina	S1A	15	15,84	15,18 ± 8,23
		S2A	11	6,20	
		S4A	11	7,11	
	Trasvase Tajo-Segura	S3A	20	27,52	
	Surgencia	S7A	15	13,23	
		S8A	19	21,22	
<b>Febrero 2007*</b>	Finca la Salina	S1B	7	2,41	6,66 ± 7,65
		S2B	5	1,36	
		S4B	5	1,42	
	Trasvase Tajo-Segura	S3B	20	21,12	
	Surgencia	S7B	10	4,56	
		S8B	13	9,12	
<b>Noviembre 2007</b>	Finca la Salina	S1C	23	48,27	23,93 ± 13,16
		S2C	20	29,00	
		S4C	15	16,86	
	Trasvase Tajo-Segura	S3C	16	17,57	
	Surgencia	S7C	13	12,04	
		S8C	16	19,84	
<b>MDS</b>					0,0295

\* Época de muestreo en la que hay diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con respecto al resto de las épocas. MDS: Mínima diferencia significativa

El promedio del número de bandas por muestra fue 18, con un mínimo de 5 bandas encontrado en la zona de Finca la Salina (S2 y S4) durante febrero de 2007 y un máximo de 23 bandas en la misma zona (S1) en noviembre de 2007. Los valores de riqueza indicaron que el muestreo de noviembre de 2007 fue el más rico respecto al resto de las épocas estudiadas, siendo el valor de  $Rr$  igual a  $23,93 \pm 13,16$ . Por otro lado, las muestras tomadas en junio de 2006 también mostraron un valor de  $Rr$  bastante alto ( $15,18 \pm 8,23$ ), a diferencia del valor de  $Rr$  encontrado en el muestreo de febrero de 2007 que fue bastante bajo ( $6,66 \pm 7,65$ ).



Mediante el análisis de varianza (ANOVA) de los datos de riqueza se pudo seleccionar como el más distinto, con respecto al resto de las épocas, el muestreo de febrero de 2007 ( $p \leq 0,05$ ).

### *Índices de Shannon-Weaver y de Simpson*

Los valores de los índices de diversidad de *Shannon-Weaver* ( $H'$ ) y de *Simpson* ( $SI$ ) obtenidos en cada zona y época de muestreo se muestran en la Tabla 47.

Estos índices evalúan la diversidad de arqueas metabólicamente activas mediante la relación entre el número de bandas en cada muestra y sus respectivas intensidades, y para ello, se utilizó la matriz de datos obtenida mediante el análisis de los perfiles de DGGE (Tabla 54 de material suplementario).

Por otro lado, se aplicó un análisis ANOVA para determinar las diferencias significativas entre los tres muestreos (Tabla 47).

Teniendo en cuenta los valores del índice de diversidad ( $H'$ ) en las épocas de muestreo, el de junio de 2006, resultó ser la época con mayor diversidad ( $H' = 2,42 \pm 0,37$ ) respecto al resto de los muestreos. Por otro lado, el valor de dominancia ( $SI$ ) en esta época fue el más bajo,  $0,11 \pm 0,04$ .

Por otra parte, el análisis de dominancia a través del índice de *Simpson* indicó el valor más alto ( $0,27 \pm 0,08$ ) en las muestras de febrero de 2007, mientras que el promedio del índice de diversidad ( $H'$ ) en esa época fue el más bajo ( $1,89 \pm 0,46$ ); es decir, cuando aumentaba la diversidad, disminuía la dominancia.

**Tabla 47.** Índices de *Shannon-Weaver* y *Simpson* en cada sitio y época de muestreo

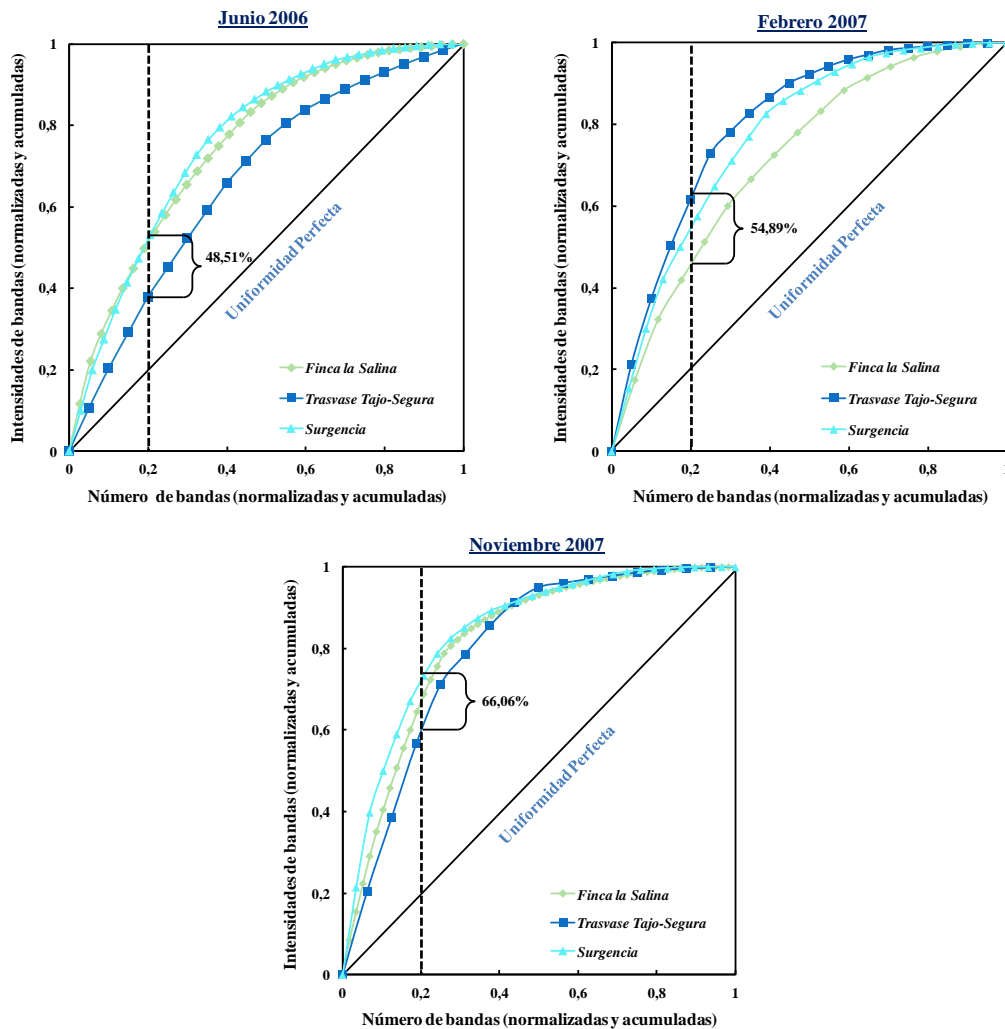
Época	Zona	Muestra	$H'$	Promedio	$SI$	Promedio	
<b>Junio 2006</b>	Finca la Salina	S1A	2,21	$2,42 \pm 0,37$	0,12	$0,11 \pm 0,04$	
		S2A	2,03		0,17		
		S4A	1,98		0,17		
	Trasvase Tajo-Segura	S3A	2,82		0,06		
		Surgencia	S7A		2,27		0,12
			S8A		2,46		0,10
<b>Febrero 2007*</b>	Finca la Salina	S1B	1,60	$1,89 \pm 0,46$	0,22	$0,27 \pm 0,08$	
		S2B	1,28		0,34		
		S4B	1,34		0,30		
	Trasvase Tajo-Segura	S3B	2,35		0,12		
		Surgencia	S7B		1,85		0,18
			S8B		1,98		0,17
<b>Noviembre 2007</b>	Finca la Salina	S1C	2,46	$2,06 \pm 0,21$	0,12	$0,17 \pm 0,05$	
		S2C	2,25		0,12		
		S4C	1,99		0,17		
	Trasvase Tajo-Segura	S3C	2,13		0,14		
		Surgencia	S7C		1,77		0,24
			S8C		1,86		0,21
<b>MDS</b>				$0,0323$		$0,0487$	

\* Época de muestreo en la que hay diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con respecto al resto de las épocas. MDS: Mínima diferencia significativa

Un análisis de varianza ANOVA reveló que existieron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) de la diversidad y la dominancia entre épocas de muestreo pero no entre zonas, siendo la época de febrero de 2007 la más distinta.

### Organización funcional ( $F_o$ )

Al analizar la organización funcional ( $F_o$ ) de las arqueas metabólicamente activas, se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 80 y la Tabla 48.



**Figura 80.** Curvas de distribución de *Pareto-Lorenz* basadas en los perfiles de DGGE. La proyección de la línea vertical del valor 0,2 del eje X se utiliza para determinar los valores de  $F_0$

En relación con las muestras tomadas en junio de 2006, el 20% del número de bandas (acumuladas y normalizadas) representó el 53,57%, 38,39% y el 53,57% (48,51% de promedio) de las intensidades de las bandas (acumuladas y normalizadas) en las zonas de la Finca la Salina, canal Traslase Tajo-Segura y la surgencia respectivamente.

Tabla 48. Valores de  $F_o$  (en %) obtenidos en cada zona y época de muestreo

Época	Zona	$F_o$	Promedio
<b>Junio 2006</b>	Finca la Salina	53,57	48,51
	Trasvase Tajo-Segura	38,39	
	Surgencia	53,57	
<b>Febrero 2007*</b>	Finca la Salina	46,42	54,89
	Trasvase Tajo-Segura	62,9	
	Surgencia	55,35	
<b>Noviembre 2007</b>	Finca la Salina	64,28	66,06
	Trasvase Tajo-Segura	59,82	
	Surgencia	74,10	
<b>MDS</b>			0,0187

\* Época de muestreo en la que hay diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con respecto al resto de las épocas. MDS: Mínima diferencia significativa

En cuanto a las muestras tomadas en febrero de 2007, los valores de  $F_o$  fueron 46,42%, 62,9% y 55,35% para el 20% de las bandas en las zonas de la Finca la Salina, canal Trasvase Tajo-Segura y la surgencia respectivamente. Por su parte, las muestras tomadas en noviembre de 2007 mostraron el 64,28%, 59,82% y 74,10% de  $F_o$  respecto al 20% de las bandas en las mismas zonas.

En general, se comprobó que los valores de  $F_o$  obtenidos en las tres épocas de muestreo fueron bastante altos, siendo el mayor el obtenido en noviembre de 2007. En cuanto a la zona de muestreo, la comunidad de arqueas encontrada en la zona de la surgencia en dicha fecha presentó el valor de  $F_o$  (intensidades de las bandas acumuladas y normalizadas) más elevado, el 74,10%; es decir el 20% de las bandas tuvo el 74,10% de la intensidad total.

Finalmente el análisis ANOVA detectó diferencias significativas en las comunidades de arqueas metabólicamente activas a nivel de temporalidad ( $p \leq 0,05$ ), siendo el muestreo de febrero de 2007 el más distinto, mientras que a nivel espacial no se detectaron diferencias significativas.

## Influencia de los factores ambientales en la diversidad de arqueas metabólicamente activas

Al aplicar un análisis de correspondencia sin tendencias (ACD) a la matriz cualitativa (Tabla 53 de material suplementario) de la comunidad de arqueas metabólicamente activa, se obtuvo un valor de 2,258 de longitud del gradiente, lo que demostró una respuesta lineal de las especies de arqueas respecto a las variables ambientales. Como consecuencia, se aplicó un análisis de redundancia (ARD) (véase el apartado III. 3. 2 de Material y Métodos).

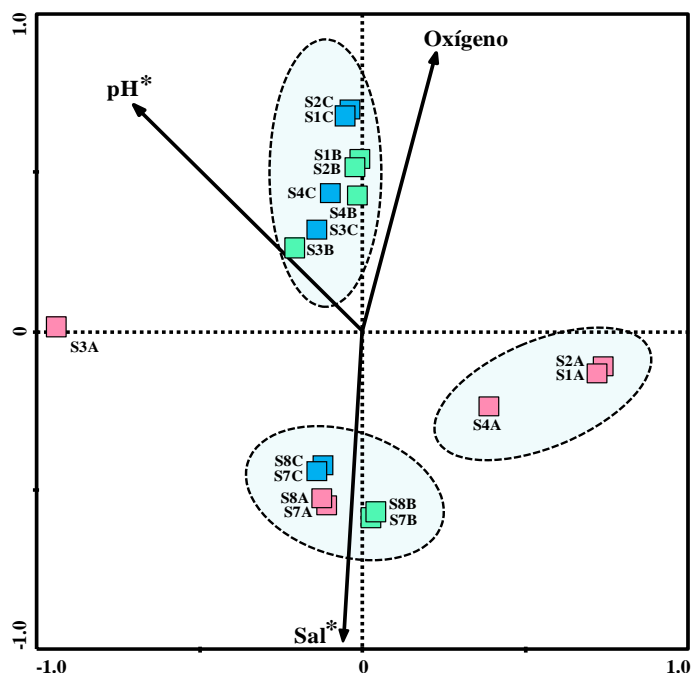
El resultado del análisis de redundancia (ARD) de las variables físico-químicas y las épocas y zonas de muestreo se presenta en la Figura 81; y la variabilidad explicada por cada eje de variación, así como la contribución de las variables físico-químicas a cada uno de ellos, se presenta en la Tabla 49. El primer eje canónico explicó el 11,2% de la variabilidad en la composición de la comunidad de arqueas metabólicamente activa y estuvo correlacionado negativamente con el pH. El segundo eje canónico explicó el 8,7% de la variabilidad correlacionándose principalmente con la concentración salina en su parte negativa. En relación con la variabilidad acumulada a nivel de la relación especies-variables ambientales, el primer eje explicó el 47,5% de la variabilidad acumulada y el 84,2% de la misma junto con el segundo eje, lo que indica que los dos primeros ejes explicaron casi el total de la variabilidad. Cuando se evaluó el efecto de cada variable ambiental, encontramos una alta significancia en la salinidad (*Monte Carlo*,  $F = 1,76$ ,  $P = 0,014$ ) y en el pH (*Monte Carlo*,  $F = 1,85$ ,  $P = 0,014$ ). La correlación de las variables ambientales se consideró significativa si presentaba valores inferiores a 0,05.

**Tabla 49.** Valores del análisis estadístico Canoco

Ejes de ordenación	1	2	3	Inercia total
Valores propios	0,112	0,087	0,037	1,000
Correlación especies-variables ambientales	0,924	0,832	0,872	
Porcentaje acumulado de la variabilidad de especies	11,2	19,9	23,6	
Porcentaje acumulado de la variabilidad de la relación especies- variables ambientales	47,5	84,2	100,0	

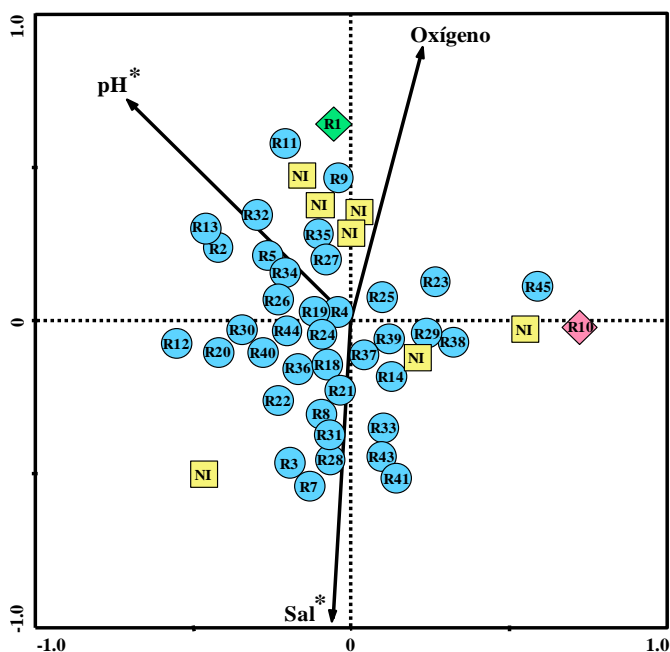
En el primer ARD (Figura 81), en el que se analiza la influencia de las variables ambientales con la diversidad en las distintas zonas y épocas de muestreo, se observó la formación de tres grupos.

El primer grupo está compuesto por las muestras de la zona de surgencia (S7 y S8) de las tres épocas de muestreo, correlacionándose positivamente y significativamente con la salinidad. El segundo grupo incluyó las muestras provenientes de la zona de la Finca la Salina (S1B, S2B, S4B, S1C, S2C y S4C) y el canal Trasvase Tajo-Segura (S3B y S3C) tomadas en febrero y noviembre de 2007, mostrándose una correlación positiva con el pH y el oxígeno y negativa con la salinidad. Por su parte, el tercer grupo asoció las muestras de la zona de la Finca la Salina tomadas en junio de 2006, correlacionándose ligeramente y positivamente con la salinidad y el oxígeno. La muestra S3A no ha sido considerada en la interpretación de los resultados, ya que demostró un comportamiento distinto respecto con el resto de las zonas. Según el test de permutaciones de *Monte Carlo*, el primer eje canónico representó la influencia del pH y el segundo eje se relacionó con la salinidad.



**Figura 81.** Biplot de la ordenación ARD, basado en los datos cualitativos generados por DGGE, que representa la correlación entre los factores ambientales, zonas y épocas de muestreo. **SA** ■: Muestras tomadas en junio de 2006, **SB** ■: Muestras tomadas en febrero de 2007, **SC** ■: Muestras tomadas en noviembre de 2007. (S1, S2 y S4: Finca la Salina, S3: Canal Trasvase Tajo-Segura, S7 y S8: Surgencia). Las flechas indican el sentido de correlación de las variables ambientales (sal, oxígeno y pH). Las variables ambientales marcadas con el símbolo \* son significativas ( $p \leq 0,05$ )

La Figura 82 muestra la ordenación de los distintos taxa que forman parte de la comunidad de arqueas metabólicamente activas en base a la matriz cualitativa de datos (Tabla 53 de material suplementario) y las variables ambientales.



**Figura 82.** Biplot de la ordenación ACC, basado en los datos cualitativos generados por DGGE, que representa la correlación entre los factores ambientales y las comunidades de arqueas. ●: *Halobacteriales* ◆: *Methanosarcinales* ◆: *Crenarchaeota* ■: Arqueas no identificadas. Las flechas indican el sentido de correlación de las variables ambientales (sal, oxígeno y pH). Las variables ambientales marcadas con el símbolo \* son significativas ( $p \leq 0,05$ )

El análisis de ordenación ARD indicó una correlación significativamente positiva entre la sal y la mayoría de los taxa pertenecientes al orden *Halobacteriales*, como es el caso de los taxa *Halorhabdus* (bandas R31 y R33), *Halobacterium* (bandas R21 y R22), *Halomicrobium* (banda R28), *Haladaptatus* (bandas R41 y R43), *Halobaculum* (banda R29), *Natronomonas* (bandas R36 y R37) y los miembros de la haloarquea no cultivada Phy43Medsalt2C8 (bandas R3, R7, R8, R14, R18, y R38). La mayoría de los miembros pertenecientes al género *Halorubrum* (banda R34, R35, R40 y R44), *Haloarcula* (bandas R24, R26, R27 y R30), *Halorussus* (bandas R2, R5, R9, R11 y R13), *Halolamina* (bandas R19 y R20) y *Haloterrigena* (banda R32) mostraron una correlación positiva con el pH puesto que su situación fue cercana a este eje. Queremos destacar que algunos de estos taxa también estuvieron influenciados por el oxígeno como por ejemplo los taxa R23 y R25 pertenecientes al género *Haloarcula*, así como los taxa R39 y R45 correspondientes al género *Halorubrum* y el R9 correspondiente a *Halorussus*.

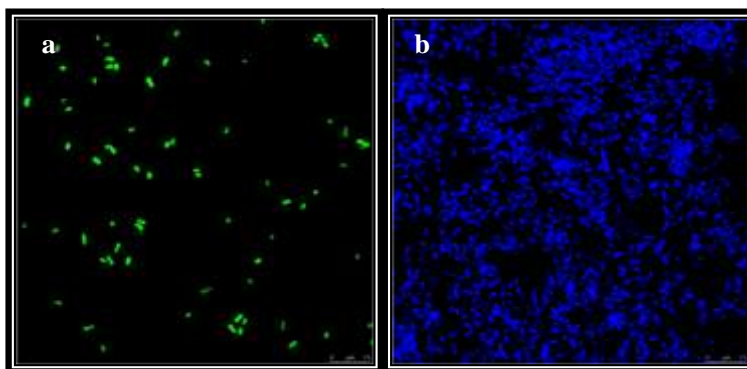
Como se puede apreciar en la Figura 82, la especie perteneciente al phylum *Crenarchaeota* (banda R10) no se ve afectada por ninguna de las variables. Por otro lado, la banda R1

asignada al taxón *Methanosaeta* (*Methanosarcinales*) mostró una relación negativa con la sal.

Basándose en el nivel del 5% en el test de permutación de *Monte Carlo*, la sal y el pH representan los factores ambientales que influyen significativamente ( $p \leq 0,05$ ) en la composición de las comunidades de arqueas metabólicamente activas.

### II. 3. 3. Análisis de la comunidad de arqueas mediante CARD-FISH

Para la técnica CARD-FISH, se realizó la hibridación *in situ* (FISH) con una sonda específica de arqueas marcada con peroxidasa de rábano (HRP). Igualmente la muestra se tiñó con DAPI para determinar el número total de microorganismos. Después de la amplificación de la señal fluorescente (CARD), las células se visualizaron mediante microscopía láser confocal (CLSM, Confocal Laser Scanning Microscopy). Las células hibridadas con la sonda mencionada anteriormente emiten una luz de color verde y representan la comunidad de arqueas de la muestra. Por otro lado, las células teñidas con DAPI que emiten una luz de color azul, reflejan la población microbiana total de dicha muestra. En la Figura 83 se observa una muestra marcada con la sonda específica de arqueas (a) y una teñida con DAPI (b).



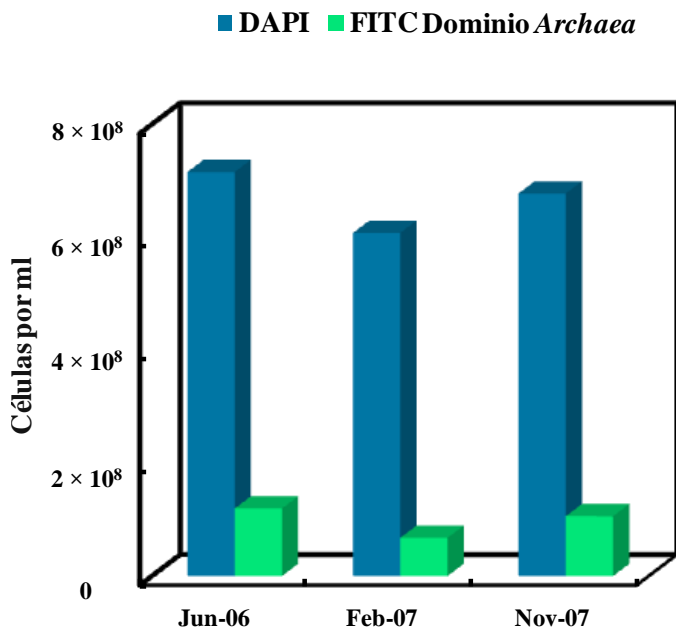
**Figura 83.** CARD-FISH de muestras de Rambla Salada. a: Arqueas marcadas con la sonda Arc915-HRP, FITC; b: Células teñidas con DAPI. La escala es de 10 µm

Los recuentos y el porcentaje de arqueas con respecto al total de células en cada época de muestreo se indican en la Tabla 50. Los recuentos de células totales en los tres muestreos variaron entre  $6,1 \times 10^8$  y  $7,1 \times 10^8$  células/ml. El promedio de células microbianas totales obtenido en Rambla Salada fue de  $6,7 \times 10^8$  células/ml.



El análisis estadístico ANOVA indicó que estos recuentos tanto de células totales como de arqueas no presentaron diferencias significativas entre los distintos sitios de muestreo, pero sí entre febrero de 2007 y el resto de las épocas ( $P = 0,0002$  para DAPI,  $P = 0,0001$  para FITC).

En la Figura 84 se muestra la representación gráfica de los resultados obtenidos en los recuentos de arqueas y de células totales.



**Figura 84.** Recuentos de la población total (DAPI) y la población de arqueas (FITC) en las tres épocas de muestreo

Como se observa, el muestreo de junio de 2006 mostró que las arqueas suponían el 16% de la población de arqueas respecto a la población total de microorganismos. Por el contrario, el porcentaje más bajo fue encontrado en la época de febrero de 2007, siendo sólo un 11,1% de la población total.

**Tabla 50.** Cuantificación de células microbianas totales y de arqueas en cada zona y época de muestreo

Época de muestreo	Zona	Muestra	Recuento de células totales (DAPI) (cel/ml)	Promedio (DAPI)	Recuento de arqueas (FITC) (cel/ml)	Promedio (FITC)	% de FITC/DAPI	Promedio (%) FITC/DAPI
<b>Junio 2006</b>	Finca la Salina	S1A	$7,51 \times 10^8$	$7,1 \times 10^8$	$9,18 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	12,22	16,7
		S2A	$6,77 \times 10^8$		$1,11 \times 10^8$		16,39	
		S4A	$6,78 \times 10^8$		$1,30 \times 10^8$		19,17	
	Trasvase Tajo-Segura	S3A	$7,26 \times 10^8$		$1,26 \times 10^8$		17,35	
		Surgencia	S7A		$6,79 \times 10^8$		$1,14 \times 10^8$	
	S8A		$7,77 \times 10^8$		$1,43 \times 10^8$		18,40	
<b>Febrero 2007*</b>	Finca la Salina	S1B	$6,53 \times 10^8$	$6,1 \times 10^8$	$7,11 \times 10^7$	$6,7 \times 10^7$	10,88	11,1
		S2B	$6,08 \times 10^8$		$6,88 \times 10^7$		11,31	
		S4B	$6,26 \times 10^8$		$7,83 \times 10^7$		12,50	
	Trasvase Tajo-Segura	S3B	$5,87 \times 10^8$		$6,64 \times 10^7$		11,31	
		Surgencia	S7B		$5,79 \times 10^8$		$6,01 \times 10^7$	
	S8B		$5,94 \times 10^8$		$6,02 \times 10^7$		10,13	

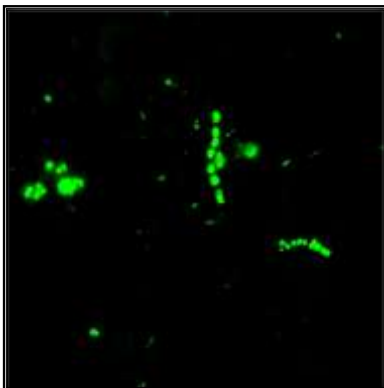
\* Época de muestreo en la que hay diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con respecto al resto de las épocas. MDS: Mínima diferencia significativa

Tabla 50. Continuación

Época de muestreo	Zona	Muestra	Recuento de células totales (DAPI) (cel/ml)	Promedio (DAPI)	Recuento de arqueas (FITC) (cel/ml)	Promedio (FITC)	% de FITC/DAPI	Promedio (%) FITC/DAPI
Noviembre 2007	Finca la Salina	S1C	$6,71 \times 10^8$	$6,7 \times 10^8$	$9,70 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$	14,45	15,6
		S2C	$6,76 \times 10^8$		$1,12 \times 10^8$		16,56	
		S4C	$6,66 \times 10^8$		$1,26 \times 10^8$		18,91	
	Trasvase Tajo-Segura	S3C	$7,15 \times 10^8$		$7,70 \times 10^7$		10,76	
		Surgencia	S7C		$6,42 \times 10^8$		$1,20 \times 10^8$	
	S8C		$7,01 \times 10^8$		$1,10 \times 10^8$		15,69	
<b>Promedio</b>				$6,7 \times 10^8$		$9,7 \times 10^7$		14,4
<b>MDS</b>				0,0002		0,0001		0,0140

\* Época de muestreo en la que hay diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con respecto al resto de las épocas. MDS: Mínima diferencia significativa

En la Figura 85 se pueden observar células de arqueas hibridadas con la sonda correspondiente y visualizadas en un microscopio láser confocal (CLSM). Se pueden apreciar que algunas de estas células tienen forma cuadrada, por lo que podrían pertenecer al género *Haloarcula*, un taxón que resultó dominante de acuerdo a los resultados obtenidos



**Figura 85.** Imagen de arqueas visualizadas con un microscopio láser confocal Leica TCS-SP5 (CLSM). La escala es de 10  $\mu\text{m}$

## II. 3. 4. Discusión

El estudio de la diversidad microbiana en ambientes naturales ha avanzado enormemente a partir de la introducción de técnicas moleculares que permiten obtener un “perfil genético” u “huella genética” (*fingerprinting*) de la comunidad basándose en el análisis del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S. Entre los métodos de “huella genética” más utilizados podemos mencionar la técnica de Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE: *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). Esta técnica ha resultado particularmente útil para la identificación de los miembros dominantes en una comunidad, puesto que el número de bandas y su intensidad en un gel de DGGE está directamente relacionado con la diversidad (Muyzer y col., 1993). Por otro lado, con los métodos de agrupación y ordenación se pueden incluir los datos de los parámetros ambientales, lo que permite analizar y evaluar el impacto de diferentes factores sobre la composición y la estructura de la comunidad (Besemer y col., 2005). Sin embargo, la técnica de DGGE tiene sus limitaciones que se deben tener en cuenta, como los posible sesgos que pueden ser introducidos con la extracción de ADN, la amplificación por PCR, la selección de los cebadores universales y finalmente con el número de copias de los genes ARNr, que puede variar entre especies (Neufeled y col., 2006).

Para el análisis de los perfiles de DGGE, se han utilizado tanto los datos de presencia-ausencia de bandas como los de la intensidad de dichas bandas. De acuerdo a los resultados obtenidos, hay diferencias significativas en las comunidades de arqueas encontradas en las tres épocas de muestreo (Figuras 66 y 67). Los perfiles de la diversidad de arqueas obtenidos en junio de 2006 y noviembre de 2007 fueron similares (dendograma de presencia-ausencia e intensidad). Sin embargo, la comunidad de arqueas encontrada en febrero de 2007 resultó muy uniforme y distinta con respecto a las comunidades halladas en las otras épocas. Igualmente, cabe destacar que el tipo de muestra (suelo o sedimento acuoso) o el área de estudio no influyó en la agrupación de las comunidades de arqueas (Figuras 66 y 67), por lo que no fue posible establecer una relación entre el tipo de muestras y un taxón específico. La excepción son las muestras S7 y S8 de la zona de la surgencia que resultaron tener una biodiversidad análoga, de hecho, en los dendogramas obtenidos tras aplicar el índice de Dice, estas muestras quedaron siempre agrupadas. Se trata de una poza de agua sulfurosa salina de peculiares características por su alto contenido en cloruro y elevada proporción de sulfatos procedentes del yeso. Este nacimiento de agua se mantiene constante en su composición y concentración de sales a lo largo del año.

Para comparar la diversidad de arqueas de las distintas zonas y las épocas en las que se realizaron los muestreos se determinaron varios índices de diversidad. Al comparar los resultados obtenidos con el rango ponderado de la riqueza, se detectaron diferencias significativas entre las fechas de muestreo, siendo la época de junio de 2006 la que mostró el valor más alto de  $R_r$ ,  $12,73 \pm 2,36$  (Tabla 40), este valor está comprendido entre 10 y 30 (10

$< Rr < 30$ ) y según Marzorati y col. (2008) es típico de ambientes caracterizados por una diversidad microbiana media.

Teniendo en cuenta las curvas de *Pareto-Lorenz (PL)*, la mayoría de las muestras analizadas en este estudio presentaron valores medios de  $Fo$  que oscilan entre el 40% y el 60% de  $Fo$  (Figura 71 y Tabla 42). Este resultado indica que las comunidades de arqueas encontradas en Rambla Salada tienen un potencial que les permite conservar su funcionalidad frente a las variaciones de las condiciones ambientales, y por lo tanto se trata de comunidades muy equilibradas (Marzorati y col., 2008). En el caso particular de las poblaciones de arqueas halladas en las muestras correspondientes a la zona de la Finca la Salina tomadas en junio de 2006, el valor de  $Fo$  obtenido superó el 60%, lo cual indica que la comunidad de arqueas en esta zona y época se caracteriza por la existencia de un número pequeño de miembros dominantes, mientras que el resto de los miembros está representado por pocos individuos, lo que indica que dicha comunidad es más especializada y por tanto más susceptible a cambios ambientales (Marzorati y col., 2008).

El índice de *Shannon-Weaver (H')* (Shannon y Weaver, 1949) contempla el número de especies presentes en el área de estudio (riqueza de especies) y el número de individuos de cada una de esas especies (abundancia). El valor más alto ( $1,82 \pm 0,20$ ) correspondió a las muestras tomadas en junio de 2006; ello hace pensar que probablemente ese resultado está relacionado con la alta salinidad determinada en esas muestras. Datos similares fueron puestos de manifiesto por nuestro grupo de investigación (Luque y col., 2012a) cuando se analizó la diversidad de arqueas en el mismo hábitat mediante métodos clásicos de cultivo utilizándose las mismas zonas y épocas de muestreo.

Por otro lado, la dominancia fue determinada a través del índice de *Simpson (SI)*. Este índice tiene en cuenta el número de especies de un hábitat y su abundancia relativa y representa la probabilidad de que dos individuos tomados al azar pertenezcan a la misma especie. Los resultados mostraron el valor más bajo de dominancia en junio de 2006 ( $0,19 \pm 0,05$ ). Por el contrario, el valor más alto fue registrado en la época de febrero de 2007 ( $0,27 \pm 0,05$ ). De acuerdo a estos datos, pudimos confirmar que la dominancia de la comunidad de arqueas disminuye cuando aumenta su diversidad (Magurran, 1996).

En el estudio de la comunidad de arqueas usando el ADN total extraído de las muestras objeto de estudio, se determinaron un total de 34 clases de bandas mediante el análisis de los patrones de DGGE, de las cuales se secuenciaron 29 (Figuras 66 y 67). La mayoría de las secuencias pertenecían al phylum *Euryarchaeota* (Figura 68). Dentro de éste, se encontraron mayoritariamente arqueas del orden *Halobacteriales*. Debido a que la técnica DGGE detecta solamente las poblaciones con más del 0,5% de individuos del total de la comunidad (Muyzer, 1999), se puede concluir que el orden *Halobacteriales* es el grupo predominante en la comunidad de arqueas encontrada en Rambla Salada.

Cabe mencionar que los géneros *Haloarcula*, *Halorhabdus*, *Methanolobus*, *Halomicrobium*, *Halorubrum*, *Natronomonas*, *Haloterrigena*, *Halobacterium* y *Halosimplex* fueron los más abundantes y ampliamente distribuidos en Rambla Salada. Entre ellos, *Haloarcula* es el taxón más ampliamente distribuido y se encuentra en todas las muestras y épocas de muestreo.

Los géneros *Haloferax*, *Halorubrum*, *Haloarcula* y *Halobacterium* se han descrito como población mayoritaria en estanques cristalizadores de salinas solares y lagos hipersalinos, mientras que los géneros *Halorubrum*, *Haloferax* y *Halobacterium* se describieron como predominantes y ubicuos en sedimentos salinos (Oren, 2002c; Burns y col., 2004; Bidle y col., 2005; Pâsic y col., 2007).

En nuestro estudio encontramos también un número elevado de *Thermoplasmatales* que llegan a representar un 16,38% de la población de arqueas y pertenecen a dos grupos marinos, a las arqueas bentónicas marinas del grupo D (*MBGD*) y a las arqueas marinas del grupo III (*MGIII*). Este grupo de arqueas (*MBGD* y *MGIII*) ha sido encontrado en distintos hábitats hipersalinos, como por ejemplo, en un lago hipersalino solar en Egipto (Cytryn y col., 2000) y también en suelos de la isla “Salt Spring” en Canadá (Walsh y col., 2005). Otros autores también las describieron en hábitats hipersalinos (Jiang y col., 2006 y 2007; Benlloch y col., 2002; Casamayor y col., 2000b).

Después de identificar y conocer los patrones de distribución de la comunidad de arqueas en Rambla Salada, es importante discernir los factores ambientales que mejor expliquen la variación observada. En ese sentido, el análisis ACC (Figuras 72 y 73) confirmó que la salinidad influye de manera significativa en la distribución de la comunidad de arqueas. Las muestras correspondientes a la zona de surgencia (S7 y S8) de todas las épocas de muestreo se situaron muy cercanas entre sí y al eje de la salinidad. Esto puede deberse a los valores altos de salinidad que caracterizaron esta zona, un 15% (p/v), y que se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo.

La mayoría de los taxa que pertenecen al orden *Halobacteriales* están fundamentalmente relacionados con la salinidad, excepto los géneros *Haloarcula*, *Halorubrum* y *Haloterrigena*, que además de por la salinidad, están influenciados por el pH.

En el año 2006, Jiang y col. describieron la diversidad microbiana en aguas y sedimentos del lago Chaka, un lago atalasoalino localizado en el nordeste de China. Estos autores encontraron que la comunidad de arqueas en el agua del lago está dominada por miembros del orden *Halobacteriales*. Sin embargo, la comunidad de arqueas encontrada en los sedimentos del mismo hábitat estaba más relacionada con las poblaciones que caracterizan los suelos y sedimentos metanogénicos. Esta variación en la estructura de la comunidad de arqueas se debe según los autores a una disminución de la salinidad en el agua y sedimentos del lago Chaka. Otros estudios publicados por Jiang y col. (2009) también apoyan nuestros

resultados; estos autores confirmaron la dominancia del orden *Halobacteriales* (alrededor del 78% del total de los clones secuenciados) en los lagos del Tibet en el nordeste de China, y además, mostraron que el número de taxa pertenecientes al orden *Halobacteriales* aumentaba con el incremento de la salinidad. Por su parte, Dong y col. (2006); Jiang y col. (2006 y 2007) y Liu y col. (2011) publicaron resultados similares en otros estudios.

En nuestro trabajo, determinamos que la salinidad influye en la distribución de las comunidades pertenecientes al orden *Halobacteriales*. Nuestros resultados indican que los géneros *Haloarcula*, *Halorhabdus*, *Halorubrum*, *Halomicrobium*, *Haloterrigena*, *Natronomonas*, *Halobacterium* y *Halosimplex* están ampliamente distribuidos en todas las zonas y épocas de muestreo, incluso en zonas de baja y media concentración salina. Estos resultados son concordantes con los obtenidos por otros autores en varios estudios moleculares previos, que han puesto de manifiesto la presencia de miembros de haloarqueas en diversos hábitats con baja salinidad (Purdy y col., 2004; Elshahed y col., 2004; Walsh y col., 2005).

Hemos detectado dos taxa de arqueas haloalcalófilas (bandas A28, A13 y A16) pertenecientes a los géneros *Halorubrum* y *Natronomonas*. El género *Halorubrum* se encontró preferentemente en las zonas de la Finca la Salina y del canal del Trasvase Tajo-Segura en la época de febrero de 2007. El género *Natronomonas* fue registrado en todas las muestras tomadas en noviembre de 2007 y también en la zona de la surgencia en junio de 2006. Estas zonas se caracterizan por tener valores neutros y ligeramente alcalinos de pH. La influencia del pH se demostró mediante el análisis estadístico Canoco, que mostró que la banda A28 se situaba muy cerca de la flecha del pH, y que las bandas A13 y A16 relacionadas con el género *Natronomonas* estaban influenciadas tanto por el pH como por la salinidad. Ochseneiter y col. (2002) sugieren que estos géneros están asociados tanto a pH neutros como alcalinos.

También es importante resaltar que el género *Methanobolus* (A31), que incluye especies de arqueas anaerobias, se halló con un porcentaje bastante alto (35,43%) en febrero de 2007, donde los valores de oxígeno fueron bajos, aunque también se detectó en el resto de las zonas analizadas en la misma época. Sin embargo, los resultados de DGGE confirmaron la ausencia de dicho género en las épocas de junio de 2006 y noviembre de 2007. Una posible explicación a esta observación podría relacionarse con la mayor concentración del oxígeno que caracterizó las muestras de estas épocas. Previamente, Jiang y col. (2009) señalaron la presencia del género *Methanobolus* en los sedimentos anaeróbicos procedentes de los lagos del Tibet. Este mismo resultado fue descrito en la bahía de Bombay por Kadam y col. (1994) y también en un acuífero salino por Liu y col. (1990) y Boone (2001).

Merece la pena destacar que en el estudio de la comunidad de arqueas predominante en Rambla Salada, no hemos detectado otras arqueas metanógenas a parte del género *Methanobolus*, como por ejemplo, los géneros *Methanohalophilus* (Paterek y col., 1988),



*Methanohalobium* (Zhilina y col., 1987), *Methanosalsum* (Mathrani y col., 1988; Bonne y Baker, 2002) y *Methanococcus* (Jones y col., 1983) que se han descrito en otros hábitats hipersalinos.

Las arqueas relacionadas con *Thermoplasmatales* se encontraron en la zona de la Finca la Salina en junio de 2006 y noviembre de 2007. Esta zona se caracterizaba por valores relativamente bajos de pH (6,3 a 6,8) y valores medios de la salinidad (4,4 a 8,3%, p/v) en junio de 2006. En noviembre de 2007, se registraron valores bajos de la salinidad (1,1%, p/v), y pH ligeramente alcalinos (Figura 52 y Tabla 28). No hemos encontrado arqueas relacionadas con *Thermoplasmatales* en las muestras recogidas en febrero de 2007, y tampoco en la zona de la surgencia que se distinguía del resto de las zonas estudiadas por su alta concentración de sal. En este punto es donde cabe pensar que los valores altos de pH unidos a valores elevados de salinidad podrían ser responsables de la ausencia de las arqueas relacionadas con *Thermoplasmatales* en la zona de la surgencia y en general en las muestras tomadas en febrero de 2007.

Esta observación se refuerza con los resultados obtenidos mediante el análisis canónico, en donde la situación de las especies relacionadas con *Thermoplasamatales* en el biplot de la Figura 73 evidenció su alejamiento del eje que representa el pH y la salinidad. Este resultado concuerda con los previamente publicados por Jiang y col. (2008), quienes señalaron que los valores bajos de pH y la salinidad podrían favorecer la presencia de las arqueas marinas relacionadas con *Thermoplasamatales* en el lago Qinghai y en el agua del mar.

A nivel del phylum *Crenarchaeota*, encontramos una baja abundancia respecto al total de la comunidad de arqueas predominante (2,77%). De hecho sólo tres clases de bandas (A30, A32 y A33) se relacionaban con este phylum y se encontraron en zonas con baja salinidad (Finca la Salina y el canal Trasvase Tajo-Segura) en las tres épocas de muestreo. Los resultados del análisis canónico apoyaron esta observación, puesto que las bandas (A30, A32 y A33) se situaron en el sentido contrario al eje de la salinidad. Este resultado concuerda con los obtenidos por Jiang y col. (2009), quienes encontraron que los clones pertenecientes al phylum *Crenarchaeota* representaron sólo el 22% de la comunidad de arqueas existente en los lagos del Tíbet. Estos autores concluyeron que la abundancia del phylum *Crenarchaeota* disminuye con el incremento de la salinidad.

De lo expuesto en este punto, sugerimos que aunque la salinidad resultó ser la variable ambiental más significativa ( $p \leq 0,05$ ), otros factores tales como el pH, contribuyen en la distribución de algunos miembros de las comunidades de arqueas en Rambla Salada.

El análisis de la diversidad de arqueas metabólicamente activas en Rambla Salada se llevó a cabo por RT-PCR y DGGE tras la extracción del ARN total de la muestra. La utilización de las técnicas basadas en el ARN permite detectar la proporción de las comunidades microbianas que presentan una actividad metabólica significativa respecto al total de la

comunidad. Esto es posible puesto que la cantidad del ARN por célula es proporcional a su actividad metabólica (Molin y Givskov, 1999; Nogales y col., 1999; Mills y col., 2004) y por lo tanto una mayor actividad celular es proporcional a un contenido elevado de ARN por célula. Asimismo, los estudios de microorganismos metabólicamente activos pueden ser interesantes puesto que permiten determinar e identificar microorganismos responsables de los procesos biogeoquímicos y de otras actividades en un ambiente natural.

El análisis de clúster de los patrones de DGGE de la comunidad metabólicamente activa mostró resultados ligeramente diferentes dependiendo del coeficiente utilizado. El patrón de diversidad basado en las intensidades de bandas (dendrograma basado en el coeficiente de Pearson, Figura 75) reveló una clara separación entre las muestras correspondientes a la época de junio de 2006 y el grupo que incluye las muestras tomadas en febrero y noviembre de 2007. Sin embargo, los resultados de agrupamiento según el coeficiente de Dice (Figura 76) fueron similares a los obtenidos en el análisis de la comunidad de arqueas (a partir de ADN) con el mismo coeficiente (Figura 67). En este análisis las tres épocas de muestreo se separaron claramente en tres clústers.

Existen varios trabajos que han demostrado que la aplicación de la técnica de PCR en muestras heterogéneas, como las muestras ambientales, puede influir en la cuantificación de los microorganismos de una muestra y por tanto en el índice de Pearson (Farrelly y col., 1995, Suzuki y Giovannoni, 1996, Polz y Cavanaugh, 1998, Suzuki y col., 1998). De acuerdo con este hecho, varios autores han optado por otros índices para determinar la similitud entre comunidades como el índice de Dice (Murray y col., 1996 y 1998; Liu, 1997; Lindström, 1998; Schwalbach y col., 2005; Hewson, 2006a y 2006b). En nuestro estudio, el agrupamiento basado en ausencia-presencia de bandas utilizando el coeficiente de Dice parece ser más coherente con las características físico-químicas de cada época, especialmente con el contenido de sal (Tabla 28).

En términos generales, las comunidades de arqueas de Rambla Salada (la obtenida a partir del ADN total y la metabólicamente activa) mostraron un patrón general de cambio temporal (época de muestreo) que resultó más marcado en el muestreo de febrero de 2007 respecto a las otras épocas.

El análisis filogenético de las secuencias de las bandas extraídas del DGGE mostró la dominancia del phylum *Euryarchaeota* (Figura 77). Dentro de este último, se encontraron mayoritariamente arqueas del orden *Halobacteriales* y una sola clase de banda (R1), representando el orden *Methanosarcinales*. Igualmente al analizar la comunidad de arqueas a partir de ADN se constató este hecho. La mayor riqueza de la familia *Halobacteriaceae* en ambas comunidades de arqueas (a partir de ADN y ARN) puede ser explicada por la concentración de sal de las muestras de Rambla Salada. Recientemente, Mwirichia y col. (2010) y Paul Antony y col. (2012) también demostraron al analizar la población

metabólicamente activa de lagos haloalcalinos la predominancia del orden *Halobacteriales* así como la presencia de miembros del orden *Methanosarcinales*.

La familia *Halobacteriaceae* incluye miembros que pueden crecer tanto aeróbicamente como anaeróbicamente; además se encuentra ampliamente distribuida en lagos hipersalinos y en cristalizadores de sal (Maturrano y col., 2006a; Mutlu y col., 2008; Caton y col., 2009; Benloch y col., 2001; Burns y col., 2004; Oh y col., 2010; Pâsic y col., 2005). La abundancia del orden *Halobacteriales* (comunidad de arqueas metabólicamente activas) en Rambla Salada, independientemente de la concentración de sales, puede relacionarse con el alto contenido de materia orgánica de las muestras estudiadas. En la literatura, las arqueas pertenecientes al orden *Halobacteriales* se describen como los organismos más activos respecto a la degradación de la materia orgánica en ambientes hipersalinos (Auguet y col., 2010).

En relación con el orden *Halobacteriales*, se observó la presencia de once géneros (*Haloarcula*, *Halorubrum*, *Halorhabdus*, *Halorussus*, *Halobacterium*, *Halomicrobium*, *Halolamina*, *Natronomonas*, *Haladaptatus*, *Haloterrigena* y *Halobaculum*) en la mayoría de las zonas muestreadas a lo largo del tiempo, incluso en zonas con baja salinidad. Algunos de estos géneros no fueron detectados en el análisis de la comunidad de arqueas a partir de ADN total de las muestras.

Purdy y col. (2004) describieron una comunidad diversa de haloarqueas en sedimentos de salinas costeras capaces de crecer en concentraciones bajas de salinidad (2,5%, p/v). Sus resultados fueron similares a los obtenidos al analizar la comunidad de arqueas (a partir de ADN) en el mismo hábitat. Existen pocos trabajos que caracterizan la diversidad microbiana en las mismas muestras a partir de ADN y ARN (Teske y col., 1996; Nogales y col., 1999 y 2001; Mills y col., 2005; Moeseneder y col., 2005), pero en ellos, la diversidad encontrada utilizando ADN y ARN fue diferente, al igual que ocurre en nuestro trabajo.

Es importante recalcar que cuando se analizó la comunidad de arqueas a partir de ADN, se encontró que el género *Haloarcula* (bandas A22, A23 y A24) es el dominante en los tres muestreos analizados mostrando una abundancia bastante alta (28,29%) respecto al total de la comunidad de arqueas predominantes. También ocurre esto cuando se estudió la comunidad de arqueas a partir de ARN; se obtuvieron seis clases de bandas (bandas R23, R24, R25, R26, R27 y R30) que correspondieron a dicho género y mostraron un 38,43% de abundancia respecto al total de la comunidad de arqueas metabólicamente activas. El hecho de que hayamos detectado como población mayoritaria miembros del género *Haloarcula* en ambas comunidades, puede ser explicado por su alto potencial metabólico. Por otro lado, las condiciones de pH (Tabla 28) en Rambla Salada podrían ser unos de los factores clave en este hecho, puesto que la mayoría de los miembros de este género requieren pH neutros. Varios estudios de la diversidad microbiana en diversos ambientes hipersalinos también

mostraron la dominancia de miembros del género *Haloarcula* (Antón y col., 1999; Benlloch y col., 2002; Burns y col., 2004; Özcan y col., 2007; Makhdoumi-Kakhki y col., 2012b).

Por otro lado, cabe mencionar que el género *Halorubrum* (bandas R34, R35, R39, R40, R44 y R45) mostró también una abundancia bastante alta (14,30%) en el análisis del gen del ARNr 16S. En la literatura (McGenity y Grant, 1995 y 2001; Ochsenreiter y col., 2002; Burns y col., 2004; Makhdoumi-Kakhki y col., 2012b) se ha encontrado que los miembros de este género se encuentran ampliamente distribuidos en los ambientes hipersalinos donde desempeñan papeles importantes en los ciclos del carbono y nitrógeno.

Los miembros del género *Halorhabdus* fueron encontrados con una alta abundancia en junio de 2006 y en noviembre de 2007 tanto en la población predominante de arqueas como en la población metabólicamente activa. La abundancia de este género fue del 17,41% y del 12,64% respectivamente. *Halorhabdus* se compone de dos especies, *Halorhabdus utahensis* que se aisló a partir de sedimentos del gran lago salado (Wainø y col., 2000) y *Halorhabdus tiamatea* aislada a partir de sedimentos del norte del Mar Rojo (Antunes y col., 2008). Los estudios publicados por Ochsenreiter y col. (2002), Jiang y col. (2006), Mesbah y col. (2007), Mutlu y col. (2008) no describieron el género *Halorhabdus* como dominante, sin embargo, Makhdoumi-Kakhki y col. (2012b) encontraron que este taxón es uno de los dominantes en el lago Aran-Bidgol en Irán. Estos autores hallaron que el 16% de los clones y el 12,5% de abundancia relativa de las bandas de DGGE estaba relacionada con el género *Halorhabdus*.

Es interesante comentar que el filotipo Phy43Medsalt2C8, que representa una haloarquea no cultivada (bandas R3, R4, R7, R8, R12, R14, R18, y R38), es exclusivo de la comunidad de arqueas metabólicamente activas, no habiéndose detectado en el estudio de la población de arqueas dominantes. Este filotipo fue encontrado con mayor abundancia en de junio de 2006 (13,88%). Se ha detectado (Oxley y col., 2010) en muestras de la mucosa humana y probablemente tiene su origen en la ingestión de determinados alimentos salados ya que se encuentra en salinas y lagunas saladas de donde se obtiene la sal. Oxley y col. (2010) además de demostrar la supervivencia de haloarqueas en el sistema digestivo sugieren su posible implicación en trastornos intestinales.

El análisis de los índices de diversidad de la población de arqueas metabólicamente activas demostró, al igual que ocurre con la diversidad de la población de arqueas (obtenida a partir de ADN), que ésta presenta una serie de diferencias significativas entre las distintas épocas de muestreo.

En lo que respecta al rango ponderado de la riqueza (*Rr*), el mayor valor se obtuvo en noviembre de 2007 ( $23,93 \pm 13,16$ ) indicando una diversidad típica de ambientes caracterizados con una riqueza media (Marzorati y col., 2008). En este sentido, las curvas de *Pareto-Lorenz* (*PL*) mostraron valores de *Fo* que oscilaron entre el 40% y el 60% (Figura 80

y Tabla 48) en la mayoría de las muestras. Este hecho indicó que las comunidades de arqueas metabólicamente activas son muy equilibradas y que por lo tanto, pueden conservar su funcionalidad frente a los cambios de las condiciones ambientales (Marzorati y col., 2008). Sin embargo, los valores de  $F_o$  obtenidos en las muestras correspondientes a noviembre de 2007 superaron el 60%, lo cual indicó que la comunidad de arqueas en esta época fue más especializada, puesto que se caracterizó por la existencia de un número pequeño de miembros dominantes (un 20% de los individuos presentaban el 60% del total de las intensidades de bandas) (Marzorati y col., 2008).

En relación con el índice de diversidad de *Shannon-Weaver* ( $H'$ ) (Shannon y Weaver, 1949), las muestras correspondientes a junio de 2006 mostraron el valor más alto ( $2,42 \pm 0,37$  de promedio), aunque no ha sido la época con mayor rango ponderado de riqueza ( $Rr$ ). La no coincidencia entre el rango ponderado de riqueza ( $Rr$ ) y el índice de *Shannon-Weaver* ( $H'$ ) es debido a que, a pesar de tener ambos índices en cuenta el número de bandas, el primero considera también el gradiente del DGGE en el que están distribuidas las bandas (Marzorati y col., 2008), y el índice de *Shannon-Weaver* ( $H'$ ) tiene también en consideración la intensidad de las bandas. Las muestras obtenidas en noviembre de 2007 originaron 17 bandas (de promedio) en un gradiente desnaturalizante de DGGE del 45% al 60%, lo que determinó un  $Rr$  de  $23,93 \pm 13,16$  de promedio. Las muestras de junio de 2006 originaron un total de 15 bandas de promedio en el mismo gradiente desnaturalizante de DGGE y por ello el  $Rr$  fue menor. El índice de *Shannon-Weaver* ( $H'$ ) sin embargo, para el muestreo de noviembre de 2007, fue más bajo ( $2,06 \pm 0,21$ ) que el obtenido en junio de 2006 ( $2,42 \pm 0,37$ ) ya que en este último las bandas fueron más intensas.

El índice de *Simpson* ( $SI$ ) mostró una relación inversa con el índice de *Shannon-Weaver* ( $H'$ ). El mayor valor lo presentaron las muestras tomadas en febrero de 2007 ( $0,27 \pm 0,08$  de promedio) y el valor más bajo se observó en la época de junio de 2006 ( $0,27 \pm 0,05$  de promedio). Es decir, al igual que ocurre cuando se analizó la diversidad de la población de arqueas a partir del ADN total, la diversidad de arqueas metabólicamente activas es diferente según la época de muestreo siendo el de junio de 2006 el que presentó mayor diversidad.

Una posible interpretación de la existencia de una mayor diversidad en junio de 2006 podría ser la mayor concentración salina existente en esta época. De hecho, nuestro grupo de investigación (Luque y col., 2012a) obtuvo resultados similares cuando analizó la diversidad de arqueas en el mismo hábitat mediante métodos clásicos de cultivo utilizando los mismos sitios y épocas de muestreo.

El análisis de la distribución de la comunidad de arqueas metabólicamente activas en relación con los factores ambientales (Figura 82) confirmó que la salinidad influyó de manera significativa en la distribución de la mayoría de los taxa pertenecientes al orden *Halobacteriales*, como es el caso de los géneros *Halorhabdus*, *Halobacterium*, *Halomicrobium*, *Natronomonas*, *Haladaptatus* y *Halobaculum*. Los géneros *Haloarcula*,

*Halorubrum*, *Halorussus*, *Haloterrigena* y *Halolamina* estuvieron doblemente influenciados por la salinidad y por el pH. Los géneros *Halorubrum* y *Natronomonas* son arqueas haloalcalófilas, por lo que parece lógico este resultado.

Otras diferencias encontradas entre las comunidades de arqueas determinadas a partir de ADN y ARN se trata de las arqueas marinas relacionadas con *Thermoplasmatales*. Éstas solo se hallaron en la comunidad de arqueas determinada a partir de ADN, lo que podría indicar que aunque están presentes en el hábitat son metabólicamente inactivas. Resultados similares fueron publicados por Martínez y col. (2006). Estos autores detectaron la presencia de arqueas marinas del grupo III y otras arqueas marinas bentónicas relacionadas con *Thermoplasmatales* en la comunidad de arqueas determinada a partir de ADN en los sedimentos de un volcán de lodo activo en México, aunque sin embargo, ninguno de estos grupos se detectó como población metabólicamente activa.

Los géneros *Halorussus* (bandas R2, R5, R9, R11 y R13), *Halolamina* (bandas R19 y R20), *Haladaptatus* (bandas R41 y R43) y *Halobaculum* (banda R29) fueron detectados únicamente en la comunidad de arqueas metabólicamente activa. *Halorussus* y *Halolamina* fueron descritos por Cui y col. (2010 y 2011) como nuevos géneros de la familia *Halobacteriaceae*. El género *Halolamina* fue aislado del lago Aran-Bidgol en Irán por Makhdoui-Kakhki y col. (2012b), pero no fue hallado por métodos moleculares en el mismo estudio. El género *Haladaptatus* fue aislado por Savage y col. (2007) de un manantial (Zodletone) bajo en contenido de sal y rico en azufre, en el suroeste de Oklahoma, Estados Unidos. Este hecho no concuerda con nuestros resultados, ya que el género *Haladaptatus* fue encontrado en todas las muestras correspondientes al muestreo de junio de 2006 y en la zona de la surgencia muestreada en noviembre de 2007, época y zona que se caracterizan por una mayor concentración salina. El análisis ARD por otra parte, confirmó esta observación. Además, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Makhdoui-Kakhki y col. (2012b), quienes observaron que el género *Haladaptatus* constituía el 10% de las bandas de DGGE de muestras del agua del lago Aran-Bidgol en Irán; estas muestras se caracterizaban por tener un contenido de sal que osciló entre 30% y 33%, (p/v).

Entre las arqueas metanógenas, solo se detectó una secuencia (R1) relacionada con el género *Methanosaeta*. Mwirichia y col. (2010) encontraron dos clones afilados con este género al analizar la diversidad de arqueas en el lago haloalcalino Elmenteita en Kenya. Los miembros del género *Methanosaeta* se caracterizan por usar el acetato como único sustrato de la metanogénesis (Ma y col., 2006; Paul Antony y col., 2012).

El género *Methanosaeta* no fue detectado en la comunidad de arqueas determinada a partir de ADN. Sin embargo, se encontraron secuencias afiliadas al género *Methanolobus* mostrando una abundancia bastante alta (11,80%) respecto al total de la comunidad de arqueas a partir de ADN. La ausencia de este último género en la comunidad de arqueas metabólicamente activa nos hace pensar que los miembros del género *Methanolobus* no

fueron activos en el hábitat estudiado. Por otra parte, la abundancia del género *Methanosaeta* (banda R1) fue muy baja (0,32%), por lo que no se detectó en el estudio de la comunidad de arqueas a partir de ADN.

La banda (R10) asignada al phylum *Crenarchaeota*, fue encontrada en la zona de la Finca la Salina en el muestreo de junio de 2006. Su abundancia relativa respecto al total de la comunidad de arqueas metabólicamente activas fue muy baja (0,45%). Dicha zona se caracterizó por una baja salinidad, de hecho, los resultados obtenidos mediante el análisis Canoco apoyaron esta observación, ya que la banda (R10) se situó en el sentido contrario del eje de la salinidad. Jiang y col. (2009) encontraron resultados similares y concluyeron que el incremento de la sal hace disminuir la abundancia de miembros del phylum *Crenarchaeota*. Por otro lado, las bandas pertenecientes al phylum *Crenarchaeota* (A30, A32 y A33) halladas en la comunidad de arqueas determinada a partir de ADN mostraron un comportamiento similar.

El género *Haloquadratum* incluye especies halófilas extremas aerobias que se encuentran ampliamente distribuidas en hábitats hipersalinos, representando desde el 40% hasta el 80% del total de la comunidad en las aguas de los lagos salados y cristalizadores de salinas solares (Burns y col., 2004; Antón y col., 1999; Oh y col., 2010). Sin embargo, en este estudio no hemos encontrado secuencias afiliadas con este género, ni en la comunidad de arqueas determinada a partir de ADN ni en la comunidad determinada a partir de ARN, por lo que podemos deducir que las condiciones no son adecuadas para las especies de este género. Cabe pensar que el rango de concentraciones de sal existentes en Rambla Salada (1,1-15,8%, p/v de sales) no permite el crecimiento de este microorganismo.

Los resultados de la diversidad de arqueas total y metabólicamente activas en Rambla Salada mediante métodos moleculares fueron comparados con los obtenidos por métodos clásicos previamente publicados por nuestro grupo de investigación (Luque y col., 2012a) cuando se analizó la diversidad de arqueas cultivables en el mismo hábitat y en las mismas épocas de muestreo (Figura 86).





Al comparar los taxa identificados por ambas técnicas, observamos que la mayoría de los detectados por métodos moleculares no se corresponden con los aislados por Luque y col. (2012a). Únicamente los géneros *Haloarcula*, *Haloterrigena*, *Halorhabdus* y *Halomicrobium* fueron encontrados por ambas técnicas. Por otro lado, Luque y col. (2012a) describieron como taxa más abundantes los géneros *Haloferax* y *Natrinema*, mientras que en este trabajo, hemos comprobado que el género *Haloarcula* es el dominante.

Para determinar si los aislados obtenidos por Luque y col. (2012a) estaban filogenéticamente relacionados con los taxa detectados por técnicas moleculares, se incluyeron en el análisis filogenético las secuencias de los mismos, concretamente las secuencias de las cepas M2-7a, M3-7b, M3-9b y M3-1c.

Al incluir las secuencias de las cepas aisladas por Luque y col. (2012a) en nuestro estudio filogenético (Figura 68), la cepa M2-7a (Luque y col., 2012a) que corresponde con la especie *Haloarcula argentinensis*, resultó estar estrechamente relacionada con la banda A24 (*Haloarcula* sp.), obtenida en nuestro estudio; ambos filotipos compartían el 99% de identidad entre sí. Las cepas M3-7b y M3-9b identificadas por Luque y col. (2012a) como *Haloterrigena jeotgali* y *Haloterrigena thermotolerans*, respectivamente, se relacionaron (92,7% y 93% de identidad respectivamente) con la banda A29 (*Haloterrigena* sp.).

Además, en el estudio filogenético de las bandas de DGGE, la secuencia de la banda A19 descrita como *Halomicrobium*, no mostró relación ni con la cepa M3-1c aislada por Luque y col. (2012a) ni con la especie *Halomicrobium mukohataei* rrnB arg-2<sup>T</sup> usada como cepa de referencia. Sin embargo esta secuencia, (banda A19), se situó en el clúster que agrupaba las especies *Halomicrobium mukohataei* rrnA arg-2<sup>T</sup> y *Halomicrobium zhouii*, usadas como referencias (Figura 68), debido probablemente a la existencia de las tres copias del gen del ARNr 16S que posee la especie *Halomicrobium mukohataei*, con una variabilidad del 9% entre ellas (Tindall y col., 2009). Por último, cabe mencionar que la cepa M2-2d, aislada por Luque y col. (2012a) mostró un bajo porcentaje de identidad (89,4%) con el género *Halorhabdus*, por lo que no fue considerada en el análisis filogenético.

Por otro lado, en el análisis filogenético de la comunidad de arqueas metabólicamente activas, se observó que la banda R24 mostró un 96% de identidad con la cepa M2-7a aislada por (Luque y col., 2012a) que se corresponde con *Haloarcula argentinensis*,

Hay que destacar que *Haloarcula*, el taxón predominante en la población de arqueas (28,29%) y también en la población metabólicamente activa (38,43%), fue además encontrado por técnicas clásicas de cultivo (Luque y col., 2012a). Igualmente ocurre con *Haloterrigena*, que representó un 3,12% del total de la población de arqueas y un 6,18% de la población metabólicamente activa.

Para cuantificar la diversidad de arqueas en Rambla Salada, se llevó a cabo un análisis mediante la técnica CARD-FISH utilizando sondas específicas para el Dominio *Archaea*. Según los resultados obtenidos, la comunidad de arqueas más abundante fue encontrada en la época de junio de 2006 (16% respecto al total de las células teñidas con DAPI). Este hecho es coincidente con los resultados obtenidos mediante la técnica DGGE y los índices de diversidad. Es importante mencionar aquí que el porcentaje de abundancia relativa de la población de arqueas encontrada en Rambla Salada en las distintas épocas y lugares de muestreo osciló del 11% al 16% de la población total (DAPI). Por otra parte, los recuentos de las arqueas existentes en Rambla Salada fueron  $10^3$  órdenes de magnitud mayor que los recuentos de arqueas cultivables (UFC/ml) registrados en el mismo hábitat por Luque y col. (2012a).

El porcentaje de arqueas en hábitats hipersalinos es muy variable, y depende fundamentalmente del tipo de hábitat y de la concentración salina del mismo. Niederberger y col. (2010), al analizar la diversidad microbiana en un sedimento hipersalino en el Alto Ártico canadiense, encontraron que la comunidad de arqueas representaba el 3,8% respecto al total de células ( $4,3 \times 10^5$  células/ml). Sin embargo, Antón y col. (1999), describieron que la comunidad de arqueas en los estanques cristalizadores de una salina solar de Alicante, se hallado en porcentajes que oscilaban entre el 67,7% y el 73% respecto al total de la comunidad microbiana.

A la vista de la información obtenida y discutida en este capítulo, podemos concluir que el uso combinado del análisis de ADN y el ARN total de las muestras de Rambla Salada junto con el CARD-FISH para su cuantificación ha sido herramientas útiles para conocer la diversidad de arqueas en este ambiente. Los resultados del análisis del ARN nos permitieron identificar las arqueas metabólicamente activas y responsables por lo tanto, de la funcionalidad de la comunidad en este ambiente. Por otra parte, los resultados del análisis del ADN total han permitido identificar otros miembros de la comunidad no activos metabólicamente, pero si presentes en un alto porcentaje.

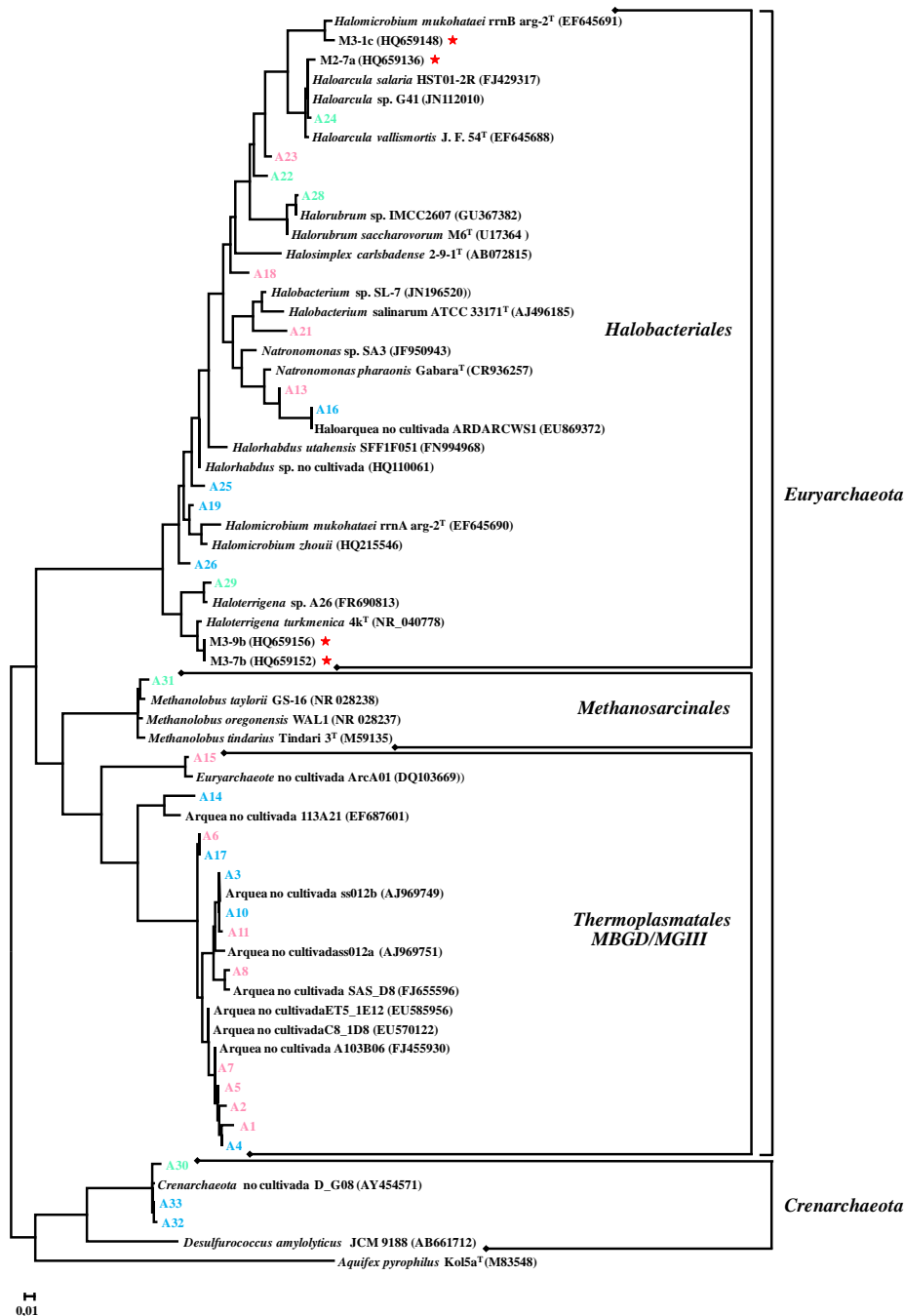
Los estudios de biodiversidad de arqueas realizados en este trabajo por técnicas moleculares se complementan con los desarrollados previamente por nuestro grupo de investigación (Luque y col., 2012a) con técnicas clásicas de cultivo. Aunque muchos de los taxa presentes en Rambla Salada no han podido ser cultivados, y otros taxa cultivados no se han detectado por técnicas moleculares, hay algunos hechos destacables. *Haloarcula*, un taxón detectado por técnicas moleculares como predominante en todas las zonas y épocas de muestreo, tanto en la comunidad de arqueas total como en la metabólicamente activa, fue aislado por Luque y col. (2012a) por métodos dependientes de cultivo.

De acuerdo con los análisis de DGGE y estadísticos, se encontraron variaciones temporales (época de muestreo) en la estructura, riqueza y uniformidad de las comunidades de arqueas (a partir de ADN y ARN), siendo la salinidad y el pH los factores que contribuyeron

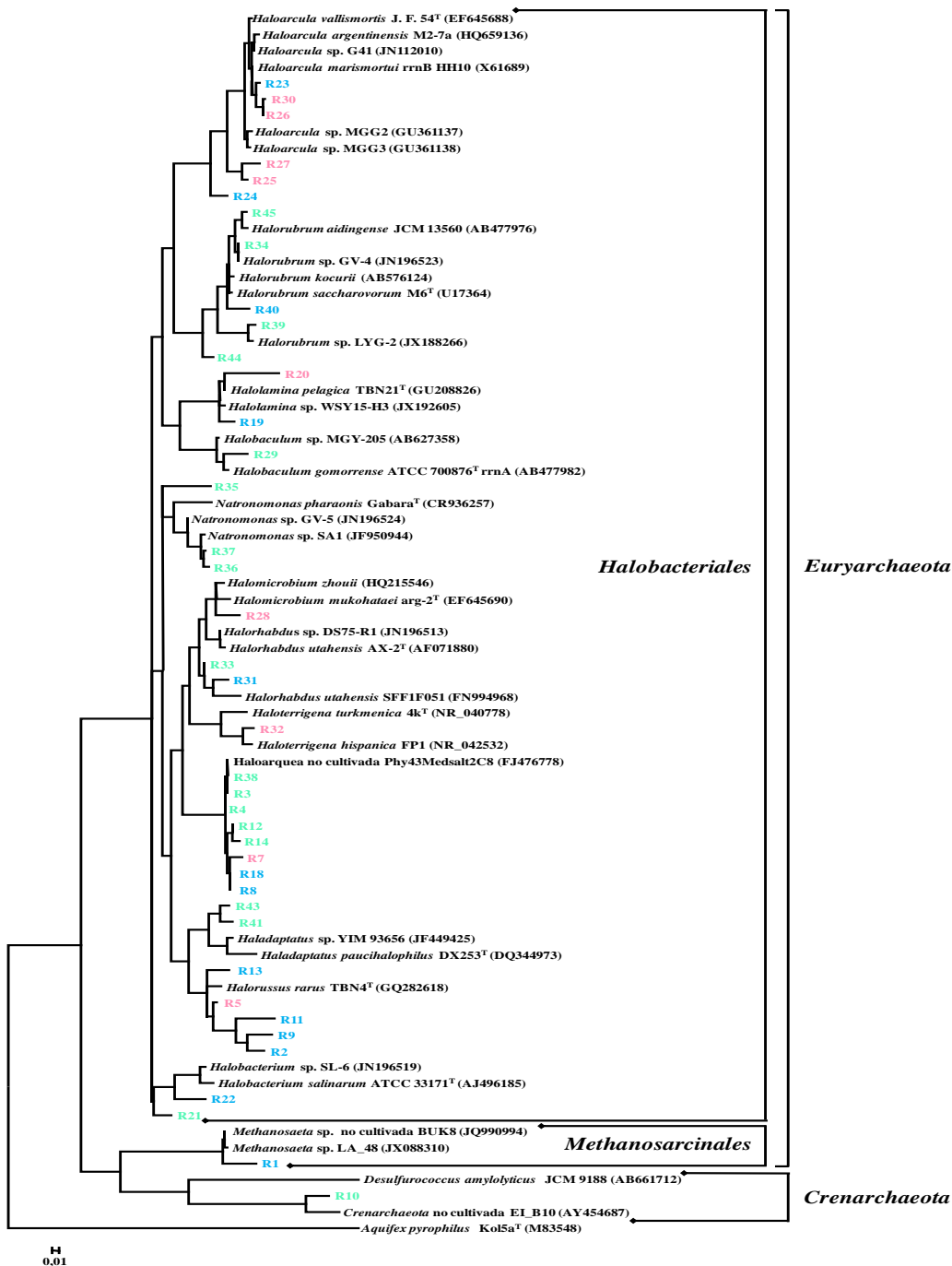
principalmente y de manera significativa en la composición y estructura de la diversidad de arqueas en Rambla Salada.

## **Material suplementario**





**Figura 87.** Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método Maximum-Likelihood. Los números de acceso en la base de datos Genbank de las secuencias de referencia se encuentran entre paréntesis. ★ Secuencias de las arqueas aisladas por Luque y col. (2012a). Secuencias obtenidas en junio de 2006 (A), febrero de 2007 (A) y noviembre de 2007 (A)



**Figura 88.** Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método de Maximum-Likelihood. Los números de acceso en la base de datos Genbank de las secuencias de referencia se encuentran entre paréntesis. ★ Secuencias de las arqueas aisladas por Luque y col. (2012a). Secuencias obtenidas en junio de 2006 (R), febrero de 2007 (R) y noviembre de 2007 (R)

**Tabla 51.** Valores de ausencia-presencia de las bandas encontradas en los perfiles de DGGE de la comunidad de arqueas (a partir de ADN) en las tres zonas y épocas de muestreo (matriz cualitativa)

		Presencia-ausencia de bandas de DGGE																																		
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20	A21	A22	A23	A24	A25	A26	A27	A28	A29	A30	A31	A32	A33	A34	
Zona y época de muestreo	Junio 2006	S1A	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
		S2A	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
		S3A	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
		S4A	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		S7A	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
		S8A	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
		S1B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	
		S2B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	
	Febrero 2007	S3B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1		
		S4B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0		
		S7B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	
		S8B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	
		Noviembre 2007	S1C	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	
			S2C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1
			S3C	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			S4C	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0
S7C	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	
S8C	0		0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Valor 0: banda ausente en un carril de DGGE, valor 1: banda presente en un carril de DGGE





**Tabla 53.** Valores de ausencia-presencia de las bandas encontradas en los perfiles de DGGE de la comunidad de arqueas (a partir de ARN) en las tres zonas y épocas de muestreo (matriz cualitativa)

		Presencia-ausencia de bandas de DGGE																																																		
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17	R18	R19	R20	R21	R22	R23	R24	R25	R26	R27	R28	R29	R30	R31	R32	R33	R34	R35	R36	R37	R38	R39	R40	R41	R42	R43	R44	R45	R46					
Zona y época de muestreo	Junio 2006	S1A	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0			
		S2A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1		
		S3A	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
		S4A	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0		
		S7A	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	
		S8A	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	
	Febrero 2007	S1B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		S2B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		S3B	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		S4B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		S7B	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
		S8B	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Noviembre 2007	S1C	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0
	S2C	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	S3C	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	S4C	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	S7C	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	
	S8C	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

Valor 0: banda ausente en un carril de DGGE, valor 1: banda presente en un carril de DGGE

**Tabla 54.** Intensidades relativas de las bandas encontradas en los perfiles de DGGE de la comunidad de arqueas (a partir de ARN) en las tres zonas y épocas de muestreo (matriz cuantitativa)

		Intensidad de bandas de DGGE																																																		
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17	R18	R19	R20	R21	R22	R23	R24	R25	R26	R27	R28	R29	R30	R31	R32	R33	R34	R35	R36	R37	R38	R39	R40	R41	R42	R43	R44	R45	R46					
Zona y época de muestreo	Junio 2006	S1A	0	0	0	2	0	0,68	0	0	0	2,71	0	0	0	0,72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,58	0	0,89	0	0,62	11,03	11,35	0	0	0	17,02	0	0	14,63	0	5,18	16,45	0	14,62	0	0	0	1,5	0			
		S2A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12,37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9,88	0	5,3	0	0	0	0	0	0	35,02	0	0	9	0	4,78	3,41	0	9,54	0	0,87	0	1,98	7,84			
		S3A	0	10,53	8,75	7,2	0	0	8,85	0	0	0	0	1,95	3,4	2,36	0	0	0	0	0	0	6,89	0	9,71	0	0	2,62	0	0	3,99	0	1,64	0	0	7,11	0	0	5,14	0	6,74	1,84	0	2	1,62	0	5,49	0	2,2			
		S4A	0	0	2,94	0	0	0	0,41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8,7	0	3,88	0	0	3,24	0	0	8,57	20,23	6,56	31,37	0	12,29	0	0	1,82	0	0		
		S7A	0	0	1,19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	4,52	2,65	0,94	5,41	11,58	0	20,04	19,82	0	0	3,86	13,27	7,52	5,93	2,54	0	0	0		
		S8A	0	0	0,65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,17	0	0	0	0	0	0,03	0	1,13	0	0	0	0	0	2,29	3,88	11,72	9,66	0	2,22	10,18	15,08	10,68	14,67	0	8,83	0	0,63	0,89	2,99	2,95	0,35	0	0		
	Febrero 2007	S1B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,39	0	0	0	0	6,63	0	2,53	0	0	15,7	0	28,72	0	17,85	28,17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
		S2B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4,49	0	52,47	0	0	19,56	0	8,15	0	0	15,33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		S3B	0	0	0	1,64	1,16	0	2,02	0	0	0	0,39	0	0,08	0,36	0,08	0	0,47	0	0	4,63	5,3	3,86	0	2,04	0	1,13	13,07	15,97	0	3,5	21,4	11,36	0	0,44	11,11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		S4B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,34	26,44	0	0	44,59	0	0	9,19	0	16,43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		S7B	0	0	0	0	0	0	0,17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,71	0	6,41	0	4,92	29,21	11,14	0	24,25	0,46	0	4,77	0	14,96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		S8B	0	0	0	0	0	0	1,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,13	1,43	0,88	0	0	4,5	11,71	12,57	15,87	3,42	0	30,9	0,96	0	1,94	0	14,66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Noviembre 2007	S1C	0,18	1,15	0	0	0	0	0	0	0,06	0	1,05	0	0	0	0	0,83	0,8	0,61	0	2,22	1,34	5,52	0	0	13,37	3,02	20,88	0	0	20,07	4,53	0	9,71	0	1,13	2,02	0	4,54	1,74	2,11	0	0	0	1,82	1,32	0				
		S2C	0,57	1,36	0	0	0	0	0	0	0	0,09	0	0,58	0	0,23	0	0	0	0	0,55	0	2,79	16	14,57	10,69	0	3,15	14,78	1,04	0,75	0	2,45	13,36	16,13	0	0,07	0,09	0	0,75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		S3C	0,25	0,63	0	0	0	0	0	0	1,03	0	0,79	0	0	0	0,33	0	0	0	0,91	0	0	6,96	5,76	3,66	0	18,06	18,05	0,85	0	7,36	0	20,57	14,6	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		S4C	0,96	1,74	0	0	0	0	0	0	0,47	0	0	0	0	0,17	0,17	0	0	0	1,13	0	0	0,98	0	0	3,74	9,55	18,09	13,03	3,17	0	0	20,76	25,5	0	0	0	0	0	0,54	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		S7C	0	0,14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,6	3,75	0	0	0,47	0	0	0	12,46	42,91	0	0	0	10,78	0	17,93	0	0	2,35	0	2,47	2,13	0	1,31	1,7	0	0	0	0	0			
		S8C	0	0,33	0	0	0	0	0	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,68	0	1,67	4,64	5,23	0	0	20,46	36,67	16,3	7,53	0	2,37	0,36	0,82	1,85	0	0	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0,01	0	0	0	



## **II. 4. Diversidad de *Halomonas* en Rambla Salada**



# Resumen

Los resultados del análisis de los perfiles de DGGE utilizando cebadores específicos para el gen del ARNr 16S de *Halomonas* han demostrado que la temporalidad (fecha de muestreo) resultó ser más importante que la zona de muestreo en la determinación de la composición de la comunidad del género *Halomonas* en este hábitat. La mayor diversidad de dicho género fue encontrada en junio de 2006, la época que se caracteriza por su mayor concentración salina. La correlación entre la comunidad de *Halomonas* y los factores ambientales se analizó mediante la ordenación de correspondencia canónica (ACC) con el programa estadístico Canoco. Así, se observó que la salinidad y el pH son los factores que influyen significativamente en la distribución de las comunidades de *Halomonas* en Rambla Salada.

El análisis filogenético de las secuencias de los perfiles de DGGE reveló la predominancia de las especies desnitrificantes durante las tres épocas de muestreo (62% del total). Entre ellas, *Halomonas almeriensis* fue la más abundante, correlacionándose positivamente con el pH y de forma ligeramente negativa con la salinidad.

La utilización de sondas diseñadas por nuestro grupo de investigación para detectar los genes *nirS* y *nosZ* nos ha permitido identificar algunos nuevos filotipos desnitrificantes que no se habían hallado utilizando los cebadores del gen del ARNr 16S específicos para el género *Halomonas*.

A través de la técnica CARD-FISH hemos descubierto que *Halomonas* representa menos del 1% del total de la microbiota hallada en Rambla Salada.

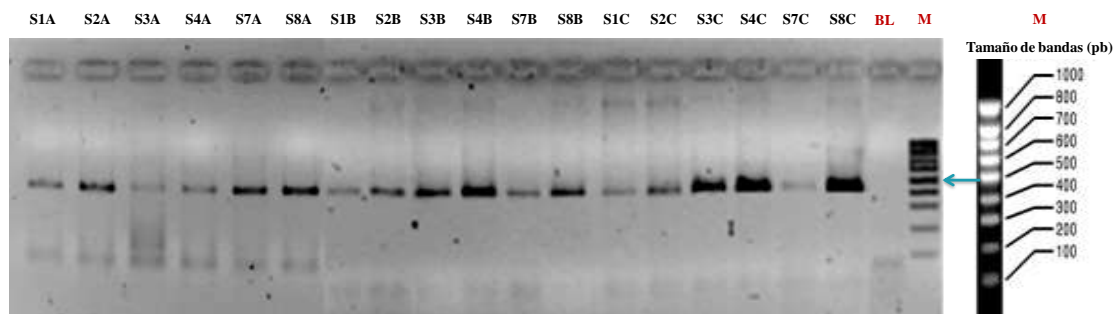




## II. 4. 1. Diversidad de *Halomonas*

### *Amplificación por PCR del gen del ARNr 16S*

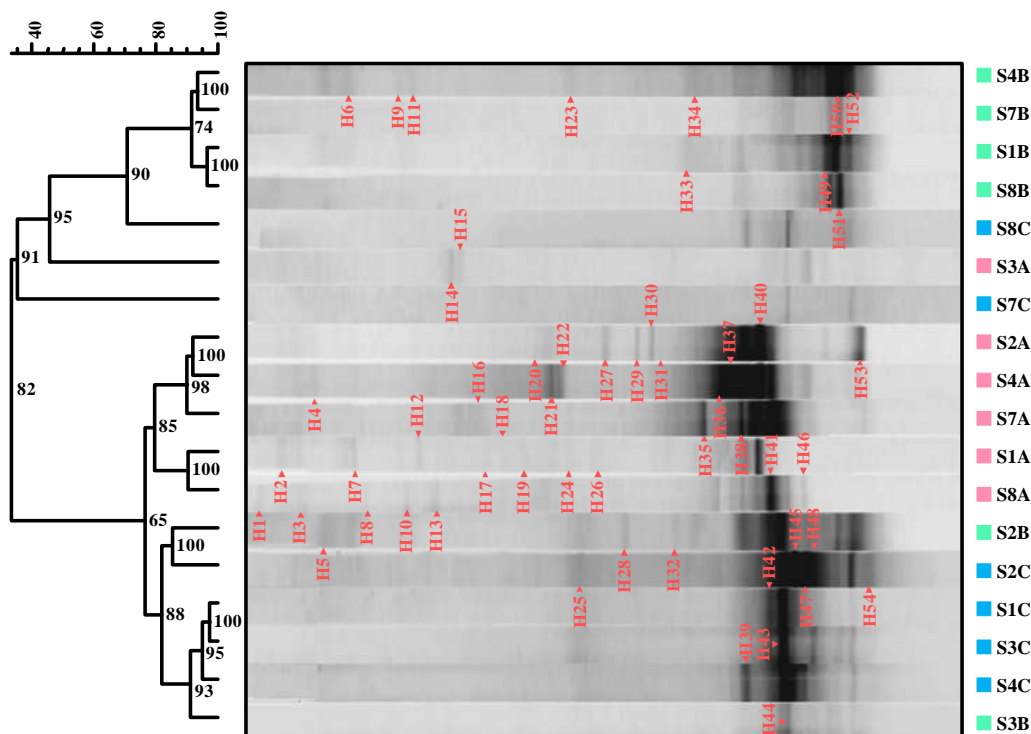
Las condiciones de PCR mencionadas en el apartado II. 4 de Material y Métodos dieron lugar a amplificaciones específicas para las especies del género *Halomonas* utilizadas, apareciendo una banda del tamaño esperado (500pb) en todas las muestras (Figura 89). No se obtuvieron bandas en los controles negativos. Todas las amplificaciones se realizaron por triplicado.



**Figura 89.** Productos de amplificación del gen ARNr 16S (500pb). **SA:** Muestras tomadas en junio de 2006, **SB:** Muestras tomadas en febrero de 2007, **SC:** Muestras tomadas en noviembre de 2007. **M:** Marcador Molecular (1000pb). **BL:** Blanco

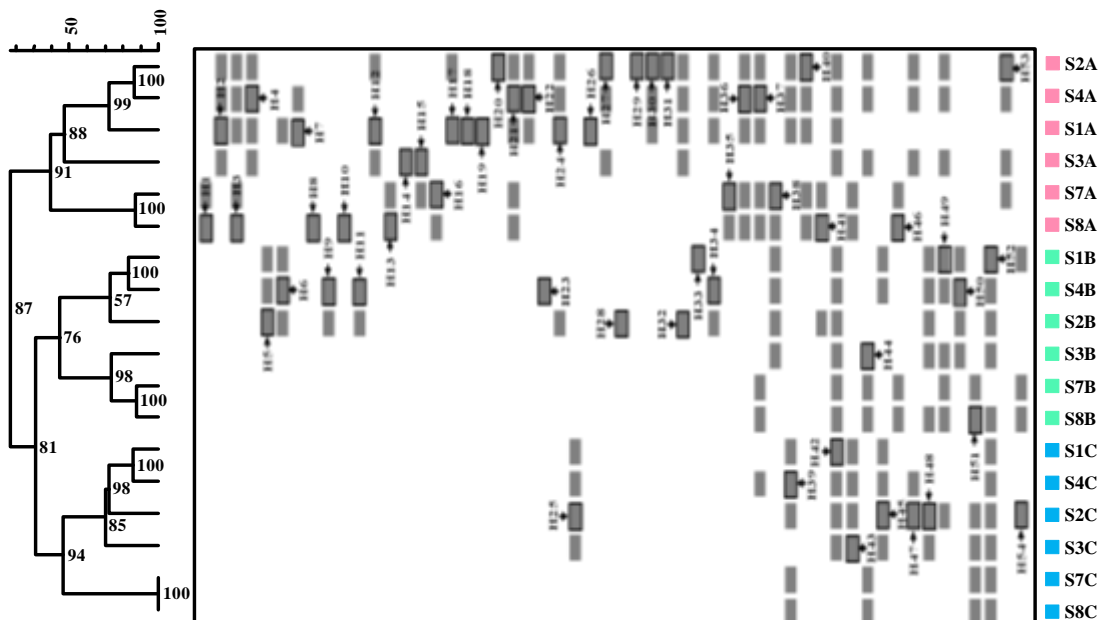
### *DGGE*

Mediante DGGE se detectaron 54 clases de bandas en las 18 muestras analizadas. Los patrones de DGGE de las distintas muestras, tomadas en diferentes épocas, se compararon mediante el software FPquest. El dendograma basado en el coeficiente de Pearson que tiene en cuenta la intensidad de las bandas (Figura 90), reveló la formación de dos grupos con el 34% de similitud entre ellos. El primer grupo incluyó a la mayoría de las muestras tomadas en febrero 2007, cuatro muestras que comparten un 91% de similitud, y tres muestras, S7C, S8C y S3A, tomadas en noviembre de 2007 y junio de 2006 respectivamente, y que mostraron una menor semejanza. Por otro lado, el segundo grupo incluye el resto de las muestras tomadas en junio de 2006 y noviembre de 2007, así como dos muestras de febrero de 2007 (S2B y S3B) con un nivel de semejanza del 76% entre ambas.



**Figura 90.** Análisis de los perfiles de DGGE basado en el coeficiente de Pearson y el método de unión de enlace medio (UPGMA). La escala indica el porcentaje de similitud. Los números en los nodos representan los valores del coeficiente de correlación cofenético. **SA** ■: Muestras tomadas en junio de 2006, **SB** ■: Muestras tomadas en febrero de 2007, **SC** ■: Muestras tomadas en noviembre de 2007

En el dendrograma de la Figura 91, obtenido a partir del coeficiente de Dice que tiene en cuenta la presencia-ausencia de bandas, se observó más claramente la separación en función de la época de muestreo. El patrón de bandas de las muestras tomadas en junio de 2006 formó un clúster que, indicaba que esta época se caracteriza por una comunidad de *Halomonas* diferente respecto a las otras épocas estudiadas. Dentro del clúster mayor, las muestras tomadas en febrero de 2007, con una semejanza del 45% entre sí, se separaron de aquellas tomadas en noviembre de 2007. El análisis de agrupamiento mediante Dice confirmó, por otra parte, la separación de las muestras de la zona de la surgencia (muestras S7 y S8) en una rama diferente en cada época de muestreo (Figura 91).



**Figura 91.** Análisis de los perfiles de DGGE basado en el coeficiente de Dice y el método de unión de enlace medio (UPGMA). La escala indica el porcentaje de similitud. Los números en los nodos representan los valores del coeficiente de correlación cofenética. ➔/□ Bandas cortadas, reamplificadas y secuenciadas. **SA** ■: Muestras tomadas en junio de 2006, **SB** ■: Muestras tomadas en febrero de 2007, **SC** ■: Muestras tomadas en noviembre de 2007

### Análisis de las secuencias

De un total de 54 clases de bandas detectadas en los perfiles de DGGE de la comunidad de *Halomonas* en las tres épocas de muestreo, se reamplificaron con éxito y se secuenciaron un total de 44 bandas (alrededor de 500pb). Las bandas H1, H5, H6, H9, H11, H14, H15, H23, H25 y H28, cuya posición se muestra en la Figura 91, no pudieron ser secuenciadas.

Para llevar a cabo el estudio filogenético, se compararon las secuencias obtenidas a partir de las bandas escindidas de los patrones de DGGE con la misma región de los genes del ARNr 16S existentes en la base de datos Genbank. La asignación de las bandas secuenciadas se resume en la Tabla 55. Todas las secuencias mostradas en dicha tabla fueron depositadas en la base de datos Genbank donde también aparecen los números de acceso. Todas ellas mostraron más del 96% de identidad con las secuencias de referencia. Por otra parte, en el árbol filogenético basado en el algoritmo Neighbour-Joining que se muestra en la Figura 92, se observó la formación de dos grupos filogenéticos principales con distintas especies del género *Halomonas*, y un tercer grupo que incluyó las especies utilizadas como grupos externos.

**Tabla 55.** Identificación de las secuencias del gen del ARNr 16S obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE, las bandas H1, H5, H6, H9, H11, H14, H15, H23, H25 y H28 no pudieron ser secuenciadas

Clase de banda	Número de acceso	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
H2	JX997648	<i>H. ventosae</i> M4-15 (JQ811031)	99
H3	JX997649	<i>H. ventosae</i> M4-38 (JQ811054)	99
H4	JX997650	<i>H. ventosae</i> M4-38 (JQ811054)	99
H7	JX997651	<i>H. ventosae</i> M4-22 (JQ811039)	99
H8	JX997652	<i>H. sabkhae</i> 5-3 <sup>T</sup> (NR_044217)	99
H10	JX997653	<i>H. sabkhae</i> 5-3 <sup>T</sup> (NR_044217)	99
H12	JX997654	<i>H. ventosae</i> M4-22 (JQ811039)	99
H13	JX997655	<i>H. sabkhae</i> 5-3 <sup>T</sup> (NR_044217)	99
H16	JX997656	<i>H. halmophila</i> ATCC 19717 <sup>T</sup> (NR_042064)	100
H17	JX997657	<i>H. ventosae</i> M4-22 (JQ811039)	100
H18	JX997658	<i>H. ventosae</i> M4-38 (JQ811054)	100
H19	JX997659	<i>H. ventosae</i> M4-15 (JQ811031)	100
H20	JX997660	<i>H. ventosae</i> M4-38 (JQ811054)	99
H21	JX997661	<i>H. ventosae</i> M4-38 (JQ811054)	100
H22	JX997662	<i>H. ventosae</i> M4-22 (JQ811039)	99
H24	JX997663	<i>H. ventosae</i> M4-15 (JQ811031)	99
H26	JX997664	<i>H. ventosae</i> M4-38 (JQ811054)	99
H27	JX997665	<i>H. ventosae</i> M4-38 (JQ811054)	99
H29	JX997666	<i>H. ventosae</i> M4-22 (JQ811039)	99
H30	JX997667	<i>H. ventosae</i> M4-38 (JQ811054)	99
H31	JX997668	<i>H. ventosae</i> M4-22 (JQ811039)	99
H32	JX997669	<i>H. ventosae</i> M4-15 (JQ811031)	99
H33	JX997670	<i>H. ilicicola</i> SP8 <sup>T</sup> (NR_044436)	98
H34	JX997671	<i>H. ventosae</i> M4-22 (JQ811039)	99
H35	JX997672	<i>H. halmophila</i> ATCC 19717 <sup>T</sup> (NR_042064)	99
H36	JX997673	<i>H. ventosae</i> M4-22 (JQ811039)	100
H37	JX997674	<i>H. halmophila</i> ATCC 19717 <sup>T</sup> (NR_042064)	99

Tabla 55. Continuación

Clase de banda	Número de acceso	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
H38	JX997675	<i>H. almeriensis</i> M3-47 (JQ810968)	99
H39	JX997676	<i>H. ventosae</i> M4-22 (JQ811039)	99
H40	JX997677	<i>H. ventosae</i> M4-38 (JQ811054)	100
H41	JX997678	<i>H. almeriensis</i> M3-47 (JQ810968)	100
H42	JX997679	<i>H. almeriensis</i> M3-47 (JQ810968)	100
H43	JX997680	<i>H. almeriensis</i> M3-47 (JQ810968)	100
H44	JX997681	<i>H. campisalis</i> M2-61 (JQ810888)	98
H45	JX997682	<i>H. stenophila</i> B-100 (HM357129)	99
H46	JX997683	<i>H. nitroreducens</i> 12CR (EF613114)	99
H47	JX997684	<i>H. saccharevitans</i> whb37 (FJ444983)	98
H48	JX997685	<i>H. ilicicola</i> SP8 <sup>T</sup> (NR_044436)	97
H49	JX997686	<i>H. ilicicola</i> SP8 <sup>T</sup> (NR_044436)	97
H50	JX997687	<i>H. ilicicola</i> SP8 <sup>T</sup> (NR_044436)	97
H51	JX997688	<i>H. kenyensis</i> AIR-2 <sup>T</sup> (AY962237)	98
H52	JX997689	<i>H. ilicicola</i> SP8 <sup>T</sup> (NR_044436)	97
H53	JX997690	<i>H. kenyensis</i> AIR-2 <sup>T</sup> (AY962237)	98
H54	JX997691	<i>H. salina</i> XJSL6-8 (GQ903437)	96

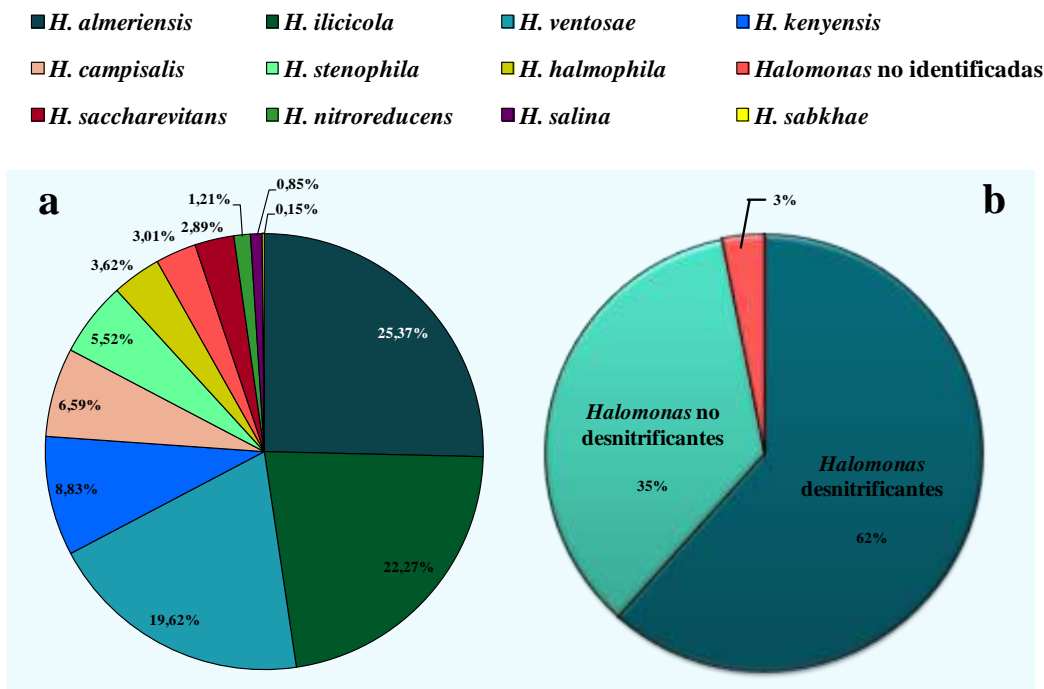
El clúster I está formado por dos grupos, uno mayoritario constituido por las secuencias relacionadas con *H. ventosae* y otro con las secuencias relacionadas con *H. saccharevitans*, *H. nitroreducens*, *H. stenophila*, *H. salina*, *H. almeriensis*, *H. sabkhae* y *H. halmophila*. Las bandas correspondientes a las especies *H. campisalis* y *H. kenyensis*, las cuales son especies haloalcalófilas desnitrificantes, constituyeron un filotipo separado junto con la especie *H. ilicicola*. Las especies *Cobetia marina* DSM 4741<sup>T</sup> (AJ306890), *Carnimonas nigrifaciens* CTCBS1<sup>T</sup> (Y13299) y *Salinicola socius* SMB35<sup>T</sup> (DQ979342) fueron usadas en el análisis filogenético como “outgroups”.

El árbol filogenético obtenido mediante el algoritmo Maximum-Likelihood muestra una topología similar (véase el apartado de material suplementario).



**Figura 92.** Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método de Neighbour-Joining. Los números de acceso en la base de datos Genbank de las secuencias de referencia se encuentran entre paréntesis. Se indican los valores de “bootstrap” mayores del 50%. Secuencias obtenidas en junio de 2006 (H), febrero de 2007 (H) y noviembre de 2007 (H)

En la Figura 93a se muestra la abundancia relativa de las especies del género *Halomonas* y en la Figura 93b la población de especies desnitrificantes respecto al total de la comunidad de *Halomonas*.



**Figura 93.** Abundancia relativa de especies de *Halomonas* (a) y especies desnitrificantes (b) en los tres muestreos

Como se puede apreciar en la Figura 93a, las especies *H. almeriensis*, *H. ilicicola* y *H. ventosae* son las más abundantes en Rambla Salada, con un porcentaje de 25,37%, 22,27% y 19,62% respectivamente con respecto al total de la población.

El análisis de la población desnitrificante de la comunidad de *Halomonas* representó el 62% del total de la comunidad, mientras que las especies de *Halomonas* no desnitrificantes formaron el 35% del total de la comunidad. El 3% restante no se pudo identificar (Figura 93b).

La Tabla 56 muestra la abundancia relativa de las especies del género *Halomonas* (intensidad de las bandas de DGGE) identificados en cada época en las que se han realizado los muestreo.

**Tabla 56.** Abundancia relativa (en %) de las especies de *Halomonas* (intensidad de bandas de DGGE) identificados en las tres épocas de muestreo

Especies de <i>Halomonas</i>	Junio de 2006	Febrero de 2007	Noviembre de 2007
<i>H. almeriensis</i>	22,25	15,89	37,96
<i>H. ilicicola</i>	1,18	46,02	19,62
<i>H. ventosae</i>	52,57	0,61	5,70
<i>H. kenyensis</i>	1,90	13,94	10,66
<i>H. campisalis</i>	2,11	8,92	8,73
<i>H. stenophila</i>	0,00	6,49	10,07
<i>H. halmophila</i>	9,97	0,58	0,32
<i>Halomonas</i> no identificadas	4,85	2,56	1,63
<i>H. saccharevitans</i>	4,05	0,00	4,63
<i>H. nitroreducens</i>	0,63	3,02	0,00
<i>H. salina</i>	0,00	1,92	0,65
<i>H. sabkhae</i>	0,46	0,00	0,00

La Figura 94 representa la diversidad del género *Halomonas* en cada época de muestreo.

A partir de los resultados expuestos, se observó que *H. almeriensis* (clase de bandas H38, H41, H42 y H43), resultó ser la especie más abundante en las tres épocas de muestreo respecto al total de la comunidad hallada en Rambla Salada (22,25%, 15,89% y 37,96% de abundancia relativa en junio de 2006, febrero de 2007 y noviembre de 2007 respectivamente).

Las secuencias (H2, H3, H4, H7, H12, H17, H18, H19, H20, H21, H22, H24, H26, H27, H29, H30, H31, H32, H34, H36, H39 y H40) afiliadas con *H. ventosae* fueron dominantes en el muestreo de junio de 2006 (52,57% de abundancia relativa, Tabla 56) y se agruparon en un filotipo común dentro del clúster I (Figura 94). Sin embargo, las especies *H. ilicicola* (H33, H48, H49, H50 y H52), *H. kenyensis* (H51 y H53) y *H. campisalis* (H44) que forman el clúster filogenético II, además de *H. stenophila* (H45) que se incluye en el clúster I, se hallaron en alta proporción (46%, 13,9% y 8,9% respectivamente del total de las intensidades de bandas) en las muestras tomadas en febrero de 2007 y en noviembre de 2007. Sin embargo los valores obtenidos en junio de 2006 fueron bajos (Tabla 56 y Figura 92).



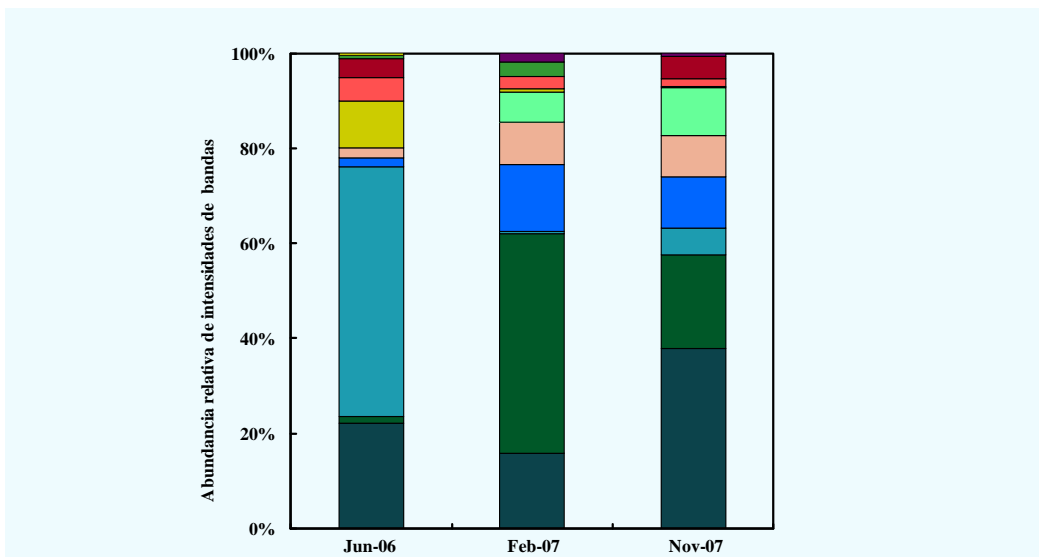
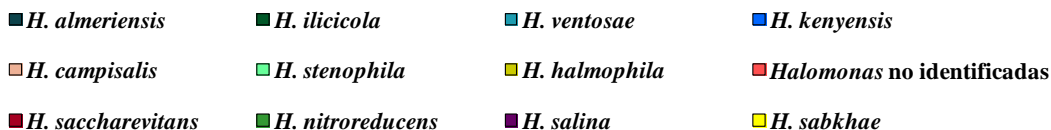
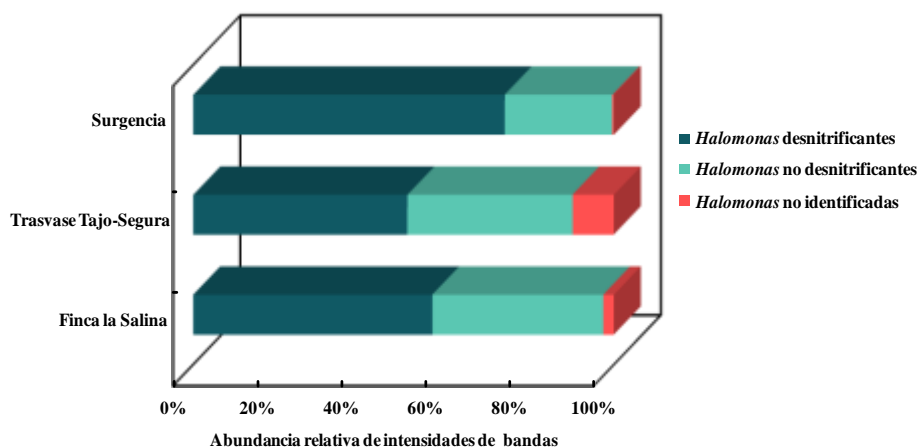


Figura 94. Abundancia relativa de *Halomonas* en cada época de muestreo

Cabe mencionar que las bandas correspondientes a *H. halmophila* (H16, H35 y H37) mostraron su mayor abundancia en el muestreo de junio de 2006 (9,97%), mientras que los valores fueron bajos en las épocas de febrero y noviembre de 2007 (Tabla 56). En el clúster I, también se incluyen bandas pertenecientes a otras especies diferentes, como por ejemplo, *H. nitroreducens* (H46), *H. sabkhae* (H8, H10 y H13), *H. salina* (H54) y *H. saccharevitans* (H47). Esta última fue encontrada únicamente en de junio de 2006 y noviembre de 2007 prácticamente en el mismo porcentaje (4,05% y 4,63% respectivamente) (Figura 94). Por otro lado, *H. nitroreducens* y *H. salina* mostraron su mayor abundancia en febrero de 2007, mientras que los valores fueron muy bajos en el resto de las épocas. Un hecho similar ocurrió con *H. sabkhae* (H8, H10 y H13), que está presente sólo en la zona de la surgencia tomada en junio de 2006. Las bandas H1, H5, H6, H9, H11, H14, H15, H23, H25, H28 fueron detectadas en las tres épocas, pero no fue posible su secuenciación.

A nivel espacial (zona de muestreo) (Figura 95), se observó que la zona de surgencia destacó por presentar una mayor abundancia de especies desnitrificantes del género *Halomonas* (más del 70% respecto al total de la comunidad hallada en esta zona).

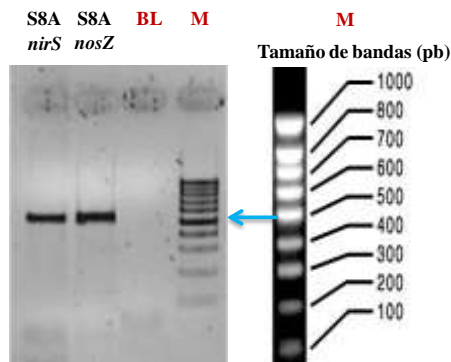


**Figura 95.** Abundancia relativa de la población desnitrificante en las tres zonas de muestreo

A la vista de la información obtenida en las Figuras 93 y 95 y con el fin de profundizar en el estudio de las poblaciones desnitrificantes en Rambla Salada, se decidió comprobar e identificar las especies desnitrificantes en las muestras tomadas de la zona de la surgencia en junio de 2006, puesto que fue la zona y época de muestreo que reveló una mayor abundancia de especies. Para ello, se amplificó una región correspondiente a los genes de desnitrificación *nirS* y *nosZ*, utilizando para ello dos juegos de oligonucleótidos específicos previamente descritos por nuestro grupo de investigación (González-Domenech y col., 2010; Oueriaghli y col., 2012a).

### *Amplificación por PCR de los genes nirS y nosZ*

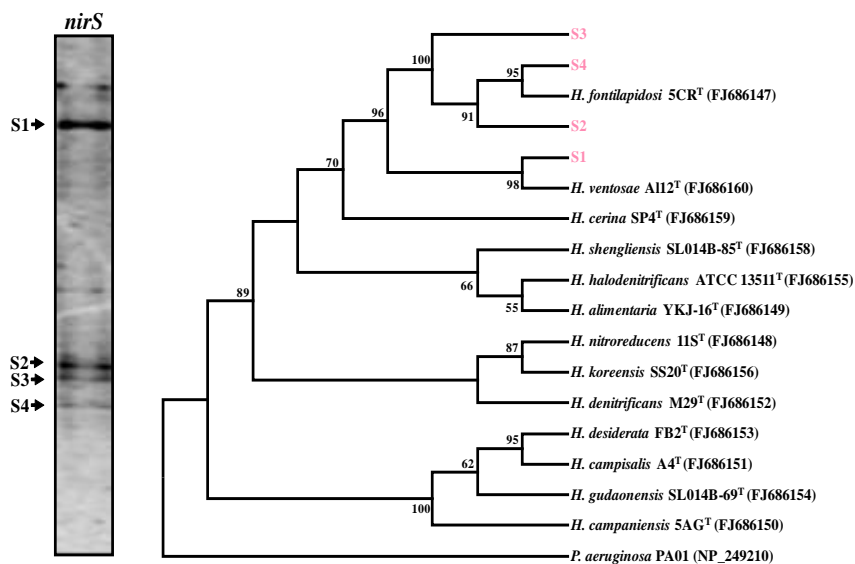
Los resultados de la amplificación por PCR de los genes de desnitrificación (*nirS* y *nosZ*), se muestran en la Figura 96. Como se puede apreciar en la muestra S8A, la amplificación de los genes *nirS* y *nosZ* originó un único fragmento de cada uno de ellos con el tamaño esperado (500pb). No se obtuvieron bandas en el control negativo. El producto de PCR de ambos genes fue concentrado según el protocolo mencionado en el apartado II. 8 de Material y Métodos para su posterior análisis mediante DGGE.



**Figura 96.** Productos de amplificación de los fragmentos de los genes *nirS* y *nosZ* (500pb). S8A: Muestra tomadas en la zona de surgencia en junio de 2006. **M:** Marcador Molecular (1000pb). **BL:** Blanco

### DGGE y análisis filogenético de las secuencias

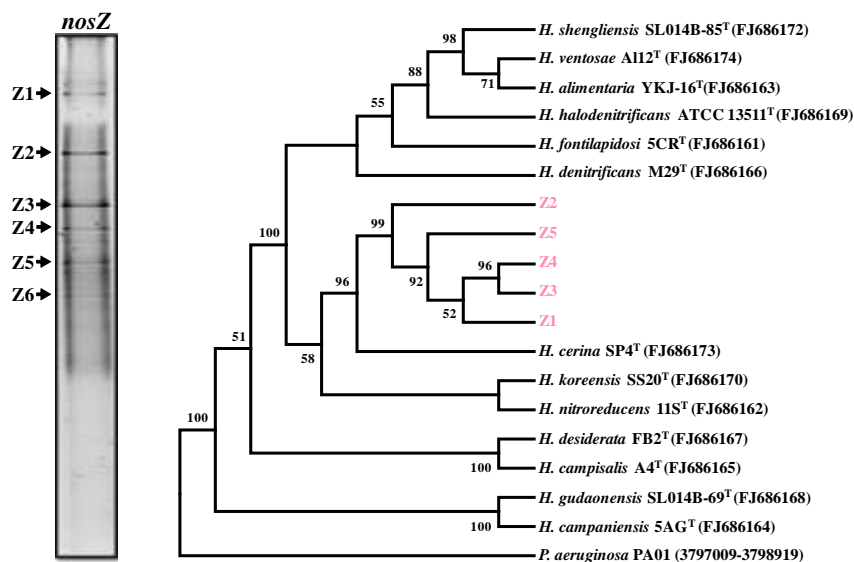
La Figura 97 muestra el perfil de DGGE correspondiente a los fragmentos amplificados del gen de desnitrificación *nirS*, así como el árbol filogenético basado en las secuencias recuperadas del mismo, obtenido mediante el algoritmo Neighbour-Joining.



**Figura 97.** Árbol filogenético basado en las secuencias del gen *nirS* y las de referencia, obtenido mediante el método de Neighbour-Joining. Los números de acceso en la base de datos Genbank de las secuencias de referencia se encuentran entre paréntesis. Se indican los valores de “bootstrap” mayores del 50%. Secuencias obtenidas en junio de 2006 (S)

Como se muestra en el árbol, se caracterizaron cuatro bandas relacionadas con especies desnitrificantes de *Halomonas*. Las bandas S2, S3 y S4 se relacionaron con *H. fontilapidosi* 5CR<sup>T</sup>, mientras que la banda S1 se afilió con *H. ventosae* A112<sup>T</sup>.

En cuanto al gen de desnitrificación *nosZ*, los resultados se muestran en la Figura 98. Como se puede apreciar, la separación del producto de amplificación por PCR del gen *nosZ* mediante DGGE, dió lugar a cinco bandas. Su posterior secuenciación y comparación con las existentes en la base de datos mediante el Blast permitió establecer una relación filogenética entre las bandas Z1, Z2, Z3, Z4 y Z5 y las especies *H. cerina* SP4<sup>T</sup> y *H. korensis* SS20<sup>T</sup>.



**Figura 98.** Árbol filogenético basado en las secuencias del gen *nosZ* y las de referencia, obtenido mediante el método de Neighbour-Joining. Los números de acceso en la base de datos Genbank de las secuencias de referencia se encuentran entre paréntesis. Se indican los valores de “bootstrap” mayores del 50%. Secuencias obtenidas en junio de 2006 (Z)

Como era de esperar, para ambos genes de la desnitrificación (*nirS* y *nosZ*), ninguna de las bandas obtenidas a partir de los perfiles de DGGE, se relacionaba con especies alcalófilas desnitrificantes del género *Halomonas*, las cuales formaron un clúster separado en ambos árboles filogenéticos (Figuras 97 y 98). La mayoría de las secuencias obtenidas de ambos genes, mostraron entre el 93% y el 95% de identidad con las de referencia. Todas las secuencias fueron depositadas en la base de datos Genbank, su número de acceso se muestra en la Tabla 57.

**Tabla 57.** Identificación de las secuencias de los genes *nirS* y *nosZ* obtenidas a partir de las bandas escindidas del DGGE

Banda	Número de acceso	Microorganismo más similar y su número de acceso	Identidad (%)
<b>Gen <i>nirS</i></b>			
S1	KC415605	<i>H. ventosae</i> A112 <sup>T</sup> (FJ686160)	94
S2	KC415606	<i>H. fontilapidosi</i> 5CR <sup>T</sup> (FJ686147)	96
S3	KC415607	<i>H. fontilapidosi</i> 5CR <sup>T</sup> (FJ686147)	95
S4	KC415608	<i>H. fontilapidosi</i> 5CR <sup>T</sup> (FJ686147)	95
<b>Gen <i>nosZ</i></b>			
Z1	KC415600	<i>H. cerina</i> R53 (GQ384060)	93
Z2	KC415601	<i>H. koreensis</i> JCM 12237 <sup>T</sup> (FJ686170)	93
Z3	KC415602	<i>H. cerina</i> R53 (GQ384060)	93
Z4	KC415603	<i>H. cerina</i> R53 (GQ384060)	93
Z5	KC415604	<i>H. cerina</i> R53 (GQ384060)	95

### Índices de diversidad

Para hacer una comparación de la comunidad de *Halomonas* en las tres zonas y fechas de muestreo, se determinaron varios índices de diversidad, cuyos resultados se describen en los apartados siguientes.

#### Rango ponderado de la riqueza (*Rr*)

El promedio del número de bandas por muestra fue 12 (mínimo, 4 bandas encontrado en la zona de surgencia, y máximo, 24 bandas en la zona de la Finca la Salina).

Como se muestra en la Tabla 58, la riqueza de la comunidad de *Halomonas* en Rambla Salada depende de la época de muestreo. El promedio de la riqueza (*Rr*) osciló entre  $54,43 \pm 26,09$  y  $3,29 \pm 3,08$ , mostrándose valores altos en la época de junio de 2006 y bajos en el muestreo de noviembre de 2007.

**Tabla 58.** Rango ponderado de la riqueza ( $Rr$ ) en cada sitio y época de muestreo

Época	Zona	Muestra	N° de bandas	$Rr$	Promedio	
<b>Junio 2006*</b>	Finca la salina	S1A	22	61,74	54,43 ± 26,09	
		S2A	24	96,48		
		S4A	20	67,00		
	Trasvase Tajo-Segura	S3A	12	24,12		
		Surgencia	S7A	15		40,50
			S8A	15		36,78
<b>Febrero 2007</b>	Finca la salina	S1B	11	17,84	12,57 ± 12,17	
		S2B	14	27,93		
		S4B	13	24,08		
	Trasvase Tajo-Segura	S3B	7	1,34		
		Surgencia	S7B	7		1,60
			S8B	9		2,63
<b>Noviembre 2007</b>	Finca la salina	S1C	6	2,43	3,29 ± 3,08	
		S2C	11	8,77		
		S4C	8	4,32		
	Trasvase Tajo-Segura	S3C	7	3,30		
		Surgencia	S7C	4		0,48
			S8C	4		0,48
<b>MDS</b>					0,0002	

\* Época de muestreo en la que hay diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con respecto al resto de las épocas. MDS: Mínima diferencia significativa

El análisis ANOVA distinguió significativamente el muestreo de junio de 2006 respecto al resto de las épocas de muestreo (MDS = 0,0002), mientras que a nivel estacional (zona de muestreo) no se detectaron diferencias significativas.

### Índices de Shannon-Weaver y de Simpson

Los valores del índice de *Shannon-Weaver* ( $H'$ ) fueron  $2,04 \pm 0,16$ ;  $1,73 \pm 0,15$  y  $1,47 \pm 0,20$  en las muestras tomadas en junio de 2006, febrero y noviembre de 2007 respectivamente (Tabla 59).

Tabla 59. Índice de *Shanon-Weaver* y *Simpson* en cada sitio y la época de muestreo

Época	Zona	Muestra	$H'$	Promedio	$SI$	Promedio	
Junio 2006*	Finca la Salina	S1A	2,37	$2,04 \pm 0,16$	0,14	$0,17 \pm 0,04$	
		S2A	1,93		0,21		
		S4A	1,69		0,30		
	Trasvase Tajo-Segura	S3A	2,22		0,12		
		Surgencia	S7A		1,85		0,20
			S8A		1,95		0,21
Febrero 2007	Finca la Salina	S1B	1,86	$1,73 \pm 0,15$	0,21	$0,22 \pm 0,03$	
		S2B	1,97		0,18		
		S4B	1,90		0,20		
	Trasvase Tajo-Segura	S3B	1,68		0,18		
		Surgencia	S7B		1,63		0,23
			S8B		1,60		0,27
Noviembre 2007	Finca la Salina	S1C	1,34	$1,47 \pm 0,20$	0,30	$0,27 \pm 0,03$	
		S2C	1,99		0,17		
		S4C	1,54		0,27		
	Trasvase Tajo-Segura	S3C	1,55		0,26		
		Surgencia	S7C		1,19		0,33
			S8C		1,30		0,28
<b>MDS</b>				0,0068	0,0456		

\* Época de muestreo en la que hay diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con respecto al resto de las épocas. MDS: Mínima diferencia significativa

Por otra parte, el índice de *Simpson* ( $SI$ ) mostró valores de  $0,17 \pm 0,04$ ;  $0,22 \pm 0,03$  y  $0,27 \pm 0,03$ , respectivamente.

Como se puede observar en la Tabla 59, la mayor diversidad de la comunidad de *Halomonas* se encontró en el muestreo de junio de 2006 y, por el contrario, la dominancia de dicha comunidad en la misma época fue baja, demostrándose por tanto que la dominancia de las especies de *Halomonas* en Rambla Salada disminuye cuando aumenta su diversidad.

La significación de las diferencias de los valores de la diversidad y dominancia de la comunidad de *Halomonas* entre las época de muestreo, se determinó mediante el análisis de varianza ANOVA. La época de junio de 2006 fue la que se distinguía más significativamente

por su alta diversidad y baja dominancia respecto al resto de los muestreos realizados. Sin embargo, a nivel espacial no hubo diferencias significativas.

### Organización funcional (*F<sub>o</sub>*)

Para determinar la organización funcional (*F<sub>o</sub>*) o la uniformidad de las comunidades de *Halomonas* en Rambla Salada, se construyeron las curvas de distribución de *Pareto-Lorenz* (*PL*) de las muestras tomadas en las tres épocas. La Tabla 60 presenta los valores obtenidos.

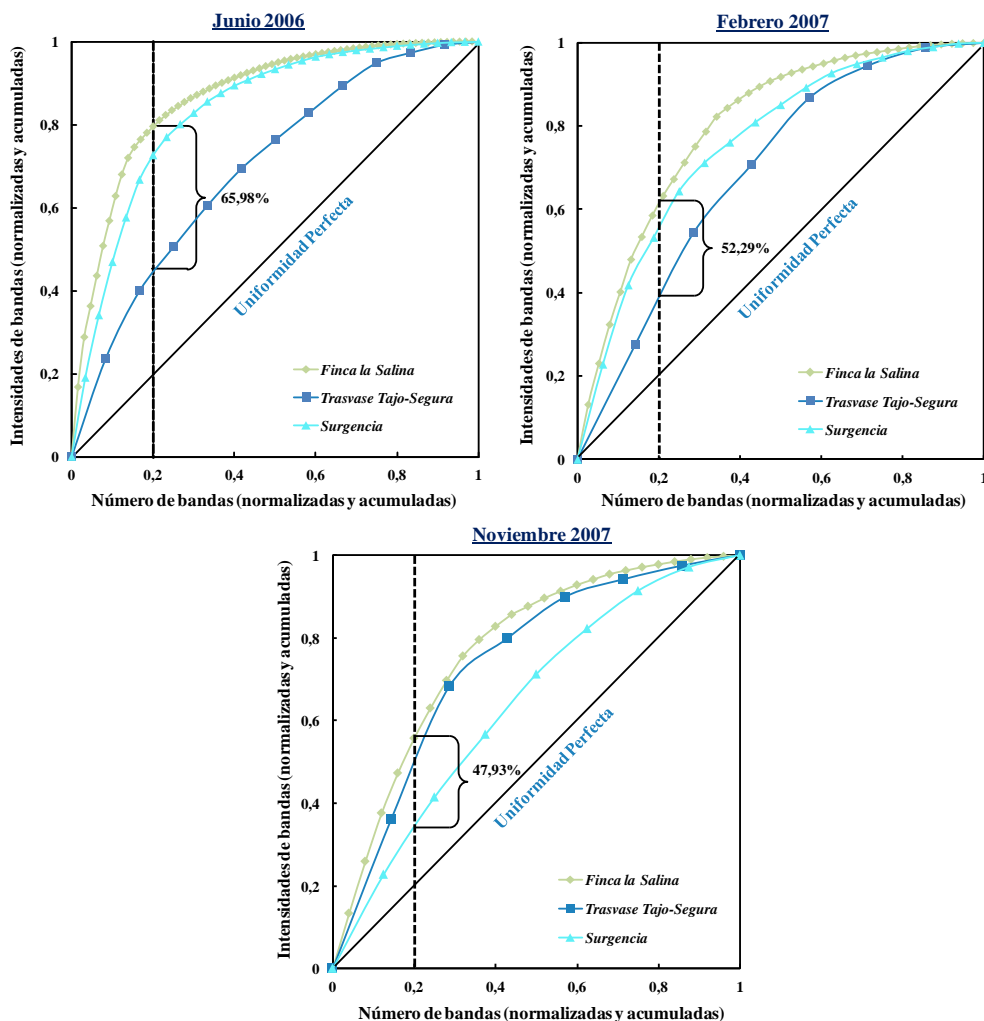
**Tabla 60.** Valores de *F<sub>o</sub>* (en %) obtenidos en cada zona y época de muestreo

Época	Zona	<i>F<sub>o</sub></i>	Promedio
<b>Junio 2006*</b>	Finca la salina	80,00	65,98
	Trasvase Tajo-Segura	45,12	
	Surgencia	72,82	
<b>Febrero 2007</b>	Finca la salina	61,05	52,29
	Trasvase Tajo-Segura	39,00	
	Surgencia	56,84	
<b>Noviembre 2007</b>	Finca la salina	59,04	47,93
	Trasvase Tajo-Segura	52,38	
	Surgencia	32,38	
<b>MDS</b>			0,009

\* Época de muestreo en la que hay diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con respecto al resto de las épocas. MDS: Mínima diferencia significativa

Los valores mostrados en la Tabla 60 fueron obtenidos a partir del cálculo del índice *F<sub>o</sub>* mediante la construcción de las curvas de *Pareto-Lorenz* (Figura 99) empleando la matriz de intensidades de bandas de DGGE de cada zona y época de muestreo (Tabla 64 de material suplementario).





**Figura 99.** Curvas de distribución de Pareto-Lorenz basadas en los perfiles de DGGE. La proyección de la línea vertical del valor 0,2  $\chi$ -eje se utiliza para determinar los valores de  $F_0$

Como se puede observar en la Figura 99, el 20% de las bandas acumuladas y normalizadas en las muestras tomadas en junio de 2006 mostraron el 80%, 45,12% y 72,82% (65,98% de promedio) de las intensidades de bandas acumuladas y normalizadas, mientras que el 20% de las bandas detectadas en febrero de 2007 representaron el 61,05%, 39% y 56,84% (52,29% de promedio) de las intensidades de bandas acumuladas y normalizadas en la Finca la Salina, canal Trásvase Tajo-Segura y la surgencia respectivamente. Por otro lado, los valores de  $F_0$  obtenidos en noviembre de 2007 fueron 59,04%, 52,38% y 32,38% (47,93% de promedio) de las intensidades acumuladas y normalizadas que presentan el 20% de las bandas encontradas en la Finca la Salina, canal Trásvase Tajo-Segura y la surgencia respectivamente. Cabe mencionar que el valor medio de  $F_0$  obtenido en junio de 2006 fue el

más alto, siendo las zonas de la Finca de la Salina y la surgencia de la misma época las más específicas puesto que los valores de  $F_0$  fueron 72,82% y el 80% respectivamente (Tabla 60).

En lo que respecta al análisis ANOVA, se observaron diferencias significativas en la comunidad de *Halomonas* a nivel de la temporalidad ( $p \leq 0,05$ ), mostrándose que la comunidad de *Halomonas* hallada en la época de junio de 2006 fue distinta respecto al resto de la comunidad encontrada en los otros muestreos.

### *Influencia de los factores ambientales en la diversidad de Halomonas*

Para determinar la contribución de los parámetros ambientales en la composición de la comunidad de *Halomonas*, se aplicó un análisis de correspondencia sin tendencias (ACD) a la matriz cualitativa (Tabla 63 de material suplementario) de la comunidad de *Halomonas*. Los datos mostraron una respuesta unimodal respecto a las variables ambientales (longitud de gradiente 3,279); como consecuencia, se aplicó un análisis de correspondencia canónica (ACC) empleando el software Canoco (véase el apartado III. 3. 2 de Material y Métodos).

El resultado del análisis de la variabilidad en cada eje de ordenación, así como la contribución de las variables físico-químicas a cada uno de los mismos se presenta en la Tabla 61.

Los dos primeros ejes son responsables del 25,4% de la variabilidad acumulada de especies y del 81,4% de la variabilidad acumulada a nivel de la relación especies-variables ambientales. El primer eje está positivamente relacionado con la salinidad y negativamente con el pH. El segundo eje canónico se correlaciona positivamente con la salinidad y el pH, mientras que, la parte negativa de este eje se correlaciona con el oxígeno. La correlación de las variables ambientales se consideró significativa si presentaba valores inferiores a 0,05; por lo tanto, mediante el test de permutaciones de *Monte Carlo*, se seleccionaron como variables significativas la salinidad (*Monte Carlo*,  $F = 1,76$ ,  $P = 0,014$ ) y el pH (*Monte Carlo*,  $F = 1,85$ ,  $P = 0,014$ ), obteniéndose el 78% y 43%, respectivamente, de la potencia total del análisis ACC.

Tabla 61. Valores del análisis estadístico Canoco

Ejes de ordenación	1	2	3	Inercia total
Valores propios (eigenvalor)	0,458	0,324	0,179	
Correlación especies-variables ambientales	0,914	0,911	0,786	
Porcentaje acumulado de la variabilidad de especies	14,9	25,4	31,2	3,081
Porcentaje acumulado de la variabilidad de la relación especies-variables ambientales	47,6	81,4	100,0	

La Figura 100 muestra la influencia de las variables ambientales sobre la diversidad de la comunidad de *Halomonas* en las tres zonas y épocas de muestreo.

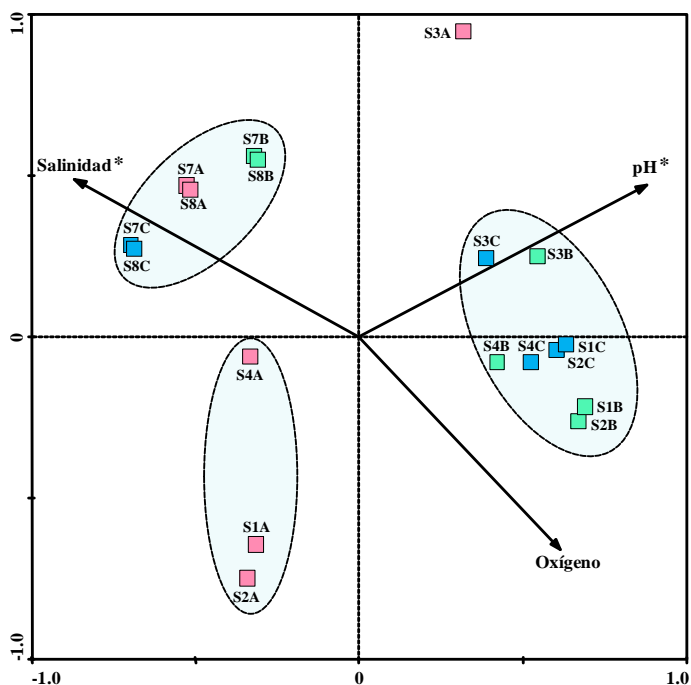
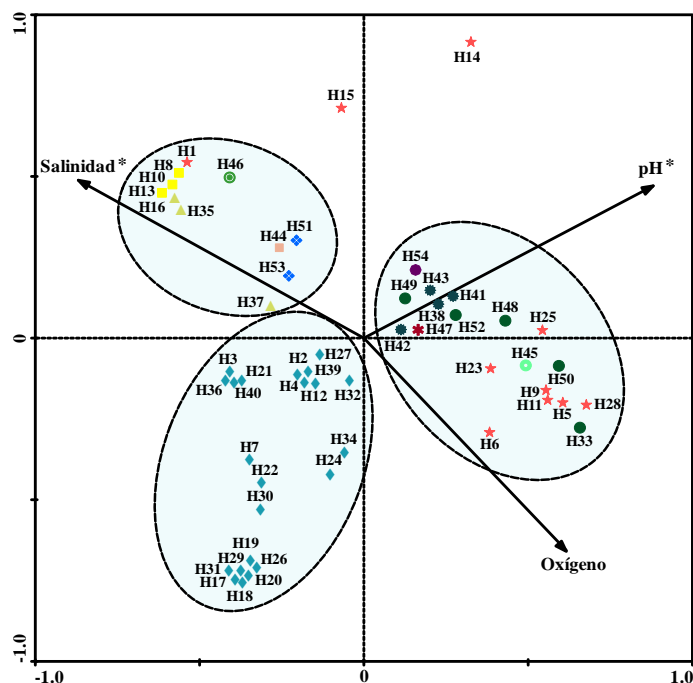


Figura 100. Biplot de la ordenación ACC, basados en los datos cualitativos generados por DGGE, que representa la correlación entre los factores ambientales y zonas y épocas de muestreo. SA ■: Muestras tomadas en junio de 2006, SB ■: Muestras tomadas en febrero de 2007, SC ■: Muestras tomadas en noviembre de 2007. (S1, S2 y S4: Finca la Salina, S3: Canal Tránsito Tajo-Segura, S7 y S8: Surgencia). Las flechas indican el sentido de correlación de las variables ambientales (sal, oxígeno y pH). Las variables ambientales marcadas con el símbolo \* son significativas ( $p \leq 0,05$ )

Se observó un primer grupo que está estrechamente relacionado con la salinidad y compuesto por las muestras de la zona de surgencia (S7 y S8) de las tres épocas de muestreo. El segundo grupo se relacionó de forma positiva con el pH y negativa con la salinidad, y agrupó muestras de las zonas de la Finca la Salina y el canal Trasvase Tajo-Segura de febrero y noviembre de 2007. El último grupo mostró una relación negativa con el pH, incluyendo las muestras de la zona de la Finca la Salina tomadas en junio de 2006. No se tomó en consideración la muestra S3A en la interpretación de los resultados, puesto que su comportamiento en el análisis fue distinto respecto al resto de las zonas estudiadas.

Como se muestra en la Figura 101 que representa la relación entre las especies de *Halomonas* y las variables ambientales, se obtuvieron tres grupos principales dependiendo de los ejes de ordenación canónica y los parámetros físico-químicos.



**Figura 101.** Biplot de la ordenación ACC, basados en los datos cualitativos generados por DGGE, que representa la correlación entre los factores ambientales y las especies de *Halomonas*. ♦: *H. ventosae*, \* : *H. almeriensis*, ●: *H. ilicicola*, ◆: *H. kenyensis*, ■: *H. campisalis*, ○: *H. stenophila*, ▲: *H. halmophila*, ☆: *Halomonas* no identificadas, ✱: *H. saccharevitans*, ⊙: *H. nitroreducens*, ●: *H. salina*, ■: *H. sabkhae*. Las flechas indican el sentido de correlación de las variables ambientales (sal, oxígeno y pH). Las variables ambientales marcadas con el símbolo \* son significativas ( $p \leq 0,05$ )

El primero incluye todas las bandas correspondientes a la especie *H. ventosae* (H2, H3, H4, H7, H12, H17, H18, H19, H20, H21, H22, H24, H26, H27, H29, H30, H31, H32, H34, H36,

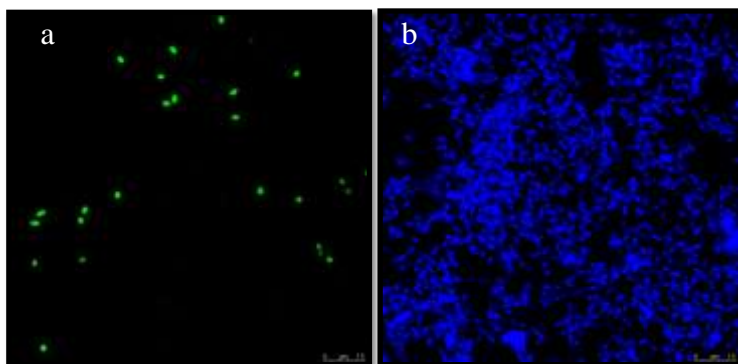
H39 y H40) que se correlacionaban negativamente con el pH y muchas de ellas se relacionaban también de forma positiva con la salinidad.

El segundo grupo está compuesto por filotipos pertenecientes a *H. almeriensis* (H38, H41, H42 y H43), *H. ilicicola* (H33, H48, H49, H50 y H52), *H. saccharevitans* (H47), *H. salina* (H54), *H. stenophila* (H45) y algunas de las secuencias que no fueron identificadas (H5, H6, H9, H11, H23, H25 y H28). Este grupo se correlacionó positivamente con el pH, encontrándose en las zonas de la Finca la Salina y el canal Trasvase Tajo-Segura en febrero y noviembre de 2007. Ambas zonas se caracterizaron por tener un pH relativamente alcalino. En este segundo grupo, algunas de las secuencias, fundamentalmente las correspondientes a las especies de *Halomonas* no identificadas, mostraron también una relación positiva con el oxígeno.

El tercer grupo mostró una correlación significativamente positiva con la salinidad, dentro de él, encontramos filotipos correspondiente a *H. campisalis* (H44), *H. halmophila* (H16, H35 y H37), *H. kenyensis* (H51 y H53), *H. nitroreducens* (H46) y *H. sabkhae* (H8, H10 y H13). Todas los filotipos de este último grupo fueron específicamente detectados en la zona de surgencia (S7 y S8), aunque algunos de ellos se encontraron también en las otras zonas.

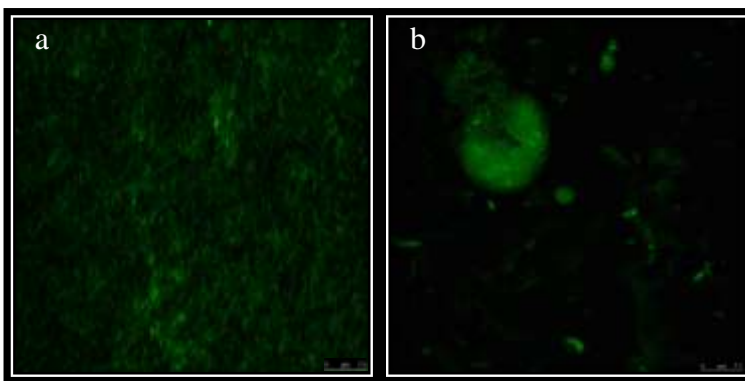
### II. 4. 2. Análisis de la comunidad de *Halomonas* mediante CARD-FISH

La Figura 102 muestra los resultados obtenidos después de hibridar las diferentes muestras con la sonda Hlm474-HRP, específica del género *Halomonas*. La visualización, mediante microscopía láser confocal (CLSM, Confocal Laser Scanning Microscopy), permitió detectar fluorescencia en las células de *Halomonas* hibridadas con la sonda mencionada anteriormente, emitiendo una luz de color verde (Figura 102a), así como las células microbianas totales teñidas con DAPI (Figura 102b).



**Figura 102.** CARD-FISH de muestras de Rambla Salada. **a:** *Halomonas* marcadas con la sonda Hlm474-HRP, FITC; **b:** Células de la misma muestra teñidas con DAPI (población microbiana total). La escala es de 10 µm

Tal como se mencionó anteriormente en el apartado IV. 3 de Material y métodos, se comprobó la especificidad de la sonda Hlm-474 de *Halomonas*, utilizando una cepa de *Cobetia marina* 219<sup>T</sup>, ya que es un taxón relacionado filogenéticamente con *Halomonas* y otra cepa de *Pseudomonas aeruginosa* AJ 2116<sup>T</sup>. En estas últimas cepas, los resultados obtenidos fueron negativos y se muestran en la Figura 103.



**Figura 103.** CARD-FISH de *Cobetia marina* 219<sup>T</sup> (a) y de *Pseudomonas aeruginosa* AJ 2116<sup>T</sup> (b). La escala es de 10 µm

En la Tabla 62 se presentan comparativamente los recuentos de las células totales teñidas con DAPI y las células pertenecientes al Dominio *Bacteria*, al Dominio *Archaea* y al género *Halomonas*, también se incluye en dicha tabla el porcentaje de *Halomonas* respecto a las células totales y a las bacterias totales, en las tres épocas de muestreo de Rambla Salada.

En la muestra S8A, tomada en la surgencia en junio de 2006, se obtuvieron los mayores recuentos de células totales ( $7,77 \times 10^8$  células/ml), arqueas ( $1,43 \times 10^8$  células/ml) y *Halomonas* ( $6,52 \times 10^7$  células/ml).

Sin embargo, en el caso de la comunidad de bacterias, el número más alto fue encontrado en la zona de la Finca la Salina en el muestreo de febrero de 2007, siendo la muestra S1B la que presentó los mayores valores ( $5,50 \times 10^8$  células/ml).

**Tabla 62.** Cuantificación de células microbianas totales, bacterias, arqueas y *Halomonas* en cada zona y época de muestreo

Recuentos de células totales, bacterias, arqueas y <i>Halomonas</i>																					
Época de muestreo	Zona	Muestra	Células totales (DAPI) (cel/ml)	Promedio (DAPI)	Arqueas (FITC) (cel/ml)	Promedio (FITC)	Bacterias (FITC) (cel/ml)	Promedio (FITC)	<i>Halomonas</i> (FITC) (cel/ml)	Promedio (FITC)	% de FITC ( <i>Halomonas</i> ) /DAPI	Promedio (%)	% de FITC ( <i>Halomonas</i> ) /bacterias	Promedio (%)							
Junio 2006	Finca la Salina	S1A	$7,51 \times 10^8$	$7,1 \times 10^8$	$9,18 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	$3,79 \times 10^8$	$3,9 \times 10^{8*}$	$2,70 \times 10^7$	$4,1 \times 10^7$	3,59	5,74*	7,12	10,83*							
		S2A	$6,77 \times 10^8$		$1,11 \times 10^8$		$4,07 \times 10^8$		$3,13 \times 10^7$		4,62		7,69								
		S4A	$6,78 \times 10^8$		$1,30 \times 10^8$		$3,93 \times 10^8$		$2,96 \times 10^7$		4,36		7,53								
	Trasvase Tajo-Segura	S3A	$7,26 \times 10^8$		$1,26 \times 10^8$		$4,04 \times 10^8$		$3,01 \times 10^7$		4,14		7,45								
		S7A	$6,79 \times 10^8$		$1,14 \times 10^8$		$3,17 \times 10^8$		$6,36 \times 10^7$		9,36		20,06								
	Surgencia	S8A	$7,77 \times 10^8$		$1,43 \times 10^8$		$4,30 \times 10^8$		$6,52 \times 10^7$		8,39		15,16								
		Finca la Salina	S1B		$6,53 \times 10^8$		$6,1 \times 10^{8*}$		$7,11 \times 10^7$		$6,7 \times 10^{7*}$		$5,50 \times 10^8$		$4,8 \times 10^8$	$3,38 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$	5,17	5,23	6,14	6,46
			S2B		$6,08 \times 10^8$				$6,88 \times 10^7$				$4,62 \times 10^8$			$3,60 \times 10^7$		5,92		7,92	
S4B	$6,26 \times 10^8$		$7,83 \times 10^7$	$5,04 \times 10^8$	$3,83 \times 10^7$	6,11		7,59													
Trasvase Tajo-Segura	S3B	$5,87 \times 10^8$	$6,64 \times 10^7$	$4,31 \times 10^8$	$2,96 \times 10^7$	5,04		6,86													
	S7B	$5,79 \times 10^8$	$6,01 \times 10^7$	$4,70 \times 10^8$	$2,55 \times 10^7$	4,40		5,42													
Surgencia	S8B	$5,94 \times 10^8$	$6,02 \times 10^7$	$4,65 \times 10^8$	$2,82 \times 10^7$	4,74		6,06													
	Finca la Salina	S1C	$6,71 \times 10^8$	$6,7 \times 10^8$	$9,70 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$		$4,16 \times 10^8$	$4,3 \times 10^8$	$3,25 \times 10^7$		$2,9 \times 10^{7*}$	4,84	4,37		7,81		6,90			
		S2C	$6,76 \times 10^8$		$1,12 \times 10^8$			$4,19 \times 10^8$		$2,90 \times 10^7$			4,28			6,92					
S4C		$6,66 \times 10^8$	$1,26 \times 10^8$		$4,87 \times 10^8$		$2,84 \times 10^7$	4,26		5,83											
Trasvase Tajo-Segura	S3C	$7,15 \times 10^8$	$7,70 \times 10^7$		$4,28 \times 10^8$		$2,51 \times 10^7$	3,51		5,86											
	S7C	$6,42 \times 10^8$	$1,20 \times 10^8$		$4,36 \times 10^8$		$3,41 \times 10^7$	5,31		7,82											
Surgencia	S8C	$7,01 \times 10^8$	$1,10 \times 10^8$		$3,94 \times 10^8$		$2,84 \times 10^7$	4,05		7,20											
	<b>Promedio</b>				$6,7 \times 10^8$			$9,7 \times 10^7$			$4,3 \times 10^8$				$3,4 \times 10^7$		5,11			8,13	
<b>MDS</b>					0,0002			0,0001			0,0026				0,0500		0,0140			0,0456	

\* Época de muestreo en la que hay diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con respecto al resto de las épocas. MDS: Mínima diferencia significativa

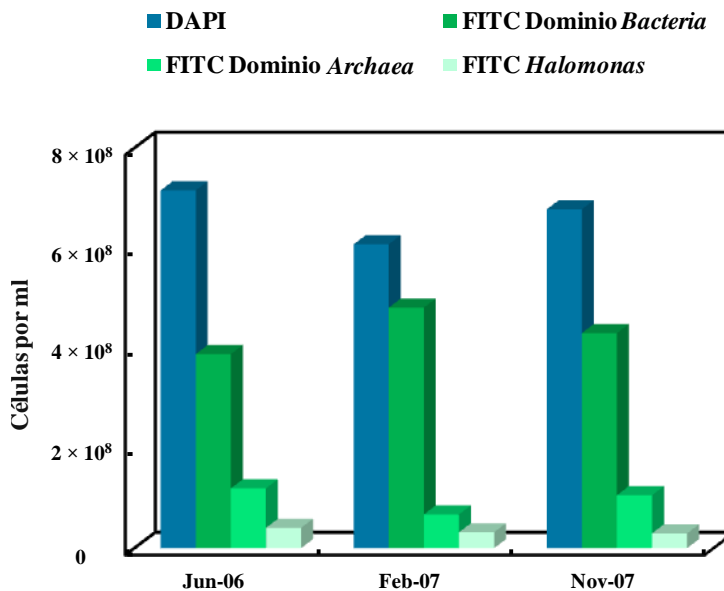


Se obtuvo un promedio de  $6,7 \times 10^8$  (células/ml) de células microbianas mediante la tinción de las células con DAPI en las tres épocas de muestreo. Asimismo, se obtuvo un promedio de  $3,4 \times 10^7$  (células/ml) de *Halomonas*, alcanzándose su máximo en la época de junio 2006 con un  $4,1 \times 10^7$  células/ml de promedio. El recuento más bajo fue obtenido en las muestras correspondientes al muestreo de noviembre de 2007 ( $2,9 \times 10^7$  células/ml). El porcentaje de *Halomonas* fue un 5,11% de promedio respecto a las células microbianas totales y un 8,13 de promedio respecto a bacterias, siendo la muestra S7, perteneciente a la zona de la surgencia tomada en junio de 2006, la que mostró el porcentaje más alto (20,06% y 9,36% de células de *Halomonas* respecto a las células microbianas totales y a las bacterias respectivamente).

El análisis estadístico ANOVA indicó que los recuentos de las células microbianas totales, arqueas, bacterias y *Halomonas* no presentaron diferencias significativas entre los distintos sitios de muestreo, pero sí entre las épocas, siendo febrero de 2007, el que mostró los valores más bajos de recuentos en la comunidad microbiana total y la comunidad de arqueas; sin embargo, en esta época, se obtuvieron los mayores recuentos de la comunidad de bacterias.

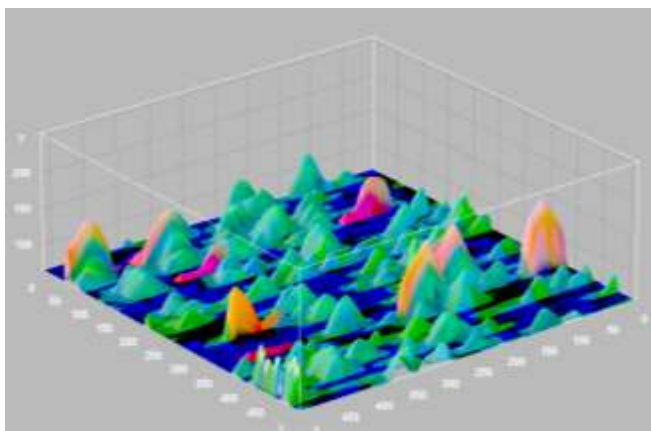
Por otro lado, en junio de 2006, hicimos el muestreo que presentó los valores más altos en la comunidad microbiana total y en las de arqueas y *Halomonas*, mientras que en estas muestras, los recuentos de las bacterias fueron bajos.

En la Figura 104 se presentan los porcentajes de las tres comunidades de procariotas en Rambla Salada en las tres épocas de muestreo y cuyos datos hemos comentado anteriormente.



**Figura 104.** Recuentos de la población microbiana total (DAPI), bacterias, arqueas y *Halomonas* (FITC) en las tres épocas de muestreo

La Figura 105 muestra una imagen en 3D donde se pueden ver las células microbianas totales teñidas con DAPI y las comunidades procariotas: bacterias, arqueas y *Halomonas*, hibridadas con la sondas correspondientes. Esta imagen es el resultado de un montaje realizado mediante el programa ImageJ con las imágenes obtenidas tras la visualización de las células en un microscopio láser confocal CLSM. La población de *Halomonas* aparece en color rojo-naranja.



**Figura 105.** Imagen en 3D montada con el programa ImageJ de tres imágenes visualizadas con un microscopio de láser confocal Leica TCS-SP5 (CLSM) mostrando la abundancia de microorganismos totales (DAPI, color azul), bacterias y arqueas (color verde), y *Halomonas* (color rojo-naranja)

## II. 4. 3. Discusión

En este trabajo, se ha estudiado la comunidad de *Halomonas* en Rambla Salada mediante la amplificación específica de fragmentos del gen del ARNr 16S de este género y su posterior análisis a través de la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE). Los patrones de la comunidad de *Halomonas*, obtenidos en los distintos puntos de muestreo, fueron sometidos a un análisis multivariable mediante el programa Canoco, con la finalidad de correlacionar la diversidad de *Halomonas* con los factores ambientales (pH, oxígeno y salinidad) del hábitat objeto de estudio. Además, para conocer la abundancia relativa del género *Halomonas* en Rambla Salada, se aplicó la técnica CARD-FISH a las muestras tomadas a lo largo del estudio.

*Halomonas* constituye unos de los géneros que se aíslan con más frecuencia por métodos tradicionales de cultivo en ambientes salinos e hipersalinos (Vreeland y col., 1980; Martínez-Cánovas y col., 2004a; Martínez-Checa y col., 2005; Xu y col., 2007; Guzmán y col., 2010; Mann y col., 2010; Poli y col., 2011; Wang y col., 2012; Luque y col., 2012b; Zhao y col., 2012; Poli y col., 2013). Se ha encontrado también en hábitats en los que además de la salinidad, existen otras condiciones extremas, tales como un pH alcalino o ácido (Li y col., 2008; Shapovalova y col., 2008; Shi y col., 2012) e incluso en hábitats no salinos, como es el caso de *H. stevensii*, *H. hamiltonii* y *H. johnsoniae* halladas en la sangre de dos pacientes en diálisis de un centro de atención renal (Kim y col., 2010).

Luque y col., 2013 pusieron de manifiesto la dominancia del género *Halomonas* en un trabajo realizado mediante técnicas clásicas de cultivo en Rambla Salada. En dicho estudio, el 35% de las cepas aisladas pertenecían al género *Halomonas*. A pesar de este hecho, en este trabajo, no ha sido posible detectar miembros del género *Halomonas* cuando se emplearon cebadores generales para el Dominio *Bacteria*, según los datos analizados y discutido en el apartado II. 2. 3 del capítulo 2 de la presente tesis. Este hecho podría ser debido a que el género *Halomonas* no constituye una población dominante en Rambla Salada respecto a la comunidad total de bacterias (Tabla 62 y Figura 104). Aunque la población total de *Halomonas* representa según los datos del CARD-FISH un 8% de la población de bacterias, las distintas especies de *Halomonas* estarían presentes en un porcentaje inferior, probablemente por debajo del 1% y por ello no serían detectadas mediante DGGE, técnica que sólo detecta poblaciones presentes en un porcentaje superior a este (Muyzer y col., 1993; Dar y col., 2005)

Nuestros resultados son equivalentes a los de Cui y col. (2008) quienes, mediante técnicas clásicas de cultivo, aislaron *Halomonas* como bacteria predominante a partir de muestras tomadas en sedimentos profundos en el Atlántico, y sin embargo no detectaron este microorganismo mediante la técnica de DGGE.

Según nuestros resultados, la estrategia clásica de cultivo en realidad no estaría reflejando la comunidad dominante de un hábitat, puesto que, solo aislamos los microorganismos capaces de crecer en las condiciones de los medios de cultivo utilizados. Como se ha descrito en diversas publicaciones, el sesgo introducido por los medios de cultivo es importante ya que debido a varios motivos, solo se cultiva del 1-10% de la microbiota existente en la naturaleza (Oren y Papke, 2010).

Si comparamos los resultados de este estudio con los obtenidos al analizar la diversidad bacteriana en las mismas zonas y épocas de muestreo por métodos clásicos (Luque y col., 2013) hallaremos una gran diferencia. Como ya se ha dicho, no se detecta *Halomonas* con sondas de bacterias, pero Luque y col. (2013) la aislaron en altos porcentajes. Para solventar el problema se realizó una búsqueda en la literatura con el fin de encontrar una sonda específica para el género *Halomonas* y estudiar su población por técnicas moleculares. La sonda seleccionada fue la sonda Hlm-474R empleada en la técnica FISH en un trabajo previamente realizado por Yoshie y col. (2004). Por otro lado, para llevar a cabo reacciones de PCR específicas para *Halomonas*, se combinó la sonda Hlm-474R con el cebador 16F-B27 (Lane y col., 1991; Oueriaghli y col., 2012a).

El análisis de agrupamiento de las muestras analizadas mediante DGGE con el programa FPquest mostró resultados diferentes dependiendo del coeficiente utilizado. El coeficiente de Dice (Figura 91) reveló una clara separación temporal (época de muestreo) de la comunidad de *Halomonas* en Rambla Salada. El perfil de diversidad de *Halomonas* obtenido en junio de 2006 fue distinto a los obtenidos en febrero y noviembre de 2007 (Figura 91). Por el contrario, el dendograma de la Figura 90, que tiene en cuenta la intensidad de bandas (coeficiente de Pearson), no separó claramente la comunidad de *Halomonas* en función de la época de muestreo.

En este sentido, existen opiniones divergentes sobre la conveniencia del uso de un coeficiente o otro, pero la evidencia sugiere que el método de agrupamiento UPGMA acoplado con el coeficiente de Pearson es más sensible a los artefactos que aparecen en los perfiles de DGGE y aún más, a las variaciones en las intensidades relativas de las bandas (Huys y Swings, 1999). Recientemente se ha recomendado, para los estudios de huella genética como el DGGE, la utilización de índices más conservativos, tales como el coeficiente de similitud de Dice (Schwalbach y col., 2005; Hewson, 2006a y 2006b). En el presente trabajo, el agrupamiento basado en la presencia-ausencia de bandas (coeficiente de Dice), resultó ser más coherente, observándose una estrecha relación entre el patrón de composición de *Halomonas* y las condiciones ambientales locales de cada época de muestreo y especialmente con el contenido de la sal (Tabla 28).

El análisis filogenético de la comunidad de *Halomonas* a partir de las 54 clases de bandas detectadas en los perfiles de DGGE mostró la formación de dos grupos filogenéticos afiliados con distintas especies del género *Halomonas* (Figura 92). Los dos clústers se

asociaban principalmente con las especies desnitrificantes del género *Halomonas* (*H. campisalis*, *H. kenyensis*, *H. nitroreducens*, *H. saccharevitans*, *H. ventosae*, *H. ilicicola* y *H. sabkhae*). El análisis de la comunidad de *Halomonas* mostró que *H. almeriensis* era la especie más abundante en los tres muestreos realizados, seguida por la especie *H. ilicicola* (Tabla 56 y Figura 93a).

La especie desnitrificante *H. ventosae*, fue bastante abundante, sobre todo en de junio de 2006 (52,57%). Cabe mencionar que las secuencias de las bandas obtenidas en este estudio (bandas H2, H3, H4, H4, H7, H12, H17, H18, H19, H20, H21, H22, H24, H26, H27, H29, H30, H31, H32, H34, H36, H39 y H40) mostraron porcentajes elevados de identidad (99% y 100%) con las secuencias de las cepas *H. ventosae* M4-22, *H. ventosae* M4-15 y *H. ventosae* M4-38 aisladas previamente por Luque y col. (2013) cuando analizaron la diversidad de bacterias en los mismos lugares y épocas de muestreo en Rambla Salada. Igualmente ocurrió con la secuencia de la banda H38, que mostró un 99% de identidad con la especie *H. almeriensis* M3-47 (Luque y col., 2013), y las secuencias H41, H42, H43 y H44 que tenían un 100% de identidad con dicha cepa. También encontramos que la secuencia de la banda H44 se relacionó filogenéticamente (98% de identidad) con la cepa *H. campisalis* M2-61 aislada por Luque y col. (2013). Por tanto, hay que destacar que *H. almeriensis* y *H. ventosae*, los taxa predominantes en la población de *Halomonas* (25,37% y 19,62% respectivamente) pueden ser aisladas por técnicas clásicas de cultivo (Luque y col., 2013).

Al analizar la abundancia relativa de todas las especies de *Halomonas* se observó que el 62% de la comunidad de *Halomonas* se correspondía con especies desnitrificantes (Figura 93b). Además, se analizó la abundancia de la población desnitrificante a nivel estacional y temporal (Figura 95). Los resultados evidenciaron la dominancia de las especies desnitrificantes del género *Halomonas* en la zona de la surgencia (74% de la población total).

A la vista de estos resultados, nos planteamos profundizar en el estudio de la población desnitrificante y para ello se utilizaron cebadores específicos para amplificar los genes de la desnitrificación *nirS* y *nosZ* (Oueriaghli y col., 2012a). Se seleccionó la muestra S8 de la zona de la surgencia tomada en junio de 2006 por ser la de mayor riqueza y diversidad. Esta zona se caracterizó además por presentar la mayor concentración de sales y unos parámetros físico-químicos estables a lo largo del año.

Mediante el uso de cebadores específicos de los genes *nirS* y *nosZ*, los patrones de DGGE basados en los fragmentos amplificados de los mismos dieron lugar a secuencias afiliadas con cuatro cepas desnitrificantes del género *Halomonas*: la cepa *H. cerina* R53, aislada por nuestro grupo de investigación (González-Domenech y col., 2008b) en Rambla Salada, y las cepas tipo de *H. fontilapidosi*, *H. ventosae* y *H. korensis* (Tabla 57).

*H. cerina* y *H. fontilapidosi* fueron detectadas solamente con los cebadores diseñados para estos genes funcionales. Por el contrario, *H. ventosae* también es reconocida por los cebadores del género *Halomonas*.

Cabe mencionar que no se detectaron especies desnitrificantes alcalófilas de *Halomonas* (*H. campaniensis*, *H. campisalis*, *H. desiderata* y *H. gudaonensis*). Estas especies forman un grupo distinto y separado en el árbol filogenético obtenido al utilizar los genes de la desnitrificación (González-Domenech y col., 2010) y puede ser que los cebadores utilizados no sean muy específicos para ellas.

La comunidad de *Halomonas* en Rambla Salada, también mostró diferencias significativas según la época de muestreo, presentando valores altos de riqueza ( $R_r$ ) y diversidad ( $H'$ ) ( $54,43 \pm 26,09$  y  $2,04 \pm 0,16$  respectivamente) en junio de 2006. Como ya se ha mencionado con anterioridad, según Marzorati y col. (2008), estos valores son típicos de ambientes caracterizados por una alta diversidad microbiana.

Teniendo en cuenta los patrones de las curvas de *Pareto-Lorenz* (*PL*), las muestras tomadas en febrero y noviembre de 2007 presentaron valores medios de  $F_o$ , oscilando desde el 40% hasta el 60% de  $F_o$  (Tabla 60 y Figura 99), indicando que la comunidad de *Halomonas* está equilibrada y por lo tanto puede, potencialmente, hacer frente a los cambios de las condiciones ambientales y preservar su funcionalidad (Marzorati y col., 2008). Sin embargo, las muestras tomadas en junio de 2006 mostraron más del 60% de  $F_o$ , indicando que la población de *Halomonas* encontrada en esta época es muy especializada (Marzorati y col., 2008).

La dominancia de las especies del género *Halomonas* se reveló mediante el índice de *Simpson* ( $SI$ ), mostrando los valores más altos en febrero de 2007 ( $0,22 \pm 0,03$ ). Es útil recordar en este punto que las muestras correspondientes al muestreo de febrero de 2007, revelaron valores bajos de la diversidad ( $H'$ ) (Tabla 59). Este dato concuerda con el valor de *Simpson* ( $SI$ ) obtenido en esta época, confirmandose por tanto que la dominancia de las especies pertenecientes al género *Halomonas*, disminuye de forma concomitante con el aumento de su diversidad (Magurran, 1996).

Por otro lado, el análisis ACC (Tabla 61 y Figura 100) confirmó que la estructura de la comunidad de *Halomonas* en Rambla Salada estaba significativamente influida por la salinidad y el pH. Teniendo en cuenta el factor de la salinidad, se observó una clara distinción entre la comunidad de *Halomonas* encontrada en la zona de surgencia (S7 y S8), fuertemente relacionada con el contenido de sal, y la comunidad hallada en el resto de las zonas estudiadas durante las tres épocas de muestreo (Figura 101).

Cabe mencionar que las bandas afiliadas con *H. campisalis*, *H. halmophila*, *H. kenyensis*, *H. nitroreducens* y *H. sabkhae* fueron específicas de la zona de surgencia (Figura 101).

mostrando una fuerte correlación con la salinidad. La especie de *Halomonas* identificada como la más abundante en este estudio, *H. almeriensis* (Figuras 93a y 94), representó alrededor del 26% de la comunidad total de *Halomonas* en las tres épocas de muestreo y alrededor del 38% de las bandas secuenciadas en noviembre de 2007, donde los valores de pH fueron ligeramente alcalinos (Figura 94). Este resultado fue confirmado mediante el análisis ACC, el cual mostró que las bandas afiliadas con *H. almeriensis* (H38, H41, H42 y H43) se situaban en el cuadrante derecho superior muy cercanas al eje del pH (Figura 101).

Por otro lado, las especies *H. ventosae* y *H. ilicicola* fueron bastante abundantes en de junio de 2006 y febrero de 2007. *H. ventosae* fue encontrada específicamente en la zona de la Finca la Salina, donde los valores de pH eran ligeramente ácidos. De hecho el análisis ACC (Figura 101) agrupaba todas las bandas afiliadas con *H. ventosae* en el cuadrante izquierdo inferior, lo cual prueba que este grupo bacteriano se correlacionaba de forma ligeramente positiva con la salinidad y negativamente con el pH. Sin embargo *H. ilicicola*, junto con *H. saccharevitans*, *H. salina* y *H. stenophila*, mostraron una correlación positiva con el pH, tal y como se esperaba, puesto que este grupo filogenético se detectó en la zona de la Finca la Salina y el canal Trasvase Tajo-Segura en febrero y noviembre de 2007, cuando los valores de pH fueron relativamente alcalinos (Figura 101).

Para cuantificar la presencia de *Halomonas* en Rambla Salada, se llevó a cabo un análisis mediante la técnica CARD-FISH. Como se expuso anteriormente en la Tabla 62 del apartado II. 4. 2 del presente capítulo, se detectó un promedio de  $6,7 \times 10^8$  células/ml teñidas con DAPI. El uso de la sonda Hlm474-HRP nos permitió observar un promedio de  $3,4 \times 10^7$  células/ml de *Halomonas* en las tres épocas de muestreo, lo que representa el 7,99% de las bacterias y el 5,1% de las células microbianas totales. Estos valores indican la ubicuidad y abundancia de este género en Rambla Salada.

Estos resultados están relacionados de una forma directa con la concentración salina, puesto que la zona de la surgencia (S7 y S8) fue la que mostró el mayor valor en los recuentos de arqueas y *Halomonas*, y es prácticamente la que tiene mayor concentraciones de sal. El efecto de la salinidad se ha visto fuertemente reflejado en los patrones de distribución de la comunidad de arqueas y bacterias en ambientes salinos e hipersalinos (Jiang y col., 2006 y 2007; Liu y col., 2011; Oueriaghli y col., 2012b; Oueriaghli y col., 2013) y también en la distribución de algunos bacterianos, tales como los miembros de los phyla *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* (Wu y col., 2006; Barberán y Casamayor, 2010). Concretamente en el caso de la clase *Gammaproteobacteria*, se ha publicado una correlación positiva entre la abundancia relativa de organismos pertenecientes a esta clase y el incremento en la salinidad (Benlloch y col., 2002; Humayoun y col., 2003; Kirchman y col., 2005; Wu y col., 2006), parece ser que los miembros de esta clase los que predominan en ambientes hipersalinos (Benlloch y col., 2002; Humayoun y col., 2003). Para lo que respecta

a los resultados de este estudio, está claro que existe una correlación positiva entre la salinidad y los miembros del género *Halomonas* (Figura 101).

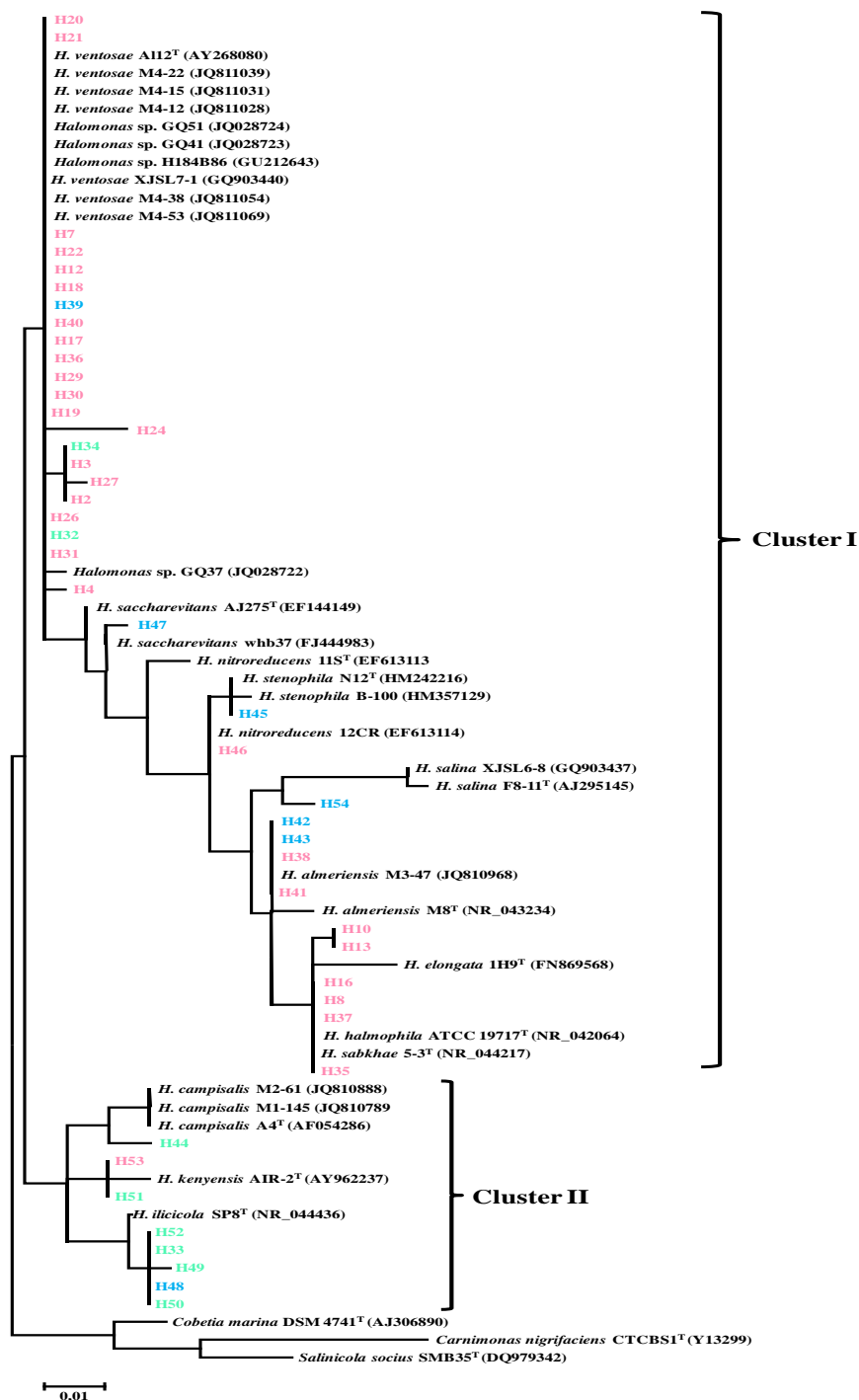
Teniendo en cuenta estos resultados, la no aparición de bandas correspondientes al género *Halomonas* en los perfiles de DGGE de la comunidad bacteriana empleando cebadores generales no debe interpretarse como la inexistencia de la población de *Halomonas* en Rambla Salada, sino que probablemente debido a los sesgos relacionados con dicha metodología (Muyzer, 1999).

En resumen, los patrones de DGGE de la comunidad de *Halomonas* revelaron variaciones temporales, siendo el muestreo de junio de 2006 el que presentó la mayor diversidad así como el mayor número de recuentos de células de *Halomonas*. Esta variación se puede explicar en función de los parámetros físico-químicos del lugar de muestreo y, en particular, por la concentración salina y el pH. Por último, es de resaltar que la comunidad de *Halomonas* fue dominada por los miembros desnitrificantes, siendo *H. almeriensis*, *H. illicicola* y *H. ventosae* las especies predominantes. Además el uso de cebadores específicos para los genes de desnitrificación *nirS* y *nosZ* evidenció la presencia de especies desnitrificantes que no fueron detectados con los cebadores específicos para amplificar el gen del ARNr 16S de *Halomonas*.



## **Material suplementario**





**Figura 106.** Árbol filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método de Maximum-Likelihood. Los números de acceso en la base de datos Genbank de las secuencias de referencia se encuentran entre paréntesis. Secuencias obtenidas en junio de 2006 (H), febrero de 2007 (H) y noviembre de 2007 (H)







## **CONCLUSIONES**





1. El análisis de la diversidad procariota indica que el **Dominio Bacteria** es el predominante en todos los hábitats estudiados, siendo los phyla *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* los más abundantes.
2. Los miembros del **Dominio Archaea** están presentes tanto en los hábitats salinos como en los no salinos siendo el phylum *Euryarchaeota* el más abundante. En los hábitats salinos predomina el orden *Halobacteriales* y en los no salinos el orden *Thermoplasmatales*. En Rambla Salada *Haloarcula* fue el taxón más abundante tanto en la comunidad de arqueas predominante como en la comunidad metabólicamente activa. Este taxón fue aislado previamente por métodos clásicos por nuestro grupo de investigación.
3. Se detectan secuencias afiliadas al **género Halomonas** en todos los hábitat excepto en la salina de La Malahá lo que demuestra la ubiquidad y la versatilidad de este género. En Rambla Salada se encontró en todas las zonas y en todas las épocas de muestreo empleando cebadores específicos pero no se detectó en el estudio de la comunidad de bacterias utilizando cebadores universales de bacterias a pesar de que en este hábitat la población de *Halomonas* representa entre un 6,9-10,8% del total de la población.
4. Existen taxa que se encuentran únicamente en condiciones determinadas como es el caso de *Salinibacter ruber* y *Haloquadratum walsby* detectados solamente en las salinas de la Malahá (Granada) y Cabo de Gata (Almería).
5. La concentración de sales es un factor que influye significativamente en la biodiversidad. En la población de bacterias la diversidad aumenta al disminuir la concentración de sal mientras que en la de arqueas ocurre lo contrario.
6. La asociación de las técnicas de agrupamiento (FPquest), ordenación (Canoco) y las técnicas moleculares (DGGE) permitió determinar la influencia de los factores ambientales y temporales en la distribución de la comunidad procariota.
7. La época de muestreo tiene un efecto significativo en las tres comunidades de procariotas estudiadas en Rambla Salada (bacterias, arqueas y *Halomonas*); este efecto se explica por la variación temporal de la concentración de sales. Sin embargo la zona de muestreo no tuvo una influencia significativa.
8. Al comparar los resultados de biodiversidad de este trabajo con los obtenidos por métodos clásicos en Rambla Salada podemos deducir que:

## *Conclusiones*

---

a) La biodiversidad detectada por métodos moleculares es muy superior a la obtenida por métodos clásicos.

b) Hay taxones que se aíslan por métodos clásicos y que no se detectan por métodos moleculares y viceversa.

9. Finalmente, mediante CARD-FISH hemos constatado que la diversidad procariota en Rambla Salada es del orden de  $10^3$  veces superior a la microbiota procariota cultivable.

# **BIBIOGRAFÍA**

## *Bibliografía*

---

**A**

**Altschul SF, Madden TL, Schäffe AA, Zhang J, Zhang Z, Miller WW, Lipman DJ (1997)** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.

**Amann R, Bernhard FM (2008)** Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. *Nature rev Microbiol* 6: 339-48.

**Amann RI, Krumholz L, Stahl DA (1990)** Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol* 172: 762-770.

**Amann RI, Wolfgang L, Schleifer KH (1995)** Phylogenetic Identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59: 143-169.

**Amjres H, Béjar V, Quesada E, Abrini J, Llamas I (2011)** *Halomonas rifensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing, halophilic bacterium isolated from Brikcha, a solar saltern in Chefchaouen, Morocco. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 2600-2605.

**Amjres H, Béjar V, Quesada E, Abrini J, Llamas I (2012)** Pharmaceutical applications of the exopolysaccharide produced by *Halomonas nitroroducens* strain HK30. *ARS Pharmaceutica* ISSN: 0004-2927.

**Anan'ina LN, Plotnikova EG, Gavrish Elu, Demakov VA, Evtushenko LI (2007)** *Salinicola socius* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a naphthalene-utilizing microbial association. *Microbiol* 76: 369-76.

**Antón J, Amann R, Rosselló-Mora R (2010)** Genus II. *Salinibacter*. In *Bergey's Manual*. Chapter 27. Family 1. pp. 146-151.

**Antón J, Llobet-Brossa E, Rodríguez-Valera F, Amann R (1999)** Fluorescence *in situ* hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environ Microbiol* 1: 517-523.

**Anton J, Oren A, Benlloch S, Rodríguez-Valera F, Amann R, Rosselló-Mora R (2002)** *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the *Bacteria* from saltern crystallizer ponds. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 485-491.

**Antón J, Peña A, Santos F, Martínez-García M, Schmitt-Kopplin P, Rosselló-Móra R (2008)** Distribution, abundance and diversity of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Saline Systems* 4:15.

**Antón J, Peña A, Valens M, Santos F, Glöckner FO, Bauer M, Dopazo J, Herrero J, Rosselló-Mora R, Amann R (2005)** *Salinibacter ruber*: genomics and biogeography. *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya* (Gunde-Cimerman N, Oren A & Plemenitaš A, eds). pp. 257-266.

**Antón J, Rosselló-Mora R, Rodríguez-Valera F, Amann R (2000)** Extremely halophilic *Bacteria* in crystallizer ponds from solar salterns. *Appl Environ Microbiol* 66: 3052-3057.

**Antunes A, Taborda M, Huber R, Moissl C, Nobre MF, Da Costa MS (2008)** *Halorhabdus tiamatea* sp. nov., a non-pigmented, extremely halophilic archaeon from a deep-sea, hypersaline anoxic basin of the Red Sea, and emended description of the genus *Halorhabdus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 215-220.

**Arahal DR, Castillo AM, Ludwig W, Schleifer KH, Ventosa A (2002a)** Proposal of *Cobetia marina* gen. nov., comb. nov., within the family *Halomonadaceae*, to include the species *Halomonas marina*. Syst Appl Microbiol 25: 207-211.

**Arahal DR, Ludwig W, Schleifer KH, Ventosa A (2002b)** Phylogeny of the family *Halomonadaceae* based on 23S and 16S rDNA sequence analyses. Int J Syst Evol Microbiol 52: 241-249.

**Arahal DR, Ventosa A (2006)** The family *Halomonadaceae*. In The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of *Bacteria* Volume 6 3rd edition Edited by: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E Springer, New York. pp. 811-835.

**Arahal DR, Vreeland RH, Litchfield CD, Mormile MR, Tindall BJ, Oren A, Bejar V, Quesada E, Ventosa A (2007)** Recommended minimal standards for describing new taxa of the family *Halomonadaceae*. Int J Syst Evol Microbiol 57: 2436-2446.

**Arias S, del Moral A, Ferrer MR, Tallon R, Quesada E, Bejar V (2003)** Mauran, an exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura*, with a novel composition and interesting properties for biotechnology. Extremophiles 7: 319-326.

**Ashby MN, Rine J, Mongodin EF, Nelson KE, Dimster-Denk D (2007)** Serial analysis of rRNA genes and the unexpected dominance of rare members of microbial communities. Appl Environ Microbiol 73: 4532-4542.

**Auguet JC, Barberan A, Casamayor EO (2010)** Global ecological patterns in uncultured *Archaea*. ISME J 4: 182-190.

## B

**Baas-Becking LGM (1934)** Geobiologie of Inleiding Tot de Milieukunde. Van Stockum & Zoon, The Hauge, The Netherlands.

**Baati H, Guerhazi S, Amdouni R, Gharsallah N, Sghir A, Ammar E (2008)** Prokaryotic diversity of a Tunisian multipond solar saltern. Extremophiles 12: 505-518.

**Balashov SP, Imasheva ES, Boichenko VA, Antón J, Wang JM, Lanyi JK (2005)** Xanthorhodopsin: a proton pump with a light-harvesting carotenoid antenna. Science 309: 2061-2064.

**Balashov SP, Lanyi JK (2007)** Xanthorhodopsin: Proton pump with a carotenoid antenna. Cell Mol Life Sci 64: 2323-2328.

**Balch W, Fox G, Magrum L, Woese C, Wolfe R (1979)** Methanogens: reevaluation of a unique biological group. Microbiol Mol Biol Rev 43: 260-296.

**Barberán A, Casamayor E (2010)** Global phylogenetic community structure and b-diversity patterns in surface bacterioplankton metacommunities. Aquat Microb Ecol 59: 1-10.

**Baronio M, Lattanzio VMT, Vaisman N, Oren A, Corcelli A (2010)** The acylhalocapnines of halophilic bacteria: structural details of unusual sulfonate sphingoids. J Lipid Res 51: 1878-1885.

**Béjar V, Calvo C, Moliz J, Diaz-Martínez F, Quesada E (1996)** Effect of growth conditions on the rheological properties and chemical composition of *Volcaniella eurihalina* exopolysaccharide. App Biochem Biotechnol 59: 77-85.

**Béjar V, Llamas I, Calvo C, Quesada E (1998)** Characterization of exopolysaccharides produced by 19 halophilic strains of the species *Halomonas eurihalina*. *J Biotechnol* 61: 135-141.

**Ben Ali Gam Z, Abdelkafi S, Casalot L, Tholozan JL, Oueslati R, Labat M (2007)** *Modicisalibacter tunisiensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic, moderately halophilic bacterium isolated from an oilfield-water injection sample, and emended description of the family *Halomonadaceae* Franzmann et al. 1989 emend Dobson and Franzmann 1996 emend. Ntougias et al. 2007. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 2307-2313.

**Benlloch S, Acinas SG, Anton J, López-López, Luz SP, Rodríguez-Valera F (2001)** Archaeal biodiversity in crystallizer ponds from a solar saltern: Culture versus PCR. *Microb Ecol* 41:12-19.

**Benlloch S, López-López A, Casamayor EO, Øvreås L, Goddard V, Daae FL, Smerdon G, Massana R, Joint I, Thingstad F y col. (2002)** Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environ Microbiol* 4: 349-360.

**Benlloch S, Martínez-Murcia AJ, Rodríguez-Valera F (1995)** Sequencing of bacterial and archaeal 16S rRNA genes directly amplified from a hypersaline environments. *Syst Appl Microbiol* 18: 574-581.

**Bernhard AE, Donn T, Giblin AE, Stahl DA (2005)** Loss of diversity of ammonia-oxidizing bacteria correlates with increasing salinity in an estuary system. *Environ Microbiol* 7: 1289-1297.

**Besemer K, Moeseneder MM, Arrieta JM, Herndl GJ, Peduzzi P (2005)** Complexity of bacterial communities in a river-floodplain system (Dnube, Austria). *Appl Environ Microbiol* 71:609-620.

**Bidle K, Amadio W, Oliveira P, Paulish T, Hicks S, Earnest C (2005)** A phylogenetic analysis of haloarchaea found in a solar saltern. *Bios* 76:89-96.

**Bobrow MN, Harris TD, Shaughnessy KJ, Litt GJ (1989)** Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J Immunol Methods* 125:279-285.

**Bockelmann U, Manz W, Neu TR, Szewzyk U (2000)** Characterization of the microbial community of lotic organic aggregates ('river snow') in the Elbe river of Germany by cultivation and molecular methods. *FEMS Microbiol Ecol* 33: 157-170.

**Bonch-Osmolovskaya EA, Slesarev AI, Miroshnichenko ML, Svetlichnaya TP, Alekseev VA (1988)** Characteristics of *Desulfurococcus amylolyticus* n. sp. a new extremely thermophilic archaeobacterium isolated from thermal springs of Kamchatka and Kunashir Island. *Microbiol* 57: 94-101.

**Boone DR (2001)** Genus V. *Methanolobus*. König and Stetter 1983, 439<sup>vp</sup>. The *Archaea* and the Deeply Branching and Phototrophic *Bacteria*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 1, Boone DR, Castenholz RW. pp. 283-287.

**Boone DR, Baker CC (2002)** Genus VI *Methanosalsum* gen. nov. The *Archaea* and the Deeply Branching and Phototrophic *Bacteria*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 1, Boone DR, Castenholz RW & Garrity GM, Springer, New York. pp. 287-289. Validation List N° 85. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002.

**Bouchotroch S, Quesada E, del Moral A, Llamas I, Béjar V (2001)** *Halomonas maura* sp nov., a new moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 1625-1632.

**Bowman JP, McCammon SA, Rea SM, McMeekin TA (2000)** The microbial composition of three limnologically disparate hypersaline Antarctic lakes. *FEMS Microbiol Lett* 183: 81-88.

**Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, Forterre P (2008a)** Mesophilic *Crenarchaeota*: proposal for a third archaeal phylum, the *Thaumarchaeota*. *Nat Rev Microbiol* 6: 245-252.

**Brummer IHM, Fehr W, Wagner-Dobler I (2000)** Biofilm community structure in polluted rivers: abundance of dominant phylogenetic groups over a complete annual cycle. *Appl Environ Microbiol* 66: 3078-3082.

**Buesing N, Filippini M, Bürgmann H, Gessner MO (2009)** Microbial communities in contrasting freshwater marsh microhabitats. *FEMS Microbiol Ecol* 69: 84-97.

**Burns DG, Camakaris HM, Janssen PH, Dyall-Smith ML (2004)** Combined use of cultivation-dependent and cultivation-independent methods indicates that members of most haloarchaeal groups in an Australian crystallizer pond are cultivable. *Appl Environ Microbiol* 70: 5258-5265.

## C

**Calvo C, Ferrer MR, Martínez-Checa F, Béjar V, Quesada E (1995)** Some rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Volcaniella eurihalina* F2-7. *Appl Biochem Biotechnol* 55: 45-54.

**Calvo C, Martínez-Checa F, Mota A, Béjar V, Quesada E (1998)** Effect of cations, pH and sulfate content on the viscosity and emulsifying activity of the *Halomonas eurihalina* exopolysaccharide. *J Ind Microbiol & Biotechnol* 20: 205-209.

**Cantrell SA, Casillas-Martínez L, Molina M (2006)** Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. *Mycol Res* 110: 962-970.

**Caporaso JG, Lauber CL, Costello EK y col. (2011c)** Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biol* 12: R50.

**Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA y col. (2011b)** Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *P Natl Acad Sci* 108: 4516-4522.

**Caporaso JG, Paszkiewicz K, Field D, Knight R, Gilbert JA (2011a)** The Western English Channel contains a persistent microbial seed bank. *ISME J* 6: 1089-1093.

**Casamayor EO, Calderón-Paz JI, Pedrós-Alió C (2000a)** 5S rRNA fingerprints of marine bacteria, halophilic archaea and natural prokaryotic assemblages along a salinity gradient. *FEMS Microbiol Ecol* 34: 113-119.

**Casamayor EO, Massana R, Benlloch S, Øvreås L, Díez B, López-López A (2002a)** Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environ Microbiol* 4: 338-348.

**Casamayor EO, Pedrós-Alió C, Muyzer G, Amann R (2002b)** Microheterogeneity in 16S rDNA-defined bacterial populations from a stratified planktonic environment is related to temporal changes and to ecological adaptations. *Appl Environ Microbiol* 68: 1706-1714.

**Casamayor EO, Schafer H, Baeras L, Pedrós-Alió C, Muyzer G (2000b)** Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 66: 499-508.

**Caton TM, Caton IR, Witte LR, Schneegurt MA (2009)** Archaeal Diversity at the Great Salt Plains of Oklahoma Described by Cultivation and Molecular Analyses. *Micro Ecol* 58: 519-528.



**Christen R (2008)** Global sequencing: A review of current molecular data and new methods available to assess microbial diversity. *Microb & Environ* 23: 253-268.

**Clementino MM, Vieira RP, Cardoso AM, Nascimento APA, Silveira CB, Riva TC, González ASM, Paranhos R, Albano RM, Ventosa A y col. (2008)** Prokaryotic diversity in one of the largest hypersaline coastal lagoons in the world. *Extremophiles* 12: 595-604.

**Colwell RR (1997)** Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 18: 302-307.

**Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JL, Knight R (2009)** Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 326:1694-1697.

**Cottrell M, Kirchman DL (2003)** Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware estuary. *Limnol Oceanogr* 48: 168-178.

**Crosby LD, Criddle CS (2003)** Understanding bias in microbial community analysis techniques due to rrr operon copy number heterogeneity. *Biotechniques* 34: 2-9.

**Cui HL, Gao X, Yang X, Xu XW (2010)** *Halorussus rarus* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Halobacteriaceae* isolated from a marine solar saltern. *Extremophiles* 14: 493-9.

**Cui HL, Gao X, Yang X, Xu XW (2011)** *Halolamina pelagica* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Halobacteriaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 1617-1621.

**Cui Z, Lai Q, Dong C, Shao Z (2008)** Biodiversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from deep sea sediments of the Middle Atlantic Ridge. *Environ Microbiol* 10: 2138-2149.

**Curtis TP, Sloan WT (2004)** Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Curr Opin Microbiol* 7: 221-226.

**Curtis TP, Sloan WT, Scannell JW (2002)** Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 10494-10499.

**Cytryn E, Minz D, Oremland RS, Cohen Y (2000)** Distribution and diversity of *Archaea* corresponding to the limnological cycle of a hypersaline stratified lake (Solar Lake, Sinai, Egypt). *Appl Environ Microbiol* 66: 3269-3276.

## D

**Dar SA, Kuenen JG, Muyzer G (2005)** Nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 71: 2325-2330.

**de la Haba RR, Sánchez-Porro C, Márquez MC, Ventosa A (2010)** Taxonomy of halophiles. In: K. Horikoshi, G. Antranikian, A. Bull, F. Robb and K. Stetter (eds.). *Extremophiles Handbook*. Springer-Verlag, Heidelberg.

**de la Haba RR, Sánchez-Porro C, Márquez MC, Ventosa A (2011)** Taxonomy of Halophiles *In: Extremophiles: Halophiles Part 3* Koki Horikoshi (ed), *Extremophiles handbook*, Springer. pp. 1-31.

**del Giorgio PA, Bouvier TC (2002)** Linking the physiologic and phylogenetic successions in free-living bacterial communities along an estuarine salinity gradient. *Limnol Oceanogr* 47: 471-486.

- DeLong EF, Pace NR (2001)** Environmental diversity of *Bacteria* and *Archaea*. *Syst Biol* 50: 470-8.
- DeLong EF, Wickham GS, Pace NR (1989)** Phylogenetic strains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 243: 1360-1363.
- Demergasso C, Casamayor EO, Chong G, Galleguillos P, Escudero L, Pedrós-Alió C (2004)** Distribution of prokaryotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, Northern Chile. *FEMS Microbiol Ecol* 48:57-69.
- Demergasso C, Escudero L, Casamayor EO, Chong G, Balague V, Pedrós-Alió C (2008)** Novelty and spatio-temporal heterogeneity in the bacterial diversity of hypersaline Lake Tebenquiche (Salar de Atacama). *Extremophiles* 12: 491-504.
- Dobson SJ, Franzmann PD (1996)** Unification of the genera *Deleya*, *Halomonas* and *Halovibrio* and the species *Paracoccus halodenitrificans* into a single genus, *Halomonas*, and placement of the genus *Zymobacter* in the family *Halomonadaceae*. *Int J Syst Bacteriol* 46: 550-558.
- Dong H, Zhang G, Jiang H, Yu B, Leah RC, Courtney RL, Fields MW (2006)** Microbial diversity in sediment of saline Qinghai Lake, China: linking geochemical controls to microbial ecology. *Microbiol Ecol* 51: 65-82.
- Dundas I (1998)** Was the environment for primordial life hypersaline? *Extremophiles* 2: 375-377.
- Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (2007)**. *Proteobacteria: Gamma Subclass*. In: *The Prokaryotes. A handbook of the Biology of Bacteria*. vol. 6, Springer.

## E

- Edwards U, Rogall T, Blocker H, Emde M, Bottger EC (1989)**. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes characterization of a gene coding for 16S-ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 17: 7843-7853.
- Elevi Bardavid R, Ionescu D, Oren A, Rainey FA, Hollen BJ, Bagaley DR, Small AM, McKay CM (2007)** Selective enrichment, isolation and molecular detection of *Salinibacter* and related extremely halophilic *Bacteria* from hypersaline environments. *Hydrobiologia* 576: 3-13.
- Elshahed MS, Najar FZ, Roe BA, Oren A, Dewers TA, Krumholz LR (2004)** Survey of archaeal diversity reveals an abundance of halophilic *Archaea* in a low salt, sulfide- and sulfur-rich spring. *Appl Environ Microbiol* 70: 2230-2239.
- Elshahed MS, Youssef NH, Spain AM y col. (2008)** Novelty and uniqueness patterns of rare members of the soil biosphere. *Appl Environ Microbiol* 74: 5422-5428.
- Euzéby JP (2013)** List of prokaryotic names with standing in nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr>. Accessed Sept 2013.

## F

- Farrelly V, Rainey FA, Stackebrandt E (1995)** Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl Environ Microbiol* 61: 2798-2801.

**Feazel LM, Spear JR, Berger AB, Harris KJ, Frank DN, Ley RE, Pace NR (2008)** Eucaryotic diversity in a hypersaline microbial mat. *Appl Environ Microbiol* 74: 329-332.

**Felsenstein J (2008)** Phylogenies Inference Package (PHYLIP) version 3.69. Department of Genome Sciences and Department of Biology, University of Washington, Seattle.

**Fenchel T, Finlay BJ (2004)** The ubiquity of small species: patterns of local and global diversity. *BioScience* 54: 777-784.

**Fendrich C (1988)** *Halovibrio variabilis* gen. nov. sp. nov., *Pseudomonas halophila* sp. nov. and a new halophilic aerobic coccoid Eubacterium from Great Salt Lake, Utah, USA. *Syst Appl Microbiol* 11: 36-43.

**Finlay BJ, Clarke KJ (1999)** Ubiquitous dispersal of microbial species. *Nature* 400: 828.

**Fisher SG, Lerman LS (1979)** Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell* 16: 191-200.

**Franzmann PD, Wehmeyer U, Stackebrandt E (1988)** *Halomonadaceae* fam. nov., a new family of the class *Proteobacteria* to accommodate the genera *Halomonas* and *Deleya*. *Syst Appl Microbiol* 11: 16-19.

## G

**Galand PE, Casamayor EO, Kirchman DL, Lovejoy C (2009)** Ecology of the rare microbial biosphere of the Arctic Ocean. *Proc Natl Acad Sci* 106: 22427-22432.

**García-Heredia I, Martín-Cuadrado AB, Mojica FJM, Santos F, Mira A, Antón J, Rodríguez-Valera F (2012)** Reconstructing viral genomes from the environment using fosmid clones: the case of haloviruses. *PLoS One* 7: e33802.

**Garriga M, Ehrmann MA, Arnau J, Hugas M, Vogel RF (1998)** *Carnimonas nigrificans* gen. nov., sp. nov., a bacterial causative agent for black spot formation on cured meat products. *Int J Syst Bacteriol* 48: 677-686.

**Garrity GM, Boone DR, Castenholz RW (2005b)** The *Archaea* and the deeply branching and phototrophic bacteria. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, Springer, Verlag.

**Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (2005a)** The *Proteobacteria*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, Springer, Verlag.

**Gelsomino A, Keijzer-Wolters AC, Cacco G, Elsas JDV (1999)** Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J of Microbiol Methods* 38: 1-15.

**Gibbons NE (1974)** Family V. *Halobacteriaceae*. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Ed., Buchanan, R.E. y Gibbons, N.E. (Eds). pp. 269-273.

**Gilbert JA, Steele JA y col. (2011)** Defining seasonal marine microbial community dynamics. *ISME J.* 6: 298-308.

**González A, King A, Robeson MS, Song S, Shade A, Metcalf JL, Knight R (2012)** Characterizing microbial communities through space and time. *Curr Opin in Biotechnol* 23: 431-436.

**González-Domenech CM, Béjar V, Martínez-Checa F, Quesada E (2008a)** *Halomonas nitroreducens* sp. nov., a novel nitrate- and nitrite-reducing species. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 872-876.

**González-Domenech CM, Martínez-Checa F, Béjar V, Quesada E (2010)**. Denitrification as an important taxonomic marker within the genus *Halomonas*. *Syst Appl Microbiol* 33: 85-93.

**González-Domenech CM, Martínez-Checa F, Quesada E, Béjar V (2008b)** *Halomonas cerina* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharideproducing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 803-809.

**González-Domenech CM, Martínez-Checa F, Quesada E, Béjar V (2009)** *Halomonas fontilapidosi* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 1290-1296.

**Gorlenko VM, Bryantseva IA, Rabold S, Tourova TP, Rubtsova D, Smirnova E, Thiel V, Imhoff JF (2009)** *Ectothiorhodospira variabilis* sp. nov., an alkaliphilic and halophilic purple sulfur bacterium from soda lakes. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 658-664.

**Grant WD, Gemmel RT, McGenity TJ (1998)** Halophiles. In Horikoshi, K and Grant, W D, eds, *Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environments*, Wiley-Liss, Inc. pp. 93-132.

**Grant WD, Larsen H (1989)** Extremely halophilic *archaeobacteria*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st ed., Vol.3. Staley, Bryant, Pfennig, and Holt (eds). Baltimore: The Williams and Wilkins Co. pp. 2216-2219.

**Green J, Bohannan JM (2006)** Spatial scaling of microbial biodiversity. *Trends in Ecol & Evol* 21: 501-507.

**Gunde-Cimerman N, Oren A, Plemenitâs A (2005a)** Adaptation to life at high salt concentrations. In: *Archaea, Bacteria and Eukarya*. Springer, Dordrecht.

**Gunde-Cimerman N, Oren A, Plemenitâs A (2005b)** Microsafari. the beautiful world of microorganisms. In: *The Salterns*. Drzavna Založba. Springer, Slovenije.

**Gunde-Cimerman N, Zalar P, Petrovic U, Turk M, Kogej T, de Hoog GS, Plemenitaš A (2004)** Fungi in the salterns. In: *Halophilic Microorganisms*. Springer, Heidelberg.

**Gutiérrez-Cánovas C, Velasco J, Millán A (2009)**. Effects of dilution stress on the functioning of a saline Mediterranean stream. *Hydrobiologia* 619: 119-132.

**Guzmán D, Quillaguamán J, Muñoz M, Hatti-kaul R (2010)** *Halomonas andesensis* sp. nov., a moderate halophile isolated from the saline lake Laguna Colorada in Bolivia. *Int. J Syst Evol Microbiol* 60: 749-753.

## H

**Hamady M, Knight R (2009)** Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Gen Res* 19: 1141-1152.

**Hatzenpichler R, Lebedeva EV, Spieck E, Stoecker K, Richter A, Daims H, Wagner M (2008)** A moderately thermophilic ammonia-oxidizing *Crenarchaeote* from a hot spring. *Proc Natl Acad Sci* 105: 2134-2139.

**Henriques IS, Alves A, Tacao M, Almeida A, Cunha A, Correia A (2006)** Seasonal and spatial variability of free-living bacterial community composition along an estuarine gradient (Ria de Aveiro, Portugal). *Estuarine Coastal Shelf. Sci* 68: 139-148.

**Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington EMH (1997)** Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol* 63: 3233-41.

**Hewson I, Fuhrman JA (2004)** Richness and diversity of bacterioplankton species along an estuarine gradient in Moreton Bay, Australia. *Appl Environ Microbiol* 70: 3425-3433.

**Hewson I, Steele JA, Capone DG y Fuhrman JA (2006b)** Remarkable heterogeneity in meso and bathypelagic bacterioplankton assemblage composition. *Limnol Oceanogr* 51:1274-1283

**Hewson I, Steele JA, Capone DG, Fuhrman JA (2006a)** Temporal and spatial scales of variation in bacterioplankton assemblages of oligotrophic surface waters. *Marin Ecol Progress Series* 311: 67-77.

**Hirsch PR, Mauchline TH, Clark IM (2010)** Culture independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biol & Biochemi* 42: 878-887.

**Hirschler-Réa A, Matheron R, Riffaud C, Moune S, Eatock C, Herbert RA, Willison JC, Caumette P (2003)** Isolation and characterization of spirilloid purple phototrophic bacteria forming red layers in microbial mats of Mediterranean salterns: description of *Halorhodospira neutriphila* sp. nov. and emendation of the genus *Halorhodospira*. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 153-163.

**Hollister EB, Amanda SE, Hammett AJM, Provin TL, Wilkinson HH, Gentry TJ (2010)** Shifts in microbial community structure along an ecological gradient of hypersaline soils and sediments. *The ISME Journal* 4: 829-838.

**Horner-Devine MC, Carney KM, Bohannon BJM (2004)** An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proceedings of the Royal Society of London* 271: 113-122.

**Huber R, Wilharm T, Huber D, Trincone A, Burggraf S, König H, Rachel R, Rockinger I, Fricke H, Stetter KO (1992)** *Aquifex pyrophilus* gen. nov., sp. nov., represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacteria. *Syst Appl Microbiol* 15: 340-351.

**Humayoun SB, Bano N, Hollibaugh JT (2003)** Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda lake in California. *Appl Environ Microbiol* 69: 1030-1042.

**Huys G, Swings J (1999)** Evaluation of a fluorescent amplified fragment length polymorphism (FAFLP) methodology for the genotypic discrimination of *Aeromonas* taxa. *FEMS Microbiol Lett* 177: 83-92.

## I

**Imhoff JF, Süling J (1996)** The phylogenetic relationship among *Ectothiorhodospiraceae*: a reevaluation of their taxonomy on the basis of 16S rDNA analyses. *Arch Microbiol* 165: 106-113.

## J

**Janse I, Bok J, Zwart G (2004)** A simple remedy against artificial double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *J Microb Methods* 57: 279-281.

- Javor BJ (1989)** *Hipersaline Environments Microbiol Biogeochem*. Springer-Verlag, Berlin.
- Jiang H, Dong H, Deng S, Yu B, Huang Q, Wu Q (2009)** Response of archaeal community structure to environmental changes in Lakes on the Tibetan Plateau, Northwestern China. *Geomicrobiol J* 26: 289-297.
- Jiang H, Dong H, Yu B, Li Y, Ji S, Liu X, Zhang C (2007)** Microbial response to salinity change in Lake Chaka, a hypersaline lake on Tibetan Plateau. *Environ Microbiol* 9: 2603-2621.
- Jiang H, Dong H, Yu B, Ye Q, Shen J, Rowe H, Zhang C (2008)** Dominance of putative marine benthic archaea in Qinghai Lake, northwestern China. *Environ Microbiol* 10: 2355-2367.
- Jiang H, Dong H, Zhang G, Yu B, Chapman LR, Fields MW (2006)** Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka: an athalassohaline lake in northwestern China. *Appl Environ Microbiol* 72: 3832-3845.
- Jones WJ, Paynter MJB, Gupta R (1983)** Characterization of *Methanococcus maripaludis* sp. nov., a new methanogen isolated from salt marsh sediment. *Arch Microbiol* 135: 91-97.
- Jukes TH, Cantor CR (1969)** Evolution of protein molecules. En: *Mammalian Protein Metabolism*. Munro, H. N. (Ed.). Boca Raton: Academic Press. pp. 21-132.
- K**
- Kadam PC, Ranade DR, Mandelco L, Boone DR (1994)** Isolation and characterization of *Methanolobus bombayensis* sp. nov., a methylotrophic methanogen that requires high concentrations of divalent cations. *Int J Syst Bacteriol* 44: 603-607.
- Kaurichev IS (1980)** *Prácticas de edafología*. Mir, Moscow.
- Kaye JZ, Baross JA (2000)** High incidence of halotolerant bacteria in Pacific hidrothermal-vent and pelagic environments. *FEMS Microbiol Ecol* 32: 249-260.
- Kemnitz D, Kolb S, Conrad R (2007)** High abundance of *Crenarchaeota* in a temperate acidic forest soil. *FEMS Microbiol Ecol* 60: 442-448.
- Kharroub K, Aguilera M, Quesada T, Morillo JA, Ramos-Cormenzana A, Boulharouf A, Monteoliva-Sánchez M (2006)** *Salicola salis* sp. nov., an extremely halophilic bacterium isolated from Ezzemoul sabkha in Algeria. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 2647-2652.
- Kim KK, Lee KC, Oh HM, Lee JS (2010)** *Halomonas stevensii* sp. nov., *Halomonas hamiltonii* sp. nov. and *Halomonas johnsoniae* sp. nov., isolated from a renal care centre. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 369-377.
- Kirchman DL, Dittel AI, Malmstrom RR, Cottrell MT (2005)** Biogeography of major bacterial groups in the Delaware Estuary. *Limnol Oceanogr* 50: 1697-1706.
- Knauth LP (1998)** Salinity history of the Earth's early ocean. *Nature* 395: 554-555.
- Könneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA (2005)** Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437: 543-546.
- Kowalchuk GA, Stephen JR, de Boer W, Prosser JI, Embley TM, Woldendorp JM (1997)**. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the  $\beta$ -subdivision of the class *Proteobacteria* in costal sand dunes by denaturing

gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl Environ Microbiol* 63: 1489-1497.

**Kubota K y col. (2008)** Evaluation of enzymatic cell treatments for application of CARD-FISH to methanogens. *J of Microbiol Methods* 72: 54-59.

**Kushner DJ, Kamekura M (1988)** Physiology of halophilic eubacteria. *In: Halophilic bacteria*. F. Rodríguez-Valera. (ed.), vol. 1, Boca Raton: CRC Press. pp. 109-138.

## L

**Lane DJ (1991)** 16S/23S rRNA sequencing. *In: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. E. Stackebrandt and M. Goodfellow (Ed.). Chichester, UK: Wiley. pp. 115-148.

**Langenheder S, Kisand V, Wikner J, Tranvik LJ (2003)** Salinity as a structuring factor for the composition and performance of bacterioplankton degrading riverine DOC. *FEMS Microbiol Ecol* 45: 189-202.

**Lanyi JK, Balashov SP (2011)** Xanthorhodopsin. *Halophiles and Hypersaline Environments* (Ventosa A, Oren A & Ma Y, eds). Springer, Verlag, Berlin. pp. 319-340.

**Lattanzio VMT, Baronio M, Oren A, Russell NJ, Corcelli A (2009)** Characterization of polar membrane lipids of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber* and possible role of cardiolipin. *Biochim Biophys Acta* 1791: 25-31.

**Legendre P, Legendre L (1998)** Numerical Ecology. *Developments in Environmental Modelling* 20. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.

**Leininger S, Urich T, Schloter M, Schwark L, Qi J, Nicol G et al. (2006)** *Archaea* predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442: 806-809.

**Li HB, Zhang LP, Chen SF (2008)** *Halomonas korlensis* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying bacterium isolated from saline and alkaline soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 2582-2588.

**Li L, Kato C, Horikoshi K (1999)** Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths. *Biodivers Conserv* 8: 659-677.

**Lindström ES (1998)** Bacterioplankton community composition in a boreal forest lake. *FEMS Microbiol Ecol* 27: 163-174.

**Lindström ES, Leskinen E (2002)** Do Neighboring Lakes Share Common Taxa of Bacterioplankton ? Comparison of 16S rDNA Fingerprints and Sequences from Three Geographic Regions. *Microbiol Ecol* 44: 1-9.

**Litchfield CD (2004)** Microbial Molecular and physiological diversity in hypersaline environments. *In Halophilic Microorganisms*. Springer, Verlag, Berlin, Heidelberg. A. Ventosa (ed.). pp. 49-61.

**Litchfield CD, Gillevet PM (2002)** Microbial diversity and complexity in hypersaline environments: a preliminary assessment. *J Ind Microbiol Biotechnol* 28: 48-55.

**Liu M, Xiao T, Wu Y, Zhou F, Zhang W (2011)** Temporal distribution of the archaeal community in the Changjiang Estuary hypoxia area and the adjacent east China Sea as determined by denaturing gradient gel electrophoresis and multivariate analysis. *Can J Microbiol* 57: 504-513.

**Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ (1997)** Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 63: 4516-4522.

**Liu WY, Wang J, Yuan M (2011)** *Halomonas aidingensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from Aiding salt lake in Xinjiang, China. *Antonie van Leeuwenhoek* 99: 663-670.

**Liu Y, Boone DR, Choy C (1990)** *Methanohalophilus oregonense* sp. nov., a methylotrophic methanogen from an alkaline, saline aquifer. *Int J Syst Bacteriol* 40: 111-116.

**Llamas I, Amjres H, Mata JA, Quesada E, Béjar V (2012)** The Potential Biotechnological Applications of the Exopolysaccharide Produced by the Halophilic Bacterium *Halomonas almeriensis*. *Molecules* 17: 7103-7120.

**Llamas I, Béjar V, Martínez-Checa F, Martínez-Canovas MJ, Molina I, Quesada E (2011)** *Halomonas stenophila* sp. nov., a halophilic bacterium that produces sulphate exopolysaccharides with biological activity. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 2508-2514.

**Llamas I, del Moral A, Martínez-Checa F, Arco Y, Arias S, Quesada E (2006)** *Halomonas maura* is a physiologically versatile bacterium of both ecological and biotechnological interest. *Antonie van Leeuwenhoek* 89: 395-403.

**López-López A, Yarza P, Richter M, Suárez-Suárez A, Antón J, Niemann H, Roselló-Móra R (2010)** Extremely halophilic microbial communities in anaerobic sediments from a solar saltern. *Environ Microbiol Rep* 2: 258-271.

**Lorenz MO (1905)** Methods of measuring concentration of wealth. *J Am Stat Assoc* 9: 209-219.

**Lozupone CA, Knight R (2007)** Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104: 11436-11440.

**Luque R, Béjar V, Quesada E, Martínez-Checa F, Llamas I (2012b)** *Halomonas ramblicola* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from Rambla Salada, a Mediterranean hypersaline rambla in south-east Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* doi:10.1099/ijs.0.039453-0.

**Luque R, Béjar V, Quesada E, Martínez-Checa F, Llamas I (2013)** Diversity of culturable halophilic *Bacteria* isolated from Rambla Salada, Murcia. (en preparación).

**Luque R, González-Domenech CM, Llamas I, Quesada E, Béjar V (2012a)** Diversity of culturable halophilic *Archaea* isolated from Rambla Salada, Murcia (Spain). *Extremophiles* 16: 205-213.

**Lutnæs BF, Oren A, Liaaen-Jensen S (2002)** New C40-carotenoid acyl glycoside as principal carotenoid in *Salinibacter ruber*, an extremely halophilic eubacterium. *J Nat Prod* 65: 1340-134.

## M

**Ma K, Liu X, Dong X (2006)** *Methanosaeta harundinacea* sp. nov., a novel acetate-scavenging methanogen isolated from a UASB reactor. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 127-131.

**Macnaughton SJ, Stephen JR, Venosa AD y col. (1999)** Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl Environ Microbiol* 65: 3566-3574.

**Madigan M, Martinko J, Parker J (2003)** Hábitat microbianos, ciclos de nutrientes e interacciones con las plantas, *Biología de los microorganismos*. Madrid, España: Prentice Hall Iberia. pp. 624-632.



- Magurran AE (1996)** Ecological diversity and its measurement. Chapman and Hall, London
- Makhdoumi-Kakhki A, Amoozegar MA, Kazemi B, Pâsic L, Ventosa A (2012b)** Prokaryotic diversity in aran-bidgol salt lake, the largest hypersaline playa in iran. *Microbes Environ* 27: 87-93.
- Makhdoumi-Kakhki A, Amoozegar MA, Ventosa A (2012a)**. *Salinibacter iranicus* sp. nov. and *Salinibacter luteus* sp. nov., isolated from a salt lake, and emended descriptions of the genus *Salinibacter* and of *Salinibacter ruber*. *Int J Syst Evol Microbiol* 62: 1521-1527.
- Malik S, Beer M, Megharaj M, Naidu R (2008)**. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environ Int* 34: 265-276.
- Manikandan M, Kannan V, Pâsic L (2009)** Diversity of microorganisms in solar salterns of Tamil Nadu, India. *World J Microbiol Biotechnol* 25: 1007-1017.
- María del Rosario R, María del Carmen M (2004)**. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22 :238-45.
- Martínez RJ, Mills HJ, Story S, Sobecky PA (2006)** Prokaryotic diversity and metabolically active microbial populations in sediments from an active mud volcano in the Gulf of Mexico. *Environ Microbiol* 8: 1783-1796.
- Martínez-Cánovas MJ, Béjar V, Martínez-Checa F, Páez R, Quesada E (2004c)** *Idiomarina fontislapidosi* sp. nov. and *Idiomarina ramblicola* sp. nov., isolated from inland hypersaline habitats in Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 1793-1797.
- Martínez-Cánovas MJ, Béjar V, Martínez-Checa F, Quesada E (2004b)** *Halomonas anticariensis* sp. nov., from Fuente de Piedra, a saline-wetland wildfowl reserve in Malaga, southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 1329-1332.
- Martínez-Cánovas MJ, Quesada E, Llamas I, Béjar V (2004a)** *Halomonas ventosae* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 733-737.
- Martínez-Checa F, Béjar V, Martínez-Cánovas MJ, Llamas I, Quesada E (2005)** *Halomonas almeriensis* sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium from Cabo de Gata, Almería, south-east Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 2007-2011.
- Martínez-Checa F, Toledo FL, El Mabrouki K, Quesada E, Calvo C (2007)** Characteristics of bioemulsifier V2-7 synthesized in culture media added of hydrocarbons: Chemical composition, emulsifying activity and rheological properties. *Bioresour Technol* 98: 3130-3135.
- Marzorati M, Wittebolle L, Boon N, Daffonchio D, Verstraete W (2008)** How to get more out of molecular fingerprints, practical tools for microbial ecology. *Environ Microbiol* 10: 1571-1581.
- Mata JA, Béjar V, Bressollier P, Tallón R, Urdaci MC, Quesada E, Llamas I (2008)** Characterization of exopolysaccharides produced by three moderately halophilic bacteria belonging to the family *Alteromonadaceae*. *J Appl Microbiol* 105: 521-528.
- Mata JA, Béjar V, Llamas I, Arias S, Bressollier P, Tallon R, Urdaci MC, Quesada E (2006)** Exopolysaccharides produced by the recently described halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*. *Res Microbiol* 157: 827-835.

**Mata JA, Martínez-Cánovas J, Quesada E, Béjar V (2002)** A detailed phenotypic characterisation of the type strains of *Halomonas* species. *Syst Appl Microbiol* 25: 360-375.

**Mathrani IM, Boone DR, Mah RA, Fox GE, Lau PP (1988)** *Methanohalophilus zhilinae* sp. Nov., an alkaliphilic, halophilic, methylotrophic methanogen. *Int J Syst Bacteriol* 38: 139-142.

**Maturrano L, Santos F, Rosselo-Mora R, Anton J (2006a)** Microbial Diversity in Maras Salterns, a Hypersaline Environment in the Peruvian Andes. *Appl Environ Microbiol* 72: 3887-3895.

**Maturrano L, Valens-Vadell M, Rosselló-Mora R, Antón J (2006b)** *Salicola marasensis* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic bacterium isolated from the Maras solar salterns in Peru. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 1685-1691.

**May R (1988)** How many species are there on Earth? *Science* 241: 1441-1449.

**McGenity TJ, Grant WD (1995)** Transfer of *Halobacterium saccharovorum*, *Halobacterium sodomense*, *Halobacterium trapanicum* NRC 34021 and *Halobacterium lacusprofundi* to the genus *Halorubrum* gen. nov., as *Halorubrum saccharovorum* comb. nov., *Halorubrum sodomense* comb. nov., *Halorubrum trapanicum* comb. nov., and *Halorubrum lacusprofundi* comb. nov. *Syst Appl Microbiol* 18: 237-243.

**McGenity TJ, Grant WD (2001)** Genus VII. *Halorubrum* McGenity and Grant 1996, 362VP (effective publication: McGenity and Grant 1995, 241). In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 1, Edited by Boone DR, Castenholz RW & Garrity GM, Springer, New York. pp. 320-324.

**Mellado E, Moore ERB, Nieto JJ, Ventosa A (1995)** Phylogenetic inferences and taxonomic consequences of 16S ribosomal DNA sequence comparison of *Chromohalobacter marismortui*, *Volcaniella eurihalina*, and *Deleya salina* and reclassification of *V. eurihalina* as *Halomonas eurihalina* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 45: 712-716.

**Mellado E, Sánchez-Porro C, Martín S, Ventosa A (2004)** Extracellular hydrolytic enzymes produced by moderately halophilic bacteria. In *Halophilic microorganisms*. Edited by Ventosa, A. (ed.). Springer, Verlag, Berlin. pp. 285-295.

**Mendes LW, Taketani RG, Navarrete AA, Tsai SM (2012)** Shifts in phylogenetic diversity of archaeal communities in mangrove sediments at different sites and depths in southeastern Brazil. *J resmic* 163: 366-77.

**Mesbah NM, Abou-El-Ela SH, Wiegel J (2007)** Novel and unexpected prokaryotic diversity in water and sediments of the alkaline, hypersaline lakes of the Wadi An Natrun, Egypt. *Microb Ecol* 54: 598-617.

**Meuser JE, Baxter BK, Spear JR, Peters JW, Posewitz MC, Boyd ES (2013)** Contrasting Patterns of Community Assembly in the Stratified Water Column of Great Salt Lake, Utah. *Microb Ecol* Doi: 10.1007/s00248-013-0180-9.

**Midgley DJ, Saleeba J, Stewart M, McGee P (2007)** Novel soil lineages of Archaea are present in semi-arid soils of eastern Australia. *Can J Microbiol* 53: 129-138.

**Mills HJ, Martínez RJ, Story S, Sobecky PA (2004)** Identification of members of the metabolically active microbial populations associated with *Beggiatoa* species. *Appl Environ Microbiol* 70: 447-5458.

**Mills HJ, Martínez RJ, Story S, Sobecky PA (2005)** Characterization of microbial community structure in Gulf of Mexico gas hydrates: a comparative analysis of DNA- and RNA-derived clone libraries. *Appl Environ Microbiol* 71: 3235-3247.

**Moeseneder MM, Arrieta JM, Herndl GJ (2005)** A comparison of DNA- and RNA-based clone libraries from the same marine bacterioplankton community. *FEMS Microbiol Ecol* 51: 341-352.

**Molin S, Givskov M (1999)** Application of molecular tools for *in situ* monitoring of bacterial growth activity. *Environ Microbiol* 1: 383-391.

**Mongodin EF, Nelson KE, Daugherty S y col. (2005)** The genome of *Salinibacter ruber*: Convergence and gene exchange among hyperhalophilic bacteria and archaea. *Proc Natl Acad Sci* 102: 18147-18152.

**Mouné S, Caumette P, Matheron R, Willison JC (2003)** Molecular sequence analysis of prokaryotic diversity in the anoxic sediments underlying cyanobacterial mats of two hypersaline ponds in Mediterranean salterns. *FEMS Microbiol Ecol* 44: 117-130.

**Muller DW, Hsü KJ (1987)** Event stratigraphy and paleoceanography in the Fortuna basin (Southeast Spain): a scenario for the Messinian salinity crisis. *Paleoceanogr* 2: 679-696.

**Murray AE, Preston CM, Massana R y col. (1998)** Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. *Appl Environ Microbiol* 64: 2585-2595.

**Murray E, Hollibaugh JT, Orrego C (1996)** Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Appl Environ Microbiol* 62: 2676-2680.

**Mutlu MB, Martínez-García M, Santos F, Peña A, Guven K, Antón J (2008)** Prokaryotic diversity in Tuz Lake, a hypersaline environment in Inland Turkey. *FEMS Microbiol Ecol* 65: 474-483.

**Muyzer G (1999)** DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 2: 317-322.

**Muyzer G, Brinkhoff T, Nübel U y col. (1998)** Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. En: Akkermans ADL, van Elsas JD y de Bruijn FJ (Eds). *Molecular Microbial Ecology Manual* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp. 1-27.

**Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG (1993)** Profiling of complex microbial populations by 16 denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59: 695-700.

**Muyzer G, Smalla K (1998)** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73: 127-141.

**Mwirichia R, Cousin S, Muigai AW, Boga HI, Stackebrandt E (2010)** Archaeal Diversity in the Haloalkaline Lake Elmenteita in Kenya. *Curr Microbiol* 60: 47-52.

## **N**

**Nemergut DR, Costello EK, Hamady M, Lozupone C, Jiang L, Schmidt SK, Fierer N, Townsend AR, Cleveland CC, Stanish L y col. (2011)** Global patterns in the biogeography of bacterial taxa. *Environ Microbiol* 13: 135-44.

**Neufeld JD, Mohn WW (2006)** Assessment of Microbial phylogenetic diversity based on environmental nucleic acid. In: *Molecular identification systematic and population structure of prokaryotes*, Erko Stackebrandt (ed). Springer, Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 220-259.

**Niederberger TD, Perreault NN, Lawrence JR, Nadeau JL, Mielke RE, Greer CW, Andersen DT, Whyte LG (2009)** Novel sulfur-oxidizing streamers thriving in perennial cold saline springs of the Canadian high Arctic. *Environ Microbiol* 11: 616–629.

**Niederberger TD, Perreault NN, Tille S, Lollar BS, Lacrampe-Couloume G, Andersen D, Greer CW, Pollard W, Whyte LG (2010)** Microbial characterization of a subzero, hypersaline methane seep in the Canadian High Arctic. *Int J Syst Evol Microbiol* 4: 1326-1339.

**Niemi RM, Heiskanen I, Wallenius K, Lindstrom K (2001)** Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *J of Microbiol Methods* 45: 155-165.

**Nogales B, Moore ERB, Abraham WR, Timmis KN (1999)** Identification of the metabolically-active members of a bacterial community in a polychlorinated biphenyl-polluted moorland soil. *Environ Microbiol* 1: 199-212.

**Nogales B, Moore ERB, Llobet-Brossa E, Rossello-Mora R, Amann R, Timmis KN (2001)** Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Appl Environ Microbiol* 67: 1874-1884.

**Ntougias S, Zervakis GI, Fasseas C (2007)** *Halotalea alkalilenta* gen. nov., sp. nov., a novel osmotolerant and alkalitolerant bacterium from alkaline olive mill wastes, and emended description of the family *Halomonadaceae* Franzmann et al. 1989, emend. Dobson and Franzmann 1996. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 1975-1983.

**Nübel U, García-Pichel F, Muyzer G (1997)** PCR primers to amplify 16S rRNA genes from *Cyanobacteria*. *Appl Environ Microbiol* 63: 3327-3332.

## O

**Ochsenreiter, Pfeifer F, Schleper C (2002)** Diversity of *Archaea* in hypersaline environments characterized by molecular-phylogenetic and cultivation studies. *Extremophiles* 6: 267-274.

**Oh D, Porter K, Russ B, Burns D, Dyall-Smith M (2010)** Diversity of *Haloquadratum* and other haloarchaea in three, geographically distant, Australian saltern crystallizer ponds. *Extremophiles* 141: 161-169.

**Okamoto T, Taguchi H, Nakamura K, Ikenaga H, Kuraishi H, Yamasato K (1993)** *Zymobacter palmae* gen. nov., sp. nov., a new ethanol-fermenting peritrichous bacterium isolated from palm sap. *Arch Microbiol* 160: 333-337. Validation list N° 53. *Int J Syst Bacteriol* (1995) 45: 418-419.

**Ollivier B, Fardeau ML, Cayol JL, Magot M, Patel BK, Prensier CG, Garcia JL (1998)** *Methanocalculus halotolerans* gen. nov., sp. nov., isolated from an oil-producing well. *Int J Syst Bacteriol* 48: 821-828.

**Olsen GJ, Woese CR (1993)** Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J* 7: 113-23.

**Oremland RS, Capone DG, Stolz JF, Fuhrman J (2005)** Whither or wither geomicrobiology in the era of 'community metagenomics'. *Nat Rev Microbiol* 3: 572-578.

**Oren A (1994)** The ecology of extremely halophilic archaea. *FEMS Microbiol Rev* 13: 415-440.

**Oren A (2002a)** Halophilic microorganisms and their environments. Kluwer Academic Publishers London.

**Oren A (2002b)** Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* 28: 56-63.

- Oren A (2002c)** Molecular ecology of extremely halophilic archaea and bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 39: 1-7.
- Oren A (2004)** Convergent evolution in extremely halophilic prokaryotes: a comparison between *Salinibacter ruber* (Bacteria) and the *Halobacteriaceae* (Archaea). *Evolutionary Theory and Processes: Modern Horizons. Papers in Honour of Eviatar Nevo* (Wasser SP, ed), pp. 53-64. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Oren, A. (2005). A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005. *Saline Systems* 1: 2.
- Oren A (2005)** A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005. *Saline Systems* 1: 2.
- Oren A (2006a)** Life at high salt concentrations, En: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. 3rd ed. Springer, Verlag, New York.
- Oren A (2006b)**. The order *Halobacteriales*. In *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria Volume 3* 3rd edition Edited by: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E, Springer, New York. pp. 113-164.
- Oren A (2008)** Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* 4: 2.
- Oren A (2010)** Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ Technol* 31: 825-834.
- Oren A (2013)** *Salinibacter*: an extremely halophilic bacterium with archaeal properties Aharon Oren. *FEMS Microbiol Lett* doi: 10.1111/1574-6968.12094.
- Oren A, Arahall DR, Ventosa A (2009)** Emended descriptions of genera of the family *Halobacteriaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 637-642.
- Oren A, Mana L (2002)** Amino acid composition of bulk protein and salt relationships of selected enzymes of *Salinibacter ruber*, an extremely halophilic Bacterium. *Extremophiles* 6: 217-223.
- Oren A, Mana L (2003)** Sugar metabolism in the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *FEMS Microbiol Lett* 223: 83-87.
- Oren A, Papke T (2010)** *Molecular phylogeny of microorganisms*. Ed by Aharon Oren and R Thane Papke Caister Academic Press.
- Oren A, Rodríguez-Valera F (2001)** The contribution of *Salinibacter* species to the red coloration of saltern crystallizer ponds. *FEMS Microbiol Ecol* 36: 123-130.
- Oueriaghli N, Béjar V, Quesada E, Martínez-Checa F (2012b)**. Influence of environmental variables on bacterial community composition in Rambla Salada, a hypersaline environment in south-eastern Spain. 9th International Congress on Extremophiles Sevilla. Comunicación Personal.
- Oueriaghli N, Béjar V, Quesada E, Martínez-Checa F (2013)** Molecular-ecology techniques reveal both spatial and temporal variations in the diversity of archaeal communities in Rambla Salada, Spain. *Microb Ecol* Doi 10.1007/s00248-013-0176-5.
- Oueriaghli N, González Domenech CM, Martínez-Checa F, Quesada E, Muyzer G, Béjar V (2012a)** Estudio molecular de la diversidad del género *Halomonas* en Rambla Salada (Murcia). XIV Taxonomy, Phylogeny and Microbial Biodiversity Group Meeting of Spanish Microbiology Society. Comunicación Personal.

**Owen RJ, Pitcher D (1985)** Current methods for estimating DNA base composition and levels of DNA-DNA hybridization. En: Chemical methods in bacterial systematic. M. Good-Fellow y E. Minnikin (Ed.). Academic Press. London. pp. 67-93.

**Oxley APA, Lanfranconi MP, Würdemann D, Ott S, Schreiber S, McGenity TJ, Timmis KN, Nogales B (2010)** Halophilic archaea in the human intestinal mucosaemi. *Environ Microbiol* 12: 2398-2410.

**Özcan B, Özcengiz G, Collieri A, Cokmus C (2007)** Diversity of halophilic archaea from six hypersaline environments in Turkey. *J Microbiol Biotech* 17: 985-992.

## **P**

**Pace NR (1996)** New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *Features* 62 :463-470.

**Pagaling E, Wang H, Venables M, Wallace A, Grant WD, Cowan DA, Jones BE, Ma Y, Ventosa A, Heaphy S (2009)** Microbial biogeography of six salt lakes in Inner Mongolia, China, and a salt lake in Argentina. *Appl Environ Microbiol* 75: 5750-5760.

**Pascual JA (1997)** El arca de la biodiversidad (De genes, especies, y ecosistemas). Celeste Ediciones, Madrid, España. Springer, Verlarg, Berling. pp. 77-100.

**Pâsic L, Barutal GS, Ulrich PN, Grabnar M, Velikonja BH (2005)** Diversity of halophilic *Archaea* in the crystallizers of an Adriatic solar saltern. *FEMS Microbiol Ecol* 54: 491-498.

**Pâsic L, Rodríguez-Mueller B, Martín-Cuadrado AB, Mira A, Rohwer F, Rodríguez-Valera F (2009)** Metagenomic islands of hyperhalophiles: the case of *Salinibacter ruber*. *BMC Genomics* 10: 570.

**Pâsic L, Ulrich NP, Crnigoj M, Grabnar M, Velikonja BH (2007)** Haloarchaeal communities in the crystallizers of two Adriatic solar salterns. *Can J Microbiol* 53: 8-18.

**Paterek JR, Smith PH (1988)** *Methanohalophilus mahii* gen. nov., sp. nov., a methylotrophic halophilic methanogen. *Int J Syst Bacteriol* 38: 122-123.

**Paul Antony C, Murrell JC, Shouche YS (2012)** Molecular diversity of methanogens and identification of *Methanolobus* sp. as active methylotrophic archaea in Lonar crater lake sediments. *FEMS Microbiol Ecol* 81: 43-51.

**Pedrós-Alió C (2004)** Trophic ecology of solar salterns. In: A Ventosa (ed) *Halophilic Microorganisms* Springer, Berlin. pp. 33-48.

**Pedrós-Alió C (2006)** Marine microbial diversity: Can it be determined? *Trends in Microbiol* 14: 257-263.

**Pedrós-Alió C, Calderón-Paz JI, Maclean MH, Medina G, Marrasé C, Gasol JM, Guixa-Boixereu N (2000)** The microbial food web along salinity gradients. *FEMS Microbiol Ecol* 32: 143-155.

**Pennisi E (2005)** What determines species diversity. *Science* 309: 90.

**Pernthaler A, Pernthaler J, Amann R (2002)** "Fluorescence *In Situ* Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of marine bacteria". *Appl Environ Microbiol* 68: 3094-3101.

**Pernthaler A, Pernthaler J, Amann R (2004)** Sensitive multi-colour fluorescence *in situ* hybridization for the identification of environmental microorganisms. *Mol Microb Ecol* 3: 711-726.

**Pesaro M, Widmer F (2002)** Identification of novel *Crenarchaeota* and *Euryarchaeota* clusters associated with different depth layers of a forest soil. *FEMS Microbiol Ecol* 42: 89-98.

**Phillips K, Zaidan F 3rd, Elizondo OR, Lowe KL (2012)** Phenotypic characterization and 16S rDNA identification of culturable non-obligate halophilic bacterial communities from a hypersaline lake, La Sal del Rey, in extreme South Texas (USA). *Aquat Biosyst* 8: 5.

**Poli A, Esposito E, Orlando P, Lama L, Giordano A, De Appolonia F, Nicolaus B, Gambacorta A (2011)** *Halomonas alkaliantarctica* sp. nov., isolated from saline lake Cape Russell in Antarctica, an alkalophilic moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 2563-2565.

**Poli A, Nicolaus B, Denizci AA, Yavuzturk B, Kazan D (2013)** *Halomonas smyrnensis* sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 63: 10-18.

**Polz MF, Cavanaugh CM (1998)** Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *App Environ Microbiol* 64: 3724-3730.

**Porter K, Kukkaro P, Bamford JK, Bath C, Kivela HM, Dyall-Smith ML, Bamford DH (2005)** SH1: a novel, spherical halovirus isolated from an Australian hypersaline lake. *Virology* 335: 22-33.

**Preston CM, Wu KY, Molinski TF, DeLong EF (1996)** A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 93: 6241-6246.

**Purdy KJ, Cresswell-Maynard TD, Nedwell DB, McGenity TJ, Grant WD, Timmis KN, Embley TM (2004)** Isolation of haloarchaea that grow at low salinities. *Environ Microbiol* 6: 591-595.

## Q

**Quesada E, Béjar V, Calvo C (1993)** Exopolysaccharide production by *Volcaniella eurihalina*. *Experientia* 49: 1037-1041.

**Quesada E, Béjar V, Ferrer MR y col. (2004)** Moderately halophilic bacteria which produce exopolysaccharides. In: *Halophilic Microorganisms*. Edited by Ventosa, A. (ed). Springer, Berlin. pp. 297-314.

## R

**Rainey FA, Zhilina TN, Boulygin ES, Stackebrandt E, Tourova TP, Zavarzin GA (1995)** The taxonomic status of the fermentative halophilic anaerobic bacteria: description of *Haloanaerobiales* ord. nov., *Halobacteroidaceae* fam. nov., *Orenia* gen. nov. and further taxonomic rearrangements at the genus and species level. *Anaerobe* 1: 185-199.

**Ramakrishnan V, Moore PB (2000)** Atomic structures at last: the ribosome in 2000. *Curr Opin Struc Biol* 11: 144-154.

**Ramírez-Díaz L, Vidal-Abarca MR, Calvo JF, Suarez ML, Palazón JA, Esteve MA, Gómez R, Jimenez A, Pujol JA, Sánchez JA y col. (1995)** Bases ecológicas para la delimitación, ordenación y gestión del Paisaje Protegido de las Ramblas de Ajauque y Salada Vol I & II. Consejería de Medio Ambiente, Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, Spain.

**Ranjard L, Poly F, Nazaret S (2000)** Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Res Microbiol* 151: 167-177.

**Rappé MS, Giovannoni SJ (2003)** The uncultured microbial majority. *Annual Rev of Microbiol* 57: 369-394.

**Raskin L, Poulsen LK, Noguera DR, Rittmann BE, Stahl DA (1994)** Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol* 60: 1241-1248.

**Rhasband W (2010)** The ImageJ (Image processing and Analysis in Java) version 1.43u. National Institutes of Health, Bethesda, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.

**Rodríguez-Valera F (1988)** Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. In: F Rodríguez-Valera (ed) *Halophilic Bacteria* CRC Press, Boca Raton. pp. 3-30.

**Rodríguez-Valera F, Ventosa A, Juez G, Imhoff JF (1985)** Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern. *Microbial Ecol* 11: 107-115.

**Roselló-Mora R, Peña L, Brito-Echeverría J, López-López A, Valens-Vadell M y col. (2008)** Metabolic evidence for biogeographic isolation of the extremophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *ISME J* 2: 242-253.

**Roselló-Mora R, Lee N, Antón J, Wagner M (2003)** Substrate uptake in extremely halophilic microbial communities revealed by microautoradiography and fluorescence *in situ* hybridization. *Extremophiles* 7: 409-413.

**Rotthauwe JH, Witzel KP, Liesack W (1997)** The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol* 63: 4704-4712.

**Ruiz-Ruiz C, Srivastava GK, Carranza D, Mata JA, Llamas I, Santamaría M, Quesada E, Molina IJ (2011)** An exopolysaccharide produced by the novel halophilic bacterium *Halomonas stenophila* strain B-100 selectively induces apoptosis in human T leukaemia cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 89: 345-355.

## S

**Sabet S, Diallo L, Hays L, Jung W, Dillon JG (2009)** Characterization of halophiles isolated from solar salterns in Baja California, Mexico. *Extremophiles* 13: 643-656.

**Sakar S, Margules C (2002)** Operationalizing biodiversity for conservation planning. *Biosc J* 27: 299-308.

**Sambrook J, Russel DW (2001)** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd (ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press: NY.

**Sánchez-Porro C, De la Haba RR, Soto-Ramírez N, Márquez MC, Montalvo-Rodríguez R, Ventosa A (2009)** Description of *Kushneria aurantia* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Halomonadaceae*, and a proposal for reclassification of *Halomonas marisflavi* as *Kushneria marisflavi* comb. nov., of *Halomonas*



*indalinina* as *Kushneria indalinina* comb. nov. and of *Halomonas avicenniae* as *Kushneria avicenniae* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol 59: 397-405.

**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, Martín S, Mellado E, Ventosa A (2003)** Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. J Appl Microbiol 94: 295-300.

**Santos F, Meyerdierks A, Peña A, Rosselló-Mora R, Amann R, Antón J (2007)** Metagenomic approach to the study of halophages: the environmental halophage. Environ Microbiol 9: 1711-1723.

**Santos F, Yarza P, Parro V, Briones C, Antón J (2010)** The metavirome of a hypersaline environment. Environ Microbiol 12: 2965-2976.

**Sauder LA, Peterse F, Schouten S, Neufeld JD (2012)** Low-ammonia niche of ammonia-oxidizing archaea in rotating biological contactors of a municipal wastewater treatment plant. Environ Microbiol 14: 2589-600.

**Savage KN, Krumholz LR, Oren A, Elshahed MS (2007)** *Haladaptatus paucihalophilus* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a low-salt, sulfide-rich spring. Int J Syst Evol Microbiol 57: 19-24.

**Scholten, JCM, Joye SB, Hollibaugh JT, Murrell JC (2005)** Molecular analysis of the sulfate reducing and archaeal community in a meromictic soda lake (Mono Lake, California) by targeting 16S rRNA, *mcrA*, *apsA*, and *dsrAB* genes. Microbiol Ecol 50: 29-39.

**Schroeter J (1872)** Über einige durch Bakterien gebildete Pigmente. In: F. Cohn (ed.), Beiträge zur Biologie der Pflanzen, J.U. Kern's Verlag, Breslau, 1875, Migula (W.): System der Bakterien, Vol. 2, Gustav Fischer, Jena, 1900. pp. 109-126.

**Schwalbach M, Brown M, Fuhrman J (2005)** Impact of light on marine bacterioplankton community structure. Aquatic Microbial Ecol 39: 235-245.

**Seaman PF, Day MJ (2007)** Isolation and characterization of a bacteriophage with an unusually large genome from the Great Salt Plains National Wildlife Refuge, Oklahoma, USA. FEMS Microbiol Ecol 60: 1-13.

**Shange RS, Ankumah RO, Ibekwe AM, Zabawa R, Dowd SE (2012)** Distinct soil bacterial communities revealed under a diversely managed agroecosystem. PLoS One 7: e40338.

**Shannon CE, Weaver W (1949)** A Mathematical model of communication. urbana, In: University of Illinois Press.

**Shapovalova AA, Khijniak TV, Tourov TP, Muyzer G, Sorokin DY (2008)** Heterotrophic denitrification at extremely high salt and pH by haloalkaliphilic gammaproteobacteria from hypersaline soda lakes. Extremophiles 12: 619-625.

**Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM (1989)**. Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. Proc Natl Acad Sci 86: 232-236.

**Shi W, Takano T, Liu S (2012)** Isolation and characterization of novel bacterial taxa from extreme alkali-saline soil. World J Microbiol Biotechnol 28: 2147-2157.

**Silveira CB, Vieira RP, Cardoso AM, Paranhos R, Albano RM y col. (2011)** Influence of salinity on bacterioplankton communities from the Brazilian rain forest to the coastal Atlantic Ocean. *PLoS One* 6: e17789.

**Simpson EH (1949)** Measurement of diversity. *Nature* 163: 688.

**Sogin M, Morrison H, Huber J, Mark Welch D, Huse S, Neal P, Arrieta J, Herndl G (2006)** Microbial diversity in the deep sea and the unexplored "rare biosphere". *Proc Natl Acad Sci* 103: 15-20.

**Sørensen KB, Canfield DE, Teske AP, Oren A (2005)** Community composition of a hypersaline endoevaporitic microbial mat. *Appl Environ Microbiol* 71: 7352-7365.

**Sorokin DY, Tourova TP, Galinski EA, Muyzer G, Kuenen JG (2008)** *Thiohalorhabdus denitrificans* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic, sulfur-oxidizing, deep-lineage gammaproteobacterium from hypersaline habitats. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 2890-2897.

**Spear JR, Ley RE, Berger AB, Pace NR (2003)** Complexity in natural microbial ecosystems: the Guerrero Negro experience. *Biol Bull* 204: 168-173.

**Srinivas TNR, Anil Kumar P, Sasikala Ch, Ramana ChV, Imhoff JF (2007)** *Rhodobium gokarnense* sp. nov., a novel phototrophic alphaproteobacterium from a saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 932-935.

**Stahl DA, Amann R (1991)** Development and application of nucleic acid probes. In: Stackebrandt, Goodfellow M (eds) *Nucleic acid techniques. Bacterial systematic*. Wiley, Chichester. pp. 205-248.

**Suzuki M, Rappé M, Giovannoni SJ (1998)** Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity. *Appl Environ Microbiol* 64: 4522-4529.

**Suzuki MT y Giovannoni SJ (1996)** Bias Caused by Template Annealing in the Amplification of Mixtures of 16S rRNA Genes by PCR. *Appl Environ Microbiol* 62: 625-630.

**Swan BK, Ehrhardt CJ, Reifel KM, Moreno LI, Valentine DL (2010)** Archaeal and bacterial communities respond differently to environmental gradients in anoxic sediments of a California hypersaline lake, the Salton Sea. *Appl Environ Microbiol* 76: 757-768.

## **T**

**Tamames J, Abellan J, Pignatelli M, Camacho A, Moya A (2010)** Environmental distribution of prokaryotic taxa. *BMC Microbiol* 10: 85.

**Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007)** MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.

**ter Braak CJF (1987)** CANOCO. A Fortran program for canonical community ordination by partial detrended canonical correspondence analysis, principal components analysis and redundancy analysis (version 2.1), 95 p. Tno Institute for Applied Computer Science, Statistics Department Wageningen, 6700 AC Wageningen, The Netherlands.

**ter Braak CJF (1990)** Update notes. CANOCO version 3.10, 35 p. Agricultural Mathematics Group, Wageningen, The Netherlands.

**ter Braak CJF (1995)** Ordination. En: Jongman R, C ter Braak. & O van Tongeren (eds), Data analysis in community and landscape ecology (Second Edition). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 91-173.

**Teske A, Wawer C, Muyzer G, Ramsing NB (1996)** Distribution of sulfate-reducing *bacteria* in a stratified fjord (Mariager fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Appl Environ Microbiol* 62: 1405-1415.

**Tindall BJ (1992)** The family *Halobacteriaceae*. In: The Prokaryotes. A Handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. 2<sup>a</sup> Ed. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. y Schleifer, K.H. (Eds), Springer, Verlag, New York. pp.768-808.

**Tindall BJ y col. (2009)** Complete genome sequence of *Halomicrobium mukohataei* type strain (arg-2<sup>T</sup>). *Stand Genomic Sci* 1: 3.

**Torsvik V, Øvreas L (2002)**. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 5: 240-245.

**Torsvik V, Øvreas L, Thingstad TF (2002)** Prokaryotic diversity: magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* 296: 1064-1066.

**Tourna M, Stieglmeier M, Spang A, Konneke M, Schintlmeister A, Urich T, Engeld M, Schloterd M, Wagner M, Richter A y col. (2011)** *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. *Proc Natl Acad Sci* 108: 8420-8425.

**Tripathi Binu M, Kim M, Singh D, Lee-CL, Lai-Hoe A, Ainuddin AN, Go R, Rahim RA, Husni MHA, Chun J y col. (2012)** Tropical Soil Bacterial Communities in Malaysia: pH Dominates in the Equatorial Tropics Too. *Microb Ecol* 64: 474-484.

## V

**Van der Gucht K, Cottenie K, Muylaert K y col. (2007)** The power of species sorting: Local factors drive bacterial community composition over a wide range of spatial scales. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 20404-20409.

**Velasco J, Millan A, Hernandez J, Gutierrez C, Abellan P, Sanchez D, Ruiz M (2006)** Response of biotic communities to salinity changes in a Mediterranean hypersaline stream. *Saline Systems* 2: 12.

**Velasco J, Millan A, Vidal-Abarca MR, Suarez ML, Ortega GC (2003)** Macrophytic, epipellic and epilithic primary production in a semiarid Mediterranean stream. *Freshwater Biology* 48: 1408-1420.

**Ventosa A (2006)** Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environments. In: N. A. Logan, H. M. Lappin-Scott and P. C. F. Oyston (eds.). *Prokaryotic diversity: mechanism and significance*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 223-253.

**Ventosa A, Arahal D (2002)** Physico-Chemical characteristics of hypersaline environments and their biodiversity. *Encyclopedia of Life Support System*. París. Eolss Publishers Co. Ltd. pp. 10020-10031.

**Ventosa A, Gutierrez MC, Garcia MT, Ruiz-Berraquero F (1989)** Classification of "*Chromobacterium marismortui*" in a new genus, *Chromohalobacter* gen. nov., as *Chromohalobacter marismortui* comb. nov., nom. rev. *Int J Syst Bacteriol* 39: 382-386.

**Ventosa A, Mellado E, Sánchez-Porro C, Márquez MC (2008)** Halophilic and halotolerant micro-organisms from soils. In: Microbiology of Extreme Soils P Dion and C S Nautiyal (eds), Springer, New York. pp. 87-115.

**Ventosa, A (2004)** Halophilic Microorganisms. Springer, Verlag, Heidelberg.

**Vreeland RH (1992)** The family *Halomonadaceae*. In: A. Ballows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer (eds.). The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. 2nd edition, vol. 4. Springer, Verlag, New York. pp. 3181-3188.

**Vreeland RH, Litchfield CD, Martin EL, Elliot E (1980)** *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. Int J Syst Bacteriol 30: 485-495.

## W

**Wainø M, Tindall BJ, Ingvorsen K (2000)** *Halorhabdus utahensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic member of the *Archaea* from Great Salt Lake, Utah. Int J Syst Evol Microbiol 50: 183-190.

**Walsh DA, Papke RT, Doolittle WF (2005)** Archaeal diversity along a soil salinity gradient prone to disturbance. Environ Microbiol 7: 1655-1666.

**Wang CY, Wu SJ, Ng CC, Tzeng WS, Shyu YT (2012)** *Halomonas beimenensis* sp. nov., isolated from an abandoned saltern. Int J Syst Evol Microbiol 62: 3013-3017.

**Wang J, Yang D, Zhang Y, Shen J, van der Gast C y col. (2011)** Do Patterns of Bacterial Diversity along Salinity Gradients Differ from Those Observed for Macroorganisms? PLoS ONE 6: e27597.

**Wania AA, Surakasib VP, Siddharth J, Raghavan RG, Patole MS, Ranade D, Shouche YS (2006)** Molecular analyses of microbial diversity associated with the Lonar soda lake in India: An impact crater in a basalt area. Res Microbiol 157: 928-937.

**Watanabe K, Teramoto M, Futamata H, Harayama S (1998)** Molecular detection, isolation, and physiological characterisation of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated-sludge. Appl Environ Microbiol 63: 4396-4402.

**Wawer C, Jetten MSM, Muyzer G (1997)** Genetic diversity and expression of the (NiFe) hydrogenase large subunit gene of *Desulfovibrio* spp. in environmental samples. Appl Environ Microbiol 63: 4360-4396.

**Weisburg WG, Barn SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991)** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol 173: 697-703.

**Wellington EM, Berry A, Krsek M (2003)** Resolving functional diversity in relation to microbial community structure in soil: exploiting genomics and stable isotope probing. Curr Opin Microbiol 6: 295-301.

**Winsor GL, Van Rossum T, Lo R, Khaira B, Whiteside MD, Hancock RE, Brinkman FS (2009)** *Pseudomonas* Genome Database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. Nucleic Acids Res 37: D483-488.

**Wintzingerode F, Göbel UB, Stackebrandt E (1997)** Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiol Rev 21: 213-229.

**Woese CR (1987)** Bacterial evolution. Microb Rev 51: 221-271.

**Woese CR (1990)** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. Proc Natl Acad Sci 87: 4576-4579.

**Wu QL, Chatzinotas A, Wang J, Boeigk J (2009)** Genetic diversity of eukaryotic plankton assemblages in eastern Tibetan lakes differing by their salinity and altitude. Microb Ecol 58: 569-581.

**Wu QL, Xingm P, Liu WT (2010)** East Tibetan lakes harbour novel clusters of picocyanobacteria as inferred from the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer sequences. Microb Ecol 59: 614-622.

**Wu QL, Zwart G, Schauer M, Kamst-van Agterveld MP, Hahn MW (2006)** Bacterioplankton community composition along a salinity gradient of sixteen high-mountain lakes located on the Tibetan Plateau, China. Appl Environ Microbiol 72: 5478-5485.

### X

**Xing P, Hahn MW, Wu Q (2009)** Low taxon richness of bacterioplankton in high-altitude lakes of the Eastern Tibetan Plateau, with a Predominance of *Bacteroidetes* and *Synechococcus* spp. Appl Environ Microbiol 75: 7017-7025.

**Xu XW, Wu YH, Zhou Z, Wang CS, Zhou YG, Zhang HB, Wang Y, Wu M (2007)** *Halomonas saccharevitans* sp. nov., *Halomonas arcis* sp. nov. and *Halomonas subterranea* sp. nov., halophilic bacteria isolated from hypersaline environments of China. Int J Syst Evol Microbiol 57: 1619-1624.

### Y

**Yoshie S, Noda N, Tsuneda S, Hirata A, Inamori Y (2004)** Design of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and microbial community analysis in the denitrification process of a saline industrial wastewater treatment system. FEMS Microbiol Lett 235: 183-189.

### Z

**Zhang Y, Jiao NZ, Cottrell MT, Kirchman DL (2006)** Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production along a salinity gradient in the South China Sea. Aquat Microb Ecol 43: 233-241.

**Zhao B, Wang H, Mao X, Li R, Zhang YJ, Tang S, Li WJ (2012)** *Halomonas xianhensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a saline soil contaminated by crude oil. Int J Syst Evol Microbiol 62: 173-178.

**Zhilina TN, Zavarzin GA (1987)** *Methanohalobium evestigatus*, n. gen., n. sp. The extremely halophilic methanogenic *Archaeobacterium*. Dokl Akad Nauk SSSR 293: 464-468.

**ANEXOS**

## Anexo 1

### 1. Electroforesis en geles de agarosa

- Composición de TBE 10X

TBE 10X	
Trizma Base (AppliChem)	54g
Ácido bórico (AppliChem)	27,5g
EDTA (AppliChem) 0,5M, pH 8	20ml
Agua bidestilada c.s.p.	500ml

- Composición de tampón de carga 6X

Tampón de carga 6X	
Azul de bromofenol (Sigma®)	0,25%, (p/v)
Xilen-cianol (Sigma®)	0,25%, (p/v)
Glicerol	30%, (p/v)

- Composición tampón de carga 6X para muestras de ARN

Tampón de carga 6X	
Azul de bromofenol (Sigma®)	0,25%, (p/v)
Formamida (Sigma®)	50%, (p/v)
Formaldehído	15%, (p/v)
Buffer Tris-Acetato (TAE 50X)	2%, (p/v)
Glicerol	13%, (v/v)

- Composición de H<sub>2</sub>O DEPC

H <sub>2</sub> O DEPC	
Solución de dipirocarbonato (DEPC) (Sigma®)	1/1000, (v/v)

- Composición de bromuro de etidio

Bromuro de etidio	
Solución stock	10mg/ml

## Anexo 2

### 1. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

- Composición de la solución Acrilamida/Bis 40% (37.5:1)

Acrilamida/Bis 40% (37.5:1)	
Acrilamida (37.5:1) (Sigma®)	38.93g
Bis-acrilamida	1.07g
Agua bidestilada c.s.p	100ml

- Composición del buffer TAE 50X

TAE 50X	
Tris base	242g (2M)
Acido acético glacial	57,1ml (1M)
0,5M EDTA pH 8	100ml (50mM)
Agua bidestilada c.s.p	1000ml

- Composición del buffer TAE 1X

TAE 1X	
Buffer Tris-Acetato (TAE 50X)	140ml
Agua bidestilada c.s.p	6,86ml
Volumen total	7ml



- Composición de Persulfato de Amonio

Persulfato de Amonio 10%, (p/v)	
Persulfato de Amonio, grado biología molecular	0,1g
Agua bidestilada c.s.p	1ml

- Composición de la solución desnaturalizante del 0%

Solución desnaturalizante 0%	
Acilamida/Bis al 40% (37.5:1) (Sigma®)	20ml
Buffer Tris-Acetato (TAE 50X)	2ml
Agua bidestilada c.s.p	78ml
Volumen total	100ml

- Composición de la solución desnaturalizante del 80%

Solución desnaturalizante 80%	
Acilamida/Bis al 40% (37.5:1) (Sigma®)	20ml
Buffer Tris-Acetato (TAE 50X)	2ml
Formamida desionizada (Sigma®)	40ml
Urea, grado biología molecular (Sigma®)	42g
Agua bidestilada c.s.p	100ml
Volumen total	100ml

### Anexo 3

1. Hibridación *in situ* de fluorescencia con un sistema de deposición del receptor catalizado (CARD-FISH)

- Composición de la solución de lisozima

Lisozima 10mg/ml	
EDTA	0,05M
Tris-HCl	0,1M
pH	8

- Solución de agarosa 0,1%, (p/v)

Agarosa 0,1%, (p/v)	
Agarosa	0,1g
Agua bidestilada c.s.p.	100ml

- Composición de acromopeptidasa (60U/ml)

Acromopeptidasa	
Tris-HCl	0,01M
pH	8

- Composición del tampón PBS (10X)

PBS 10X	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14.24g
NaCl	75.97g
pH	8
Agua bidestilada c.s.p.	1000ml

- Composición del tampón EDTA (0,5M)

EDTA 0,5M	
EDTA	186,12g/l
Pastillas de NaOH	Hasta desolver
pH	8
Agua bidestilada c.s.p.	1000ml

- Composición de SDS 10%, (p/v)

SDS 10%	
SDS	50g
Agua bidestilada c.s.p.	500ml

- Composición del tampón de hibridación

Tampón de hibridación	
NaCl 5M	3,6ml
Tris-HCl	0,4ml
Formamida	7ml
pH	8
SDS 10%, (p/v)	20µl
Bloking Reagent 10%, (p/V)	2,0ml
Agua bidestilada c.s.p.	7ml
Volumen total	20ml

Añadir 2g del dextrane sulfato, calentar entre 40° hasta 60°, comprobar si el dextrane sulfato esta disuelto guardar a -20° durante meses.

- Composición del tampón del lavado

Tampón del lavado	
NaCl 5M	420µl
Tris-HCl	1,0ml
EDTA 0,5M	0,5ml
SDS 10%, (p/v)	25µl
Agua bidestilada c.s.p.	50ml

- Composición del tampón de amplificación de la señal Card

Tampón de amplificación de señal CARD	
PBS 20X	2ml
NaCl 5M	16ml
Bloking Reagent 10%, (p/v)	0,4ml
Agua bidestilada c.s.p.	Hasta 40ml

Añadir 4g del dextrane sulfato, calentar entre 40° hasta 60°, comprobar si el dextrane sulfato esta disuelto guardar a -4° durante semanas.