

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Farmacia
Departamento de Microbiología



**“DIVERSIDAD DE LAS ESPECIES DESNITRIFICANTES
DEL GÉNERO *Halomonas*”**

Carmen María González Domenech
Tesis Doctoral, 2007



**Universidad de Granada
Facultad de Farmacia
Departamento de Microbiología**

Memoria presentada por la Licenciada en Farmacia
Dña. Carmen María González Domenech para aspirar al grado de Doctor

Granada, 2007

VºBº Los directores

Fdo. Dra. Emilia Quesada Arroquia
Catedrática de Microbiología
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada

Fdo. Dra. Victoria Béjar Luque
Profesora Titular de Microbiología
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada

Fdo. Fernando Martínez-Checa Barrero
Profesor Contratado Doctor
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada

La Doctorando

Fdo. Carmen María González Domenech

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

Título: “Taxonomía polifásica de bacterias halófilas productoras de exopolisacáridos”

Investigador principal: Dra. Victoria Béjar Luque.

Entidad financiadora: CICYT; BOS2000-1519 (2001-2003).

Título: “Diversidad de las especies desnitrificantes del género *Halomonas*. Estudio filogenético, genotípico y fisiológico”

Investigador principal: Dra. Victoria Béjar Luque.

Entidad financiadora: CICYT; BOS2003-00498 (2003-2004).

Título: “Respiración anaeróbica de nitrato y desnitrificación en el género *Halomonas*”

Investigador principal: Dra. Victoria Béjar Luque.

Entidad financiadora: Plan Propio de Investigación de la Universidad de Granada (2004).

Título: “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”.

Investigador principal: Dra. Emilia Quesada Arroquia.

Entidad financiadora: CICYT; CGL2005-05947 (2006-2008).

Asimismo, durante la realización de la Tesis Doctoral, la doctoranda ha disfrutado de una beca de Formación de Personal Universitario, concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia (2003-2007).

Parte de los resultados de esta Tesis se obtuvieron gracias a las estancias realizadas por la doctoranda en el Departamento de Biotecnología del Kluver laboratory, perteneciente a la Technology University de Delft (Holanda), bajo la dirección del Dr. Gerard Muyzer, así como en el Departamento de Ciencias Biológicas, de la Universidad de Missouri-Rolla (U.S.A.), bajo la dirección de la Dra. Melanie Mormile.

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

Publicaciones

González-Domenech, C.M., Martínez-Checa, F., Quesada, E., Béjar, V. 2007. *Halomonas cerina* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* (en revisión).

González-Domenech, Béjar, V., C.M., Martínez-Checa, F., Quesada, E. *Halomonas nitratireducens* sp. nov., a new nitrate and nitrite reducing species of the genus *Halomonas*. *Int J Syst Evol Microbiol.* (en revisión).

Comunicaciones a congresos

González-Domenech, C.M., Martínez-Cánovas, M.J., Quesada E., Del Moral, A., Béjar, V. Relación filogenética entre las especies desnitrificantes *Halomonas ventosae*, *H.halodenitrificans*, *H.campisalis* y *H.desiderata*. XIX Congreso Nacional de Microbiología. Santiago de Compostela, 2003.

González-Domenech, C.M., Martínez-Checa, F., Quesada E., Del Moral, A., Béjar, V. Descripción de nuevas cepas halófilas moderadas productoras de exopolisacárido y con capacidad desnitrificante. XX Congreso Nacional de Microbiología. Cáceres, 2005.

González-Domenech, C.M., Martínez-Checa, F., Béjar, V. , Quesada, E. *Strain N64, an exopolysaccharide-producing bacteria capable of denitrifying.* 2nd FEMS Congress of European Microbiologists. Madrid, 2006.

González-Domenech, C.M., Martínez-Checa, F., Béjar, V. and Quesada, E. Capacidad desnitrificante en el género *Halomonas*. VII Reunión de la Red Nacional de Organismos Extremófilos, Castalla (Alicante), 2007.

González-Domenech, C.M., Martínez-Checa, F., Muyzer, G., Mormile, M.R., Béjar, V., Quesada, E. Diversity of the denitrifying species of the genus *Halomonas*. Halophiles-2007 (International Congress Exploring Life at High Salinity). Colchester (Reino Unido), 2007.

González-Domenech, C.M., Martínez-Checa, F., Béjar, V. , Quesada, E.*Halomonas nitroreducens* sp. nov., una nueva especie anaerobia facultativa del género *Halomonas*. XXI Congreso Nacional de Microbiología. Sevilla, 2007.

AGRADECIMIENTOS

En estas primeras páginas quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que, de distintas maneras, han contribuido a que culminase esta Tesis Doctoral y lo hiciese aún sana y salva. Sois muchos los que me habéis acompañado estos años; por ello, y segura del alto “índice de impacto” de este apartado, espero no dejarme a nadie en el tintero.

En primer lugar empezaré agradeciendo a las Dras. Emilia Quesada y Victoria Béjar la oportunidad de formar parte de su grupo. Vuestra sabiduría y confianza me ha hecho crecer desde el punto de vista científico, pero aún más como persona. Parafraseando a Bernard de Chartres puedo decir que si he logrado ver más allá, es porque he estado a hombros de gigantes. Gracias sinceramente.

Seguidamente, quisiera también expresar mi gratitud al Dr. Fernando Martínez-Checa, mi otro director de tesis, por su apoyo especialmente estos últimos estresantes meses. Hemos compartido buenos y malos momentos, pero lo importante es que siempre terminaron con una sonrisa.

A mis otras “jefas”, Ana, Inma y Marita. De tí, Ana sabes sobradamente que admiro tu enorme capacidad para llevar a buen puerto cualquier proyecto. Eres un ejemplo a seguir por tu vitalidad y entusiasmo. Inma, gracias de corazón por tus consejos, tanto científicos como personales. Tienes un enorme potencial en la ciencia y, con permiso del “Pater familia” Fernando, serás una digna sucesora del “matriarcado”. Gracias también a mi “compí” de pádel, Marita, por compartir conmigo sus dotes deportivas. El año que viene, como mínimo, ¡a semifinales!

Al Dr. Gerard Muyzer, de la Universidad Tecnológica de Delft (Holanda) por haberme acogido en su laboratorio, permitiéndome vivir una gran experiencia profesional y humana. De forma especial, agradecer al Dr. Dimitri Sorokin la cesión de sus dos aislados y su asesoramiento siempre que lo he necesitado, y cómo no a Mirjam, por su amistad incondicional a pesar de la distancia.

A la Dra. Melanie Mormile de la Universidad de Rolla (E.E.U.U.) por la accesibilidad para trabajar en su grupo, poniendo a mi disposición todo cuanto necesité. Al Doctor Bernardo Prado, de la Universidad Técnica Federico Santa María de Chile, por la cesión de sus muestras.

Aunque a veces el tiempo conlleva el olvido, espero en mi caso recordar siempre y con la misma gratitud como hasta ahora, a todos aquellos que cuando empecé me acompañaban en el laboratorio. Fuisteis unos grandes maestros y demostrasteis una enorme paciencia con la principiante: Gracias María José y Cristina además por vuestra "herencia microbiana", Sole, por tus palabras de ánimo en mis periplos por el mundo, Rafa Páez, por tu simpatía y tu ingenio, que te hicieron inolvidable, y Rafita, por el toque internacional al grupo. Gracias Montse, por tu amabilidad y conocimientos; si alguien empezó a pelearse con las NAR, NAS,... fuiste tú y espero que hoy estés satisfecha de la continuación. Entre las "viejas glorias" no me puedo olvidar de mi Yolandita, de todas ellas quizás con la que más tiempo compartí en el laboratorio. Fuiste una gran compañera para mí y espero que lo seas para el resto de inspectores. ¡Mucha suerte en tus opos! Por último, y aunque no sabía bien si situarte en este párrafo o en el siguiente, si que tenía claro que debía "colocarte": Muchas gracias Juanan por tus palabras de ánimo en los momentos menos buenos, por tu generosidad de tiempo, por darme ciento y una vez tu artículo, que seguía perdiendo ciento y una vez. Al final conseguí tenerlo el suficiente tiempo para leerlo y ya verás que Mata y col. (2002) está en todas partes en la memoria.

El grupo ha cambiado bastante durante estos años. A las nuevas incorporaciones, aunque hace poco que están aquí, a todos tengo algo por lo que estar agradecida: A Rocío, por arrancarme siempre una sonrisa con sus historias y por su comprensión. Suerte con tu "prole"... ¡bacteriana!; a Nahid, por su colaboración y simpatía; a A Ali, por su espíritu curioso y por esos tés tan deliciosos. Aunque en retirada, tampoco me puedo olvidar de José por su nobleza y disponibilidad infinita. ¡Suerte en los "madriles"! A Arnaldo y Maricarmen "técnico", por su bondad y ayuda el tiempo que estuvieron.

A todos los compañeros que han pasado o que aún "sobreviven" en el Departamento: A Madeleín, por esas "terapias" conjuntas que tanto nos ayudaban y por tu paciencia a la hora de las comidas. Te deseo lo mejor en el mundo de la ciencia, ¡confío en tu valía!. A José Morillo, por el aprecio mostrado en todo momento, que sin duda es recíproco. Suerte también en tu aventura en el país de los tulipanes; A Ana González, porque ha sido bonito recuperar la amistad entre tubos y placas; A María Luján, Lamía, a Paquita, Marga, Kiko, Carmen B., las "teres", y en especial al grupo de Belén Rodelas, porque en los últimos meses pasé más tiempo en vuestro laboratorio que en el mío y siempre me acogisteis estupendamente.

A Lourdes, por tu amabilidad en todo momento, y a Gloria, por tu dedicación plena al Departamento. A todos los profesores del Departamento por el interés mostrado.

A los “vecinos” de Bioquímica, en especial a Laura y Natalia, porque empezamos siendo compañeras de fatigas y hemos terminado siendo buenas amigas. Mucha suerte a las dos, que os la merecéis. A Antonio Suárez, José María, Alí, Tríní, María José, Dámaso y Olga por su disponibilidad siempre que necesité algo.

También quiero agradecer por los buenos momentos compartidos a mis compañeros “los científicos”, Manolico, Platero, Fernando, Jessica, Teresa y todos los demás. Espero que lo que la ciencia unió, el tiempo y los problemas del camino que hemos elegido, no los separe. Gracias también a Rafa de Sevilla, por su disposición para enviar cualquier “bichillo”.

A mis amigos ajenos a la cuarta planta, por vuestra paciencia y comprensión: A Bea y Juan, por vuestra amistad sincera en cualquier punto del mundo donde estemos. Muchas gracias además por los asesoramientos bioinformáticos. A Ana, Cristi, Felisa, Javi, Laura Medicina, María, Nama´a, Patricia, Pilar y Teresa, por vuestro ánimo y cariño en todo momento, para mí han sido fundamentales. A mis amigos de Atarfe, por la alegría e interés que me han transmitido. A los nuevos amigos de “Córdoba”, especialmente a Manolo, por la ayuda con la portada.

Agradecer también desde estas páginas a mi familia de Morata la ilusión y el interés que siempre han manifestado por mi trabajo y por todo lo que conseguía. A los otros tíos y primos, por su apoyo y afecto.

Por último pero como en los artículos, los más importantes, los verdaderos responsables de que hoy esté aquí. A mis padres, porque éste es un buen momento para dejar por escrito mi agradecimiento por los sacrificios y esfuerzos que habéis realizado a lo largo de...siempre. Sois unos padres estupendos. A mis abuelos, por ser para mí un ejemplo a seguir en todo y porque sé que disfrutaréis mucho viéndome en este día. A mis hermanos y cuñadas, por ser simplemente como sois, geniales.

MUCHAS GRACIAS A TODOS.

A mis padres
A mi familia y amigos

**“Todo aquello que puede concebir la mente de
un hombre, se puede lograr”**

W. Clement Stone, hombre de negocios y filántropo estadounidense

I. INTRODUCCIÓN

I.1. EL GÉNERO <i>Halomonas</i>	1
I.1.1. HISTORIA Y COMPOSICIÓN ACTUAL	1
I.1.2. GENERALIDADES	5
I.2. PROCESO DE DESNITRIFICACIÓN	7
I.2.1. CONCEPTO Y CARACTERÍSTICAS GENERALES	7
I.2.2. BASES MOLECULARES DE LA DESNITRIFICACIÓN	10
I.2.2.1. Nitrato reductasa	11
I.2.2.2. Nitrito reductasa	14
I.2.2.3. Óxido nítrico reductasa	15
I.2.2.4. Óxido nitroso reductasa	16
I.2.3. MICROORGANISMOS DESNITRIFICANTES	17
I.2.3.1. Bacterias desnitrificantes	18
I.2.3.2. Archeas desnitrificantes	20
I.2.3.3. Hongos desnitrificantes	21
I.2.3.4. Especies del género <i>Halomonas</i> con capacidad desnitrificante	22
I.2.4. FISIOLOGÍA DE LA DESNITRIFICACIÓN. INFLUENCIA DE DIVERSOS FACTORES EN EL PROCESO	23
I.2.4. 1. Oxígeno	24
I.2.4. 2. Óxidos de nitrógeno	26
I.2.4. 3. Temperatura	27
I.2.4. 4. pH	28
I.2.4. 5. Luz	28
I.2.4. 6. Salinidad	29
I.2.4. 7. Metales	30
I.2.4. 8. Fuente de carbono orgánica	31
I.2.4. 9. Factores nutricionales	32
I.2.4.10. Otros compuestos inhibidores	33
I.2.5. ECOLOGÍA DE LA DESNITRIFICACIÓN	34
I.2.5.1. Importancia ecológica del proceso de desnitrificación	34
I.2.5.2. Análisis de la diversidad de desnitrificantes de un hábitat mediante técnicas	35

moleculares	
I.3.5.3. Cuantificación de la actividad desnitrificante de un hábitat	37
I.3.5.4. Empleo de la desnitrificación bacteriana en la biorremediación de aguas residuales	38
II. OBJETIVOS	41
III. CAPÍTULO I: SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS	43
III.1. MATERIAL Y MÉTODOS	43
III.1.1. Criterios de inclusión de cepas procedentes de nuestra colección de cultivo	44
III.1.2. Conservación de los microorganismos	46
III.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
III.2.1. <i>Halomonas alimentaria</i> como especie desnitrificante	47
III.2.2. Cepas de nuestra colección de cultivo con capacidad desnitrificante	47
III.2.3. Cepas de nuestra colección de cultivo que respiran sobre nitratos	48
IV. CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE NUEVAS CEPAS DESNITRIFICANTES	49
IV.1. MATERIAL Y MÉTODOS	49
IV.1.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	49
IV.1.1.1. Pruebas morfológicas, culturales, fisiológicas, bioquímicas, nutricionales y de susceptibilidad frente a diversos antimicrobianos	49
IV.1.1.2. Taxonomía numérica	71
IV.1.1.3. Microscopía electrónica	73
IV.1.2. ESTUDIO GENOTÍPICO	74
IV.1.2.1. Extracción de ADN genómico	74
IV.1.2.2. Determinación de la concentración de ADN	76
IV.1.2.3. Determinación del contenido en G+C	76
IV.1.2.4. Hibridación ADN-ADN	77
IV.1.3. ANÁLISIS FILOGENÉTICO	82
IV.1.3.1. Obtención de la secuencia del gen ARNr 16S	82
IV.1.3.2. Análisis filogenético	83
IV.1.4. ANÁLISIS QUIMIOTAXONÓMICO	85

IV.2. RESULTADOS	86
IV.2.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	86
IV.2.1.1. Resultados de las pruebas morfológicas, culturales, fisiológicas, bioquímicas, nutricionales y de susceptibilidad frente a diversos antimicrobianos	86
IV.2.2. Taxonomía numérica	97
IV.2.2. ESTUDIO GENOTÍPICO	99
IV.2.2.1. Determinación del contenido en G+C	99
IV.2.2.2. Hibridación ADN-ADN	99
IV.2.3. ESTUDIO FILOGENÉTICO	100
IV.2.4. ANÁLISIS QUIMIOTAXONÓMICO	104
	105
IV.3. DISCUSIÓN	113
IV.3.1. FENÓN 1	117
IV.3.2. FENÓN 2	122
IV.3.3. FENÓN 3	124
IV.3.4. FENÓN 4	127
IV.3.5. CEPAS NO INCLUIDAS EN LOS FENA DESCRITOS	
V. <u>CAPÍTULO III: ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL PROCESO DE DESNITRIFICACIÓN EN EL GÉNERO HALOMONAS</u>	131
V.1. MATERIAL Y MÉTODOS	131
V.1.1. AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES <i>narH</i>, <i>nirS</i>, <i>nirK</i> Y <i>nosZ</i>	131
V.1.2. ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR POR ELECTROFORESIS CONVENCIONAL	134
V.1.3. SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN AMPLIFICADOS	135
V.1.3.1. Ligación del inserto en el vector	136
V.1.3.2. Preparación de células competentes con CaCl ₂ y transformación por choque térmico	136
V.1.3.3. Chequeo de clones portadores del inserto y extracción del ADN plasmídico	137
V.1.4. ANÁLISIS FILOGENÉTICO	138
V.1.4.1. Construcción de árboles filogenéticos	138
V.1.4.2. Determinación del contenido en G+C de los genes <i>narH</i> , <i>nirS</i> , <i>nirK</i> y <i>nosZ</i>	139

V.2. RESULTADOS	140
V.2.1. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>narH</i>	140
V.2.2. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>nirS</i>	141
V.2.3. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>nirK</i>	143
V.2.4. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>nosZ</i>	143
V.2.5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO	145
V.2.5.1. Procesamiento del alineamiento con el programa <i>Gblocks</i>	145
V.2.5.2. Establecimiento de la semejanza entre secuencias	145
V.2.5.3. Construcción de árboles filogenéticos	146
V.2.5.4. Determinación del contenido en G+C	147
V.3. DISCUSIÓN	155
V.3.1. METODOLOGÍA USADA	158
V.3.2. FILOGENIA BASADA EN EL GEN ARNr 16S	160
V.3.3. FILOGENIA BASADA EN EL GEN <i>narH</i> Y EN LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DEDUCIDA DE LA PROTEÍNA NarH	161
V.3.4. FILOGENIA BASADA EN EL GEN <i>nirS</i> Y EN LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DEDUCIDA DE LA PROTEÍNA NirS	162
V.3.5. FILOGENIA BASADA EN EL GEN <i>nosZ</i> Y EN LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DEDUCIDA DE LA PROTEÍNA NosZ	164
VI. CAPÍTULO IV: ESTUDIO FISIOLÓGICO DE LA DESNITRIFICACIÓN	167
VI.1. MATERIAL Y MÉTODOS	167
VI.1.1. MICROORGANISMOS	167
VI.1.2. TASA DE RESPIRACIÓN SOBRE NITRATO Y NITRITO CON DIFERENTES FUENTES DE CARBONO Y ALTA CONCENTRACIÓN DE SAL	167
VI.1.2.1. Descripción del procedimiento de cultivo y muestreo	167
VI.1.2.2. Método analítico	169
VI.1.2.3. Expresión de los resultados	170
VI.1.3. CUANTIFICACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS MEDIANTE TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA	170
VI.2. RESULTADOS	172
VI.2.1. TASA DE RESPIRACIÓN SOBRE NITRATO Y NITRITO CON DIFERENTES FUENTES DE CARBONO Y ALTA CONCENTRACIÓN DE SAL	172

VI.2.1.1. Determinación de parámetros cinéticos comparativos	172
VI.2.1.2. Representación gráfica de los resultados obtenidos	174
VI.2.2. CUANTIFICACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS MEDIANTE TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA	187
VI.3. DISCUSIÓN	188
VI.3.1. CAPACIDAD PARA RESPIRAR SOBRE NITRATOS Y NITRITOS	188
VI.3.2. INFLUENCIA DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA CAPACIDAD PARA RESPIRAR SOBRE NITRATOS Y NITRITOS	192
VI.3.3. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE SAL EN EL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATO	196
VI.3.4. CAPACIDAD PARA FORMAR BIOPELÍCULAS	197
VII. CAPÍTULO V: ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN DESNITRIFICANTE DEL GÉNERO HALOMONAS EN DOS HÁBITATS SALINOS	198
VII.1. MATERIAL Y MÉTODOS	198
VII.1.1. SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS	
VII.1.2. EXTRACCIÓN DEL ADN DE LAS MUESTRAS	198
VII.1.3. ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE GRADIENTE DESNATURALIZANTE (DGGE)	198
VII.1.3. 1. Diseño de cebadores específicos del género <i>Halomonas</i>	199
VII.1.3. 2. Amplificación mediante PCR de fragmentos de los genes ARNr 16S, <i>narH</i> , <i>nirS</i> y <i>nosZ</i> del ADN de las muestras	200
VII.1.3. 3. Determinación del gradiente de sustancias desnaturalizantes mediante DGGE perpendicular	202
VII.1.3. 4. Separación de los productos de PCR mediante DGGE paralelo	205
VII.1.3. 5. Secuenciación de los fragmentos reamplificados y análisis comparativo de bandas	207
VII.2. RESULTADOS	208
VII.2.1. DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS CEBADORES PARA EL GÉNERO HALOMONAS	208
VII.2.2. DETERMINACIÓN PARA CADA GEN DEL GRADIENTE DESNATURALIZANTE MEDIANTE DGGE PERPENDICULAR	209
VII.2.3. ESTUDIO MEDIANTE DGGE PARALELO DE LA DIVERSIDAD DE LA POBLACIÓN DESNITRIFICANTE DEL GÉNERO HALOMONAS EN DOS MUESTRAS DE SUELO	211

VII.2.3.1. Análisis por DGGE de fragmentos del gen ARNr 16S de las muestras de suelo	211
VII.2.3.2. Análisis por DGGE de fragmentos del gen <i>narH</i> de las muestras de suelo	214
VII.2.3.3. Análisis por DGGE de fragmentos del gen <i>nirS</i> de las muestras de suelo	214
VII.2.3.4. Análisis por DGGE de fragmentos del gen <i>nosZ</i> de las muestras de suelo	217
VII.3. DISCUSIÓN	218
VII.3.1. ELECCIÓN DE LA TÉCNICA PCR-DGGE. OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE PCR E INCONVENIENTES DEL MÉTODO	218
VII.3. 2. DISEÑO DE CEBADORES ESPECÍFICOS	220
VII.3. 3. APROXIMACIÓN A LA DIVERSIDAD DE LA POBLACIÓN DEL GÉNERO <i>HALOMONAS</i> POR MEDIO DEL GEN ARNR 16S	221
VII.3.4. EMPLEO DEL GEN <i>NarH</i> COMO MARCADOR DE LA DIVERSIDAD DE LA POBLACIÓN DESNITRIFICANTE Y NITRATO REDUCTORA DEL GÉNERO <i>HALOMONAS</i>	223
VII.3. 5. EMPLEO DEL GEN <i>NirS</i> COMO MARCADOR DE LA DIVERSIDAD DE LA POBLACIÓN DESNITRIFICANTE DEL GÉNERO <i>HALOMONAS</i>	223
VII.3.6. EMPLEO DEL GEN <i>NosZ</i> COMO MARCADOR DE LA DIVERSIDAD DE LA POBLACIÓN DESNITRIFICANTE DEL GÉNERO <i>HALOMONAS</i>	224
<u>IX. CONCLUSIONES</u>	228
<u>X. GENERAL SUMMARY</u>	
<u>XI. BIBLIOGRAFÍA</u>	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía de <i>Halocynthia aurantium</i>	5
Figura 2. Aspecto de las colonias de <i>H. maura</i>	6
Figura 3. Ciclo biogeoquímico del nitrógeno sostenido por microorganismos	7
Figura 4. Reacciones de un proceso de desnitrificación completo	8
Figura 5. Representación de los procesos desnitrificación, DNRA y asimilación de nitrato y/o nitrato	9
Figura 6. Organización y orientación en la membrana citoplasmática de la cadena de transporte de electrones anaerobia de <i>Pseudomonas stutzeri</i>	10
Figura 7. Localización de los sistemas enzimáticos en la arquea <i>P. aerophilum</i>	21
Figura 8. Ilustración representando los distintos factores que influyen sobre la comunidad desnitrificante y sobre el mismo proceso de desnitrificación	24
Figura 9. Compuestos inhibidores de la desnitrificación	33
Figura 10. Formación de oxidantes a través del ciclo fotolítico del dióxido de nitrógeno (NO ₂)	34
Figura 11. Esquema de un biorreactor de membrana sumergida	38
Figura 12. Resultado positivo y negativos en la prueba de respiración sobre nitratos/nitritos	44
Figura 13. Rambla salada (Murcia)	48
Figura 14. Salinas del Sabinar (Almería)	48
Figura 15. Salinas de Cahuil, (Laguna de Cahuil, Chile)	48
Figura 16. Microfotografía de la cepa 4CR, mostrando su único flagelo polar (16000X)	87
Figura 17. Microfotografía de la cepa HGDK1, mostrando sus flagelos peritricos (16000X)	87
Figura 18. Microfotografía de la cepa 5CR, con su único flagelo polar (16.000X)	87
Figura 19. Microfotografía de la cepa F5, mostrando su único flagelo polar (16000X)	87
Figura 20. Resultados positivos y negativos de algunas de las pruebas bioquímicas	92
Figura 21. Dendrograma basado en 107 características fenotípicas, utilizando el coeficiente de Sokal y Michener y la técnica de agrupación UPGMA.	98
Figura 22. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen ARNr 16S, obtenido mediante el método Máxima Parsimonia	101
Figura 23a. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen ARNr 16S, obtenido mediante el método Neighbour-Joining	102
Figura 23b. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen ARNr 16S, obtenido mediante el método de Mínima Evolución	103
Figura 24. Árbol consenso simplificado, construido en base a la secuencia del gen ARNr 16S	111
Figura 25. Fotografías de microscopía electrónica de las cepas 11S y 12CR	114
Figura 26. Fotografías de microscopía electrónica de las cepas 15CR, R53 y SP4	125
Figura 27. Fotografía al microscopio electrónico de la cepa Al 13 (31500X)	129
Figura 28. Condiciones de amplificación del gen <i>narH</i>	132
Figura 29. Condiciones de amplificación del gen <i>nirS</i>	132
Figura 30. Condiciones de amplificación del gen <i>nosZ</i>	133
Figuras 31a y 31b. Producto de amplificación de un fragmento del gen <i>narH</i> de aproximadamente 1000pb	140
Figura 32. Producto de amplificación de un fragmento del gen <i>nirS</i> de entre 800 y 900 pb en las cepas de referencia	141
Figuras 33a y 33b. Producto de amplificación de un fragmento del gen <i>nirS</i> de entre 800 y 900 pb en los microorganismos objeto de estudio	142
Figura 34. Producto de amplificación del gen <i>nirS</i> en la cepa HGDK1	142
Figura 35. Producto de amplificación del gen <i>nirS</i> en <i>H. campisalis</i>	143
Figura 36. Producto de amplificación de un fragmento del gen <i>nosZ</i> de entre 1000 y 1100 pb	144
Figura 37. Producto de amplificación de un fragmento del gen <i>nosZ</i> de entre 1000 y 1100 pb.	144

Figura 38. Árbol filogenético consenso obtenido a partir de la secuencia del gen ARNr 16S	148
Figura 39. Árbol consenso obtenido a partir de la secuencia de nucleótidos del gen <i>narH</i>	149
Figura 40. Árbol consenso obtenido a partir de la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína NarH	150
Figura 41. Árbol consenso obtenido a partir de la secuencia de nucleótidos del gen <i>nirS</i>	151
Figura 42. Árbol consenso obtenido a partir de la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína NirS	152
Figura 43. Árbol consenso obtenido a partir de la secuencia de nucleótidos del gen <i>nosZ</i>	153
Figura 44. Árbol consenso obtenido a partir de la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína NosZ	154
Figura 45. Genes empleados en el análisis filogenético, indicando las etapas del proceso de desnitrificación donde participan	155
Figuras 46a,b,c,d. Resultados del estudio fisiológico en controles negativos	174
Figuras 47a,b,c,d. Resultados del estudio fisiológico en <i>H. alimentaria</i>	175
Figuras 48a,b,c,d. Resultados del estudio fisiológico en <i>H. campisalis</i>	176
Figuras 49a,b,c,d. Resultados del estudio fisiológico en <i>H. desiderata</i>	177
Figuras 50a,b,c,d. Resultados del estudio fisiológico en <i>H. halodenitrificans</i>	178
Figuras 51a,b,c,d. Resultados del estudio fisiológico en <i>H. ventosae</i>	179
Figuras 52a,b,c,d. Resultados del estudio fisiológico en la cepa 11S	180
Figuras 53a,b,c,d. Resultados del estudio fisiológico en la cepa 5CR	181
Figuras 54a,b,c,d. Resultados del estudio fisiológico en la cepa A113	182
Figuras 55a,b,c,d. Resultados del estudio fisiológico en la cepa N64	183
Figuras 56a,b,c,d. Resultados del estudio fisiológico en la cepa HGDK1	184
Figuras 57a,b,c,d. Resultados del estudio fisiológico en la cepa SP4	185
Figuras 58a,b,c,d. Resultados del estudio fisiológico en la cepa F5	186
Figura 59. Representación gráfica de la producción de biofilms por los microorganismos en estudio	187
Figura 60. Inducción de la nitrito reductasa con respecto a la nitrito reductasa	191
Figura 61. Ciclo de los ácidos tricarbónicos (Ciclo de Krebs)	195
Figura 62. Condiciones de amplificación por PCR de los genes ARNr 16S; <i>narH</i> ; <i>nirS</i> ; y <i>nosZ</i>	202
Figura 63. Ejemplo de aplicación de la técnica DGGE perpendicular	203
Figura 64. Disposición en los vasos comunicantes de las soluciones con los compuestos desnaturizantes	204
Figura 65. Ejemplo de aplicación de la técnica DGGE perpendicular	205
Figura 66. Comprobación de la especificidad de los cebadores para el gen ARNr 16S	208
Figura 67. Comprobación de la especificidad de los cebadores para el gen <i>narH</i>	208
Figura 68. Chequeo de la especificidad de los cebadores para el gen <i>nirS</i>	209
Figura 69. Chequeo de la especificidad de los cebadores Zdgge-F y Z-dgge-R2 para el gen <i>nosZ</i>	209
Figura 70. Separación de dos amplicones diferentes del gen ARNr 16S mediante DGGE perpendicular	210
Figura 71. Separación de dos amplicones diferentes del gen <i>narH</i> mediante DGGE perpendicular	210
Figura 72. Separación de dos amplicones diferentes del gen <i>nirS</i> mediante DGGE perpendicular	210
Figura 73. Separación de dos amplicones diferentes del gen <i>nosZ</i> mediante DGGE perpendicular	210
Figura 74. Análisis por DGGE de fragmentos del gen ARNr 16S de las muestras de suelo	211
Figura 75. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen ARNr 16S, obtenido mediante el método Neighbour-Joining	213
Figura 76. Análisis por DGGE de fragmentos del gen <i>nirS</i> de las muestras de suelo	214
Figura 77. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen <i>nirS</i> , obtenido mediante el método Neighbour-Joining	216
Figura 78. Análisis por DGGE de fragmentos del gen <i>nosZ</i> de una muestra de suelo de Rambla Salada	217

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Géneros de la familia <i>Halomonadaceae</i> válidamente publicados hasta la fecha	1
Tabla 2. Clasificación de microorganismos de Kushner y Kamekura (1988), en función de la concentración de NaCl óptima para su crecimiento	2
Tabla 3. Especies del género <i>Halomonas</i> , válidamente publicadas hasta la fecha	3
Tabla 4. Especies del género <i>Halomonas</i> cuya descripción ya está disponible en prensa	4
Tabla 5. Especies desnitrificantes del género <i>Halomonas</i> válidamente publicadas hasta la fecha	22
Tabla 6. Influencia de diversos metales sobre el proceso de desnitrificación	31
Tabla 7. Especies de <i>Halomonas</i> válidamente publicadas y descritas como desnitrificantes	43
Tabla 8. Nombre y procedencia de las cepas de nuestra colección de cultivo, seleccionadas por su capacidad desnitrificante	47
Tabla 9. Sustratos ensayados como única fuente de carbono y energía	69
Tabla 10. Aminoácidos utilizados como única fuente de carbono, nitrógeno y energía	70
Tabla 11. Antimicrobianos ensayados, con sus concentraciones especificadas	71
Tabla 12. Especies del género <i>Halomonas</i> , válidamente publicadas hasta la fecha e incluidas como referencia en el estudio fenotípico	72
Tabla 13. Oligonucleótidos usados en la amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S	82
Tabla 14. Nucleótidos signatura en la secuencia del gen ARNr 16S, característicos de la familia <i>Halomonadaceae</i> y de los géneros <i>Halomonas</i> , <i>Carnimonas</i> y <i>Zymobacter</i>	85
Tabla 15. Características morfológicas y culturales	86
Tabla 16. Pruebas fisiológicas (I)	88
Tabla 17. Pruebas fisiológicas (II)	89
Tabla 18. Pruebas fisiológicas (III)	89
Tabla 19. Pruebas bioquímicas (I)	91
Tabla 20. Pruebas bioquímicas (II)	91
Tabla 21. Pruebas nutricionales (I)	94
Tabla 22. Pruebas nutricionales (II)	94
Tabla 23. Susceptibilidad a los siguientes antimicrobianos (I)	96
Tabla 24. Susceptibilidad a los siguientes antimicrobianos (II)	96
Tabla 25. Contenido en G+C (moles %) de las cepas en estudio	99
Tabla 26. Porcentajes de hibridación entre las cepas del fenón 1 y con <i>Halomonas alimentaria</i> y <i>H. organivorans</i>	100
Tabla 27. Porcentaje de hibridación entre las cepas del fenón 4	100
Tabla 28. Composición en ácidos grasos de las cepas pertenecientes a los fena 1 y 4, así como de la cepa A113 no incluida en ningún fenón	104
Tabla 28. Composición en ácidos grasos de las cepas pertenecientes a los fena 1 y 4, así como de la cepa A113 no incluida en ningún fenón	104
Tabla 29. Características diferenciales entre las cepas del fenón 1, <i>H. alimentaria</i> y <i>H. maura</i>	115
Tabla 30. Características diferenciales entre las cepas del fenón 2	119
Tabla 31. Características diferenciales entre <i>H. alimentaria</i> , <i>H. ventosae</i> y la cepa N64, representante del fenón 2	121
Tabla 32. Características diferenciales entre las cepas del fenón 3 y <i>H. eurihalina</i>	123
Tabla 33. Características fenotípicas diferenciales entre las cepas del fenón 3	126
Tabla 34. Composición en ácidos grasos de la cepa A113 y <i>H. denitrificans</i>	129
Tabla 35. Microorganismos estudiados desde el punto de vista filogenético	131
Tabla 36. Cebadores utilizados en las reacciones de secuenciación	135
Tabla 37. Resultados tras el procesamiento con el programa <i>Gblocks</i> del alineamiento preliminar	145
Tabla 38. Número de particiones en que difieren cada pareja de árboles consenso en función del	

número total de particiones (gen <i>narH</i>)	146
Tabla 39. Número de particiones en que difieren cada pareja de árboles consenso en función del número total de particiones (gen <i>nirS</i>)	146
Tabla 40. Número de particiones en que difieren cada pareja de árboles consenso en función del número total de particiones (gen <i>nosZ</i>)	147
Tabla 41. Determinación del contenido en G+C de los genes <i>narH</i> , <i>nirS</i> , <i>nirK</i> y <i>nosZ</i>	147
Tabla 42. Microorganismos estudiados desde el punto de vista fisiológico	167
Tabla 43. Concentración máxima de nitrito (mg/l)	172
Tabla 44. Velocidad máxima de respiración sobre nitrato expresada como concentración máxima de nitrito en el tiempo y relación con la formación de biomasa, expresada como mg de proteínas	173
Tabla 45. Hábitats salinos y cepas del género <i>Halomonas</i> aisladas en ellos	198
Tabla 46. Cebadores usados en los estudios ecológicos por PCR-DGGE de la población desnitrificante del género <i>Halomonas</i>	200
Tabla 47. Microorganismos empleados como control en la reacción de PCR	201
Tabla 48. Valores de semejanza máximos de las bandas extraídas con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank	212
Tabla 49. Valores de semejanza máximos de las bandas extraídas con las secuencias <i>nirS</i> de microorganismos del género <i>Halomonas</i>	215

ABREVIATURAS

A₂₆₀	: Absorbancia a una longitud de onda de 260 nm
ADNasa	: Desoxirribonucleasa
AFLP	: Amplified fragment length polymorphism
Ag	: Plata
Anammox	: Oxidación anaeróbica de amonio
ARNasa	: Ribonucleasa
BERs	: Bioelectrorreactores
BSA	: Albúmina sérica bovina
c.s.p.	: Cantidad suficiente para
Cd	: Cadmio
col.	: Colaboradores
ctdad.	: Cantidad
dATP	: Desoxi adenosín trifosfato
dCTP	: Citosín trifosfato
dcha.	: Derecha
DGGE	: Electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante (“denaturant gradient gel electrophoresis”)
dGTP	: Guanosín trifosfato
DMSO	: Dimetilsulfóxido
DNRA	: Reducción desasimilatoria de nitrato a amonio
dNTPs	: Desoxinucleótidos
dPAOs	: Organismos desnitrificantes acumuladores de polifosfato (“denitrifying poly-phosphate accumulating organisms”)
dUTP	: Desoxi uridín trifosfato
EDTA	: Ácido etilendiamino-tetraacético
EPS	: Exopolisacárido
Fe	: Hierro
FISH	: Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia (“fluorescent <i>in situ</i> hybridization”)
Fte	: Fuente
g	: Gramo
IJSEM	: International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology
M	: Molar
h	: Horas
MBR	: Biorreactores de membrana
mg	: miligramo
ml	: mililitro
NAP/Nap	: Proteína Nitrato reductasa periplásmica
NAR/Nar	: Proteína Nitrato reductasa unida a membrana
ng	: Nanogramo
NIR/Nir	: Proteína Nitrito reductasa
nm	: nanómetro
NO	: Óxido nítrico
μl	: microlitro
ONPG	: <i>O</i> -nitrofenil-β-D-galactopiranosido
pb	: Pares de bases
PAOs	: Organismos acumuladores de polifosfato (“poly-phosphate accumulating organisms”)
PBS	: Tampón fosfato salino
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa

PHB	: Ácido poli-β-hidroxibutírico
Prot	: Proteína
r.p.m.	: Revoluciones por minuto
SDS	: Dodecil sulfato sódico
SSC	: Solución salina citratada
T°	: Temperatura
T-RFLP	: Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción terminales (“terminal restriction fragment length polymorphism”)
T_m	: Temperatura de desnaturalización
U	: Unidad (medida de la actividad de enzimas)
USP	: United States Pharmacopea
V	: Voltaje
vol	: Volúmenes
λ	: Fago lambda

COLECCIONES DE CULTIVO

ATCC	: American Type Culture Collection
CECT	: Colección Española de Cultivos Tipo
DSM (también DSMZ)	: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
JCM	: Japan Collection of Microorganisms
LMG (también BCCM/LMG)	: Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms/Division Bacteria Collection

Introducción

I. INTRODUCCIÓN

I.1. EL GÉNERO *Halomonas*

I.1.1. HISTORIA Y COMPOSICIÓN ACTUAL

Este género fue descrito por Vreeland y colaboradores en 1980 para acomodar una nueva especie, *Halomonas elongata*. A mediados de la década de los noventa, se propuso que los miembros por aquel entonces de los géneros *Deleya*, *Halovibrio* y *Volcaniella*, así como la especie *Paracoccus halodenitrificans*, se reunieran en un solo género, el género *Halomonas*, dentro de la familia *Halomonadaceae*, por su parte 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 ADNr 16S (Mellado y col., 1995; Dobson y Franzmann, 1996).

Posteriormente, otros estudios de filogenia basados en el gen ADNr 23S (Arahal y col., 2002a) 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., 2002b). En este mismo estudio se vio que dentro del género *Halomonas* se podían distinguir dos filotipos, y que especies como *Halomonas marisflavi* filogenéticamente no podían ser asignadas a ninguno de ellos. En la Tabla 1, se recogen los miembros actuales de la familia *Halomonadaceae* perteneciente a la clase *Gammaproteobacteria*.

Tabla 1. Géneros de la familia *Halomonadaceae* válidamente publicados hasta la fecha.

Género	Nº de especies ^a	Descripción original de la especie tipo	Transferencia a la posición taxonómica actual
<i>Carnimonas</i>	1	Garriga y col., 1998	Arahal y col., 2002a
<i>Chromohalobacter</i>	8	Volcani, E.B., 1940	Ventosa y col., 1989
<i>Cobetia</i>	1	Cobet y col., 1970	Arahal y col., 2002b
<i>Halomonas</i>	43	Vreeland y col., 1980	Vreeland y col., 1980
<i>Halovibrio</i>	12	Fendrich, C., 1988	Dobson y Franzmann, 1996
<i>Salicola</i>	2	Maturrano y col., 2006	Euzeby, J.P., 2007
<i>Zymobacter</i>	1	Okamoto y col., 1993	Dobson y Franzmann, 1996

^a De acuerdo a Euzeby, J.P. (2007).

La situación taxonómica de *Halovibrio variabilis*, con la cepa DSM 3050^T como tipo, está siendo dilucidada por la Comisión Judicial en respuesta a un artículo de opinión remitido por Sorokin y Tindall (2006). De ser aceptado, el género estaría constituido por las especies *Halovibrio variabilis* y *H. denitrificans*.

Los géneros recogidos en la Tabla 1 se agrupan en halófilos y halotolerantes (*Chromohalobacter*, *Cobetia*, *Halomonas* y *Salicola*) y no halófilos (*Carnimonas* y *Zymobacter*). Esta clasificación, que será manejada de nuevo más adelante, responde a los criterios propuestos en 1988 por Kushner y Kamekura, según los cuales los microorganismos se podían dividir en diferentes categorías atendiendo a la concentración de NaCl necesaria para su óptimo crecimiento. En la Tabla 2, hemos recogido los diferentes grupos, así como sus características.

Tabla 2. Clasificación de microorganismos de Kushner y Kamekura (1988), en función de la concentración de NaCl óptima para su crecimiento.

Denominación	Características
No halófilos	Crecimiento óptimo a una concentración de NaCl inferior al 0,2 M (1% p/v)
Halotolerantes	Microorganismos no halófilos capaces de crecer en medios con hasta 2,5 M (15% p/v) de NaCl
Halófilos débiles (bacterias marinas)	Crecimiento óptimo en medios con 0,2-0,5 M (1-3% p/v) de NaCl
Halófilos moderados	Crece de forma óptima entre una concentración de NaCl de 0,5-2,5 M (3-15% p/v) de NaCl
Halófilos extremos	Tienen un crecimiento óptimo entre 2,5-5,2 M (15-32% p/v) de NaCl*

*El límite superior (5,2 M) constituye la concentración de saturación del NaCl.

El género *Halomonas* es el más ampliamente representado dentro de la familia *Halomonadaceae*. Como se puede comprobar en la Tabla 2 y 3, en el momento de escribir esta memoria, está constituido por 43 especies válidamente publicadas, así como por otras 4 más cuyas descripciones se encuentran ya en prensa (página web de la revista IJSEM: <http://ijs.sgmjournals.org/misc/pip.shtml>, 22/06/07) (véase Tabla 4). En los últimos años se ha producido un incremento asombroso en el número de especies pertenecientes a este taxón; así desde el año 2000 se han descrito hasta 27 especies nuevas en *Halomonas*, es decir, en tan sólo siete años se ha duplicado el número de miembros del género y la tendencia reinante parece seguir con este aumento continuo. Los miembros actuales del género *Halomonas*, así como las especies cuya descripción está ya aceptada, se muestran en las Tablas 3 y 4, respectivamente.

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 varios trabajos (Arahal y col., 2002a; Mata y col., 2002). En cuanto al contenido en G+C, la variación es muy superior a 10 moles %, que es lo recomendado por Owen y Pitcher (1985) para miembros de un mismo género. Y, por último, filogenéticamente ya se ha mencionado que el género *Halomonas* no puede ser considerado monofilético (Arahal y col., 2002a). Por ello, con vistas a un futuro y necesario reajuste del género, se están haciendo diversos intentos por uniformizar las descripciones, especialmente desde el punto de vista fenotípico, estableciéndose unos criterios mínimos a la hora de describir un miembro de *Halomonas* (Arahal y col., 2007).

Tabla 3. Especies del género *Halomonas*, válidamente publicadas hasta la fecha.

Especie	Referencia
<i>Halomonas alimentaria</i> DSM 15356 ^T	Yoon y col., 2002
<i>Halomonas almeriensis</i> CECT 7050 ^T	Martínez-Checa y col., 2005a
<i>Halomonas anticariensis</i> CECT 5854 ^T	Martínez-Cánovas y col., 2004c
<i>Halomonas aquamarina</i> CECT 5000 ^T	ZoBell y Upham, 1944; Dobson y Franzmann, 1996
<i>Halomonas avicenniae</i> CECT 7193 ^T	Soto-Ramírez y col., 2007
<i>Halomonas axialensis</i> CECT 5812 ^T	Kaye y col., 2004
<i>Halomonas boliviensis</i> DSM 15516 ^T	Quillaguamán y col., 2004
<i>Halomonas campaniensis</i> DSM 15293 ^T	Romano y col., 2005
<i>Halomonas campisalis</i> ATCC 700597 ^T	Mormile y col., 1999
<i>Halomonas cupida</i> ATCC 27124 ^T	Baumann y col., 1972; Dobson y Franzmann, 1996
<i>Halomonas denitrificans</i> DSM 18045 ^T	Kim y col., 2007
<i>Halomonas desiderata</i> DSM 9502 ^T	Berendes, 1996
<i>Halomonas elongata</i> ATCC 33173 ^T	Vreeland y col., 1980
<i>Halomonas eurihalina</i> ATCC 49336 ^T	Quesada y col., 1990; Mellado y col., 1995
<i>Halomonas gomseomensis</i> DSM 18042 ^T	Kim y col., 2007
<i>Halomonas gudaonensis</i> LMG 23610 ^T	Wang y col., 2007a
<i>Halomonas halmophila</i> ATCC 19717 ^T	Volcani, 1940; Dobson y col., 1990
<i>Halomonas halocynthiae</i> DSM 14573 ^T	Romanenko y col., 2002
<i>Halomonas halodenitrificans</i> ATCC 13511 ^T	Robinson y Gibbons, 1952; Dobson y Franzmann, 1996
<i>Halomonas halodurans</i> ATCC 29686 ^T	Hebert y Vreeland, 1987
<i>Halomonas halophila</i> ATCC 49969 ^T	Quesada y col., 1984; Dobson y Franzmann, 1996
<i>Halomonas hydrothermalis</i> CECT 5814 ^T	Kaye y col., 2004
<i>Halomonas indalinina</i> CECT 5902 ^T	Cabrera y col., 2007
<i>Halomonas janggokensis</i> DSM 18043 ^T	Kim y col., 2007
<i>Halomonas koreensis</i> JCM 12237 ^T	Lim y col., 2004
<i>Halomonas magadiensis</i> DSM 15367 ^T	Duckworth y col., 2000

Tabla 3. Continuación.

Especie	Referencia
<i>Halomonas marisflavi</i> DSM 15357 ^T	Yoon y col., 2001
<i>Halomonas maura</i> CECT 5298 ^T	Bouchotroch y col., 2001
<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425 ^T	James y col., 1990
<i>Halomonas muralis</i> DSM 14789 ^T	Heyrman y col., 2002
<i>Halomonas neptunia</i> CECT 5815 ^T	Kaye y col., 2004
<i>Halomonas organivorans</i> CECT 5995 ^T	García y col., 2004
<i>Halomonas pacifica</i> ATCC 27122 ^T	Baumann y col., 1972; Dobson y Franzmann, 1996
<i>Halomonas pantelleriensis</i> ATCC 700273 ^T	Romano y col., 1996
<i>Halomonas salaria</i> DSM 18044 ^T	Kim y col., 2007
<i>Halomonas salina</i> ATCC 49509 ^T	Valderrama y col., 1991; Dobson y Franzmann, 1996
<i>Halomonas shengliensis</i> LMG 23897 ^T	Wang y col., 2007b
<i>Halomonas subglaciescola</i> ATCC 43668 ^T	Franzmann y col., 1987
<i>Halomonas sulfidaeris</i> CECT 5817 ^T	Kaye y col., 2004
<i>Halomonas taeanensis</i> DSM 16463 ^T	Lee y col., 2005
<i>Halomonas variabilis</i> DSM 3051 ^T	Fendrich, 1989; Dobson y Franzmann, 1996
<i>Halomonas ventosae</i> CECT 5797 ^T	Martínez-Cánovas y col., 2004a
<i>Halomonas venusta</i> ATCC 27125 ^T	Baumann y col., 1972; Dobson y Franzmann, 1996

Actualmente la situación taxonómica de *Halomonas variabilis* DSM 3051^T está siendo dilucidada por la Comisión Judicial en respuesta a un artículo de opinión remitido por Sorokin y Tindall (2006).

Tabla 4. Especies del género *Halomonas* cuya descripción ya está disponible en prensa (<http://ijs.sgmjournals.org/misc/pip.shtml>).

Especie	Referencia*
<i>Halomonas kribbensis</i>	Jeon y col.
<i>Halomonas arcis</i>	Xu y col.
<i>Halomonas saccharevitans</i>	“
<i>Halomonas subterranea</i>	“

*Aunque ya aceptadas, el título y contenidos están sujetos a modificación. La fecha de publicación tampoco puede ser determinada con exactitud.

I.1.2. GENERALIDADES

El género *Halomonas* constituye uno de los grupos de microorganismos halófilos más ampliamente distribuido, presentándose en localizaciones geográficas muy distintas quizás por su gran versatilidad metabólica y fisiológica (Kaye y Baross, 2000). Así, los miembros de este género han sido aislados tanto de ambientes salinos tradicionales, aguas y suelos de elevada salinidad, como de hábitats tan dispares como alimentos fermentados (*H. alimentaria*, Yoon y col., 2002), biofilms microbianos procedentes de pinturas murales (*H. muralis*, Heyrman y col., 2002) o tejidos de cordados como la ascidia *Halocynthia aurantium* (*H. halocynthiae*, Romanenko y col., 2002). En la Figura 1 se muestra una imagen de la ascidia mencionada.



Figura 1. Fotografía de *Halocynthia aurantium* ([http://www.sanamyan.com/underwater photo](http://www.sanamyan.com/underwater_photo)). En la parte superior dcha., imagen ampliada de la ascidia (http://www.fegi.ru/primorve/sea/hal_i7.htm).

El género *Halomonas* está formado en su mayoría por microorganismos halófilos moderados (véase Tabla 2), pudiendo encontrar algunos halotolerantes como la especie tipo del género, *H. elongata* (Vreeland y col., 1980), *H. campaniensis* (Romano y col., 2005) o *H. desiderata* (Berendes, 1996). Existen microorganismos haloalcalófilos como *H. pantellerensis* (Romano y col., 1996), *H. boliviensis* (Quillaguamán y col., 2004) o *H. campisalis* (Mormile y col., 1999).

Las especies de este género son bacilos o cocobacilos quimioheterótrofos Gram negativos, catalasa positivos y no formadores de 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 (véase apartado I.2.6.). Esta capacidad ha permitido el uso de distintas cepas del género *Halomonas* en biorreactores para tratamiento de aguas contaminadas con nitratos, como se comentará en el apartado I.4.3.

Como ya se ha comentado anteriormente, desde el punto de vista fenotípico el género *Halomonas* no presenta uniformidad (Mata y col., 2002); las especies válidamente descritas hasta el año 2002, se dividían en tres grupos según la capacidad de producir ácidos de los azúcares y de acuerdo a su versatilidad nutricional. No todas las especies de reciente descripción han seguido la metodología propuesta en dicho trabajo. Por ello, no se descarta que la realización en un futuro de un estudio similar al mencionado conduzca a una nueva reordenación del género *Halomonas*, reclasificación apuntalada también en otros datos de taxonomía polifásica que serán comentados a continuación.

En el aspecto genotípico, llama la atención que en el género *Halomonas* el contenido en moles % de guanina y citosina se extienda entre márgenes tan amplios, mayores al 10% propuesto para miembros de un mismo género (Owen y Pitcher, 1985). Así, podemos encontrar especies con un contenido en G+C aproximado desde 53 moles % (*H. venusta*, Baumann y col., 1972; *H. denitrificans*, Kim y col., 2007) a 74.3 moles % (*H. ventosae*, Martínez-Cánovas y col., 2004).

El género *Halomonas* no es monofilogenético, como ya fue apuntado por Arahal en 2002 (Arahal y col., 2002a). Sin embargo, el elevado número de especies recientemente descritas dentro del género, conllevará con seguridad en un futuro a un número de filotipos mayor a los dos descritos en ese trabajo.

El potencial biotecnológico de las bacterias del género *Halomonas* es muy amplio. Así, encontramos especies productoras de exopolisacáridos de interés, entre las cuales destacan *H. eurihalina* (Martínez-Checa y col., 2007) y *H. maura* (Arias y col., 2003; Llamas y col., 2006). En la Figura 2 podemos observar el carácter mucoso de las colonias de *H. maura*. También se han realizado diferentes estudios en los que se seleccionaron cepas pertenecientes al género *Halomonas* con diversas actividades hidrolíticas: Amilasas, DNasas, lipasas, proteasas y pululunasas ([Sánchez-Porro y col., 2003](#)).



Figura 2. Aspecto de las colonias de *H. maura*.

La capacidad para degradar compuestos aromáticos ha sido descrita en *Halomonas organivorans* (García y col., 2004). En esta línea, resulta curioso el aislamiento de una cepa relacionada con el género *Halomonas* que descomponía colorantes azoicos a altas concentraciones de sal (Guo y col., 2007). Recientemente, también han sido descritas propiedades antibacterianas en otros aislados del género *Halomonas* (Xu y col., 2007).

I.2. PROCESO DE DESNITRIFICACIÓN

I.2.1. CONCEPTO Y CARACTERÍSTICAS GENERALES

La **desnitrificación** es el principal mecanismo por el que el nitrógeno fijado del suelo y medios acuáticos vuelve a la atmósfera (Conrad, 1996; Philippot, 2005a y b). El nitrógeno se introduce en la biosfera por fijación biológica y química de dinitrógeno (N_2), y es eliminado de la misma principalmente mediante desnitrificación. En el ciclo global del nitrógeno, los microorganismos juegan un papel fundamental, tanto en procesos oxidativos (*nitrificación*), reductivos (*desnitrificación*, *amonificación*, *asimilación de nitrato o nitrito* y *fijación de nitrógeno*), como en combinación de ambos (oxidación anaerobia de amonio o *anammox*) (Zumft, 1997; Nogales y col., 2002; Dalsgaard y col., 2003; Cabello y col., 2004; Jetten y col., 2005) (Figura 3).

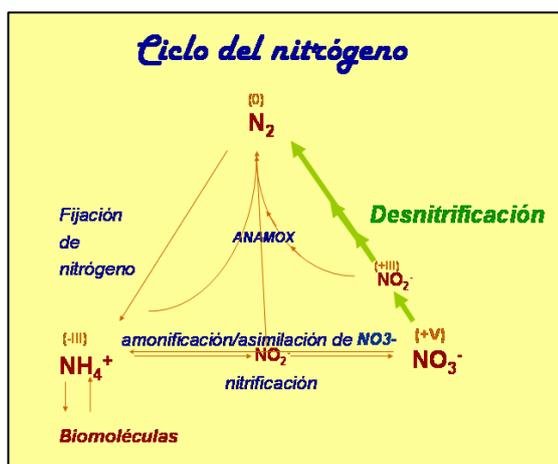


Figura 3. Ciclo biogeoquímico del nitrógeno sostenido por microorganismos (Zumft, 1997; González y col., 2006).

Un proceso completo de desnitrificación consta de cuatro pasos en los que diversas metaloenzimas catalizan la reducción secuencial o coordinada de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) y dinitrógeno (N_2) (Figura 4). Como se verá más adelante, alguna de las etapas puede estar ausente o el proceso detenerse en reacciones previas a la

Introducción

formación de dinitrógeno (Renner y Becker, 1970; Greenberg y Becker, 1977; Knowles, 1982; Frunzke, 1990; [Shoun](#) y [Tanimoto](#), 1991).

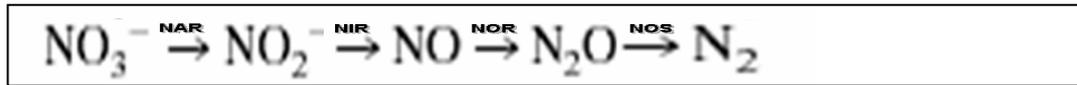


Figura 4. Reacciones de un proceso de desnitrificación completo. Se indican las reductasas participantes: Nar: Nitrato reductasa; Nir: Nitrito reductasa; Nor: Óxido nítrico reductasa; Nos: Óxido nitroso reductasa.

La síntesis de estas reductasas se induce de forma general en presencia del sustrato oportuno y con una adecuada tensión de oxígeno (Zumft, 1997), aunque existen trabajos en los que se pone de manifiesto el carácter constitutivo de ciertas enzimas o reguladores (Bachmann, 1990; Ka y col., 1997; Etchebehere y Tiedje, 2005).

La desnitrificación es un proceso respiratorio, en el cual las formas oxidadas del nitrógeno actúan como aceptores terminales alternativos al oxígeno (Knowles, 1982; Conrad, 1996; Zumft, 1997). Tiene normalmente un trato facultativo, porque desde el punto de vista termodinámico es menos favorable que el oxígeno (Thauer y col., 1977), produciendo hasta en un 40% menos de biomasa (Koike y Hattori, 1975). Por ello, se va a producir en situaciones preferentemente anaerobias o microaerófilas, con tensiones limitantes de oxígeno (Zumft, 1997; Philippot, 2005b; Tavares y col., 2006), si bien se han descrito microorganismos capaces de desnitrificar en aerobiosis (Jetten y col. 1997; Scholten y col., 1999; Chen y col., 2003; [Rock](#) y col., 2005; Robertson y col., 2005).

La desnitrificación está asociada a la conservación de energía, por medio de la transferencia enzimática de electrones acoplada a la síntesis de ATP (Stouthamer, 1991). Por su parte, la reducción desasimilatoria de nitrato a amonio (DNRA) o *amonificación*, comparte con la desnitrificación un primer paso de reducción de nitrato a nitrito, con similar trato bioenergético y llevado a cabo por las mismas enzimas, si bien las etapas posteriores de la DNRA, que conducen a la formación de amonio, tienen como principales objetivos la eliminación de poder reductor y la detoxificación (Zumft, 1997; Moreno-Vivián y col., 1999; Stolz y Basu, 2002). Fisiológicamente, ambos procesos se pueden considerar opuestos a la *reducción asimilatoria* de esos mismos oxianiones con fines biosintéticos (Zumft, 1997). Estos tres aspectos del ciclo del nitrógeno se esquematizan en la Figura 5, así como una variante menos extendida, que se conoce como

desnitrificación *in sensu lato*, en el cual los óxidos de nitrógeno proceden de otros procesos del ciclo para ser finalmente reducidos a dinitrógeno, con similares características a las de un proceso de desnitrificación corriente (Zumft, 1997).

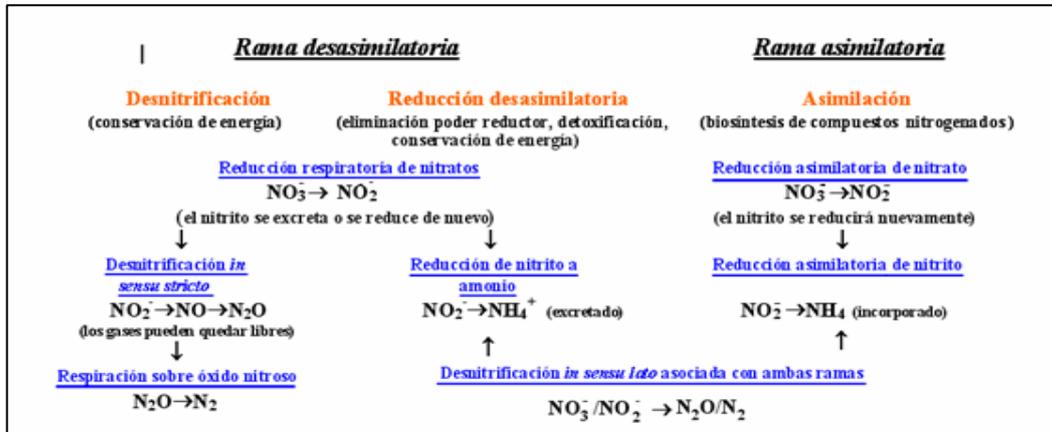


Figura 5. Representación de los procesos desnitrificación, DNRA y asimilación de nitrato y/o nitrito (Zumft, 1997).

Para llevar a cabo la desnitrificación se requiere un sustrato oxidable, ya sea orgánico o inorgánico, que actúe como donador de electrones. En base a la naturaleza de este dador podemos establecer dos tipos de desnitrificación:

-Desnitrificación autótrofa, en la cual tanto la fuente de carbono como de energía es inorgánica. Los desnitrificantes autótrofos emplean como donadores de electrones el hidrógeno, los compuestos reducidos de azufre (sulfhídrico, H_2S ; o tiosulfato, $S_2O_3^{2-}$) e incluso el hierro Fe (II). La fuente de carbono puede ser CO_2 ó HCO_3^- (Knowles, 1982; Straub y col., 1996; Zhang, 2001).

-Desnitrificación heterótrofa, en la que los microorganismos desnitrificantes emplean como fuente de carbono y energía un sustrato orgánico, como ácido acético, etanol o glucosa (Zhang, 2001).

I.2.2. BASES MOLECULARES DE LA DESNITRIFICACIÓN

Un proceso de desnitrificación completo consta de cuatro pasos a través de los cuales el nitrato se reduce a dinitrógeno mediante las correspondientes metaloenzimas: Nitrato reductasa, nitrito reductasa, óxido nítrico reductasa y óxido nitroso reductasa. La síntesis de estas enzimas requiere de una regulación a nivel genético muy compleja, en la que pueden llegar a estar implicados más de cuarenta genes (Stouthamer, 1992; Vollack y col., 1998). En la Figura 6, podemos ver una representación de la organización global de las diferentes enzimas participantes en la desnitrificación en *Pseudomonas stutzeri*, microorganismo usado frecuentemente como modelo para el estudio del proceso.

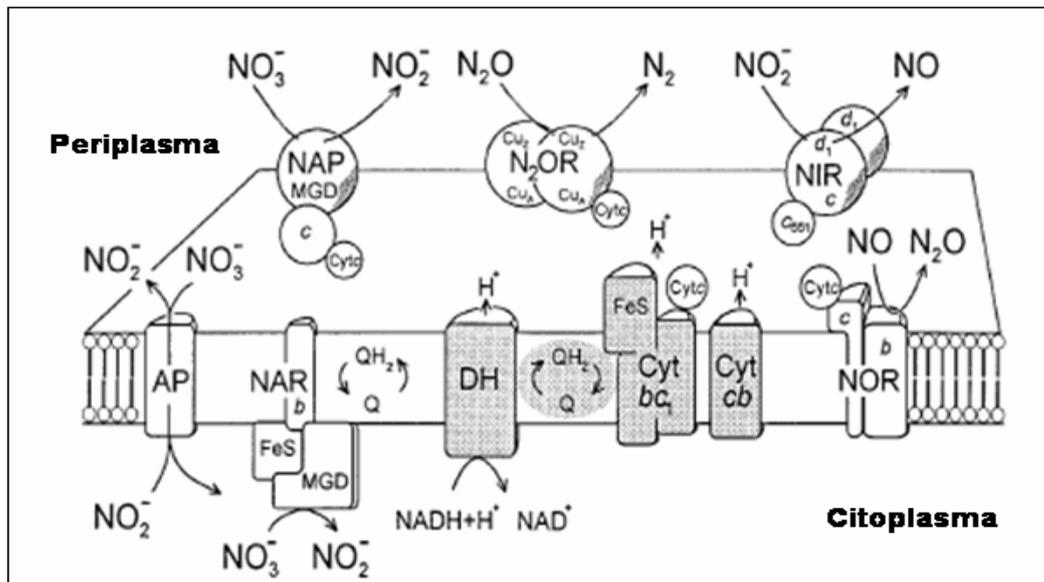


Fig.6. Organización y orientación en la membrana citoplasmática de la cadena de transporte de electrones anaerobia de *Pseudomonas stutzeri*. Las áreas sombreadas representan los componentes de la cadena respiratoria aerobia constitutiva, que consiste en un complejo NADH deshidrogenasa (DH), un ciclo de quinona (Q, QH₂), un complejo citocromo bc₁ (Cyt bc₁) y el complejo citocromo cb oxidasa terminal (Cyt cb). El sistema de desnitrificación está constituido por una nitrato reductasa respiratoria (Nar), nitrito reductasa (Nir), óxido nítrico reductasa (Nor) y óxido nitroso reductasa (Nos). La evidencia de la existencia de una nitrato reductasa periplásmica (Nap) en *P. stutzeri* se deduce mediante hibridación del DNA con sondas; la enzima se ha representado de acuerdo con su situación en *Ralstonia eutropha* y *Paracoccus denitrificans*. Abreviaturas: FeS, centros de hierro-azufre; b, c y d₁, hemo B, hemo C y hemo D₁, respectivamente; cyt c, citocromos de tipo c inespecíficos que aceptan electrones del complejo bc₁ y actúan junto con Nos y Nor; cyt c₅₅₁, citocromo c₅₅₁; AP, antiporter nitrato/nitrito. (Zumft, 1997).

I.2.2.1. Nitrato reductasa

Los organismos reducen el nitrato por tres razones principales (Campbell, 1999; Moreno-Vivian y col., 1999; Richardson y Watmough, 1999; Richardson y col., 2001, Stolz y Basu, 2002):

- Incorporación del nitrógeno en biomoléculas (reducción asimilatoria).
- Generación de energía necesaria para las funciones celulares (respiración y desnitrificación).
- Disipación del exceso de energía generado por el metabolismo celular (reducción desasimilatoria).

A pesar de que la reacción química es siempre la reducción de nitrato a nitrito, las enzimas que llevan a cabo la acción catalítica pueden ser de muy diferentes tipos; las nitrato reductasas pueden diferenciarse según la situación taxonómica de los microorganismos que las poseen, función, localización en las células, estructura y producto final de la ruta que inician.

Las nitrato reductasas se encuentran en plantas, algas, hongos, arqueas y bacterias (Campbell, 1999; Volkl y col., 1993; Zumft, 1997). Existirían, por tanto, distintas nitrato reductasas desde el punto de vista taxonómico; de tipo eucariótico y de tipo procariótico. Esta distinción se apoya también en diferencias estructurales (Hille, 1996).

La mayoría de las enzimas nitrato reductasas procariotas presentan molibdeno como cofactor principal. Recientemente se ha aislado una nitrato reductasa que posee vanadio en lugar de molibdeno y que parece estar relacionada con la vida en condiciones extremas, tales como la elevada concentración de contaminantes y las altas salinidades (Antipov y col., 2003). Tanto unas como otras poseen cofactores adicionales, grupos Fe-S o hemo, que median las reacciones de transferencia entre el donante de electrones y el aceptor (nitrato) (Richardson y col., 2001b; Tavares y col., 2006).

Según su función, las nitrato reductasas se pueden clasificar en asimilatorias y desasimilatorias:

-La nitrato reductasa asimilatoria (NAS) es la primera enzima de la ruta anabólica que tiene como finalidad la incorporación de nitrógeno en la biomasa, asegurando la biodisponibilidad del nitrato en plantas, algas, hongos, arqueas y bacterias (Campbell, 1999; 2001; Lin y Stewart, 1998).

-Las nitrato reductasas desasimilatorias intervienen en el primer paso de una ruta catabólica que tiene como finalidad obtener energía mediante respiración anaerobia (Zumft, 1997; Blasco y col., 2001). Como ya se ha mencionado, los primeros pasos de reducción de nitrato a nitrito en los procesos de desnitrificación y DNRA son idénticos y pueden llevarse a cabo por la misma enzima. La reducción desasimilatoria de nitrógeno no está regulada directamente por un requerimiento nutricional de nitrógeno.

Son dos las nitrato reductasas desasimilatorias que pueden participar en el proceso de desnitrificación:

***Nitrato reductasa ligada a membrana (Nar):** Está orientadas hacia el citoplasma y participa en la generación de una fuerza protón motriz (Berks y col., 1995a; Zumft, 1997). Ha sido objeto de numerosos estudios en *Escherichia coli*; viéndose que está compuestas por tres subunidades (Richardson y col., 2001b; Tavares y col., 2006):

-Subunidad catalítica o subunidad α , codificada por el gen *narG*. Es la subunidad activa, que contiene molibdeno (o vanadio) como cofactor.

-Subunidad soluble o subunidad β , codificada por el gen *narH*. Esta subunidad contiene tres complejos hierro-azufre [4Fe-4S] y uno [3Fe-4S].

-Subunidad γ , codificada por el gen *narI*. Contiene dos grupos hemo de tipo *b* (*bP* y *bD*).

NarGHI se dispone en dos dominios: las subunidades α y β , que constituyen el dominio citoplasmático, y la subunidad γ que constituye el dominio transmembrana, necesario para la unión

de las subunidades α y β a la cara citoplasmática de la membrana interna. La subunidad γ acepta electrones del conjunto de quinonas y los transfiere a través del grupo hemo b a la subunidad β (Figura 6).

El hecho de que los operones *nar* sean móviles, puede explicar el papel de las Nars tanto en denitrificación como en DNRA, su asociación con diferentes nitrito reductasas, la naturaleza mosaico de la organización genética de la desnitrificación y la presencia de las tres nitrato reductasas en una única especie (Berks y col., 1995a; Castillo y col., 1996; Cava y Berenguer, 2006).

El sistema Nar funciona en condiciones de anaerobiosis para la obtención de energía. Se ha descubierto, no obstante, la existencia de esta enzima en microorganismos aerobios estrictos como *Mycobacterium tuberculosis*. Aunque en ellos su significado fisiológico todavía está por establecer completamente, se cree que la Nar podría estar relacionada con la capacidad de colonización. Con estos microorganismos se plantea la necesidad de una revisión de la descripción del concepto de aerobio obligado (Hutter y Dick, 1999; Weber y col., 2000).

***Nitrato reductasa periplásmica (Nap).** Está implicada en el equilibrio redox, en la respiración (tanto desnitrificación como DNRA) y en el aprovechamiento del nitrato residual (Carter y col., 1995a; 1995b; Berks y col., 1995c; Castillo y col., 1996; Potter y col., 1999; Wang y col., 1999; Richardson y col., 2001b; Stewart y col., 2002). En la mayoría de microorganismos desnitrificantes se ha visto que interviene en la adaptación transitoria al metabolismo anaerobio, cuando el microorganismo en condiciones aerobias pasa a una situación de anoxia en presencia de nitrato (Siddiqui y col., 1993). Existen microorganismos desnitrificantes, como *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774, que únicamente posee Nap como actividad nitrato reductasa, de manera que en presencia de nitrato, se expresa también esta enzima en anaerobiosis (Bursakov y col., 1995, 1997). En otras bacterias, como *Escherichia coli*, que pueden expresar Nar y Nap bajo condiciones anaerobias, la disponibilidad de nitrato y de fuente de carbono regula la síntesis de una u otra: Bajo condiciones limitantes de nitrato, la Nap le reporta al microorganismo una mayor ventaja selectiva sobre otros desnitrificantes, mientras que si existe una reducida concentración de carbono, se expresa preferentemente Nar (Potter y col., 1999).

Desde el punto de vista estructural, la nitrato reductasa periplásmica es un heterodímero codificado por los genes *napA* y *napB*. Nap A es la subunidad mayor y con funciones catalíticas. Contiene el cofactor de molibdeno y un complejo [4Fe-4S]. Nap B es un citocromo de tipo *c*. En el operón *nap* también encontramos el gen *napC*, que codifica para un citocromo de tipo *c* tetrahemo que está implicado en la transferencia de electrones (Berks y col., 1995c; Moreno-Vivian y col., 1999). La enzima se localiza en el periplasma de las bacterias Gram negativas o en un espacio equivalente en Gram positivas (Merchante y col., 1995; Zumft, 1997).

I.2.2.2. Nitrito reductasa

La nitrito reductasa es clave entre las reductasas participantes en un proceso de desnitrificación, ya que comienzan la pérdida del nitrógeno fijado en lugar de su asimilación. En bacterias, se han encontrado dos tipos diferentes de nitrito reductasas en función de su grupo prostético: Una de las enzimas está asociada al citocromo *cd₁* (*cd₁-Nir*), mientras que la otra lo está al cobre (Cu-Nir) (Zumft, 1997). Funcional y fisiológicamente son equivalentes, como lo indican los experimentos de mutantes llevados a cabo por Glockner y col. (1993).

La existencia simultánea de estas enzimas en una misma bacteria no se ha descrito (Zumft, 1997; Jetten y col., 1997; Watmough y col., 1999), si bien ocasionalmente pueden coexistir en cepas distintas de una misma especie (Coyne y col., 1989) y en especies diferentes de un mismo género (Zumft, 1997). Dentro de las *Proteobacterias*, no consta una estricta asociación de cada tipo de enzima con una subclase en concreto (alfa, beta o gamma), sino que ambos tipos pueden ser encontrados en cada una de ellas (Zumft, 1992; Philippot, 2002); no obstante, sí que es evidente un predominio de la Cu-Nir entre las *alfa* y *betaproteobacterias* y de la *cd₁-Nir* entre las *gammaproteobacterias* (Philippot, 2002). Ambas nitrito reductasas están distribuidas, por tanto, entre una gran variedad de bacterias pertenecientes a grupos fisiológicamente diferentes.

***Nitrito reductasa asociada al cobre (Cu-Nir).** Consiste en un homotrímero, en el cual cada subunidad contiene centros de cobre. Es codificada por el gen *nirK*.

***Citocromo *cd₁*-nitrito reductasa (*cd₁-Nir*)**. Se trata de un homodímero; cada subunidad posee como grupos prostéticos un hemo tipo *c*, unido por enlace covalente, y un hemo tipo *d₁*, que se une por otro tipo de enlace. La eliminación del grupo hemo tipo *d₁* de una subunidad conduce a una semi-apoproteína carente de actividad enzimática, lo que pone de manifiesto su participación en las propiedades catalíticas de la nitrito reductasa (Hill y Wharton, 1978). Además se ha visto que se encuentra asociada a otro citocromo: *c₅₅₂* (Jungst y col., 1991).

La citocromo *cd₁*-nitrito reductasa es codificada por el gen *nirS*. No obstante, como sucede con las otras reductasas de la desnitrificación, son varios los genes participantes en la actividad final de la enzima, de manera que los genes *nirCFD* y *nirE*, *nirJ* y *nirN* están conservados en la mayoría de los operones *nir*. Estos genes intervienen en el transporte de electrones y en la biosíntesis de los grupos hemo (Zumft, 1997; Philippot, 2002).

1.2.2.3. Óxido nítrico reductasa

El óxido nítrico en exceso es tóxico para la célula, tanto si ésta es procariótica como eucariótica, e incluso tumoral. De hecho, la susceptibilidad bacteriana al NO es uno de los mecanismos de defensa empleados por el hospedador ante una infección; en los macrófagos se induce la síntesis de NO tras la interacción con bacterias (Nathan y Hibbs, 1991; Bastian y Hibbs, 1994). Esto explicaría que la propiedad para reducir el óxido nítrico no esté restringida a los desnitrificantes y pueda ser llevada a cabo por multitud de microorganismos sin conducir necesariamente a la generación de nitrógeno gas como producto final. Así, esta propiedad reductora podría haberse desarrollado como un mecanismo de detoxificación y en el caso de bacterias patógenas como un factor de virulencia más, por permitirles eludir las defensas del hospedador (MacMicking y col., 1995; Wei y col., 1995; Zumft, 1997).

Las óxido nítrico reductasas son las enzimas más sensibles de todas las reductasas participantes en el proceso de desnitrificación. En bacterias se han descrito tres clases de óxido nítrico reductasas:

***cNor**. Está presente en la mayor parte de los desnitrificantes; se trata de un complejo transmembrana, compuesto de dos subunidades: Una mayor, NorB, que es un citocromo tipo *b*, y

una subunidad menor, NorC, constituida por un citocromo tipo *c* (Heiss y col., 1989). Los genes que las codifican se denominan *norB* y *norC*, respectivamente (Arai y col., 1995; Bartnikas y col., 1997; Mesa y col., 2002).

***qNor.** Con la excepción de la enzima aislada de la bacteria desnitrificante *Ralstonia eutropha*, todas las qNORs son expresadas en ausencia del resto de enzimas desnitrificantes, principalmente en microorganismos patógenos (Hendriks y col., 2000; Householder y col., 2000). Consta de una subunidad única que acepta electrones de las quinonas (de Vries y col., 2003).

***qCuNor.** Ha sido purificada de *Bacillus azotoformans*. Está formada por dos subunidades. La mayor, catalítica, es similar a la subunidad NorB de cNOR, mientras que la más pequeña en lugar de poseer un grupo hemo tipo *c* como ésta, se asocia al cobre para la transferencia de electrones al sitio activo de la enzima. Se ha propuesto la participación de qCuNor en procesos de destoxificación para eliminar NO de la célula (Suharti y col., 2001).

1.2.2.4. Óxido nítrico reductasa

La conversión de óxido nítrico a dinitrógeno representa el último paso de una desnitrificación completa y un proceso respiratorio por sí mismo. Muchas bacterias desnitrificantes podrían crecer a expensas del óxido nítrico como único aceptor de electrones disponible para la oxidación de compuestos orgánicos (Pichinoty y col., 1977), lo que pone de manifiesto la importancia propia de esta enzima. Por otra parte, sólo se conocen bacterias que respiran sobre óxido nítrico sin ser desnitrificantes cuando conjuntamente con esta capacidad poseen la de respirar sobre nitrato, sin estar acoplada de forma necesaria esta reducción de nitrato a la desnitrificación (Yoshinari, 1980; McEwan y col., 1985). También encontramos una variante incompleta del proceso de desnitrificación en la cual la respiración sobre óxido nítrico está ausente, de manera que el paso de óxido nítrico a nítrico constituye el último peldaño de dicho proceso; suele ser muy frecuente en bacterias carboxidotróficas (Hart y col., 1965; Renner y Becker, 1970; Frunzke, 1990).

La óxido nitroso reductasa es de naturaleza periplásmica (Korner y Mayer, 1992), si bien una Nos débilmente unida a membrada ha sido descrita en *Flexibacter canadensis* (Jones y col., 1992). Está compuesta por dos subunidades idénticas asociadas a diferentes tipos de cobre (Chen y col., 2002). En *Wolinella succinogenes*, que en sentido estricto no sería considerado desnitrificante (Zumft, 1997), se ha comprobado la existencia de un citocromo tipo *c* asociado a la reductasa, el cual actúa en experimentos *in vitro* como un electrón donante para la enzima (Teraguchi y Hollocher, 1989).

La Nos es codificada por un conjunto de genes sólo encontrados hasta el momento en *Proteobacterias*, pero no en Gram positivas o Arqueobacterias. Sin embargo, hay evidencia de actividad óxido nitroso reductasa en Gram positivas, pero no un estudio genético ni una purificación bioquímica de la enzima, apuntando a la posibilidad de evolución divergente (Philippot, 2002).

El operón de esta enzima está constituido por el gen *nosZ*, que codifica la parte estructural; el gen *nosR* que regula la expresión de *nosZ* y los genes *DFY* codificantes de proteínas involucradas en el ensamblaje del cobre al sitio catalítico de la enzima (Viebrock y Zumft, 1988). El gen *nosX* está presente sólo en *alfaproteobacterias*. Esto pone de manifiesto la variabilidad de las rutas biosintéticas entre proteobacterias.

I.2.3. MICROORGANISMOS DESNITRIFICANTES

En un principio se pensó que la desnitrificación era llevada a cabo exclusivamente por bacterias, pero hoy en día el proceso está muy bien estudiado también entre los miembros halófilos e hipertermófilos del Dominio *Archaea* (Zumft, 1997; de Vries, 2002; Philippot y col., 2002; Cabello y col., 2004) e incluso en eucariotas, como es el caso de ciertos hongos y levaduras (Shoun y Tanimoto, 1991; Kobayashi y col., 1996; [Tsuruta](#) y col., 1998).

I.2.3.1. Bacterias desnitrificantes

Desde 1886, año en el que se dio a conocer la primera especie desnitrificante (Gayon y Dupetit, 1886), hasta el día de hoy, se ha descrito esta capacidad en microorganismos pertenecientes a más de 30 géneros distintos (Tavares y col., 2006). No existe un patrón de distribución específico, aunque las especies desnitrificantes predominan entre las α y β -*Proteobacterias*, si bien *Pseudomonas*, dentro de la clase γ -*Proteobacteria*, es quizás el género más ampliamente representado dentro de la comunidad desnitrificante y en las diferentes variedades del proceso (Zumft, 1997; Philippot, 2002; Lalucat, 2006).

La mayoría de las bacterias desnitrificantes son aerobias heterótrofas; en condiciones de anaerobiosis total o parcial y en presencia de nitrato y nitrito, generan energía a partir de los equivalentes de reducción procedentes de la oxidación de compuestos orgánicos. Entre los organismos autótrofos desnitrificantes, menos frecuentes, encontramos bacterias como *Thiomicrospira denitrificans* (Timmer-ten Hoor, 1975).

Las bacterias desnitrificantes son metabólicamente muy diversas. Antes de adentrarnos en los distintos tipos, mencionar que el gran grupo de las enterobacterias lleva a cabo una reducción desasimilatoria de nitrato a amonio (Knowles, 1982; Zumft, 1997), y aunque en algunos casos se generan intermediarios de desnitrificación, como el óxido nitroso, esa formación no está asociada a la conservación de energía ni al crecimiento (Smith, 1982 y 1983).

A continuación, se detallan los tipos metabólicos más representativos de desnitrificantes:

***DESNITRIFICANTES DIAZOTROFOS:**

Los procesos de desnitrificación y diazotrofia pueden coexistir en un mismo microorganismo. Ambos se han descrito también entre microorganismos fototróficos como *Rhodospseudomonas sphaeroides*. En esta bacteria el N_2 generado en la desnitrificación, es fijado por una nitrogenasa e incorporado a la célula. Este proceso tiene lugar en oscuridad y anaerobiosis y requiere de una fuente de energía, que es el ATP producido en la desnitrificación (Dunstan y col., 1982).

Por otra parte, *Bradyrhizobium japonicum*, cuya capacidad para fijar el nitrógeno en asociación con leguminosas ha sido ampliamente estudiada, se ha visto además que es capaz de desnitrificar (O'Hara y Daniel, 1985), secuenciándose muchos de los genes que participan en el proceso (Mesa y col., 2001, 2002). Este microorganismo presenta la particularidad de asimilar y desnitrificar a partir de nitrato de forma simultánea (Vairinhos y col., 1989).

***DESNITRIFICANTES FOTOTROFOS**

La primera descripción que se hizo de una bacteria fotosintética desnitrificante corresponde a *Rhodobacter sphaeroides* subespecie *denitrificans* (Satoh y col., 1974, 1976). En este microorganismo se ha visto que se produce una inhibición de la reducción de nitrato a consecuencia de la luz (Satoh, 1977). Esto implicaría que en condiciones de iluminación la bacteria es capaz de llevar a cabo un proceso fotosintético, mientras que en oscuridad y en presencia de nitrato podría desnitrificar.

Un caso particular dentro de este grupo lo constituye la cepa BK5 de *Rhodobacter capsulatus*, que no es considerada una verdadera desnitrificante ya que no expresa la nitrito reductasa. Sin embargo, cuando se hacen diferentes subcultivos en un medio con baja concentración de nitrato se manifiesta esa actividad. No se conoce con claridad el mecanismo por el cual ciertos genes en esta cepa permanecen crípticos (Richardson y col., 1994).

***DESNITRIFICANTES AEROBIOS**

La capacidad para desnitrificar en aerobiosis es considerada ya en la actualidad como una variante más del proceso y no como una rara excepción. Así, este grupo abarca microorganismos pertenecientes a diversas especies: *Alcaligenes faecalis* (van Niel y col., 1992), *Hyphomicrobium X* (Meiberg y col., 1980), *Paracoccus denitrificans* (previamente nombrada como *Paracoccus pantotrophus*) (Robertson y col., 1988), *Pseudomonas aeruginosa* (Chen y col., 2003), *Pseudomonas stutzeri* (Su y col., 2001b) y *Bacillus licheniformis* (Brycki y col., 2000).

La desnitrificación aerobia es llevada a cabo por el mismo tipo de enzimas que actúan en anaerobiosis. No se trata, por tanto, de una cuestión de sensibilidad al oxígeno por parte de las

reductasas, sino más bien de diferencias en los mecanismos de regulación enzimática y a nivel genético (Zumft, 1997).

***DESNITRIFICANTES CAPACES DE REALIZAR TAMBIÉN UNA NITRIFICACIÓN**

Las bacterias nitrificantes fueron *a priori* excluidas de ser también capaces de desnitrificar por su forma de vida aerobia. Usando ^{15}N como marcador, Poth y Focht (1985) demostraron la producción de N_2O a partir de nitrito por *Nitrosomonas europaea*, un microorganismo típicamente nitrificante. En condiciones aerobias, esta especie realizaba el primer paso de la nitrificación, que es la conversión de amonio a nitrito. Bajo condiciones limitantes o carentes de oxígeno, se favorecía la formación de óxido nitroso o dinitrógeno como resultado de un proceso desnitrificante (Shrestha y col., 2002). Un comportamiento similar ha sido descrito para ciertas cepas del género *Bacillus* (Kim y col., 2005).

***DESNITRIFICANTES OXIDADORES ANAEROBIOS DE AMONIO**

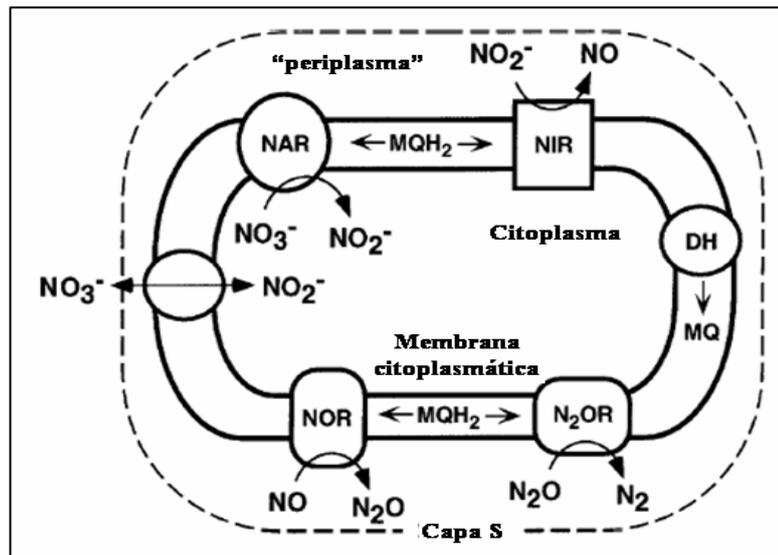
Si bien los microorganismos capaces de realizar el proceso conocido como anammox pueden coexistir en un mismo ambiente con desnitrificantes (Pathak y col., 2007), hasta el momento son muy escasas las descripciones de bacterias con ambas habilidades. Basándose exclusivamente en pruebas morfológicas y fisiológicas, se ha descrito una cepa desnitrificante perteneciente a *Pseudomonas mendocina* que también era capaz de oxidar en anaerobiosis el amonio (Hu y col., 2006).

I.2.3.2. Arqueas desnitrificantes

El proceso de desnitrificación se extiende tanto entre arqueas halófilas, como *Haloferax denitrificans* y *Haloarcula marismortui*, como hipertermófilas, que es el caso de *Ferroglobus placidus* y *Pyrobaculum aerophilum* (Werber y [Mevarech](#), 1978; Tomlinson y col., 1986; Volkl y col., 1993; Stetter, 1996; Vorholt y col., 1997). De entre estas arqueas, *P. aerophilum* es la mejor estudiada en todo lo concerniente a la desnitrificación. Así, se ha comprobado que los cuatro sistemas enzimáticos relacionados con el proceso se encuentran unidos a la membrana citoplasmática y todos ellos tienen como donador de electrones exclusivamente a la menaquinona

(de Vries y Schroder, 2002). En la Figura 7 se muestra un esquema de distribución de los sistemas enzimáticos en la arquea *P. aerophilum*.

Figura 7. Localización de los sistemas enzimáticos en la arquea *P. aerophilum*. La situación del sitio para el sustrato de las diferentes reductasas no ha sido determinado y se asume que debe de ser el mismo que en bacterias. El espacio situado entre la capa S y la membrana citoplasmática es llamado "periplasma". Su volumen relativo con respecto al citoplasma es mucho más pequeño que como aparece en el dibujo adyacente (imagen tomada de de Vries y Schroder, 2002).



1.2.3.3. Hongos desnitrificantes

Durante más de un siglo, el proceso de desnitrificación fue considerado un proceso exclusivamente procariótico. Sin embargo, en los últimos años se ha ido incrementando el número de géneros fúngicos en los que se ha descubierto capacidad desnitrificante: *Fusarium*, *Giberella*, *Trichoderma*, *Cylindrocarpon*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Hansenula*. Otros hongos imperfectos, hongos filamentosos y levaduras se encuentran también entre los organismos desnitrificantes (Bollag y Tung, 1972; Bleakley y Tiedje, 1982; Burth y col., 1982; Shoun y Tanimoto, 1991; Shoun y col., 1992; Kobayashi y col., 1996; Tsuruta y col., 1998). En el caso concreto de *Fusarium oxysporum* la desnitrificación parece detenerse en el paso previo a la reducción a dinitrógeno (Shoun y col., 1992). La formación de óxido nitroso como producto final del proceso ha sido observada también en cepas de otros géneros. Por ello resultaría interesante estudiar la distribución ecológica de esta propiedad entre los microorganismos eucariotas, ya que la creciente acidificación de los suelos potencia la actividad de los hongos en general y, por tanto,

la actividad desnitrificante, incrementándose la concentración de N₂O, con elevada importancia en el efecto invernadero.

I.2.3.4. Especies del género *Halomonas* con capacidad desnitrificante

En la actualidad son ocho las especies del género *Halomonas* válidamente publicadas y presentadas como desnitrificantes en su descripción original. Se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Especies desnitrificantes del género *Halomonas* válidamente publicadas hasta la fecha.

Especie	Referencia
<i>Halomonas campisalis</i> ATCC 700597 ^T	Mormile y col., 1999
<i>Halomonas denitrificans</i> DSM 18045 ^T	Kim y col., 2007
<i>Halomonas desiderata</i> DSM 9502 ^T	Berendes, 1996
<i>Halomonas gudaonensis</i> LMG 23610 ^T	Wang y col., 2007a
<i>Halomonas halodenitrificans</i> ATCC 13511 ^T	Robinson y Gibbons, 1952; Dobson y Franzmann, 1996
<i>Halomonas shengliensis</i> LMG 23897 ^T	Wang y col., 2007b
<i>Halomonas ventosae</i> CECT 5797 ^T	Martínez-Cánovas y col., 2004a

Se dispone de poca información acerca del proceso de desnitrificación en estas especies. En *Halomonas campisalis* se ha estudiado la tasa de respiración sobre nitrato y nitrito usando diferentes fuentes de carbono (Peyton y col., 2001). Con respecto a *H. desiderata*, existen datos que confirman la dependencia que su actividad desnitrificante tiene del pH (Berendes, 1996).

Desde el punto de vista genético y enzimático existe un gran vacío de conocimiento sobre la desnitrificación en el género *Halomonas*. En *Halomonas halodenitrificans* existen estudios recientes sobre el operón *nar* (Sakurai y col., 2006) y sobre el funcionamiento y estructura de la óxido nítrico reductasa (Sakurai y col., 2005). Información sobre la organización de los genes de la nitrato reductasa también están disponibles en *Halomonas maura* (Argandoña y col., 2006), con capacidad para respirar únicamente sobre nitratos pero no para desnitrificar.

I.2.4. FISIOLOGÍA DE LA DESNITRIFICACIÓN. INFLUENCIA DE DIVERSOS FACTORES EN EL PROCESO

Las señales exógenas principales que regulan la síntesis y actividad de las enzimas participantes en la desnitrificación, son la tensión de oxígeno, la disponibilidad de oxianiones de nitrógeno en el medio (Tiedje, 1994; Zumft, 1997; Moreno-Vivián, 1999). En ellas y en la influencia del pH se han centrado la mayoría de estudios sobre el control del proceso de desnitrificación (Firestone y col., 1979; Davidson, 1986; Weier y col., 1993; Thomas y col., 1994). Normalmente la regulación se estudia en un microorganismo concreto o como mucho en dos, pero por la importancia ecológica de la desnitrificación (apartado I.2.5.1), es necesario un planteamiento que considere en conjunto no sólo el proceso de desnitrificación mismo, sino también la comunidad desnitrificante. Existen otros factores cuya influencia sobre ambos está también demostrada: Temperatura, luz, fuente de carbono, salinidad, metales y existencia de represores (Knowles, 1982; Zumft, 1997; Cavigelly y Robertson, 2000; Wallenstein y col., 2006). Estos distintos factores pueden tener una acción a corto o largo plazo (Wallenstein y col., 2006). En la Figura 8 se esquematizan todos los elementos, incidiéndose en la temporalidad de su efecto.

Cuando se analiza la tasa de desnitrificación de un determinado ambiente, en general, no se presta excesiva importancia a la composición de su población desnitrificante (Wallenstein, 2006). El principal sesgo de estos estudios es que en muchos casos la diversidad de la comunidad desnitrificante se analiza únicamente a partir de la presencia de genes específicos del proceso, los cuales está demostrado que se extienden entre ramas filogenéticas muy dispares (Linne von Berg y Bothe, 1992; Gamble y col., 1977; Tiedje, 1988; Zumft, 1997). Se obvia también el hecho de que la existencia de los genes no implica su expresión ni la funcionalidad del producto (Flanagan y col., 1999; Philippot, 2002; Tuomanien y col., 2003; Wallenstein y col., 2006).

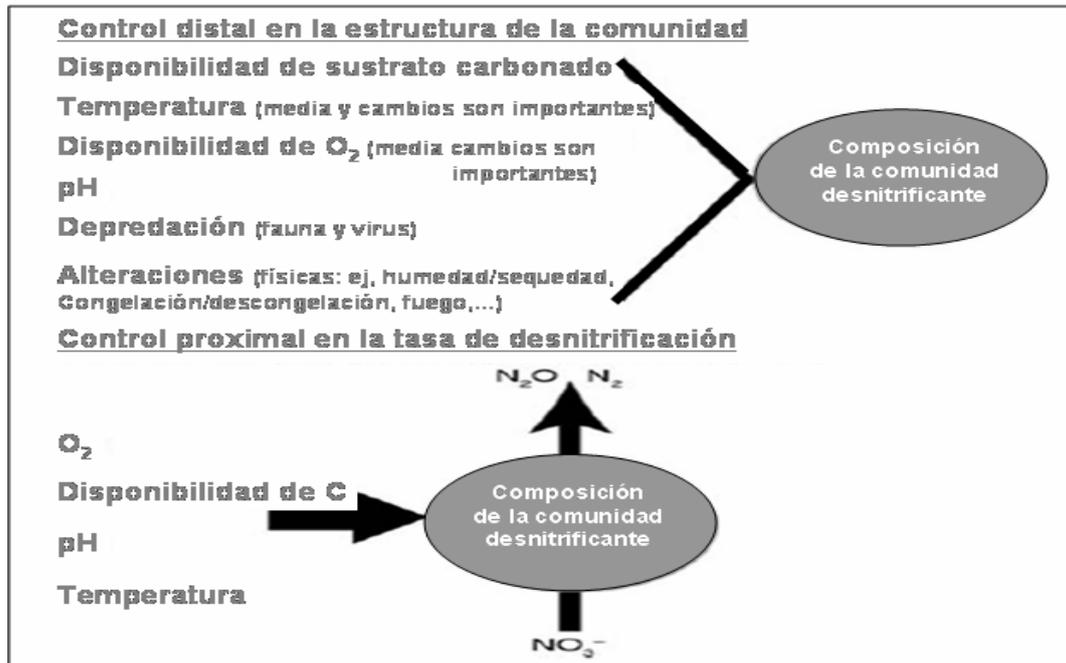


Figura 8. Ilustración representando los distintos factores que influyen sobre la comunidad desnitrificante y sobre el mismo proceso de desnitrificación. Por <<control proximal>> se entiende la acción inmediata de ciertos elementos; generalmente afectan a la cinética de desnitrificación de la población existente en un determinado momento. En cambio, << regulación distal>> sería el efecto a largo plazo, más influyente sobre la composición de la comunidad desnitrificante (Imagen tomada de Wallenstein y col., 2006).

1.2.4. 1. Oxígeno

Es un hecho generalizado que el oxígeno inhibe la actividad de las enzimas desnitrificantes, con excepción de la nitrato reductasa periplásmica (Nap) (Lloyd y col., 1987; Carter y col., 1995a y b). En los desnitrificantes aerobios los genes se activan incluso a concentraciones elevadas de oxígeno y la pérdida de sensibilidad al mismo no responde a distintas variantes enzimáticas, sino a la existencia de mecanismos protectores, dispositivos que en algunos casos se regulan a nivel genético, pero que en otros no son muy bien conocidos (Bell y Ferguson, 1991; Zumft, 1997; Pantel y col., 1998).

Como se ha mencionado anteriormente, la desnitrificación tiene un trato facultativo, de manera que si el microorganismo puede respirar con oxígeno, tenderá a hacerlo pues energéticamente es mucho más favorable (Thauer y col., 1977). Por su parte, los desnitrificantes

aerobios lo son incluso a altas presiones de oxígeno, pudiéndose hablar en estos casos de correspiración (Zumft, 1997; Kim y col., 2005). Para el resto de desnitrificantes los márgenes de concentración de oxígeno dentro de los cuales se manifiesta la capacidad para desnitrificar, varían de un microorganismo a otro (Knowles, 1982; Zumft y col., 1988; Robertson y Kuenen, 1990; Ka y col., 1997). Un caso especialmente curioso lo constituye *Magnetospirillum magnetotacticum*, que presenta un requerimiento absoluto del oxígeno para manifestar su capacidad desnitrificante (Bazylynski y Blakemore, 1983). La situación contraria a ésta, la de un anaerobio desnitrificante obligado, es mucho menos frecuente: *Thiomicrospira denitrificans* sería uno de los pocos ejemplos (Timmer-ten Hoor, 1975).

El mecanismo de inhibición del oxígeno es diferente para cada enzima (Bell y Ferguson, 1991), produciéndose la represión directa únicamente sobre la óxido nitroso reductasa (Alefounder y Ferguson, 1982). En las demás enzimas el efecto inhibitorio parece estar más relacionado con un efecto competitivo por los electrones (Payne, 1973; Stouthamer, 1976). La nitrato reductasa unida a membrana ha demostrado ser inactiva en aerobiosis (Zumft, 1997); las dos clases de nitrito reductasas, salvo excepciones, son fuertemente reprimidas por el oxígeno y aunque necesitan tras la exposición al mismo un periodo más prolongado de recuperación, éste es siempre menor al requerido por la óxido nitroso reductasa, la enzima más sensible (Knowles, 1982; Coyle y col., 1985; Snyder y Hollocher, 1987). Por su parte, las óxido nítrico reductasas asociadas al proceso de desnitrificación suelen ser sensibles al oxígeno (Tavares y col., 2006), si bien se han descrito en *Paracoccus denitrificans* y *P. pantotrophus* un tipo de óxido nítrico reductasa ligada al complejo citocromo *bc* que actúa reduciendo el mismo oxígeno (Zumft, 2005).

Estas diferencias en el comportamiento frente al oxígeno determinan la variabilidad del producto final en la desnitrificación. La influencia es aún mayor en microorganismos capaces de realizar más de un proceso del ciclo del nitrógeno; en ellos, disponiendo de oxianiones del nitrógeno, el oxígeno actuaría como regulador, dirimiéndose en función de su concentración cuál de las reacciones de cada paso tiene lugar. Es el caso del desnitrificante autótrofo, *Nitrosomonas europaea*; si se produce anaerobiosis o la tensión de oxígeno es baja, tiene lugar preferentemente la desnitrificación a partir de nitrito, el cual, por su parte, procede de la oxidación aerobia de

amonio (Poth, 1986; Shrestha y col., 2002). Esta misma situación se ha observado en cepas del género *Bacillus* (Kim y col., 2005).

I.2.4. 2. Óxidos de nitrógeno

La síntesis y actividad de las enzimas desnitrificantes puede verse influenciada, como se irá viendo, por multitud de factores ambientales pero son quizás los óxidos de nitrógeno, junto con el oxígeno, los factores clave (Knowles, 1996; Zumft, 1997). No obstante, existen microorganismos en los que esta influencia no se manifiesta; es el caso de *Pseudomonas denitrificans* y *P. perfectomarinus* (reclasificada como genomovar de *P. stutzeri* por Rossello-Mora y col., 1993) que en condiciones limitantes de oxígeno, poseen las reductasas desreprimidas incluso en ausencia de óxidos de nitrógeno (Payne y col., 1971; Matsubara, 1971). En otros microorganismos como *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* (reclasificada por Peix y col., 2007), su actividad NirK no está condicionada tampoco por la presencia de óxidos de nitrógeno, ni en aerobiosis ni en atmósfera libre de oxígeno (Ka y col., 1997). La influencia va a depender, por tanto, del microorganismo, pero también del tipo de enzima.

El efecto del nitrato en diversos sistemas es quizás el mejor estudiado entre todos los óxidos de nitrógeno. En general actúa como inductor de la desnitrificación (Zumft, 1997; Mergel y col., 2001), pero se ha visto que a altas concentraciones puede inhibir la actividad nitrato reductasa por competencia con el nitrato como aceptor de electrones, provocando la acumulación de éste (Komada y col., 1969). También puede bloquear la actividad óxido nítrico reductasa (Payne y Riley, 1969). El nitrato, junto con el nitrato y también a concentraciones elevadas, condicionan el producto mayoritario de una desnitrificación, desplazando el proceso hacia la formación de óxido nítrico por inhibición directa de la Nos o por su condición de aceptores terminales preferentes (Blackmer y Bremner, 1978; Firestone y col., 1979; Ryden y col., 1979a,b; Knowles, 1982). En organismos como *Alcaligenes odorans*, que carece de Nar, el nitrato no tiene efecto alguno sobre su óxido nítrico reductasa (Betlach y Tiedje, 1981).

Por su parte, el nitrato y óxido nítrico pueden actuar retardando la actividad nitrato reductasa, siempre y cuando sus correspondientes reductasas (Nir y Nos) no se encuentren

saturadas por intermediarios endógenos del proceso de desnitrificación. Este efecto inhibitorio se explica más por la oxidación de determinados componentes de la cadena respiratoria vía Nir y Nos, que a través de la inhibición por producto (Kucera y col., 1983). El nitrito además actúa induciendo la síntesis de su propia reductasa (Körner y Zumft, 1989; Arai y col., 1991), aunque se ha comprobado que incluso en ausencia del mismo puede existir una expresión basal de la enzima en algunos microorganismos (Ka y col., 1997).

El carácter tóxico del NO se debe a su alta reactividad con proteínas que contienen en su estructura metales de transición como el cobre o hierro. Por tal motivo actúa inhibiendo la óxido nitroso reductasa, que contiene cobre (Frunzke y Zumft, 1986) o la nitrogenasa en desnitrificantes diazotrofos, con centros Fe-S (Hyman y col., 1992). Por esta toxicidad su formación a partir del nitrito no tiene lugar si la posterior reducción a N₂O por la Nor no está asegurada; se propone que el óxido nítrico actúe como molécula activadora de su propia reductasa y como regulador de la Nir (de Boer y col., 1996; Zumft, 2005).

I.2.4. 3. Temperatura

La dependencia de la temperatura es mayor en medios terrestres que en hábitats acuáticos (Knowles, 1982). Así, la actividad desnitrificante en estos últimos permanece estable en un rango de temperaturas amplio, de 5 a 23°C; la explicación parece estar basada en la limitada concentración de nitrato y en su escasa difusión en esos medios, más que en una cuestión de tipo metabólico (Anderson, 1974, 1977; Johnston, 1974). En suelos, el rango óptimo es algo más elevado y se sitúa entre 10 y 32°C (Knowles, 1982):

En general, el aumento de temperatura se corresponde con un aumento de actividad y viceversa (Knowles, 1982; Ilies y Mavinic, 2001). Por ello, la dependencia de la temperatura no es sólo estacional, sino que se ha comprobado que a lo largo del día la tasa de desnitrificación es también distinta, siendo más alta en las horas de mediodía-tarde, cuando la temperatura es mayor (Denmead y col., 1979a, b; Matthias y col., 1980).

Como ocurre con los demás factores siempre existen microorganismos que se sitúan fuera de los márgenes normales. En relación con la temperatura, la arquea hipertermófila *Pyrobaculum aerophilum* muestra una actividad desnitrificante óptima a 85°C (Afshar y col., 1998).

I.2.4. 4. pH

Tanto en un cultivo puro como en un ambiente natural la desnitrificación está muy ligada al pH. Es plenamente aceptado que a $\text{pH} \leq 7$ se produce una inhibición de las reductasas participantes en la desnitrificación, especialmente de la óxido nitroso reductasa, de manera que a pH 4 el producto mayoritario del proceso sería N_2O (Knowles, 1982). Este efecto inhibitorio, de carácter reversible (Glass y Silverstein, 1998b), parece estar originado por la formación de especies protonadas de ácido nitroso (HNO_2), de gran toxicidad (Glass y col., 1997; Glass y Silverstein, 1998a).

Normalmente los estudios de suelos u otros hábitats llegan a la conclusión de que el proceso de desnitrificación tiene un pH óptimo próximo o superior a 7, llegando incluso a observarse buen rendimiento a pH 11 (Prakasam y Loehr, 1972; Knowles, 1982; Napier, 1990; Cook y col., 1993; Glass y Silverstein, 1998). Más aún, en suelos ácidos un incremento del pH se traduce en un aumento de la población desnitrificante (Bloesl y Conrad, 1992).

Centrándonos en microorganismos concretos encontramos valores de pH altos en los cuales se da el máximo rendimiento del proceso: Así se han descrito especies como *Thiobacillus nitratireducens* (Sorokin y col., 2003a), *Halomonas campisalis* (Peyton y col., 2001) y *H. desiderata* (Berendes y col., 1996) que presentan un buen rendimiento de desnitrificación a pH superior a 9. Estos óptimos de desnitrificación coinciden en estas especies con los de crecimiento; ya que se trata de microorganismos alcalófilos.

I.2.4. 5. Luz

En microorganismos desnitrificantes fotosintéticos se ha puesto de manifiesto la influencia de la iluminación en su capacidad para desnitrificar. En algunos casos esta relación está ligada a la fuente de carbono que actúa como donante de electrones (Satoh, 1977).

La influencia de la luz también se ha observado en microorganismos no fotosintéticos (Mütze, 1963; Barak y col., 1998). Así, en la cepa JR12, perteneciente al género *Pseudomonas*, se observó una fotoinhibición de la reducción de nitrito, dosis dependiente y reversible. Esta sensibilidad parece basarse en la oxidación del citocromo *c*, lo que provoca una interrupción del flujo de electrones desde este citocromo a la nitrito reductasa, y por tanto, revierte en una acumulación de nitrito (Barak y col., 1998).

I.2.4. 6. Salinidad

Las altas concentraciones salinas pueden marcar la pauta de un proceso de desnitrificación; se ha comprobado que a altas concentraciones de cloruro sódico, la reducción de nitrito constituía el paso clave en un proceso de desnitrificación y a porcentajes muy altos podía inhibirse, acumulándose el nitrito (Yoshie y col., 2002, 2006a). Por el contrario, se ha visto que la actividad óxido nitroso reductasa es independiente de la salinidad (Tsuneda y col., 2005).

Sin embargo, la influencia de la salinidad en el proceso de desnitrificación no está bien estudiada en muchos casos, pues los resultados se extraen en trabajos de campo con poblaciones mixtas, en las que no siempre están presentes microorganismos halófilos; por ello las conclusiones hay que considerarlas con cautela. El proceso de desnitrificación puede tener lugar incluso a concentraciones de NaCl próximas a la saturación (Oren, 1999) y en estudios específicos con bacterias halófilas de géneros como *Halomonas* o *Marinobacter*, se ha demostrado que a elevadas concentraciones salinas las tasas de desnitrificación son iguales o superiores a las que presentan los microorganismos no halófilos en sus medios óptimos (Peyton y col., 2001; Yoshie y col., 2002, 2006a, b). Estos microorganismos presentan una ventaja selectiva con respecto a los no halófilos en los tratamientos de aguas contaminadas que emplean columnas de intercambio iónico, ya que se generan efluentes ricos en nitrato y cloruro sódico (Clifford y Liu, 1993a, b).

En relación con lo anterior, encontramos un caso particular en la nitrato reductasa unida a membrana de *Haloferax denitrificans*, un microorganismo halófilo extremo. Esta enzima, a diferencia de otras de bacterias halófilas, presenta mayor actividad en ausencia de sal (Hochstein y Lang, 1991).

Muchos halófilos moderados, a pesar de su condición, cuando crecen en altas concentraciones salinas manifiestan requerimientos adicionales, siendo necesario en muchos casos medios complejos (Ventosa y col., 1998). Es un factor a tener en cuenta más por la fisiología del microorganismo que por la propia capacidad de desnitrificación en medios salinos.

I.2.4. 7. Metales

Su importancia, aunque diferente según el metal de que se trate, se debe a que la mayoría de las enzimas participantes en el proceso de desnitrificación estructuralmente se encuentran asociadas a algún metal: El molibdeno forma parte de dos de los tipos de nitrato reductasas (Jetten y col., 1997; Zumft, 1997; Philippot, 2005; Tavares y col., 2006); el hierro es un constituyente del grupo hemo del citocromo *cd₁* de la nitrito reductasa NirS, y tanto en grupos hemo como independiente, también forma parte de los distintos tipos de óxido nítrico reductasas (Zumft, 1997; Tavares y col., 2006); por último, el cobre es fundamental en la estructura de la nitrito reductasa NirK, de la óxido nítrico reductasa qCuNor y de la óxido nitroso reductasa (Zumft, 1997; Tavares y col., 2006).

Se postula con que la variación en el estado de oxidación y disponibilidad de los metales existentes en el tránsito desde una atmósfera anóxica a otra rica en oxígeno podría haber dirigido la evolución de las enzimas Nors; así, la baja solubilidad de hierro, en conjunción con la relativamente alta de cobre, condujo al reemplazamiento del hierro no hemo por cobre en las qCuNor (de Vries y Schroder. 2002).

De forma general, la influencia de los metales sobre el proceso de desnitrificación va a depender del tipo de metal de que se trate y de su concentración (véase Tabla 6). No obstante, existen situaciones específicas de los microorganismos, como es el caso de la especie *Rhizobium sullae* que presenta una desnitrificación atípica sólo con actividad nitrito reductasa, generando la especie reactiva óxido nítrico (Casella y col., 2006). Su capacidad desnitrificante es altamente resistente a elevadas concentraciones de selenito (Basaglia y col., 2007).

Tabla 6. Influencia de diversos metales sobre el proceso de desnitrificación.

Metal/Condiciones	Efecto	Referencia
Fe (II), pH neutro	-Aceleración de la desnitrificación	-Zhou y col., 2007
Fe (III) ,Fe (II), pH ácido	-Disminución de la desnitrificación	-Baeseman y col., 2006
Cd	-Ligero descenso de la desnitrificación	-Yang y col., 2005; Ganguly y Jana, 2002
Ag (I)	-Disminución de la desnitrificación	-Throbäck y col., 2007
Cu	-Estimulación de la óxido nítrico reductasa -Incremento síntesis citocromo <i>cd₁</i>	-Zumft, 1997; Manconi y col., 2006 -Yamanaka y col., 1963
Cu, Zn en ctidad. elevada	-Inhibición actividad desnitrificantes autótrofos	-Moon y col., 2006

I.2.4. 8. Fuente de carbono orgánica

Su influencia se ciñe a los desnitrificantes heterótrofos, que constituyen el grosor de los microorganismos capaces de desnitrificar. En ellos la disponibilidad de poder reductor a través de un compuesto orgánico juega un papel esencial en el proceso, con un resultado muy distinto según el microorganismo o compuesto de que se trate (Knowles, 1982; Blaszczyk, 1993; Firth y Edwards, 2000; Lorrain y col., 2004; Otani y col., 2004). Esta relación se ha puesto de manifiesto no sólo a escala de laboratorio, sino también en trabajos de campo (Hill y Cardaci, 2004; Bastviken y col., 2007). Se ha visto, no obstante, que bajo determinadas condiciones la fuente de carbono no tiene efecto alguno (Tiedje, 1978). Por el contrario, en otros estudios de suelos se observa una acción específica sobre las reductasas, pues compuestos con igual tasa de desnitrificación daban lugar a diferentes concentraciones de intermediarios (Bremner, 1977). Por último, señalar que a veces la influencia de un sustrato no radica en su aporte de carbono y energía sino que depende más de su metabolismo, ya que a través de él se generan señales de regulación para determinadas reductasas (Ellington y col., 2002).

El poder reductor de la fuente de carbono puede tener un efecto contrapuesto dependiendo del microorganismo y de las condiciones de desnitrificación: En *Paracoccus pantotrophus* (reclasificada por Rainey y col., 1999), en aerobiosis cuanto mayor es el estado de oxidación del compuesto mayor es el crecimiento pero menor la actividad nitrato reductasa periplásmica, y viceversa. Estos resultados se explican porque sustratos carbonados de elevado poder reductor

generan una situación de estrés en la célula, que tiende a disipar el exceso incrementando la actividad de la Nap; sin embargo, esta actividad no está acoplada a la síntesis de ATP y por ello no se observa relación directa con el crecimiento (Richardson y Ferguson, 1992; Ellington y col., 2002). En otros desnitrificantes, como *Paracoccus denitrificans*, se da la situación contraria; cuando en anaerobiosis existe un equilibrio apropiado entre la fuente de carbono y la concentración de nitrato, el nitrito formado a partir de éste se acumula antes de proseguir con las siguientes reacciones de desnitrificación. El mayor o menor grado de acumulación depende del poder energético del compuesto, de manera que a mayor poder reductor, mayor actividad nitrito reductasa y mayor crecimiento (Blaszczyk, 1993).

Entre las peculiaridades relacionadas con la fuente de carbono es de destacar que existen compuestos que pueden ser utilizados como fuente de carbono y energía cuando el microorganismo respira en aerobiosis, pero no si realiza desnitrificación en completa anaerobiosis. Es el caso de *Halomonas campisalis* y el etanol (Peyton y col., 2001). Entre las posibles explicaciones estaría la ya mencionada anteriormente de formación de algún metabolito derivado del sustrato que inhiba a las reductasas participantes en la desnitrificación (Ellington y col., 2002); también podría justificarse esta evidencia simplemente por el potencial de oxido-reducción de los compuestos, insuficiente para sostener el crecimiento en anaerobiosis.

I.2.4. 9. Factores nutricionales

Un microorganismo puede presentar requerimientos adicionales a los que manifieste en aerobiosis para llevar a cabo las etapas del proceso de desnitrificación o simplemente para sostener un crecimiento adecuado. Así, se ha visto que en medios complejos, con numerosos factores de crecimiento, la desnitrificación a partir de nitrato está acelerada y la acumulación transitoria de nitrito reducida (Blaszczyk, 1993)

Halomonas halodenitrificans es incapaz de crecer anaeróbicamente con nitrato como aceptor de electrones si el medio no está suplementado con metionina, glicina betaina o vitamina B₁₂. En este caso, la necesidad de estos compuestos no está relacionada con el propio proceso de desnitrificación sino con la incapacidad de producción anaerobia de metionina, si bien este hecho

no está aún claro (Ventosa y col., 1998). En otros microorganismos desnitrificantes, como *Paracoccus denitrificans*, factores como tiamina, cobalamina u otras vitaminas del grupo B aceleran la velocidad de crecimiento, si bien no tienen un efecto directo sobre la actividad enzimática (Blaszczyk, 1993).

I.2.4. 10. Otros compuestos inhibidores

El mecanismo de acción por el cual interfieren en el proceso de desnitrificación no está claro en muchos de los compuestos (Knowles, 1982). En el caso de los sulfuros parece que actúan inhibiendo específicamente la reducción de NO a N₂O y de éste a dinitrógeno, provocando la acumulación de los dos primeros (Sorensen, 1978). En la Figura 9 de la página siguiente se muestra un listado de compuestos con efecto inhibitorio de la desnitrificación.

Inhibitor (concn)	Reaction inhibited
Acetylene (10 ⁻³ atm)	N ₂ O → N ₂
Azide, cyanide, DNP ^a (ca. 10 ⁻⁴ M)	NO ₃ ⁻ → N ₂ , N ₂ O → N ₂
Nitrapyrin (nitrification inhibitor)	
14 ppm in soil	NO ₃ ⁻ → N ₂
50 ppm in soil	No effect
50 ppm in culture	NO ₃ ⁻ → N ₂
N-serve formulation (20 ppm in enrichment culture)	NO ₃ ⁻ → N ₂ O and N ₂
Pesticide	
Vapam (20 ppm in soil)	NO ₃ ⁻ → N ₂
Dalapon (10 ppm in soil)	NO ₃ ⁻ → N ₂
Toluidine derivatives	NO ₂ ⁻ , N ₂ O → N ₂
Sulfur compound	
SO ₄ ²⁻ (100–500 μg of S g ⁻¹)	NO ₃ ⁻ disappearance in soil
S ²⁻	
40 mmol g ⁻¹	NO ₃ ⁻ → gaseous products
0.3 mM	NO → N ₂ O
0.3 mM, 8 μmol g ⁻¹	N ₂ O → N ₂

Figura 9. Compuestos inhibidores de la desnitrificación (imagen e información tomada de Knowles y col., 1982).

I.2.5. ECOLOGÍA DE LA DESNITRIFICACIÓN

I.2.5.1. Importancia ecológica del proceso de desnitrificación

Dependiendo del punto de vista desde el que se enfoque, podemos considerar la desnitrificación como un proceso perjudicial pero también beneficioso para el ecosistema.

*Aspectos negativos de la desnitrificación

Supone una pérdida del nitrógeno introducido en la biosfera por fijación química y biológica (Conrad, 1996; Philippot, 2005a y b). Esta pérdida puede afectar al crecimiento de las plantas, para las cuales el nitrato constituye un nutriente esencial.

Por otro lado, los óxidos de nitrógeno participan en la contaminación fotoquímica de la atmósfera; su fotólisis conduce a la destrucción del ozono estratosférico (Staehelin, 1992; Conrad y col., 1996; Festy, 1997; Zumft, 1997; Tang y col., 1998; Waibel y col., 1999; Prather y col., 2001). Se conoce con la denominación de NO_x al conjunto de óxido nítrico (NO) y dióxido de nitrógeno (NO_2). El emitido en más cantidad es el NO, pero sufre una rápida oxidación a NO_2 , siendo éste el que predomina en la atmósfera. Las reacciones fotoquímicas que conducen a la destrucción de la capa de ozono se esquematizan en la Figura 10.

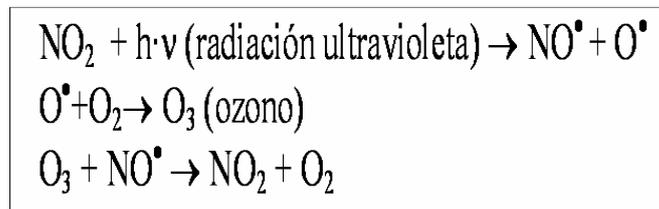


Figura 10. Formación de oxidantes a través del ciclo fotolítico del dióxido de nitrógeno (NO_2).

Asimismo, el N_2O contribuye con igual importancia que el CO_2 y el CH_4 al efecto invernadero. Sin embargo, debido a un mayor tiempo de residencia en la atmósfera -alrededor de 150 años-, la eficiencia de cada molécula de N_2O es muy superior a la de los otros gases (Lashof y Ahuja, 1990; Conrad y col., 1996; Festy, 1997; Zumft, 1997).

***Beneficios del proceso de desnitrificación**

El exceso de nitrato en aguas es la causa primaria de metahemoglobinemia o “enfermedad de los bebés azules” en la infancia (Mensinga y col., 2003; Camargo y Alonso, 2006). Esta patología es causada por un exceso de nitritos en sangre, tanto por ingestión directa de los mismos como por la reducción de nitratos una vez absorbidos éstos. Además la formación de nitrosaminas en el estómago a partir del nitrato reducido es considerada causa de cáncer (Vermeer y van Maanen, 2001). Para evitar estos efectos adversos, el contenido en nitratos se limita en las aguas de bebida; así, por ejemplo, la concentración máxima permitida en Estados Unidos es de 10mg/l mientras que en Europa es de 12mg/l. El Real Decreto 1138/90 establece que la concentración máxima de nitratos y nitritos debe ser de 50 y de 0.1 miligramos por litro, respectivamente.

El nitrato es muy soluble en agua y es fácilmente transportado a aguas profundas y superficiales desde los vertidos industriales y domésticos. Como resultado, la contaminación por nitrato está causando pérdidas significativas en los recursos hídricos, lo cual se ha puesto de manifiesto especialmente en las regiones agrícolas de Estados Unidos (Spalding y Exner, 1993).

I.3.5.2. Análisis de la diversidad de desnitrificantes de un hábitat mediante técnicas moleculares

Los avances en biología molecular han supuesto un progreso del conocimiento sobre la población desnitrificante por su independencia de las técnicas de cultivo. Como se ha mencionado, la desnitrificación está extendida entre ramas filogenéticas muy dispares (Gamble y col., 1977; Tiedje, 1988; Zumft, 1997), tanto que se cuestiona incluso con la posibilidad de una transferencia horizontal de los genes participantes en el proceso (Moreira y Philippe, 2000). Por ello, para analizar la diversidad de especies desnitrificantes de un hábitat el uso del gen ARNr 16S resulta poco práctico y las investigaciones en esta comunidad tienden a enfocarse más en los genes funcionales que codifican para las enzimas involucradas en alguna etapa de la desnitrificación.

La generalidad de estos estudios se centra en bacterias, ya que es creído ser los microorganismos desnitrificantes que predominan en los distintos ambientes. Entre la población bacteriana aunque existen numerosos trabajos sobre especies concretas, en los últimos años los

estudios se han dirigido más hacia el rastreo de desnitrificantes en diversos hábitats (Scala y Kerkhof, 2000, Priemé y col., 2002, Rich y col., 2003, Chéneby y col., 2004, Throbäck y col., 2004).

Las técnicas moleculares empleadas son muy diversas; las hay dependientes de una reacción de PCR, como PCR-DGGE (electroforesis en geles de gradiente desnaturante) y T-RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción terminales) y otras que permiten un estudio directo sin amplificación previa de ningún gen, como FISH (hibridación *in situ* con fluorescencia). Como ejemplo de aplicación de tales métodos en el estudio de la comunidad desnitrificante citar los trabajos de Yoshie y col. (2002) y Goregues y col. (2005), en relación con la técnica DGGE; los trabajos de Scala y Kerkhof (2000) y Priemé y col. (2002) empleando el método T-RFLP; y de Fernandez y col. (2007) utilizando la técnica FISH. Tanto unos métodos como otros hacen uso de información originada en microorganismos que han sido previamente cultivados. Esto implica que aún cuando hablemos de cebadores o sondas “universales” estemos considerando un “universo” muy pequeño, una pequeña fracción de especies presentes en la naturaleza.

Aunque los métodos moleculares permiten independizarse de las técnicas cultivo-dependientes, la elevada variabilidad génica, reflejo de la vasta diversidad, no encuentra su correspondencia en las secuencias de bacterias previamente descritas. Asimismo, la presencia de genes en un ambiente no implica su funcionalidad (Flanagan y col., 1999; Philippot, 2002; Tuomanen y col., 2003; Wallenstein y col., 2006). La identificación de bacterias sin la determinación de su papel fisiológico, carece de valor. Así, para entender el papel de esas poblaciones microbianas en el ambiente la ecología debe ser capaz de integrar diversidad y funcionalidad (Philippot, 2005a). En este sentido, resulta especialmente útil la técnica de amplificación a tiempo real de alguno de los genes clave en el proceso de desnitrificación; como ejemplo citar el trabajo de Araki y col. (2006), que han encontrado en un biorreactor alimentado con aguas residuales una buena correlación entre la actividad desnitrificante medida directamente y la cuantificación de los genes *nirS* mediante amplificación por PCR a tiempo real.

I.3.5.3. Cuantificación de la actividad desnitrificante de un hábitat

La cuantificación de las pérdidas de nitrógeno a través de la desnitrificación es extremadamente difícil de medir a largo plazo por varias razones: Estos métodos cambian las concentraciones de sustratos, alteran el medio físico donde transcurre el proceso, no son muy sensibles, y resultan frecuentemente muy costosos en tiempo y capital. Además, el N_2 , producto final dominante de una reacción de desnitrificación, resulta dificultoso de cuantificar por su alta concentración de base en el ambiente. Por otra parte, la desnitrificación es también altamente variable en el tiempo y el espacio, sobre todo, en los ambientes terrestres (Groffman y col., 2006).

Existen diversas metodologías para la cuantificación de la actividad desnitrificante en un ambiente. Algunas de las más frecuentemente usadas son:

***Método de inhibición por acetileno.** Es uno de los métodos más usados. Se basa en la inhibición de la reducción de N_2O a N_2 , de manera que el primero es el producto final del proceso de desnitrificación. El óxido nítrico es relativamente fácil de medir por su baja concentración atmosférica y la sensibilidad de los detectores para este gas. No obstante, presenta como principal problema que inhibe la producción de nitrato vía nitrificación (Mosier, 1980), con la consiguiente influencia que sobre el proceso de desnitrificación tendría en un ambiente donde cohabitan una población nitrificante y desnitrificante (Seitzinger y col., 1993).

***Empleo del isótopo ^{15}N .** La adición de $^{15}NO_3$ y la posterior medición de dinitrógeno marcado, fue el primer método empleado para la cuantificación directa de la desnitrificación en muestras ambientales. Su aplicación, no obstante, quedó limitada por los procedimientos tan laboriosos y la costosa instrumentación requerida.

***Cuantificación directa de dinitrógeno en un ambiente.** Como ya se ha mencionado, las concentraciones atmosféricas de este gas son muy altas, lo cual dificulta la medición de pequeñas variaciones originadas por el proceso de desnitrificación. Este problema se presenta mayormente en muestras de suelo, ya que en el medio acuático el intercambio de gases con la atmósfera es limitado. Para la medida de dinitrógeno en suelos y sedimentos se precisan sistemas

de incubación especiales para las muestras, los cuales mantengan una baja presión atmosférica de dinitrógeno (Butterbach-Bahl y col., 2002).

I.2.5.4. Empleo de la desnitrificación bacteriana en la biorremediación de aguas residuales

***Biorreactores**

Las técnicas biológicas de tratamiento de aguas residuales se vienen usando desde hace casi un siglo. Dentro de éstas, la tecnología de membrana (MBR) ha cobrado en los últimos años un gran interés. Consiste en una unidad biológica responsable de la degradación de los compuestos presentes en el agua a depurar y en un módulo de membrana encargado de llevar a cabo la separación física del agua ya depurada. Dependiendo de la configuración del sistema, podemos hablar de MBR de membrana sumergida o MBR con recirculación. Los primeros se denominan así porque en ellos la unidad de membrana está inmersa en el tanque biológico (Figura 11); son los más empleados por la aparición de membranas poliméricas menos costosas y más resistentes, junto con los requerimientos de presión menores (Adham y col., 2001).

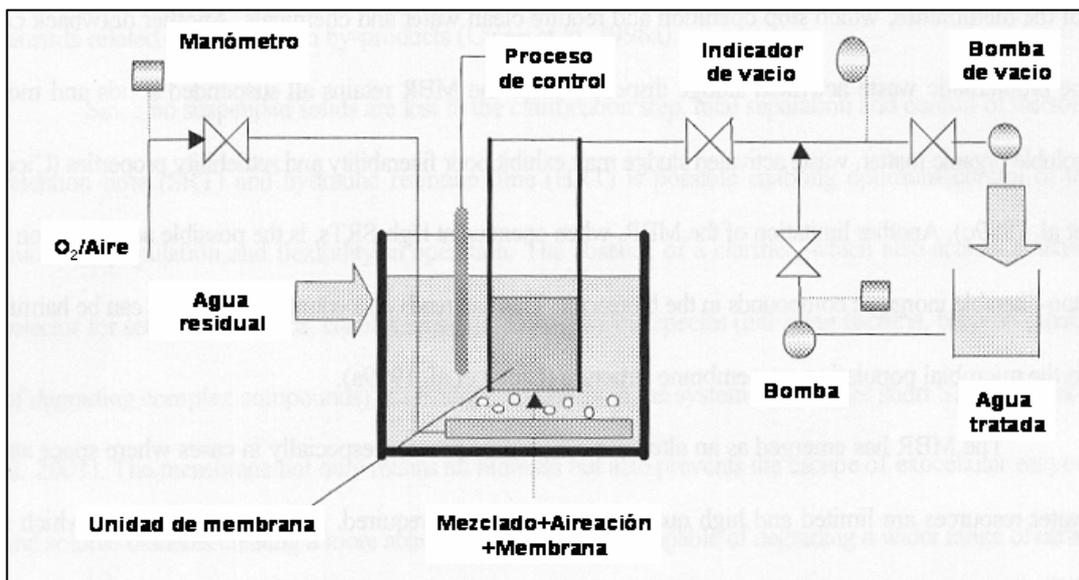


Figura 11. Esquema de un biorreactor de membrana sumergida. La fuerza impulsora a través de la membrana es alcanzada presurizando el biorreactor o creando presión negativa en el lado permeado de la membrana (Buisson y col., 1998; Cote et al. 1997; Rosemberger et al. 2002).

El rendimiento de los biorreactores depende tanto de la actividad desnitrificante de las bacterias como de su capacidad para formar biopelículas. El principal problema de la desnitrificación biológica es la contaminación potencial del agua tratada con bacterias, con fuente de carbono residual (desnitrificación heterótrofa) y la posibilidad de formación de nitritos, lo cual hace necesario un post-tratamiento. Pero hay que destacar que prácticamente la totalidad de los sistemas de biorremediación desarrollados se basan en la desnitrificación heterótrofa, habiendo un gran vacío en el conocimiento y desarrollo de la desnitrificación autótrofa. Los desnitrificantes autótrofos utilizan el dióxido de carbono como fuente de carbono y el hidrógeno o los compuestos reducidos de azufre como donantes de electrones. Son empleados en los llamados bioelectrorreactores (BERs), con bastantes ventajas que serán comentadas más adelante.

En relación con los MBR basados en procesos de desnitrificación heterótrofa, en los últimos años se están empleando unidades de membrana formadas por polihidroxialcanoatos (PHAs) y polímeros biodegradables relacionados. Éstos, además de constituir la matriz sólida para la formación de biopelículas, presentan la ventaja adicional de servir como aporte constante de poder reductor para el proceso de desnitrificación, mejorando la calidad del agua depurada al reducir el contenido residual en sustratos carbonados. La mayoría de los microorganismos desnitrificantes degradadores de PHA pertenecen a la clase *Betaproteobacteria* (Hiraishi y Khan, 2003).

***Relación con otros ciclos biogeoquímicos: Eliminación de fósforo y azufre**

En condiciones normales de un medio acuático, el fósforo constituye un factor limitante para la proliferación de algas en el mismo (Kortstee y col., 1994). Sin embargo, en los últimos años las descargas de fósforo procedentes de actividades agrícolas, industriales y domésticas ha llegado a constituir un problema medioambiental importante, similar al que representan los nitratos. Como consecuencia, la eliminación de fósforo se está convirtiendo en un tratamiento estándar en las plantas de purificación de aguas residuales.

La descontaminación biológica de fósforo es el más común de los métodos utilizados. Se basa en el enriquecimiento de las aguas a depurar en los llamados organismos acumuladores de

polifosfatos (PAOs), los cuales eliminan fósforo en las zonas anaerobias y lo almacenan como polifosfato en la aerobia, de donde es descartada la biomasa (Toerien y col., 1990). Recientemente, se ha demostrado que existen microorganismos que no sólo bajo condiciones aerobias forman gránulos de polifosfatos, sino también cuando el nitrato es el aceptor terminal de electrones (Egly y Zehnder, 1994; Jorgensen y Pauli, 1995; Barker y Dold, 1996; Barak y van Rijn, 2000). Estos microorganismos, los dPAOs u organismos desnitrificantes acumuladores de polifosfatos, constituyen una herramienta poderosa en los tratamientos biológicos de depuración de aguas, al permitir combinar en un sólo paso la eliminación de nitrato y fósforo. Es el caso concreto de *Paracoccus denitrificans*, que permite el diseño de biorreactores donde no exista la necesidad de alternar fases de aerobiosis y anaerobiosis (Barak y van Rijn, 2000).

Por otra parte, como ya se ha mencionado anteriormente, existen microorganismos desnitrificantes autótrofos, capaces de emplear compuestos reducidos de azufre como donantes de electrones. En los tratamientos de depuración, las ventajas de utilización de estos microorganismos son obvias; por un lado el proceso es más económico ya que no requiere adición de ningún suplemento carbonado y, por otro, se producen menos sedimentos (Claus y Kutzner, 1985; Flere, 1997; Flere y Zhang, 1999; Koenig and Liu, 2004). El agua resultante es química y bacteriológicamente segura.

Entre los sistemas más novedosos de biorremediación basada en la desnitrificación se encuentran unos reactores tubulares especiales, dotados de un ánodo, donde se produce la oxidación microbiana de acetato y como consecuencia se generan electrones, y de un cátodo, en el cual los microorganismos realizan un proceso de desnitrificación completo, usando esos electrones donados del ánodo. Se produce de forma simultánea la eliminación de un sustrato carbonado y una desnitrificación completa sin necesidad de un aporte externo de poder reductor (Clauwaert y col., 2007). Existe una versión autótrofa de este sistema (Tan y col., 2006), en el cual los microorganismos desnitrificantes son inmovilizados mediante alcohol polivinílico en un cátodo fabricado con carbón activado. En este caso el hidrógeno es el donante de electrones.

Objetivos

II. OBJETIVOS

El Grupo de Investigación “Exopolisacáridos Microbianos” (CVI 188), de la Universidad de Granada, desarrolla actualmente su trabajo en las siguientes líneas de investigación:

- Biodiversidad, estructura y dinámica de ambientes hipersalinos.
- Taxonomía y filogenia de bacterias halófilas.
- Caracterización molecular de genes en especies del género *Halomonas*.
- Análisis de exopolisacáridos de interés biotecnológico producidos por bacterias halófilas.
- Estudio de los sistemas de comunicación intercelular tipo *Quorum sensing*, mediado por moléculas autoinductoras del tipo N-acilhomoserin lactonas.

En los últimos años se han estudiado distintos hábitats hipersalinos, describiéndose como resultado seis nuevas especies de microorganismos halófilos productores de exopolisacáridos: *Halomonas almeriensis*, *H. anticariensis*, *H. ventosae*, *Idiomarina fontislapidosi*, *I. ramblicola*, *Ateromonas hispanica*, y dos nuevos géneros, cuyas especies tipo son *Salipiger mucosus* y *Palleronia marismenoris* (Martínez-Cánovas y col., 2004a, c, d y e; Martínez-Checa y col., 2005a, b y c). Asimismo, la exploración de esos ambientes nos ha permitido disponer de una amplia colección de cepas, muchas de las cuales aún no han sido caracterizadas.

Con la descripción de *Halomonas ventosae* ya eran cuatro las especies desnitrificantes pertenecientes al género *Halomonas*, de acuerdo con la información bibliográfica disponible en el momento de iniciarse este trabajo. Las tres bacterias restantes eran *H. campisalis* (Mormile y col., 1999), *H. desiderata* (Berendes, 1996) y *H. halodenitrificans* (Robinson y Gibbons, 1952; Dobson y Franzmann, 1996). A pesar de que *Halomonas* es quizás el género más ampliamente representado en los medios hipersalinos, nos encontramos con un reducido número de miembros de este taxón descritos como desnitrificantes.

Así, considerando que los miembros de *Halomonas*, por su extensa distribución deben participar activamente en el proceso global de desnitrificación, se planteó como principal objetivo de esta Tesis Doctoral, el siguiente:

“Estudiar la diversidad de las especies desnitrificantes del género *Halomonas*, desde un punto de vista fenotípico, filogenético, fisiológico y ecológico”

Para dar cumplimiento al mismo, se establecieron los siguientes objetivos parciales:

- I. Selección e identificación mediante taxonomía polifásica de nuevas cepas desnitrificantes.**

- II. Análisis de la relación filogenética entre dichas cepas y las especies desnitrificantes del género *Halomonas* válidamente publicadas, por medio del gen del ARNr 16S y de los genes codificantes de enzimas claves en el proceso de desnitrificación.**

- III. Estudio de la diversidad fisiológica de la desnitrificación utilizando diferentes fuentes de carbono.**

- IV. Análisis mediante técnicas moleculares de la distribución ecológica de la población desnitrificante de *Halomonas*.**

Capítulo I:

Selección de microorganismos

RESUMEN

Durante los últimos años, nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo la exploración de distintos hábitats hipersalinos, lo que nos ha permitido disponer de una amplia colección de cepas. Con objeto de seleccionar aquellas capaces de desnitrificar, esos microorganismos se sometieron al test de respiración sobre nitratos y nitritos de Callies y Mannheim (1978) con modificaciones de Stanier y col. (1966). Asimismo, también se incluyó en este estudio la cepa tipo de *Halomonas alimentaria* DSM 15356^T (Yoon y col., 2002), especie que había quedado fuera del análisis fenotípico realizado por Mata y col. en el año 2002 a todas las especies del género *Halomonas* válidamente publicadas por aquel entonces.

En función de los resultados del citado test, se seleccionan doce cepas con capacidad desnitrificante y tres más que respiran sobre nitratos. Por otra parte, también queda constatado que *Halomonas alimentaria* es una especie desnitrificante, al respirar sobre nitrato y nitrito en anaerobiosis y generar gran cantidad de gas en este proceso respiratorio.

SUMMARY

We have studied several hypersaline habitats for the last years. As a result, we gathered a wide bacteria collection, many of them were still uncharacterized. With the aim of selecting the bacteria able to denitrify among them, we did a preliminary phenotypic test: Callies and Mannheim's test with Stanier's modifications (Stanier *et al.*, 1966). This test consisted on growing the bacterium into Weimberg tube under anaerobic conditions, with nitrate or nitrite as sole electron acceptor. Growth was indicative of its ability to respire on nitrate or nitrite, respectively, and gas production was related to nitrogen oxides formation as intermediates in a denitrifying process. We used phenol red as indicator of pH in the medium, avoiding a false positive result by a fermentative metabolism (growth in anaerobic conditions and sometimes gas formation).

We also tested the denitrifying ability in the type strain of *Halomonas alimentaria* (DSM 15356^T), in whose description we could read its capacity of growing under anaerobic conditions but not which conditions were (sort of acceptors, for instance).

On the basis of positive results in Stanier's test, we selected twelve strains able to denitrify and other three ones able to respire on nitrate but unable to do a complete denitrification process. We also got a positive result with *Halomonas alimentaria*, so it would be considered as a denitrifying species and included in the subsequent studies.

III. SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS

III.1. MATERIAL Y MÉTODOS

Como ya se ha mencionado anteriormente, las especies de *Halomonas* incluidas en el presente trabajo fueron aquéllas que en el momento de iniciarse el estudio eran descritas como desnitrificantes en su referencia original. Se recogen en la Tabla 7.

Tabla 7. Especies de *Halomonas* válidamente publicadas y descritas como desnitrificantes.

Especie	Origen	Referencia
<i>H. campisalis</i> ATCC 700597 ^T	Sedimento de Alkali Lake (Washington, USA)	Mormile y col., 1999
<i>H. desiderata</i> DSM 9502 ^T	Planta de tratamiento de aguas residuales (Gotingen, Alemania)	Berendes, 1996
<i>H. halodenitrificans</i> ATCC 13511 ^T	Salmueras de curación de carnes	Robinson y Gibbons, 1952; Dobson y Franzmann, 1996
<i>H. ventosae</i> CECT 5797 ^T	Suelos salinos en Jaen (Sureste de España)	Martinez-Canovas y col., 2004a

Aparte de ellas, y tal y como se ha señalado en los objetivos, hemos incluido **otras cepas procedentes de nuestra colección de cultivo** (Martinez-Canovas, M.J. 2002; Ruiz-Garcia, 2003), beneficiada en los últimos años también con microorganismos cedidos por los Dres. Dimitri Sorokin de la TU Delft (Holanda) y Bernardo Prado, de la Universidad Federico Sta. María (Chile). Asimismo, los criterios aplicados para esta selección se hicieron extensibles a *Halomonas alimentaria* (Yoon y col., 2002), la única especie por entonces del género *Halomonas* que había quedado fuera del estudio fenotípico realizado por Mata y col. (2002), y en cuya descripción original se mencionaba su capacidad para crecer en anaerobiosis pero no bajo qué condiciones (respiración, y en su caso tipo de aceptor alternativo al oxígeno, o fermentación).

III.1.1. Criterios de inclusión de cepas procedentes de nuestra colección de cultivo

La selección de las cepas desnitrificantes se basó en la positividad del test diseñado por Callies y Mannheim (1978) que se modificó según Stanier y col. (1966). El resultado positivo viene dado por el crecimiento con nitrato y nitrito como aceptores finales de electrones y por la producción de gas (Figura 12). También se incluyeron en los estudios posteriores aquellas cepas que sólo respiraban sobre nitrato aunque no llevaran a cabo los siguientes pasos de un proceso de desnitrificación completo; esta capacidad se vería reflejada en la prueba por crecimiento sin producción de gas.

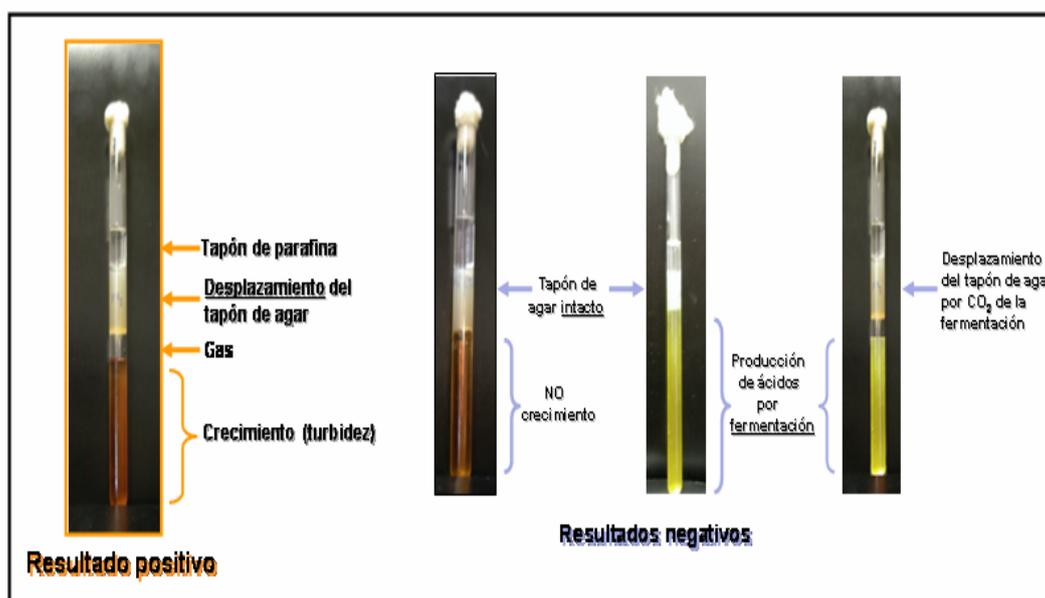


Figura 12. Resultado positivo y negativos en la prueba de respiración sobre nitratos/nitritos

El medio de cultivo base se distribuyó en tubos Weimberg. Se ajustó el pH a 7-7,2 y se esterilizó en autoclave a 112°C durante 30 minutos. Su composición se detalla en el cuadro de la página siguiente.

Prueba de respiración sobre nitratos y nitritos
(Stanier y col., 1966)

Glicerol (Panreac [®]).....	1,0g
Extracto de levadura (Difco [®]).....	0,3g
Proteosa-peptona n°3 (Difco [®]).....	0,5g
Nitrato potásico (Merck [®]).....	1g
(nitrito potásico -Merck [®] -, en su caso).....	0,01g
Rojo fenol al 0,04% (p/v) (sol. acuosa).....	2,0 ml
Solución de sales ^a al 7,5% (p/v) c.s.p.....	100ml

^a. La concentración salina se ajustó a partir de un stock al 30% (p/v), conocido como Sales de Subow (Rodríguez-Valera y col., 1981), con la misma proporción de sales que el agua de mar. Véase apartado III.1.2.

El preinóculo se realizó en el medio descrito anteriormente, adicionado del mismo porcentaje de nitrato o nitrito -dependiendo de la prueba-. Siguiendo las recomendaciones de Stanier y col. (1966), la incubación del preinóculo se hizo en aerobiosis pero sin agitación, ya que ésta favorece la difusión del oxígeno en el medio y, podría, por tanto, reprimir la síntesis de alguna de las enzimas desnitrificantes (Cavigelli y Robertson, 2000).

Tras 24 horas se tomó una muestra con una pipeta Pasteur estéril y se inoculó el fondo de un tubo Weimberg previamente regenerado (15 minutos a ebullición y enfriamiento rápido en hielo). Procediendo con rapidez, se selló el tubo con agar estéril al 2% (p/v) a sobrefusión, formando un tapón de unos dos centímetros; finalmente se añadió parafina, también estéril.

Los tubos se incubaron a 32°C durante 15 días, efectuándose lecturas diarias para detectar si existía crecimiento sin producción de ácidos, lo que indicaba que se había producido una respiración. Asimismo, se anotó la existencia de gases, observada por el desplazamiento del tapón de agar.

Por otra parte, las cepas seleccionadas mediante el criterio anterior se sometieron a una segunda criba para escoger aquéllas que presentaran semejanza con el género *Halomonas* y otros relacionados. Se realizó una batería de pruebas fenotípicas básicas (tinción de Gram, tipo de

metabolismo, crecimiento óptimo de temperatura, pH y concentración de sales), descritas con todo detalle en el apartado IV.1.A.1. de esta memoria.

III.1.2. Conservación de los microorganismos

La conservación de las cepas para uso cotidiano se hizo a una temperatura de 20°C en medio sólido MY (Moraine y Rogovin, 1966; Quesada y col., 1993) al 7,5% (p/v) de sales (Rodríguez-Valera y col., 1981). El pH se ajustó a 7-7,2, salvo cuando el medio iba destinado a la conservación de *Halomonas campisalis* y *H. desiderata*, con los cuales el pH se elevó a 8-8,5. La descripción del medio MY, así como la de la mezcla de sales se describe en los cuadros inferiores.

Medio MY modificado (Moraine y Rogovin, 1966; Quesada y col., 1993)		Sales de Subow al 30% (p/v) (Rodríguez-Valera y col., 1981)	
Glucosa (Panreac®).....	1,0g	NaCl (Panreac®).....	234,0 g
Extracto de levadura (Difco®).....	0,3g	MgCl ₂ ·6H ₂ O (Merck®).....	41,6g
Proteosa-peptona n°3 (Difco®).....	0,5g	MgSO ₄ ·7H ₂ O (Merck®).....	59,8g
Extracto de malta (Panreac®).....	0,3g	CaCl ₂ ·2H ₂ O (Merck®).....	1,1g
Solución de sales al 7,5% (p/v) c.s.p.	100ml	KCl (Merck®).....	6,0g
		NaHCO ₃ (Merck®).....	0,2g
		NaBr (Merck®).....	0,7g
		Solución 0,5% (p/v) de FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,65ml
		H ₂ O destilada c.s.p.....	1000ml

Para la conservación a largo plazo, los microorganismos en cultivos líquidos del mismo medio se mantuvieron congelados a -80°C. Como crioprotector se empleó dimetil sulfóxido a una concentración del 20% (v/v).

III.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.2.1. *Halomonas alimentaria* como especie desnitrificante

De acuerdo a los criterios expuestos en el apartado III.1.1. de Material y Métodos, *Halomonas alimentaria* (Yoon y col., 2002) puede ser considerada como especie desnitrificante, al observarse abundante crecimiento en el medio descrito y producción de gases, que desplazaron el tapón de agar. La cepa tipo de dicha especie, DSM 15356^T, fue aislada de una comida fermentada de origen marino, tradicional de Corea (Yoon y col., 2002).

III.2.2. Cepas de nuestra colección de cultivo con capacidad desnitrificante

De acuerdo a los criterios descritos en el apartado III.1.1., las cepas seleccionadas por su capacidad desnitrificante para los estudios posteriores fueron las que a continuación se indican en la Tabla 8:

Tabla 8. Nombre y procedencia de las cepas de nuestra colección de cultivo, seleccionadas por su capacidad desnitrificante.

Cepa	Procedencia
11S	Salina solar en Montemar (Viña del Mar, Chile)
4CR	Suelo hipersalino de Fuente de Piedra (Málaga, España)
5CR	“
15CR	“
A113	Barranco de la salina (Jaén, España)
C8	Sedimentos de salinas solares de Cahuil (Chile) (Figura 15)
F15	Suelo hipersalino de Fuente de Piedra (Málaga, España)
HGD1	Lago haloalcalino en la estepa de Altai (Siberia, Rusia)
HGDK1	Lago haloalcalino en la estepa de Altai (Siberia, Rusia)
N64	Salinas del Sabinar (Almería, España) (Figura 14)
R53	Salinas de Rambla Salada (Murcia, España) (Figura 13)
SP4	Salinas de Santa Pola (Alicante, España)

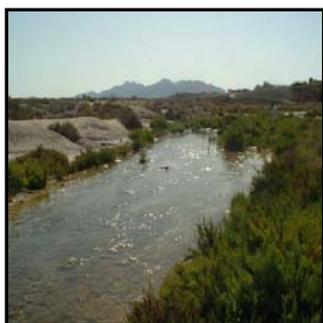


Figura 13. Rambla salada (Murcia).

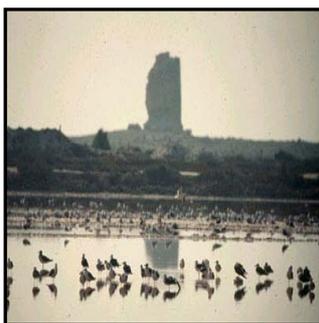


Figura 14. Salinas del Sabinar (Almería).



Figura 15. Salinas de Cahuil, (Laguna de Cahuil, Chile).

III.2.3. Cepas de nuestra colección de cultivo que respiran sobre nitratos

Como se mencionó en Material y Métodos, también se incluyeron en el trabajo las cepas que respiraban sobre nitratos aunque no fueran capaces de realizar un proceso de desnitrificación. La reducción de nitrato a nitrito, tanto si ésta continúa hacia la formación sucesiva de otras especies gaseosas (caso de la desnitrificación) como si no, es el primer paso de la ruta de reducción desasimilatoria de nitrato y es común en ambos casos (Zumft, 1997). La inclusión de estas cepas representa un objetivo secundario en la Tesis, no recogido en los principales (Apartado II), que nos permite en los estudios posteriores comprobar las posibles diferencias fenotípicas, genotípicas y filogenéticas que puedan existir con los microorganismos desnitrificantes, determinando finalmente si el proceso de desnitrificación no tenía lugar en esas cepas, porque no existía la maquinaria molecular, o bien no era realizado en las condiciones ensayadas.

Tabla 9. Nombre y procedencia de las cepas de nuestra colección de cultivo, seleccionadas por respirar sobre nitratos.

Cepa	Procedencia
12CR	Suelo de Fuente de Piedra (Málaga)
F5	“
S19	Salinas de Asilah (Marruecos)

Estas tres cepas serán destacadas en las Tablas de esta memoria sombreadas en gris, con objeto de facilitar en todo momento su distinción de los microorganismos desnitrificantes.

Capítulo II:

Caracterización taxonómica de nuevas cepas desnitrificantes

RESUMEN

En este capítulo se recogen todos los aspectos relacionados con la caracterización taxonómica completa de las cepas seleccionadas mediante los criterios expuestos en el apartado III.

Hoy día, la clasificación adecuada de un microorganismo requiere un estudio polifásico del mismo (Vandamme y col., 1996; Stackebrandt y col., 2002; [Uilenberg](#) y col., 2004). Así, en las cepas ya mencionadas realizamos diferentes análisis fenotípicos, genéticos, filogenéticos y quimiotaxonómicos.

Para el estudio fenotípico las pruebas realizadas se seleccionaron de acuerdo con la presente edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2004) y fueron modificadas para el estudio de microorganismos halófilos siguiendo los criterios empleados por Mata y colaboradores (2002), en la caracterización fenotípica de las especies tipo del género *Halomonas*.

La filogenia de estos nuevos aislados la establecimos en base a la secuencia del gen ARNr 16S, que en la actualidad es la herramienta molecular más comúnmente empleada para suministrar una relación evolutiva fiable (Ludwig y Schleifer, 1999; Ludwig & Klenk, 2001).

El estudio genético abarcó, por un lado, la determinación del contenido en G+C del ADN genómico, mediante el método gráfico descrito por Ferragut y Leclerc (1976). Por otro, entre las cepas seleccionadas y las especies de *Halomonas* filogenéticamente muy próximas, realizamos experiencias de hibridación ADN-ADN, siguiendo la técnica de Lind y Ursing (1986), con las modificaciones de Ziemke y col. (1998) y Bouchotroch y col. (2001).

Por último, se determinó también el contenido en ácidos grasos y quinonas respiratorias, en todas aquellas cepas desnitrificantes candidatas a ser nuevas especies del género *Halomonas*.

Como resultado de este estudio hemos descrito dos nuevas especies desnitrificantes pertenecientes al género *Halomonas*: *Halomonas cerina* (González-Domenech y col., 2007) y *H. nitratireducens* (González-Domenech y col., bajo revisión). Ambas descripciones han seguido fielmente los criterios mínimos recomendados para la identificación de miembros de la familia *Halomonadaceae* (Arahal y col., 2007 en prensa).

SUMMARY

After selecting twelve strains able to denitrify and other three ones with the capacity of respiring on nitrate, we intended to characterise these strains, before going deeply in other aspects related to the denitrifying process or nitrate dissimilatory respiration.

Following the current trend in Bacterial Taxonomy to classify prokaryotes, the study was done combining several methods: Phenotypics, genotypics, phylogenetics and chemotaxonomics (Vandamme *et al.*, 1996; Stackebrandt *et al.*, 2002; Uilenberg *et al.*, 2004).

The procedures described by Mata *et al.* (2002) were followed to performe the phenotypic study.

We achieved the phylogenetic analysis by sequencing of 16rRNA gene, which remains being considered as the backbone for prokaryotics systematics ((Ludwig and Schleifer, 1999; Ludwig and Klenk, 2001).

The information on the G+C content of the DNA was estimated by the midpoint value (T_m), using the graphic method from Ferragut and Leclerc (1976). We complemented the genetic study doing DNA-DNA hybridizations; so this aim, we followed the Lind and Ursing's methods (1986) with the modifications of Ziemke *et al.* (1998) and Bouchotroch *et al.* (2001).

Fatty acids and quinones were identified by high-resolution GLC and HPLC respectively, in the Identification Service of DSMZ, Braunschweig, Germany. We have done this analysis just with the strains which could be new species of the genus *Halomonas* in the base of the latter studies.

Finally, as results of all these studies, we have already described two new species of *Halomonas*: *Halomonas cerina* (González-Domenech *et al.*, 2007) y *H. nitratireducens* (González-Domenech *et al.*, under revision).

IV. CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE NUEVAS CEPAS DESNITRIFICANTES

IV.1. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

Las pruebas realizadas se seleccionaron de acuerdo con la presente edición del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2004) y fueron modificadas para el estudio de microorganismos halófilos siguiendo los criterios empleados por Mata y colaboradores (2002) en la caracterización fenotípica de las especies tipo del género *Halomonas*.

IV.1.1.1. Pruebas morfológicas, culturales, fisiológicas, bioquímicas, nutricionales y de susceptibilidad a diversos antimicrobianos

a) Pruebas morfológicas y culturales

Se resumen a continuación todas las experiencias realizadas en este apartado:

- Tinción de Gram
- Movilidad
- Tinción de flagelos
- Tinción de esporas
- Tinción de PHA
- Características culturales
- Producción de piocianina y fluoresceína

Tinción de Gram

Se siguió la técnica usual, utilizándose un cultivo de 24 horas del microorganismo en medio MY sólido (Moraine y Rogovin, 1966; Quesada y col., 1993) al 7,5% (p/v) de sales (Rodríguez-Valera y col., 1981). Al mismo tiempo se estudió la morfología y el tamaño, valiéndonos de un micrómetro graduado con el que se midió la longitud y anchura de las células bacterianas. También se observó la tendencia a la formación de asociaciones celulares y la capacidad de las células de teñirse de forma homogénea.

Movilidad

Se observó por el método de la gota pendiente. Para ello se sembraron los microorganismos en medio MY al 7,5% (p/v) sólido, distribuido en tubos; a las 24 horas de incubación se añadió a cada tubo 2 ml de solución de sales al 7,5% (p/v) y, pasadas aproximadamente 2 horas, se observó al microscopio óptico la suspensión resultante, depositada en la cavidad de un porta excavado sobre el que se sitúa un cubreobjetos.

Tinción de flagelos

Para cada uno de los microorganismos que dieron positiva la prueba de la movilidad se realizó un cultivo en medio MY líquido, que se incubó 24 horas a 32°C y en reposo, para evitar la fragmentación de los flagelos. La suspensión bacteriana, adherida a una microceldilla metálica, fue teñida con acetato de uranilo al 4% (p/v), como parte del procedimiento requerido para realizar una tinción negativa.

El equipo empleado en la observación fue un Microscopio Electrónico de Transmisión C. ZEISS EM 10C (30µm de apertura de objetivo y 80 kV de voltaje de aceleración). Tanto la preparación de la muestra como el posterior análisis y captura de la imagen fue llevada a cabo en las secciones de Microscopía y Tratamiento de la Imagen, respectivamente, del Centro de Instrumentación Científica, de la Universidad de Granada.

Tinción de esporas

Se siguió el método de Schaeffer y Fulton (1933). Así, el primer colorante, una solución acuosa de verde malaquita al 5% (p/v), se dejó actuar en frío durante un minuto, tiempo tras el cual se calentó a emisión de vapores de diez a quince minutos. Para el calentamiento se empleó la Platina de Koch y sobre la extensión del microorganismo se depositó un pequeño trozo de papel de filtro para evitar la desecación y precipitación del colorante sobre la misma. Posteriormente, se lavó de forma profusa con agua y, a continuación, se adicionó como coloración de contraste una solución acuosa de safranina al 0,5% (p/v).

Para la tinción se empleó un cultivo en medio sólido de unos 5 a 7 días. Para los casos dudosos se cultivó el microorganismo en el medio de Norris y colaboradores (1981), modificado convenientemente; en el cuadro adyacente se describe la composición ajustada:

Medio de Norris y col. (1981)	
Peptona (Panreac®).....	5,0g
Extracto de levadura (Panreac®).....	3,0g
Agar (Panreac®).....	15,0g
MnSO ₄ ·H ₂ O (Merck®).....	0,005g
Solución de sales al 7,5% (p/v) c.s.p.	1000ml

Tinción de PHA

La tinción se llevó a cabo tal y como describen Stanier y colaboradores (1966), empleando Sudán negro, de preparación reciente y previamente filtrado. Este colorante

Sudán negro	
Sudán negro B (Merck®).....	0,3g
Alcohol etílico 70% (v/v) c.s.p..	100ml

se dejó sobre la preparación durante aproximadamente 15 minutos. A continuación, se desechó el exceso y se realizó un lavado con xilol. Tras secar la preparación, se tiñó durante 10 segundos con safranina como coloración de contraste, y se lavó finalmente con agua.

Características culturales

Se observó la morfología colonial de cada cepa en cuanto a tamaño, forma, consistencia y borde, en medio MY sólido al 7,5% (p/v) de sales, utilizando un cultivo de dos o tres días. Por su parte, la pigmentación de las colonias se anotó tras incubar ese mismo cultivo durante una semana.

También se observó el tipo de crecimiento en medio MY líquido a las 24 horas de incubación.

Producción de piocianina y fluoresceína

Se sembraron las cepas en los medios King A® (para piocianina) y King B® (para fluoresceína), en los que se manifiesta la producción de esos pigmentos. Se describe en la página siguiente la composición de estos medios deshidratados, ambos de Oxoid®, que fue modificada para adaptarla al estudio de microorganismos halófilos. La observación de fluorescencia por

producción de fluoresceína, requiere que el cultivo del microorganismo se sitúe bajo una lámpara de luz ultravioleta.

Agar King A (Oxoid®)
(King y col., 1954)

Peptona de carne.....	10,0g
Peptona de caseína.....	10,0g
K ₂ PO ₄	1,5g
MgSO ₄	1,5g
Agar.....	15,0g
Solución de sales al 7,5% (p/v) c.s.p.	1000ml

Agar King B (Oxoid®)
(King y col., 1954)

Peptona	20,0g
MgCl ₂	1,4g
MgSO ₄	10,0g
Agar.....	15,0g
Solución de sales al 7,5% (p/v) c.s.p.	1000ml

b) Pruebas fisiológicas

Para todas ellas se partió de un cultivo de 24 horas a 32°C en medio MY líquido al 7,5% (p/v). Tomando inóculos de 20 µl de cada cepa, se sembraron cuatro microorganismos distintos por placa.

En este apartado se estudió lo siguiente:

- Crecimiento a distintas concentraciones de sal
- Crecimiento a distintas temperaturas
- Crecimiento a distintos márgenes de pH
- Crecimiento en anaerobiosis
- Resistencia al calentamiento

Crecimiento a distintas concentraciones de sal

Se utilizó el medio MY a las concentraciones de sales totales de 0; 0,5; 1; 3; 5; 7,5; 10; 15; 20; 25 y 30% (p/v). Se incubaron a 32°C durante una semana, realizándose lecturas periódicas a las 24 horas y durante los días 2, 5 y 7.

Esta propiedad fue también estudiada con adición de los mismos porcentajes pero de NaCl al medio MY.

Crecimiento a distintas temperaturas

Las temperaturas ensayadas fueron 4, 15, 20, 25, 32, 37 y 45°C.

Crecimiento a distintos márgenes de pH

Se utilizaron los valores de pH de 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

Para la realización de estas dos últimas pruebas se siguió la misma metodología que para el estudio del crecimiento a distintas concentraciones de sal; los microorganismos se sembraron en placas de medio MY sólido al 7,5% (p/v). Tras un periodo máximo de incubación de una semana se observó si había existido o no crecimiento aparente.

Crecimiento en anaerobiosis

Las placas de medio MY sólido al 7,5% (p/v), sembradas con cuatro microorganismos distintos, se incubaron durante 7 días en jarras de anaerobiosis comercializadas por OXOID®. Para crear un ambiente exento de oxígeno se empleó el Sistema Anaeróbico en bolsita AnaeroGen™, de la misma casa comercial que las jarras. Paralelamente se realizó un control en aerobiosis del mismo inóculo y medio.

Resistencia al calentamiento

Se estudió a partir de cultivos en MY líquido, incubados durante 24 horas a 32°C. La resistencia se evaluó en dos condiciones, para lo cual se tomaron tres alícuotas de cada cultivo. Una para el calentamiento a 65°C, que se mantuvo durante 30 minutos (Liu y col., 2004), tiempo tras el que se sembró en MY 7,5% (p/v) sólido; otra para 80°C, temperatura a la que permanecieron durante 10 minutos, transcurridos los cuales se procedió de igual forma. Finalmente, la tercera alícuota se sembró directamente sin calentar en MY 7,5% (p/v) sólido.

c) Pruebas bioquímicas

Estas pruebas se sembraron a partir de un inóculo de 24 horas en medio MY líquido al 7,5% (p/v), con excepción de las pruebas catalasa y oxidasa que se realizaron con un cultivo de 18-24 horas en el medio MY sólido al 7,5% de sales (p/v). En todas las actividades estudiadas, se utilizó un blanco (prueba sin sembrar), así como un control positivo y otro negativo.

Fueron analizadas las siguientes actividades:

- | | |
|--|---|
| -Catalasa | -Rojo de metilo |
| -Oxidasa | -Voges-Proskauer |
| -Producción de ácidos a partir de
carbohidratos | -Reducción de selenito |
| -Prueba de óxido-fermentación de
la glucosa | -Oxidación de gluconato |
| -Respiración sobre fumarato | -Crecimiento en agar Mac Conkey |
| -Producción de H ₂ S | -Crecimiento en agar cetrimida |
| -Reducción de nitratos y nitritos | -Hemolisis en agar sangre |
| -Producción de indol | -Hidrólisis de la esculina |
| -ONPG | -Hidrólisis de la tirosina y
formación de pigmento |
| -Producción de ureasa | -Hidrólisis de la gelatina |
| -Fenilalanina desaminasa | -Hidrólisis del almidón |
| -Producción de lecitinasa | -Hidrólisis de Tween 20 y 80 |
| -Producción de DNasa | -Producción de fosfatasa |
| | -Hidrólisis de caseína |

Catalasa

Para la realización de esta prueba se adicionó agua oxigenada de 10 volúmenes directamente a un cultivo joven. La aparición de burbujeo indicó la presencia de oxígeno y, por tanto, la presencia de la enzima.

Oxidasa

Para detectar la enzima citocromo C oxidasa se realizó la extensión de un cultivo joven de cada microorganismo sobre un papel de filtro y rápidamente se depositó una gota de solución acuosa de N, N, N',N'- tetrametil-*p*-fenilendiamina al 1% (p/v) (Sigma®). Se dio como positiva la prueba si aparecía un intenso color azul violeta antes de 30 segundos, correspondiente a las formas oxidadas del reactivo (Kovacs, 1956).

Producción de ácidos a partir de carbohidratos

Se siguió la metodología de Leifson (1963), modificada posteriormente para microorganismos halófilos por Ventosa y colaboradores (1982). Así, al medio de cultivo descrito a continuación se le añadió cada azúcar ensayado a una concentración del 1% (p/v), se ajustó el pH a 7,2, se repartió en tubos de hemolisis y se calentó en el autoclave de vapor a 100°C durante 30 minutos. El proceso se repitió dos veces con un intervalo de incubación a 32°C durante 24 horas. La esterilización se llevó a cabo por vapor fluente para evitar la hidrólisis de los azúcares.

Medio de cultivo para producción de ácidos
(Ventosa y col., 1982)

Extracto de levadura (Difco®).....	10,0g
Proteosa-peptona n°3 (Difco®).....	5,0g
Rojo fenol al 0,04% (p/v) (sol. acuosa).	20ml
Solución de sales al 7,5% (p/v) c.s.p.	1000ml

Carbohidratos ensayados (Sigma®)

Adonitol	D-manosa
D-celobiosa	D-melecitosa
D-fructosa	L-ramnosa
D-galactosa	Sacarosa
D-glucosa	D-salicina
<i>mio</i> -inositol	L-sorbosa
Lactosa	D-sorbitol
D-manitol	D-trehalosa
Maltosa	

Los microorganismos se incubaron a 32°C durante una semana, efectuándose lecturas diarias y anotándose la producción de ácidos por el viraje del indicador a amarillo. La observación cada día de los tubos es fundamental para evitar falsos resultados negativos debidos al reviraje del indicador con el tiempo.

Prueba de oxido-fermentación de la glucosa

Se utilizó el mismo medio base que en la prueba anterior, adicionado de un 1% (p/v) de glucosa y distribuido en tubos Weimberg. La bacteria se inoculó en profundidad utilizando una pipeta Pasteur, en el medio previamente regenerado. Rápidamente se cubrió con agar estéril al 2% (p/v) calentado a sobrefusión, formando un tapón de unos dos centímetros, finalmente se añadió parafina estéril.

Los tubos se incubaron a 32°C durante una semana efectuándose lecturas diarias para detectar si la glucosa era transformada en ácidos en ausencia de oxígeno.

Respiración sobre fumarato

Basándonos en la metodología de Callies y Mannheim (1978) y utilizando también el mismo medio que en las pruebas anteriores, se añadió fumarato potásico (Merck®) a una concentración del 0,08% (p/v). Los tubos fueron inoculados de forma semejante a como lo hicimos en la prueba de oxido-fermentación; tras la inoculación se cubrió con un tapón de agar y parafina. Los tubos se incubaron a 32°C durante 15 días, observándolos diariamente.

La prueba se consideró positiva cuando aparecía crecimiento en el tubo sin producción de ácidos, lo que indicaba que se había producido una respiración. Se anotó también la producción de gas, que se evidencia por el desplazamiento del tapón de agar.

Producción de H₂S

El medio descrito en este apartado se ajustó a pH 7-7,2 y se distribuyó en tubos de hemolisis. Se esterilizó a 112°C durante 30 minutos.

Después de inocular los microorganismos, se colocó en la boca de cada tubo y sujeta por el tapón de algodón una tira de papel de filtro de 3x0,5 cm, impregnada en una solución saturada de acetato de plomo.

Los tubos se incubaron a 32°C durante una semana y se anotaron como positivos aquellos casos en que se produjo ennegrecimiento de la tira de papel por la formación de sulfuro de plomo.

Medio de cultivo para producción de H₂S (Clarke, 1953)	
Extracto de levadura (Difco®).....	10,0g
Proteosa-peptona nº3 (Difco®).....	5,0g
L-cistina (Sigma®).....	0,1g
Glucosa (Panreac®).....	1,0g
Solución de sales al 7,5% (p/v) c.s.p...	1000ml

Todos los pasos seguidos responden a la metodología descrita por Clarke (1953).

Reducción de nitratos y nitritos

En este ensayo se detectan la actividad nitrato y nitrito reductasa. Se realiza en aerobiosis a diferencia de la prueba de respiración sobre estos compuestos, ya explicada en el apartado III.1.1. del Capítulo I.

Se sigue el método propuesto por Skerman en 1967. El medio descrito a continuación se ajustó a un pH de 7-7,2, se distribuyó en tubos de hemolisis con campanita Durham y se esterilizó en autoclave a 112°C durante 30 minutos.

Medio de cultivo para reducción de nitrato

Extracto de levadura (Difco®).....	10,0g
Proteosa-peptona n°3 (Difco®).....	5,0g
Glucosa (Panreac®).....	1,0g
Nitrato potásico (Panreac®).....	1,0g
Solución de sales al 7,5% (p/v) c.s.p...	1000ml

Tras 5 días de incubación a 32°C se procedió a la lectura, observándose en primer lugar la presencia o ausencia de gas en el interior de la campanita. A continuación, se adicionaron los reactivos de nitratos: 1 ml de la solución A y otro de la B a cada tubo. La aparición de un color rojo intenso indica la presencia de nitritos en el medio.

Reactivos de detección de nitritos en el medio (Skerman, 1967)

<p>Reactivo A: Solución al 0,8% (p/v) de ácido sulfanílico en ácido acético 5 N.</p> <p>Reactivo B: Solución al 0,5% (p/v) de α-naftilamina en ácido acético 5 N.</p>

En los casos negativos se añadió a cada tubo granalla de zinc (aproximadamente 5 mg/ml); la aparición de un color rojo indicó que aún existían nitratos en el medio, con lo cual la prueba era dada como negativa. Por el contrario, la ausencia de color rojo mostraba que no había

nitratos en el medio, por haber pasado inicialmente a nitritos y éstos haberse reducido nuevamente hasta dinitrógeno gas u otras especies gaseosas intermedias. En este caso el microorganismo reducía no sólo los nitratos, sino también los nitritos; la formación de dinitrógeno era evidenciada por la aparición de una burbuja en el interior de la campanita.

Producción de indol

Se siguieron las directrices de Kovacs (1928), preparándose previamente el medio de cultivo que se describe a continuación:

Medio de cultivo para producción de indol

Proteosa-peptona n°3 (Difco®).....	5,0g
Glucosa (Panreac®).....	1,0g
Solución de sales al 7,5% (p/v) c.s.p...	1000ml

El medio se esterilizó en autoclave a 112°C durante 30 minutos, una vez ajustado el pH al mismo valor que en las pruebas anteriores y haberlo distribuido en tubos de hemolisis. Posteriormente, se sembraron los tubos y se incubaron durante 48 horas a 32°C.

Para la lectura se añadieron 0,5 ml del reactivo de Kovacs a cada tubo, cuya composición se recoge a continuación

Reactivo de Kovacs (Kovacs, 1928)

<i>p</i> -dimetilaminobenzaldehido (Merck®).....	5,0g
HCl concentrado (Panreac®).....	75ml
Alcohol amílico (Panreac®).....	25ml
Preparación: Se disolvió el aldehido en alcohol por calentamiento suave en baño María, se dejó enfriar y, finalmente, se añadió el ácido.	

La prueba se dio como positiva con la aparición de un anillo de color rojo en la superficie del medio que indicaba la presencia de indol, y con ello la existencia de actividad triptofanasa.

Rojo de metilo

Esta prueba y la siguiente determinan los tipos de fermentación producidos por los microorganismos: Ácido-mixta y butanodiólica. En ambas se utilizó el medio de Barrit (1936)

adaptado para microorganismos halófilos (Mata y col., 2002). En la prueba de rojo de metilo se detectan los ácidos producidos en la fermentación ácido-mixta.

Medio de cultivo para detección de fermentación ácido mixta
(Ventosa y col., 1982)

Extracto de levadura(Difco®).....	10g
Proteosa-peptona nº3 (Difco®).....	5g
Glucosa (Panreac®).....	5g
NaCl (Panreac®).....	75g
KCl (Panreac®).....	2g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O (Merck®)	0,2g
FeCl ₃ x 3 H ₂ O (Probus®).....	trazas
K ₂ HPO ₄ (Merck®).....	5g
Agua destilada c.s.p.....	1000ml

El pH del medio se ajustó a 7-7,2 y se esterilizó en autoclave como en los casos anteriores, tras repartir en tubos de hemolisis. Después de 48 horas de incubación a 32°C se realizó la lectura mediante la adición de unas gotas de solución de rojo de metilo.

Solución de rojo de metilo (Barritt, 1936)

Rojo de metilo (Merck®).....	0,4g
Etanol (Probus®).....	400ml
Agua destilada c.s.p.....	1000ml

La aparición de un color rojo indicó la positividad de la prueba, es decir, la presencia de ácidos resultantes de la fermentación ácido-mixta. La coloración naranja se dio como dudosa.

Voges-Proskauer

El método seguido se debe también a Barritt (1936), con las modificaciones para microorganismos halófilos de Ventosa y col. (1982). Se utilizó el mismo medio que el de la prueba del rojo de metilo, pretendiendo en este caso detectar la presencia de acetoina, procedente de la fermentación butanodiólica. Para ello, después de la incubación durante 48 horas a 32°C, se añadió a cada tubo 0,6 ml de la solución de α -naftol al 5% (p/v) en etanol y 0,2 ml de KOH al 40% (p/v) en agua. Un color rojo intenso en la superficie del tubo indicó que la prueba era positiva. Los casos negativos se volvieron a observar, tras incubarlos a 32°C durante 30 minutos.

Reducción de selenito

Se utilizó el medio base siguiente, descrito por Lapage y Bascomb (1968) y adaptado a microorganismos halófilos:

Medio base para la reducción de selenito

Extracto de levadura(Difco [®]).....	10,0g
Proteosa-peptona n°3 (Difco [®]).....	5,0g
Manitol (Sigma [®]).....	4,0g
NaCl (Panreac [®]).....	74,5g
KCl (Panreac [®]).....	1,5g
MgSO ₄ (Panreac [®])	0,2g
Na ₂ HPO ₄ (Merck [®]).....	4,3g
Agua destilada c.s.p.....	1000ml

Se ajustó el pH a 7-7,2 y se esterilizó a 112°C durante 30 minutos. Una vez estéril se añadió a cada 99 ml de este medio de cultivo, 1 ml de selenito ácido de sodio (Merck[®]) al 40% (p/v) en agua previamente esterilizada y se distribuyó en tubos de hemolisis estériles.

La aparición de un precipitado rojo ladrillo tras una incubación durante 15 días a 32°C daría la prueba como positiva.

Oxidación de gluconato

Se siguió el método de Shaw y Clarke (1955), también adaptado a microorganismos halófilos. Al medio de cultivo que se describe en este apartado se le ajustó el pH al mismo valor que los otros y se esterilizó en autoclave a 112°C durante 30 minutos, después de repartir en tubos de hemolisis. Tras dos días de incubación a 32°C se procedió a la lectura mediante la adición de 1 ml de reactivo de Benedicto por cada 5 ml de cultivo y tras mezclar, se hirvió durante 10 minutos. La formación de un precipitado color ocre, naranja o pardo constituye una reacción positiva.

Medio de cultivo para oxidación de gluconato
(Shaw y Clarke, 1955)

Extracto de levadura (Difco®)...	10,0g
Proteosa-peptona nº3 (Difco®).	5,0g
Gluconato potásico (Sigma®)...	40,0g
NaCl (Panreac®).....	74,5g
KCl (Panreac®).....	1,5g
MgSO ₄ (Panreac®)	0,2g
K ₂ HPO ₄ (Panreac®).....	4,3g
Agua destilada c.s.p.....	1000ml

Solución de Benedicto

Citrato sódico (Sigma®).....	17,3g
Na ₂ CO ₃ anhidro (Panreac®).....	10,0g
CuSO ₄ x 5H ₂ O (Panreac®).....	1,7g
Agua destilada c.s.p.....	100ml
Preparación: Se disolvió el citrato y el carbonato en 60 ml de agua y el sulfato de cobre en 20 ml de agua y esta segunda solución se agregó a la primera con agitación constante.	

ONPG

Mediante este test se detectaron algunos fermentadores de lactosa que en medios ordinarios tardan varios días en producir ácidos o incluso no llegan a producirlos.

La prueba se realizó según Lowe (1962). Se preparó una solución de ONPG (*O*-nitrofenil-β-D-galactopiranosido) disolviendo 6 g por cada 1000 ml de Na₂HPO₄ 0,01 M (Panreac®); 250 ml de esta solución esterilizada por filtración se añadieron a 750 ml del medio base descrito a continuación, ya estéril y con el pH ajustado a 7-7,2:

Una vez mezclado el medio se repartió en tubos de hemolisis estériles. Tras 24 horas de incubación a 32°C la actividad β-galactosidasa se puso de manifiesto por la aparición de un color amarillo debido a la aparición del *O*-nitrofenol.

Medio base para la prueba ONPG

Extracto de levadura (Difco®).....	10,0g
Proteosa-peptona nº3 (Difco®).....	5,0g
Solución de sales al 7,5% (p/v) c.s.p....	1000ml

Producción de ureasa

Se utilizó el medio Christensen (1946), que es comercializado por Scharlau® como polvo deshidratado; fue reconstituido en solución de sales al 7,0% (p/v), puesto que el medio ya contenía un 0,5% de NaCl. Después de esterilizar en el autoclave, se añadieron 50 ml por cada 950 ml de medio de una solución de urea (Merck®) al 40% (p/v), esterilizada por filtración.

Medio de Christensen (Scharlau®)
(Christensen, 1946)

Peptona.....	1,0g
Dextrosa.....	1,0g
NaCl.....	5,0g
KH ₂ PO ₄	2,0g
Rojo fenol.....	0,012g
Agar.....	15,0g
Solución de sales al 7,0% (p/v) c.s.p.	1000ml

Fenilalanina desaminasa

Para el estudio de esta actividad se utilizó un medio deshidratado comercializado por Difco®, cuya composición se describe en el siguiente cuadro.

Este medio, al igual que en el caso anterior, se reconstituyó en 1000 ml de solución de sales al 7,0% (p/v). Se reparte en tubos de hemolisis que se esterilizan, y se disponen en pico de flauta.

Posteriormente se repartió en tubos de hemolisis estériles que se inclinaron en pico de flauta. Tras la incubación a 32°C durante 7 días se observó la hidrólisis de la urea por el viraje del indicador a color rosa.

Extracto de levadura.....	3,0g
NaCl.....	5,0g
HPO ₄	1,0g
D,L-fenilalanina.....	2,0g
Agar.....	12,0g
Solución de sales al 7,0% (p/v) c.s.p..	1000ml

Se sembraron los microorganismos, y tras la incubación durante 24 horas a 32°C se añadieron 0,2 ml de una solución de FeCl₃ (Probus®) al 10% (p/v). La aparición de un color verde en la superficie del medio indicó la presencia de ácido fenilpirúvico, considerando la prueba como positiva. Esta forma de proceder responde a la metodología descrita por Ewing y col. en 1957.

Crecimiento en agar Mac Conkey

En este caso también se empleó un medio deshidratado (de la casa comercial ADSA®), que se reconstituyó en solución de sales al 7,0% (p/v).

Se disolvieron 52,5 g del medio en 1000 ml de solución de sales al 7,0% (p/v), y se distribuyó en placas petri. Se inocularon los microorganismos y se observó el crecimiento tras una semana de incubación a 32°C. Esta prueba permite ver el crecimiento del microorganismo en presencia de sales biliares.

Extracto de peptona.....	20,0g
Lactosa.....	10,0g
Sales biliares.....	2,5g
NaCl.....	5,0g
Agar.....	15,0g
Rojo neutro.....	0,05g
Cristal violeta.....	0,001g
Solución de sales al 7,0% (p/v) c.s.p.....	1000ml

Crecimiento en agar cetrimida

Se utilizó el medio deshidratado comercializado por Difco[®], cuya composición se indica en el cuadro adyacente. Como se puede observar el medio contiene cetrimida, que por sus propiedades detergentes actúa inhibiendo el crecimiento de la mayoría de microorganismos con excepción de *Pseudomonas aeruginosa* y otros Gram negativos no fermentadores.

Agar Cetrimida (Difco[®])

Peptona	20,0g
MgCl ₂	1,4g
K ₂ SO ₄	10,0g
Cetrimida (bromuro de cetiltrimetilamonio).....	0,3g
Agar.....	13,6g
Solución de sales al 7,5% (p/v) c.s.p.	1000ml

El agar cetrimida es una modificación del medio diseñado por King y col. (1954) para potenciar la producción de pirocianina y fluoresceína por las especies de *Pseudomonas* (información técnica de la USP).

Se inocularon los microorganismos y se incubaron a 32°C durante 7 días. Se observó el crecimiento durante este periodo.

Hemolisis en agar sangre

El medio MY sólido se preparó al 5% (p/v) de sales; en este caso, el porcentaje de sales se redujo para evitar la lisis de los glóbulos rojos por choque osmótico. No obstante, la concentración salina seguía encontrándose dentro del intervalo óptimo de crecimiento de todas las cepas. Tras esterilizar y enfriar el medio a unos 50-60°C, se le añadió sangre asépticamente en una proporción del 5% (v/v); se mezcló y se distribuyó en placas petri.

El ensayo se realizó por duplicado; cada microorganismo fue sembrado en dos placas, una preparada tal cual se ha explicado anteriormente y otra, en la que al medio MY se le había suprimido la glucosa. Esta estrategia para potenciar la actividad hemolítica, sigue las recomendaciones de Fuller y Maxted, (1939).

Tras dos días de incubación, en ambos casos a 32°C, se observó la actividad hemolítica por la aparición de un halo transparente (hemolisis total) o verdoso (hemolisis parcial) alrededor del crecimiento. La lectura de la prueba no debería posponerse en el tiempo, puesto que el alto contenido en sales puede producir la lisis de los glóbulos rojos.

Hidrólisis de la esculina

Se siguió la metodología descrita en el Manual de Cowan y Steel's (1993). Al medio MY al 7,5% (p/v) sólido se le añadió esculina al 0,1% (p/v) y citrato férrico al 0,05% (p/v).

Los microorganismos una vez inoculados, fueron incubados a 32°C. Durante 7 días se examinaron las placas diariamente para observar un ennegrecimiento sobre y alrededor del crecimiento bacteriano, lo que indica la hidrólisis de la esculina, y formación de esculetina que, con el Fe³⁺ del medio da un complejo fenólico de color negro (Koneman y col., 1983).

Hidrólisis de la tirosina y formación de pigmento

Se realizó según el método de Gordon y Smith (1955). Al medio MY al 7,5% (p/v) sólido se añadió tirosina al 0,5% (p/v); se mezcló bien y se esterilizó a 112°C durante 30 minutos; se distribuyó en placas petri asegurándonos que la tirosina se distribuye uniformemente, puesto que es una sustancia insoluble.

Las placas inoculadas se incubaron a 32°C. Durante un período de 7 días se observó la hidrólisis de este compuesto por la disolución de los cristales debajo y alrededor del crecimiento bacteriano. Se observó también la aparición de color sobre y alrededor de la extensión, lo que indica la formación de pigmento.

Hidrólisis de la gelatina

Se siguió el método de Frazier (1926), modificado en placa, utilizándose el medio MY al 7,5% (p/v) sólido al cual se le añadió gelatina al 1% (p/v) (Sneath y Collins, 1974). Se esterilizó en autoclave durante 30 minutos a 112°C, como viene siendo habitual, tras ajustar el pH a 7-7,2.

Se inocularon los microorganismos y se incubaron a 32°C durante 7 días. Al cabo de este tiempo se inundó la placa con el reactivo de Frazier. Una zona de aclaramiento alrededor del crecimiento bacteriano indicó que la gelatina estaba hidrolizada en la zona próxima al crecimiento.

Reactivo de Frazier
(Frazier, 1926)

Cloruro de mercurio (Sigma®).	12,0g
HCl concentrado (Panreac®).	16ml
Agua destilada c.s.p.....	80ml
Preparación: Se mezcló el cloruro mercúrico con el agua y a continuación se añadió el ácido agitándose hasta completa disolución.	

Hidrólisis de almidón

Se utilizó el medio MY al 7,5% (p/v) sólido al que se le suprimió la glucosa, adicionándole en su defecto almidón al 1% (p/v) (Cowan y Steel, 1993). Se esterilizó a 112°C durante 30 minutos. Se inocularon las placas y se incubaron a 32°C durante 7 días. La lectura se realizó inundando la placa con lugol.

Solución de lugol
(Cowan y Steel, 1993)

I ₂ (Panreac®).....	3,0g
KI (Panreac®).....	6,0g
Agua destilada c.s.p.....	1000ml
Preparación: Se mezclaron todos los reactivos. La mezcla se dejó reposar durante 24 horas y se filtró.	

El medio toma color azul allí donde existe almidón sin hidrolizar. La hidrólisis se observa por la aparición de halos sin teñir alrededor de la extensión del microorganismo que posee amilasa.

Hidrólisis de Tween 20 y 80

Se siguió el método de Sierra (1957) para el estudio de la actividad lipolítica. El Tween se esterilizó por separado mediante calor seco y se añadió al medio MY al 7,5% (p/v) sólido y esterilizado previamente en autoclave (112°C, 30 minutos) hasta una concentración final del 1% (p/v). Se ensayaron los dos derivados del polioxietilén sorbitan, Tween 20 y 80 (Sigma®).

Se inocularon los microorganismos y se incubaron a 32°C durante 15 días, tras los cuales

se observó, en los casos positivos, la aparición de un halo opaco alrededor del crecimiento bacteriano debido a la precipitación de la sal cálcica del ácido liberado.

Producción de lecitinasa

De acuerdo con la metodología de Larpent y Larpent-Gourgand (1957), se preparó por un lado, una emulsión estéril de yema de huevo recogiénola asepticamente en 250 ml de solución salina estéril. De otra parte, se preparó como viene siendo habitual el medio MY al 7,5% (p/v) sólido; se esterilizó y una vez que se enfrió a 45-50°C, se adicionaron, en condiciones también asepticas, 10 ml de la emulsión de yema estéril por cada 90 ml de medio MY. Se distribuyó en placas petri.

Tras la incubación a 32°C durante una semana, se observó en los casos positivos la opalescencia en el medio, alrededor de las colonias y zonas de crecimiento. Cuando la actividad lecitinasa se acompañaba de propiedades lipolíticas, se forma una capa superficial de coloración perlada sobre la masa bacteriana.

Producción de DNasa

Se utilizó el medio deshidratado DNasa Agar (ADSA[®]), que se reconstituyó en solución de sales al 7,0% (p/v). Su composición se puede observar en el cuadro inferior.

Agar DNasa (ADSA[®])

Triptona	20,0g
ADN.....	2,0g
NaCl.....	5,0g
Agar.....	13,6g
Solución de sales al 7,0% (p/v) c.s.p..	1000ml

Se disolvieron 42 g del medio deshidratado en un litro de solución de sales al 7,0% (p/v), y se esterilizó durante 30 minutos a 112°C. Los microorganismos se incubaron durante una semana a 32°C.

Para la lectura se vertió HCl 1N (Panreac[®]) sobre la placa, el cual precipita el ADN confiriendo más opacidad al medio. En los microorganismos productores de la enzima aparece un halo más claro alrededor del crecimiento microbiano (Jeffries y col., 1957).

Producción de fosfatasa

Al medio MY al 7,5% (p/v) sólido, esterilizado en autoclave a 112°C durante 30 minutos, se le añadió una solución acuosa de difosfato de fenolftaleína al 1% (p/v) (Sigma[®]), previamente esterilizada por filtración, hasta una concentración final del 0,01% (p/v), y se repartió en placas.

Las placas una vez inoculadas se incubaron a 32°C durante 5 días, tras lo cual se llevó a cabo la lectura adicionando sobre la placa una solución de amoníaco concentrado (Panreac[®]). La aparición de un color rosa sobre y alrededor del crecimiento bacteriano indica la liberación de la fenolftaleína, que con el amonio toma color rosado (Baird-Parker, 1963).

Hidrólisis de la caseína

Se siguió el método modificado de Hastings (1903, 1904): A 500 ml de leche desnatada se le añadió el mismo volumen del medio MY al 7,5% (p/v) sólido y elaborado a doble concentración en todos sus componentes; tanto la leche como el medio deben estar previamente estériles y enfriados a unos 55-60°C. Posteriormente, la mezcla resultante se repartió en placas.

Después de inocular los microorganismos, las placas se incubaron a 32°C durante 7 días. En la lectura se observaron halos de aclaramiento alrededor de la extensión del microorganismo, cuando la prueba era positiva. Para los casos dudosos, se utilizó el reactivo de Frazier (Frazier, 1926); si la zona de aclaramiento decrecía tras la adición del mismo, era indicativo de que la caseína no había sido digerida totalmente (Cowan y Steel, 1993).

d) Pruebas nutricionales

Se estudió el empleo de diversos **carbohidratos**, **alcoholes** y **ácidos orgánicos** como única fuente de carbono y energía. Asimismo, se ensayaron varios **aminoácidos** con la anterior finalidad pero también con la de estudiar la capacidad de los microorganismos para usarlos como único aporte de nitrógeno.

Utilización de carbohidratos, alcoholes y ácidos como única fuente de carbono y energía

Para los estudios nutricionales se siguió la técnica de Koser (1923), modificada por Ventosa y colaboradores (1982), utilizando un medio base de sales cuya composición es la siguiente:

Medio de Koser
Koser (1923)

NaCl (Panreac [®])	75,0g
KCl (Merck [®]).....	2,0g
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Merck [®]).....	0,2g
KNO ₃ (Merck [®]).....	1,0g
(NH ₄) ₂ HPO ₄ (Panreac [®]).....	1,0g
KH ₂ PO ₄ (Panreac [®]).....	0,5g
Agua destilada c.s.p.....	1000ml

El sustrato ensayado se adicionó al medio hasta la concentración final adecuada. Para los carbohidratos se empleó una concentración de 0,2% (p/v) y en el caso de los alcoholes y ácidos orgánicos del 0,1% (p/v). Se repartió en tubos de hemolisis y se esterilizó en el autoclave de vapor a la temperatura de ebullición del agua durante 30 minutos. El proceso se repitió dos veces con un intervalo de 24 horas, durante el cual los tubos se incubaron a 32°C. La esterilización se realizó a vapor fluyente para evitar la hidrólisis de los sustratos ensayados en el medio definido.

Los sustratos ensayados como única fuente de carbono y energía fueron los incluidos en la Tabla 9:

Tabla 9. Sustratos ensayados como única fuente de carbono y energía.

Carbohidratos (Sigma®)		Ácidos (Sigma®)	Alcoholes (Sigma®)
Almidón	D-manosa	Acetato	Adonitol
L-arabinosa	D-salicina	Citrato	Etanol
D-celobiosa	D-trehalosa	Formiato	DL-glicerol
Esculina		Fumarato	<i>mio</i> -inositol
D-fructosa		D-gluconato	D-manitol
D-galactosa		DL-lactato	D-sorbitol
D-glucosa		Malonato	
Lactosa		Propionato	
Maltosa		Succinato	

Para la siembra de todas las pruebas nutricionales se utilizó un cultivo de 24 horas en el medio MY al 7,5 % (p/v) líquido que, posteriormente, se sembró en medio Koser sin sustrato durante 24 horas, utilizando éste como inóculo para la prueba. Este paso previo se realizó para asegurar la utilización del sustrato añadido como único aporte de carbono y energía. Los sustratos se incubaron a 32°C durante siete días.

Es imprescindible para la lectura contar con un tubo control sin sustrato para cada microorganismo, que se inocula al mismo tiempo que el resto de las pruebas. También es importante utilizar un control positivo que constituye un tubo de MY al 7,5% (p/v) líquido. Se dieron como positivos los casos en que apareció una turbidez manifiesta.

Utilización de aminoácidos como única fuente de carbono, nitrógeno y energía

Se empleó el mismo medio anterior al que se eliminó el KNO_3 y el $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, este último sustituyéndolo por la sal sódica.

Los aminoácidos, en concentración 0,1% (p/v), se adicionaron por filtración después de haber esterilizado el medio base.

Tabla 10. Aminoácidos utilizados como única fuente de carbono, nitrógeno y energía.

Aminoácidos (Sigma [®])	
DL-alanina	L-lisina
L-cisteína	L-metionina
L-histidina	L-serina
iso-leucina	L-valina

e) Pruebas de susceptibilidad a diversos antimicrobianos

Para el estudio de la sensibilidad frente a agentes antimicrobianos se siguió la técnica de Bauer y colaboradores (1966), empleando el medio MY sólido al 7,5% (p/v). Se utilizaron discos de 6 mm de diámetro (Sensi-disc, BBL).

Como inóculo se utilizó una suspensión del microorganismo en solución salina ajustada al número 0,5 de la escala de MacFarland. La lectura se realizó a las 24 horas de incubación a 32°C midiendo la zona de inhibición del crecimiento y el microorganismo se clasificó como resistente, sensible o intermedio de acuerdo con Barrit y Thornsberry (1980).

Los antibióticos estreptomomicina, kanamicina y tobramicina se ensayaron en placas con 2% de sales (p/v), ya que se inactivan a concentraciones mayores de sales (Coronado y col., 1995).

Se abarcó un amplio abanico de agentes antimicrobianos, escogiendo al menos un representante de cada uno de los grupos químicos.

Tabla 11. Antimicrobianos ensayados, con sus concentraciones especificadas.

Antimicrobianos (OXOID®)	
<u>Aminoglicósidos:</u>	<u>Nitrofuranos:</u>
Gentamicina (10µg)	Nitrofurantoina (300 UI)
Tobramicina (10µg)	<u>Polipéptidos:</u>
<u>β-Lactámicos:</u>	Polimixina B (300 UI)
<u>Penicilinas:</u>	<u>Quinolonas:</u>
A: Amoxicilina (20µg)+ Ácido clavulánico (10µg)	Ácido nalidíxico (30µg)
Ampicilina (10µg)	Norfloxacino (5µg)
G: Penicilina (10 UI)	<u>Rifamicinas:</u>
<u>Cefalosporinas:</u>	Rifampicina (30µg)
Aztreonam (30µg)	<u>Sulfamidas:</u>
I: Cefalotina (30µg)	Sulfamida (250 µg)
II: Cefoxitina (30µg)	Trimetoprim (1,25µg) +Sulfametoxazol (23,75µg)
III: Ceftazidima (30µg)	<u>Tetraciclinas:</u>
<u>Glicopéptidos:</u>	Doxiciclina (30 UI)
Vancomicina (30µg)	

IV.1.1.2. Taxonomía numérica

A partir de los resultados de las pruebas morfológicas, culturales, fisiológicas, bioquímicas, nutricionales y de susceptibilidad a antimicrobianos, se realizó un análisis numérico para determinar la semejanza de las bacterias objeto de estudio, entre ellas y con respecto a las de referencia. En las pruebas bioquímicas se incluyeron también los resultados de la respiración sobre nitrato y nitrito, expuestos en el Capítulo I, que determinaron la selección de los microorganismos.

Las cepas tipo listadas en la Tabla 10 (página siguiente) fueron las incluidas como referente en el análisis numérico, pues de ellas se poseía la caracterización fenotípica completa (Mata y col., 2002; Martínez-Canovas y col., 2004 a y c; Martínez-Checa y col., 2005), realizada en las mismas condiciones que las usadas en este estudio.

Este análisis numérico se llevó a cabo gracias al programa TAXAN (Information resource group, Maryland Biotechnology Institute, University of Maryland, College Park, HT 20742, USA). La codificación de las pruebas para el cálculo estadístico se realizó dando el valor 1 a las pruebas positivas y 0 a las negativas. Las pruebas en las cuales la comparación no era factible, bien porque

resultaran dudosas o bien porque no se poseyera el dato, se codificaron como 9.

La valoración de los datos para obtener el grado de semejanza entre las distintas unidades taxonómicas operativas (OTU's), se realizó empleando el coeficiente de Sokal y Michener (S_{SM}), de apareamiento simple, el más idóneo para este tipo de estudio (Quesada y col., 1983; Del Moral y col., 1987). Los resultados obtenidos con dicho coeficiente de semejanza se sometieron a un análisis de agrupación según la técnica UPGMA (Unweighted Pair Group Mean Average) o de acoplamiento promedio binario contrapesado, obteniéndose el correspondiente coeficiente de correlación cofenética (Sneath y Sokal, 1973).

Tabla 12. Especies del género *Halomonas*, válidamente publicadas hasta la fecha e incluidas como referencia en el estudio fenotípico.

Especie	Referencia
<i>Halomonas alimentaria</i> DSM 15356 ^T *	Yoon y col., 2002
<i>Halomonas almeriensis</i> CECT 7050 ^T	Martinez-Checa y col., 2005
<i>Halomonas anticariensis</i> CECT 5854 ^T	Martinez-Canovas y col., 2004
<i>Halomonas aquamarina</i> CECT 5000 ^T	ZoBell y Upham, 1944; Dobson y Franzmann, 1996
<i>Halomonas campisalis</i> ATCC 700597 ^T	Mormile y col., 1999
<i>Halomonas cupida</i> ATCC 27124 ^T	Baumann y col., 1972; Dobson y Franzmann, 1996
<i>Halomonas desiderata</i> DSM 9502 ^T	Berendes, 1996
<i>Halomonas elongata</i> ATCC 33173 ^T	Vreeland y col., 1980
<i>Halomonas eurihalina</i> ATCC 49336 ^T	Quesada y col., 1990; Mellado y col., 1995
<i>Halomonas halmophila</i> ATCC 19717 ^T	Elazari-Volcani, 1940; Dobson y col., 1990
<i>Halomonas halodenitrificans</i> ATCC 13511 ^T	Dobson y Franzmann, 1996
<i>Halomonas halodurans</i> ATCC 29686 ^T	Hebert y Vreeland, 1987
<i>Halomonas halophila</i> ATCC 49969 ^T	Quesada y col., 1984; Dobson y Franzmann, 1996
<i>Halomonas magadiensis</i> DSM 15367 ^T	Duckworth y col., 2000
<i>Halomonas marisflavi</i> DSM 15357 ^T	Yoon y col., 2001
<i>Halomonas maura</i> CECT 5298 ^T	Bouchotroch y col., 2001
<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425 ^T	James y col., 1990
<i>Halomonas pacifica</i> ATCC 27122 ^T	Baumann y col., 1972; Dobson y Franzmann, 1996
<i>Halomonas pantelleriensis</i> ATCC 700273 ^T	Romano y col., 1997
<i>Halomonas salina</i> ATCC 49509 ^T	Valderrama y col., 1991; Dobson y Franzmann, 1996
<i>Halomonas subglaciescola</i> ATCC 43668 ^T	Franzmann y col., 1987
<i>Halomonas variabilis</i> DSM 3051 ^T	Fendrich, 1989; Dobson y Franzmann, 1996
<i>Halomonas venusta</i> ATCC 27125 ^T	Baumann y col., 1972; Dobson y Franzmann, 1996
<i>Halomonas ventosae</i> CECT 5797 ^T	Martinez-Canovas y col., 2004

* La información aportada en su descripción original fue completada durante esta tesis doctoral.

Actualmente la situación taxonómica de *Halomonas variabilis* DSM 3051^T está siendo dilucidada por la Comisión Judicial en respuesta a un artículo de opinión remitido por Sorokin y Tindall (2006).

IV.1.1.3. Microscopía electrónica

Este estudio fue realizado en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Se utilizaron células en fase exponencial, las cuales se vertieron sobre una placa petri de 10 ml. En cada placa se sumergió un cubreobjetos con el fin de que las células se adhirieran a él, y se incubaron en reposo durante 48 horas a 32°C. Pasado el tiempo de incubación, las células adheridas al cristal se fijaron con una capa de poli-L-lisina durante una noche, a 4°C y en atmósfera saturada de vapor de glutaraldehído al 2,5% (p/v).

Posteriormente, las preparaciones se lavaron con cacodilato sódico 0,05M y se les añadió rojo de rutenio al 0,05% (p/v) durante 4 horas. Después, ya a temperatura ambiente, las células se deshidrataron con etanol en varias series (30, 50, 70, 90 y 100% v/v), cada una de 20 minutos de duración. Tras este proceso, se realizaron unas secciones ultrafinas con un ultramicrotomo Reichter Ultracut S, equipado con una cuchilla de diamante, recogándose en una rejilla de cobre.

Las secciones se tiñeron con acetato de uranilo (1% [p/v]) y citrato de plomo. Finalmente, las preparaciones se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión (Zeiss TEM EM 10C, 30µm de apertura de objetivo y 80 KV de voltaje de aceleración), ya empleado anteriormente para observar los flagelos de las bacterias.

IV.1.2. ESTUDIO GENOTÍPICO

IV.1.2.1. Extracción de ADN

La extracción del ADN se llevó a cabo por los dos métodos siguientes. En todos ellos se partió de un inóculo en fase logarítmica del microorganismo en medio MM al 7,5% (p/v) de sales (Argandoña y col., 2001). Se trata de un medio mínimo, en el que el crecimiento es óptimo pero la producción de exopolisacárido por parte de las bacterias está limitada, asegurando así una mayor eficacia en la extracción.

Medio MM (Argandoña y col., 2001)	
Proteosa-peptona nº3 (Difco®).....	2,0g
Extracto de levadura (Difco®).....	0,4g
Solución de sales al 7,5% (p/v) c.s.p.	1000ml

a) Método de Marmur (1961)

*Reactivos:

PBS

NaCl (Sigma®).....	17,53g
Na ₂ HPO ₄ (Sigma®).....	0,89g
KH ₂ PO ₄ (Sigma®).....	0,204g
Agua bidestilada c.s.p.....	1000ml

EDTA salino

EDTA (Sigma®).....	33,62g
NaCl (Sigma®).....	8,7g
Agua bidestilada c.s.p.....	1000ml

SSC 0,1x

Citrato sódico (Sigma®).....	0,4g
NaCl (Sigma®).....	0,08g
Agua bidestilada c.s.p.....	100ml

***Técnica:**

Es un método de extracción a gran escala. Se partió de un litro de cultivo en medio MM 7,5% (p/v) en fase logarítmica, el cual se centrifugó durante 10 minutos a 9000 r.p.m. Las células se lavaron un par de veces con PBS (pH 7,2), repitiéndose la centrifugación después de cada lavado.

Para llevar a cabo la lisis de las células, se resuspendieron en 100 ml de EDTA salino (pH 8) y se añadieron 10 mg de lisozima, dejándolas a 37°C durante 10 minutos.

Posteriormente, se adicionaron 10 ml de SDS (Sigma®) al 25% (p/v) y se incubó durante 10 minutos a 60°C o bien hasta que el lisado adquirió un aspecto semitransparente. Después, se añadieron 20 ml de perclorato sódico 5M, de modo que la mezcla tuviese una concentración 1M. A continuación, se realizó la desproteínización mediante la adición de un volumen igual de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Se incubó 30 minutos a 37°C y se centrifugó a 8000 r.p.m. durante 10 minutos, recuperándose la fase acuosa. Repetimos la desproteínización tantas veces como fue necesario hasta lograr un sobrenadante claro. Esta solución que contenía el ADN se precipitó con 2 volúmenes de alcohol etílico 96° conservado a -20°C. Se extrajeron las fibras de ADN enrollándolas en una varilla de vidrio fina. Seguidamente, el ADN se disolvió en solución salina citratada 0,1x (SSC 0,1x), cuando el ADN estaba destinado a la determinación del contenido en G+C, o bien en agua bidestilada, para su uso en todas las demás experiencias. En ambos casos se repartió en tubos de polipropileno que contenían 500µl cada uno.

Finalmente, el ADN se purificó tratando con 2µl de ARNasa A (Sigma®) (10mg/ml, en SSC 2x), durante 60 minutos a 37°C; transcurrido este tiempo se adicionaron 3µl de proteinasa K (20mg/ml) en las mismas condiciones. Se volvió a purificar con cloroformo-alcohol isoamílico y se precipitó nuevamente con alcohol etílico absoluto.

Por último, la muestra de ADN se disolvió en SSC 0,1x o en agua bidestilada como hemos explicado con anterioridad.

b) Extracción de ADN genómico usando el kit comercial “AquaPure Genomic DNA isolation kit” (Biorad®)

Es un método a pequeña escala, que se utiliza cuando se requiere ADN de gran pureza.

Se partió de un inóculo de 5 ml en medio MM. Después de centrifugar el cultivo se trataron las células con una solución de lisis, y posteriormente se adicionó ARNasa, incubándose durante 1 hora a 37°C. El paso siguiente fue la adición de una solución para precipitar las proteínas. Finalmente se obtuvo el ADN mediante precipitación con isopropanol y posterior disolución en el volumen adecuado de agua bidestilada. Todos los pasos seguidos se detallan en el protocolo facilitado por la casa comercial.

IV.1.2.2. Determinación de la concentración de ADN

La concentración de ADN de una solución se determinó utilizando un biofotómetro Eppendorf®, adoptando las recomendaciones del manual de Sambrook y Russell (2001). La absorbancia de la solución de ADN se determinó a 260 nm, frente a un blanco de agua bidestilada. La concentración de ADN de la muestra se expresa respecto al valor estándar de $A_{260}=1$ para soluciones con 50 µg de ADN de cadena doble. La pureza de la muestra viene dada por la relación A_{260}/A_{280} , de forma que un valor de esta relación por debajo de 1,8 fue indicativo de contaminación por proteínas, EPS y/o fenol.

IV.1.2.3. Determinación del contenido en G+C

Se utilizó el ADN disuelto en SSC 0,1x, extraído por el método de Marmur. El ensayo se hizo por triplicado.

El contenido en las bases guanina y citosina fue determinado a partir de la temperatura media de desnaturalización (T_m), mediante el método gráfico descrito por Ferragut y Leclerc (1976). Se empleó para ello el perfil de desnaturalización térmica (Marmur y Doty, 1962) dado por un espectrofotómetro Perkin-Elmer UV-Vis Lambda3B, a una longitud de onda de 260 nm. La

muestra se calentó desde 50°C hasta 110°C a una velocidad constante de 1°C/ minuto, mediante un programador de temperatura modelo PTP-1 (Perkin-Elmer®). La variación de la D.O. con la temperatura se recogió en un registrador modelo Waters 746 Data Module (Waters-Millipore®), a una velocidad constante de 1 cm/ minuto.

El porcentaje en G+C se obtuvo utilizando la ecuación de Owen y Pitcher (1985). Se escogió como referencia la temperatura media de desnaturalización de *Escherichia coli* NCTC 9001, 74,6°C en SSC 0,1x, y su porcentaje de G+C, 50,9 moles %.

Ecuación de Owen y Pitcher (1985)

$$\text{G+C moles \%} = 50,9 + 2,09 \times (T_m - 74,6)$$

IV.1.2. 4. Hibridación ADN-ADN

Se siguió la técnica descrita por Lind y Ursing (1986), con las modificaciones de Ziemke y col. (1998) y Bouchotroch y col. (2001). El proceso se desarrolló en cinco pasos:

- a) Marcaje del ADN
- b) Reacción de hibridación
- c) Separación de las cadenas simples y dobles
- d) Detección del ADN marcado
- e) Interpretación de los resultados

a) Marcaje del ADN

***Reactivos:**

Kit Nick Translation (Boehringer Mannheim®)

***Técnica:**

Se preparó una mezcla a partir de los nucleótidos independientes suministrados en el kit comercial. A dicha mezcla se le adicionó DIG-11-dUTP y biotin-16-dUTP, responsables del

marcaje del ADN de la cepa objeto de estudio. Los volúmenes empleados se detallan en el cuadro de la página siguiente:

En la reacción de marcaje se utilizaron 0,5µg de ADN, manteniéndose durante 90 minutos a 15°C, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, se llevó a cabo la precipitación del ADN con etanol durante toda la noche.

Mezcla de nucleótidos (Boehringer Mannheim®)	
dATP.....	3vol
dCTP.....	3vol
dGTP.....	3vol
dTTP.....	2vol
DIG-11-dUTP.....	1vol
Biotin-16-dUTP.....	0,25 vol

Finalmente, se resuspendió en 100µl de agua bidestilada estéril. Un microlitro de esta solución se utilizó para comprobar la eficiencia del marcaje mediante el protocolo de revelado que se describe seguidamente.

b) Reacción de hibridación

***Reactivos:**

PB1M (pH 6,8)

Na ₂ HPO ₄ 1M (Sigma®).....	142g/l
NaH ₂ PO ₄ 1M (Sigma®).....	120g/l

Preparación: Se prepararon por separado soluciones de cada uno de los compuestos y se adicionó al NaH₂PO₄ la otra solución hasta alcanzar el pH deseado de 6,8.

PB 0,4M

PB 1M	100ml
H ₂ O bidestilada estéril.....	150ml

PB 0,14M+0,2% SDS

PB 1M	35ml
H ₂ O bidestilada estéril.....	150ml
SDS (Sigma®) al 10%.....	1ml

Siempre que se haga mención al tampón 0,14 M se sobreentenderá que contiene un 0,2% de SDS.

La conservación de estos tampones hasta el momento de su uso se realizó a temperatura ambiente, una vez esterilizados en autoclave de vapor durante 30 minutos a 112°C.

***Técnica:**

Se llevó a cabo por una modificación del método de Lind y Ursing (1986). Así, se mezclaron de 9-12 μ l de ADN marcado con 15 μ g de ADN sin marcar en 72 μ l de agua bidestilada estéril. La mezcla se desnaturalizó a 100°C durante 10 minutos, pasándose rápidamente a hielo, donde se mantuvo 5 minutos. Transcurrido este tiempo y tras una breve centrifugación de algunos segundos, se le añadieron 28 μ l de tampón fosfato 1M. Finalmente, se cubrió con 50 μ l de aceite mineral para evitar la evaporación durante la incubación y se dejó durante 16 horas a la temperatura de hibridación que se consideró óptima en cada caso (T_m -20°C del ADN marcado).

e) Separación de las cadenas simples y dobles

***Reactivos:**

PBS (pH 7,2)

NaCl 0,3M (Sigma®).....	17,53g/l
Na ₂ HPO ₄ 5mM (Sigma®).....	0,71g/l
KH ₂ PO ₄ 1,5mM(Sigma®).....	0,204g/l

Coating buffer (pH 9,6)

Na ₂ CO ₃ 7,5mM (Sigma®).....	0,794g/l
NaHCO ₃ 15,5mM (Sigma®).....	1,302g/l
MgCl ₂ 1mM (Sigma®).....	0,203g/l

Una vez esterilizados los tampones de la manera que viene siendo habitual, se conservarán en el refrigerador durante un máximo de 15 días.

***Técnica:**

Tras la incubación se procedió a la separación de las cadenas simples y dobles de la mezcla a través de una matriz de hidroxiapatita, siguiendo el protocolo de Brenner y colaboradores (1969). Las eluciones se realizaron por duplicado.

Previamente a la elución, se hidrató la hidroxiapatita (DNA grade Bio-Gel HTP; Biorad®) con el mismo tampón fosfato 0,14 M con SDS al 0,2% (p/v); así, se disolvió 1g de la misma en 6 ml de tampón, se invirtió suavemente y se dejó decantar durante 20 minutos, descartando el sobrenadante. Este proceso se repitió dos veces. Finalmente la hidroxiapatita se disolvió en otros 6 ml, se hicieron alícuotas de 200 µl y se centrifugaron a 10,000 r.p.m. durante 30 segundos, quedándonos con el precipitado. La hidroxiapatita en tampón 0,14M retiene las cadenas dobles del ADN y a 0,4M las simples.

La mezcla de hibridación, una vez separada del aceite mineral, se diluyó a la mitad con agua bidestilada, de forma que la concentración final del tampón fuera 0,14M. A continuación, se añadieron 50 µl de esta dilución a una alícuota de hidroxiapatita. La preparación se mezcló suavemente, sin vortear y se incubó durante 15 minutos a 5°C por debajo de la temperatura usada para hibridar. Seguidamente, se centrifugó de nuevo a 10,000 r.p.m. durante medio minuto y el sobrenadante, conteniendo las cadenas simples, se pasó a un tubo limpio. De igual manera se procedió con otros dos lavados de 450 µl y 500 µl de tampón 0,14 M, para conseguir finalmente 1 ml de una dilución que habría de contener las cadenas simples. Posteriormente, se usó el tampón 0,4M para separar las cadenas dobles, realizando dos lavados de 0,2 ml, intercalados por una agitación vigorosa.

d) Detección del ADN marcado

A cada alícuota de cadenas simples y dobles del ADN se le añadió un 0,1% (p/v) de albúmina sérica bovina ó BSA (Sigma®) y se incubaron 200µl de las mismas en placas con estreptavidina (Boehringer-Mannheim®), a temperatura ambiente y en agitación. De forma previa, las cadenas dobles habrán sido desnaturalizadas. Durante las dos horas que se mantiene esta

incubación las cadenas marcadas se unen a los pocillos por medio de la biotina usada en la reacción de marcaje, la cual reacciona con la estreptavidina.

Transcurrido el tiempo de incubación, los pocillos se lavaron tres veces con 200µl de PBS (pH 7,2) y se incubaron una hora con otros 200µl del mismo tampón al que se le había añadido anticuerpos anti-Digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (1µl de anti-Digoxigenina disuelto en 5 ml de PBS -Boehringer Mannheim®-). Esta incubación, al igual que la anterior, se llevó a cabo a temperatura ambiente y en agitación, y una vez finalizada se realizaron tres lavados; los dos primeros nuevamente con 200µl de PBS (pH 7,2) y el último lavado con el mismo volumen pero de Coating Buffer.

La detección se realizó con 250µl de Coating Buffer conteniendo *p*-nitrofenilfosfato (disolver una tableta de *p*-nitrofenilfosfato -Sigma®- en 5-7 ml de Coating Buffer). Esta reacción se mantuvo a 37°C y sin agitación durante al menos media hora. Con ese reactivo, la enzima fosfatasa alcalina origina un producto de color amarillo, cuya intensidad, relacionada con el grado de hibridación, fue evaluada a 405 nm empleando un lector de placas E.L.I.S.A. (Labsystems iEMS Reader MF).

e) Interpretación de los resultados

El protocolo se llevó a cabo simultáneamente con las reacciones homólogas y heterólogas. El grado de hibridación se expresó como el porcentaje del ADN marcado obtenido en el tampón 0,4M (cadenas dobles) respecto al ADN marcado total. A su vez, el **grado de unión relativo** del ADN heterólogo se expresó como porcentaje del homólogo.

IV.1.3. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Se abordó a partir de la secuencia del gen ARNr 16S.

IV.1.3.1. Obtención de la secuencia del gen ARNr 16S

a) Amplificación del gen

Se utilizó el ADN genómico extraído mediante el kit comercial “AquaPure Genomic DNA isolation kit” (Biorad®), procedimiento que ya se describió en el punto b) del apartado IV.1.B.1.

El ADN disuelto en agua bidestilada se amplificó por PCR, siguiendo el protocolo de Saiki y colaboradores (1988) y empleando la enzima ADN polimerasa de *Termus aquaticus* (Lawyer y col., 1998) comercializada por Eppendorf®. Se utilizó el cebador directo **16F27** que se une a las posiciones 8-27, y el cebador reverso **16R1488** unido a las posiciones complementarias 1511-1488 [numeración en *E.coli* (Brosius y col., 1978)] (se puede consultar su secuencia en la Tabla 13). Ambos cebadores son sintetizados por Sigma-Genosys®.

Tabla 13. Oligonucleótidos usados en la amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S.

Cebador	Secuencia (5'→3')	Referencia
16F27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Lane, 1991
16R1488	CGGTTACCTTGTTAGGACTTCACC	Lane, 1991
A7+1	CATGCCGCGTGTGTGAAGAAG	Martinez-Canovas, 2002

*M= A ó C

La reacción de amplificación incluyó una desnaturalización previa de tres minutos a 95°C y posteriormente se desarrollaron 25 ciclos según el siguiente esquema: Desnaturalización durante 70 segundos a 94°C, un minuto a 56°C para el apareamiento de los cebadores, y 2 minutos de elongación a 72°C. Después de los 25 ciclos, se concluyó con una fase de polimerización de 10 minutos a 72°C. Finalmente se enfriaron las muestras a 4°C.

b) Secuenciación del fragmento de ADN amplificado

Los productos de PCR se purificaron directamente utilizando el kit Illustra[®] GFX DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare[®]), según las recomendaciones del fabricante. La secuenciación se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación Automática del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra de Granada, utilizando un aparato Applied Biosystems (modelo 373 STRECHT). El método de secuenciación fue el comercializado por Perkin Elmer, ABI PRISM[™] “Big Dye Terminators”, que utiliza en la reacción de extensión el enzima AmpliTaq DNA polymerase (ref,402122) y emplea dideoxinucleótidos marcados con cromóforos fluorescentes.

Los oligonucleótidos empleados como iniciadores en la secuenciación, fueron los mismos cebadores usados en la reacción de amplificación. Para completar la secuencia del gen, se diseñó un nuevo cebador (A7+1, sintetizado por Sigma-Genosys[®]), complementario a una región intermedia (véase Tabla 13).

IV.1.3.2. Análisis filogenético

Los cromatogramas de las secuencias recibidas fueron comprobados visualmente para corregir los posibles errores. Una vez inspeccionadas las secuencias, éstas se compararon con las de los genes ARNr 16S disponibles en la base de datos GenBank, usando el programa *Nucleotide BLASTsearch* (Altschul y col., 1990), cuyos resultados de similaridad entre secuencias se basan en alineamientos locales de las mismas.

Para inferir la relación filogenética procedimos en primer lugar al alineamiento múltiple de las secuencias de los microorganismos en estudio con las especies de referencia, considerando como tal las especies válidamente descritas hasta la fecha del género *Halomonas* y algunas otras de la familia *Halomonadaceae* (consultar apartado I.1.1. de la introducción). Con este fin empleamos los programas informáticos *Clustal X* (Thompson y col., 1997) y *Megalign*, éste último perteneciente al paquete de programas *DNASTar* (Burland, 2000). El programa *Megalign* nos permitió visualizar los porcentajes de semejanza entre secuencias.

El alineamiento obtenido por *Clustal X* fue empleado en otro programa, *MEGA 3.1* (Kumar y col., 2004), para generar el árbol filogenético. Tal y como se aconseja (Arahal y col., 2007), la relación filogenética se estableció por varios métodos: Máxima Parsimonia y de Distancias. En este último caso, a su vez se utilizaron las metodologías de los “vecinos próximos” (más conocido como Neighbour-Joining) y de la Mínima Evolución, ya que cuando el número de taxa es pequeño, la variación entre ambos métodos de Distancias puede ser sustancial (Nei y Kumar, 2000). Las distancias evolutivas, incluyendo un factor de corrección para las mutaciones reversas (Jukes y Cantor, 1969), se calcularon en función del número de pares de bases en que difieren o asemejan dos genes. Por último, para corregir posibles sesgos en las relaciones de parentesco entre los microorganismos en estudio, se incluyeron tres especies externas u outgroups, *Zymobacter palmae*, *Cobetia marina* y *Carnimonas nigrificans*, especies tipo de otros géneros de la familia *Halomonadaceae*.

La consistencia de una determinada relación filogenética se evaluó, por un lado, por su permanencia independientemente del algoritmo usado (Chelo y col., 2007). Por otro, por el valor de remuestreo o “bootstrap” de la agrupación, mediante el cual se comprobó estadística y aleatoriamente si el orden en que se habían introducido las secuencias afectaba a las características del modelo empleado (Felsenstein, 1985). El valor de “bootstrap” fue calculado por el mismo programa *MEGA 3.1* y se basó en 1000 remuestreos.

Finalmente, se buscó *de visu* en la secuencia del gen ARNr 16S de cada una de las cepas, los 19 nucleótidos signatura característicos del género *Halomonas* y de otros géneros de la familia *Halomonadaceae* (véase Tabla 14 en la página siguiente) (Dobson y Franzmann, 1996). Esto nos permitió el encuadre filogenético definitivo de las cepas dentro de esta familia.

Tabla 14. Nucleótidos signatura en la secuencia del gen ARNr 16S, característicos de la familia *Halomonadaceae* y de los géneros *Halomonas*, *Carnimonas* y *Zymobacter* (Dobson y Franzmann, 1996).

Posición ^a	Familia <i>Halomonadaceae</i>	Género <i>Halomonas</i>	Género <i>Zymobacter</i>	Género <i>Carnimonas</i>
76±93	6 bp	6 bp	6 bp	6 bp
484	A	A	A	G
486	C	C	C	U
640	G	G	G	G
660	A	A	A	A
668	A	A	A	A
669	A	A	A	A
737	U	U	U	U
738	U	U	U	U
745	U	U	U	U
776	U	U	U	U
1124	U	U	U	U
1297	U	U	U	U
1298	C	C	C	C
1423	A	A	A	A
1424		C	U	U
1439		U	C	C
1462		A	C	C
1464		C	U	C

^aNumeración en *E.coli* (Brosius y col., 1978)

IV.1.4. ANÁLISIS QUIMIOTAXONÓMICO

Se realizó a partir de 250 ml de un cultivo de la cepa en cuestión en medio MY líquido al 7,5% (p/v). Tras 24 horas, el cultivo se centrifugó y el sedimento fue enviado al Servicio de Identificación de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (*DSMZ*, Braunschweig, Germany), donde se realizó tanto la determinación de los ácidos grasos como la de las quinonas respiratorias. En el análisis de los primeros se empleó la técnica de cromatografía de gases (GLC), mientras que para la determinación de las quinonas respiratorias se usó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

IV.2.RESULTADOS

IV.2.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

IV.2.1.1. Resultados de las pruebas morfológicas, culturales, fisiológicas, bioquímicas, nutricionales y de susceptibilidad frente a diversos antimicrobianos

a) Pruebas morfológicas y culturales

Todas las cepas seleccionadas son bacilos Gram negativos y crecen uniformemente en medio líquido. Ninguna de ellas manifiesta producción de piocianina.

A continuación, en la Tabla 15 se muestran los resultados de las pruebas morfológicas y culturales. En ellas hemos usado las siguientes abreviaturas:

Pig: Pigmentación de las colonias. **C:** Crema; **A:** Anaranjada; **M:** Marrón.

Muc: Mucosidad de las colonias. **3:** Muy mucosas; **2:** Moderadamente mucosas; **1:** Poco mucosas; **0:** No mucosas.

Mov: Movilidad.

Flag: Flagelación; **Pol:** Polares; **Per:** Peritricos.

Longitud aproximada de la bacteria: **> 3µm**; anchura **> 0,75µm**

Fluo: Producción de fluoresceína.

PHA: Acumulación de gránulos de poli-β-hidroxibutirato.

Tabla 15. Características morfológicas y culturales.

CEPA	Pig	Muc	Mov	Flag	>3µm	<0,75µm	Fluo	PHA
11S	C	3	-	-	-	-	-	+
4CR	C	1	+	POL	-	-	-	+
5CR	M	0	+	POL	-	+	-	+
15CR	A	2	-	-	-	+	-	+
AL13	C	2	-	-	+	+	-	+
C8	C	1	-	-	+	+	-	+
F15	C	2	-	-	-	+	-	+
HGD1	C	2	-	-	-	+	-	+
HGDK1	C	2	+	PER	-	+	+	+
N64	C	2	-	-	-	+	-	+
R53	A	2	-	-	-	+	-	+
SP4	A	2	-	-	-	+	-	+
12CR	C	3	-	-	+	+	-	+
F5	C	2	+	POL	-	+	-	-
S19	C	3	-	-	-	+	-	-

Las cepas sombreadas en gris respiran sobre nitratos, sin llegar a desnitrificar. Serán destacadas de esta forma en el resto de Tablas de este apartado

Tinción de flagelos

En las Figuras 16 a 19 podemos observar las fotografías al microscopio electrónico de los microorganismos móviles y la distribución de sus flagelos.

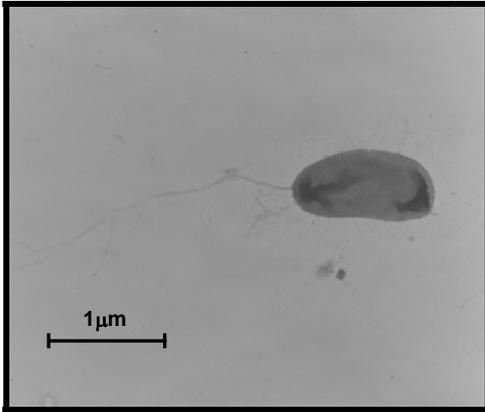


Figura 16. Microfotografía de la cepa 4CR, mostrando su único flagelo polar (16000X).

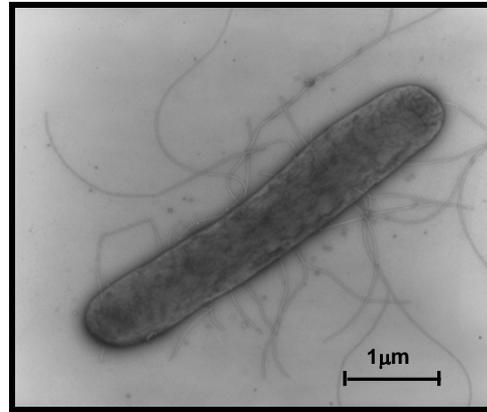


Figura 17. Microfotografía de la cepa HGDK1, mostrando sus flagelos peritricos (16000X).

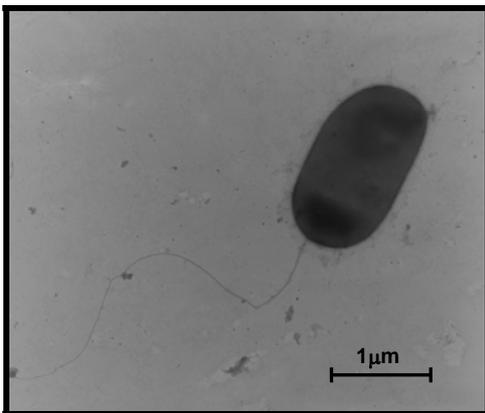


Figura 18. Microfotografía de la cepa 5CR, con su único flagelo polar (16000X).

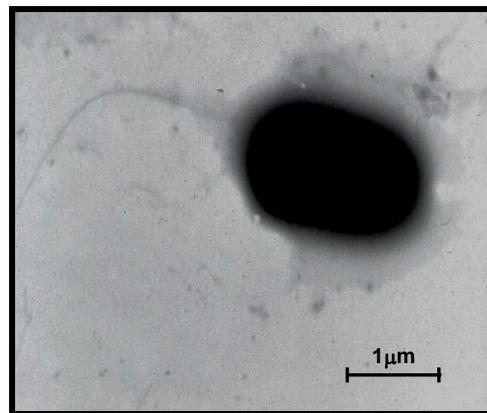


Figura 19. Microfotografía de la cepa F5, mostrando su único flagelo polar (16000X).

b) Pruebas fisiológicas

En las **Tablas 16, 17 y 18** se indican los resultados de las siguientes pruebas fisiológicas:

Tabla 16. Pruebas fisiológicas (I):

Crecimiento a las concentraciones de sales siguientes: **0, 0,5, 1, 3, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25 y 30% (p/v)**.

Tabla 17. Pruebas fisiológicas (II):

Crecimiento a las concentraciones de NaCl siguientes: **0, 0,5, 1, 3, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25 y 30% (p/v)**.

Tabla 18. Pruebas fisiológicas (III):

Crecimiento a las temperaturas siguientes: **4, 15, 20, 25, 32, 37 y 45°C**.

Crecimiento a los valores de pH siguientes: **5, 6, 7, 8, 9 y 10**.

Tabla 16. Pruebas fisiológicas (I).

CEPA	% sales (p/v)											
	0	0,5	1	3	5	7,5	10	15	20	25	30	
11S	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4CR	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
5CR	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
15CR	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
AL13	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C8	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
F15	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HGD1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HGDK1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R53	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SP4	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
12CR	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S19	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* Los resultados sombreados en amarillo corresponden a los **óptimos** de las cepas

Tabla 17. Pruebas fisiológicas (II).

CEPA	% NaCl (p/v)										
	0	0,5	1	3	5	7,5	10	15	20	25	30
11S	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
4CR	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
5CR	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
15CR	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
AL13	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
C8	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
F15	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
HGD1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
HGDK1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
N64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R53	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
SP4	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
12CR	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
F5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S19	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

* Los resultados sombreados en amarillo corresponden a los óptimos de las cepas

Tabla 18. Pruebas fisiológicas (III).

CEPA	T ^a (C)							pH					
	4°C	15°C	20°C	25°C	32°C	37°C	45°C	5	6	7	8	9	10
11S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4CR	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
5CR	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
15CR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AL13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C8	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F15	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
HGD1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
HGDK1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SP4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12CR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* Los resultados sombreados en amarillo corresponden a los óptimos de las cepas

Crecimiento en anaerobiosis

Ninguna de las cepas crece en las condiciones de anaerobiosis generadas con las bolsitas AnaeroGen™ (OXOID®), a diferencia de los controles que de cada microorganismo se incuban en aerobiosis.

Resistencia al calentamiento

Tras un calentamiento a 80°C durante 10 minutos, crecen todos los microorganismos excepto las cepas 15CR y SP4. Después de calentar a 65°C durante 30 minutos no crece ninguna de las cepas en estudio.

c) Pruebas bioquímicas

La producción de ácidos sólo se manifiesta en tres cepas: 4CR, F15 y HGD1, y únicamente a partir de la glucosa.

Los resultados obtenidos en las demás pruebas se detallan en las Tablas 19 y 20. En la Figura 20 (página 92) se muestran imágenes de resultados positivos y negativos de algunas cepas.

Tabla 19. Pruebas bioquímicas (I).

Cat: Catalasa
Oxi: Oxidasa
O/F: Oxido-fermentación de la glucosa
Ind: Indol
RM: Rojo de metilo
VP: Voges-Proskauer
RpNO₃⁻: Respiración sobre nitrato
Gas: Producción de gas sobre nitrato

RpFum: Respiración sobre fumarato
H₂S: Producción de sulfhídrico
NO₃⁻: Reducción de nitratos en aerobiosis
NO₂⁻: Reducción de nitritos en aerobiosis
Sel: Reducción de selenito
Geo: Oxidación de gluconato
ONPG: Producción de β-galactosidasa
Ure: Producción de ureasa

Tabla 20. Pruebas bioquímicas (II).

Phe: Producción de fenilalanina desaminasa
McC: Crecimiento en agar Mac Conkey
Cet: Crecimiento en agar cetrimida
Gel: Hidrólisis de la gelatina
Cas: Hidrólisis de la caseína
T20: Hidrólisis del Tween 20
T80: Hidrólisis del Tween 80
Lec: Producción de lecitinasa
Ti-H: Hidrólisis de la tirosina

Ti-P: Producción de pigmento de la tirosina
Alm: Hidrólisis del almidón
Esc: Hidrólisis de la esculina
Fos: Producción de fosfatasa
ADN: Producción de ADNasa
Hem: Producción de hemolisis
Sglu: Producción de hemolisis en MY-sangre sin glucosa

Tabla 19. Pruebas bioquímicas (I).

CEPA	Cat	Oxi	O/F	Ind	RM	VP	Rp NO ₃ ⁻	Gas	Rp Fum	H ₂ S	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	Sel	Gco	ONPG	Urea
11S	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
4CR	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
5CR	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
15CR	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	D	+	+	-	+
AL13	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
C8	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	D	-	+
F15	+	-	-	-	-	-	+	+	D	+	+	+	+	-	+	+
HGD1	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	D	-	+
HGDK1	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
N64	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
R53	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
SP4	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	D	+	+	-	+
12CR	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
F5	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	D	+
S19	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+

D: Resultado dudoso

Tabla 20. Pruebas bioquímicas (II).

CEPA	Phe	McC	Cet	Gel	Cas	T20	T80	Lec	Ti-H	Ti-P	Alm	Esc	Fos	ADN	Hem	Sglu
11S	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
4CR	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
5CR	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
15CR	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-
AL13	+	+	-	-	-	+	+	+	+ ^a	-	D	-	+	+	+	+
C8	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
F15	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+ ^a	-	-
HGD1	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
HGDK1	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
N64	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
R53	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
SP4	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-
12CR	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
F5	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
S19	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-

^a Después de más de 20 días de incubación

D: Resultado dudoso

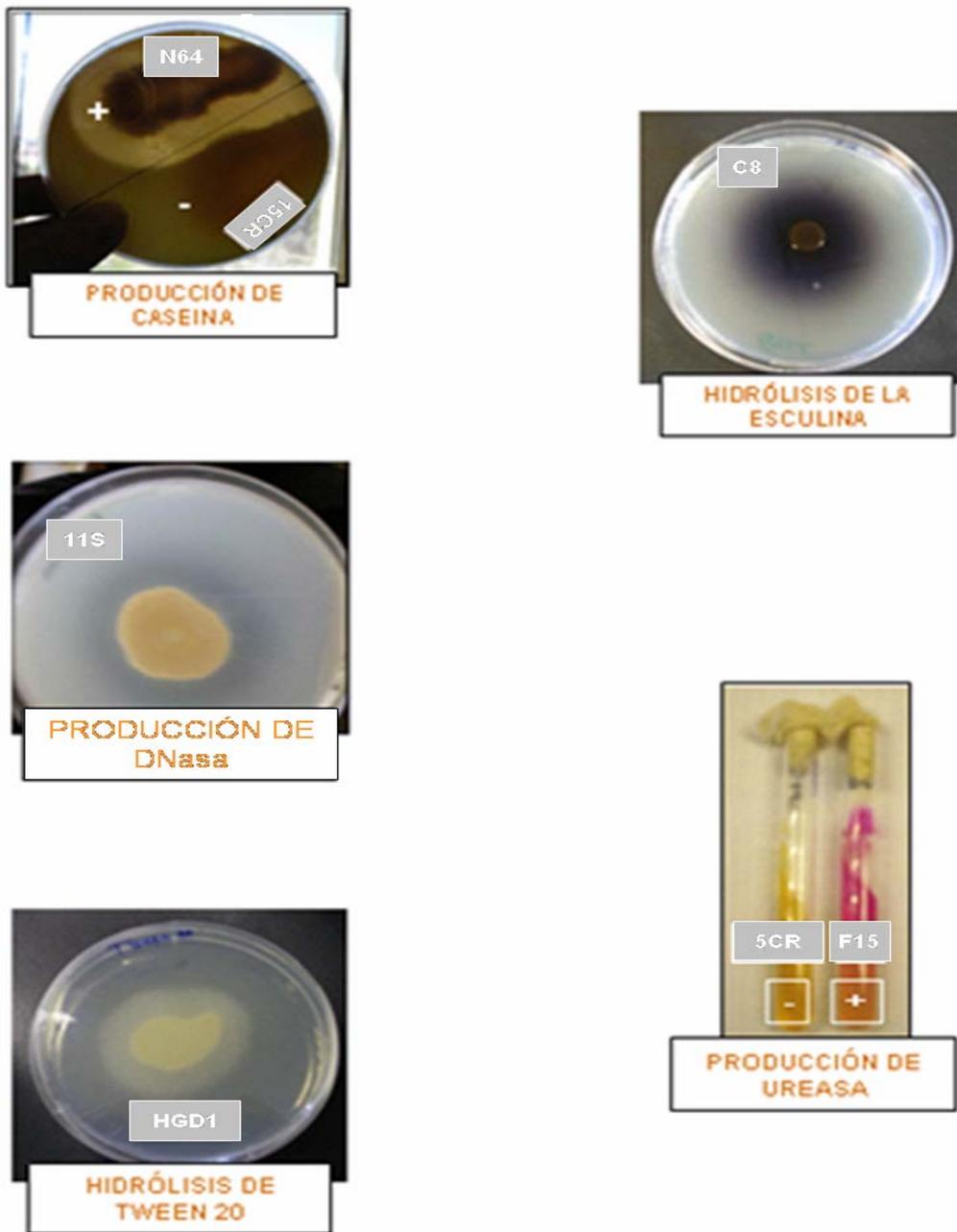


Figura 20. Resultados positivos y negativos de algunas de las pruebas bioquímicas.

d) Pruebas nutricionales

En las **Tablas 21** y **22** se expresan los resultados de las siguientes pruebas nutricionales:

Tabla 21. Pruebas nutricionales (I). Utilización como única fuente de carbono y energía de los siguientes compuestos:

Alm: Almidón
Ara: L-arabinosa
Cel: D-celobiosa
Esc: Esculina
Fru: D-fructosa
Gal: D-galactosa
Glu: D-glucosa
Lac: Lactosa
Mal: Maltosa

Man: D-manosa
Sal: D-salicina
Tre: D-trehalosa
Ace: Acetato
Cit: Citrato
For: Formiato
Fum: Fumarato
Gco: D-gluconato

Tabla 22. Pruebas nutricionales (II). Utilización como única fuente de carbono y energía de los siguientes sustratos:

Lto: DL-lactato
Mto: Malonato
Pro: Propionato
Suc: Succinato
Ado: Adonitol

Eta: Etanol
Gli: DL-glicerol
Ino: *mio*-inositol
Mni: D-manitol
Sbi: D-sorbitol

aminoácidos:

Utilización como única fuente de carbono y energía de los siguientes

Ala: DL-alanina
Cys: L-cisteína
His: L-histidina
Ile: *iso*-leucina

Lys: L-lisina
Met: L-metionina
Ser: L-serina
Val: L-valina

Tabla 21. Pruebas nutricionales (I).

CEPA	Alm	Ara	Cel	Esc	Fru	Gal	Glu	Lac	Mal	Man	Sal	Tre	Ace	Cit	For	Fum	Geo
11S	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
4CR	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
5CR	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+
15CR	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+
AL13	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
C8	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
F15	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
HGD1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
HGDK1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	D	+	-
N64	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
R53	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+
SP4	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+
12CR	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
F5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+

D: Resultado dudoso

Tabla 22. Pruebas nutricionales (II).

CEPA	Lto	Mto	Pro	Suc	Ado	Eta	Gli	Ino	Mni	Sbi	Ala	Cys	His	Ile	Lys	Met	Ser	Val
11S	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
4CR	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
5CR	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
15CR	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
AL13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
C8	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
F15	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
HGD1	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
HGDK1	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+
N64	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
R53	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SP4	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
12CR	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
F5	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
S19	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-

e) Pruebas de susceptibilidad a diversos agentes antimicrobianos

En las **Tablas 23** y **24** se indican los resultados de las pruebas de susceptibilidad frente a diversos antimicrobianos. A continuación se recogen las abreviaturas, que hemos usado en ellas:

Tabla 23. Susceptibilidad a los siguientes antimicrobianos (I):

NAL: Ácido nalidixico
NOR: Norfloxacino
RMP: Rifampicina
AMC: Amoxicilina+Ácido clavulánico
AMP: Ampicilina
P: Penicilina G
ATM: Aztreonam
CF: Cefalotina
FOX: Cefoxitina
CAZ: Ceftazidima

Tabla 24. Susceptibilidad a los siguientes antimicrobianos (II):

TM: Tobramicina
GM: Gentamicina
DXT: Doxiciclina
PB: Polimixina B
VA: Vancomicina
FM: Nitrofurantoina
G: Sulfamida
SXT: Trimetoprim-Sulfametoxazol

Interpretación de las Tablas:

R: Resistente

S: Sensible

I: Intermedio

Tabla 23. Susceptibilidad a agentes antimicrobianos (I).

CEPA	NAL	NOR	RMP	AMC	AMP	P	ATM	CF	FOX	CAZ
11S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4CR	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
5CR	S	S	S	S	I	I	I	S	S	S
15CR	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AL13	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
C8	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
F15	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
HGD1	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
HGDK1	S	I	S	S	S	I	S	S	S	S
N64	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
R53	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SP4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12CR	S	R	S	S	S	S	R	S	S	I
F5	S	I	S	S	R	R	S	R	R	S
S19	S	R	S	S	R	R	S	R	R	S

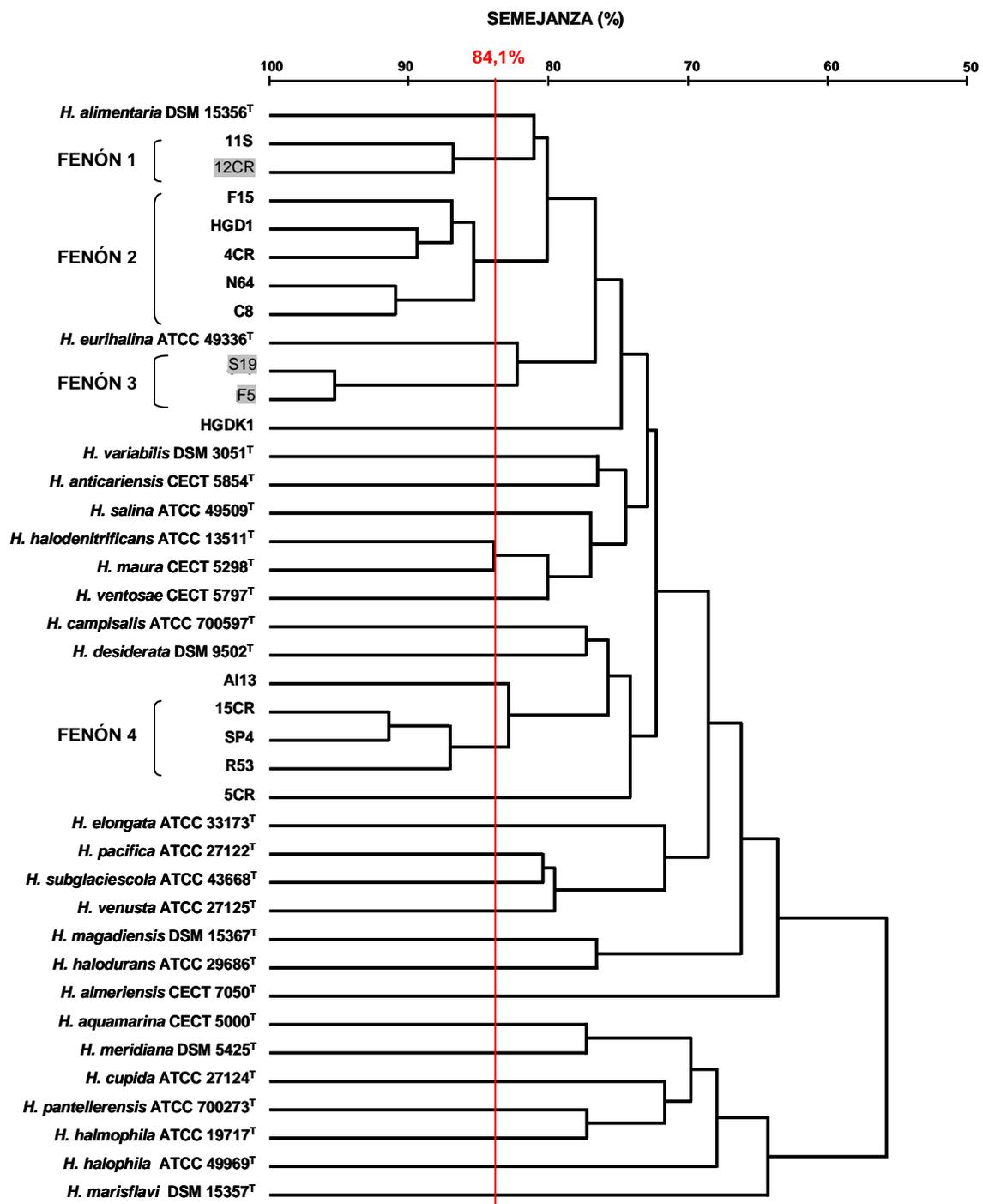
Tabla 24. Susceptibilidad a agentes antimicrobianos (II).

CEPA	TM	GM	DXT	PB	VA	FM	G	SXT
11S	R	S	S	S	R	S	S	S
4CR	S	S	S	S	R	S	S	S
5CR	S	S	S	R	S	S	S	S
15CR	R	S	S	S	D	S	S	S
AL13	S	S	S	S	D	S	S	S
C8	I	I	S	S	R	S	S	S
F15	S	S	S	S	R	S	S	S
HGD1	S	S	S	S	R	S	S	S
HGDK1	S	S	R	R	R	S	S	S
N64	S	S	S	S	R	S	S	S
R53	R	S	S	S	R	S	S	S
SP4	R	S	S	S	R	S	S	S
12CR	S	S	I	S	R	S	S	R
F5	S	S	R	R	R	S	S	S
S19	S	S	R	R	R	S	S	S

D: Resultado dudoso

IV.2.2. Taxonomía numérica

En la Figura 21 se muestra el dendrograma obtenido después del análisis numérico con el programa TAXAN, utilizando el coeficiente de Sokal y Michener y la técnica de agrupación UPGMA. La matriz de semejanza se puede consultar en el Apéndice X de esta memoria.



☒ Las cepas sombreadas en gris respiran sobre nitratos, pero no realizan una desnitrificación completa.

Figura 21. Dendrograma basado en 107 características fenotípicas, utilizando el coeficiente de Sokal y Michener y la técnica de agrupación UPGMA. Se indican cuatro fena resultantes si consideramos la semejanza del 84%.

IV.2.2. ESTUDIO GENOTÍPICO

IV.2.2.1. Determinación del contenido en G+C

En la Tabla 25 se representa el contenido en G+C de cada una de las cepas. Los datos mostrados son la media de tres determinaciones.

Tabla 25. Contenido en G+C (moles %) de las cepas en estudio.

CEPA	G+C (moles %)
11S	65,37±1,0
4CR	67,55±1,2
5CR	65,71±0,2
15CR	62,75±0,5
AL13	66,05±0,4
C8	67,41±0,2
F15	66,26±0,2
HGD1	66,00*
HGDK1	68,80*
N64	67,14±0,1
R53	66,20±0,5
SP4	66,26±1,0
12CR	68,78±0,2
F5	64,29±1,0
S19	62,45±0,2

*Datos aportados por el Dr. Sorokin. de la Universidad TU de Delft (Holanda)

IV.2.2.3. Hibridación ADN-ADN

Tomando como base los resultados obtenidos en el estudio fenotípico (apartado IV.2.A) y filogenético (apartado IV.2.C) se realizaron hibridaciones cuando fue preciso entre algunas de las cepas entre sí y con distintas especies de referencia. En las Tablas 26 y 27 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 26. Porcentajes de hibridación entre las cepas del fenón 1 y con *Halomonas alimentaria* y *H. organivorans*.

CEPA	% Hibridación ADN-ADN			
	11S	12CR	<i>H. alimentaria</i>	<i>H. organivorans</i>
11S	100	71,40	54,20±6	47,25

-: No determinado

Tabla 27. Porcentaje de hibridación entre las cepas del fenón 4.

CEPA MARCADA	% Hibridación ADN-ADN		
	15CR	R53	SP4
SP4	89,16±7	76,60±9	100

IV.2.3. ESTUDIO FILOGENÉTICO

Las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas caracterizadas, así como los alineamientos con las especies de referencia se pueden consultar en el disco compacto adjunto a esta memoria.

En las Figuras de las siguientes páginas se muestran los árboles filogenéticos obtenidos a partir de la secuencia del gen ARNr 16S mediante el programa *MEGA 3.1*, usando los métodos de Máxima Parsimonia (Figura 22) y de Distancias (Figuras 23a y 23b).

Los porcentajes de semejanza a partir de las secuencias del gen ARNr 16S entre las cepas a clasificar y las especies de referencia se obtuvieron mediante el programa *Megalign*. La matriz resultante se encuentra en el Apéndice X.

Por otra parte, en todas las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas a clasificar, encontramos los 15 nucleótidos característicos de la familia *Halomonadaceae* y los 4 del género *Halomonas*.

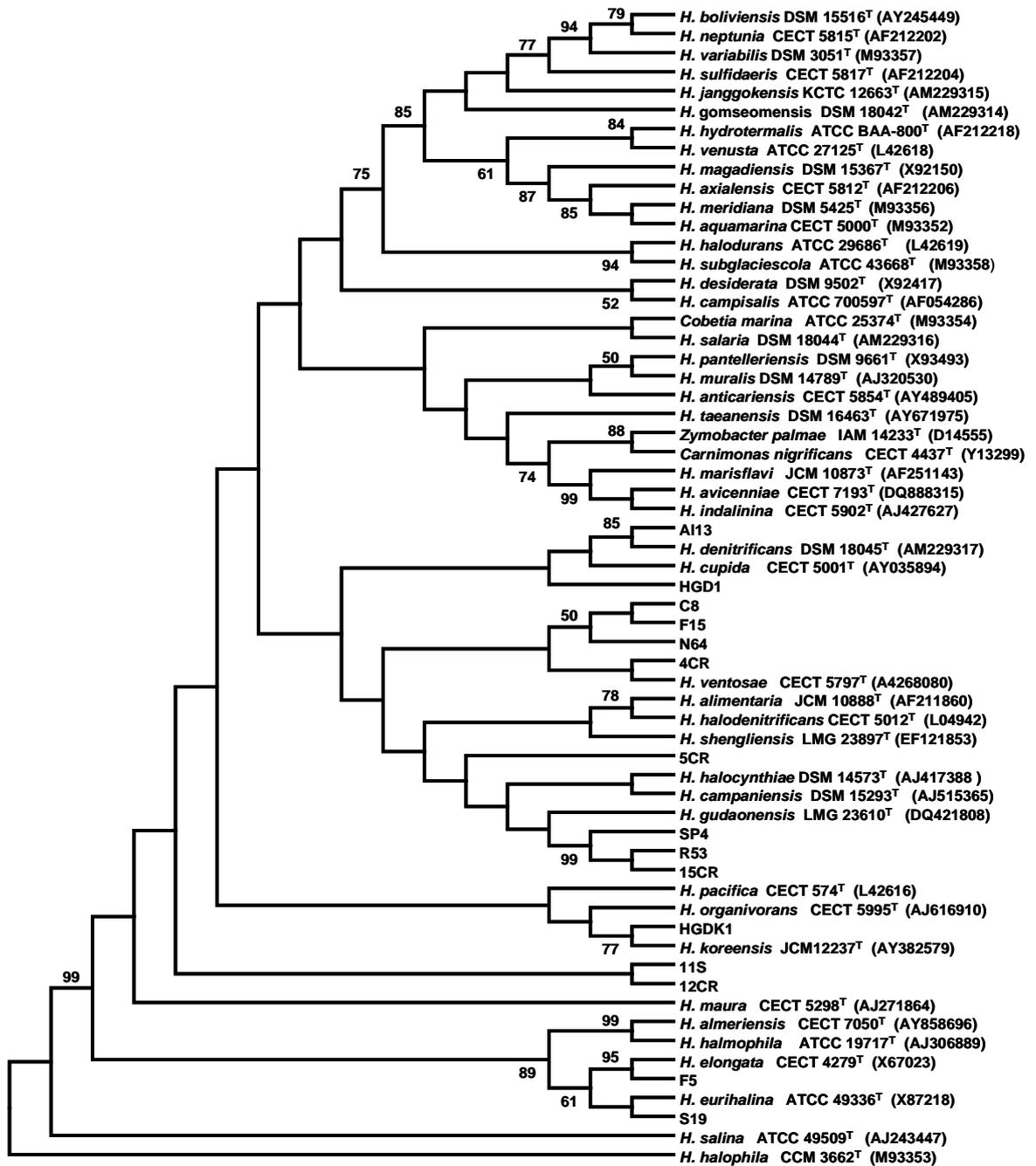


Figura 22. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen ARNr 16S, obtenido mediante el método Máxima Parsimonia. Los números de acceso en la base de datos GenBank de las secuencias de las especies de referencia son dados entre paréntesis. Se indican los valores de “bootstrap” mayores del 50%.

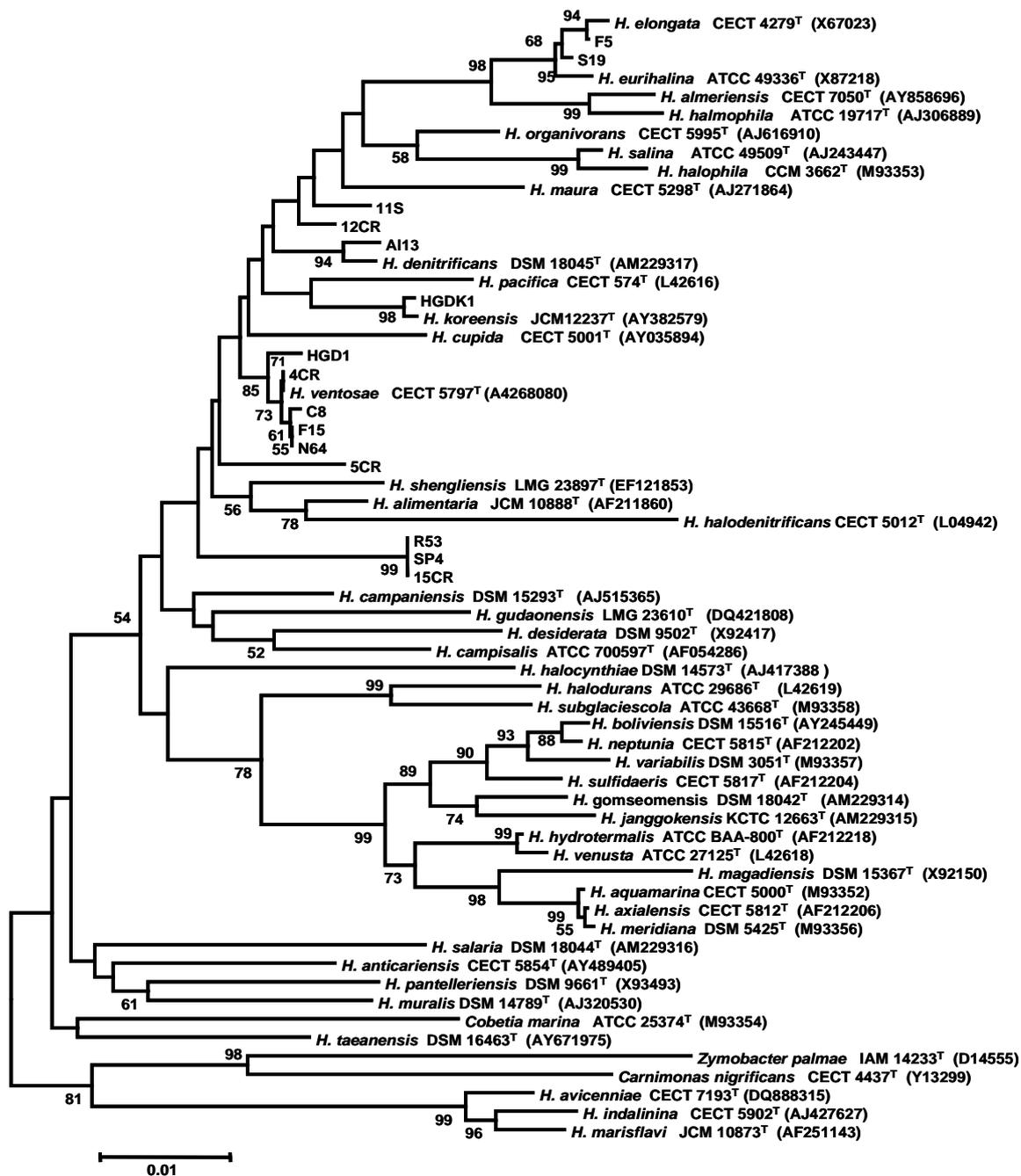


Figura 23a. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen ARNr 16S, obtenido mediante el método Neighbour-Joining. Los números de acceso en la base de datos GenBank de las secuencias de las especies de referencia son dados entre paréntesis. La barra indica un 1% de divergencia. Se indican los valores de “bootstrap” mayores del 50%.

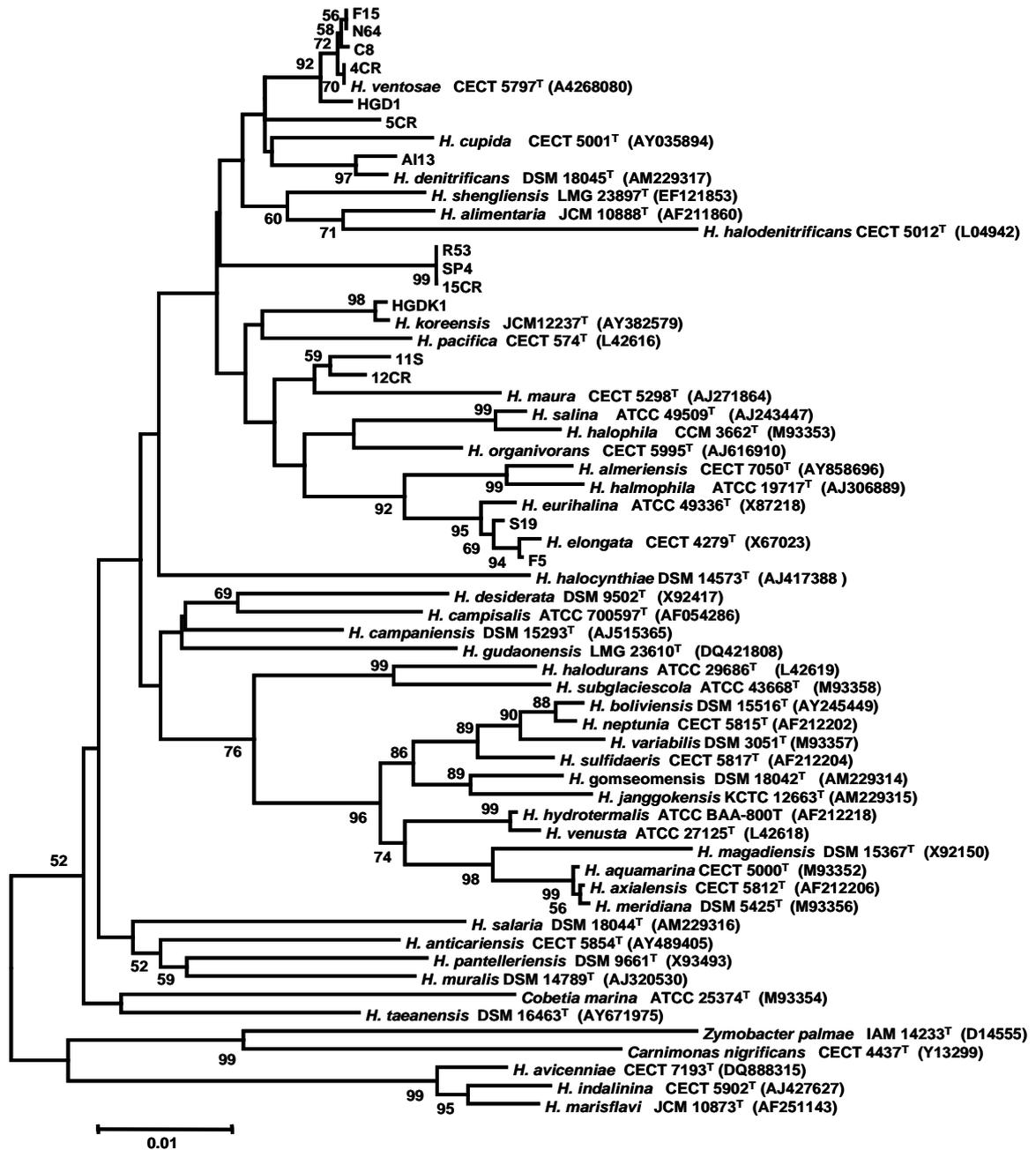


Figura 23b. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen ARNr 16S, obtenido mediante el método de Mínima Evolución. Los números de acceso en la base de datos GenBank de las secuencias de las especies de referencia son dados entre paréntesis. La barra indica un 1% de divergencia. Se indican los valores de “bootstrap” mayores del 50%.

IV.2.4. ANÁLISIS QUIMIOTAXONÓMICO

La composición de ácidos grasos de cinco de las cepas estudiadas se detalla en la Tabla 28:

Tabla 28. Composición en ácidos grasos de las cepas pertenecientes a los fena 1 y 4, así como de la cepa A113 no incluida en ningún fenón. Resultados expresados como % del total de ácidos grasos.

CEPA	11S	12CR	15CR	R53	SP4	A113
Ácido graso						
10:0	2,08	1,85	2,30	2,35	2,60	3,09
10:0 3OH	0,39	0,21	-	-	-	0,29
11:0 ISO	-	-	-	-	-	0,21
12:0	2,10	1,95	3,07	3,26	3,19	0,57
12:0 3OH	5,56	4,09	5,43	5,98	6,22	6,38
14:0	0,31	0,26	-	-	-	0,83
15:0	X	0,14	-	-	-	-
16:0	27,79	30,90	30,91	24,01	33,93	28,20
17,0 CYCLO	1,41	2,70	-	-	-	0,83
17:0	-	0,29	-	-	-	0,06
18:0	0,41	0,54	3,06	3,70	1,55	0,08
18:1 w5c	-	0,29	-	-	-	0,08
18:1 ω7c	29,92	26,23	23,76	42,23	16,08	13,83
11 methyl 18:1 w7c	0,44	-	-	-	-	-
19:0 cyclo ω8c	7,02	6,86	9,40	4,18	14,46	0,83
15:0 ISO 20H/ 16:1 w7c	22,29	23,16	20,81	14,19	18,72	44,01

-: No detectado

Por su parte, las cepas del fenón 4, 15CR, SP4 y R53, poseían la **ubiquinona 9** como quinona respiratoria, única en el caso de 15CR y SP4, y mayoritaria (94%) en R53 (la ubiquinona 8 representa sólo un 6%).

IV.3. DISCUSIÓN

Para la caracterización taxonómica completa de una cepa y su encuadre en taxa ya existentes o de nueva creación, es fundamental integrar datos procedentes de varios estudios: Fenotípicos, genéticos, filogenéticos y quimiotaxonómicos (Vandamme y col., 1996; Stackebrandt y col., 2002).

Teniendo en cuenta que en este trabajo la selección de los microorganismos estaba enfocada hacia potenciales miembros del género *Halomonas* con capacidad desnitrificante (Apartado III.1.1.), para el **análisis fenotípico** se emplearon como referencia las 24 especies de este género incluidas en el estudio llevado a cabo por Mata y colaboradores (2002) (véase Tabla 12). En la caracterización fenotípica de los microorganismos, aunque se realizaron pruebas adicionales, se siguió básicamente la metodología del trabajo mencionado, con objeto de dar uniformidad a las descripciones fenotípicas y permitir una posterior comparación y análisis de los resultados. Con este proceder intentábamos solventar en parte el escollo encontrado a la hora de agrupar fenotípicamente las especies del género *Halomonas*; existe una enorme variabilidad en los estudios fenotípicos originales de cada especie, siendo escasos unas veces, o empleando metodologías diferentes que impiden una fiable cotejación, otras (Arahal y col., 2007). Por lo anteriormente expuesto, la realización de muchas de las pruebas fenotípicas se hizo en *Halomonas alimentaria* de forma paralela a los microorganismos en estudio, permitiendo incluir esta especie desnitrificante en los estudios de taxonomía numérica.

La caracterización fenotípica constituye una de las líneas esenciales en taxonomía polifásica (Vandamme y col., 1996), ya que aunque no representa toda la información potencial del genoma de los microorganismos (Logan, 1994; Rosselló-Mora y Amann, 2001) es esencial para establecer una concordancia con los datos genéticos y filogenéticos (Stackebrandt y Goebel, 1994; Stackebrandt y col., 2002).

El análisis de un gran número de pruebas fenotípicas permitió someter los resultados a un análisis numérico (Sneath y Sokal, 1973; Sneath, 2006). Se realizó un total de 131 pruebas, entre

morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, nutricionales y de susceptibilidad a diversos agentes antimicrobianos. Los resultados pueden ser consultados en las páginas X a X de esta memoria, así como en los Apéndices X y X.

Todas las cepas seleccionadas son bacilos Gram negativos con metabolismo respiratorio, catalasa positivos. Si observamos la Tabla 19 (página 91) llama la atención que las cepas oxidasa negativas sean aquéllas que respiran sobre nitratos pero que son incapaces de proseguir con la reducción de nitrito hacia un proceso de desnitrificación completo. La excepción se encuentra en la cepa F15, que también da un resultado negativo. El significado fisiológico de esta prueba es que carecen de citocromo C oxidasa, enzima que tiene como sustrato al citocromo C. Los sistemas respiratorios bacterianos están ramificados y poseen una gran variedad de oxidasas bacterianas terminales, lo que hace pensar que estos microorganismos dispondrán de otro tipo de oxidasa (por ejemplo, una quinol oxidasa).

Todas las bacterias objeto de estudio presentan un crecimiento adecuado entre el 3% y el 25% (p/v) de sales y el 7,5% y 20% de NaCl, entre 15°C y 37°C y en un intervalo de pH de 6 a 9. Por otra parte, todas son capaces de respirar sobre nitratos, no así sobre fumarato, que no es utilizado como aceptor final por ninguno. También reducen el selenito y los nitratos en aerobiosis. Son negativas, sin embargo, en todas las cepas las pruebas de producción de piocianina oxidofermutación de la glucosa, el indol, rojo de metilo y Voges-Proskauer, así como la hidrólisis del almidón. La producción de ácidos a partir de diversos azúcares no es frecuente, presentándose sólo en tres de las 15 cepas (4CR, F15 y HGD1) y únicamente a partir de la glucosa. Respecto a las características nutricionales, ninguna de ellas es capaz de emplear el malonato como única fuente de carbono y energía; tampoco usan L-cisteína ni L-metionina como única fuente de carbono, nitrógeno y energía. Finalmente, todas las bacterias del estudio son sensibles al ácido nalidíxico, rifampicina, amoxicilina, nitrofurantoina y sulfamida.

Hay que señalar que ninguna de las bacterias seleccionadas produce esporas, ni siquiera cuando se incuban en el medio de Norris (Norris y col., 1981). Por ello, cuando se someten a un calentamiento a 65°C durante media hora (Liu y col., 2004), ninguna de sus células es viable. Por el contrario, la tolerancia observada al calentamiento a 80°C durante 10 minutos no se relaciona

con la producción de formas de resistencia, y pone de manifiesto un tiempo insuficiente de calentamiento, a pesar de estar trabajando a una temperatura 20°C superior.

La taxonomía numérica se basó en los resultados de 107 pruebas del total de características fenotípicas analizadas. De los 150 caracteres, 12 eran comunes en las especies de referencia y en las cepas seleccionadas de nuestra colección de cultivo y, por tanto, no se incluyeron en el análisis numérico; tampoco se consideraron en este análisis 31 caracteres no analizados en las especies de referencia por Mata y colaboradores (2002) y que no podían ser cotejados con nuestras cepas. A continuación se muestra la lista de las 107 características empleadas.

a)-Pruebas morfológicas

Acúmulos de PHA Producción de EPS Movilidad

b)-Pruebas fisiológicas

Crecimiento a las concentraciones de sales: 0, 0,5, 1, 3, 5, 15, 20, 25 y 30%
 Crecimiento a las temperaturas: 4, 15 y 45°C.
 Crecimiento a los valores de pH: 5, 6, 7, 9 y 10.
 Capacidad para crecer anaeróbicamente

c)-Pruebas bioquímicas

Oxidasa	Respiración sobre fumarato, nitrato y nitrito
Fenilalanina desaminasa	Reducción de nitratos y nitritos
ONPG	Prueba de óxido-fermentación de la glucosa
Producción de H ₂ S	Oxidación de gluconato
Producción de ureasa	Crecimiento en agar Mac Conkey
Crecimiento en agar cetrimida	Hemólisis en agar sangre
Hidrólisis de: Almidón	Producción de fosfatasa
Caseína	Hidrólisis de la tirosina
Esculina	Formación de pigmento a partir de la tirosina
Gelatina	Producción de DNasa
Tween 20	Producción de lecitinasa
Tween 80	

Producción de ácidos a partir de todos los carbohidratos mencionados en IV.1.A.1.c), con excepción de D-celobiosa, que era negativa en todos los microorganismos.

d)-Pruebas nutricionales

Se codificaron los resultados de utilización de todos los sustratos mencionados en IV.1.A.1.d), con excepción de L-ramnosa y DL-lactato, que no fueron utilizados por los microorganismos estudiados.

e)-Pruebas de susceptibilidad frente a agentes antimicrobianos

Fueron incluidos los resultados de susceptibilidad frente a:

- Amoxicilina
- Ácido nalidixico
- Ampicilina
- Cefoxitina
- Nitrofurantoina
- Polimixina B
- Rifampicina
- Sulfamida
- Tobramicina
- Trimetoprim-Sulfametoxazol

Para valorar los resultados fenotípicos y obtener el grado de semejanza entre las distintas unidades taxonómicas operativas (OTU's), hemos empleado únicamente el coeficiente de Sokal y Michener (S_{SM}), de apareamiento simple. En trabajos anteriores de nuestro grupo, las matrices de semejanza y los dendrogramas correspondientes se obtuvieron por medio de dos coeficientes: El mencionado de Sokal y Michener y el de Jaccard (Jaccard, 1908), siendo las agrupaciones resultantes semejantes con ambos. Sin embargo, el coeficiente de Sokal y Michener ha demostrado ser el más idóneo para este tipo de estudio (Quesada y col., 1983; Del Moral y col., 1987), por lo que fue finalmente el elegido en nuestra valoración de los datos.

En la Figura 21 se muestra el dendrograma obtenido después de llevar a cabo el análisis numérico. Al estudiar dicho dendrograma se observa una cierta homogeneidad de las cepas, presentando entre sí una semejanza superior al 72%. A este nivel mínimo de semejanza se agrupan con todas las especies desnitrificantes: *H. alimentaria*, *H. campisalis*, *H. desiderata*, *H. halodenitrificans* y *H. ventosae*, así como con *H. maura*, que es capaz de respirar sobre nitratos. Estas especies formaban parte de dos de los grupos descritos en el estudio de Mata y colaboradores (2002). En dicho trabajo las especies de *Halomonas* se clasificaban en tres fena de acuerdo al análisis numérico de más de un centenar de datos fenotípicos, siendo las principales características diferenciales entre ellos, la capacidad para producir ácidos o no a partir de carbohidratos y la utilización de diversos sustratos como fuente de carbono, nitrógeno y energía. Nuestras cepas pertenecen al grupo más numeroso, esto es, a los no fermentadores. Resulta interesante, a la vista de los resultados obtenidos, realizar en un futuro próximo una estandarización de la caracterización fenotípica de otras especies desnitrificantes del género *Halomonas* recientemente

publicadas: *Halomonas denitrificans* (Kim y col., 2007), *H. gudaonensis* (Wang y col., 2007a) y *Halomonas shengliensis* (Wang y col., 2007b). Esto nos permitiría incluirlas en los análisis numéricos y comprobar de esta forma el peso real que la desnitrificación tiene como carácter fenotípico diferenciador dentro del género *Halomonas*.

A un nivel de semejanza del 84%, se observa la existencia de 4 grupos fenotípicos, sólo uno de ellos relacionado a este porcentaje con alguna de las cepas utilizadas como referencia. Se trata del fenón 1, que presenta un 85% de semejanza con *Halomonas alimentaria*. El fenón 2, por su parte, se encuentra también muy relacionado con esta especie (al 81%), mientras que el fenón 3 muestra un 82% de semejanza con *Halomonas eurihalina*. Por el contrario, las especies más semejantes fenotípicamente al fenón 4 son *Halomonas campisalis* y *H. desiderata* con unos porcentajes de semejanza del 74% y 76%, respectivamente.

Son 12 las cepas incluidas en estos 4 fena, quedando tan sólo 3 sin agrupar al porcentaje de semejanza establecido del 84%. Además, es significativo que los microorganismos del estudio se hayan agrupado con independencia del lugar en el que fueron aislados (véanse los apartados III.2.2. y III.2.3 sobre la procedencia de las cepas).

Para determinar el contenido en G+C de los microorganismos estudiados, se utilizó su ADN disuelto en SSC 0,1x. El ADN se extrajo por el método de Marmur (1961), que permite obtener suficiente cantidad y con una adecuada pureza para llevar a cabo estos experimentos.

El **contenido en G+C** puede resultar útil como información orientativa; una discrepancia elevada entre dos cepas podría ser indicativa de diferencias taxonómicas entre las mismas (Goodfellow y col., 1997). No obstante, en los casos en los que los valores son semejantes, debería considerarse como un dato más en la confirmación de la relación taxonómica, ya que no se puede descartar la existencia de grupos diferentes con similar contenido en guanina y citosina. La información que aporta este análisis no indica la semejanza de genomas, sino la proporción en determinados nucleótidos (Roselló-Mora y Amann, 2001).

En la Tabla 25 de la página 99, se observa que el contenido en G+C de todas las cepas se encuentra en el intervalo de 62 moles % (cepas 15CR y S19) a 68 moles % (cepas 12CR y HGDK1). Estos porcentajes se encuadran dentro del rango de G+C del género *Halomonas*, que se extiende desde 53.8±0,1 moles % de *H. denitrificans* (Kim y col., 2007) y *H. venusta* (Baumann y col., 1972) a 74.3 moles % de *H. ventosae* (Martinez-Canovas y col., 2004).

Con relación a las experiencias de **hibridación ADN-ADN**, la pureza del ADN es fundamental por su influencia en el grado de unión de los genomas. Así, se aconseja que la relación A_{260}/A_{280} , se sitúe por encima de 1,8 para asegurarnos un contenido mínimo de impurezas, tales como proteínas o exopolisacárido. Por ello, para la realización de estos experimentos se empleó el kit comercial AquaPure Genomic DNA isolation, de Biorad®. Las hibridaciones, recogidas en las Tablas 26 y 27 fueron realizadas en aquellos casos en los que la posición taxonómica de las cepas no quedaba suficientemente dilucidada con el resto de estudios.

Finalmente, para completar la caracterización taxonómica de los microorganismos seleccionados, se llevó a cabo un **análisis filogenético** en el que se compararon las secuencias del gen ARNr 16S de dichas cepas con las especies de referencia. Tal y como se puede comprobar en el disco compacto que acompaña a la memoria, todas las secuencias poseen una longitud mayor a 1400 pares de bases, con un porcentaje de posiciones indeterminadas inferior al 0.5%, cumpliendo de esta forma los requisitos establecidos por el Comité para la Reevaluación de la Definición de especie (Stackebrandt y col., 2002). En las Figuras 22, 23a y 23b se observa la afiliación filogenética obtenida por los métodos de Máxima Parsimonia, Neighbour-Joining y Mínima Evolución, respectivamente. Como se puede apreciar, las relaciones más próximas se mantienen estables, independientemente del método, con valores de “bootstrap” superiores al 50% en la mayoría de los casos. Este hecho aporta confianza en la filogenia resultante.

Por otra parte, podríamos aventurarnos a establecer varios filotipos, como se muestra en la Figura 24 de la página 111. Se trata simplemente de un planteamiento hipotético que debería complementarse con otros estudios filogenéticos más exhaustivos, como puede ser la secuenciación del gen ARNr 23S, ya realizada en su momento por Arahall y colaboradores (2002a), o bien con el estudio de otros marcadores filogenéticos, como los empleados en esta Tesis

Doctoral (Capítulo III). Así, llama la atención que los Filotipos 3 y 4 agrupen mayoritariamente microorganismos desnitrificantes y que el 1 esté constituido en su generalidad por especies capaces de respirar sobre nitratos. A menos que los cambios evolutivos ocurran con tasas similares en diferentes ramas filogenéticas, no siempre podemos esperar concordancia filogenética y fenotípica (Young, 1992). Similitud fenotípica no necesariamente refleja relaciones filogenéticas, ni a la inversa. Por ello, las coincidencias mencionadas nos podrían orientar en el origen evolutivo del proceso de desnitrificación en el género *Halomonas*. Este aspecto se discutirá más ampliamente en el Capítulo III.

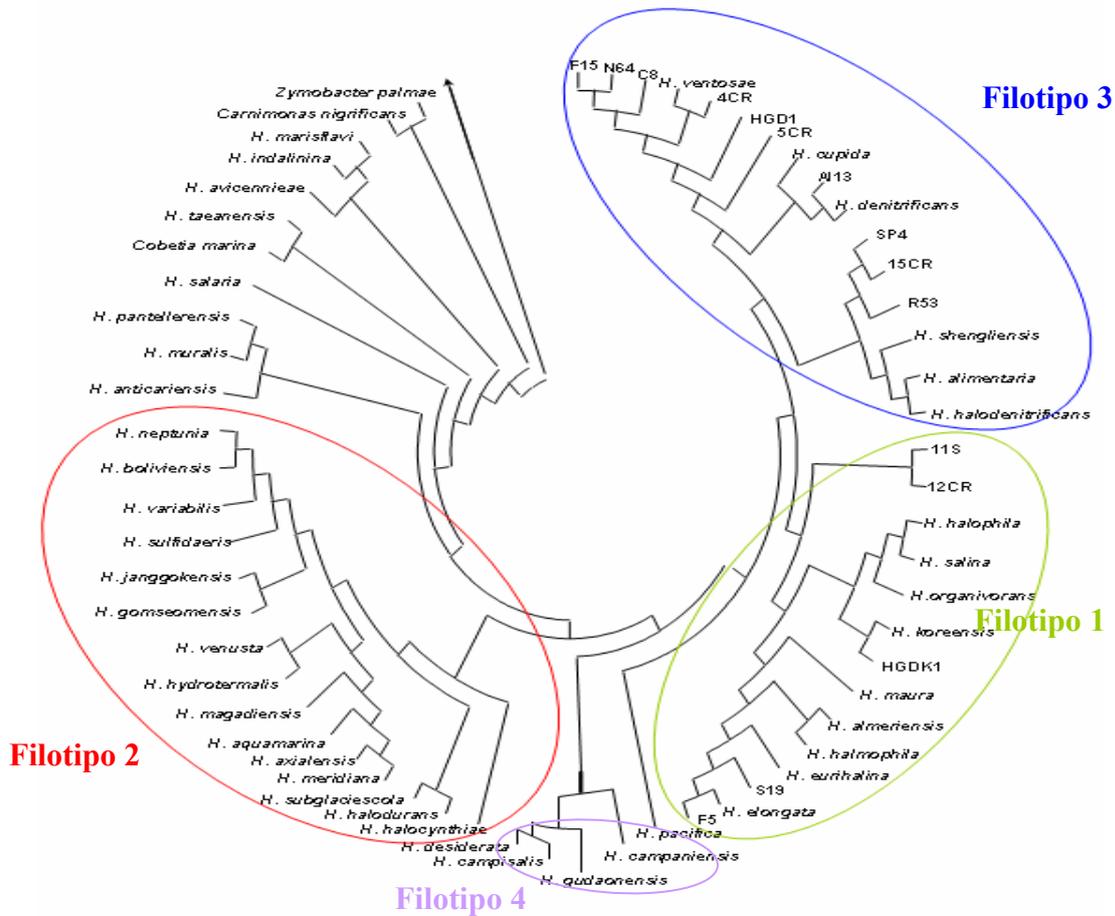


Figura 24. Árbol consenso simplificado, construido en base a la secuencia del gen ARNr 16S. La flecha apunta hacia los microorganismos empleados como especies externas. Para la obtención de esta reconstrucción filogenética se ha utilizado el programa CONSENSE del paquete informático PHYLIP (véase Material y Métodos del Capítulo III).

Los filotipos que hemos establecido son coherentes con los grupos establecidos en su momento por Arahal y colaboradores (2002a), si bien, como se ha mencionado anteriormente son sólo supuestos y no se descarta que alguno de los filotipos creados por nosotros pueda ser subdividido en más de un grupo evolutivo, cuando se disponga de mayor información. Así, el Filotipo 1 agrupa las mismas especies que el grupo 1 del mencionado trabajo y otras nuevas descritas en los últimos años: *H. almeriensis*, *H. koreensis*, *H. maura* y *H. organivorans*. En este filotipo encontramos las cepas F5, S19 y 12CR, que respiran sobre nitratos, y HGDK1 y 11S, desnitrificantes. Por su parte el Filotipo 2 también es coincidente con el grupo 2 de dicho estudio, englobando otras especies de nueva descripción como *H. axialensis*, *H. boliviensis*, *H. gomseomensis*, *H. hydrothermalis*, *H. janggokensis*, *H. neptunia* y *H. sulfidaeris*. *H. halocynthiae* podría integrarse en este filotipo, aunque está algo más alejada filogenéticamente de las otras. Por otra parte el Filotipo 3 estaría compuesto, con la excepción de *H. cupida*, por especies desnitrificantes, *H. denitrificans*, *H. halodenitrificans*, *H. shengliensis* y *H. ventosae*, así como por todas las cepas del fenón 2 que filogenéticamente además se relacionan con esta última especie. Además, microorganismos que en el trabajo original no aparecían en ningún filotipo, tras la descripción en los últimos años de nuevas especies aparecen ahora formando agrupaciones estables, como es el caso de *H. campaniensis*, *H. campisalis*, *H. desiderata* y *H. gudaonensis*. Todas ellas comparten las características de ser haloalcalófilas y, salvo en el caso de *H. campaniensis*, ser desnitrificantes (esta capacidad no se ha descrito en esa especie, pero tampoco ha sido comprobada).

Se ha llevado a cabo también el **análisis quimiotaxonómico** de cinco de las cepas caracterizadas en este trabajo, con objeto de profundizar en su clasificación. La metodología seguida se recoge en el apartado IV.1.D. de Material y Métodos, mientras que los resultados se muestran en la Tabla 28. La discusión de los mismos se planteará más adelante, en la descripción de los fena 1 y 4.

A continuación, comentaremos globalmente los resultados obtenidos tras el estudio polifásico, así como la situación taxonómica de los fena.

IV.3.1. FENÓN 1

Está formado por las cepas 11S y 12CR, aisladas de suelos salinos en Chile y Málaga, respectivamente. La semejanza fenotípica entre las cepas es de un 86.7%, bastante elevada, si bien, la principal diferencia entre ellas desde el punto de vista de nuestro estudio es la incapacidad de la cepa 12CR para llevar a cabo un proceso de desnitrificación completo. Esta discrepancia ha quedado evidenciada tanto con los tests fenotípicos realizados como con la detección y secuenciación de los genes específicos del proceso, ausentes en la cepa 12CR (Capítulo III). Las demás diferencias fenotípicas entre las cepas del fenón 1 se resumen en la Tabla 29 de la página 115.

Las células de las cepas 11S y 12CR miden entre 1,5-2,2 μm de largo por 0,4-0,5 μm de ancho. Acumulan en su interior gránulos de PHA, como se puede apreciar en la Figura 25 de la página siguiente. Producen exopolisacárido, si bien en el procesamiento de las muestras para microscopía electrónica las células son sometidas a una centrifugación, de modo que se pierde gran parte del EPS, observándose únicamente el que permanece adherido a ellas. En medio MY sólido al 7,5% (p/v) de sales originan colonias muy mucosas, de color blanco-crema, y en el caso de la cepa 11S el polisacárido a las semanas comienza a presentar un aspecto laxo.

Ambas cepas crecen adecuadamente entre el 0,5 y el 30 % (p/v) de la mezcla de sales, mientras que este intervalo se reduce desde el 3 al 20 % (p/v) cuando el medio sólo lleva NaCl. Además tienen un crecimiento apropiado entre 4 y 45°C, y a un pH de 5 a 10. Son resistentes al calentamiento a 80°C durante 10 minutos.

No producen ácidos a partir de ningún azúcar. Crecen en agar Mac Conkey y agar cetrimida. Poseen las enzimas ureasa y gelatinasa. Son, en cambio, negativas las pruebas ONPG, fenilalanina desaminasa, producción de pigmento a partir de tirosina, hidrólisis de caseína, esculina, lecitina, Tween 20 y Tween 80. Tampoco presentan actividad hemolítica.

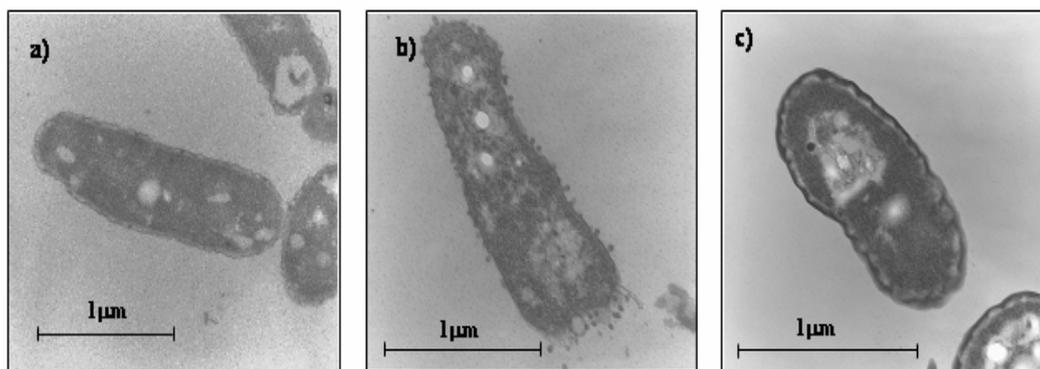


Figura 25. Fotografías de microscopía electrónica de las cepas 11S (imagen -a-, 40000X) y 12CR (imágenes -b- y -c-, 40000X y 50000X respectivamente), tras 12 horas de incubación. En la imagen b) se observan protuberancias de polisacárido durante el proceso de excreción del mismo.

En cuanto a las características nutricionales son capaces de utilizar como única fuente de carbono y energía, acetato, almidón, citrato, etanol, D-fructosa, fumarato, D-galactosa, DL-glicerol, gluconato, D-glucosa, lactato, maltosa, D-manitol, D-manosa, propionato, D-sorbitol, succinato y D-trehalosa. Por el contrario no fueron capaces de crecer cuando la única fuente de carbono y energía era adonitol, L-arabinosa, esculina o D-salicina. Como única fuente de carbono, nitrógeno y energía no podían emplear L-valina pero sí L-alanina, L-histidina y L-serina.

Ambas cepas son sensibles a la ampicilina, cefalotina, cefoxitina, gentamicina, penicilina y polimixina B. Son resistentes a la vancomicina.

Entre todas las especies de referencia, la cepa 11S presenta mayor semejanza fenotípica con *Halomonas alimentaria*, también desnitrificante, con un porcentaje del 85,3%. Por su parte, la cepa 12CR es más similar a *H. maura* (80,2%), mientras que con *H. alimentaria* presentaba un 76,6% de similitud. Hay que señalar que *H. maura* es solamente capaz de respirar sobre nitratos (Bouchotroch y col., 2001; Mata y col., 2002), al igual que la cepa 12CR. En la Tabla 29 se observan las características diferenciales entre las cepas del fenón entre sí y con estas especies.

Tabla 29. Características diferenciales entre las cepas del fenón 1, *H. alimentaria* y *H. maura*.

Prueba	Microorganismo	11S	12CR	<i>H. alimentaria</i> ^a DSM 15356 ^T	<i>H. maura</i> ^b CECT 5298 ^T
EPS		+	+	-	+
Tamaño (µm)		1,5-2.2 x 0,5	1,5-2 x 0,4-0,5	0.8-1.2 x 1.3-1.9	0.5-0.7 x 6.0-9.0
Morfología		Bacilo	Bacilo	Bacilo corto/cocobacilo	Bacilo largo
Crecimiento en sales % (p/v)		0,5-30	0,5-30	1-20	1-20
Crecimiento en NaCl % (p/v)		3-20	3-20	1-23	1-15
Crecimiento a 4°C		+	+	+	-
Oxidasa		+	-	+	+
H ₂ S		+	-	-	+
Reducción de NO ₂ ⁻ (aerobiosis)		+	-	+	+
Oxidación de gluconato		-	+	ND	+
Ureasa		+	+	+	-
Fosfatasa		-	+	ND	+
Crecimiento en agar cetrimida		+	+	ND	-
Hidrólisis de:					
ADN		+	-	+	-
Gelatina		+	+	-	-
Tirosina		+	-	-	-
Tween 20		-	-	-	+
Crecimiento ^c en:					
Almidón		+	+	+	-
L-arabinosa		-	-	+	+
D-celobiosa		-	-	+	-
D-fructosa		+	+	-	+
Lactosa		+	-	+	-
D-salicina		-	-	+	-
D-trehalosa		+	+	+	-
Formiato		-	+	-	-
Malonato		-	-	+	+
Succinato		+	+	-	+
<i>mio</i> -inositol		-	+	-	+
<i>iso</i> -leucina		-	+	D	-
L-lisina		+	-	+	+
L-valina		-	-	+	-
Susceptibilidad a:					
Sulfamida		+	+	-	+
Tobramicina		-	+	-	+
Trimetoprim-Sulfametoxazol		+	-	+	+

^a Datos obtenidos de esta Tesis Doctoral y de Yoon y col. (2002).

^b Datos obtenidos de Bouchotroch y col. (2001) y de Mata y col. (2002)

^c Sustratos utilizados como única fuente de carbono y energía o como única fuente de carbono, energía y nitrógeno
ND: No determinado

Por otra parte, para confirmar la posición taxonómica del fenón 1 se realizaron estudios genotípicos y filogenéticos. Los valores de G+C son 65,37±1,0 moles % para la cepa 11S y 68,78±0,2 moles % para 12CR. Estos valores se encuentran próximos a los 63,0 moles % de *H. alimentaria* ó 64,1 moles % de *H. maura*. No obstante, como ya se ha apuntado varias veces a lo

largo de esta memoria este dato habrá que interpretarlo con cautela, pues no siempre es el reflejo de similitud entre genomas, sino simplemente del contenido en determinados nucleótidos.

En el análisis filogenético se observa que ambas cepas presentan una semejanza entre sí en el gen ARNr 16S de un 98,8%. Además, también desde el punto de vista filogenético están muy próximas a *Halomonas alimentaria*, con valores de similaridad de un 98,1% para 11S y de un 97,6% para 12CR. Por su parte, la semejanza con *H. organivorans* es de 97,9% con 11S y de 97,2% con 12CR. Esta proximidad nos obligó a realizar experimentos de hibridación ADN-ADN; los resultados obtenidos en la reasociación del ADN de las dos cepas es aproximadamente de 71-72% (véase Tabla 26, página 100), muy cercano al límite del 70% para confirmación de microorganismos de la misma especie (Grimont 1981; Wayne y col., 1987; Stackebrandt y col., 2002). De otro lado, el porcentaje de hibridación de la cepa 11S, elegida como representante del fenómeno, con *H. alimentaria* y *H. organivorans* es de 54,2±6 y 47,25%, respectivamente.

Por último, se realizó un estudio quimiotaxonómico de ambas cepas, determinándose que su perfil de ácidos grasos es similar entre ellas (Tabla 28, página 104).

Resumiendo, la cepa 11S aunque fenotípica y filogenéticamente se relacionaba con *H. alimentaria*, la semejanza no es tan elevada como para considerarse la misma especie. Así, junto con los experimentos de hibridación ADN-ADN, consideramos que se trata de un nuevo taxón y proponemos una nueva especie desnitrificante dentro del género *Halomonas*, con **11S^T** como cepa tipo, *Halomonas nitratireducens* (ni.trati.re.du'cens; Gr.N. *nitrum*, nitrato; N.L. adj. *reducens* V.L. *reduco*, reducir, convertir a una diferente condición; N.L. part. adj. *nitratireducens* = que reduce el nitrato). El trabajo con la descripción completa de la nueva especie se puede encontrar en el Apéndice X.

Por otra parte, nos planteamos la inclusión de la cepa 12CR en la nueva especie a describir. Las semejanzas fenotípicas, filogenéticas y quimiotaxonómicas ya han sido comentadas anteriormente, mostrando que existen suficientes evidencias como para considerarse dentro del mismo taxón. Sin embargo, los experimentos de hibridación parecen indicar que podría tratarse de un genotipo de *H. nitratireducens*. El porcentaje de hibridación del 71-72% se encuentra en el

límite del 70% (Waine y col., 1987), establecido para microorganismos de la misma especie, pero bastante reducido en comparación con la semejanza fenotípica. El concepto de genomovar fue por primera vez empleado en el género *Pseudomonas* para designar microorganismos fenotípicamente muy similares pero genéticamente no tanto. Un genomovar se considera carente de un rasgo fenotípico diferencial con respecto a otros genomovares, pues de existir y tener suficiente importancia podría considerarse una especie distinta (Lalucat y col., 2006). En este caso, a pesar de la semejanza fenotípica, ambas cepas podrían distinguirse fenotípicamente en base a su capacidad para desnitrificar.

Será necesario en el futuro realizar experimentos complementarios que determinen definitivamente la posición taxonómica de 12CR. Entre las técnicas propuestas están ciertos métodos de tipado inter e intraespecífico, RAPD, AFLP, PFGE, etc,... plenamente aceptados en Sistemática bacteriana (Stackebrandt y col., 2002). La secuenciación en este trabajo de tan sólo un gen funcional, *narH* (no es desnitrificante y los otros genes del proceso no han sido detectados) no es suficiente para discernir su posición, si bien mediante dicho gen su relación filogenética con 11S no es tan próxima (apartado V.2.).

IV.3.2. FENÓN 2

Es el más ampliamente representado, en concreto, por cinco cepas: 4CR, C8, F15, HGD1 y N64. Se vuelve a poner de manifiesto como en el fenón anterior, que la agrupación fenotípica es independiente del lugar en el que fueron aisladas las cepas. Así, las cepas 4CR y F15 proceden de Málaga, la cepa C8 de una salina solar en Chile, la cepa HGD1 fue aislada en Rusia y la cepa N64 en Almería. Estas cepas se asocian entre sí a un 86,7%, mientras que los mayores porcentajes de semejanza con las especies de referencia los encontramos con *Halomonas maura* (siendo el más alto de 82,5% en la cepa C8), con *H. alimentaria* (valor más alto para la bacteria HGD1, con un 81,1%) y con *H. campisalis* (80,2% en la cepa 4CR).

Todas las cepas del fenón se caracterizan por originar en medio MY sólido al 7,5% (p/v) colonias de color crema. Éstas son de carácter mucoso, siéndolo en menor medida las de las cepas 4CR y C8. Las células acumulan PHA en su interior y son de pequeño tamaño, con excepción

también de la cepa C8, cuya longitud es mayor a 3µm. Crecen adecuadamente entre un 3 y un 25 % (p/v) de sales y entre un 3 y un 20 % (p/v) de NaCl. Resulta interesante comprobar que la cepa N64 es capaz de crecer en medio MY no suplementado con sal ni NaCl. Sin embargo, su óptimo de crecimiento se sitúa al 7,5-10% (p/v) de ambos, con lo cual podría ser considerada como halófila moderada, de acuerdo a los criterios de Kushner y Kamekura (1988), expuestos en la Introducción. No obstante, para comprobar exactamente su crecimiento en ausencia de sal deberían ser empleado un medio mínimo, tal y como recomienda Arahal y col. (2007). Asimismo, se observa que las cinco cepas crecen óptimamente en el intervalo de 15 a 45°C y a un pH de 6 a 10. Resisten el calentamiento a 80°C durante 10 minutos.

Las cepas de este fenón crecen en agar Mac Conkey pero no en agar cetrimida. En cuanto a las actividades enzimáticas, son ureasa, fenilalanina desaminasa y DNAsa positivas, si bien ninguna de ellas hidroliza la gelatina, el Tween 80 o la lecitina. No producen pigmento a partir de la tirosina ni presentan actividad hemolítica.

Todas van a reducir el nitrito en aerobiosis y, con excepción de la cepa HGD1, originan una pequeña burbuja de gas en la campanita de Durham. Esta burbuja se relaciona con la formación de N₂ más que con la de otros gases como N₂O ó CO₂, ya que éstos solamente la producen cuando se excede su solubilidad en el medio (Brettar y Höfle, 1993). Con el propósito de descartar una posible influencia del pH, se repitió la prueba a pH 6-10, obteniéndose el mismo resultado. No obstante, la formación de burbuja en la campanita de Durham es un factor muy variable y no debería tomarse como criterio único para la detección de microorganismos desnitrificantes (Brettar y Höfle, 1993). Esta variabilidad podría explicarse en la extrema sensibilidad al oxígeno de las óxido nitroso reductasas, sensibilidad ya descrita en organismos como *Paracoccus denitrificans* (Alefounder y Ferguson, 1982). Así, la cepa HGD1 fue seleccionada mediante el test de Callies y Mannheim (1978) por observarse crecimiento y desplazamiento del tapón de agar (Capítulo I); en esta prueba, que tiene lugar en anaerobiosis, se descartó que lo observado se debiese a un proceso fermentativo ya que el medio viraba a rosa como consecuencia de la alcalinización. Sin embargo, la no detección del gen *nosZ* en la cepa HGD1 (apartado V.2.) nos conduce a pensar que tiene lugar un proceso de desnitrificación pero que éste podría detenerse en el paso de NO a N₂O; la observación en anaerobiosis de gases podría

deberse a una alta actividad óxido nítrico reductasa que, aunque funcional en aerobiosis, cabe la posibilidad de que sea estimulada por la ausencia de oxígeno, superando la solubilidad del óxido nítrico en el medio. El producto final del proceso será confirmado en un futuro mediante cromatografía de gases.

En cuanto a las propiedades nutricionales las cepas presentan bastante semejanza entre sí. Son capaces de utilizar como única fuente de carbono y energía acetato, almidón, L-arabinosa, citrato, D-fructosa, D-galactosa, gluconato, D-glucosa, lactato, lactosa, maltosa, manitol y manosa, pero no adonitol, etanol, esculina o formiato. Pueden usar como fuente de carbono, nitrógeno y energía los siguientes compuestos: L-alanina y L-serina pero no L-lisina.

Son sensibles a la ampicilina, cefalotina, cefoxitina, ceftazidima, doxiciclina, penicilina, polimixina B y trimetroprim-sulfametoxazol, pero son resistentes a vancomicina.

En la Tabla 30 se recogen las características diferenciales de las cinco.

Tabla 30. Características diferenciales entre las cepas del fenón 2.

Prueba \ Cepa	4CR	C8	F15	HGD1	N64
EPS	+	+	++	++	++
Movilidad	+	-	-	-	-
Longitud >3µm	-	+	-	-	-
Crecimiento en sales % (p/v)	0,5-25	0,5-25	0,5-30	3-30	0-30
Crecimiento en NaCl % (p/v)	3-20	3-20	3-25	3-25	0-25
Crecimiento a 4°C	-	-	+	+	+
Crecimiento a pH 5	-	+	-	-	+
Oxidasa	+	+	-	+	+
Producción de ácidos de la glucosa	+	-	+	+	-
H ₂ S	-	-	+	-	-
Oxidación de gluconato	-	D	-	D	+
ONPG	+	-	+	-	+
Fosfatasa	-	+	-	-	+
Hidrólisis de:					
Caseína	-	-	-	-	+
Esculina	+	+	+	-	+
Tirosina	-	-	-	-	+
Tween 20	+	+	+	+	-
Crecimiento ^a en:					
D-salicina	-	-	-	+	-

^a Sustratos utilizados como única fuente de carbono y energía o como única fuente de carbono, energía y nitrógeno
D: Resultado dudoso

Tabla 30. Continuación.

Prueba \ Cepa	4CR	C8	F15	HGD1	N64
Crecimiento^a en:					
D-trehalosa	+	+	-	+	+
Fumarato	+	+	-	-	+
Propionato	+	+	-	-	+
Succinato	+	+	-	+	+
DL-glicerol	+	+	+	-	+
DL-mio-inositol	+	-	-	+	+
D-sorbitol	+	+	-	+	+
L-histidina	+	-	-	+	-
DL-iso-leucina	-	+	-	-	+
L-valina	-	-	+	-	-
Susceptibilidad a:					
Norfloxacino	I	I	I	I	S
Aztreonam	S	S	S	S	R
Tobramicina	S	I	S	S	S
Gentamicina	S	I	S	S	S

^a Sustratos utilizados como única fuente de carbono y energía o como única fuente de carbono, energía y nitrógeno
I: Resultado intermedio

En relación a los estudios genotípicos, se observa que el contenido en G+C de las cinco cepas del fenón presenta valores muy similares, con un margen de variación entre ellos muy pequeño. Se sitúan entre 66,0 y 67,5 moles % (véase Tabla 25, página 99).

Por otro lado, la similitud en las secuencias del gen ARNr 16S es superior al 99,4% entre las cepas del fenón, lo que claramente nos indica que estamos ante cepas de una misma especie. Con respecto a las especies de referencia, filogenéticamente se sitúan muy próximas a *Halomonas ventosae*, con una semejanza superior al 99%. Con respecto a *H. alimentaria*, especie con la cual guardaban elevada semejanza fenotípica, se aprecia que desde el punto de vista filogenético se sitúan a una distancia mayor (98,0% es el valor de semejanza máximo para 4CR y N64).

En resumen, se puede decir que las cinco cepas del fenón 2 pertenecen a un mismo taxón. Aunque fenotípicamente no se agrupan con *H. ventosae* a nivel de especie, consideramos que existe una semejanza suficientemente elevada entre estos microorganismos (próxima al 80%), lo cual, apoyado en los datos filogenéticos, nos confirma la estrecha relación existente entre ellos. Quizás la diferencia más notable la encontremos en el contenido en G+C, que en el caso de *H. ventosae* es de un 72,6-74,6 moles %, 5 ó 6 unidades por encima del valor de nuestras cepas, pero

ya se ha explicado que éste no es un carácter determinante. En la Tabla 31 se muestran las características diferenciales entre *H. alimentaria*, *H. ventosae* y la cepa N64, elegida como representante del fenón.

Tabla 31. Características diferenciales entre *H. alimentaria*, *H. ventosae* y la cepa N64, representante del fenón 2.

Prueba	Microorganismo	N64	<i>H. alimentaria</i> ^a DSM 15356 ^T	<i>H. ventosae</i> ^b CECT 5797 ^T
EPS		+	-	+
Movilidad		-	-	+
Morfología		Bacilo	Bacilo corto/cocobacilo	Bacilo
Crecimiento en sales % (p/v)		0-30	1-20	1-15
Óptimo % (p/v) de sales		3-10	1-13	8
Crecimiento en T ^a (°C)		4-45	4-45	15-50
Crecimiento en pH		5-10	5-10	6-10
H ₂ S		-	-	+
ONPG		+	-	-
Crecimiento en Mac Conkey		+	ND	-
Ureasa		+	+	-
Fosfatasa		+	ND	+
Hidrólisis de:				
ADN		+	+	-
Caseína		+	-	-
Esculina		+	-	-
Tirosina		+	-	+
Tween 20		-	-	+
Crecimiento ^c en:				
Almidón		+	+	-
L-arabinosa		+	+	-
D-celobiosa		+	+	-
Esculina		-	-	+
D-fructosa		+	-	+
D-manosa		+	+	-
D-salicina		-	+	-
Malonato		-	+	+
Succinato		+	-	+
Adonitol		-	-	+
Etanol		-	+	-
<i>mio</i> -inositol		+	-	+
L-alanina		+	+	-
L-histidina		-	+	-
L-lisina		-	+	-
L-serina		+	+	-
L-valina		-	+	-
Susceptibilidad a:				
Sulfamida		S	R	S
Tobramicina		S	R	R
Contenido en G+C (moles %)		67,14±0,1	63,0	72.6–74.6

^a Datos obtenidos de esta Tesis Doctoral y de Yoon y col. (2002)

^b Datos obtenidos de Martínez-Canovas (2004a)

^c Sustratos utilizados como única fuente de carbono y energía o como única fuente de carbono, energía y nitrógeno

ND: No determinado

IV.3.3. FENÓN 3

Está formado por dos cepas, F5 y S19, aisladas de Málaga y Asilah (Marruecos) respectivamente, capaces de respirar sobre nitratos pero no sobre nitritos, ni de realizar un proceso de desnitrificación. Ambas cepas se agrupan entre sí a un 95,2% de semejanza y con *H. eurihalina* a un 82,1%. Con el fenón 1 muestran un porcentaje de semejanza fenotípica de 81,1% y con el fenón 2 de 79,2%.

En el medio MY sólido al 7,5% (p/v) ambas cepas producen exopolisacárido, en mayor medida S19, dando lugar a colonias de color crema bastante mucosas. Sus células son de pequeño tamaño y no acumulan PHA en su interior. Crecen adecuadamente al 0,5-30% (p/v) de sales y al 0,5-25% de NaCl, en un rango de temperaturas de 4-45°C y pH 5-10.

Ninguna de las cepas produce ácidos a partir de la glucosa y ambas son oxidasa negativas. Van a producir H₂S a partir de L-cistina pero no reducen los nitritos en aerobiosis ni oxidan el gluconato. También dan negativas las pruebas ONPG, fenilalanina desaminasa, hidrólisis de caseína, esculina, lecitina, Tween 80, tirosina y producción de pigmento a partir de ésta. Por el contrario, presentan otras actividades bioquímicas: Fosfatasa e hidrólisis de ADN, gelatina, Tween 20 y urea. Crecen en agar Mac Conkey y agar cetrimida.

Desde el punto de vista nutricional, la semejanza entre ambas cepas es muy elevada, únicamente se diferencian en la utilización como fuente de carbono, nitrógeno y energía en tres compuestos (véase Tabla 22, página 94). Así, las dos cepas eran capaces de utilizar como fuente de carbono y energía una muy amplia variedad de sustratos: Acetato, almidón, L-arabinosa, D-celobiosa, citrato, esculina, D-fructosa, fumarato, D-galactosa, DL-glicerol, gluconato, D-glucosa, *mio*-inositol, lactato, lactosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, propionato, D-salicina, D-sorbitol, succinato y D-trehalosa. No son, sin embargo, capaces de emplear el formiato. Por otro lado, como fuente de carbono, nitrógeno y energía usan L-alanina, L-histidina, *iso*-leucina, L-lisina y L-serina.

En cuanto a la susceptibilidad a agentes antimicrobianos son sensibles a aztreonam, ceftazidima, gentamicina, tobramicina y trimetoprim-sulfametoxazol. Son, en cambio, resistentes a ampicilina, cefalotina, ceftioxina, doxiciclina, penicilina, polimixina B y vancomicina.

El contenido en G+C moles % es muy similar en ambas cepas: 64,29±1,0 moles % en F5 y 62,45±0,2 moles % en S19. Estos valores están muy próximos también a los de *H. eurihalina*, 65,7 moles % (Quesada y col., 1990).

Por otra parte, la relación filogenética entre ambas cepas es muy estrecha, con un porcentaje de semejanza del 99,8% entre sus secuencias del gen ARNr 16S. Esto corrobora, junto con los datos anteriores, su pertenencia a la misma especie. Asimismo, también filogenéticamente se confirma que ambas cepas pertenecen a la especie *H. eurihalina*, con una similitud del 99,1% y 98,9% y una divergencia de tan sólo 0,3 y 0,6 para S19 y F5, respectivamente. Con el resto de especies de referencia, la semejanza filogenética es inferior al 98%, siendo *H. elongata* con su 97,8 % de similitud con F5, la mayor relación encontrada, aparte de *H. eurihalina*.

Las diferencias entre las cepas del fenón 3 y *H. eurihalina* se recogen en la Tabla 32.

Tabla 32. Características diferenciales entre las cepas del fenón 3 y *H. eurihalina*.

Prueba	Microorganismo	F5	S19	<i>H. eurihalina</i> ^a ATCC 49336 ^T
Movilidad		+	-	-
PHA		-	-	+
Crecimiento al 30% (p/v) de sales		+	+	-
Crecimiento al 30% (p/v) de NaCl		+	-	-
ONPG		D	-	+
Oxidación de gluconato		-	-	+
Hidrólisis de:				
ADN		+	+	-
Esculina		-	-	+
Tirosina		-	-	+
Tween 80		-	-	+
Producción de pigmento de la tirosina		-	-	+
Hemolisis		-	+	-
Crecimiento ^b en:				
Almidón		+	+	-
Esculina		+	+	-

^a Datos obtenidos de Quesada y col. (1990) y de Mata y col. (2002)

^b Sustratos utilizados como única fuente de carbono y energía o como única fuente de carbono, energía y nitrógeno

Tabla 32. Continuación.

Prueba	Microorganismo	F5	S19	<i>H. eurihalina</i> ^a ATCC 49336 ^T
Crecimiento^b en:				
	Adonitol	+	-	+
	Etanol	+	-	-
	DL-glicerol	+	+	-
	Malonato	-	-	+
	L-valina	+	-	+
Susceptibilidad a:				
	Amoxicilina	S	S	R
	Cefoxitina	R	R	S
	Norfloxacino	I	R	ND
	Polimixina B	R	R	S
Contenido en G+C (moles %)		64,29±1,0	62,45±0,2	65,7

^a Datos obtenidos de Quesada y col. (1990) y de Mata y col. (2002)

^b Sustratos utilizados como única fuente de carbono y energía o como única fuente de carbono, energía y nitrógeno

I: Intermedio

ND: No determinado

IV.3.4. FENÓN 4

Este fenón incluye tres cepas 15CR, R53 y SP4, agrupadas entre si a un 89,5%. Estas cepas fueron aisladas de Málaga (cepa 15CR), Murcia (cepa R53) y Alicante (cepa SP4), poniéndose nuevamente de manifiesto que la agrupación fenotípica es independiente del lugar geográfico de origen. El porcentaje de semejanza con el resto de fena es bajo, de un 78,1% con el fenón 1, 74,3% con el fenón 2 y 65,4% con el fenón 3. También se sitúa por debajo del nivel de 85%, la relación fenotípica con otras especies de referencia, encontrándose la máxima semejanza fenotípica con *H. maura* (80%), *H. alimentaria* (78,7%) o *H. desiderata* (76,2%).

Las cepas de este fenón son bacilos con un tamaño aproximado de 1,9-2,8 µm de largo por 0,7-0,9 µm de ancho, apareciendo solos o agrupados en parejas. Las células son inmóviles y tras 24 horas de incubación acumulan múltiples y grandes gránulos de PHA en su interior, como se puede observar en la Figura 26. También en esta imagen, especialmente en la fotografía de 15CR, se observan gránulos de polifosfatos teñidos de negro. Los microorganismos capaces de desnitrificar y acumular fosfato se conocen como dPAO (*denitrifying poly-phosphate accumulating organisms*). Esta característica es muy interesante desde el punto de vista biotecnológico para descontaminación de aguas residuales, pues éstas, como ya se ha dicho en la

introducción, suelen contener no sólo abundantes cantidades de nitratos sino también de fosfatos. Aunque tradicionalmente se ha sostenido que los gránulos de PHA sólo se formaban en condiciones anaerobias y los de polifosfato en aerobias (Kortstee y col., 2000), existen microorganismos desnitrificantes como *Paracoccus denitrificans* en los que la formación de polifosfatos podía tener lugar tanto si el aceptor final era el oxígeno como el nitrato (Barak y van Rijn, 2000). En una planta de tratamiento, dPAOs como la especie mencionada posibilitarían la eliminación de nitrógenos y fósforo en un sólo paso. Así, sería interesante en este sentido, demostrar si los gránulos de polifosfato en 15CR son también producidos durante el proceso de desnitrificación.

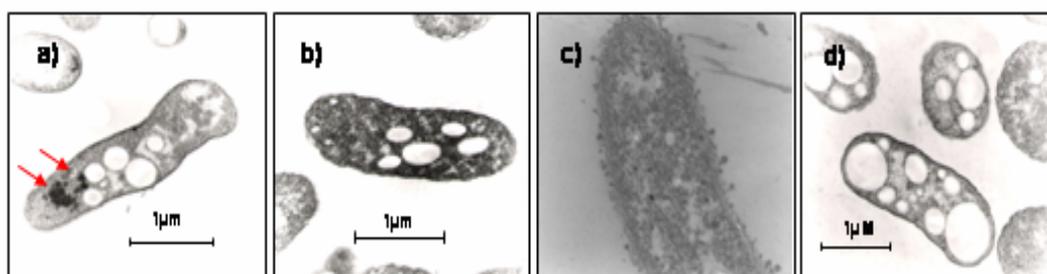


Figura 26. Fotografías de microscopía electrónica de las cepas 15CR (imagen -a-, 25000x), R53 (imágenes -b- y -c-, 35000X y 50000X, respectivamente) y SP4 (imagen -d-, 31500), tras 24 horas de incubación. En la imagen c) se observan protuberancias de polisacárido durante el proceso de excreción del mismo.

Las cepas producen exopolisacárido (véase imagen c) de la Figura superior), dando origen en medio MY 7,5 % (p/v) a colonias mucosas de color naranja pálido. Van a crecer adecuadamente entre un 3 y un 25% (p/v) de sales y un 7,5-20 % (p/v) de NaCl. El rango óptimo para el crecimiento en cuanto a temperatura y pH se sitúa entre 4 y 45°C y 5 y 10, respectivamente.

No producen ácidos a partir de ningún sustrato. Son oxidasa positivos, reducen los nitratos y nitritos en aerobiosis y oxidan el gluconato. Por otro lado, son negativas las pruebas de ONPG, hidrólisis de caseína, esculina, lecitina, formación de H₂S y producción de pigmento a partir de la tirosina. Tampoco poseen fenilalanina desaminasa ni actividad hemolítica en ninguna de las dos condiciones ensayadas. Por el contrario, van a producir enzima ureasa y fosfatasa e hidrolizan DNA y Tween 20. Crecen en agar Mac Conkey pero no en agar cetrimida.

En cuanto a sus requerimientos nutricionales, son capaces de utilizar como única fuente de carbono y energía los siguientes compuestos: Acetato, citrato, fumarato, D-gluconato, D-glucosa, D-maltosa, D-manosa y succinato. Mientras que esculina, galactosa, formiato y sorbitol no pueden ser utilizados en esas condiciones. Tampoco L-alanina, *iso*-leucina, L-lisina y L-valina pueden ser usados como única fuente de carbono, nitrógeno y energía.

Son susceptibles a ampicilina, aztreonam, cefalotina, cefoxitina, ceftazidima, doxiciclina, gentamicina, norfloxacino, penicilina, polymixina B y trimetoprim-sulfametoxazol. Presentan, en cambio, resistencia a tobramicina.

Las características fenotípicas diferenciales entre las cepas del fenón, se recogen en la Tabla 33.

Tabla 33. Características fenotípicas diferenciales entre las cepas del fenón 3.

Prueba \ Cepa	15CR	R53	SP4
Crecimiento al 3% (p/v) de NaCl	-	-	+
Crecimiento al 5% (p/v) de NaCl	+	-	+
Resistencia a 80°C durante 10 min	-	+	-
Hidrólisis de:			
Tween 80	+	-	+
Gelatina	-	+	-
Tirosina	+	-	+
Crecimiento ^a en:			
Almidón	+	+	-
L-arabinosa	-	+	-
D-celobiosa	+	-	-
D-fructosa	+	-	-
Lactosa	-	+	-
D-salicina	-	-	+
D-trehalosa	+	-	-
Lactato	+	+	-
Adonitol	-	+	-
Etanol	+	-	+
DL-glicerol	+	-	-
<i>mio</i> -inositol	+	-	-
D-manitol	-	+	-
L-histidina	+	-	-
L-serina	+	-	+
Susceptibilidad a:			
Vancomicina	D	R	R

^a Sustratos utilizados como única fuente de carbono y energía o como única fuente de carbono, energía y nitrógeno

D: Dudoso

El contenido en G+C de las tres cepas es muy similar, especialmente entre las cepas R53 y SP4, siendo en estos dos casos de 66,2 moles %. En el caso de la cepa 15CR, el valor es algo menor, de un 62,7 moles %.

El estudio quimiotaixonómico pone de manifiesto un perfil similar de ácidos grasos (véase Tabla 28), así como una predominancia de la quinona 9, si bien en el caso de la cepa R53, podemos encontrar también un 6% de Ubiquinona 8.

Desde el punto de vista filogenético, las 3 cepas de este fenón se relacionan por encima del 99%, lo cual junto con los datos anteriores, confirma su pertenencia al mismo taxón. Por otra parte, las especies relacionadas filogenéticamente son *Halomonas alimentaria*, *H. campaniensis*, *H. gudaonensis* y *H. ventosae*. Sin embargo, la similaridad del gen ARNr 16S con ellas no es muy alta, inferior siempre al 97%, límite orientativo de especie (Stackebrandt y Goebel, 1994). Los valores de semejanza más altos se obtenían con *H. alimentaria* (96.3%).

Tras comparar las características fenotípicas, genotípicas y filogenéticas de las cepas del fenón 4, se consideró que podría tratarse de una nueva especie desnitrificante del género *Halomonas*. Así, se propuso un nuevo taxón, *Halomonas cerina* (ce.ri'.na; L. adj. *cerina*, del color de la cera de las abejas, para describir el color de las colonias), con la cepa **SP4^T** como cepa tipo. Se puede encontrar en el Apéndice X el trabajo con la descripción completa de la nueva especie, así como con las características diferenciales respecto a las especies de *Halomonas* más próximas fenotípica o filogenéticamente.

IV.3.5. CEPAS NO INCLUIDAS EN LOS FENA DESCRITOS

Se trata de tres cepas, A113, 5CR y HGDK1, aisladas de Jaén, Málaga y Siberia (Rusia). Todas ellas son capaces de desnitrificar, pero no guardan similitud fenotípica con el resto de microorganismos y especies de referencia, agrupándose por debajo del 78%. La semejanza de las

tres cepas entre sí no supera el 74%. Brevemente expondré a continuación las características más destacadas de estas cepas.

Cepa 5CR

La mayor semejanza fenotípica la encontramos con *Halomonas desiderata* (74,3%), pero es un valor bastante bajo como para considerarse del mismo taxón. Y es que la cepa 5CR muestra algunas propiedades fenotípicas inusuales entre los microorganismos de este trabajo: Así, es la única de las cepas estudiadas que no presenta actividad ureasa o crecimiento en agar Mac Conkey. Por otra parte, ha manifestado actividad lecitinasa, sólo encontrada en las cepas A113 y HGDK1.

El análisis filogenético revela que podría tratarse de una nueva especie desnitrificante del género *Halomonas*, al presentar valores de semejanza no muy altos con las especies válidamente descritas hasta la fecha (la semejanza más elevada es de un 97,8% con *H. ventosae*).

A113

Esta cepa fenotípicamente guarda la mayor semejanza con *H. desiderata* (78%), perteneciente al fenón C del trabajo de Mata y colaboradores (2002). Con las especies de dicho fenón la cepa A113 comparte la característica de utilizar un reducido número de sustratos como única fuente de carbono, nitrógeno y energía (tan sólo emplea 5 de los 35 compuestos ensayados; véanse Tablas 21 y 22 en el apartado de resultados).

Desde el punto de vista filogenético es más cercana a *H. denitrificans* (98,2%), si bien con ella presenta una diferencia significativa en cuanto a contenido en G+C: 66,0 moles % en la cepa A113 y 53,8 moles % en *H. denitrificans*, casi acercándonos a la diferencia de 15 moles %, límite orientativo entre géneros (Goodfellow y col., 1997). La relación filogenética de la cepa A113 con *H. campisalis* y *H. desiderata*, fenotípicamente similares, se sitúa en ambos casos al 94,6%.

El análisis quimiotaxonómico también da un patrón de ácidos grasos diferente al descrito para *H. denitrificans* (Kim y col., 2007). Como se puede observar en la Tabla 34 los ácidos grasos

mayoritarios coinciden, si bien la proporción de cada uno de ellos es diferente entre la cepa A113 y *H. denitrificans*.

Tabla 34. Composición en ácidos grasos de la cepa A113 y *H. denitrificans*.

CEPA	A113	<i>H. denitrificans</i> * M29 ^T
Ácido graso		
10:0	3,09	2,4
10:0 3OH	0,29	-
11:0 ISO	0,21	-
12:0	0,57	-
12:0 3OH	6,38	7,4
14:0	0,83	-
15:0	-	-
16:0	28,20	21,1
17,0 CYCLO	0,83	-
17:0	0,06	-
18:0	0,08	-
18:1 ω5c	0,08	-
18:1 ω7c	13,83	47,2
11 methyl 18:1 ω7c	-	-
19:0 cyclo ω8c	0,83	trazas ^a
15:0 ISO 20H/ 16:1 ω7c	44,01	21,2

-: No detectado

*: Datos tomados de Kim y col., 2007

^a: Menos del 1%

La evaluación detenida de todos los datos obtenidos, junto con la realización de experimentos de hibridación ADN-ADN con *H. denitrificans*, determinarán si finalmente la cepa A113 constituye un nuevo taxón. En la Figura 27 se muestra una imagen de la cepa al microscopio electrónico.

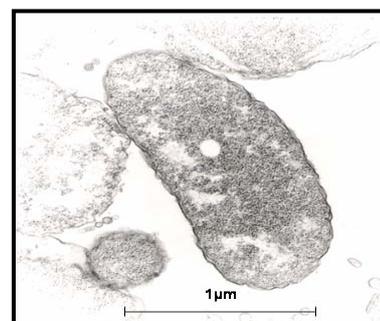


Figura 27. Fotografía al microscopio electrónico de la cepa A113 (31500X)

HGDK1

Por último, la cepa HGDK1 mostraba una semejanza fenotípica muy baja con respecto a las especies de referencia (valores más altos, 74,5% y 74,3 % para *H. alimentaria* y *H. maura* respectivamente) y demás cepas del estudio (75,2% para la cepa N64). Los dos principales rasgos diferenciadores con el resto de nuevos aislados son la producción de fluoresceína en Agar King y la movilidad por medio de flagelos peritricos (véase Figura 17, página 87).

Desde el punto de vista filogenético y genético es semejante a *H. koreensis*. Así, sus genes ARNr 16S guardan una semejanza del 98,9%. En cuanto al contenido en G+C, difieren en poco más de una unidad (68,8 moles % para HGDK1 y 70 moles % para *H. koreensis*). Estos datos apoyan su pertenencia a un mismo taxón. En este sentido sería interesante disponer en *H. koreensis* de un mayor número de características fenotípicas que permitan realizar un análisis numérico como el llevado a cabo en este trabajo. La uniformidad de criterios en la descripción fenotípica de nuevas especies de *Halomonas*, tal y como proponen Arahal y col. (2007), facilitará enormemente la comparación entre taxa del género. No obstante, como en la cepa A113, los resultados de hibridación ADN-ADN determinarán finalmente si se trata de una nueva especie del género *Halomonas*.

Capítulo III:

Análisis filogenético del proceso de desnitrificación en el género Halomonas

RESUMEN

Tras determinar fenotípicamente la capacidad desnitrificante de los microorganismos objeto de estudio, se realizó un análisis a nivel molecular de esta propiedad. Para ello se decidió secuenciar los genes *narH*, *nirS/nirK* y *nosZ*, que codifican etapas claves de un proceso de desnitrificación completo, siguiendo la metodología de Petri e Imhoff (2000), Braker y col. (1998), y Scala y Kerkhof (1998), respectivamente. Una vez que se dispuso de las secuencias, éstas fueron empleadas con fines filogenéticos, utilidad ya descrita anteriormente en los trabajos mencionados.

El proceso de desnitrificación se extiende entre ramas filogenéticas muy dispares, por ello la filogenia a partir del gen ARNr 16S puede ser complementada con la información que los genes funcionales mencionados aportan. En relación al gen *narH* comprobamos que la filogenia es altamente coincidente con la del gen ribosómico, agrupándose por un lado los microorganismos que sólo respiran sobre nitratos, de forma separada a otros con capacidad desnitrificante; como excepción se encontraría la especie *Halomonas maura*, que se agrupaba con las cepas 11S y HGDK1.

Con respecto al gen *nirS* observamos que la influencia del método filogenético usado es mayor cuando la filogenia se establece en base a la secuencia de aminoácidos que cuando partimos de la de nucleótidos y más acusada que en el caso del gen *narH* y proteína correspondiente. No obstante, la mayoría de agrupaciones vistas tanto en aquel gen como en el ribosómico, se mantienen estables independientemente del algoritmo usado y con valores de “bootstrap” altos.

Por último, con el gen *nosZ* encontramos la mayor divergencia con respecto a la filogenia del gen ribosómico, lo que sugiere una tasa de mutación algo mayor que en los genes anteriores. Las agrupaciones en general son discordantes con las observadas para los genes ARNr16S, *narH* y *nirS*, si bien la relación filogenética entre *Halomonas campisalis* y *H. desiderata* se vuelve a poner de manifiesto, demostrando una línea evolutiva diferente a la del resto de microorganismos estudiados.

La filogenia se estableció no sólo en base a la secuencia de nucleótidos de esos genes sino también a partir de la deducida de aminoácidos de las proteínas correspondientes, con conclusiones similares a las mencionadas en los párrafos anteriores.

SUMMARY

The ability to use nitrate as a terminal electron acceptor or denitrify has been tested phenotypically and described in previous chapters, so we decided to focus on a molecular analysis of the process. To this aim, the *narH*, *nirS/nirK* and *nosZ* genes were sequenced following the methodologies of Petri and Imhoff (2000), Braker et al. (1998), and Scala and Kerkhof (1998), respectively. These genes encode enzymes participating in key steps of a denitrification process.

In addition, the sequences obtained were also employed in a phylogenetic analysis. The denitrification process is found in a wide variety of bacterial lineages (Zumft, 1997; Philippot, 2002), so an approach involving 16S rRNA gene could be complemented with those functional genes, whose usefulness in phylogenetic studies is well established (mentioned articles before).

With regard to the *narH* gene, we observed congruence with the phylogeny of 16S rRNA gene. The microorganisms only able to respire on nitrate cluster together and separately from the rest of denitrifying strains. As exception for this fact, the specie *Halomonas maura*, which appears close to the denitrifying bacteria 11S and HGDK1.

The influence of the method used is stronger with the *nirS* gene, although most of the clusterings obtained with the 16S rRNA and *narH* genes, remains with the gene for nitrite reductase, with high “bootstrap” values and whatever were the method employed.

Finally, the *nosZ* gene shows the highest divergence with the phylogeny of the 16S rRNA gene, which suggests a mutation rate higher than the other functional genes. The clusterings were, in general, discordant with the already observed in the rest of genes. However, *Halomonas campisalis* and *H. desiderata* keep each other close and in a different lineage from the rest of species of the genus *Halomonas*; they could have a separate evolution.

The phylogeny was established not only on nucleotides sequences but also on aminoacidic deduced sequences, with similar results in both of cases.

V. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL PROCESO DE DESNITRIFICACIÓN EN *Halomonas*

V.1. MATERIAL Y MÉTODOS

V.1.1. AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES *narH*, *nirS*, *nirK* Y *nosZ*

Se realizó en todos los microorganismos seleccionados en el Capítulo I, que se recogen a modo de recordatorio en la Tabla 35.

Tabla 35. Microorganismos estudiados desde el punto de vista filogenético.

Microorganismos válidamente publicados	Cepas de nueva caracterización		
<i>H. alimentaria</i> DSM 15356 ^T	11S	C8	R53
<i>H. campisalis</i> ATCC 700597 ^T	4CR	F15	SP4
<i>H. desiderata</i> DSM 9502 ^T	5CR	HGD1	12CR
<i>H. halodenitrificans</i> ATCC 13511 ^T	15CR	HGDK1	F5
<i>H. ventosae</i> CECT 5797 ^T	AL13	N64	S19

Las cepas sombreadas en gris respiran sobre nitratos, pero no realizan una desnitrificación completa (apartado III.2.3)

Se utilizó el ADN extraído mediante el kit comercial “AquaPure Genomic ADN isolation kit” (Biorad®), tal y como se describió en el punto b) del apartado IV.1.B.1.

Los genes se amplificaron por PCR siguiendo el protocolo de Saiki y col. (1988), si bien para cada uno de ellos se consideraron unas condiciones determinadas, modificadas cuando fue necesario en algunos microorganismos. Los componentes de la reacción de PCR se detallan en el cuadro adyacente.

Componentes de la reacción de PCR

*ADN molde: 0,1-0,3µg
 *Cebadores (30 mM): 1 µl
 *Tampón (con Cl₂Mg) (10X): 5 µl
 *dNTPs (10 mM): 1 µl
 *Taq polimerasa (Eppendorf®): 1-5 U
 *Agua bidestilada estéril c.s.p. 50 µl

La metodología para los distintos genes se expone a continuación.

a) Amplificación del gen narH

Para la amplificación de un fragmento de aproximadamente 1000pb del gen *narH* se siguió el protocolo de Petri e Imhoff (2000), si bien se modificó alguna de las condiciones (Figura 28).

Los cebadores empleados en la reacción de amplificación fueron **narH50F** y **narH1040R** (Sigma-Genosys®), diseñados también por Petri e Imhoff (2000) y cuya secuencia se muestra en la Tabla X del Apéndice X.

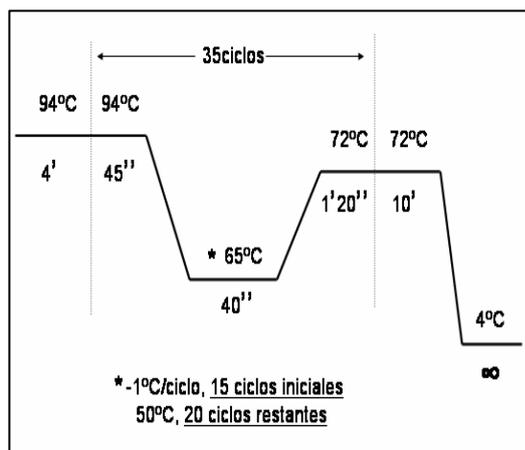


Figura 28. Condiciones de amplificación del gen *narH*.

b) Amplificación del gen nirS

El protocolo seguido fue el descrito por Braker y col. (2000), excepto para las cepas N64, C8 y F15, con las que se usaron las condiciones de un trabajo anterior (Braker y col., 1998). Para la cepa HGDK1 la temperatura de hibridación se incrementó a 57,3°C. Los protocolos se describen en la Figura 29.

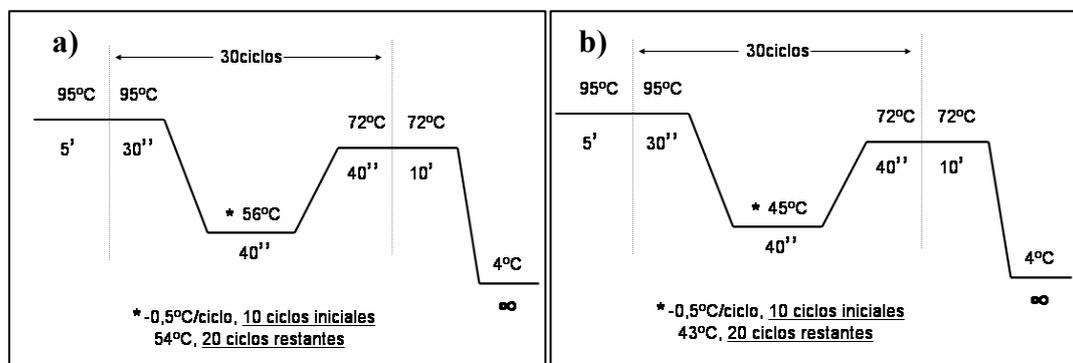


Figura 29. Condiciones de amplificación del gen *nirS*. a) Usada para todas las cepas y especies de referencia (Braker y col., 2000). b) Condiciones para las cepas N64, C8, F15, F5 y S19 (Braker y col., 1998).

Los primers usados fueron **nirS1F** y **nirS6R** (Braker y col., 1998), sintetizados por Sigma-Genosys[®], y cuya secuencia se muestra en la Tabla X del Apéndice X. El tamaño del fragmento amplificado estaba entre aproximadamente 800 y 900 pb.

c) Amplificación del gen nirK

En un microorganismo desnitrificante la nitrito reductasa puede estar codificada por el gen *nirS* ó *nirK*. Ambas posibilidades, de carácter excluyente en una misma célula (Zumft, 1997; Jetten y col., 1997; Watmough y col., 1999), fueron chequeadas y por ello se llevó a cabo también la amplificación del gen *nirK* siguiendo el protocolo de Braker y col. (1998). Las condiciones se muestran en la Figura 29 de la página anterior. Los cebadores usados en la reacción de amplificación fueron **nirK1F** y **nirK5R** (Sigma-Genosys[®]), cuya secuencia se recoge en la Tabla X, Apéndice X. El tamaño del amplicón estaba alrededor de 500pb.

d) Amplificación del gen nosZ

La amplificación de un fragmento de entre 1000 y 1100 pb se realizó de acuerdo a lo propuesto por Scala y Kerkhof (1998), usando la pareja de cebadores **nosZ661F** y **nosZ1773R** (Sigma-Genosys[®]) (Tabla X, Apéndice X). Las condiciones empleadas se detallan en la figura adyacente. No obstante, para la amplificación de *Halomonas alimentaria* y *H. desiderata* la temperatura de hibridación se bajó a 53,2°C.

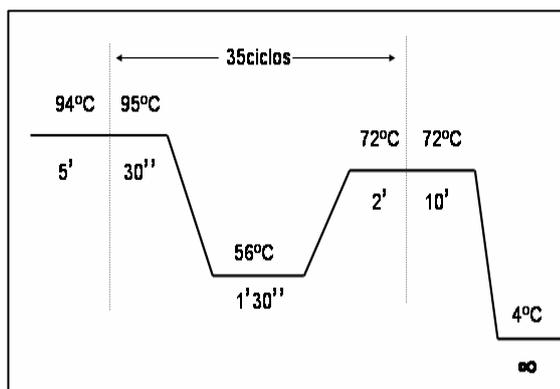


Figura 30. Condiciones de amplificación del gen *nosZ* (Scala y Kerkhof (1999)).

V.1.2. ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR POR ELECTROFORESIS CONVENCIONAL

La electroforesis se realizó en geles horizontales de agarosa (Seakem GTG[®], FMC Corp.) sumergidos en tampón TBE 1x y preparados al 1 % (p/v) con el mismo tampón.

TBE 10x

Trizma Base (Sigma [®]).....	54g
Ácido bórico (Sigma [®]).....	27,5g
EDTA (Sigma [®]) 0,5 M, pH 8.....	20ml
Agua bidestilada c.s.p.....	500ml

Como tampón de carga se utilizó el mostrado en el cuadro inferior, adicionando 1µl por cada 5 µl de ADN:

Tampón de carga 6x

Azul de bromofenol (Sigma [®]).....	0,25%(p/v)
Xilen-cianol (Sigma [®]).....	0,25%(p/v)
Glicerol.....	30%(p/v)

Las condiciones de carrera fueron 100V durante 40 minutos aproximadamente. A continuación, el ADN se tiñó con una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante media hora; tras lavar con agua para eliminar el exceso de bromuro de etidio, el ADN se visualizó mediante exposición del gel a la luz U.V. (245nm). Las imágenes se recogieron con una videocámara acoplada a una impresora térmica, empleando el programa Gel Doc 2000 (software Quantity one) de Biorad[®].

El tamaño de las bandas se determinó por interpolación en curvas logarítmicas de la talla de cada fragmento frente a su movilidad relativa. Como referencia se utilizaron las distancias de migración de los fragmentos resultantes de la digestión de 3µg del fago lambda (Bioline[®]) con 1,5 U/µg de ADN, de la enzima de restricción *Pst*I, por un lado, y de *Hind*III y *Eco*RI, por otro, en un volumen final de reacción de 30 µl. Se dejó durante toda una noche y una vez digerido, se calentó

a 60°C durante 10 minutos para separar las regiones *cos* del fago lambda. En los geles de agarosa se utilizó una concentración de ADN patrón de 100 ng/ml.

Una vez separados los fragmentos de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa, las bandas elegidas a la luz U.V. se cortaron con una cuchilla y el ADN se recuperó de la agarosa utilizando el kit Illustra® GFX DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare®), según las recomendaciones del fabricante.

V.1.3. SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN AMPLIFICADOS

Se llevó a cabo tal y como se ha descrito con el gen ADNr 16S (Apartado IV.1.C.1.b). Se emplearon igualmente los mismos cebadores usados en la reacción de amplificación, si bien para las regiones intermedias se diseñaron nuevos oligonucleótidos. En la Tabla 36 se resumen los cebadores empleados en la secuenciación de los distintos genes para cada uno de los microorganismos. La secuencia de estos oligonucleótidos se encuentra en el Apéndice III.

Tabla 36. Cebadores utilizados en las reacciones de secuenciación.

Microorganismo	Cebador*		
	Gen <i>narH</i>	Gen <i>nirS</i>	Gen <i>nosZ</i>
<i>H. alimentaria</i>	narH50F; H+2A112; H+3alim	nirS1F; nirS6R; S+1A112	nosZ661F; nosZ1773R; Z+2Hal
<i>H. campisalis</i>	SP6; T7 †	NP	nosZ661F; nosZ1773R; Z+2cam
<i>H. desiderata</i>	narH50F; H+1des; H+2A112	nirS1F; nirS6R; S+1des	nosZ661F; nosZ1773R; Z+1Hal
<i>H. halodenitrificans</i>	Secuencia ya depositada (AB076402)	nirS1F; nirS6R; S+1A112	nosZ661F; nosZ1773R; Z+1Hal
<i>H. ventosae</i>	narH50F; H+1A112; H+2A112; H+3A112	nirS1F; nirS6R; S+1A112	SP6; T7 †
11S	narH50F; H+1A112; H+2A112; H+3A112	nirS1F; nirS6R; S+1A112	nosZ661F; nosZ1773R; Z+2Hal
4CR	narH50F; H+2A112; H+3A112	nirS1F; nirS6R; S+1A112	SP6; T7 †
5CR	narH50F; narH5CR; H+3A112	nirS1F; nirS6R; S+1A112	SP6; T7 †
12CR	narH50F; H+2A112; H+3A112	NP	NP
15CR	narH50F; H+1A112; H+2A112	nirS1F; nirS6R; S+1A112	nosZ661F; nosZ1773R; Z+1Hal
A113	SP6; T7 †	nirS1F; nirS6R; S+1A112	SP6; T7 †
C8	SP6; T7 †	nirS1F; nirS6R; S+1A112	SP6; T7 †
F5	narH50F; H+1A112; H+2A112	NP	NP
F15	narH50F; H+2A112; H+3A112	nirS1F; nirS6R; S+1A112	nosZ661F; nosZ1773R; Z+1Hal
HGD1	narH50F; H+2A112; H+3A112	nirS1F; nirS6R; S+1A112	NP
SP4	SP6; T7 †	nirS1F; nirS6R; S+1A112	nosZ661F; nosZ1773R; Z+1Hal
HGDK1	narH50F; H+2A112; H+3A112	nirS1F; nirS6R	NP
N64	narH50F; H+2A112; H+3A112	nirS1F; nirS6R; S+1A112	nosZ661F; nosZ1773R; Z+1Hal
R53	SP6; T7 †	nirS1F; nirS6R; S+1A112	nosZ661F; nosZ1773R; Z+1Hal
S19	narH50F; H+2A112; narH5CR	NP	NP

* La secuencia de los oligonucleótidos puede ser consultada en el Apéndice III

† Fue necesario clonar para obtener una secuencia de adecuada fidelidad

ND: No amplificado ni secuenciado en ninguna de las condiciones ensayadas

Cuando las secuencias recibidas no tenían suficiente calidad, se procedió a insertar el fragmento en el vector de clonación p-GEM[®]-T de Promega[®] (Figura X), para su posterior secuenciación con los cebadores universales T7 y SP6. El procedimiento seguido se describe a continuación.

V.1.3.1. Ligación del inserto en el vector

Realizada la purificación del fragmento deseado, se procedió a ligar éste con el vector mediante la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 en un volumen de reacción de 10 µl. La relación molar vector:inserto utilizada fue variable en función del tamaño del fragmento. La reacción se dejó durante toda la noche a temperatura ambiente.

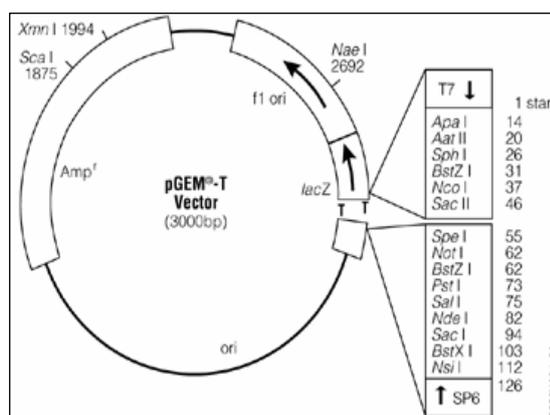


Figura X. Vector p-GEM[®]-T. Se muestran los diferentes sitios de restricción y de inserción y los genes lacZ y de resistencia a ampicilina.

V.1.3.2. Preparación de células competentes con CaCl₂ y transformación por choque térmico

La preparación de células competentes de *Escherichia coli* XL1-Blue con CaCl₂ para su posterior transformación se realizó siguiendo el protocolo descrito en el manual de Sambrook y Russell (2001). También de acuerdo a este manual se transformaron las células competentes con ADN plasmídico mediante choque térmico. Las células que habían adquirido el plásmido se seleccionaron sembrando alícuotas de 100 µl de la suspensión celular en placas de LB suplementado con ampicilina, IPTG y

Medio LB sólido

Triptona (Panreac [®]).....	1g
Extracto de levadura (Panreac [®]).....	0,5g
NaCl (Panreac [®]).....	1g
Agar (Panreac [®]).....	2g
Agua bidestilada c.s.p.....	100ml

X-Gal (véase cuadro superior). Tras una incubación a 37°C durante 24 horas se seleccionaron las colonias blancas.

La adición de IPTG, ampicilina y X-gal se hizo tras la esterilización del medio LB y una vez que la temperatura desciende en torno a los 50°C. Las concentraciones empleadas se muestran en el cuadro adyacente.

Solución de IPTG (23,83 mg/ml agua bd estéril)(Sigma®).....	500µl
Compuestos selectores	
Solución de X-Gal (80 mg/ ml de dimetilformamida)(Sigma®)...	800 µl
Ampicilina 1000x) (Sigma®).....	500µl
Medio LB.....	500ml

V.1.3.3. Chequeo de clones portadores del inserto y extracción del ADN plasmídico

Para el chequeo, las colonias blancas fueron crecidas en medio LB durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se tomó una alícuota de 200µl en un tubo de polipropileno y se adicionaron 25µl de fenol (USB Corporation®) y 25µl de una mezcla cloroformo-alcohol isoamílico en proporción 24:1, ambos reactivos de Panreac®. También se agregaron 15µl de tampón de carga 6x, cuya composición se describe en la página X. Finalmente, el contenido resultante se agitó vigorosamente durante 1 minuto y a continuación se centrifugó 5 minutos. Tras esto, se tomaron 20µl del sobrenadante a los que se les realizó una electroforesis convencional en un gel de agarosa al 0,7% (p/v), con un voltaje de 100 y un tiempo de carrera de 40 minutos. Todo el procedimiento descrito también se llevó a cabo con alguna de las colonias azules obtenidas para disponer de un control de tamaño, junto con el marcador λ *PstI*, preparado según se ha explicado anteriormente.

En aquellos cultivos que resultaron ser portadores del inserto se procedió a extraer el ADN plasmídico para la posterior secuenciación, empleando para ello el kit comercial GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit de Sigma®.

V.1.4. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Los cromatogramas de las secuencias recibidas fueron comprobados visualmente para corregir posibles errores, tal y como ya se hizo con el gen ADNr 16S para establecer la filogenia de los nuevos aislados (Apartado IV.1.C.2.).

V.1.4.1. Construcción de árboles filogenéticos

Una vez inspeccionadas las secuencias se buscó su semejanza con otras codificantes disponibles en la base de datos GenBank, mediante el programa *BLASTXsearch* (Altschul y col., 1990). La calidad de la búsqueda es valorada estadísticamente por el mismo programa, que muestra sólo aquellas secuencias en las que su alineamiento presenta menor dependencia probabilística (esto viene indicado por valores de *E* -*expected value*- próximos a 0).

Para inferir la relación filogenética procedimos en primer lugar al alineamiento múltiple de las secuencias de los microorganismos en estudio con las disponibles en la base de datos. De ésta se emplearon de forma exclusiva las secuencias de especies válidamente publicadas, para asegurar que su gen ADNr 16S estuviera secuenciado y pudiera ser usado en una posterior reconstrucción filogenética. El alineamiento múltiple se realizó con los programas *Clustal X* (Thompson y col., 1997) y *Megalign* (Burland, 2000), ya mencionados en el apartado IV.1.C.2. El programa *Megalign* nos permitió calcular los porcentajes de semejanza entre secuencias.

El alineamiento obtenido por *Clustal X* fue guardado en formato NBRF/PIR. A continuación, se usó el programa *Gblocks* para eliminar las posiciones ambiguas y regiones más divergentes del alineamiento (Castresana, 2000). Los parámetros usados no fueron demasiado estrictos con objeto de preservar tanta información como fuera posible: Para las opciones “Minimum number of sequences for a conserved position” y “Minimum number of sequences for a flank position” se utilizó el valor correspondiente a la mitad del número de secuencias; en las opciones “Maximum number of contiguous nonconserved positions” y “Minimum length of a block” se emplearon los valores de 10 y 5; finalmente, para la opción “Allowed gap positions” se optó por “With half”.

Con el alineamiento corregido y convertido también mediante *Clustal X* en formato PHY, se procedió a reconstruir la filogenia con el paquete de programas *PHYLIP* versión 3.62 (Felsenstein, 2002). Los árboles se obtuvieron por tres métodos: Máxima Parsimonia, de Distancias y Máxima probabilidad, por medio de los programas *dnaps*, *neighbor* y *dnaml*,

respectivamente. Las distancias evolutivas en los árboles generados por *neighbor* fueron calculadas por el modelo Kimura two-parameter (Kimura, 1980), que tiene en cuenta transiciones y transversiones de nucleótidos y asume para los cuatro la misma frecuencia de sustitución. Para el análisis de “bootstrap” se usó el programa *seqboot*, realizando 100 remuestreos. Por último, se obtuvo un árbol consenso a partir de los árboles obtenidos por cada uno de los métodos; en este caso empleamos el programa *consense* con las opciones por defecto, para la construcción del árbol y *TreeView* (Page, 1996), para la visualización del mismo.

Por otra parte, las secuencias predecidas de aminoácidos para cada gen y microorganismo se obtuvieron a partir de la de nucleótidos mediante el programa *MEGA 3.1* (Kumar y col., 2004). Una vez alineadas con *Clustal X* se sometieron a una “limpieza” mediante *Gblocks* y posteriormente se generaron los árboles filogenéticos con el paquete informático *PHYLIP*, en este caso, empleando los programas *protpars*, *neighbor* y *proml*. Los restantes pasos hasta visualizar el árbol consenso son los mismos descritos en el párrafo anterior para las secuencias de ADN.

Finalmente, se procedió a comparar la topología de los árboles consenso generados a partir de la secuencia nucleotídica y aminoacídica de cada gen mediante el programa *treedist*, también incluido en el paquete informático *PHYLIP*. El método usado fue la “distancia simétrica”, que mide el número de particiones en que difieren dos árboles, entendiéndose por partición cada una de las dos divisiones de una rama interna; así, el total de particiones sería de acuerdo a las instrucciones del programa $4n-6$, donde n sería el número de especies (Felsenstein, 2002). El procedimiento se extendió también a la comparación de la topología con el árbol del gen ADNr 16S, construido éste con los mismos microorganismos empleados para cada gen. Las secuencias del gen ADNr 16S de las cepas objeto de estudio se obtuvieron durante la caracterización de las mismas (Capítulo II) y se pueden comprobar en el disco compacto adjunto a esta memoria.

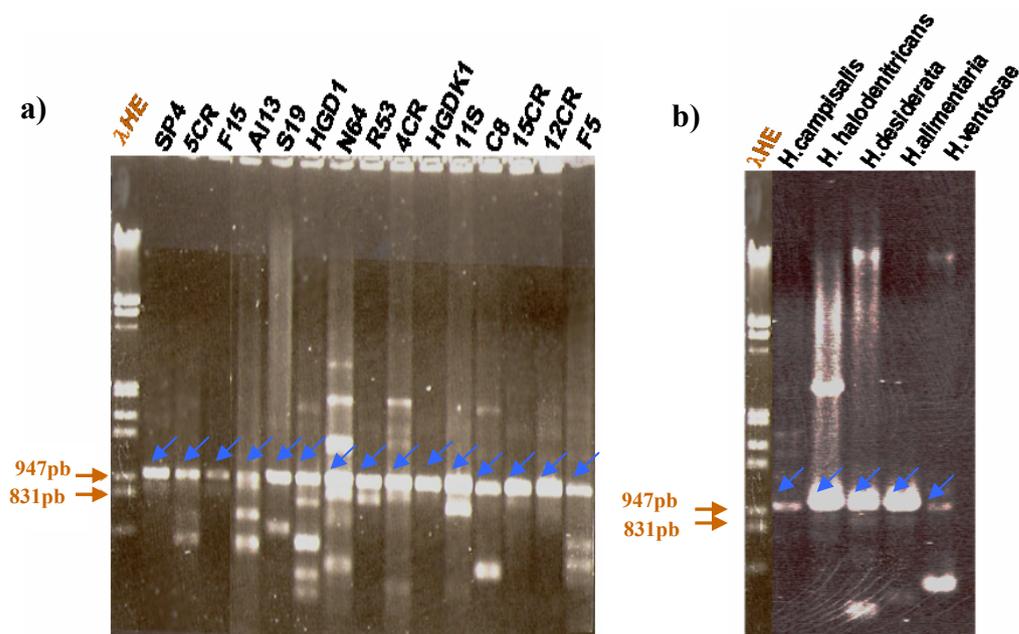
V.1.4.2. Determinación del contenido en G+C de los genes *narH*, *nirS*, *nirK* y *nosZ*

Se empleó el programa *EditSeq* del paquete de programas *DNASTAR* (Burland, 2000), concretamente la opción Goodies y dentro de ésta, DNASTATISTICS.

V.2. RESULTADOS

V.2.1. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN *narH*

La amplificación del gen *narH* se realizó siguiendo el protocolo mencionado en Material y Métodos para todos los microorganismos. Los resultados de la PCR y posterior electroforesis de se muestran en las Figuras 31b, para las especies de referencia, y 31a, para las cepas caracterizadas en la presente Tesis doctoral.



Figuras 31a y 31b. Producto de amplificación de un fragmento del gen *narH* de aproximadamente 1000pb. λ HE: ADN del fago lambda digerido con las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI*.

Como se puede apreciar en las figuras superiores, en las cepas tipo de *Halomonas campisalis* y *H. alimentaria*, así como en las cepas 12CR, 15CR, F15, HGDK1 y SP4 la amplificación del gen *narH* origina un único fragmento, que es purificado directamente para la posterior secuenciación. En el resto de microorganismos, la banda de interés fue extraída del gel de

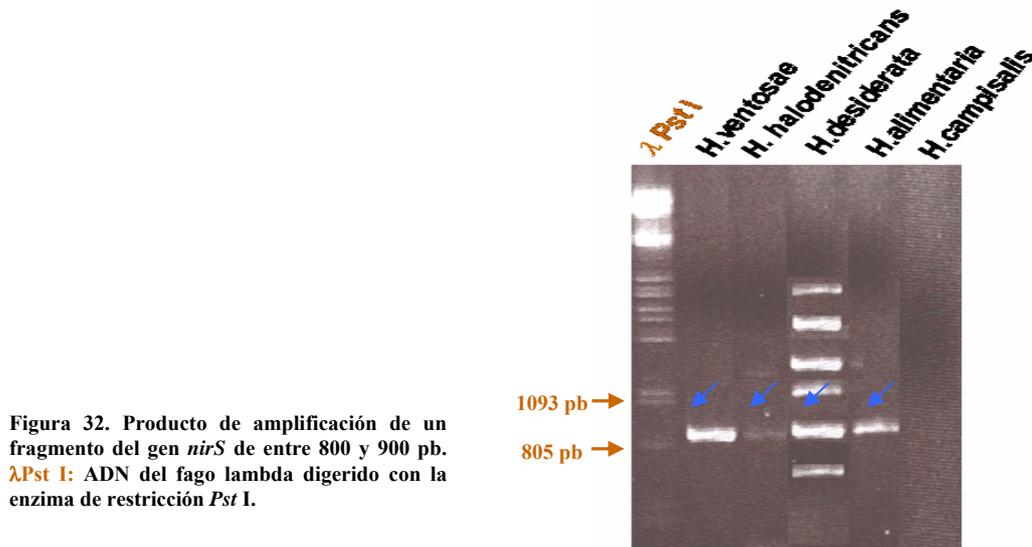
agarosa mediante el kit Illustra® GFX DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare®), procedimiento ya mencionado en el apartado de Material y Métodos.

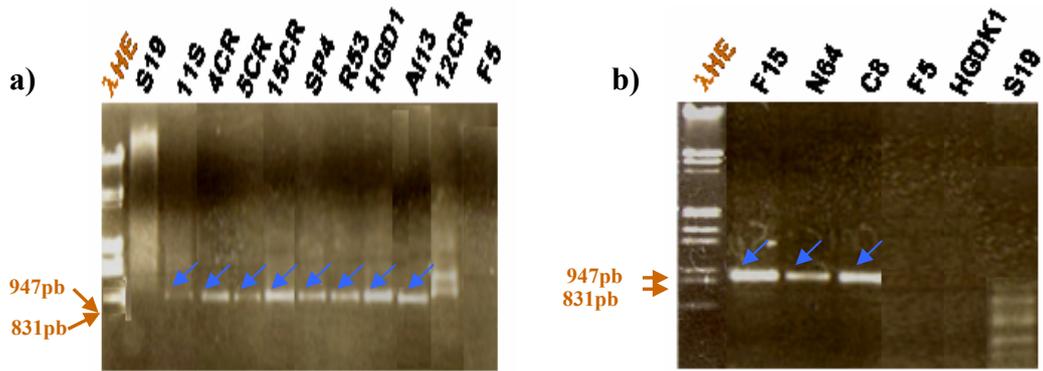
En el caso del gen *narH* de *H. campisalis* y de las cepas A113, C8, R53 y SP4 es necesaria la clonación del inserto en el vector p-GEM®-T para su secuenciación.

Tras la búsqueda en la base de datos GenBank mediante *BLASTXsearch*, las bandas secuenciadas de todos los microorganismos presentan porcentajes de identidad cercanos al 90% con secuencias de la subunidad beta de nitrato reductasas de diversos microorganismos, lo que nos asegura que estamos trabajando con los datos adecuados para el posterior análisis filogenético.

V.2.2. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN *nirS*

En los microorganismos desnitrificantes resulta amplificado el gen *nirS*, no así en las cepas F5 y S19, en las cuales fenotípicamente ya habíamos comprobado que respiran sólo sobre nitratos (Figuras 32 y 33a y b). En la cepa 12CR, como se puede observar en la Figura 33a se amplifica una banda de tamaño algo mayor, aunque cercano al esperado. Por ello se decidió secuenciarla, comprobándose tras la búsqueda en la base de datos que presenta semejanza con proteínas “huérfanas”, no pudiéndose relacionar en ningún caso con una nitrito reductasa.





Figuras 33a y 33b. Producto de amplificación de un fragmento del gen *nirS* de entre 800 y 900 pb. a) El protocolo seguido es el descrito por Braker y col. (2000); b) Amplificación según protocolo de Braker y col. (1998). λ HE: ADN del fago lambda digerido con las enzimas de restricción *Hind*III y *Eco*RI.

Por otra parte, la amplificación del gen *nirS* en la cepa HGDK1 se logra tras ensayar diferentes temperaturas de hibridación, consiguiendo finalmente una banda del tamaño deseado a temperaturas superiores a 57°C (Figura 34). En este caso fue necesaria la concentración del producto de amplificación para tener suficiente cantidad de ADN. La secuenciación de la banda confirma que el fragmento corresponde al gen *nirS*.

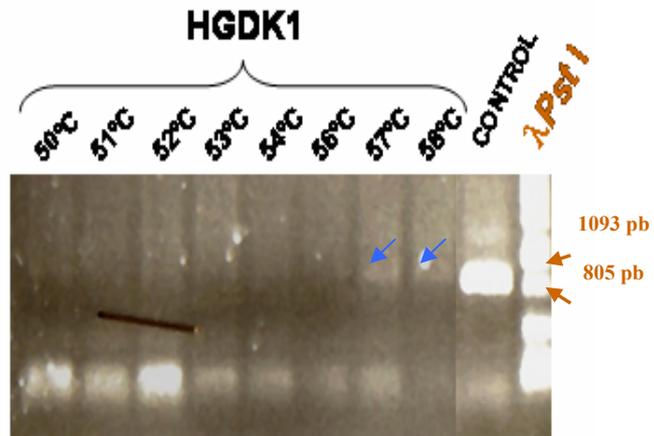


Figura 34. Producto de amplificación del gen *nirS* en la cepa HGDK1. λ Pst I: ADN del fago lambda digerido con la enzima de restricción *Pst* I. Como control de tamaño se usó el producto de amplificación del gen *nirS* en *Halomonas ventosae*.

Por su parte, la amplificación y secuenciación del gen *nirS* en *Halomonas campisalis* resulta infructuosa. Se chequean diferentes temperaturas de hibridación, consiguiéndose con las más bajas la amplificación de dos bandas próximas a 900pb (Figura 35). Sin embargo, la posterior secuenciación de las mismas da como resultado semejanza con otras proteínas, en concreto, con la proteína EpsA y NADH-quinona oxidoreductasa con porcentajes de similitud también bajos (cercaos al 40%).



V.2.3. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN *nirK*

Como la presencia de los genes *nirS* y *nirK* es excluyente en una misma célula (Zumft, 1997; Jetten y col., 1997; Watmough y col., 1999), sólo llevó a cabo la amplificación del gen *nirK* en *H. campisalis* y en las cepas no desnitrificantes, en estas últimas para descartar definitivamente que tuvieran la capacidad para respirar sobre nitritos. No se obtiene ninguna banda en ninguno de los casos.

V.2.4. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN *nosZ*

La amplificación del gen estructural de la óxido nitroso reductasa se prueba en todos los microorganismos. En las cepas que respiran solamente sobre nitratos (12CR, F5y S19), como era de esperar, no se obtiene el producto esperado. En los restantes microorganismos, con capacidad

desnitrificante, sí se amplifica una banda del tamaño esperado y la posterior secuenciación confirma que disponemos del fragmento adecuado (Figuras 36 y 37). No obstante, con las cepas HGD1 y HGDK1 no se logra disponer del gen; a pesar de ensayar distintas condiciones (cambio de la temperatura y del tiempo de hibridación y reducción del tiempo de elongación), siempre se obtiene una banda algo mayor a la predecida (Figura 37), cuya secuencia no corresponde con el gen de la enzima buscada.

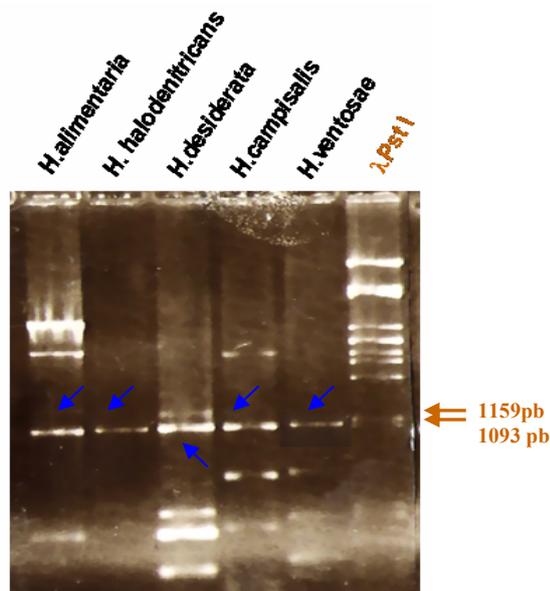


Figura 36. Producto de amplificación de un fragmento del gen *nosZ* de entre 1000 y 1100 pb. λ Pst I: ADN del fago lambda digerido con la enzima de restricción *Pst* I.

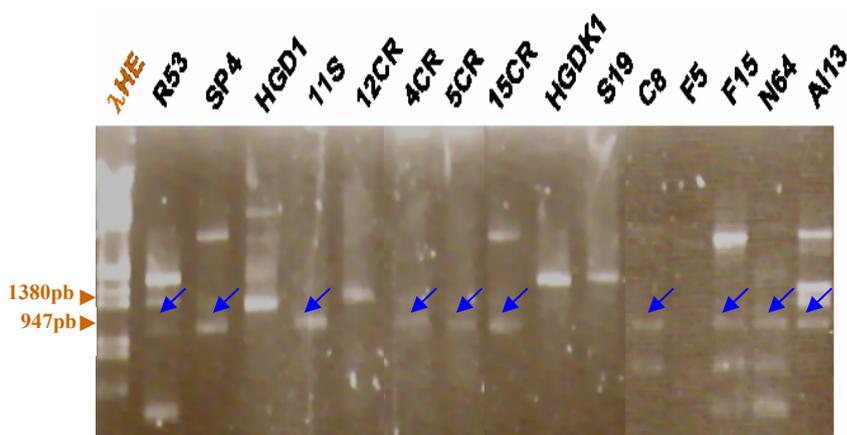


Figura 37. Producto de amplificación de un fragmento del gen *nosZ* de entre 1000 y 1100 pb. λ HE: ADN del fago lambda digerido con las enzimas de restricción *Hind*III y *Eco*RI.

V.2.5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

V.2.5.1. Procesamiento del alineamiento con el programa *Gblocks*

Como paso previo a la construcción de árboles filogenéticos, los alineamientos se procesaron con el programa *Gblocks*, seleccionando bloques o regiones homólogas conducentes a alineamientos e inferencia de filogenias más adecuados. En la Tabla 37 se muestra el porcentaje de posiciones que permanecen tras la “limpieza” con el programa *Gblocks*.

Tabla 37. Resultados tras el procesamiento con el programa *Gblocks* del alineamiento preliminar.

Gen	<i>narH</i>	<i>nirS</i>	<i>nosZ</i>
Número de secuencias ^a	27	21	20
% tras <i>Gblocks</i> ^b (secuencia nucleótidos)	60% (969/1611)	48% (873/1815)	53% (1059/1966)
% tras <i>Gblocks</i> ^b (secuencia aminoácidos)	58% (307/523)	47% (288/604)	51% (336/653)
Gen 16S ADNr % tras <i>Gblocks</i> ^b	92% (1449/1569)	92% (1455/1568)	92% (1455/1567)

^a Número de secuencias de las que se dispone para el alineamiento

^b Porcentaje de posiciones del alineamiento original que permanecen después del filtrado con *Gblocks*. En el cómputo original del número de nucleótidos o aminoácidos se incluyen los “huecos” que introduce el programa *Clustal X* para optimizar el alineamiento. Entre paréntesis las posiciones remanentes homólogas en relación a la longitud del alineamiento inicial

V.2.5.2. Establecimiento de la semejanza entre secuencias

Con el programa *Megalign* se obtuvieron los porcentajes de semejanza entre las secuencias de nucleótidos de cada gen por un lado, entre las precedidas de aminoácidos de las proteínas correspondientes por otro, y finalmente entre las secuencias del gen ADNr 16S del conjunto de microorganismos empleados en este estudio filogenético. Las diferentes matrices resultantes, indicando los porcentajes de similitud y divergencia, se pueden consultar desde el Apéndice IV a X.

V.2.5.3. Construcción de árboles filogenéticos

En este capítulo se muestran los árboles filogenéticos consenso resultantes de aplicar a los alineamientos ya procesados los métodos Máxima Parsimonia, de Distancias y Máxima probabilidad (Figuras 38 a 44). Las relaciones filogenéticas con cada uno de los métodos por separado, a partir tanto de las secuencias de nucleótidos de cada gen como de las predecidas de aminoácidos de las proteínas correspondientes, se muestran en los apéndices XI a XVI para el gen *narH* y la proteína NarH; en los apéndices XVII a XXII para el gen *nirS* y la proteína NirS; y en los apéndices XXIII a XXVIII para el gen *nosZ* y la proteína NosZ.

Por otra parte, se muestran en las Tablas 38 a 40 los resultados de comparar cuantitativamente la topología entre árboles consenso. Para esta comparación se obtuvo también la filogenia a partir de la secuencia de nucleótidos del gen ADNr 16S de los microorganismos cuyo gen hubiera sido secuenciado en cada caso. Por no hacer demasiado extensa esta memoria, se muestra únicamente en la Figura 38 el árbol consenso resultante tras alinear las secuencias del gen para el ARNr 16S de todos los microorganismos empleados en el análisis filogenético.

Tabla 38. Número de particiones en que difieren cada pareja de árboles consenso en función del número total de particiones.

	<i>narH</i> (nucleótidos)	NarH (aminoácidos)
<i>narH</i> (nucleótidos)	-	6/102
NarH (aminoácidos)	6/102	-
ADNr16S	32/102	28/102

Tabla 39. Número de particiones en que difieren cada pareja de árboles consenso en función del número total de particiones.

	<i>nirS</i> (nucleótidos)	NirS (aminoácidos)
<i>nirS</i> (nucleótidos)	-	4/78
NirS (aminoácidos)	4/78	-
ADNr16S	22/78	22/78

Tabla 40. Número de particiones en que difieren cada pareja de árboles consenso en función del número total de particiones.

	<i>nosZ</i> (nucleótidos)	<i>NosZ</i> (aminoácidos)
<i>nosZ</i> (nucleótidos)	-	6/76
<i>NosZ</i> (aminoácidos)	6/76	-
ADNr16S	24/76	24/76

V.2.5.4. Determinación del contenido en G+C

Tabla 41. Determinación del contenido en G+C de los genes *narH*, *nirS*, *nirK* y *nosZ*.

Gen Microorganismo	<i>narH</i>		<i>nirS</i>		<i>nosZ</i>		ADNr 16S		Genoma* G+C moles %
	L(pb)	G+C moles%	L(pb)	G+C moles%	L(pb)	G+C moles%	L(pb)	G+C moles%	
<i>H. alimentaria</i>	965	64,25	847	66,23	1075	63,91	1493	56,53	63,00
<i>H. campisalis</i>	1000	64,20	-	-	1015	64,73	1379	56,13	66,00
<i>H. desiderata</i>	971	63,34	860	65,70	1055	65,31	1491	56,67	66,00
<i>H. halodenitrificans</i>	1587	63,26	846	63,59	1074	63,59	1531	55,58	64,00-66,00
<i>H. ventosae</i>	965	64,87	845	66,15	1112	64,21	1395	56,70	72,60-74,60
11S	964	64,32	873	66,09	1062	65,35	1441	56,49	65,37±1,0
4CR	966	65,01	873	65,86	1095	64,20	1429	56,40	67,55±1,2
5CR	965	61,04	873	63,69	1094	64,08	1411	56,56	65,71±0,2
15CR	974	63,96	873	64,60	1063	63,88	1434	57,53	62,75±0,5
AL13	1001	62,34	855	65,96	1104	64,09	1471	55,88	66,05±0,4
C8	1001	61,14	873	65,86	1096	65,88	1457	56,76	67,41±0,2
F15	965	65,08	873	66,44	1063	65,66	1487	56,62	66,26±0,2
HGD1	975	64,82	873	65,64	-	-	1443	56,62	66,00*
HGDK1	968	65,81	840	67,62	-	-	1453	56,50	68,80*
N64	965	64,87	873	66,55	786 [†]	64,12	1445	56,75	67,14±0,1
R53	968	63,83	873	65,86	1029	64,72	1473	57,43	66,20±0,5
SP4	967	64,12	873	64,49	1032	64,05	1449	57,28	66,26±1,0
12CR	969	65,02	-	-	-	-	1412	56,59	68,78±0,2
F5	968	62,50	-	-	-	-	1449	56,38	64,29±1,0
S19	977	62,13	-	-	-	-	1448	56,35	62,45±0,2

L: Longitud del fragmento secuenciado del gen correspondiente

*: Contenido determinado en el Capítulo II; para las especies de referencia el contenido fue extraído de sus descripciones originales: Robinson y Gibbons, 1952; Berendes, 1996; Mormile y col., 1999; Yoon y col., 2002; Martínez-Cánovas y col., 2004a

[†]: No se dispone de la secuencia completa pero sí de una región de más del 70% del total alineable

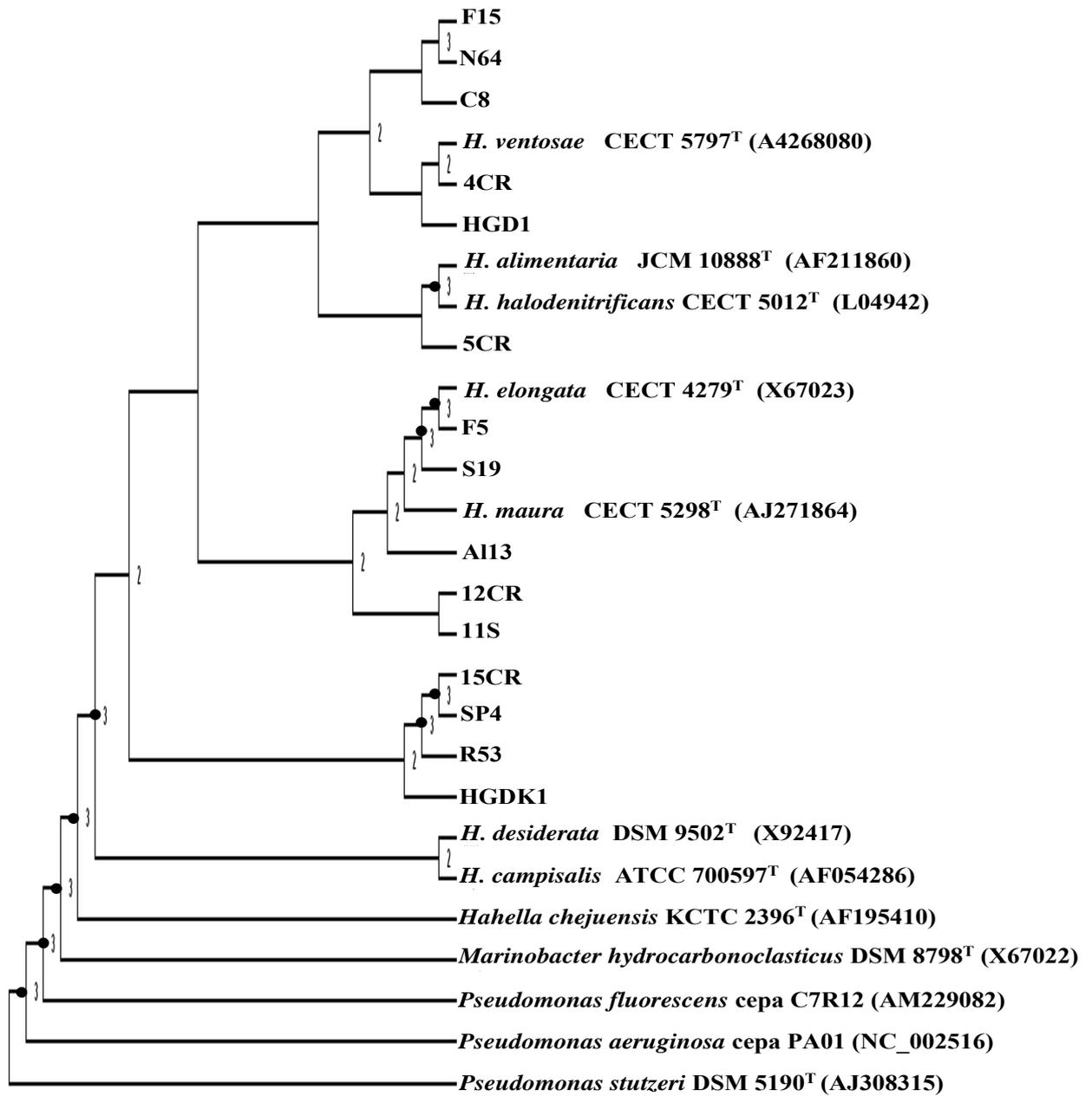


Figura 38. Árbol filogenético consenso obtenido a partir de la secuencia del gen ADNr 16S. En los nodos se indica el número de métodos (Máxima Parsimonia, Neighbour-Joining y Máxima Probabilidad) en los que esa agrupación se presenta. Los puntos negros en los nodos señalan las agrupaciones con valores de “bootstrap” superiores al 50% en los tres métodos.

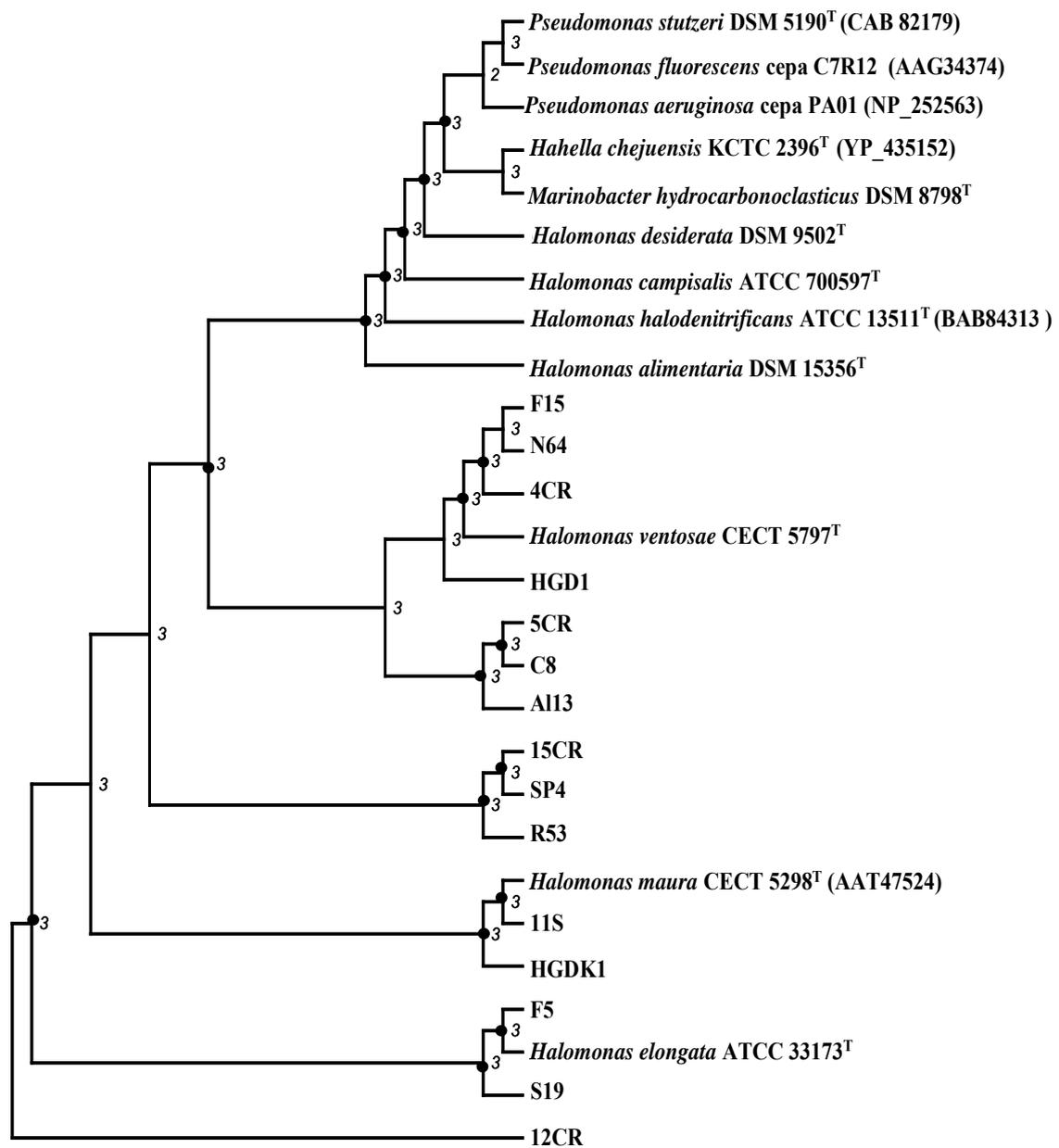


Figura 39. Árbol consenso obtenido a partir de la secuencia de nucleótidos del gen *narH*. Los valores en los nodos indican el número de métodos (Máxima Parsimonia, Neighbor-Joining y Máxima Probabilidad) en los que esa agrupación se presenta. Los puntos negros en los nodos señalan las agrupaciones con valores de “bootstrap” superiores al 50% en los tres métodos.

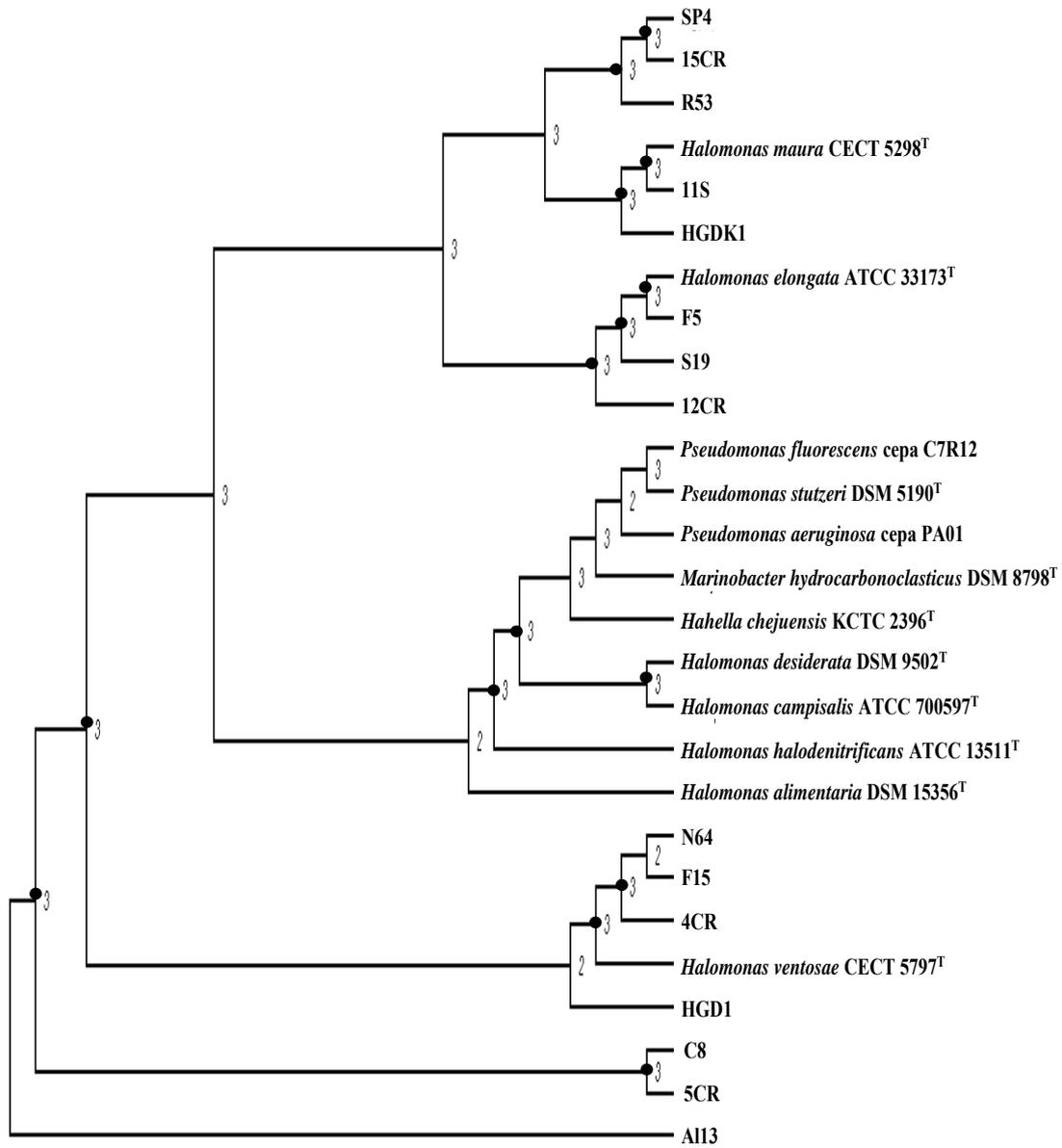


Figura 40. Árbol consenso obtenido a partir de la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína NarH. Los valores en los nodos indican el número de métodos (Máxima Parsimonia, Neighbor-Joining y Máxima Probabilidad) en los que esa agrupación se presenta. Los puntos negros en los nodos señalan las agrupaciones con valores de “bootstrap” superiores al 50% en los tres métodos.

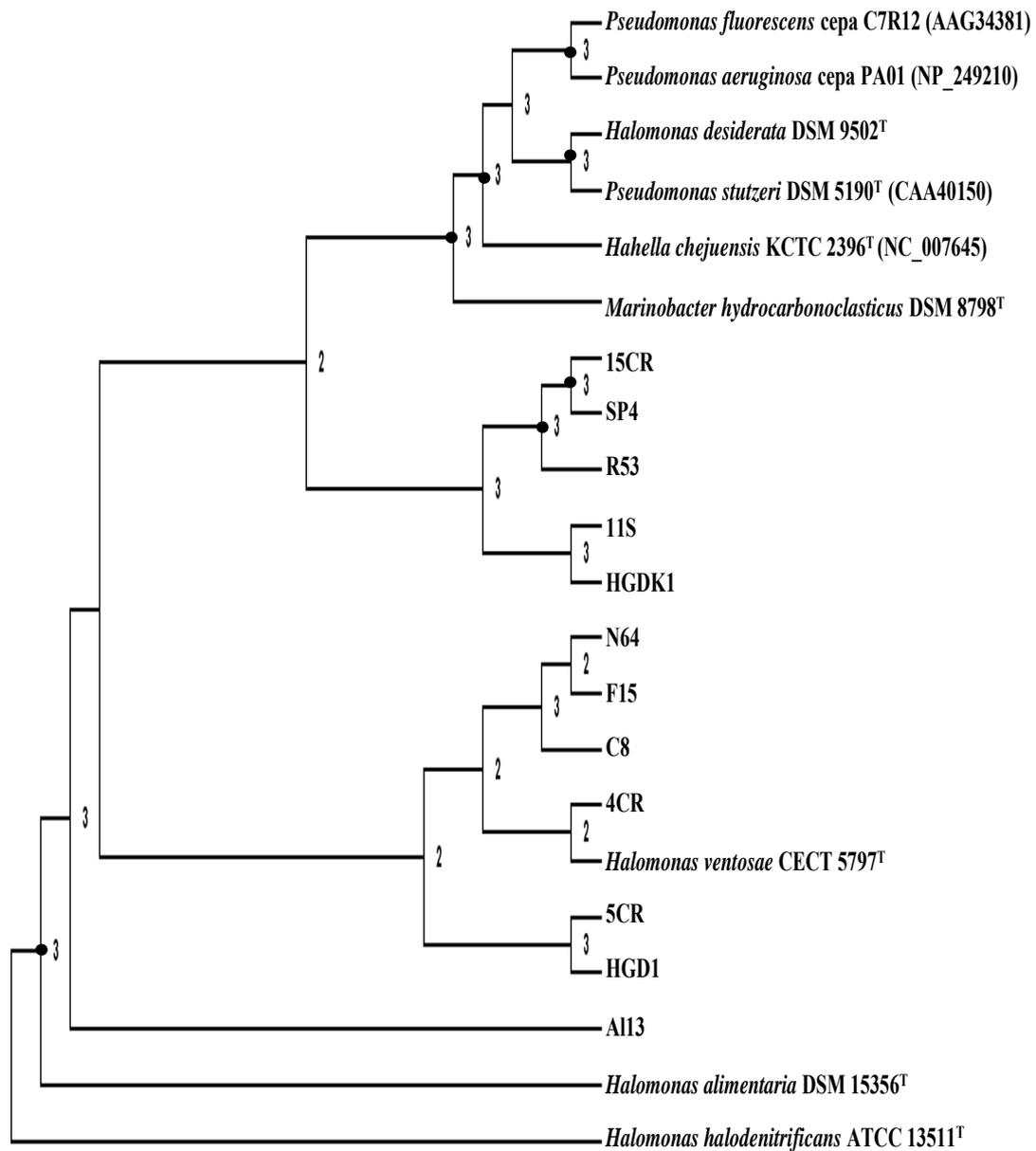


Figura 41. Árbol consenso obtenido a partir de la secuencia de nucleótidos del gen *nirS*. Los valores en los nodos indican el número de métodos (Máxima Parsimonia, Neighbor-Joining y Máxima Probabilidad) en los que esa agrupación se presenta. Los puntos negros en los nodos señalan las agrupaciones con valores de “bootstrap” superiores al 50% en los tres métodos.

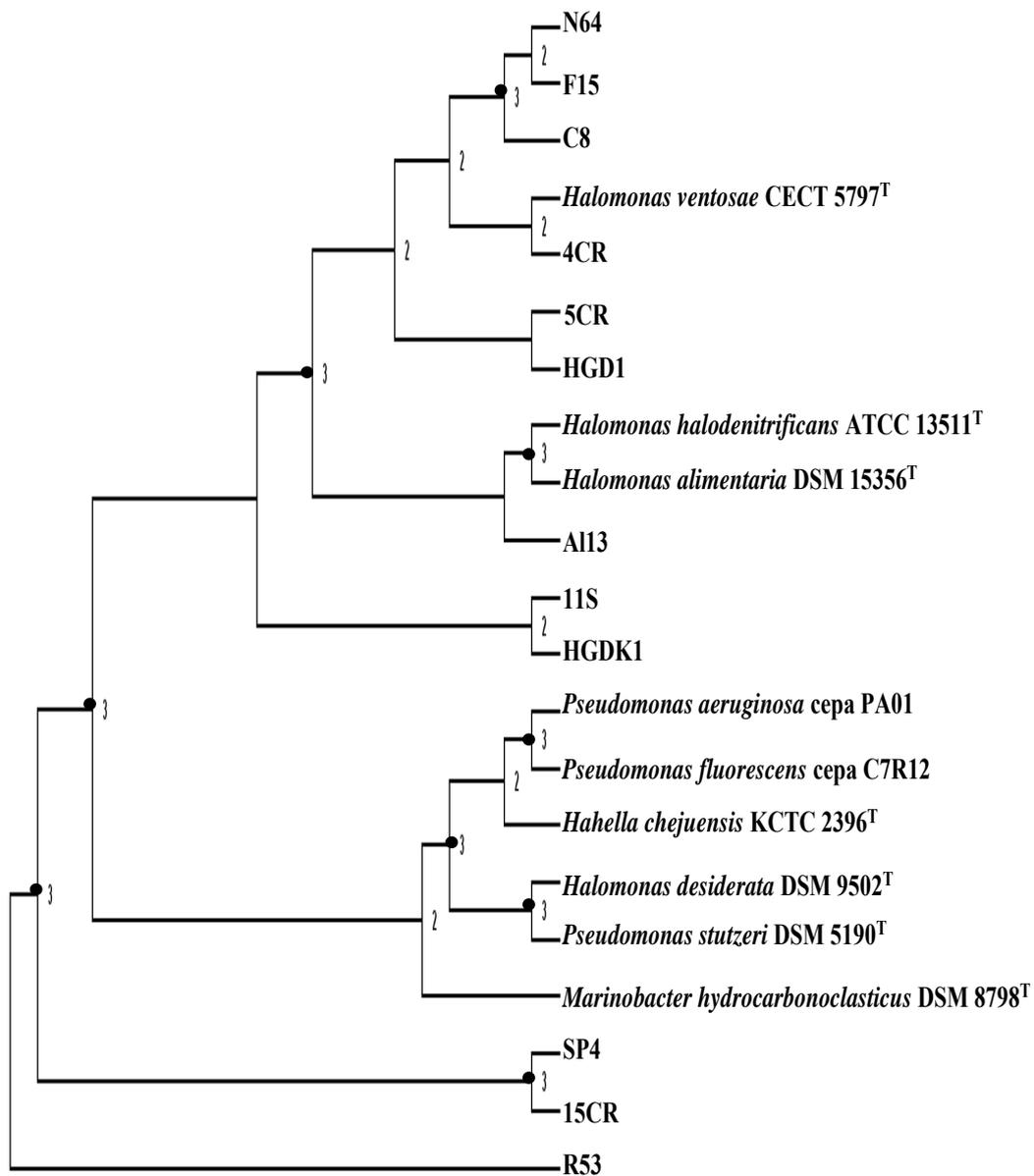


Figura 42. Árbol consenso obtenido a partir de la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína NirS. Los valores en los nodos indican el número de métodos (Máxima Parsimonia, Neighbor-Joining y Máxima Probabilidad) en los que esa agrupación se presenta. Los puntos negros en los nodos señalan las agrupaciones con valores de “bootstrap” superiores al 50% en los tres métodos.

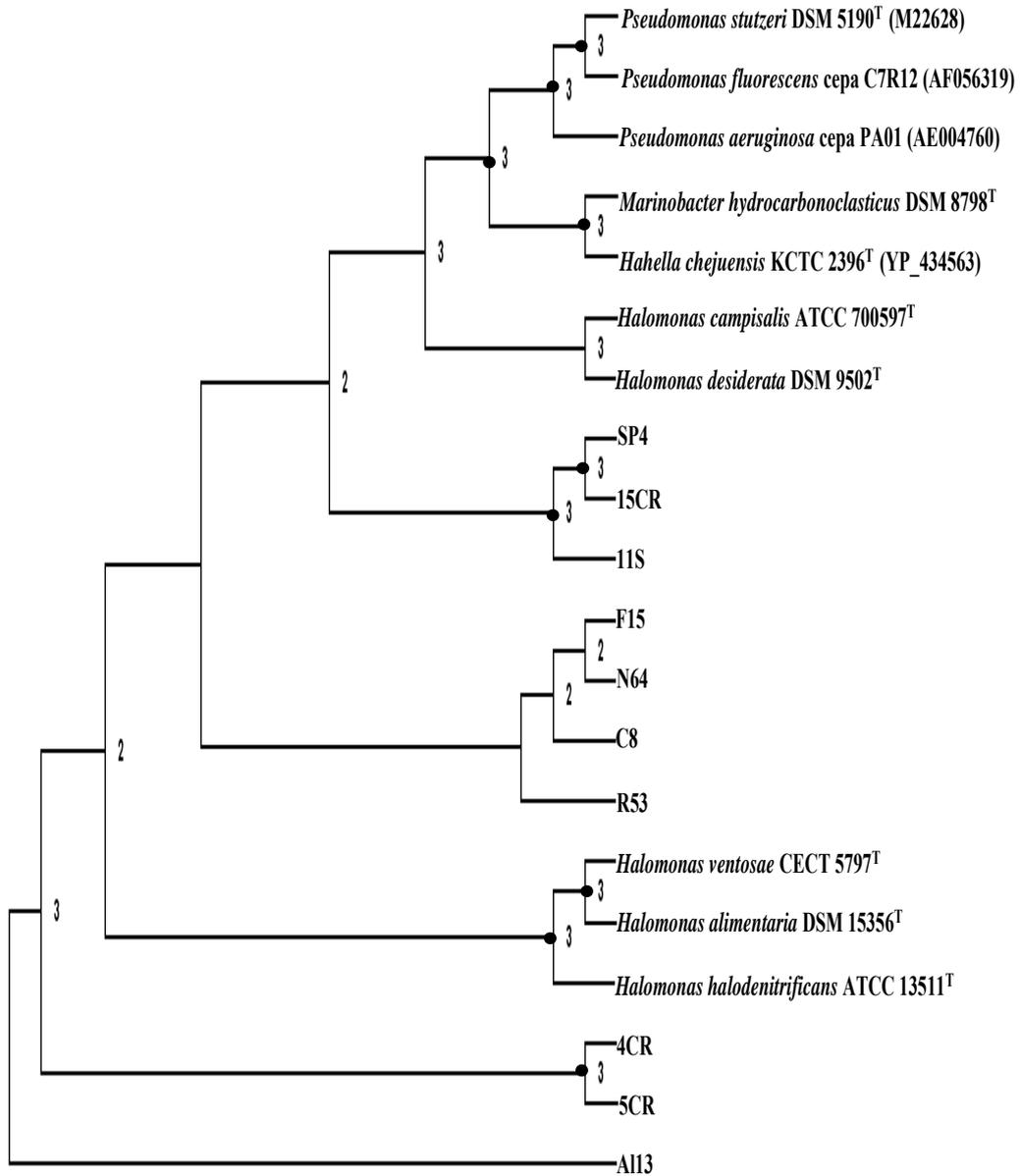


Figura 43. Árbol consenso obtenido a partir de la secuencia de nucleótidos del gen *nosZ*. Los valores en los nodos indican el número de métodos (Máxima Parsimonia, Neighbor-Joining y Máxima Probabilidad) en los que esa agrupación se presenta. Los puntos negros en los nodos señalan las agrupaciones con valores de “bootstrap” superiores al 50% en los tres métodos.

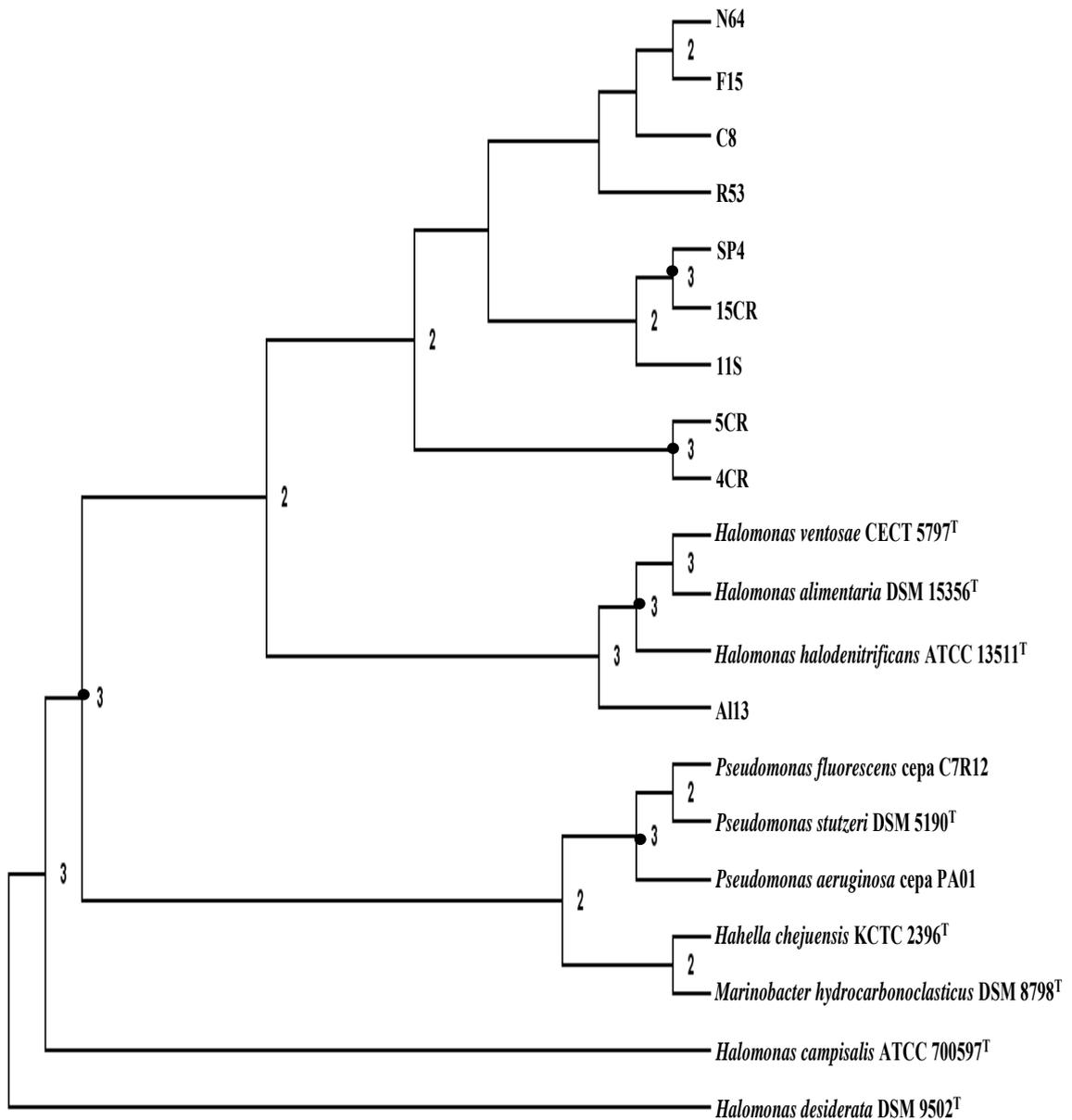


Figura 44. Árbol consenso obtenido a partir de la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína NosZ. Los valores en los nodos indican el número de métodos (Máxima Parsimonia, Neighbor-Joining y Máxima Probabilidad) en los que esa agrupación se presenta. Los puntos negros en los nodos señalan las agrupaciones con valores de “bootstrap” superiores al 50% en los tres métodos.

V.3. DISCUSIÓN

El proceso de desnitrificación se extiende entre ramas filogenéticas muy dispares, lo que dificulta en muchos casos establecer a partir de la secuencia del gen ARNr 16S una relación directa con la capacidad fisiológica de desnitrificar (Zumft, 1997; Philippot, 2002). Dentro de la comunidad desnitrificante para complementar la información que dicho gen aporta, en los últimos años se ha generalizado el uso en filogenia de genes que codifican las enzimas participantes en la desnitrificación (Braker y col., 1998, 2000; Braker y Tiedje, 2003; Scala y Kerkhof, 1998; Petri e Imhoff, 2000; Philippot, 2002; Gregory y col., 2003; Casciotti y Ward, 2005; Garbeva y col., 2007). El empleo de genes funcionales como apoyo a los datos filogenéticos aportados por el gen ARNr 16S está válidamente aceptado en sistemática bacteriana (Stackebrandt y col., 2002).

Teniendo en cuenta lo expuesto en el párrafo anterior y considerando los distintos filotipos establecidos en base al gen ARNr 16S, los cuales sugieren orígenes diferentes de las especies desnitrificantes del género *Halomonas* (véase Figura X, página X), nos planteamos en los microorganismos seleccionados en el Capítulo I la secuenciación de genes que codifican etapas clave de la desnitrificación. De esta forma comprobaremos si las relaciones filogenéticas a partir de esos genes eran consistentes con las basadas en el gen ARNr 16S y si aportaban información taxonómica adicional a la de dicho gen.

Los genes elegidos fueron *narH*, *nirS/nirK* y *nosZ*, que participan en la reducción de nitrato, nitrito y óxido nitroso, respectivamente (véase Figura 45).

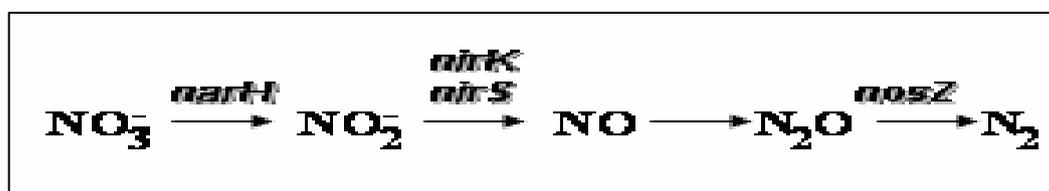


Figura 45. Genes empleados en el análisis filogenético, indicando las etapas del proceso de desnitrificación donde participan.

Diversos criterios fueron tenidos en cuenta en la selección de cada gen:

-El gen *narH*, que codifica la subunidad β de la nitrato reductasa unida a membrana, ya había sido empleado en otros estudios filogenéticos mostrando resultados interesantes (Petri e Imhoff, 2000). Aunque la reducción de nitrato a nitrito puede ser llevada a cabo también por una nitrato reductasa periplásmica, igualmente con utilidad filogenética (Flanagan y col., 1999), la Nar parece estar más extendida entre los microorganismos y por tanto, jugar un papel más relevante en el ciclo global del nitrógeno (Richardson, 2001; Richardson y col., 2001). Estas conclusiones justificaron su elección preferente sobre la enzima periplásmica en el análisis filogenético.

-La selección de los genes codificantes de la reducción de nitrito a óxido nítrico (*nirS* y *nirK*) era incuestionable, puesto que este paso constituye la primera etapa clave de un proceso de desnitrificación en sentido estricto (Zumft, 1997; Braker y col., 1998). Como ya se ha mencionado, la existencia de uno de estos genes excluye la del otro a nivel celular (Zumft, 1997; Jetten y col., 1997; Watmough y col., 1999), si bien ocasionalmente pueden coexistir en cepas distintas de una misma especie (Coyne y col., 1989) y en especies diferentes de un mismo género (Zumft, 1997).

La presencia del gen *nirS* en los microorganismos fue examinada en primer lugar atendiendo al patrón de distribución de genes establecido por Philippot (2002), según el cual la nitrato reductasa citocromo *cd₁* predomina entre las gammaproteobacterias. En aquellas cepas en las que la amplificación del gen *nirS* resultó fallida, se intentó la detección del gen *nirK*.

-El gen *nosZ* codifica la parte estructural de la óxido nitroso reductasa, que es la enzima más específica de un proceso de desnitrificación completo. Son muy reducidos el número de microorganismos no desnitrificantes que poseen dicha enzima (Zumft, 1992; 1997). Por ello, su elección también estaba clara, si bien debíamos tener en cuenta que existen variantes incompletas de la desnitrificación en las cuales la respiración sobre óxido nitroso está ausente; esta peculiaridad suele ser muy frecuente en bacterias carboxidotróficas (Hart y col., 1965; Renner y Becker, 1970), y se ha descrito también en desnitrificantes halófilos como *Bacillus halodenitrificans* (Denariáz y col., 1989).

Finalmente, en relación con los genes incluidos en el análisis filogenético, mencionar que se prescindió de los genes codificantes de la óxido nítrico reductasa, pues aunque el gen *norB* ha sido empleado en estudios de filogenia (Braker y Tiedje, 2003), la propiedad de reducir el óxido nítrico no es específica de la comunidad desnitrificante. Como se mencionó en la introducción, esta capacidad podría haberse desarrollado en algunos microorganismos como un mecanismo de detoxificación y en el caso de bacterias patógenas, como un factor de virulencia más que les permite eludir las defensas del hospedador (MacMicking y col., 1995; Wei y col., 1995; Zumft, 1997). Además se ha comprobado la existencia de un homólogo al gen *norB* en algunas bacterias oxidadoras de amonio (Casciotti y Ward, 2005).

Por otra parte, los microorganismos empleados en este estudio filogenético fueron todos aquéllos seleccionados en el primer capítulo, entre los cuales había algunos capaces sólo de respirar sobre nitratos. La reducción de nitrato a nitrito no se puede considerar desnitrificación en sentido estricto, ya que no culmina en un producto gaseoso liberado a la atmósfera (Zumft, 1997). Sin embargo, la desnitrificación tiene un carácter modular; así un microorganismo, aunque únicamente lleve a cabo parte del proceso, esas etapas van a ser catalizadas por el mismo tipo de enzimas que las de una desnitrificación completa (Gregory y col., 2003). En base a ello, se amplificó el gen *narH* también en las bacterias que sólo respiraban sobre nitratos y las secuencias fueron incluidas en el estudio filogenético. Con idéntico criterio se dispuso la secuenciación de ese mismo gen en *Halomonas elongata*, que en el momento de iniciarse este trabajo era junto con *H. maura*, las únicas especies del género *Halomonas* no desnitrificantes pero con capacidad para respirar sobre nitratos (Mata y col., 2002). La correcta secuenciación de *H. elongata* fue obtenida por clonación del inserto correspondiente en el vector p-GEM[®]-T (Promega[®]), tal y como se ha explicado en el apartado V.1.C. Por su parte, la secuencia del gen *narH* de *H. maura* ya estaba disponible (Argandoña y col., 2006).

Para el análisis filogenético se emplearon cinco microorganismos desnitrificantes como especies externas no pertenecientes al género *Halomonas*: *Pseudomonas aeruginosa* (cepa PA01), *P. fluorescens* (cepa C7R12), *P. stutzeri* (cepa tipo DSM 5190^T), *Hahella chejuensis* (KCTC 2396^T) y *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (cepa tipo DSM 8798^T). Todas estas especies eran

también gammaproteobacterias y se disponía de las secuencias de sus genes ADNr 16S, *narH*, *nirS* y *nosZ*. En el caso de las cuatro primeras las secuencias estaban disponibles en la base de datos GenBank, mientras que las de *M. hydrocarbonoclasticus* se obtuvieron durante la realización de este trabajo. Las razones por las cuales se eligieron se exponen seguidamente:

-El género *Pseudomonas* es uno de los que más especies desnitrificantes engloba (Zumft, 1997), lo que ha favorecido un amplio conocimiento del proceso en estos microorganismos y que especies como *Pseudomonas stutzeri* sirvan de modelo para otros estudios de desnitrificación (Lalucat, 2006).

-*Hahella chejuensis* es una bacteria halófila marina, productora de abundante exopolisacárido, con cuyos genes de la desnitrificación presentaban semejanza algunos de los microorganismos objeto de estudio.

-Finalmente, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* fue seleccionada por su proximidad filogenética con la familia *Halomonadaceae*, aparte obviamente de por su capacidad desnitrificante. Los oligonucleótidos empleados en la secuenciación de sus genes *narH*, *nirS* y *nosZ* se recogen en el apéndice III.

Seguidamente nos centraremos en el análisis filogenético, discutiendo previamente la metodología usada, y más tarde los resultados obtenidos con cada gen.

V.3.1. METODOLOGÍA USADA

Los datos de secuencias obtenidos fueron alineados tal y como ya se ha explicado en Material y Métodos. Este alineamiento original fue procesado con el programa *Gblocks* para eliminar regiones ambiguas o pobremente alineadas (Castresana, 2000). En el caso del gen ARNr 16S, al encontrarse bajo una fuerte presión conservadora, posee una tasa de mutación baja y como consecuencia un elevado grado de conservación, lo cual origina que sus secuencias sean fácilmente alineables; este hecho, junto con la disposición en todos los microorganismos de

secuencias de aproximadamente el mismo tamaño, explicaría el porcentaje tan alto (92% en todos los casos) del alineamiento original del gen ARNr 16S que permanece tras el procesamiento con el programa *Gblocks*.

Por su parte los genes funcionales, a diferencia del gen ribosómico, poseen una tasa de mutación algo mayor, con lo cual pueden surgir dificultades en el alineamiento de regiones altamente variables; en estos casos, la ejecución del programa *Gblocks* resulta indispensable. Como se puede observar en la Tabla X el porcentaje remanente del alineamiento original no es muy alto, sin embargo, hay que tener en cuenta también que las secuencias extraídas de la base de datos corresponden a los genes completos (aproximadamente 1600-1900pb), mientras que en nuestro caso sólo hemos secuenciado un fragmento de los mismos (1000pb como máximo). Mediante *Gblocks* se hicieron bloques compactos, presentes en todas las secuencias, que fueron los que finalmente se alinearon y utilizaron en el análisis filogenético.

Para la reconstrucción filogenética se emplearon tres métodos: Máxima Parsimonia, Neighbour-Joining y Máxima Probabilidad. De esta forma lográbamos una cierta fidelidad en la topología obtenida, ya que cuando una agrupación era sostenida por varios métodos, podíamos confiar en que el origen monofilético de la misma provenía de los datos analizados y no del algoritmo usado (Chelo y col., 2007). Para facilitar la interpretación de los resultados, en cada caso se obtuvo un árbol consenso de los tres métodos mediante la “regla de la mayoría”, que considera la frecuencia de aparición de las agrupaciones, de manera que si éstas se presentan en más de uno de los árboles de partida, finalmente aparecerá en el árbol consenso.

Las distancias evolutivas fueron calculadas por el modelo de Kimura two-parameter (Kimura, 1980), en lugar de por el de Jukes y Cantor (1969) que fue el empleado en el análisis filogenético de la familia *Halomonadaceae* en el Capítulo II. La razón de este cambio estriba en que al emplear como outgroups especies pertenecientes a otros taxones distintos a los incluidos en esta familia, si la proporción de sitios diferentes llegaba a ser en alguno de los genes mayor o igual al 75%, el factor de corrección de Jukes y Cantor no podía ser aplicado (de acuerdo a la información de Kumar y col., 2004, para el programa *Mega 3.1*).

Una vez obtenidos los árboles, es interesante comentar que se empleó el programa *treedist* para la cuantificación de las diferencias o similitudes de la topología global entre árboles filogenéticos. Como criterio empleado en dicha aplicación optamos por la “distancia simétrica”, de cuya validez en estudios filogenéticos ya existe constancia (Wolf y col., 2002).

Por último, se determinó también el contenido en G+C (moles %) de las secuencias empleadas de todos los genes, como dato de apoyo a las filogenias obtenidas a partir de ellas. Si se observa la Tabla 41, se puede comprobar que todos los genes, con excepción del gen ARNr 16S, contienen el mismo porcentaje, bastante similar además al contenido del genoma. No obstante, la importancia de este valor es relativa, puesto que se ha visto que un gen adquirido por transferencia horizontal en un momento temprano de la evolución, será sometido a los mismos procesos de mutación que el resto del genoma y con el tiempo, ese gen transferido comenzará a reflejar la misma composición que éste (Lawrence y Ochman, 1997; Coenye y col., 2005).

V.3.2. FILOGENIA BASADA EN EL GEN ARNr 16S

Continúa siendo la herramienta filogenética cuyo empleo está más extendido y en la que los investigadores depositan más confianza (Stackebrandt y col., 2002). Por ello, la filogenia obtenida a partir de este gen se ha tomado como base en el análisis y consideración de las filogenias restantes obtenidas a partir de la secuencia de los otros genes.

En el árbol consenso obtenido en base al gen ARNr 16S se observa una separación clara, con valores de “bootstrap” superiores al 50% en todos los métodos (véase la Figura 38), entre las especies externas u outgroups y el resto de microorganismos del género *Halomonas*. Dentro de este género, las especies *H. campisalis* y *H. desiderata* se alejan del resto de microorganismos, tal y como ya habíamos visto en el Capítulo II, en la afiliación filogenética de la familia *Halomonadaceae* (Figura 24, página 111); estas especies formaban una agrupación independiente con otros microorganismos descritos recientemente, y por tanto, no incluidos en este estudio, con los cuales compartían la propiedad de ser haloalcalófilos y desnitrificantes, con la salvedad de *H.*

campaniensis donde esta última característica no está demostrada ni, por tanto, se descarta (Romano y col., 2005).

Con relación al resto de microorganismos objeto de estudio, se observan tres filotipos: El mayoritario en número incluye a las especies desnitrificantes *H. alimentaria*, *H. halodenitrificans* y *H. ventosae*, así como las cinco cepas afiliadas a este último taxón: 4CR, C8, F15, HGD1 y N64 (véase la Discusión del Capítulo II). También la cepa 5CR, sin posición taxonómica definitiva (apartado IV.3.5.) formaría parte de este filotipo.

Asimismo, encontramos otra agrupación constituida en su mayoría por microorganismos capaces de respirar sólo sobre nitratos: *H. elongata* y *H. maura*, así como las cepas 12CR, F5 y S19. La caracterización taxonómica de estas dos últimas cepas, expuesta en el capítulo anterior, las adscribe a la especie *H. eurihalina*, en la cual no se ha descrito la capacidad mencionada (Mata y col., 2002). Por otra parte, este filotipo también incluye otras cepas que llevaban a cabo una desnitrificación completa: Cepas A113 y 11S, que constituyen nuevos taxones, en el caso de A113 aún por definir completamente.

Finalmente, podemos definir otro filotipo en relación al gen ARNr 16S que está formado por la especie *Halomonas cerina*, descrita durante la realización de este trabajo y que engloba a las cepas 15CR, R53 y SP4^T. Este filotipo también incluiría la cepa HGDK1, filogenéticamente muy próxima a *H. koreensis*, de la cual no se ha descrito capacidad desnitrificante.

V.3.3. FILOGENIA BASADA EN EL GEN *narH* Y EN LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DEDUCIDA DE LA PROTEÍNA NarH

La comparación cuantitativa de la topología del árbol filogenético basado en el gen ARNr 16S con la del gen *narH* y proteína en cuestión, muestra que la mayor similaridad se da con esta última, si bien en ambos casos las diferencias obtenidas con el programa *treedist* son relativamente bajas, lo que sugiere que la función nitrato reductasa se retuvo a través de la mayor parte de la evolución y está totalmente de acuerdo con otros estudios realizados en base a dicho gen (Petri e Imhoff, 2000). Las secuencias de nucleótidos del gen y las deducidas de aminoácidos de la

proteína correspondiente, muestran unos valores de semejanza entre microorganismos muy parecidos (Apéndices V y VI); igualmente, los árboles filogenéticos obtenidos a partir de ellas presentan la misma topología, como se puede comprobar en la Tabla 38 donde se indican las distancias simétricas entre ellos. Esta concordancia indica una evolución común del gen *narH* y de su función en esos microorganismos, y lo convierte en una herramienta factible como alternativa al gen ARNr 16S para estudiar la diversidad de las especies del género *Halomonas* en un hábitat.

Las agrupaciones presentes tanto en los árboles consenso del gen *narH* como de la proteína Nar (Figuras 39 y 40) en general, se mantienen independientemente del método, como se puede comprobar por los números en los nodos. Además son apoyadas, especialmente en los árboles del gen, por valores de “bootstrap” altos. Los distintos grupos que se observan comparten una serie de similitudes con los del gen ARNr 16S: Así, los microorganismos que sólo respiran sobre nitratos vuelven de nuevo a agruparse, quedando algo más alejada la especie *Halomonas maura*, que se sitúa más próxima a las cepas 11S y HGDK1, con capacidad desnitrificante. Por su parte, la agrupación que engloba a *H. ventosae* y cepas relacionadas sigue siendo compacta e incluye en este caso otros microorganismos desnitrificantes, como las cepas 5CR y A113. Como diferencia más significativa entre la filogenia del gen ARNr 16S y la derivada del gen *narH* y de la enzima nitrato reductasa es la agrupación de las especies *H. alimentaria*, *H. campisalis*, *H. desiderata* y *H. halodenitrificans* entre sí de forma independiente y más ligadas a las especies externas, aunque con éstas los porcentajes de semejanza entre secuencias son muy bajos, lo cual sugiere un origen diferente.

V.3.4. FILOGENIA BASADA EN EL GEN *nirS* Y EN LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DEDUCIDA DE LA PROTEÍNA NirS

Como ya se ha mencionado en el apartado de Resultados, la amplificación y secuenciación del gen *nirS* se logra en todos los microorganismos desnitrificantes, con excepción de *H. campisalis*. Asimismo se intenta la detección de dicho gen en las cepas que sólo respiran sobre nitratos de acuerdo a las pruebas descritas en los capítulos anteriores; en ellas no se consigue el fragmento deseado. Así, aún teniendo en cuenta que la presencia de los genes no siempre

implica su funcionalidad (Flanagan y col., 1999; Philippot, 2002; Tuomanien y col., 2003; Wallenstein y col., 2006), si combinamos los resultados fenotípicos y moleculares se nos confirma que esas cepas carecen de la capacidad desnitrificante.

El principal problema con que nos encontramos a la hora de establecer una relación filogenética en base al gen *nirS* y su proteína correspondiente es el no disponer de las secuencias en *H. campisalis*, en la cual, como ya se ha mencionado anteriormente, no se obtiene el producto esperado a pesar de que su actividad nitrato reductasa es manifiesta (véanse los capítulos anteriores así como el Capítulo IV). Una posible explicación a este hecho es que el microorganismo tuviera un gen muy diferente al resto, de manera que no se produjera la hibridación con la pareja de oligonucleótidos probada. Esta hipótesis podría venir apoyada por el bajo porcentaje de semejanza que la secuencia del gen *nirS* en *H. desiderata* guarda con el resto de microorganismos (por debajo del 50%), especie con la cual *H. campisalis* parece compartir origen evolutivo, de acuerdo a los resultados obtenidos para el resto de genes. Una diferencia aún mayor en el caso de *H. campisalis* podría haber conducido a la infructuosa detección del gen. Esta heterogenicidad como causa de una amplificación fallida se ha visto no sólo cuando se usan cebadores de bacterias en arqueas (Philippot, 2002), sino también en cepas bacterianas con capacidad desnitrificante probada (Goregues y col., 2005; Heylen y col., 2006). En *H. campisalis* también se intentó la amplificación del gen *nirK*, pero con idéntico resultado. Para descartar problemas de funcionalidad del ADN de partida, éste fue empleado reiteradas veces en la amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S, tal y como hacían previamente en sus estudios Braker y col. (2000).

Cuando se comparan los árboles obtenidos, se observa que la influencia del método usado si la filogenia se establece en base a la secuencia de aminoácidos es mayor que cuando partimos de la de nucleótidos (véanse los números de los nodos en las Figuras 41 y 42) y más acusada que en el caso del gen *narH* y proteína correspondiente (Figuras 39 y 40). No obstante, existe una mayoría de agrupaciones que se mantienen estables independientemente del algoritmo usado y con valores de “bootstrap” altos. A continuación paso a comentar las mismas.

Como ocurría con los anteriores genes, la agrupación que engloba a *H. ventosae* y las cepas adscritas a este taxón sigue siendo consistente, con porcentajes de semejanza entre

secuencias altas (Apéndice VII y VIII). Esto apoya nuevamente una filogenia común y, en el caso del gen *nirS* y proteína Nir, más próxima a *H. alimentaria* y *H. halodenitrificans*. Otros microorganismos desnitrificantes, como las cepas A113 y 5CR, también entrarían dentro de esta agrupación.

Con respecto a la especie *H. desiderata*, como ya se ha comentado, se aleja completamente del resto de bacterias pertenecientes al género *Halomonas*. Su origen evolutivo difiere del de ellas y este alejamiento se hace más manifiesto cuando se emplea el gen *nirS* y la proteína correspondiente. Si se estudian sus características fenotípicas con detenimiento, así como el hábitat donde se aisló, una planta de tratamiento de aguas residuales con un pH alcalino y alta concentración de nitratos, quizás más que de un gen *nirS* (y por extensión, de los restantes genes) completamente diferente podríamos hablar de un desnitrificante distinto, sometido a una mayor presión selectiva en relación al proceso de desnitrificación que el resto de especies de *Halomonas*. Una gran influencia del ambiente en la filogenia del gen *nirS* ya ha sido sugerida por otros autores (Heylen y col., 2006).

Existen otros microorganismos, como las cepas 11S y HGDK1, que difieren en su agrupación dependiendo de si estamos trabajando con nucleótidos o aminoácidos. En relación a estos últimos, se aproximan al grupo de *H. alimentaria*, *H. halodenitrificans* y *H. ventosae*, mientras que si nos basamos en la filogenia obtenida a partir de la secuencia nucleotídica del gen *nirS*, observamos su agrupación con las cepas 15CR, R53 y SP4, que parecen haber seguido un camino evolutivo distinto al del resto de microorganismos, tanto si hablamos de nucleótidos como de aminoácidos.

V.3.5. FILOGENIA BASADA EN EL GEN *nosZ* Y EN LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DEDUCIDA DE LA PROTEÍNA NosZ

En el caso del gen *nosZ* no se logra amplificar el fragmento deseado en dos de las cepas desnitrificantes, HGD1 y HGDK1, aunque en ambas y en anaerobiosis observábamos su capacidad desnitrificante. En relación a la cepa HGD1 durante la caracterización taxonómica se comprobó su incapacidad para formar gas en la prueba de reducción de nitratos en aerobiosis (Capítulo II); este

dato fenotípico, junto a la no amplificación del gen *nosZ* nos podría inducir a pensar en una versión desnitrificante en la cual se pierde la respiración sobre óxido nitroso, que sería, por tanto, el producto final del proceso (Zumft, 1997). Al igual que ocurría con el gen *nirS* en *H. campisalis*, resulta fundamental la combinación de técnicas clásicas con moleculares para un mejor conocimiento de la fisiología del proceso, tanto en microorganismos aislados como a nivel ambiental (Philippot, 2002). En el caso de la cepa HGDK1 será necesario realizar experimentos adicionales para comprobar el producto final del proceso.

Atendiendo a los valores medianamente altos de distancia simétrica del programa *treedist* entre el árbol filogenético del ARNr 16S y los correspondientes del gen *nosZ* y la proteína NosZ, sabemos que estamos ante topologías no excesivamente similares. Las diferencias con el gen ribosómico son mayores a las vistas anteriormente con los otros genes funcionales.

En primer lugar llama la atención por la reiterada presencia en los árboles filogenéticos de los genes *narH* (y proteína NarH) y *nirS* (y proteína NirS), que la agrupación bastante estable de *H. ventosae* y las cepas 4CR, C8, F15, HGD1 y N64, se rompe con respecto al gen *nosZ*. Así, la cepa 4CR forma con la cepa 5CR un grupo independiente y separado completamente de la especie *H. ventosae*, situada más próxima a *H. alimentaria* y *H. halodenitrificans*.

Con respecto a las cepas pertenecientes a la especie *H. cerina*, descrita como se mencionó durante la realización de esta Tesis Doctoral, se observa una separación bastante clara entre las cepas 15CR y SP4, por un lado, y la cepa R53 por otro. A nivel fisiológico esta diversidad intraespecífica en el último paso ha sido constatada en *Pseudomonas fluorescens* (Greenberg y Becker, 1977) pero podría también encontrar su reflejo a nivel molecular (Philippot, 2002). Por su parte, la cepa 11S, que se ha mostrado siempre próxima en mayor o menor medida a este taxón, aparece nuevamente agrupada con las cepas 15CR y SP4.

Por otra parte, como viene siendo habitual, las especies haloalcalófilas y desnitrificantes, *Halomonas campisalis* y *H. desiderata*, siguen formando una rama filogenética independiente, claramente alejada del resto de microorganismos del género *Halomonas*.

Por último, las agrupaciones son prácticamente idénticas en general tanto en los árboles obtenidos a partir de la secuencia de nucleótidos del gen *nosZ* como a partir de la deducida de aminoácidos, sin embargo, los valores de semejanza de ambas secuencias difieren significativamente entre algunos microorganismos, siendo mayores en el primer caso (Apéndice IX y X). Como ejemplo de estas diferencias, encontramos que entre *H. campisalis* y *H. desiderata* existe un 88,7% de semejanza en las secuencias de nucleótidos y un 70,7% en la de aminoácidos, ó entre *H. halodenitrificans* y *H. ventosae*, con un 92,8% de semejanza en las secuencias de nucleótidos y 84,7% en la deducida de aminoácidos. La situación contraria, es decir, valores de semejanza ligeramente más altos a nivel de ADN que de aminoácidos, fue descrita por Scala y Kerkhof (1999) para muestras ambientales. Es evidente que el gen *nosZ* de los microorganismos objeto de estudio está sometido a una tasa de mutación mayor que los anteriores genes estudiados, *narH* y *nirS*, codificando enzimas menos semejantes entre microorganismos, pero en las que se conservan varios residuos (véase el alineamiento del disco compacto) que deben ser esenciales para la permanencia de la función.

Capítulo IV:

Estudio fisiológico de la desnitrificación

RESUMEN

En el Capítulo I se seleccionaron fenotípicamente una serie de cepas por su capacidad para respirar sobre nitratos o realizar una desnitrificación completa. Posteriormente, se confirmó dicha propiedad con la secuenciación de algunos de los genes clave que participan en esas reacciones, estableciéndose además relaciones filogenéticas en base a ellos (Capítulo III). En el presente capítulo, se planteó el análisis de la diversidad fisiológica del proceso, cuantificando el crecimiento en anaerobiosis, con nitrato como aceptor terminal de electrones, y con suplementos de diferentes fuentes de carbono. Asimismo, también se analizó la variación en la concentración de nitrito como resultado de la respiración sobre nitrato y sobre el mismo nitrito formado a partir de éste.

La metodología seguida fue la de Peyton y col. (2001), si bien las condiciones se adaptaron al óptimo de la mayoría de nuestros microorganismos, con concentraciones de NaCl de 80.0 g/l y pH 8.0-8.2. Como fuentes de carbono se ensayaron acetato, citrato y lactato, realizándose asimismo otro ensayo simplemente con el medio base.

Los resultados muestran que, en términos generales, la inducción de la actividad nitrito reductasa no es inmediata, retrasándose con respecto a la nitrato reductasa, y provocando que el nitrito se acumule durante más o menos tiempo dependiendo del microorganismo. Se observa asimismo, que si los microorganismos crecen, la tasa de respiración sobre nitrato y nitrito no muestra un patrón definido en relación a la fuente de carbono y va a depender en último término del microorganismo. Por otro lado, el citrato es el compuesto donde menor número de especies desnitrificantes de *Halomonas* y cepas seleccionadas en el Capítulo I crecen.

Las bacterias que mejor tasa de crecimiento y actividad nitrato y nitrito reductasa presentan en el mayor número de fuentes de carbono son *H. campisalis*, entre las especies de referencia, y la cepa N64, relacionada con *H. ventosae*, entre los microorganismos caracterizados en este trabajo.

Finalmente se determinó la capacidad de estos microorganismos para la formación de biofilms. El interés por esta propiedad radica en futuras aplicaciones a procesos de biorremediación en los que se usan sistemas mediados por biopelículas. Las cepas 11S, HGDK1 y N64 resultaron ser entre las desnitrificantes las que mayor cantidad de biofilms formaron.

SUMMARY

We have studied phenotypic (Chapter II) and phylogenetic (Chapter III) diversity of the denitrifying species of the genus *Halomonas* and the strains selected in the Chapter I. After these studies, we targeted to the physiological diversity among them by comparing their rates of respiration on nitrate and/or nitrite, by using media supplemented with various sources of carbon for growth and with high percentages of salts.

We carried out the methodology of Peyton et al. (2001), using the same medium described by them but lowering down the amount of NaCl to 80.0 g/l and the pH to 8.0-8.2, conditions closer to the optima from most of our bacteria.

The results show that the activity nitrite reductasa is delayed with regard to nitrate reductase, causing nitrite accumulation for a time, longer or shorter depending on the microorganism. We don't find a trend relating carbon source and nitrite respiration since it also depends on the bacteria. In addition, citrate is the compound with the least number of microorganism grow with.

H. campisalis among denitrifying species belonging to the genus *Halomonas* and the strain N64, among the bacteria selected in Chapter I, are the microorganisms with the best nitrite respiration rates in most of the carbon sources.

IV. ESTUDIO FISIOLÓGICO DE LA DESNITRIFICACIÓN

VI.1. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1.1. MICROORGANISMOS

Para este estudio seleccionamos todas las cepas desnitrificantes de referencia (incluyendo *H. alimentaria*), cepas representantes de cada fenón, así como aquellas cepas que no se agrupaban dentro de ninguno de los fena al 85% de semejanza (apartado IV.3). En la Tabla 42, se recogen los microorganismos estudiados.

Tabla 42. Microorganismos estudiados desde el punto de vista fisiológico.

Microorganismos	
<i>H. alimentaria</i> DSM 15356 ^T	11S (representante fenón 1)
<i>H. campisalis</i> ATCC 700597 ^T	5CR
<i>H. desiderata</i> DSM 9502 ^T	A113
<i>H. halodenitrificans</i> ATCC 13511 ^T	N64 (representante fenón 2)
<i>H. ventosae</i> CECT 5797 ^T	HGDK1
	SP4 (representante fenón 4)
	F5 (representante fenón 3)

■ La cepa sombreada en gris respira sobre nitratos, pero no realiza una desnitrificación completa (apartado III.2.3)

VI.1.2. TASA DE RESPIRACIÓN SOBRE NITRATO Y NITRITO CON DIFERENTES FUENTES DE CARBONO Y ALTA CONCENTRACIÓN DE SAL

VI.1.2.1. Descripción del procedimiento de cultivo y muestreo

Los ensayos fueron realizados siguiendo la metodología de Peyton y col. (2001). Se empleó el mismo medio usado por ellos, si bien la concentración de NaCl y el pH se disminuyeron hasta 80.0 g/l y 8.0-8.2, respectivamente, con objeto de conseguir unas condiciones más próximas al óptimo de la mayoría de las cepas del estudio. El medio base empleado en los inóculos y ensayos se describe en la página siguiente.

Medio base
(Peyton y col., 2001)

NaCl (Panreac®).....	80g
KH ₂ PO ₄ (Merck®).....	0.5g
NH ₄ Cl (Merck®).....	1.0g
Na ₂ B ₄ O ₇ (Merck®).....	4.0g
NaNO ₃ (Panreac®).....	0.69g
Extracto de levadura(Panreac®)..	1.0g
H ₂ O destilada c.s.p.....	1000ml

Aparte de los componentes básicos del medio, se ensayaron diferentes fuentes de carbono: Acetato, citrato y lactato, que fueron adicionados a una concentración final del 1% (p/v) para asegurar de esta forma la no limitación del sistema por el sustrato carbonado. Como control, también se llevó a cabo el mismo ensayo sin fuente de carbono.

Para el inóculo se emplearon tubos de ensayo con el medio base descrito en esta página, adicionado de un 1% de acetato. Siguiendo las recomendaciones de Stanier y col. (1966), la incubación del inóculo se hizo en aerobiosis pero sin agitación, para evitar la difusión del oxígeno en el medio y la posible represión de las enzimas desnitrificantes (Cavigelli y Robertson, 2000).

Para los ensayos, el medio se repartió en botes de 100 ml, cerrados con un tapón de goma y sellados con un anillo de aluminio y se procedió a la esterilización de la forma habitual (112°C, 15 minutos). A continuación se sustituyó el oxígeno del medio y del espacio interior del frasco por un gas inerte, en concreto Argón.

La temperatura empleada fue la misma tanto en la incubación del inóculo como durante el ensayo: 32°C. Se cultivaron los microorganismos siempre en oscuridad, para evitar la inhibición por la luz de la nitrito reductasa, influencia comprobada incluso en organismos desnitrificantes no fotosintéticos (Mütze, 1963; Barak y col., 1998).

Para cada microorganismo, el estudio se hizo por triplicado con cada una de las fuentes de carbono, así como con el medio base sin suplementar. La inoculación, siempre al 1% (v/v) se llevó a cabo por medio de una jeringa, al igual que las posteriores tomas de muestra, trabajando siempre en condiciones de esterilidad; hasta el momento de medir las muestras se dejaron almacenadas a 4°C. El intervalo de muestreo fue de dos horas en las primeras cuarenta y ocho horas; tras este período inicial las muestras se tomaron una vez cada 24 horas, extendiéndose el ensayo durante un total de ocho días.

Asimismo, en toda tanda de ensayos se empleó como control negativo de crecimiento y respiración, un bote de medio base sin inocular, pero al que se le hicieron todos los muestreos y análisis correspondientes.

VI.1.2.2. Método analítico

El crecimiento bacteriano fue evaluado indirectamente por cuantificación del total de proteínas producidas por el microorganismo, procedimiento ya utilizado en otros trabajos (Barak y col., 1998; Nittayajarn y Baker, 2005). Se empleó el kit comercial “*BCATM Protein Assay Kit*” (Pierce[®]) que permite la detección colorimétrica de proteínas por formación de un complejo púrpura con una fuerte absorbancia a 562 nm. Este complejo está constituido por ácido bicínico (BCA), el cual quela dos moléculas de Cu^{+1} procedentes de la reducción por las proteínas del medio de un reactivo con Cu^{+2} . La sensibilidad y selectividad del método es similar a la técnica de Lowry (Smith y col., 1987).

En la cuantificación de proteínas totales se emplearon 100 μl de muestra y se siguió el protocolo fijado por el fabricante.

Por su parte, los nitratos y nitritos fueron medidos empleando otro método colorimétrico. El nitrato para su cuantificación se redujo previamente a nitrito usando hidracina y la mezcla reductora de zinc contenida en el kit “Nitrate/Nitrite Assay kit” (Amresco[®]). Las concentraciones

de nitrito fueron determinadas tras la reacción del mismo con sulfanilamida en solución ácida, lo que daba origen a un compuesto diazótico de color rosado, detectable a 550 nm (Barnes y Folkard, 1951). El protocolo seguido se describe en el siguiente esquema:

Protocolo para la determinación de nitrito

Todas las reacciones siguientes se realizaron en un pocillo de una placa *microtiter*, el cual contenía **200 µl de cada muestra:**

1°) Añadir a cada pocillo 20 µl de solución NaOH al 1% (p/v).

2°) Adicionar 10 µl de solución D (Mezcla de 80 ml de H₂O y 10 mL de ácido fosfórico al 85% p/v. En esta mezcla se disuelven 1mg de sulfanilamida y, a continuación, 0,1 mg de *n*-naftil-etilendiaminodichloro).

3°) Incubar la placa *microtiter* de 10 a 30 minutos para leer la absorbancia.

Las medidas de absorbancia fueron hechas con el lector FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH™). La interpretación de las mismas se realizó extrapolando los valores en una recta patrón preparada con concentraciones conocidas de nitritos (de 0 mM a 15 mM).

VI.1.2.3. Expresión de los resultados

Aparte de la representación gráfica de los resultados, se calculó para cada microorganismo y fuente de carbono la concentración máxima de nitritos en función del tiempo y de la biomasa producida, expresando esta última como mg/l de proteínas.

VI.1.3. CUANTIFICACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS MEDIANTE TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA

Se siguió la técnica de O'Toole y col. (1998), si bien se substituyó el medio de cultivo original por MY líquido al 7.5% (p/v) (composición en apartado III.1.2.). Cada una de las bacterias a ensayar se sembró en tubos de 3 ml de dicho medio y se incubó a 32°C y en agitación durante 24 horas. Posteriormente se hicieron diluciones 1:100 en el mismo medio MY y se transfirieron 100

µl de cada dilución a placas *microtiter* fabricadas de PVC (cloruro de polivinilo) y se procedió a la incubación de las mismas durante 40 horas, en las condiciones antes mencionadas.

A continuación, se midió la densidad óptica de los cultivos a 600 nm, se vació el contenido líquido y se lavaron las placas *microtiter* con agua destilada estéril. Las células adheridas a las paredes de las placas fueron teñidas con una solución al 1% (p/v) de cristal violeta en etanol de 95°, durante 15 minutos, pasados los cuales, se lavó abundantemente con agua para eliminar el colorante no fijado a las células. Posteriormente, las biopelículas o biofilms fueron resuspendidos en etanol de 95° mediante agitación vigorosa, y se midió la densidad óptica de la suspensión resultante a 540 nm. Para cada caso se empleó como blanco el medio de cultivo sin inocular.

VI.2. RESULTADOS

VI.2.1. TASA DE RESPIRACIÓN SOBRE NITRATO Y NITRITO CON DIFERENTES FUENTES DE CARBONO Y ALTA CONCENTRACIÓN DE SAL

VI.2.1.1. Determinación de parámetros cinéticos comparativos

En la Tabla 43 se muestran los valores máximos de nitrito detectado para cada fuente de carbono.

Tabla 43. Concentración máxima de nitrito (mg/l).

Microorganismo	Fte de carbono	Acetato	Citrato	Lactato	Medio base
<i>H. alimentaria</i>		317,58	244,53 (*)	201,56	284,28
<i>H. campisalis</i>		559,71	510,51	565,88	561,66
<i>H. desiderata</i>		341,82	334,10	341,82	339,26
<i>H. halodenitrificans</i>		349,54	258,56(*)	335,37	357,07
<i>H. ventosae</i>		317,47	292,03(*)	383,81	380,81
11S		343,78	204,15(*)	348,68	340,57
5CR		250,74	183,06(*)	357,15	332,32(*)
A113		30,66(*)	20,17(*)	37,40(*)	264,21(*)
N64		377,33	370,27	319,96	370,27
HGDK1		285,95	20,42(*)	34,65	137,06
SP4		106,16(*)	1,24(*)	49,50(*)	161,13(*)
F5		384,10	380,91 (*)	368,49	382,15

(*): No se observó crecimiento

En la Tabla 44 se recoge la velocidad máxima de respiración sobre nitrato expresada como concentración máxima de nitrito en el tiempo. También se expone la relación con la producción de biomasa durante el ensayo.

Tabla 44. Velocidad máxima de respiración sobre nitrato expresada como concentración máxima de nitrato en el tiempo y relación con la formación de biomasa, expresada como mg de proteínas.

Fte de carbono Microorganismo	Acetato		Citrato		Lactato		Medio base	
	NO ₂ ⁻ max (mg/l) /h	NO ₂ ⁻ max (mg/l) / prot (mg)	NO ₂ ⁻ max (mg/l) /h	NO ₂ ⁻ max (mg/l) / prot (mg)	NO ₂ ⁻ max (mg/l) /h	NO ₂ ⁻ max (mg/l) / prot (mg)	NO ₂ ⁻ max (mg/l) /h	NO ₂ ⁻ max (mg/l) / prot (mg)
	<i>H. alimentaria</i>	4,52	1,65	1,27	8,17 (*)	1,70	0,54	2,41
<i>H. campisalis</i>	22,38	1,86	20,42	1,70	22,63	1,53	22,46	2,00
<i>H. desiderata</i>	4,79	1,06	4,88	1,55	2,90	1,13	2,90	1,44
<i>H. halodenitrificans</i>	15,88	2,83	2,19	10,48(*)	15,24	2,96	11,52	3,08
<i>H. ventosae</i>	1,81	5,37	1,76	35,61(*)	4,00	5,88	2,21	7,74
11S	7,47	3,52	2,89	2,15 (*)	4,98	8,35	4,91	2,31
5CR	2,72	3,58	1,55	7,86 (*)	2,51	4,45	2,00	6,88 (*)
A113	0,66	0,30 (*)	0,14	0,96 (*)	0,31	1,60(*)	1,86	3,94(*)
N64	17,15	1,04	5,30	1,17	7,27	2,43	11,57	1,09
HGDK1	4,08	5,50	0,17	0,98 (*)	0,18	0,49	0,96	1,50
SP4	1,13	1,65 (*)	0,01	0,03 (*)	0,30	1,70 (*)	1,27	2,10 (*)
F5	4,08	7,43	5,26	34,90 (*)	5,26	8,35	4,08	7,20

(*): No se observa crecimiento

En las Figuras 46 a 58, se presenta la representación gráfica de los resultados obtenidos en los microorganismos estudiados, así como en los controles negativos.

En las gráficas no se ha recogido la cinética de desaparición de nitrato, pues el método analítico propuesto (apartado VI.1.B.b) no permitía reducir completamente los nitratos remanentes a nitritos, con lo cual los valores que se obtenían eran incongruentes con los nitritos medidos y no se ajustaban a la realidad. Este problema y su posible solución con otros métodos alternativos para medir nitratos en medios con alto contenido en sal, serán discutidos en el apartado VI.3. de este capítulo.

Por otra parte, la escala de valores en el eje -Y- y -Z- se ajustó para cada microorganismo, de manera que permitiera observar más adecuadamente el incremento transitorio de nitritos y la tasa de crecimiento, respectivamente.

VI.2.1.2. Representación gráfica de los resultados obtenidos

a) Resultados de los controles negativos

En las Figuras 46 a X se muestran los resultados obtenidos con los frascos de medio base sin inocular y sin fuente de carbono empleados en cada tanda de ensayos.

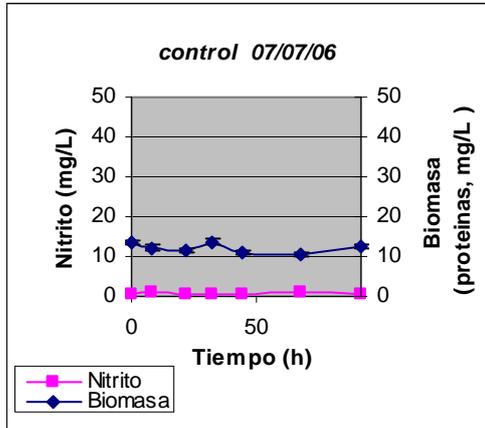


Figura 46a. Resultados del control negativo del ensayo iniciado el 7 de Julio de 2006.

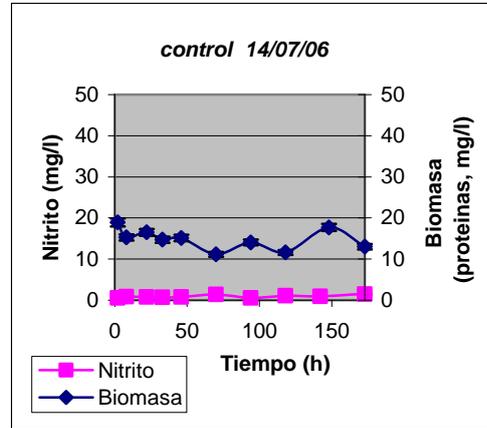


Figura 46b. Resultados del control negativo del ensayo iniciado el 14 de Julio de 2006.

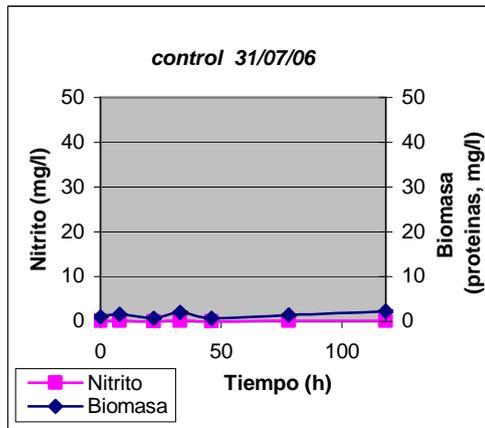


Figura 46c. Resultados del control negativo del ensayo iniciado el 31 de Julio de 2006.

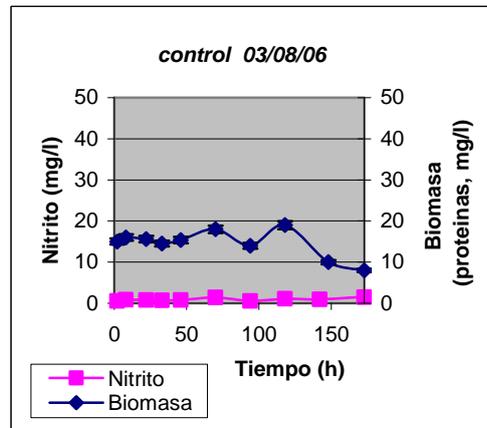


Figura 46d. Resultados del control negativo del ensayo iniciado el 3 de Agosto de 2006.

b) Resultados de *H. alimentaria*

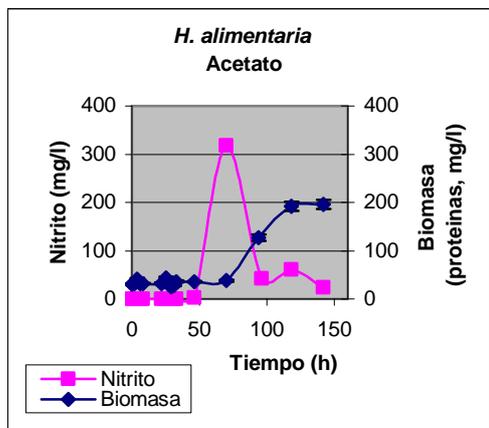


Figura 47a. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de acetato.

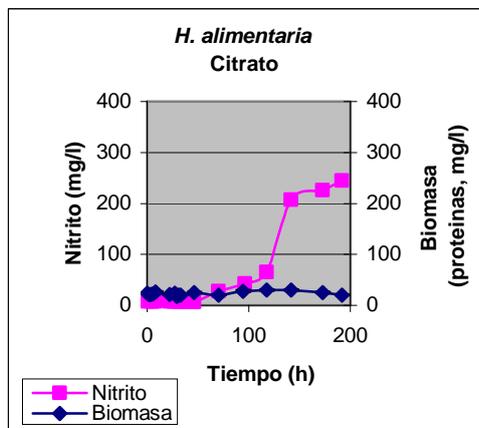


Figura 47b. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de citrato.

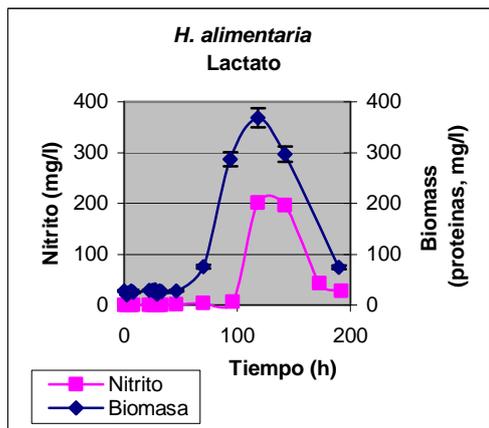


Figura 47c. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de lactato.

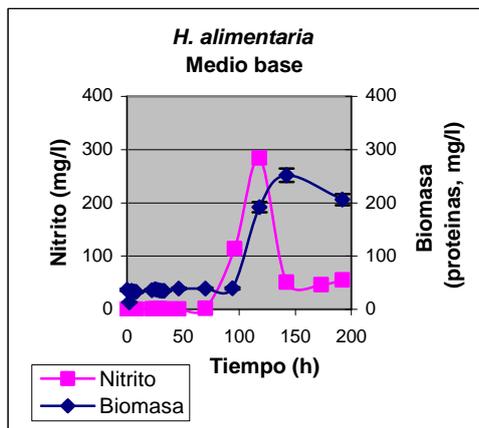


Figura 47d. Resultados en el medio medio base.

c) Resultados de *H. campisalis*

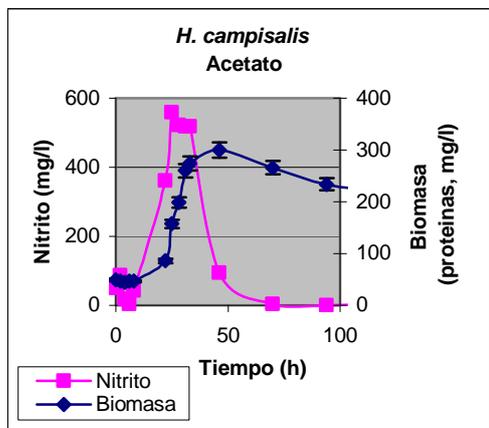


Figura 48a. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de acetato.

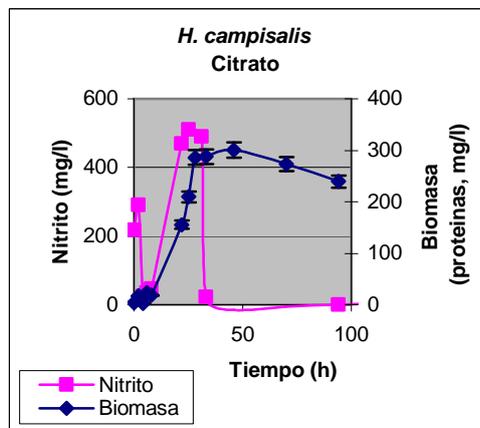


Figura 48b. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de citrato.

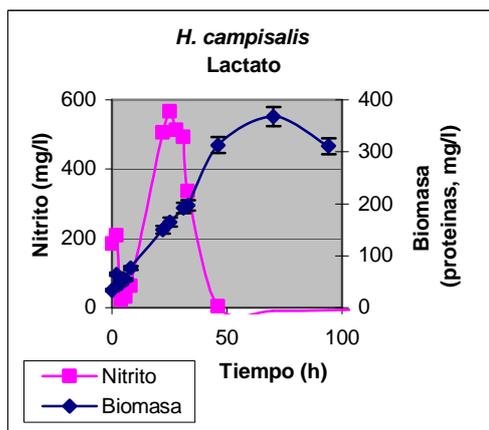


Figura 48c. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de lactato.

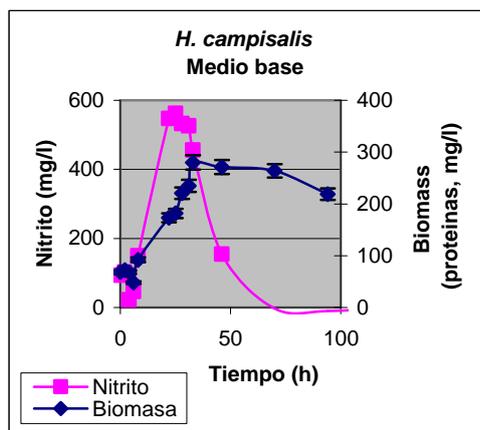


Figura 48d. Resultados en el medio base.

d) Resultados de *H. desiderata*

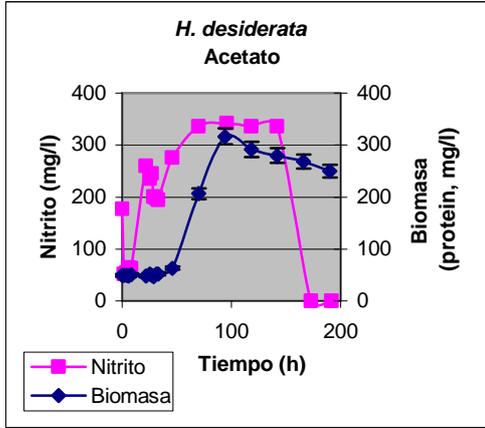


Figura 49a. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de acetato.

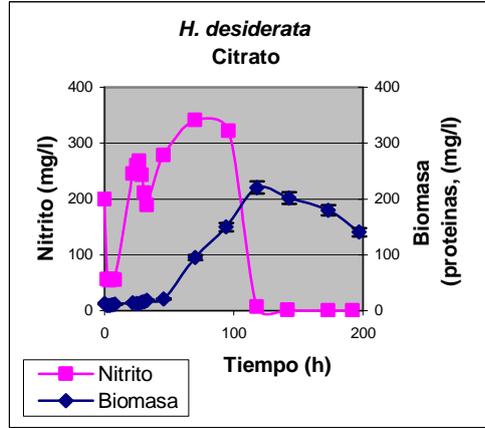


Figura 49b. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de citrato.

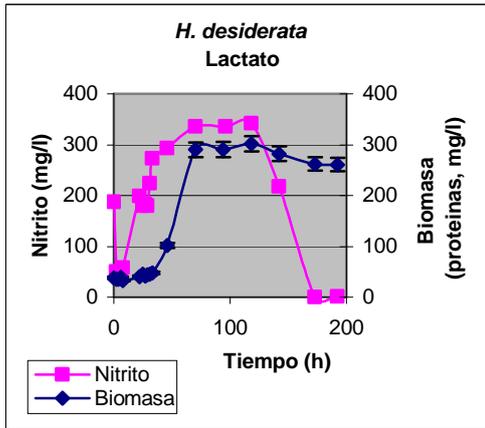


Figura 49c. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de lactato.

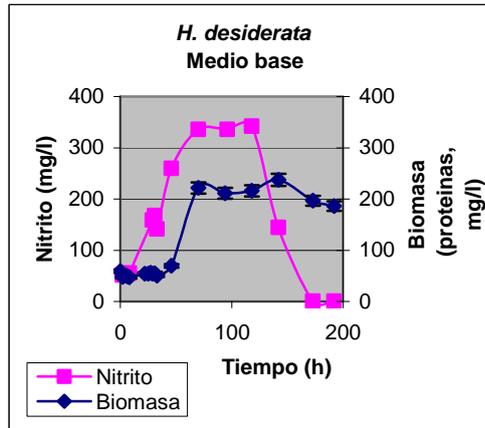


Figura 49d. Resultados en el medio base.

e) Resultados de *H. halodenitrificans*

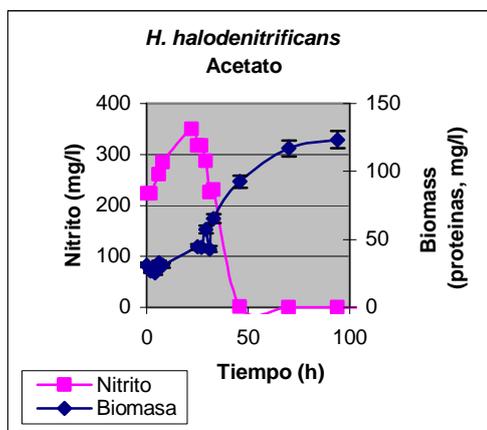


Figura 50a. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de acetato.

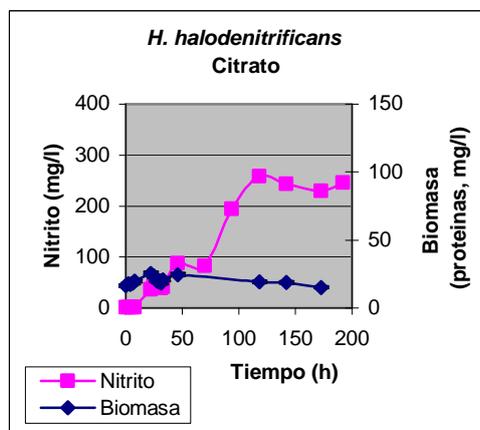


Figura 50b. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de citrato.

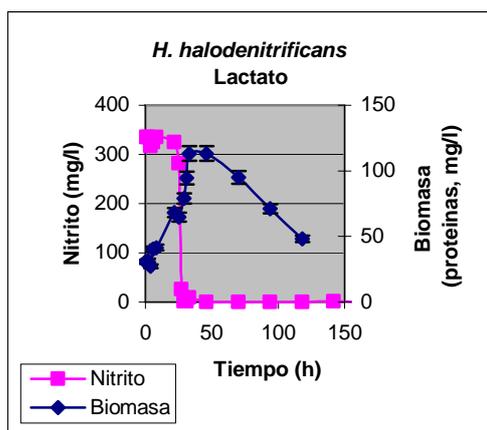


Figura 50c. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de lactato.

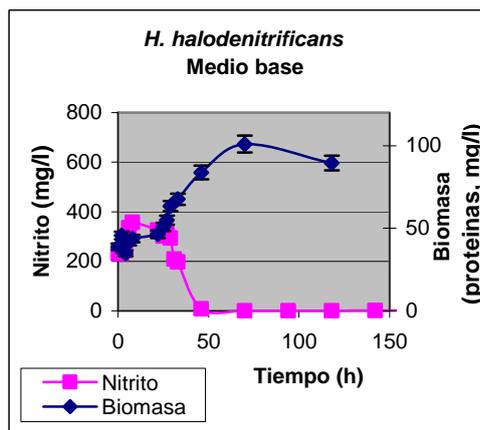


Figura 50d. Resultados en el medio base.

f) Resultados de *H. ventosae*

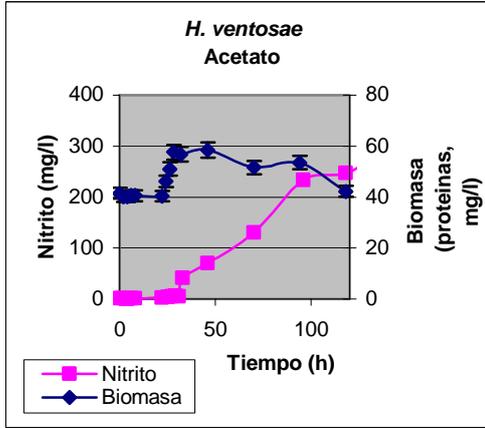


Figura 51a. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de acetato.

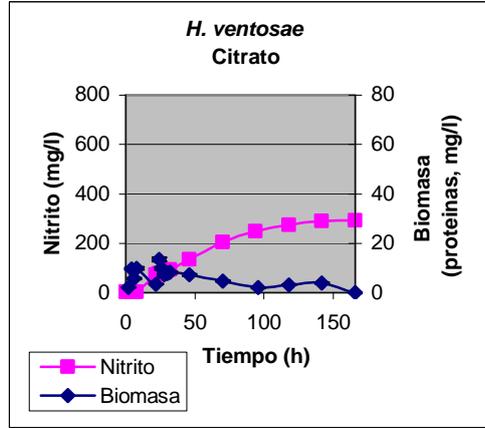


Figura 51b. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de citrato.

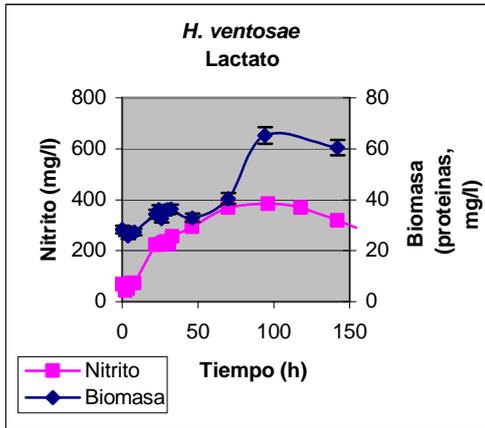


Figura 51c. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de lactato.

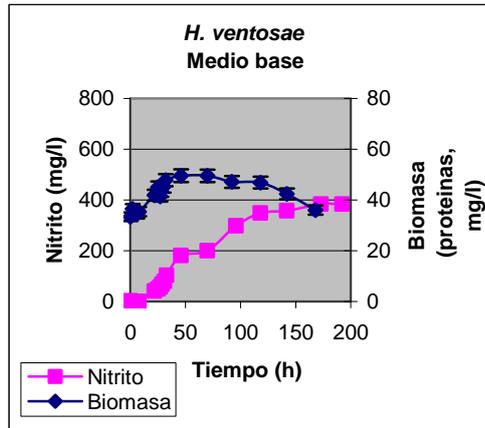


Figura 51d. Resultados en el medio base.

g) Resultados de 11S (representante del fenón 1)

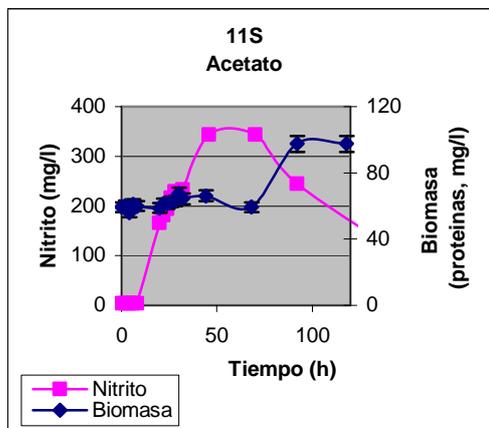


Figura 52a. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de acetato.

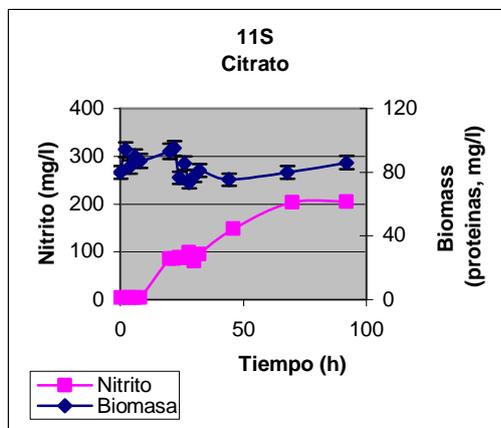


Figura 52b. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de citrato.

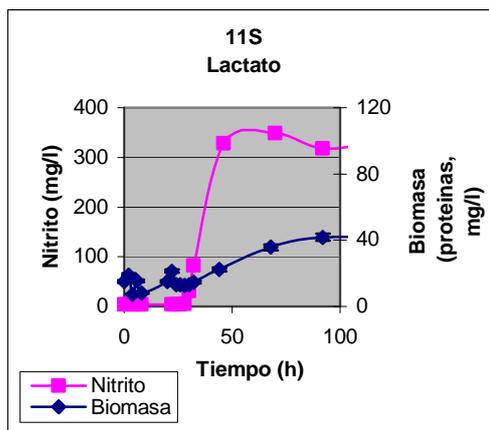


Figura 52c. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de lactato.

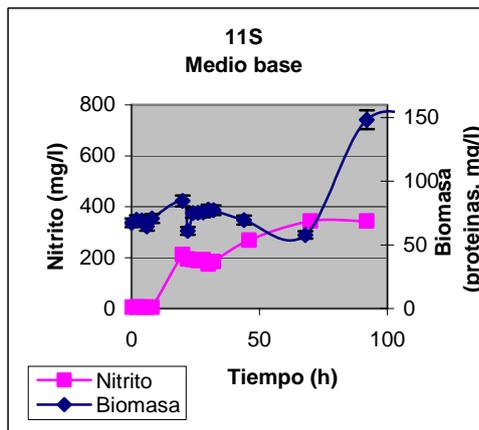


Figura 52d. Resultados en el medio base.

h) Resultados de 5CR

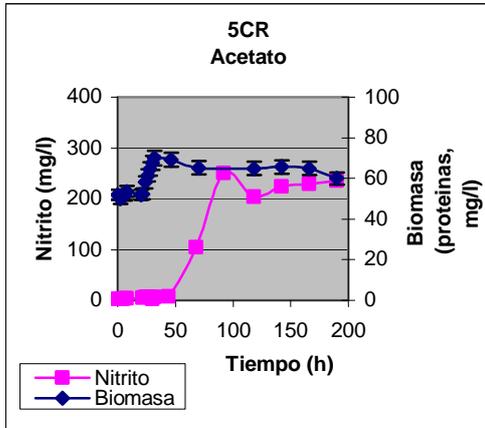


Figura 53a. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de acetato.

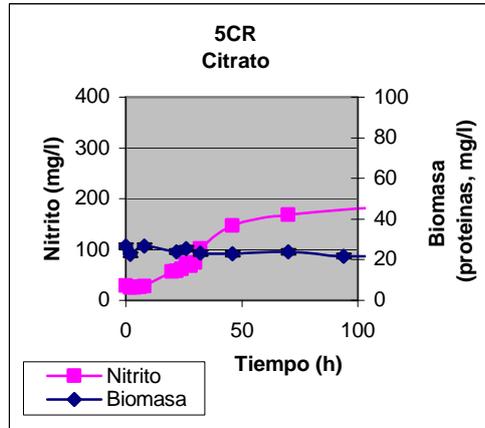


Figura 53b. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de citrato.

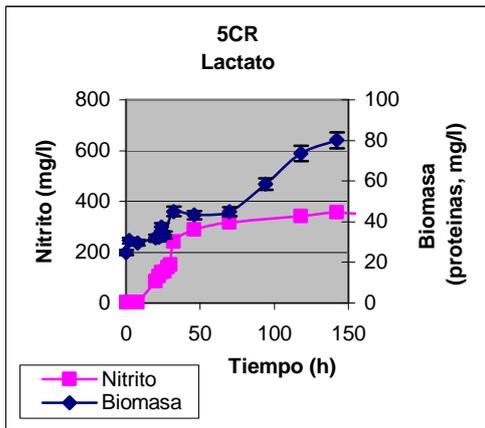


Figura 53c. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de lactato.

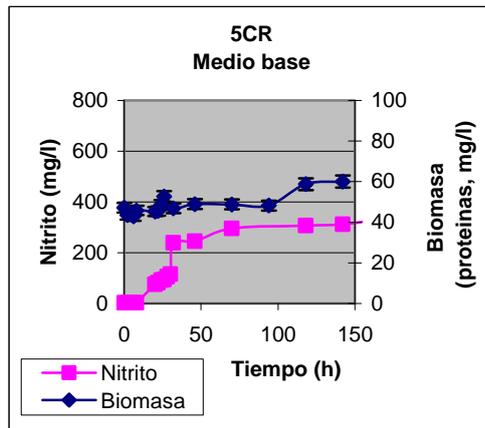


Figura 53d. Resultados en el medio base.

i) Resultados de A13

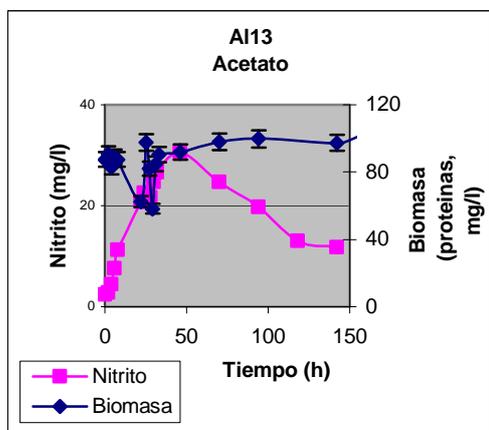


Figura 54a. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de acetato.

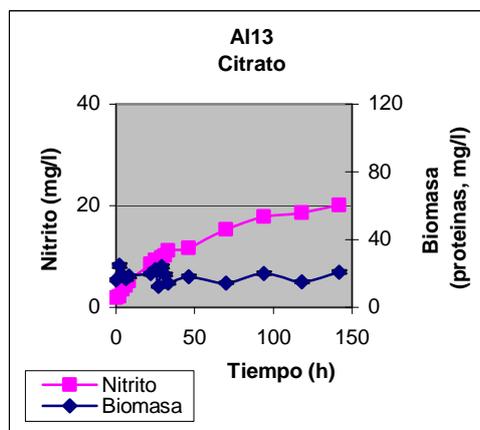


Figura 54b. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de citrato.

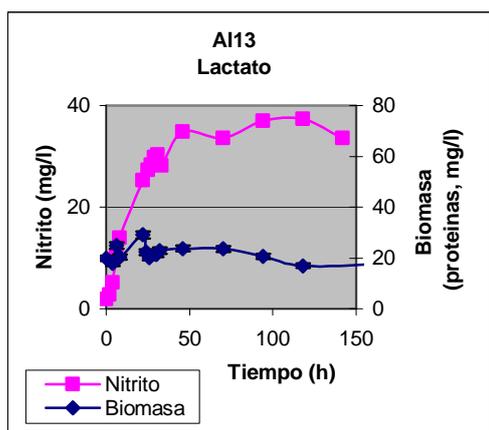


Figura 54c. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de lactato.

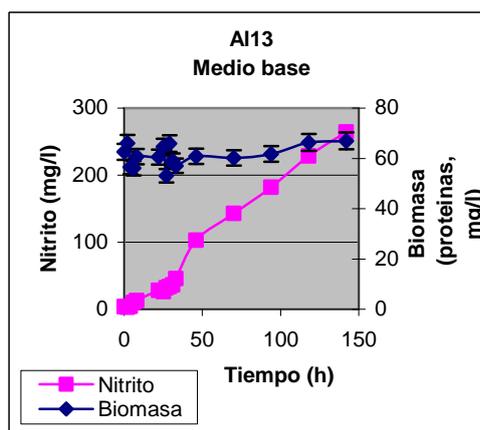


Figura 54d. Resultados en el medio base.

j) Resultados de N64 (representante del fenón 2)

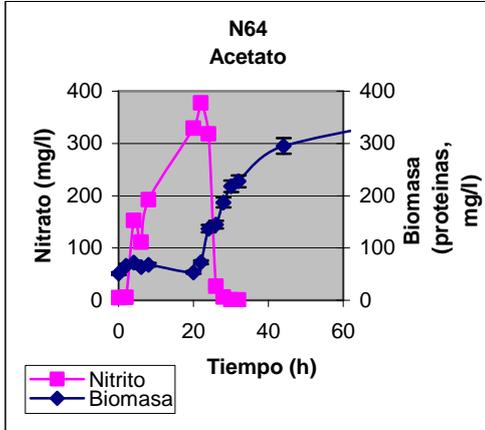


Figura 55a. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de acetato.

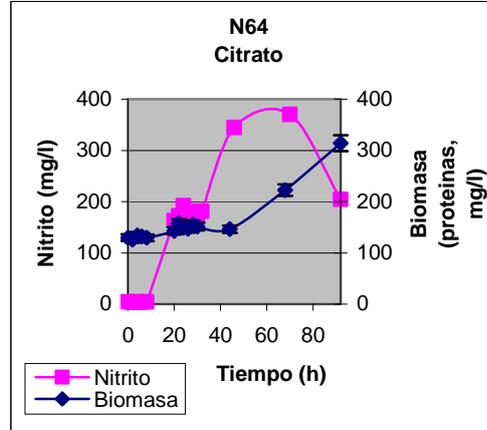


Figura 55b. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de citrato.

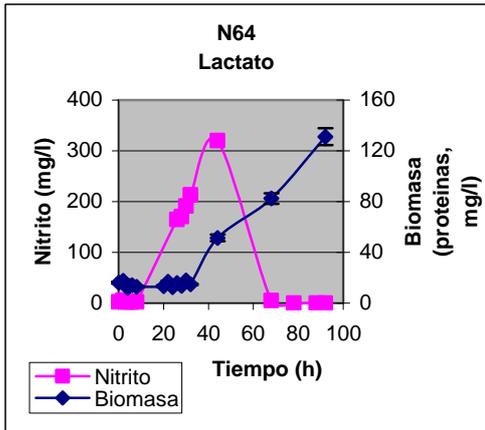


Figura 55c. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de lactato.

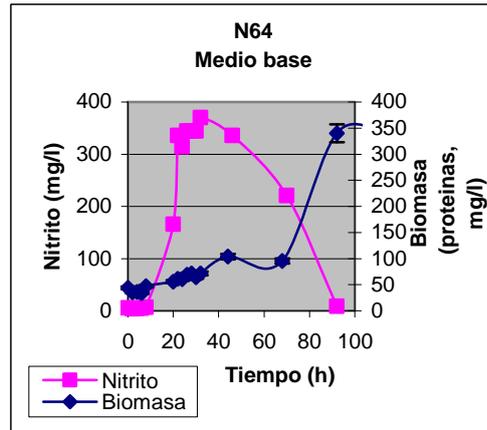


Figura 55d. Resultados en el medio base.

k) Resultados de HGDK1

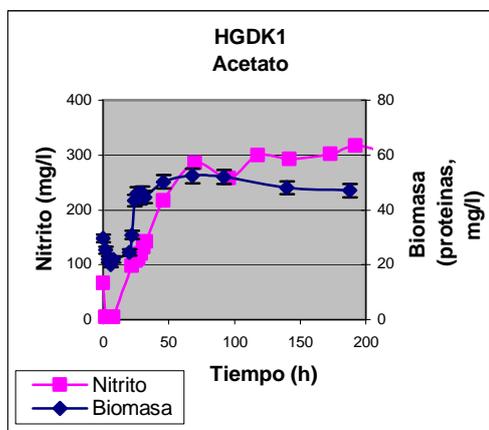


Figura 56a. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de acetato.

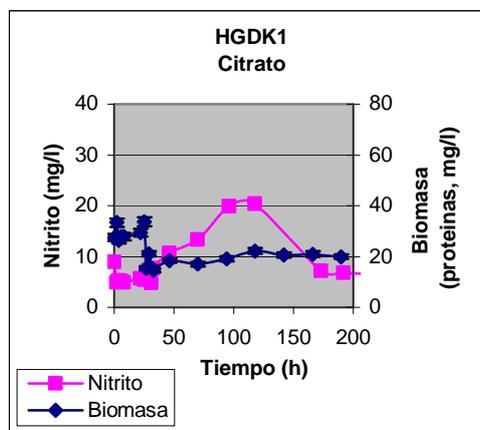


Figura 56b. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de citrato.

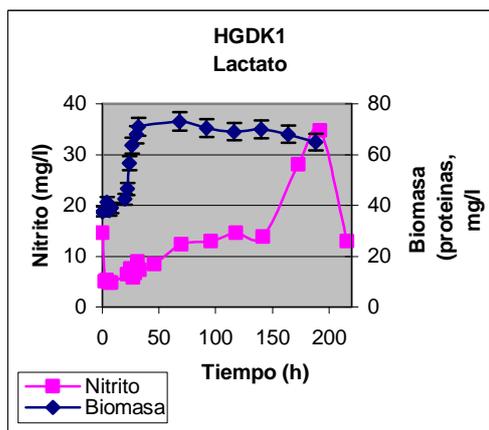


Figura 56c. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de lactato.

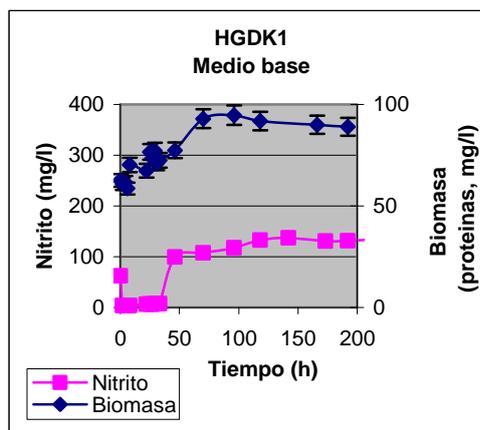


Figura 56d. Resultados en el medio base.

1) Resultados de SP4 (representante del fenón 4)

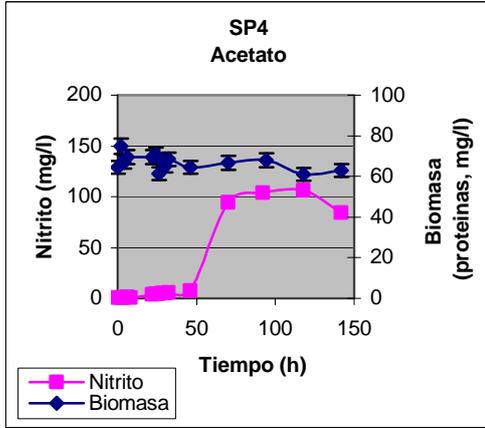


Figura 57a. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de acetato.

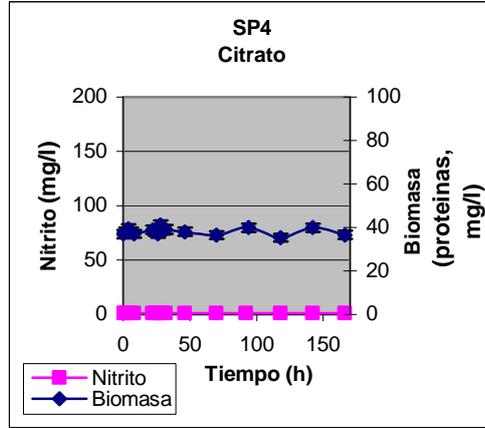


Figura 57b. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de citrato.

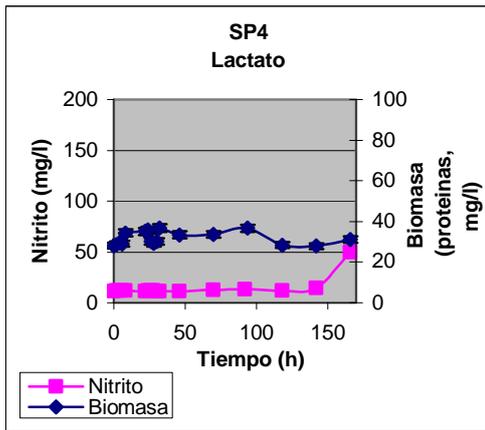


Figura 57c. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de lactato.

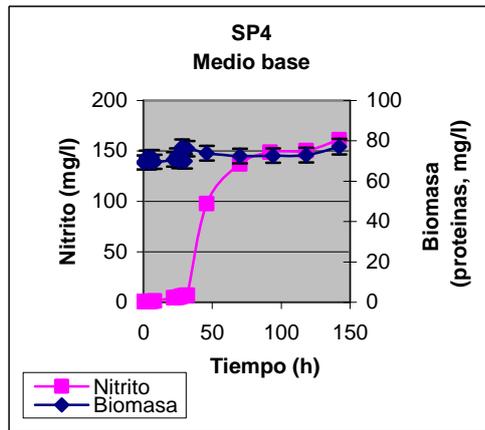


Figura 57d. Resultados en el medio base.

m) Resultados de F5 (representante del fenón 3)

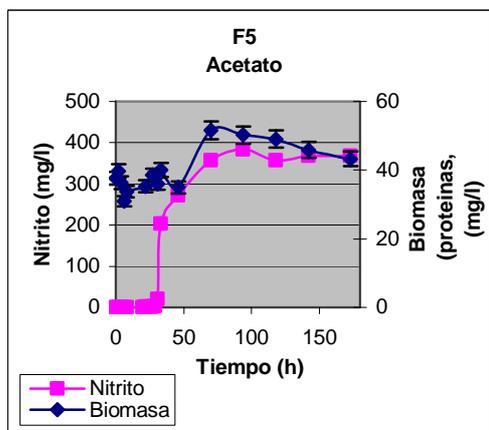


Figura 58a. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de acetato.

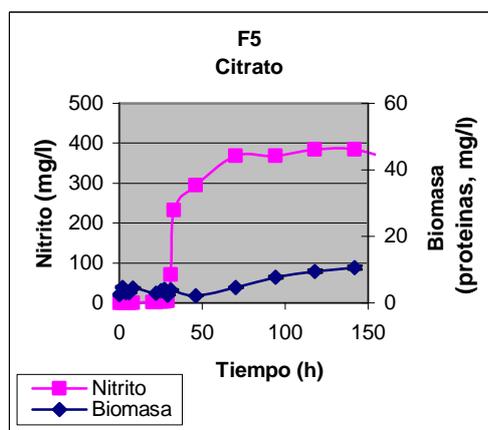


Figura 58b. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de citrato.

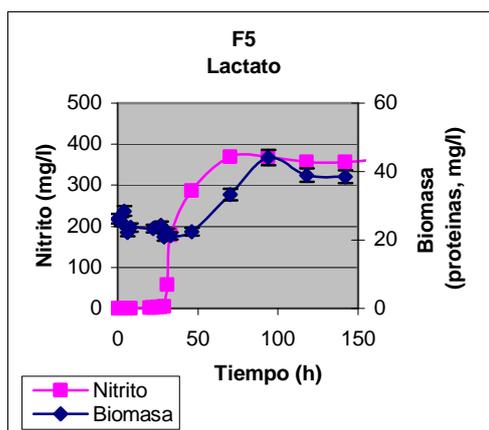


Figura 58c. Resultados en el medio suplementado con un 1% (p/v) de lactato.

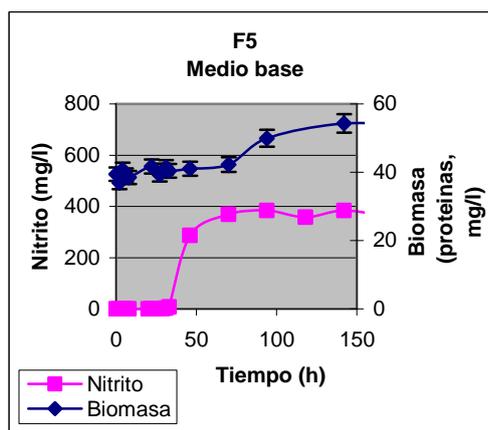


Figura 58d. Resultados en el medio base.

VI.2.2. CUANTIFICACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS MEDIANTE TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA

En el siguiente esquema se pueden observar los resultados obtenidos en esta prueba.

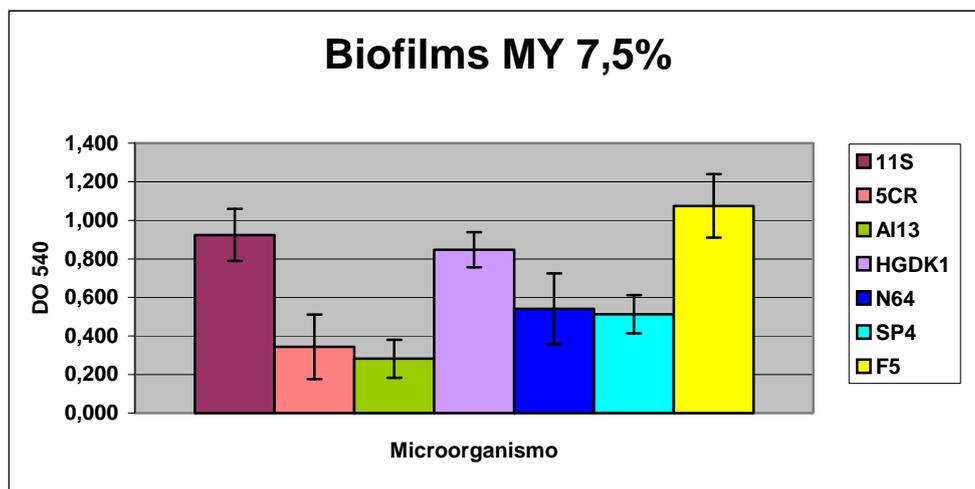


Figura 59. Representación gráfica de la producción de biofilms por los microorganismos en estudio

VI.3. DISCUSIÓN

La capacidad de respirar sobre nitratos o realizar una desnitrificación completa de los microorganismos seleccionados al comienzo de este trabajo, quedó confirmada no sólo fenotípicamente (apartado III.2.2), sino también desde el punto de vista molecular, con la secuenciación de algunos de los genes clave que participan en esas reacciones (apartado V.2). Tras estos estudios, se planteó el análisis del proceso, cuantificando la tasa de crecimiento en anaerobiosis, con nitrato como aceptor terminal de electrones, y con suplementos de diferentes fuentes de carbono. Asimismo, también se analizó la variación de la concentración de nitrito en el tiempo, resultado de la respiración sobre nitrato y sobre el mismo nitrito formado a partir de éste. Estos estudios, complementados con la capacidad de formación de biopelículas, suministran información interesante para una potencial aplicación práctica de los microorganismos objeto de estudio en la eliminación de nitratos y nitritos de aguas o suelos con alto contenido salino. Como se describió en la Introducción, estos aniones son de los más frecuentes contaminantes hídricos y la causa primaria de metahemoglobinemia e indirecta de diversos tipos de cáncer. Esto ha motivado la limitación de su consumo en las aguas de bebida y el desarrollo de diversas metodologías para su eficiente eliminación.

Si bien los análisis planteados en este capítulo se realizaron con todas las cepas, únicamente se han recogido en la memoria los resultados de las cepas representativas de cada fenómeno y de aquellas que no se agrupaban en ninguno de los fenómenos, aparte de las especies desnitrificantes del género *Halomonas* que se han venido usando como referencia.

Con objeto de facilitar la interpretación de los resultados, la discusión se ha estructurado en varios apartados.

VI.3.1. CAPACIDAD PARA RESPIRAR SOBRE NITRATOS Y NITRITOS

Los ensayos fueron realizados en anaerobiosis, generando una atmósfera exenta de oxígeno mediante vacío e intercambio del espacio interior del frasco con Argón. Este proceso se

repitió tres veces, con agitación de los frascos precediendo cada ciclo. Con esta forma de proceder y por la baja solubilidad del oxígeno en medio líquido, podíamos estar seguros de las condiciones anaerobias. Aunque se ha mencionado en la Introducción que existen microorganismos desnitrificantes aerobios o que llevan a cabo el proceso con bajas tensiones de oxígeno, en el Capítulo I se comprueba la capacidad desnitrificante de nuestros microorganismos en anaerobiosis, sin que esta evidencia suponga que no puedan hacerlo también en microaerobiosis o aerobiosis. Al generar una atmósfera libre de oxígeno eliminamos una variable, si bien sabemos, y más por los resultados obtenidos, que no es el único factor cuya interacción hay que considerar.

Por otra parte, en cada ensayo se usó un control sin inocular del mismo medio pero al que se suprimió el suplemento al 1% (p/v) de fuente de carbono. En ellos se observa que tanto la producción de biomasa como de nitrito son nulas (Figuras 46a,b,c y d).

Tenemos dos formas de valorar la tasa de respiración sobre nitrato en las condiciones experimentales usadas: Siguiendo el curso de la desaparición de nitrato en el tiempo o a través de la producción de nitrito, teniendo en cuenta que éste exclusivamente procede del nitrato original. Si observamos la Figura 3 de la Introducción, vemos que el nitrito se puede formar en varios procesos. En este ensayo, se descarta la producción a partir de cualquier otra fuente distinta al nitrato, pues es el único aporte externo de nitrógeno.

Los experimentos llevados a cabo por Peyton y col. (2001) demostraron que la concentración de nitrito en el tiempo es también una función de la concentración de nitrato. En nuestros ensayos los problemas surgidos para la determinación de nitrato nos impiden disponer de una curva de respiración sobre este anión y, por consiguiente, de una ecuación mediante la cual predecir el comportamiento desnitrificante en el tiempo partiendo de una concentración determinada de nitrato y con diversas fuentes de carbono. Como intento de aproximación a estos modelos y con fines exclusivamente comparativos, hemos calculado la producción máxima de nitrito en el tiempo y su relación con la biomasa. Ambos cálculos son parámetros cinéticos absolutos mediante los cuales establecer qué microorganismo y en qué fuente de carbono presenta en estos ensayos la máxima tasa de respiración sobre nitrato (concentración de nitrito máxima en relación al tiempo en que se alcanza), con la menor producción de biomasa (miligramos por litro

de nitrito en función de los miligramos de proteínas medidas), que serían las características deseadas en cualquier tratamiento biológico de eliminación de nitrato (Peyton y col., 2001; Zhang, 2004). La cuantificación de la biomasa a través de medidas indirectas de proteínas es un método de sensibilidad y fidelidad constatada, a veces mayores que las de otras técnicas (Nittayajarn y Baker, 2005). Además los valores de proteínas medidos no se ven afectados por el pH ligeramente alcalino, como es el empleado en este ensayo (Smith y col., 1985).

Los microorganismos que alcanzan la mayor concentración de nitrito en el menor intervalo de tiempo son *H. campisalis*, *H. halodenitrificans* y la cepa N64, con 22,63; 15,88; y 17,15 mg/l de nitrito por hora, respectivamente (véase Tabla 44). Teniendo en cuenta, como se ha comentado anteriormente, que el nitrito sólo puede proceder del nitrato inicial, éstos serían los microorganismos que eliminan con mayor rapidez la máxima cantidad de nitrato. Mediante este cálculo solventamos el no disponer de los valores reales de nitrato, pero hay que considerar que es una medida sólo comparativa; no obstante, estos parámetros son más útiles que la producción máxima de nitrito (Tabla 43), pues con vistas a una posible aplicación práctica, interesa no sólo la cantidad de nitrato que son capaces de reducir sino también el tiempo que invierten en ello. Con excepción de las cepas A113, HGDK1 y SP4, que en la mayoría de las condiciones prácticamente no manifiestan actividad nitrato reductasa, en general el resto de microorganismos elimina una cantidad considerable del nitrato inicial (véase Tabla 44).

En relación con la producción de biomasa, se observa que los valores más altos de nitrito no coinciden en todos los microorganismos con la misma fase de crecimiento, e incluso en una bacteria concreta puede variar dependiendo de la fuente de carbono, como ocurre en *H. alimentaria* (VI.2.1.2.b), *H. campisalis* (VI.2.1.2.c) o *H. ventosae* (VI.2.1.2.f). Estos resultados sugieren dos explicaciones: (i) La actividad nitrato reductasa es capaz de sostener por sí misma el crecimiento de algunos microorganismos, mientras que en otros las demás reacciones son fundamentales para alcanzar la mayor tasa de crecimiento; (ii) La influencia del sustrato carbonado, que se describirá más detenidamente en el apartado siguiente.

Con respecto a los valores de respiración y biomasa, los mejores índices los presentan *H. halodenitrificans* y las cepas F5 y 11S, con 10,48; 34,90 y 8,35 mg/l de nitrito por mg de proteínas

determinadas, respectivamente (Tabla 44). Con relación a posibles aplicaciones en biorreactores, la cepa F5, si bien presenta un gran potencial para eliminar nitratos reduciéndolos a nitritos con una baja producción de sedimentos, hay que considerar su incapacidad para realizar una desnitrificación completa (apartado III.2.2), lo cual implica que el nitrito se acumule en grandes cantidades en el dispositivo sin posibilidad de proseguir hasta dinitrógeno, que es lo buscado, requiriendo, por tanto, su asociación con otro microorganismo capaz de completar el proceso.

Finalmente, concluyendo este apartado comentaremos la gráfica de concentración de nitrito en el tiempo. Cuando se emplea un medio mínimo y concentraciones salinas moderadamente altas, condiciones ambas utilizadas aquí, el proceso de desnitrificación a partir de nitrato se considera claramente dividido en dos etapas: Reducción de nitrato a nitrito y de éste a óxido nitroso o dinitrógeno, siendo esta última fase la limitante del proceso (Blaszczyk, 1993; Yoshie y col., 2002, 2006a; Marazioti y col., 2003). Los resultados obtenidos sugieren que la amplitud de la gráfica de formación de nitrito responde a una inducción de la NIR retrasada en el tiempo con respecto a la actividad de la nitrato reductasa (Betlach y Tiedje, 1981; Blaszczyk, 1993; Peyton y col., 2001). El intervalo de demora, que provoca que el nitrito se acumule (véanse las Figuras Xa y Xb como ejemplos) va a depender del microorganismo, de la concentración de nitrato inicial y de la fuente de carbono (Betlach y Tiedje, 1981; Blaszczyk, 1993).

Así, con respecto a las especies de referencia, *H. halodenitrificans* presenta una inducción muy rápida y prácticamente simultánea de las nitrato y nitrito reductasas, excepto en el medio suplementado con citrato, donde el nitrito se acumula por inactividad de la NIR, al menos en el

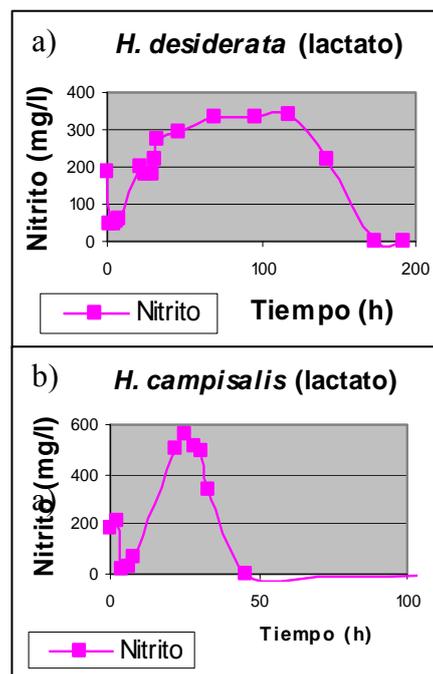


Figura 60. a) Inducción lenta de la nitrito reductasa con respecto a la nitrato reductasa. El nitrito se acumula durante más tiempo. b) La inducción es muy rápida y no hay prácticamente acumulación.

tiempo de duración del ensayo; en el medio con citrato ocurre también igual con *H. alimentaria*, si bien ésta en el resto de fuentes de carbono se comporta de forma semejante a *H. campisalis*, mostrando picos estrechos de concentración de nitrito. *H. desiderata* presenta una inducción más lenta de su actividad NIR, el nitrito se acumula y esto se ve reflejado en la gráfica por una meseta. Por su parte, *H. ventosae* manifiesta esta misma situación en el medio con lactato, pero con las restantes fuentes de carbono y en el medio sin ellas, la actividad NIR no llega a inducirse durante el transcurso del experimento.

De otro lado, los microorganismos seleccionados en esta tesis doctoral muestran comportamientos muy dispares: La cepa N64 presenta actividades nitrato y nitrito reductasas en todas las condiciones ensayadas, con unas tasas de respiración similares a las de las especies de referencia (Tabla X) y con períodos de inducción cortos para la nitrito reductasa. Una demora más prolongada presenta la cepa 11S en el medio con acetato, mientras que en las restantes condiciones la actividad nitrito reductasa no llega a inducirse. Tampoco lo hace en ninguna de las condiciones ensayadas la NIR de la cepa 5CR, mientras que la de la cepa HGDK1 se activa en los medios con lactato y citrato. En el caso de las cepas A113 y SP4, que no crecen en ninguna de las circunstancias experimentales, sí muestran en algunas de ellas actividad nitrato reductasa, lo cual podría explicarse por la síntesis constitutiva de esta enzima a pequeños niveles, como ocurre en *Escherichia coli* gracias al operón *narZWYV* (Bachmann, B.J. 1990; González y col., 2006). En las cepas A113 y HGDK1 y en el medio con acetato y citrato respectivamente, también podríamos hablar de una pequeña actividad nitrito reductasa basal, descrita en algunas cepas de *Pseudomonas* (Ka y col., 1997). Por último, la acumulación de nitrito observada en la cepa F5 parece totalmente lógica teniendo en cuenta que en los estudios fenotípicos y moleculares previos no se ha detectado actividad desnitrificante, sino solamente nitrato reductasa.

VI.3.2. INFLUENCIA DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA CAPACIDAD PARA RESPIRAR SOBRE NITRATOS Y NITRITOS

La importancia que la fuente de carbono tiene en los microorganismos desnitrificantes heterótrofos ya ha sido comentada en la Introducción. Existen multitud de estudios en los que se ha comprobado el efecto de distintos sustratos carbonados en el proceso de desnitrificación, y su

influencia es tal que la mayoría de los modelos cinéticos propuestos la consideran como un parámetro más (Knowles y col., 1982; Blaszczyk, 1993; Peyton y col., 2001; Ellington y col., 2002 y 2003; Marazioti y col., 2003; Kim y col., 2005).

Para realizar los ensayos de este análisis fisiológico, la bibliografía consultada recomendaba emplear la fuente de carbono en exceso, de manera que su concentración no fuera un factor limitante en el proceso (Peyton y col., 2001; Kim y col., 2005). En nuestro caso la relación C/N era de 14,5 (10g de fuente de carbono y 0,69 g de nitrato por litro). No obstante, en aplicaciones prácticas se recomienda que el sustrato carbonado se añada estequiométricamente al nitrato para evitar dejar concentraciones residuales de carbono.

La elección de las diferentes fuentes de carbono se hizo basándonos en diversas razones: El acetato y lactato se seleccionaron por ser compuestos producidos en la fermentación del glicerol (Oren y Gurevich, 1994), el cual es de gran importancia ecológica en los ambientes donde se encuentran los organismos halófilos (Oren, 1995). Por otro lado, en los últimos años se ha impuesto en los sistemas biológicos de descontaminación el uso de sustratos carbonados compatibles con los estándares de las aguas de bebida. Como consecuencia, se ha generalizado el empleo del acetato y citrato (Blaszczyk, 1983), de ahí la importancia de estudiar con ellos la capacidad desnitrificante de nuestros microorganismos con vistas a una posible aplicación práctica.

El acetato, citrato y lactato los utilizan la mayoría de las cepas del estudio, de acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos nutricionales (apartado IV.2.A.1.d). Teniendo como base estos resultados, sabemos que la cepa A113 no usa el citrato ni el lactato como única fuente de carbono y energía; el acetato por su parte no es empleado por la cepa 5CR ni el lactato por la cepa SP4. *H. desiderata* no emplea el citrato (Mata y col., 2002). Sin embargo, Peyton y col. (2001) ponen de manifiesto con etanol en *H. campisalis* que el hecho de que un compuesto sea utilizado en condiciones aerobias no implica que lo sea también bajo condiciones desnitrificantes.

Cuando se analizan las gráficas de formación de biomasa en el tiempo con las diferentes fuentes de carbono, se observa que el citrato es el compuesto en el que crecen menor número de

microorganismos y entre aquéllos que lo hacen se dan varias posibilidades: *H. desiderata* presenta su tasa más baja de crecimiento, mientras que otros, como la cepa N64 o *H. campisalis*, muestran valores altos o similares a los del resto de condiciones. Por su parte, el lactato es, aunque no de forma general pero sí mayoritaria, el sustrato en el cual se da la mayor producción de proteínas, lo cual indirectamente se traduce en formación de biomasa; así, *H. alimentaria*, *H. campisalis*, *H. ventosae* y la cepa 5CR muestran sus valores más altos de crecimiento en el medio suplementado con lactato.

Con respecto a la capacidad desnitrificante en los distintos sustratos, se puede comprobar que si el microorganismo crece, la producción de nitrito a partir de nitrato es equiparable en todos ellos, no existiendo un patrón de comportamiento en función del compuesto. Quizás lo llamativo sean las condiciones en las que no existe crecimiento y, sin embargo, sí que se observa actividad nitrato reductasa e, incluso en algunos microorganismos, inducción de la nitrito reductasa (cepas A113 y HGDK1). Estos casos ya han sido discutidos anteriormente.

La influencia en la actividad desnitrificante de una fuente de carbono se ha relacionado con su estado de oxidación y con su capacidad bioenergética (Blaszczyk, 1983; Ellington y col., 2002). Esta relación no siempre es directa, es decir, no siempre cuanto más alto es el poder reductor de un compuesto, más capacidad desnitrificante y mayor crecimiento presenta un microorganismo crecido con él, pues como ya se mencionó en la Introducción, un alto poder reductor puede generar también una situación de estrés en la célula si ésta no puede disipar el exceso por otros mecanismos no acoplados a la síntesis de ATP (Ellington y col., 2002).

Considerando que los tres compuestos van a ser finalmente metabolizados en el ciclo de Krebs, dependiendo de la etapa en la que lo hagan generarán más o menos energía (Madigan y col., 2004). El lactato presentaría el mayor potencial bioenergético, pues requiere de una transformación previa en piruvato, generándose dos moléculas de NADH más que en el caso del acetato, que se introduce rápidamente en el ciclo tras reaccionar con el coenzima-A. Por el contrario, el citrato presentaría el menor poder reductor, al ser incorporado directamente al ciclo (véase la Figura X). Así, el limitado crecimiento de estos microorganismos en el medio suplementado con citrato se puede justificar por el escaso poder reductor de este compuesto, lo que

hace que energéticamente sólo sea rentable su utilización en aerobiosis, pero no cuando se está desnitrificando. Esta hipótesis, sin embargo, es contradicha por la tasa de crecimiento más que notable en el medio no suplementado con otra fuente de carbono, lo cual nos induce a pensar más en un efecto inhibitorio del citrato, quizás por retroalimentación negativa sobre la citrato sintasa, que interviene en la primera etapa propiamente dicha del ciclo de Krebs. La inhibición por altas concentraciones de citrato ya ha sido descrita en bacterias como *Acetobacter xylinum* (Swissa y Benziman, 1976).

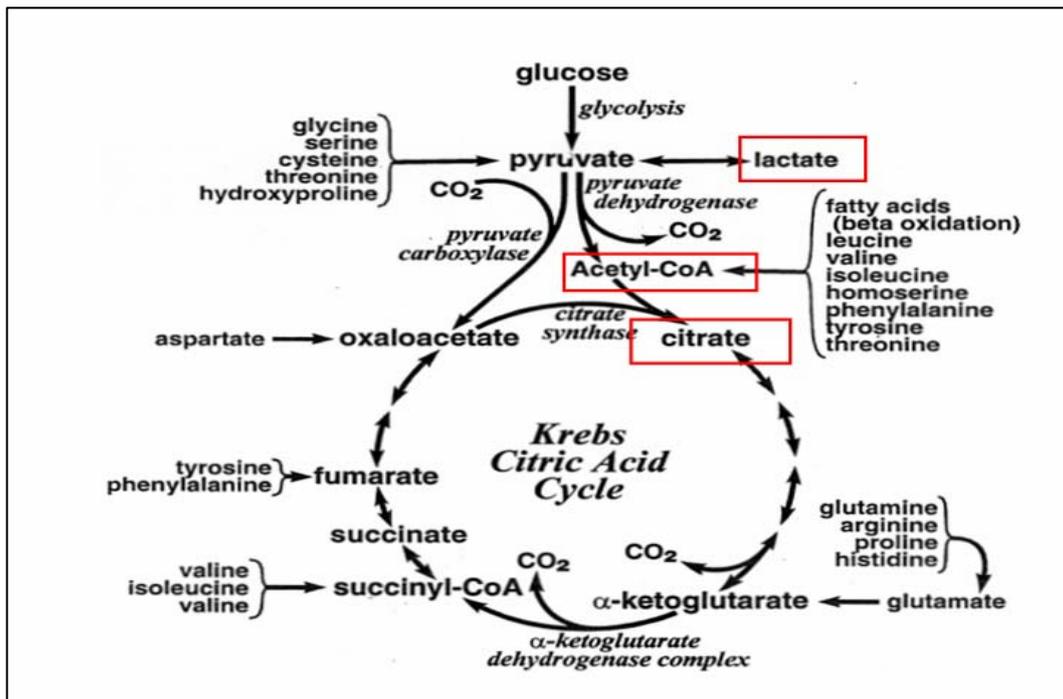


Figura 61. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Ciclo de Krebs). Enmarcados en rojo los compuestos a partir de los cuales se incorporarían al ciclo el acetato, citrato y lactato.

VI.3.3. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE SAL EN EL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATO

La cinética de desaparición de nitrato no se ha incluido en esta memoria pues resultó incoherente con los datos de nitrito obtenidos. La alta composición en sal del medio podría haber impedido una reducción completa del nitrato a nitrito y la no correspondencia de los valores medidos con los reales. Tanto con hidracina como con la mezcla reductora de Zinc del kit “Nitrate/Nitrite Assay kit” (Amresco®) los valores de nitrato que se obtenían al comienzo del ensayo eran menores o similares a los de nitritos y su evolución en el tiempo carecía de relación con la tasa de respiración sobre nitritos.

La influencia de la salinidad en la reducción de nitrato se confirmó realizando varios patrones, cuya cantidad de nitrato era exacta y conocida. Estos estándares abarcaban el rango de concentraciones de 0 mM a 50 mM, dentro de las cuales se encontraría la concentración de nitrato del medio (0,69g/l). Si estos patrones se preparaban con agua, los valores de nitrato obtenidos correspondían con bastante aproximación a la cantidad añadida de este compuesto. Por el contrario, cuando el patrón de nitrato se preparaba en el mismo medio empleado para el ensayo, la cantidad de nitrato medida era muy inferior.

Se proponen para estudios similares en el futuro dos métodos analíticos alternativos que solventen el problema de la alta salinidad requerida para un crecimiento óptimo de los microorganismos. Se trata de medidas directas de nitratos lo que evita tener que reducirlos previamente a nitritos:

-Determinación mediante cromatografía líquida de alta resolución (sistema Dionex anion-exchange HPLC, con un detector Ultravioleta), empleada con éxito en medios de alto contenido salino (Tsuneda y col., 2005).

-Detección colorimétrica por medio del reactivo químico Szechrome NAS (Polysciences®), que no presenta interferencias por la presencia de altas cantidades de cloruro sódico (referencia técnica del producto: http://www.polysciences.com/shop/product.asp?dept_id=82&pf_id=08764).

VI.3.4. CAPACIDAD PARA FORMAR BIOPELÍCULAS

En los últimos años se ha desarrollado un gran interés por la eliminación de nitrato en los sistemas de tratamiento de aguas con el propósito de reducir la contaminación y eutrofización de las mismas. En el ámbito industrial, las técnicas se dirigen hacia diversos métodos, en los cuales se utilizan cultivos suspendidos o bien fijos a alguna superficie, formando biofilms. Esta última técnica parece ser más apropiada cuando el volumen de influente no es muy alto (Knowles, 1982).

El análisis fisiológico de los microorganismos se completó con el estudio de su capacidad para formar biofilms sobre una superficie de cloruro de polivinilo (PVC), tras haber sido crecidos en medio MY al 7,5%. Los resultados obtenidos muestran que la cepa 11S es la que más cantidad de biofilms forma entre las cepas desnitrificantes excluyendo, por tanto, a la cepa F5, que únicamente respira sobre nitratos. La cepa 11S, además, muestra un buen índice de producción de nitrito en relación a la biomasa, si bien en las condiciones de los ensayos sólo se induce su actividad nitrito reductasa en el medio suplementado con acetato. Por su parte, la cepa N64, que presenta unas tasas de respiración similares a las de las especies de referencia en todas las condiciones ensayadas, no destaca por su capacidad para formar biopelículas, exhibiendo unos valores intermedios. Finalmente, podemos decir que la cepa A113 fue la que menor capacidad de formación de biopelículas presenta.

Con vistas a la aplicación práctica de la capacidad desnitrificante de nuestros microorganismos en biorreactores, sería interesante realizar los ensayos tanto de formación de biofilms como de tasa de desnitrificación en las mismas condiciones para poder llevar a cabo un estudio comparativo. Hay que tener en cuenta que no siempre existe concordancia entre la actividad en fase planctónica y en biofilms (Teixeira y Oliveira, 2002) y que en una biopelícula puede cambiar el patrón de expresión de ciertos genes o activarse algunos que no lo hacen en la otra fase (Marshall y Goodman, 1994). No obstante, existen trabajos en los que se ha comprobado que la actividad metabólica es más alta cuando los microorganismos se asocian a una superficie sólida (Paerl y Merkel, 1982; McFeters y col., 1990); en concreto, Yoshie y col. (2004) observaron que en biopelículas la actividad desnitrificante permanecía estable y en tasas bastante altas durante un período de tiempo mayor y a pesar de fluctuaciones ambientales.

Capítulo V:

*Análisis de la población desnitrificante
del género Halomonas en dos hábitats salinos*



RESUMEN

En los capítulos anteriores, el proceso de desnitrificación en el género *Halomonas* se trató de forma independiente desde diversos puntos de vista: Taxonómico, molecular y fisiológico. El análisis filogenético de los microorganismos objeto de estudio, expuesto en el Capítulo III, se llevó a cabo no sólo a partir del gen ribosómico, sino también en base a los genes *narH*, *nirS* y *nosZ*. Las secuencias de estos genes sirven de punto de partida para estudios ecológicos en los que detectar la población desnitrificante del género *Halomonas* mediante PCR-DGGE, que es el contenido de este capítulo. Como hábitats para el análisis se escogieron Rambla Salada (Murcia) y Fuente de Piedra (Málaga).

A partir de los alineamientos múltiples de nuestras secuencias con las disponibles en las bases de datos, se seleccionaron diversos cebadores, cuya especificidad para el género *Halomonas* fue puesta de manifiesto en un primer momento usando como controles positivos y negativos microorganismos ya descritos. Para el gen ribosómico se consultó la bibliografía pertinente, seleccionándose también otro oligonucleótido específico del género *Halomonas*.

La amplificación del gen ARNr 16S a partir del ADN de las muestras de suelo, su separación mediante electroforesis en gradiente desnaturizante y posterior secuenciación de las bandas puso de manifiesto nuevamente la especificidad de los cebadores diseñados para el género *Halomonas*. Tras comparar las bandas obtenidas con las secuencias depositadas en las bases de datos, se observa que los mayores porcentajes de semejanza se dan con especies del género *Halomonas*, pero los valores inferiores al 97% sugieren que los suelos podrían contener microorganismos aún por describir.

La comparación de la diversidad obtenida con el gen ribosómico y la resultante de los genes *narH*, *nirS* y *nosZ* muestra que los genes funcionales son de mayor utilidad para la detección de la comunidad específicamente desnitrificante del género *Halomonas* en esos hábitats. Podría tratarse de una población minoritaria en ellos, por lo que su presencia quedaría encubierta por otros grupos de *Halomonas* más abundantes que se amplifican preferentemente cuando se usa el gen ribosómico.

SUMMARY

In previous chapters, we studied separately taxonomic, molecular and physiologic diversity of denitrifying microorganisms belonging to the genus *Halomonas*. The phylogenetic analysis with the *narH*, *nirS* and *nosZ* genes have allowed us to handle new sequences and the possibility of using these to study the ecology of the denitrifying community of *Halomonas* with the technique PCR-DGGE. Firstly, basing on the multiple alignments of our sequences and the sequences from the databases, we selected different regions of the functional genes, conservative exclusively in the genus *Halomonas*. We looked up different references to choose the specific primers for the gene 16S RNAr. The specificity of the amplification with these primers was tested in several described microorganisms. Secondly, we chose two habitats, Rambla Salada (Murcia) and Fuente de Piedra (Málaga), where most of the strains of this work as well as two species of the genus *Halomonas* already described, have been isolated.

The DGGE analysis using the primers targeting 16S RNAr gene shows different bands. The highest similarity values were found with species belonging to the genus *Halomonas*, but these percentages were lower than 97%, which suggests that the two soils contain uncharacterized organisms of *Halomonas*.

The functional genes, specially *nirS* gene, have proved to be more useful than ribosomic gene to detect denitrifying community of *Halomonas*. Although we got some bands affiliated with denitrifying species using the pair of primers for 16S RNAr gene, the diversity of denitrifying community of *Halomonas* is wider when we employed the functional genes. The reason could be that this population was minority in the studied soils, so the use of the ribosomic primers would amplify preferently the dominant bacterial groups.

VII. ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN DESNITRIFICANTE DEL GÉNERO HALOMONAS EN DOS HÁBITATS SALINOS

VII.1. MATERIAL Y MÉTODOS

VII.1.1. SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Se tomaron muestras de rizosfera de dos hábitats atalasoalinos representativos por haberse descrito en ellos especies del género *Halomonas* y aislado muchas de las cepas caracterizadas en esta Tesis Doctoral.

Tabla 45. Hábitats salinos y cepas del género *Halomonas* aisladas en ellos.

Hábitats	Microorganismo aislado
Laguna de Fuente de Piedra (Málaga)	<i>Halomonas anticariensis</i> CECT 5854 ¹ (Martínez-Cánovas y col., 2004c) Cepas 4CR, 5CR, 12CR, 15CR, F5 y F15
Rambla Salada (Murcia)	<i>Halomonas cerina</i> Cepa R53 (LMG 24146) (González-Domenech y col., 2007a)

VII.1.2. EXTRACCIÓN DEL ADN DE LAS MUESTRAS

Para extraer el ADN de las muestras se usó el kit comercial PowerMax™ Soil DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Inc.), que aumenta el rendimiento de la extracción al permitir disponer de cantidades de muestra de partida superiores a los 10 gr. En nuestro caso, se partió de esta cantidad para cada una de las muestras y se procedió tal y como indica el fabricante.

VII.1.3. ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE GRADIENTE DESNATURALIZANTE (DGGE)

La población total y desnitrificante del género *Halomonas* de los hábitats mencionados se estudió en primer lugar amplificando por PCR regiones conservadas de los genes ARNr 16S, *narH*, *nirS* y *nosZ*, y a continuación separando los amplicones mediante la técnica DGGE. El resultado de la PCR del ADN de las muestras es una mezcla de fragmentos del mismo tamaño que no pueden ser separados por electroforesis convencional, como la descrita en el

apartado V.1.B., ya que mostrarían el mismo comportamiento de migración y, consecuentemente aparecerían como una única banda en el gel de agarosa. Aplicando la técnica de DGGE los fragmentos se desplazan en un gel de acrilamida que presenta a lo largo de su extensión un gradiente de sustancias desnaturizantes, separándose a distintas alturas en función de su T_m ; su movilidad dependerá, por tanto, de su secuencia. Esto implica que cada banda corresponda a un único fragmento, posibilitando su secuenciación y cotejo con las bases de datos y con las secuencias obtenidas en los Capítulos II y III para las cepas pertenecientes a *Halomonas*.

VII.1.3. 1. Diseño de cebadores específicos del género *Halomonas*

Basándonos en los alineamientos múltiples de las secuencias de los genes *narH*, *nirS* y *nosZ*, obtenidas para el análisis filogenético de los microorganismos objeto de estudio (Capítulo III), y de las secuencias disponibles en la base de datos GenBank con las cuales presentaban mayor porcentaje de semejanza, se diseñaron cebadores específicos de los microorganismos del género *Halomonas*, que serían utilizados para la amplificación de dichos genes mediante PCR en las muestras de suelo. Para el gen ARNr 16S, Yoshie y col. (2004) habían diseñado una sonda de relativa especificidad para el género *Halomonas*, que emplearon en estudios ecológicos mediante FISH (hibridación *in situ* por fluorescencia). Como pareja de este cebador se empleó el oligonucleótido 16F27, ya usado para establecer la posición filogenética de los microorganismos caracterizados en este trabajo (apartado IV.1.C.).

En la elección de los cebadores también se valoró la longitud del fragmento amplificado, siendo preferible que ésta estuviera comprendida entre 300 a 500 pb, con objeto de llegar a un equilibrio entre la información suministrada y la resolución de la técnica DGGE (Sheffield y col., 1989). La secuencia de los cebadores usados, así como el tamaño del fragmento amplificado, se detallan en la Tabla 46 de la página siguiente.

Tabla 46. Cebadores usados en los estudios ecológicos por PCR-DGGE de la población desnitrificante del género *Halomonas*.

Gen	Cebador	Tipo de cebador	T_m (°C)	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón	Referencia
ARNr 16S	16F27	Directo	59,39	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	515 pb	Lane, 1991
	Hlm474-R	Inverso	60,18	+CTGTGRGTGATGTCCTTCCT		Yoshie y col. (2004)
narH	Hddge-F	Directo	53,58	CAAGCAGGGYGAGC	529 pb	Este estudio
	Hddge-R	Inverso	52,62	+CTGGCGRTGGTAGAG		“
nirS	Sdgge-F	Directo	55,53	GAGTCCAACCAGATCGT	472 pb	“
	Sdgge-R	Inverso	62,60	+GGAGGTCTCGTCCATGGT		“
	Zdgge-F	Directo	53,49	+CGACATCATGAAGACG		“
nosZ	Zdgge-R1	Inverso	55,20	GTCATGCCCTTCTCG	321 pb	“
	Zdgge-R2	Inverso	57,81	GATRTAGCGGGTCAGCT		486 pb

*M= A ó C R= A ó G Y= C ó T

+CGCCCCGCCGCCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG

Como se puede observar en la Tabla X, a uno de los cebadores de cada pareja se le incorporó en el extremo 5' una extensión de guanina-citosina, ya que este procedimiento aumenta la resolución de la técnica DGGE. La secuencia de esta “cola GC” fue tomada de los trabajos de Sheffield y col. (1989) y Muyzer y col. (1998), y su composición se discutirá más adelante (apartado VII.3.2).

VII.1.3. 2. Amplificación mediante PCR de fragmentos de los genes ARNr 16S, narH, nirS y nosZ del ADN de las muestras

Para optimizar las condiciones de amplificación se tuvo en cuenta el tamaño del fragmento a amplificar y la T_m de los oligonucleótidos empleados en cada caso (véase Tabla X). Para hacer un primer ajuste de las condiciones de PCR y, sobre todo, comprobar la especificidad de los cebadores, se empleó el ADN de diversos microorganismos, los cuales se recogen en la Tabla 47 de la página siguiente.

Tabla 47. Microorganismos empleados como control en la reacción de PCR.

Gen	Controles positivos	Controles negativos
ARNr 16S	<i>H. ventosae</i> CECT 5797 ^T	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> DSM 8798 ^T
	<i>H. campisalis</i> ATCC 700597 ^T	<i>Salipiger mucescens</i> CECT 5855 ^T
narH	<i>H. ventosae</i> CECT 5797 ^T	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> DSM 8798 ^T
	<i>H. campisalis</i> ATCC 700597 ^T	<i>Salipiger mucescens</i> CECT 5855 ^T
	<i>H. cerina</i> (cepa SP4 ^T) LMG 24145 ^T	
nirS	<i>H. ventosae</i> CECT 5797 ^T	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> DSM 8798 ^T
	<i>H. cerina</i> (cepa SP4 ^T) LMG 24145 ^T	<i>Salipiger mucescens</i> CECT 5855 ^T
nosZ	<i>H. alimentaria</i> DSM 15356 ^T	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> DSM 8798 ^T
	<i>H. cerina</i> (cepa SP4 ^T) LMG 24145 ^T	<i>Salipiger mucescens</i> CECT 5855 ^T

Las condiciones finales de amplificación seleccionadas para trabajar con las muestras de suelo, se detallan en la Figura 62 de la página siguiente.

Los componentes de la reacción de PCR se muestran en el cuadro contiguo. El volumen de ADN de partida varió dependiendo de la muestra de que se tratase; para la procedente de Rambla Salada se utilizaron 5µl de la suspensión conteniendo el ADN extraído, mientras que para la de Fuente de Piedra, la solución original se diluyó diez veces para reducir la presencia de interferentes; de la dilución resultante se adicionaron 10µl.

Componentes de la reacción de PCR

- *ADN muestra: Variable (véase texto adyacente)
- *Cebadores (10 mM): 2µl
- *Tampón (10X): 5µl
- *MgCl₂: 4µl
- *dNTPs (10 mM): 1µl
- *DMSO: 1µl
- *BSA: 0,25µl
- *Taq polimerasa (AmpliTaq Gold, Eppendorf®): 1-5U
- *Agua bidestilada estéril c.s.p. 50µl

El producto de PCR, constituido por una única banda en el caso de los controles y por múltiples fragmentos de diferente secuencia en las muestras de suelo, se chequeó por electroforesis convencional en geles al 1,2 % (p/v) de agarosa (Seakem GTG®, FMC Corp.), tal y como se describe en el apartado V.1.B. Las condiciones de carrera fueron 100V durante 25 minutos aproximadamente. Como referencia del tamaño de los fragmentos se utilizó el marcador comercial HyperLadder IV de Bionline®, que genera un patrón de 10 bandas desde 100 a 1000 pares de bases.

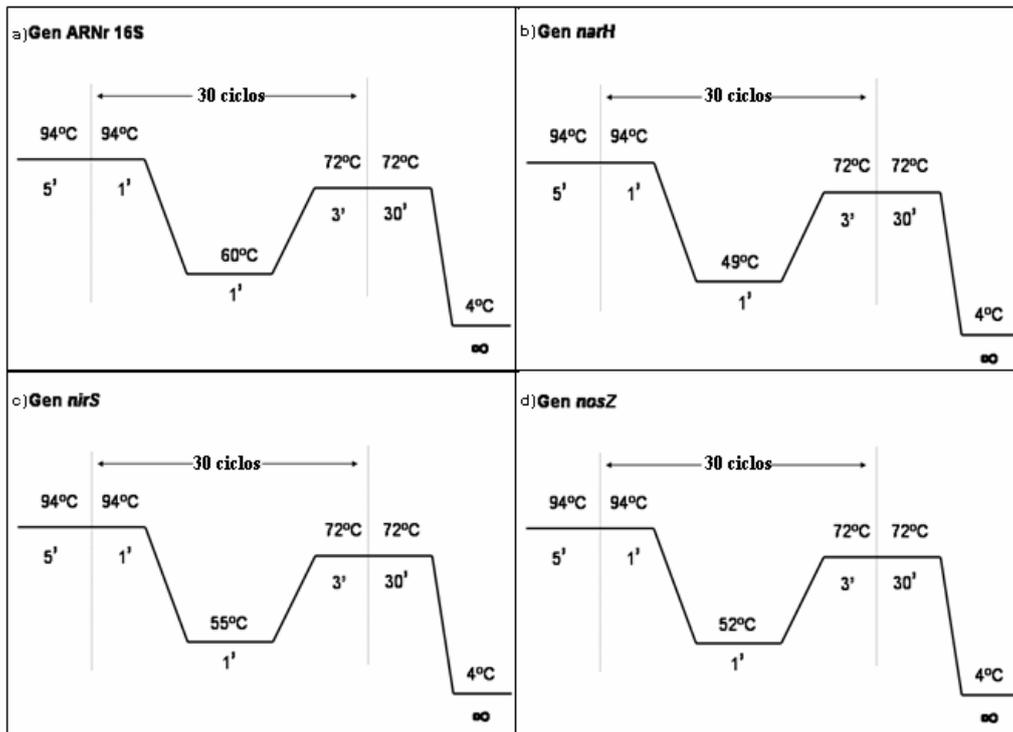


Figura 62. Condiciones de amplificación por PCR de los genes a) ARNr 16S; b) *narH*; c) *nirS*; y d) *nosZ*.

Como se puede observar en la figura superior, en todos los casos se finalizó la reacción de PCR con una etapa de polimerización que se mantuvo durante media hora, para reducir la formación de artefactos.

VII.1.3. 3. Determinación del gradiente de sustancias desnaturizantes mediante DGGE perpendicular

Para cada gen se determinó en primer lugar el intervalo orientativo de concentración de compuestos desnaturizantes que permitiera la adecuada separación de la mezcla de fragmentos obtenida por muestra (apartado VII.1.C.4.). Con tal objetivo, se llevaron a cabo experiencias de DGGE en su variante perpendicular, que fueron realizadas con el producto de PCR generado a partir de los controles positivos. Se denomina DGGE perpendicular porque el gradiente de

sustancias desnaturizantes y la dirección de migración electroforética son transversales, originando un perfil electroforético en forma de sigmoidea (véase la Figura 63). El aparataje empleado para el DGGE tanto perpendicular como paralelo, está contenido en DCode™ Universal Mutation Detection System (Biorad®), procediéndose según las instrucciones propuestas por el fabricante.

Los geles de acrilamida se prepararon, como ya se ha mencionado anteriormente, y como compuestos desnaturizantes se usaron urea y formamida.

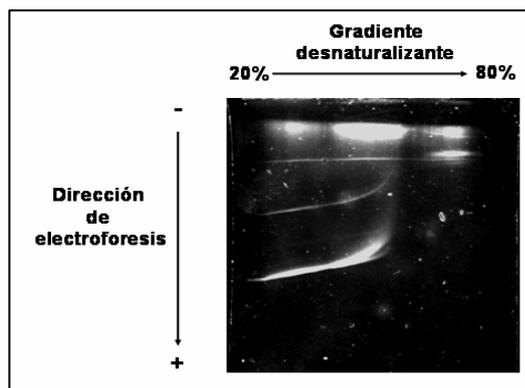


Figura 63. Ejemplo de aplicación de la técnica DGGE perpendicular.

***Reactivos:**

TAE 50x

Trizma Base (Sigma®).....	242g
Ácido acético glacial (Panreac®)..	57,1ml
EDTA (Sigma®) 0,5 M, pH 8.....	100ml
Agua bidestilada c.s.p.....	1000ml

Soluciones de acrilamida al 8% (v/v):

Solución 0% de sustancias desnaturizantes

Acrilamida/Bisacrilamida (37,5:1) al 40% (v/v) (Biorad®).....	20ml
TAE 50x.....	2ml
Agua bidestilada c.s.p.....	100ml

Solución 80% de sustancias desnaturizantes

Acrilamida/Bisacrilamida (37,5:1) al 40% (v/v) (Biorad®).....	20ml
TAE 50x.....	2ml
Formamida (Biorad®)	32ml
Urea (Sigma®).....	33,6g
Agua bidestilada c.s.p.....	100ml

La solución al 80% de sustancias desnaturizantes se agitó suavemente para facilitar la disolución de la urea. De forma previa a su uso, ambas soluciones fueron filtradas por medio de

una jeringa de gran capacidad volumétrica y filtros de nitrocelulosa (Millipore®). La conservación de las mismas se hizo en frascos de vidrio topacio envueltos en papel de aluminio y a 4°C.

Solución de APS al 10% (p/v)

Amonio persulfato(Biorad®).....	10g
Agua bidestilada c.s.p.....	100ml

La solución de APS se conservará congelada en alícuotas de 300µl.

***Técnica:**

A partir de las soluciones del 0% y 80% en sustancias desnaturalizantes, cuya composición se describió en la página anterior, para cada gel se prepararon 4 ml de dos soluciones, una al 20% y otra al 80%, para generar un gradiente comprendido entre ambos valores.

Solución 20% de sustancias desnaturalizantes

Solución al 80%.....	1ml
Solución al 0%.....	3ml
TEMED (Biorad®).....	2,66µl
Solución de APS al 10% (p/v).....	20µl
VOLUMEN TOTAL	4ml

Solución 80% de sustancias desnaturalizantes

Solución al 80%.....	4ml
TEMED (Biorad®).....	2,6µl
Solución de APS al 10% (p/v).....	20µl
Tampón de carga (apartado V.1.B) filtrado.	13µl
VOLUMEN TOTAL	4ml

TEMED y APS son compuestos que facilitan la polimerización de la acrilamida, por lo que no se adicionaron hasta el momento de preparar el gel. Para conseguir un gradiente homogéneo las soluciones se vertieron en unos vasos comunicantes, tal y como se indica en la Figura X. A la solución más concentrada se le adicionó en su composición tampón de carga para visualizar la formación del gradiente. Desde estos vasos la mezcla resultante se impulsó por una bomba peristáltica a la estructura donde se

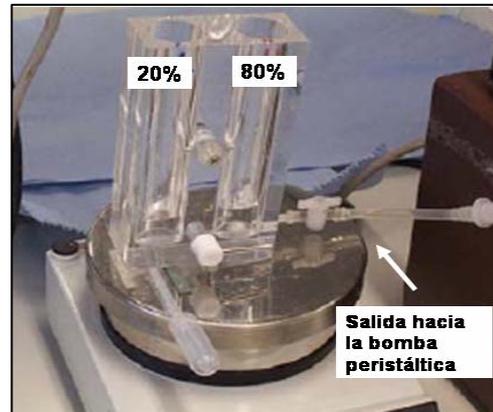


Figura 64. Disposición en los vasos comunicantes de las soluciones con los compuestos desnaturalizantes.

formaría el gel, a una velocidad de 1,26 ml por minuto. El gel se dejó polimerizar durante 2 horas. Durante este tiempo, se procedió a calentar la cubeta de electroforesis, rellena del tampón TAE 1x, hasta alcanzar 62°C.

El volumen de muestra que se cargó en el gel fue de 200µl, la mitad de los cuales lo constituía el producto de PCR obtenido en los controles positivos en cada caso. Asimismo, se adicionaron 40µl de tampón de carga, cuya composición ya se describió en el apartado V.1.B. El volumen restante se completó con agua bidestilada.

Se ensayaron distintas condiciones para la electroforesis, siendo seleccionadas las que se resumen en el cuadro adyacente.

Condiciones de electroforesis DGGE perpendicular

Voltaje.....	100V
Tiempo.....	2,5h
Tª tampón cubeta de electroforesis..	62°C

Para visualizar el ADN una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (0,5µg/ml) preparada en tampón TAE 1x. Transcurrida media hora, se eliminó el exceso de bromuro de etidio lavando los geles en agua bidestilada durante el mismo período de tiempo. Las imágenes se recogieron con una videocámara acoplada a una impresora térmica, usando el programa Gel Doc 2000 de Biorad®, como ya se explicó en el apartado V.1.B.

VII.1.3. 4. Separación de los productos de PCR mediante DGGE paralelo

Los productos de amplificación de los distintos genes se separaron mediante la técnica de DGGE en su variante paralela, aquella en la que la migración electroforética y el gradiente desnaturalizante siguen la misma dirección (véase Figura X).

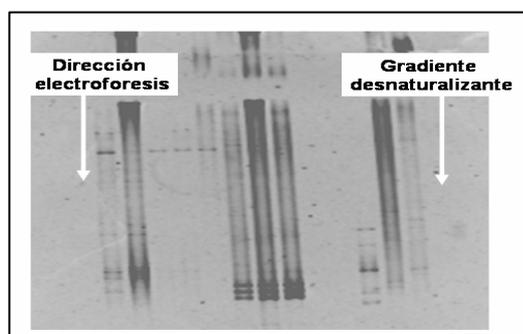


Figura 65. Ejemplo de aplicación de la técnica DGGE perpendicular.

La preparación de los geles siguió las pautas marcadas por el fabricante y se realizó de forma similar a lo explicado para el DGGE perpendicular. El gradiente desnaturante se obtuvo a partir de las soluciones de 0% y 80% (véase el apartado anterior), eligiendo para cada gen el intervalo de concentración de compuestos desnaturantes óptimo, de acuerdo a las experiencias de DGGE perpendicular previamente realizadas. El volumen total de cada solución empleada fue de 15 ml por gel, adicionando a la de mayor concentración de sustancias desnaturantes 50µl de tampón de carga para visualizar la formación del gradiente.

Al igual que en los experimentos de DGGE perpendicular, también fue necesario precalentar el tampón de la cubeta, si bien en este caso se hizo 5°C por encima de la temperatura a la cual se realizaría la electroforesis, con objeto de evitar una pérdida excesiva de calor durante la carga de las muestras. Así, la temperatura de precalentamiento del tampón fue de 67°C.

La cantidad de ADN cargada para conseguir una buena resolución de la técnica, osciló entre 500 y 700ng. Puesto que la capacidad máxima que admitía un pocillo de un gel era de 25µl, para determinar el volumen de ADN necesario previamente calculamos la concentración del producto de PCR en cada caso, utilizando un biofotómetro Eppendorf®, tal y como ya se explicó en el apartado IV.1.B.2. Al volumen de muestra se le adicionaron 5µl de tampón de carga y se enrasó hasta 25µl con agua bidestilada. En los casos en los cuales la concentración de ADN era muy baja, se procedió a reunir varios productos de la misma amplificación para concentrarlos. Para ello se completó hasta un volumen de 200µl con agua bidestilada y se adicionaron 600µl de etanol absoluto y 30µl de acetato sódico 3M. Se mantuvo a -80°C durante 2 horas, tras las cuales se resuspendió en 20µl de agua bidestilada y se volvió a cuantificar.

Las condiciones de electroforesis en las cuales se consiguió la adecuada separación de los fragmentos se resumen en el cuadro adyacente. Para facilitar la salida de las muestras de los pocillos, se aplicó un voltaje de 200V durante los primeros 15 minutos de electroforesis, tras lo cual se bajó a 100V, manteniéndose el mismo durante 16 horas.

Condiciones de electroforesis DGGE paralelo

Voltaje.....	100V
Tiempo.....	16h
Tª tampón cubeta de electroforesis..	62°C

Una vez finalizada la electroforesis, se procedió a la visualización del ADN como ya se explicó en el apartado anterior. Las distintas bandas fueron escindidas del gel por medio de una cuchilla perfectamente limpia, depositándose en un tubo de polipropileno que contenía 40µl de agua bidestilada. El ADN contenido en una banda se dejó eluir durante 24 horas, tras las cuales y utilizando 20µl de esa solución, se procedió a la reamplificación en las mismas condiciones de PCR usadas en cada caso. El producto de esta reamplificación fue chequeado por electroforesis convencional en geles de agarosa (apartado V.1.B.) y posteriormente purificado mediante el kit Illustra® GFX DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare®), según las recomendaciones del fabricante.

VII.1.3. 5. Secuenciación de los fragmentos reamplificados y análisis comparativo de bandas

La secuenciación de los fragmentos purificados se llevó a cabo de forma similar a lo descrito en el apartado IV.1.C.1.b), utilizando en este caso los mismos cebadores empleados en las reacciones de amplificación. Una vez recibidas las secuencias y tras comprobarlas visualmente, se buscó su similitud con otras secuencias disponibles en la base de datos GenBank, por medio de los programas *NucleotideBLASTsearch* o *BLASTXsearch* (Altschul y col., 1990), según se tratase del gen ARNr 16S o de los genes funcionales. Asimismo, se determinó mediante la aplicación *Megalign* (Burland, 2000) su semejanza entre sí y con la región correspondiente de las secuencias obtenidas para esos mismos genes en los microorganismos objeto de estudio (Capítulos II y III).

Por otra parte, en algunos casos también resultó interesante el posicionamiento filogenético de las secuencias obtenidas para los distintos genes y hábitats. Así, se realizó el alineamiento múltiple de dichas secuencias con las oportunas regiones de los microorganismos de referencia, empleando para ello el programa *Clustal X* (Thompson y col., 1997). A continuación, los árboles filogenéticos se construyeron por el método Neighbour-Joining mediante el programa *MEGA 3.1* (Kumar y col., 2004). La consistencia de una determinada agrupación se confirmó mediante el valor de remuestreo o “bootstrap”, calculado por el mismo programa *MEGA 3.1* en base a 1000 réplicas.

VII.2. RESULTADOS

VII.2.1. DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS CEBADORES PARA EL GÉNERO *HALOMONAS*

Las condiciones de PCR mencionadas en el apartado VII.1.C. 2. dan amplificaciones específicas para las especies del género *Halomonas* utilizadas, no obteniéndose ninguna banda en los controles negativos (Figuras 66 a 69). La pareja de cebadores Zdgge-F y Zdgge-R1 no produce amplicón alguno en las cepas y condiciones empleadas.

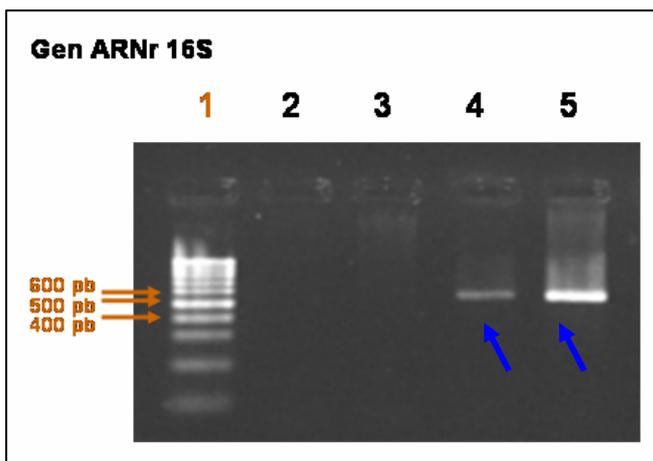


Figura 66. Comprobación de la especificidad de los cebadores para el gen ARNr 16S. Línea 1: Marcador HyperLadder IV (Bioline®). Línea 2: *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* DSM 8798^T. Línea 3: *Salipiger mucescens* CECT 5855^T. Línea 4: *Halomonas ventosae* CECT 5797^T. Línea 5: *H. campisalis* ATCC 700597^T.

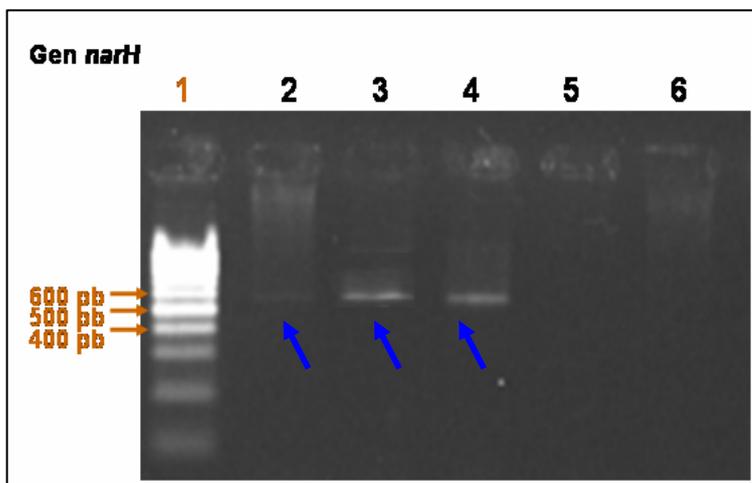


Figura 67. Comprobación de la especificidad de los cebadores para el gen *narH*. Línea 1: Marcador HyperLadder IV (Bioline®). Línea 2: *Halomonas campisalis* ATCC 700597^T. Línea 3: *H. ventosae* CECT 5797^T. Línea 4: *H. cerina* LMG 24145^T. Línea 5: *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* DSM 8798^T. Línea 6: *Salipiger mucescens* CECT 5855^T.

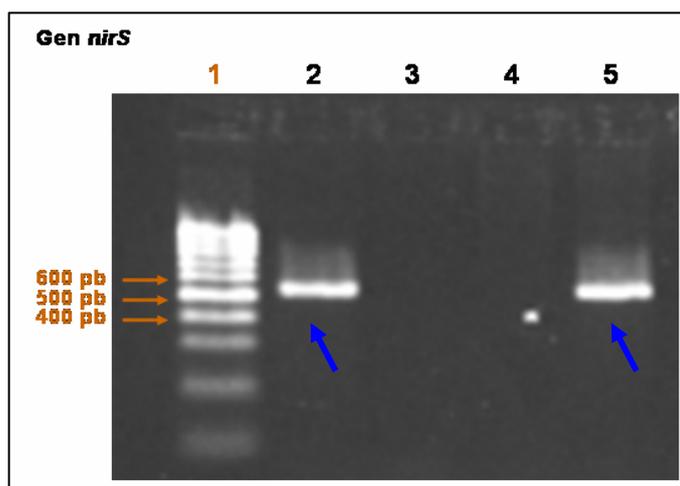


Figura 68. Chequeo de la especificidad de los cebadores para el gen *nirS*. Línea 1: Marcador HyperLadder IV (Bioline®). Línea 2: *Halomonas ventosae* CECT 5797^T. Línea 3: *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* DSM 8798^T. Línea 4: *Salipiger mucescens* CECT 5855^T. Línea 5: *H. cerina* LMG 24145^T.



Figura 69. Chequeo de la especificidad de los cebadores Zdgge-F y Zdgge-R2 para el gen *nosZ*. Línea 1: Marcador HyperLadder IV (Bioline®). Línea 2: *H. cerina* LMG 24145^T. Línea 3: *H. alimentaria* DSM 15356^T. Línea 4: *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* DSM 8798^T. Línea 5: *Salipiger mucescens* CECT 5855^T.

VII.2.2. DETERMINACIÓN PARA CADA GEN DEL GRADIENTE DESNATURALIZANTE MEDIANTE DGGE PERPENDICULAR

Las imágenes de las experiencias de DGGE perpendicular se recogen en las Figuras 70 a 73 de la página siguiente. De acuerdo a estos resultados, el intervalo de concentración de sustancias desnaturalizantes elegido fue de 35 a 60% para el gen ARNr 16S, de 40 a 70% para el gen *narH* y de 45 a 75% para los genes *nirS* y *nosZ*.

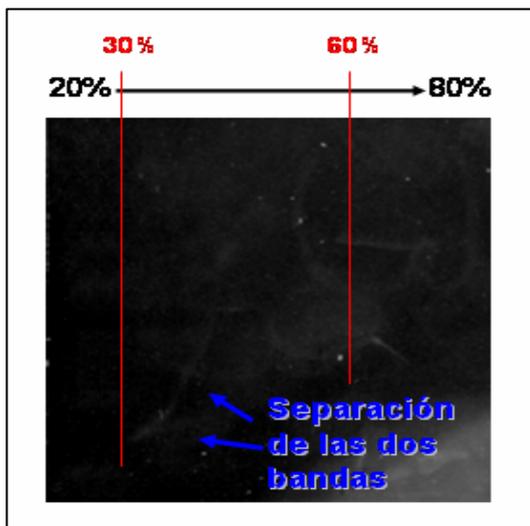


Figura 70. Separación de dos amplicones diferentes del gen ARNr 16S mediante DGGE perpendicular.

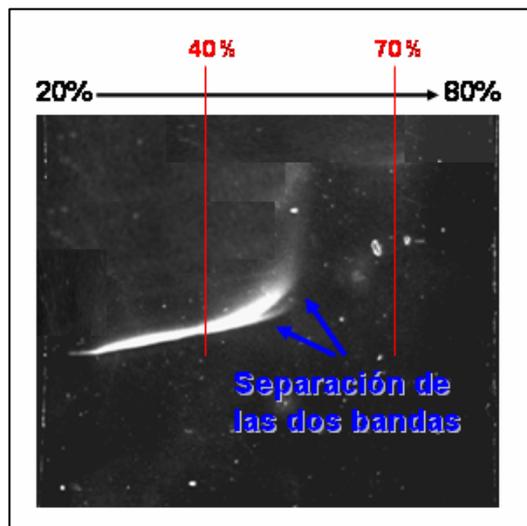


Figura 71. Separación de dos amplicones diferentes del gen *narH* mediante DGGE perpendicular.

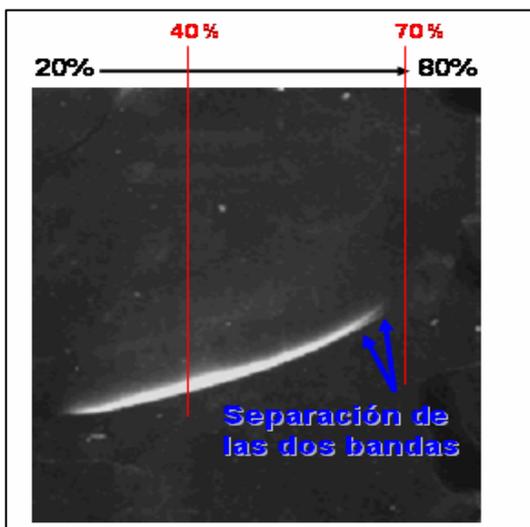


Figura 72. Separación de dos amplicones diferentes del gen *nirS* mediante DGGE perpendicular.

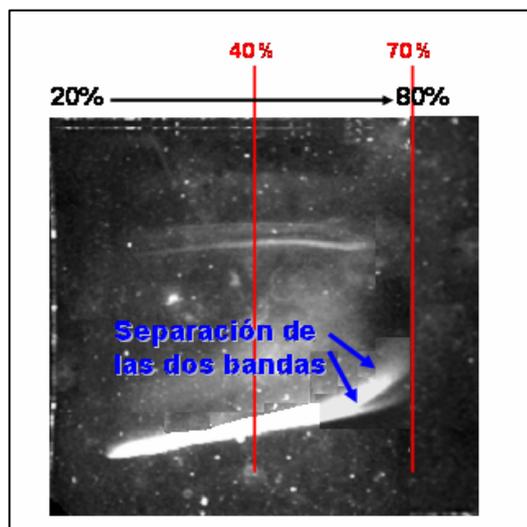


Figura 73. Separación de dos amplicones diferentes del gen *nosZ* mediante DGGE perpendicular.

VII.2.3. ESTUDIO MEDIANTE DGGE PARALELO DE LA DIVERSIDAD DE LA POBLACIÓN DESNITRIFICANTE DEL GÉNERO *HALOMONAS* EN DOS MUESTRAS DE SUELO

Tras el análisis orientativo mediante DGGE perpendicular del porcentaje de desnaturizante más adecuado para cada gen, se realizaron geles paralelos con los gradientes seleccionados.

VII.2.3.1. Análisis por DGGE de fragmentos del gen ARNr 16S de las muestras de suelo

En la Figura 74 es mostrado el perfil de diversidad obtenido por DGGE a partir de la

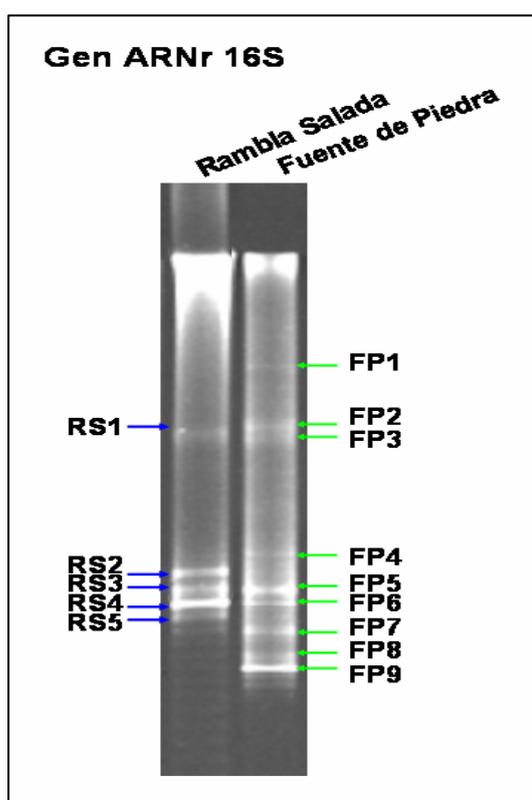


Figura 74. Análisis por DGGE de fragmentos del gen ARNr 16S de las muestras de suelo. RS: Bandas de Rambla Salada; FP: Bandas de Fuente de Piedra. Gradiente desnaturizante de 35% a 60%.

amplificación de aproximadamente 500 pares de bases del gen ARNr 16S, para las dos muestras de suelo. Como se puede observar, existe un mayor número de bandas en la muestra procedente de Fuente de Piedra (Málaga). Las bandas señaladas con una flecha fueron extraídas del gel para ser reamplificadas en las condiciones utilizadas previamente. De las bandas RS2, RS5, FP1, FP3 y FP4 no se dispone de su secuencia puesto que no rindieron ningún amplicón en la reacción de amplificación posterior a su escisión del gel.

La secuenciación de las bandas y su comparación entre sí mediante el programa *Megalign* muestra cierta redundancia de microorganismos en ambos hábitats. Así, las bandas RS4 y FP6, que aparecen a la misma

altura en ambos geles, presentan una semejanza del 100%; la similitud entre otras como RS1 y FP2 ó RS3 y FP5 es también muy alta, superior al 99%. Cuando estas secuencias se cotejan con las disponibles en la base de datos GenBank, los valores más altos de semejanza corresponden a ciertas especies válidamente publicadas del género *Halomonas* (véase Tabla 48), así como a otros microorganismos no cultivados también pertenecientes a este género.

Tabla 48. Valores de semejanza máximos de las bandas extraídas con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank.

Banda	Microorganismo	Número de acceso	Semejanza*
RS1/FP2	<i>Halomonas salina</i> ATCC 49509 ^T	X87217	93%
	<i>Halomonas desiderata</i> DSM 9502 ^T	X92417	93%
RS3/FP5	<i>Halomonas ventosae</i> CECT 5797 ^T	AY268080	94%
RS4/FP6	<i>Halomonas ventosae</i> CECT 5797 ^T	AY268080	94%
	<i>Halomonas desiderata</i> DSM 9502 ^T	X92417	93%
FP7	<i>Halomonas halmophila</i> ATCC 19717 ^T	AJ306889	96%
	<i>Halomonas halophila</i> DSM 4770 ^T	M93353	96%
FP8	<i>Halomonas halmophila</i> ATCC 19717 ^T	AJ306889	96%
FP9	<i>Halomonas halmophila</i> ATCC 19717 ^T	AJ306889	99%

*Similitud obtenida mediante el programa *NucleotideBLASTsearch* cuyos resultados de similaridad entre secuencias se basan en alineamientos locales de las mismas

Una vez conocida la vinculación de las bandas secuenciadas con microorganismos del género *Halomonas*, se procedió al alineamiento múltiple y posterior establecimiento de la filogenia de dichas secuencias con aquéllas con las cuales presentaron mayor semejanza, de acuerdo a los resultados del programa *Megalign* (véase Apéndice XXIX). En esta comparación se incluyen las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas caracterizadas en el Capítulo II. El árbol filogenético resultante se muestra en la Figura 75 de la página siguiente.



Figura 75. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen ARNr 16S, obtenido mediante el método Neighbour-Joining. En azul se resaltan las secuencias parciales del gen ARNr 16S obtenidas de las muestras de suelo: FP, Fuente de Piedra; RS: Rambla Salada. Los números de acceso en la base de datos GenBank de las secuencias de las especies de referencia aparecen entre paréntesis. La barra indica un 1% de divergencia. En los nodos se indican los valores de “bootstrap” mayores del 50%.

VII.2.3.2. Análisis por DGGE de fragmentos del gen *narH* de las muestras de suelo

No se obtiene producto de amplificación alguno a partir del ADN procedente de la muestra de suelo de Rambla Salada (Murcia). Se prueban dos nuevas temperaturas de hibridación, 47°C y 52°C, con idéntico resultado. Con respecto a la población microbiana de Fuente de Piedra (Málaga) la diversidad obtenida en base al gen *narH* es muy escasa, estando representada por dos bandas, de las cuales sólo una genera una secuencia utilizable. Al buscar la similaridad de dicha secuencia mediante *BLASTXsearch* con secuencias de la base de datos GenBank, la mayor semejanza es de un 96% y se presenta con los genes *narH* de *Halomonas maura* y *H. halodenitrificans*.

VII.2.3.3. Análisis por DGGE de fragmentos del gen *nirS* de las muestras de suelo

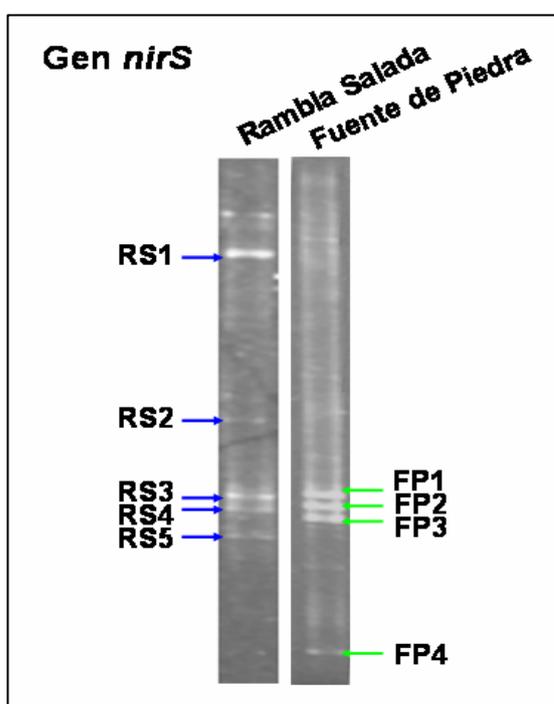


Figura 76. Análisis por DGGE de fragmentos del gen *nirS* de las muestras de suelo. RS: Bandas de Rambla Salada; FP: Bandas de Fuente de Piedra. Gradiente desnaturalizante de 45 a 75%.

En la Figura adyacente se muestra el perfil de diversidad obtenido por DGGE a partir de la amplificación de aproximadamente 470 pares de bases del gen *nirS* en las dos muestras de suelo. A diferencia de lo obtenido para el gen ARNr 16S, no existen bandas a igual altura como correspondería a fragmentos con idéntica secuencia y, por tanto, similar comportamiento desnaturalizante. La semejanza entre las secuencias obtenidas no supera en ninguno de los casos el 98%, de acuerdo a los resultados del programa *Megalign*. De las bandas RS2 y FP3 no se pudo disponer de la

secuencia al resultar fallida la reamplificación una vez que éstas fueron escindidas del gel.

Tras comparar las secuencias en la base de datos GenBank encontramos que todas ellas presentan porcentajes de semejanza superiores al 76% con los genes para la nitrito reductasa, pero de microorganismos no cultivados o sin caracterizar completamente. Puesto que en la base de datos consultada no existe ninguna secuencia depositada perteneciente al género *Halomonas*, la similitud con las mismas se determinó mediante el programa *Megalign*, empleando para ello las secuencias obtenidas en los estudios filogenéticos descritos en el Capítulo III. Los valores de semejanza y divergencia se muestran en el Apéndice XXX, destacándose a continuación los porcentajes máximos en la Tabla 49.

Tabla 49. Valores de semejanza máximos de las bandas extraídas con las secuencias *nirS* de microorganismos del género *Halomonas* (Capítulo III).

Banda	Microorganismo	Semejanza*
RS1	Cepa 4CR	92,9%
RS3	Cepa 5CR	89,3%
RS4	Cepa 5CR	91,0%
RS5	Cepa 5CR	95,0%
FP1	Cepa A113	69,9%
FP2	Cepa HGDK1	62,4%
FP4	Cepa R53 (perteneciente a <i>H. cerina</i>)	98,4%

*Similitud obtenida mediante el programa *Megalign*, cuyos resultados de similaridad entre secuencias se basan en alineamientos múltiples de las mismas

La afiliación filogenética de las bandas con el género *Halomonas* y otras especies externas empleadas en los estudios filogenéticos del Capítulo III, se representa en la Figura 77 de la página siguiente.

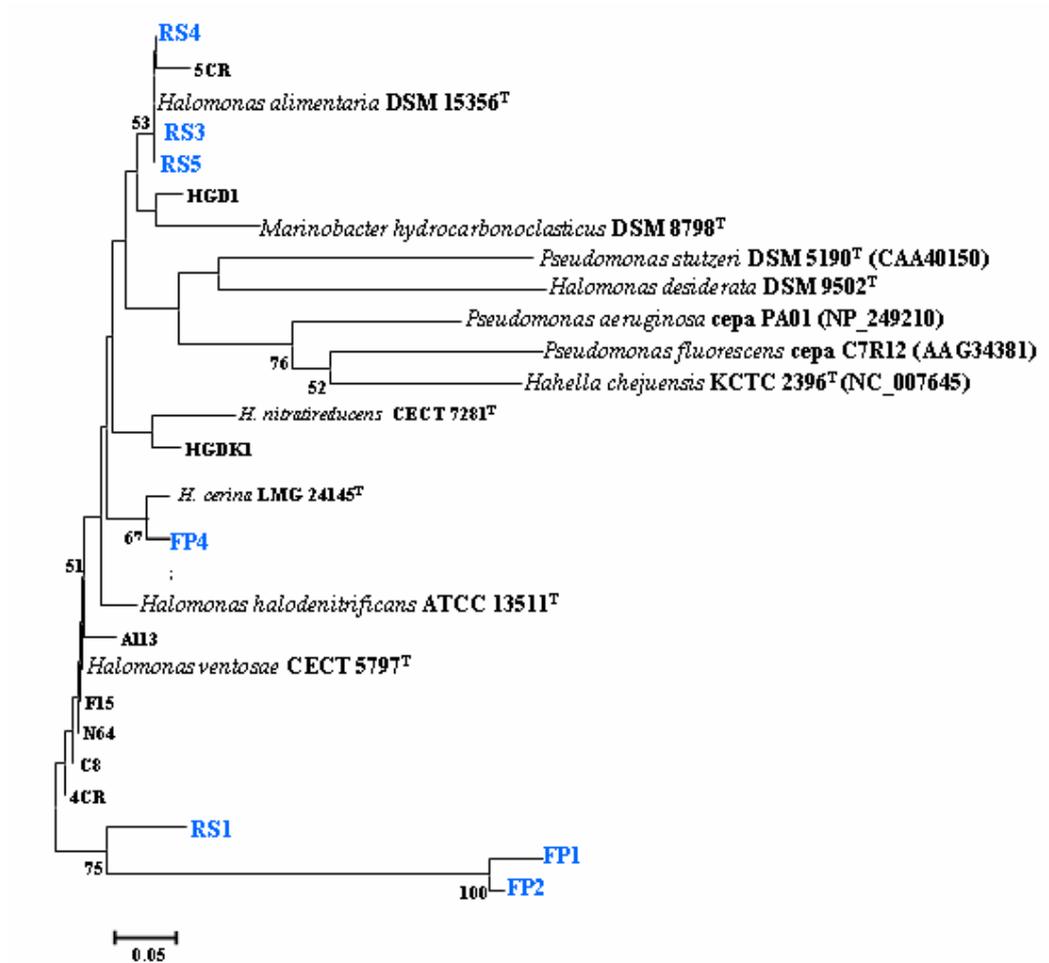


Figura 77. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen *nirS*, obtenido mediante el método Neighbour-Joining. En azul se resaltan las secuencias parciales del gen *nirS* obtenidas de las muestras de suelo: FP, Fuente de Piedra; RS: Rambla Salada. Los números de acceso en la base de datos GenBank de las secuencias de las especies de referencia aparecen entre paréntesis. La barra indica un 5% de divergencia. En los nodos se indican los valores de “bootstrap” mayores del 50%.

VII.2.3.4. Análisis por DGGE de fragmentos del gen *nosZ* de las muestras de suelo

No se obtiene producto de amplificación alguno a partir del ADN procedente de la muestra de suelo de Fuente de Piedra (Málaga). Por el contrario, la diversidad de Rambla Salada queda representada por cinco bandas, como puede observarse en la Figura 78 de la página siguiente. De éstas, sólo la banda RS1 origina una secuencia aceptable, con valores de semejanza

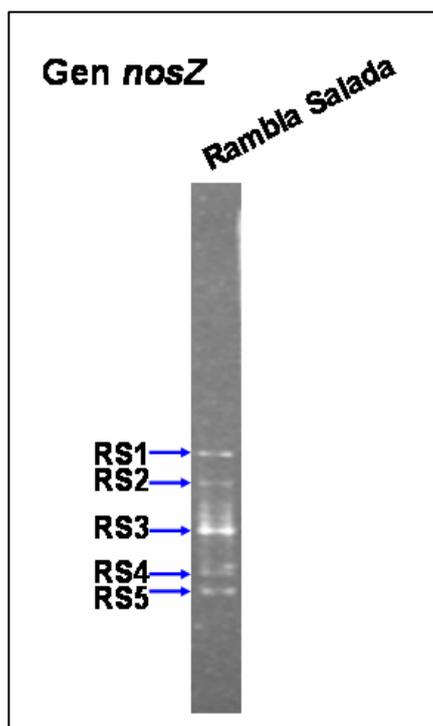


Figura 78. Análisis por DGGE de fragmentos del gen *nosZ* de una muestra de suelo de Rambla Salada. Gradiente desnaturalizante de 45 a 75%.

de hasta el 96% con la región correspondiente del gen *nosZ* de microorganismos del género *Halomonas*, en concreto con las cepas 4CR, 5CR, N64 y C8 (véase Apéndice XXXI). Por el contrario, el resto de bandas muestra secuencias algo ambiguas, si bien la semejanza con las cepas desnitrificantes de *Halomonas* sigue siendo más alta que con los demás microorganismos, tanto si la comparación se hace con el programa *BLAST* usando las secuencias disponibles en la base de datos, como con *Megalign*, incluyendo las especies externas de referencia usadas en el estudio filogenético del Capítulo III.

VII.3. DISCUSIÓN

En los capítulos anteriores, el proceso de desnitrificación en el género *Halomonas* se trató de forma independiente desde diversos puntos de vista: Taxonómico, molecular y fisiológico. En el Capítulo III se puso de manifiesto que la filogenia obtenida a partir de los genes *narH*, *nirS* y *nosZ* en los microorganismos objeto de estudio es congruente o similar a la establecida con el gen ARNr 16S. Las bases de datos son profusas en secuencias de genes funcionales relacionados con el proceso de desnitrificación pero la mayoría pertenecen a bacterias no cultivadas, por ello la secuenciación de esos genes en microorganismos caracterizados completamente resulta de gran utilidad a la hora de aplicar métodos moleculares al estudio de un hábitat. Uno de los grandes retos en ecología microbiana es establecer un nexo entre biodiversidad estructural y funcional, si bien son pocos los trabajos realizados con tal fin; como ejemplo de esta perspectiva integradora, citar el estudio de Goregues y col. (2005).

El género *Halomonas*, como ya se ha mencionado en esta memoria, es uno de los más ampliamente distribuidos en los hábitats salinos. Sin embargo, su participación en el ciclo del nitrógeno y, en concreto, en la desnitrificación, no ha sido estudiada tan exhaustivamente como en otros grupos, por lo que su trascendencia ecológica no es bien conocida. El objetivo de este capítulo no es otro que el de plantear una estrategia molecular basada en la técnica de PCR-DGGE para el rastreo en distintos hábitats salinos de bacterias desnitrificantes pertenecientes al género *Halomonas*.

VII.3.1. ELECCIÓN DE LA TÉCNICA PCR-DGGE. OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE PCR E INCONVENIENTES DEL MÉTODO

La técnica DGGE fue introducida en ecología microbiana hace ya más de una década por Muyzer y col. (1993). Desde entonces su popularidad se ha multiplicado por características tales como su sencillez, reproducibilidad, fidelidad y rapidez (Muyzer y Smalla, 1998), que fueron las que nos condujeron a su elección sobre otras técnicas moleculares.

La principal limitación de esta técnica, que implícitamente está asociada a otras desventajas, es la dependencia de una reacción de amplificación, tanto de forma previa a la electroforesis en gradiente desnaturante como posteriormente, tras escindir las bandas. Así, en primer lugar necesitamos la extracción del ADN de una muestra de suelo de naturaleza compleja y en nuestro caso, además, con alto contenido en sales. Se ha comprobado que métodos de lisis agresivos, como el empleo de lisozima o agitación vigorosa, dan mejores rendimientos (Heuer y Smalla, 1997). El kit comercial que hemos utilizado para la extracción de ADN (apartado VII.1.B) combina ambos procedimientos. Incorpora asimismo reactivos para la eliminación de sustancias que se sabe interfieren en la reacción de PCR, aunque como se lee en el apartado VII.1.C. 2., en el caso del ADN de Fuente de Piedra es requerida la dilución previa para lograr las amplificaciones necesitadas. Si bien reducimos las sustancias no deseadas, obviamente, también disminuimos la concentración de ADN de la muestra, pudiendo repercutir en la amplificación fallida que obtuvimos del gen *nosZ* a partir de dicho suelo.

La cantidad de muestra de partida es fundamental y constituye uno de los parámetros a optimizar para una adecuada resolución de la técnica (Stres y col., 2004). Se probó un kit comercial similar al finalmente usado para extraer el ADN del suelo pero que partía de 1gr, no obteniéndose ningún éxito en la amplificación de los genes. Ésta es la razón de decantarnos por una extracción a mayor escala. No obstante, incluso con este kit sería también interesante probar en un futuro a concentrar el ADN extraído del suelo para ver si se incrementa la diversidad existente al disponer de más cantidad de ADN original.

Por otra parte, aunque en las reacciones de PCR se empleó una polimerasa de alta fidelidad, el número de ciclos no superó en ningún caso los 30 para evitar la acumulación de errores.

Para reducir la formación de artefactos durante la reacción de PCR se prolongó el tiempo de elongación a 30 minutos, tres veces más de lo usado habitualmente. Aunque esta estrategia está probada en diversos trabajos (Judo y col., 1998; Qiu y col., 2001), los tiempos finales que encontramos son más reducidos.

VII.3. 2. DISEÑO DE CEBADORES ESPECÍFICOS

Existen varios trabajos en los que se analiza la población desnitrificante de ambientes salinos mediante amplificación por PCR de ciertas regiones del gen ARNr 16S y posterior electroforesis en gradiente desnaturante (Noda y col., 2002; Yoshie y col., 2002). En estos hábitats se ha puesto de manifiesto la presencia de microorganismos del género *Halomonas*. Yoshie y col. (2004) aprovechando las secuencias obtenidas en dichos estudios, diseñaron una sonda para la detección del gen ARNr 16S de un gran número de miembros de este género mediante la técnica FISH (hibridación *in situ* por fluorescencia) y comprobaron con éxito que era específica. Así, la sonda Hlm474 utilizada en dicho trabajo fue seleccionada, junto con el oligonucleótido 16F27 de carácter universal (Lane, 1991), como cebador para la amplificación por PCR del gen ARNr 16S en dos muestras de suelo. Los resultados obtenidos, así como su especificidad, se discuten en el apartado siguiente.

La técnica PCR-DGGE comenzó enfocándose en la amplificación de regiones conservadas del gen ribosómico, si bien la posterior aplicación a productos de PCR obtenidos de genes funcionales presentes sólo en determinados grupos bacterianos, permitió un mayor conocimiento de éstos y de su ecología. Así, tras secuenciar los genes *narH*, *nirS* y *nosZ* en los microorganismos objeto de estudio (Capítulo III), se nos abrió la posibilidad del uso de dichas secuencias en técnicas moleculares que informaran exclusivamente sobre la ecología de la población desnitrificante del género *Halomonas*. Esta especificidad es importante cuando se pretende la detección molecular de una comunidad que está en desventaja numérica con otras de una misma muestra. En estos casos el uso de cebadores universales tendería a amplificar la población más abundante, pasando por alto otras minoritarias cuya importancia podría ser igual de significativa (Muyzer y col., 1993; Phillips y col., 2000; Dar y col., 2005).

Tomando como referencia los alineamientos múltiples de las secuencias de los genes de la desnitrificación de nuestras cepas con las disponibles en la base de datos GenBank, se seleccionaron regiones específicas de los microorganismos del género *Halomonas*. En algunos cebadores se introdujeron degeneraciones para abarcar el máximo número de miembros, teniendo siempre en cuenta que existieran al menos tres nucleótidos distintos con las especies no

pertenecientes a dicho género. Las regiones correspondientes a los oligonucleótidos Hdgge-F y Hdgge-R estaban presentes en el gen *narH* de la gran mayoría de microorganismos del género *Halomonas* que fueron secuenciados, incluyéndose éstos entre filotipos muy diversos (en base a los genes ARNr 16S y *narH*, véase Capítulo III). Por su parte, los cebadores para la amplificación del gen *nirS* correspondían a regiones del mismo existentes también en casi todas las cepas, encontrándonos con las mayores diferencias en el gen *nirS* de *H. desiderata*, especie que como ya se expuso en el estudio filogenético del Capítulo III se alejaba bastante del resto de las especies pertenecientes a *Halomonas*. Finalmente, para el gen *nosZ*, la secuencia del cebador directo y del inverso Zdgge-R1 era compartida por todas las cepas, con la excepción de nuevo de *H. desiderata* y ahora también de *H. campisalis*. En cuanto al cebador Zdgge-R2, *H. ventosae* y *H. halodenitrificans* difieren en un único nucleótido situado en los extremos 5' y 3' respectivamente de la secuencia. El chequeo preliminar de los cebadores en los controles positivos y negativos muestra una adecuada especificidad, como se puede observar en el apartado VII.2.A.

En cada pareja de cebadores, uno de ellos incorpora una extensión de guanina-citosina, pues como se ha mencionado con anterioridad esto aumenta la resolución del DGGE al prevenir que el fragmento se desnaturalice completamente (Sheffield y col., 1989). La incorporación de esta “cola de GC” altera de forma significativa las características de desnaturalización de dicho segmento, incrementando el número de variaciones detectables desde un 40 a un 100% (Myers y col., 1985; Sheffield y col., 1989; Abrams y col., 1995). Aunque la composición de esta extensión no es crítica, algunos sintentizadores de ADN podrían tener problemas con múltiples guanosinas adyacentes, por lo que la “cola de GC” que incorporamos está compuesta mayoritariamente por residuos de citosina (Sheffield y col., 1989; Muyzer y col., 1998). La longitud tampoco es crítica pero son más numerosos aquellos artículos en los que se emplean colas de aproximadamente 40 pb.

VII.3. 3. APROXIMACIÓN A LA DIVERSIDAD DE LA POBLACIÓN DEL GÉNERO HALOMONAS POR MEDIO DEL GEN ARNR 16S

La amplificación del gen ARNr 16S genera un perfil de diversidad representado por cinco bandas en el caso de la muestra de suelo de Rambla Salada y por nueve en Fuente de Piedra. Se

observa que tres de las bandas en ambos suelos poseen el mismo comportamiento de migración, lo que debería responder a una secuencia idéntica (Muyzer y Smalla, 1998). Este hecho se confirma tras la secuenciación y obtención de la semejanza con el programa *Megalign* (Apéndice XXIX). Del total de bandas escindidas en ambas muestras, cinco de ellas no pudieron ser reamplificadas ni, por tanto, secuenciadas, quizás a consecuencia de una mala extracción del gel.

Por otra parte, las bandas secuenciadas se vinculan con el género *Halomonas*; los mayores porcentajes de similitud obtenidos al hacer la comparación con la base de datos GenBank se dan precisamente con las especies de este género (véase Tabla X), si bien, salvo en el caso de la banda FP9, son valores por debajo del 97% aceptado como límite orientativo de especie (Stackebrandt y Goebel, 1994). Esto implica que esos suelos contienen aún bastantes microorganismos del género *Halomonas* sin caracterizar.

Los cebadores utilizados en la amplificación del gen ARNr 16S fueron diseñados en base a su especificidad para el género *Halomonas*, sin hacer distinciones de grupos metabólicos o de otro tipo dentro del mismo. Como consecuencia, con estos cebadores se pueden detectar tanto microorganismos con capacidad para desnitrificar como sin ella. No obstante, los resultados obtenidos (Tabla 48) muestran que la mayor parte de las bandas se asemejan al gen ribosómico de las especies desnitrificantes *Halomonas desiderata* y *H. ventosae*. El análisis filogenético (Figura 75) confirma su relación con *H. desiderata*. Si atendemos a la filogenia establecida a partir del gen ARNr 16S y mostrada en la Figura 24 de la página 111, por la cual los filotipos que engloban a las especies mencionadas comprenden en su mayoría microorganismos desnitrificantes, es lógico presuponer que las bandas correspondan a bacterias potencialmente desnitrificantes (y aún no caracterizadas) y puesto que hablamos de una mayoría de bandas debemos considerar que éstas representan una fracción importante de los miembros del género *Halomonas* presentes en los hábitats estudiados.

VII.3.4. EMPLEO DEL GEN *NARH* COMO MARCADOR DE LA DIVERSIDAD DE LA POBLACIÓN DESNITRIFICANTE Y NITRATO REDUCTORA DEL GÉNERO *HALOMONAS*

Tal y como se expuso en el apartado VII.2.C.2, tan sólo ha sido posible la amplificación de fragmentos del gen *narH* en la muestra de Fuente de Piedra. Cuando el producto de PCR se corre en un gel en gradiente desnaturizante, se obtienen únicamente dos bandas y de ellas una utilizable. Esta banda presenta una semejanza del 96% con los genes *narH* de *Halomonas maura* y *H. halodenitrificans*.

El escaso número de bandas obtenido para el gen *narH* puede ser paradójico como reflejo de la diversidad real existente. Se ha comprobado que se origina muy poca cantidad de producto de PCR por microorganismo cuando la diversidad general de un ambiente es muy alta, de manera que posteriormente la intensidad de cada banda en un patrón de DGGE puede llegar a ser tan tenue que ni se aprecie (Dar y col., 2005). Teniendo en cuenta que el gen *narH* está ampliamente distribuido y no sólo entre la población desnitrificante sino también entre aquellos microorganismos sólo capaces de respirar sobre nitratos (Zumft, 1997; Gregory y col., 2003), se podría pensar en esta circunstancia como posible explicación, aún cuando nos estemos centrando sólo en el género *Halomonas* y, por tanto, reduciendo la variabilidad genética. Para solventar este problema podríamos concentrar varios productos procedentes de la misma reacción de PCR y posteriormente realizar un DGGE, para partir de una mayor cantidad de amplicón de cada microorganismo.

VII.3. 5. EMPLEO DEL GEN *NIRS* COMO MARCADOR DE LA DIVERSIDAD DE LA POBLACIÓN DESNITRIFICANTE DEL GÉNERO *HALOMONAS*

La diversidad obtenida mediante amplificación de regiones del gen *nirS* específicas del género *Halomonas* va a venir representada por cinco bandas en el caso de la muestra de Rambla Salada y por cuatro para la procedente de Fuente de Piedra. No se observan patrones de migración semejantes en ambos suelos y la posterior secuenciación de las bandas confirma que no hay redundancia de genes *nirS* entre ellos. Por otro lado, la semejanza de estas bandas con las secuencias del gen *nirS* de los microorganismos objeto de estudio es alta, siempre muy superior al porcentaje máximo mostrado por *H. desiderata* con las restantes desnitrificantes del género

Halomonas, que era de un 49,1% con *H. ventosae*. Además, el análisis filogenético observado en la Figura 77 confirma dicha relación.

El gen *nirS* ya ha sido empleado por otras técnicas en estudios ecológicos (Braker y col., 1998, 2000); los resultados expuestos en esta memoria reafirman su utilidad para el rastreo de la población desnitrificante del género *Halomonas*. Además, tal y como se puede observar en la Figura 77, las bandas secuenciadas abarcan varios filotipos, de acuerdo a las agrupaciones obtenidas en base a este gen y que fueron discutidas en el apartado V.3.3 del Estudio Filogenético (Capítulo III). Así, el amplio rango de detección dentro del género *Halomonas* que poseen los cebadores diseñados es una característica también a destacar.

Mediante amplificación del gen *nirS* en las muestras de suelo observamos que existen microorganismos desnitrificantes que se relacionan con especies no detectadas a partir de la secuencia del gen ARNr 16S. Esta ventaja se explica por el hecho mencionado anteriormente de que si una población es minoritaria en un hábitat, el empleo de cebadores cada vez más específicos para ella permitirá ponerla de manifiesto sobre las predominantes, que se amplificarían de forma preferente en caso de usar condiciones más universales (Muyzer y col., 1993; Phillips y col., 2000; Dar y col., 2005). El empleo en un futuro de estos cebadores en distintos hábitats conllevará el enriquecimiento de las bases de datos con genes *nirS* relacionados con miembros de *Halomonas*.

VII.3.6. EMPLEO DEL GEN *NOSZ* COMO MARCADOR DE LA DIVERSIDAD DE LA POBLACIÓN DESNITRIFICANTE DEL GÉNERO *HALOMONAS*

El gen *nosZ* codifica la parte estructural de la óxido nítrico reductasa. Teniendo en cuenta que son muy reducidos el número de microorganismos no desnitrificantes que poseen dicha enzima (Zumft, 1992; 1997), los estudios ecológicos basados en la secuencia del gen *nosZ* resultan muy específicos también para rastrear una población desnitrificante.

En los resultados presentados en el apartado VII.2.C.4 se puede comprobar la especificidad de los cebadores diseñados para amplificar la población desnitrificante del género *Halomonas*, pues aún cuando algunas de las secuencias muestran cierta ambigüedad, el porcentaje

de semejanza con las de los microorganismos objeto de estudio sigue siendo más alto que con las de las especies externas usadas en los estudios filogenéticos (Capítulo III) y con las depositadas en la base de datos GenBank. Los problemas de secuenciación tenidos, que condujeron a secuencias no claras salvo en un caso, podrían ser solventados por clonación en un vector como p-GEM[®]-T de Promega[®].

Conclusiones

IX. CONCLUSIONES

1. La mayoría de las bacterias halófilas desnitrificantes procedentes de nuestra colección de cultivo pertenecen a la especie *Halomonas ventosae* en base a los estudios de taxonomía polifásica llevados a cabo con todas ellas. Las características fenotípicas, quimiotaxonómicas, genotípicas y filogenéticas han permitido la descripción de dos nuevas especies del género *Halomonas*, *H. cerina* y *H. nitratireducens*, constituidas por las cepas R53, SP4 y 15CR la primera, y por la cepa 11S, la segunda.
2. Desde el punto de vista filogenético, existe una clara separación entre las distintas especies desnitrificantes, lo que sugiere un origen evolutivo distinto del proceso de desnitrificación en el género *Halomonas*. Tanto a partir de la secuencia del gen ARNr 16S como de las de los genes funcionales *narH*, *nirS* y *nosZ*, las especies haloalcalófilas desnitrificantes *H. campisalis* como *H. desiderata* forman una agrupación consistente y separada del resto de microorganismos estudiados.
3. Las agrupaciones filogenéticas obtenidas con el gen *narH* son las más similares a las resultantes del gen ribosómico, pudiendo representar una alternativa al mismo en los estudios de filogenia de las especies desnitrificantes del género *Halomonas*.
4. Desde el punto de vista fisiológico encontramos una gran diversidad, manifestada por diferencias en la inducción de la actividad nitrito reductasa, que en general no es inmediata, y se retrasa con respecto a la nitrato reductasa, lo que provoca que el nitrito se acumule durante más o menos tiempo dependiendo del microorganismo. Aunque no existe un patrón definido en función de la fuente de carbono, se puede decir que el citrato es el compuesto donde menor número de microorganismos manifiestan la capacidad de respirar sobre nitrato y nitrito.
5. La amplificación de regiones conservadas del gen *nirS* a partir de muestras de suelo ha permitido detectar una mayor diversidad de microorganismos que la que obtendríamos a partir del gen ribosómico, erigiéndose como herramienta más idónea para los estudios ecológicos de la población desnitrificante del género *Halomonas*.

Bibliografía

XI. BIBLIOGRAFÍA

-Abrams, E.S., Murdaugh, S.E. & Lerman, L.S. 1995. Intramolecular DNA melting between stable helical segments: melting theory and metastable states. *Nucleic Acids Res.* **23**: 2775-2783.

-Adham, S., Gagliardo, P., Boulos, L., Oppenheimer, J. & Trussell, R. 2001. Feasibility of the membrane bioreactor process for water reclamation. *Water Science and Technology.* **43**: 203-209.

-Afshar, S., Kim, C., Monbouquette, H.G. & Schroder, I. 1998. Effect of tungstate on nitrate reduction by the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Appl Environ Microbiol.* **64**: 3004-3008.

-Alefounder, P.R. & Ferguson, S.J. 1982. Electron transport-linked nitrous oxide synthesis and reduction by *Paracoccus denitrificans* monitored with an electrode. *Biochem Biophys Res Commun.* **104**: 1149-1155.

-Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* **215**: 403-410.

-Anderson, J.M. 1974. Nitrogen and phosphorus budgets and the role of sediments in six shallow Danish lakes. *Arch Hydrobiol.* **74**: 528-550.

-Anderson, J.M. 1977. Rates of denitrification of undisturbed sediment from six lakes as a function of nitrate concentration, oxygen and temperature. *Arch Hydrobiol.* **80**: 147-159.

-Antipov, A.N., Sorokin, D.Y., L'Vov, N.P. & Kuenen, J.G. 2003. New enzyme belonging to the family of molybdenum-free nitrate reductases. *Biochem J.* **369**: 185-189.

-Arahal, D.R., Garcia, M.T., Ludwig, W., Schleifer, K.H. & Ventosa, A. 2001a. Transfer of *Halomonas canadensis* and *Halomonas israelensis* to the genus *Chromohalobacter* as *Chromohalobacter canadensis* comb. nov. and *Chromohalobacter israelensis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* **51**: 1443-1448.

-Arahal, D.R., Garcia, M.T., Vargas, C., Canovas, D., Nieto, J.J. & Ventosa, A. 2001b. *Chromohalobacter salexigens* sp. nov., a moderately halophilic species that includes *Halomonas elongata* DSM 3043 and ATCC 33174. *Int J Syst Evol Microbiol.* **51**: 1457-1462.

-Arahal, D.R., Ludwig, W., Schleifer, K.H. & Ventosa, A. 2002a. Phylogeny of the family *Halomonadaceae* based on 23S and 16S rDNA sequence analyses. *Int J Syst Evol Microbiol.* **52**: 241-9.

-Arahal, D.R., Castillo, A.M., Ludwig, W., Schleifer, K.H. & Ventosa, A. 2002b. Proposal of *Cobetia marina* gen. nov., comb. nov., within the family *Halomonadaceae*, to include the species *Halomonas marina*. *Syst Appl Microbiol.* **25**: 207-211.

-Arai, H., Igarashi, Y. & Kodama, T. 1991. Nitrite activates the transcription of the *Pseudomonas aeruginosa* nitrite reductase and cytochrome *c*₅₅₁ operon under anaerobic conditions. *FEBS Lett.* **288**: 227-228.

-Arai H., Igarashi, Y. & Kodama, T. 1995. The structural genes for nitric oxide reductase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta.* **1261**: 279-284.

-Araki, N., Tsukamoto, Y., Nagano, A., Yamaguchi, T. & Harada, H. 2006. Real-time PCR quantification of nitrite reductase (*nirS*) genes in a nitrogen removing fluidized bed reactor. *Water Sci Technol.* **53**: 59-65.

-Argandoña, M., Bejar, V., Quesada, E. & del Moral, A. 2001. Genome size and physical map of *Halomonas maura*, a new moderately halophilic microorganism. International conference on halophilic microorganisms. Comunicación personal.

-Argandoña, M., Martínez-Checa, F., Llamas, I., Arco, Y., Quesada, E. & del Moral, A. 2006. A membrane-bound nitrate reductase encoded by the *narGHJI* operon is responsible for anaerobic respiration in *Halomonas maura*. *Extremophiles.* **10**: 411-9.

-Arias, S., del Moral, A., Ferrer, M.R., 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**: 319-26.

- Bachmann, B.J.** 1990. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol Mol Biol Rev.* **54**: 130-197.
- Baek, S-H. et al.** 2004. Denitrification genes regulate *Brucella* virulence in mice. *J Bacteriol.* **186**: 6025–6031.
- Baeseman, J.L., Smith, R.L. & Silverstein, J.** 2006. Denitrification potential in stream sediments impacted by acid mine drainage: effects of pH, various electron donors, and iron. *Microb Ecol.* **51**: 232-241.
- Baird–Parker, A.C.** 1963. A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests. *J Gen Microbiol.* **30**:409.
- Barak, Y., Tal, Y. & van Rijn, J.** 1998. Light-Mediated Nitrite Accumulation during Denitrification by *Pseudomonas* sp. Strain JR12. *Appl Environ Microbiol.* **64**: 813–817.
- Barak, Y. & van Rijn, J.** 2000. Atypical polyphosphate accumulation by the denitrifying bacterium *Paracoccus denitrificans*. *Appl Environ Microbiol.* **66**: 1209-1212.
- Barnes, H. & Folkard, A.R.** 1951. The determination of nitrites. *Analyst.* **76**: 599.
- Barrit, A. & Thornsberry, C.** 1980. Susceptibility testing: Diffusion test procedures. En: Manual of Clinical Microbiology. Lennette, Haussler and Truant (eds.) A.S.M., Washington, D.C.
- Barritt, M.M.** 1936. The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of α -naphthol. *J Path Bact.* **42**: 441.
- Basaglia, M., Toffanin, A., Baldan, E., Bottegal, M., Shapleigh, J.P. & Casella, S.** 2007. Selenite-reducing capacity of the copper-containing nitrite reductase of *Rhizobium sllae*. *FEMS Microbiol Lett.* **269**: 124-30.
- Barker, P.S. & Dold, P.L.** 1996. Denitrification behavior in biological excess phosphorus removal activated sludge system. *Water Res.* **30**: 769–780.

-Bartnikas, T.B., Tosques, I.E., Laratta, W.P., Shi, J. & Shapleigh, J.P. 1997. Characterization of the nitric oxide reductase-encoding region in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *J. Bacteriol.* **179**: 3534–3540.

-Bastian N.R. y Hibbs J.B. Jr. 1994. Assembly and regulation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase. *Curr Opin Immunol.* **6**: 131-139.

-Bastviken, S.K., Eriksson, P. G., Ekström, A. & Tonderski, K. 2007. Seasonal Denitrification Potential in Wetland Sediments with Organic Matter from Different Plant Species. *Water, Air, & Soil Pollution.* **183**: 25-35.

-Bauer, A.W., Serris, J.C. & Kirby, W.M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardised single disc method. *Am J Clin Path.* **45**: 493-396.

-Baumann, L., Baumann, P., Mandel, M. & Allen, R.D. 1972. Taxonomy of aerobic marine eubacteria. *J Bacteriol.* **110**: 402–429.

-Bazylinski, D.A. & Blakemore, R.P. 1983. Denitrification and Assimilatory Nitrate Reduction in *Aquaspirillum magnetotacticum*. *Appl Environ Microbiol.* **46**: 1118-1124.

-Bell, L.C. & Ferguson, S.J. 1991. Nitric and nitrous oxide reductases are active under aerobic conditions in cells of *Thiosphaera pantotropha*. *Biochem J.* **273**: 423-427.

-Berendes, F., Gottschalk, G., Heine-dobbernack, E., Moore, E.R.B. & Tindall, B.J. 1996. *Halomonas desiderata* sp. nov., a new alkaliphilic, halotolerant and denitrifying bacterium isolated from a municipal sewage works. *Syst Appl Microbiol.* **19**: 158-167.

-Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th. 1994. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P., H.A., Stanley, J.T. y Williams, S.T. (Eds). Williams&Wilkins, Baltimore, USA. Hay otra edición más reciente??

-Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd. Volumen 2: *Proteobacteria*. Parte B: **Gamma-proteobacteria**. 2005. Garrity, G. N.R. (Autor); Krieg, N.R., Brenner, D.J. & Staley, J.R. (Editores). Springer-Verlag New York Inc.

-Berks, B.C., Ferguson, S.J., Moir, J.W. & Richardson, D.J. 1995a. Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochim Biophys Acta*. **1232**:97-173.

-Berks, B.C., Page, M.D., Richardson, D.J., Reilly, A., Cavill, A., Outen, F. & Ferguson, S.J. 1995b. Sequence analysis of subunits of the membrane-bound nitrate reductase from a denitrifying bacterium: the integral membrane subunit provides a prototype for the dihaem electron-carrying arm of a redox loop. *Mol Microbiol*. **15**: 319-31.

-Berks, B.C., Richardson, D.J., Reilly, A., Willis, A.C. & Ferguson, S.J. 1995c. The *napEDABC* gene cluster encoding the periplasmic nitrate reductase system of *Thiosphaera pantotropha*. *Biochem J*. **309**: 983-92.

-Betlach, M.R. & Tiedje, J.M. 1981. Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide during bacterial denitrification. *Appl Environ Microbiol*. **42**: 1074-1084.

-Blackmer, A.M. & Bremner, J.M. 1978. Inhibitory effect of nitrate on reduction of N₂O to N₂ by soil microorganisms. *Soil Biol Biochem*. **10**: 187-191.

-Blaszczyk, M. 1983. Effect of various sources of organic carbon and high nitrite and nitrate concentrations on the selection of denitrifying bacteria. II. Continuous cultures in packed bed reactors. *Acta Microbiologica Polonica* **32**: 65–71.

-Blaszczyk, M. 1993. Effect of Medium Composition on the Denitrification of Nitrate by *Paracoccus denitrificans*. *Appl Environ Microbiol*. **59**: 3951-3953.

-Blasco, F., Dos Santos, J.P., Magalon, A., Frixon, C., Guigliarelli, B., Santini, C.L. & Giordano, G. 1998. *NarJ* is a specific chaperone required for molybdenum cofactor assembly in nitrate reductase A of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. **28**: 435-47.

-Blasco, F., Guigliarelli, B., Magalon, A., Asso, M., Giordano, G. & Rothery, R.A. 2001. The coordination and function of the redox centres of the membrane-bound nitrate reductases. *Cell Mol Life Sci*. **58**: 179-93.

-Bleakley, B.H. & Tiedje, J.M. 1982. Nitrous oxide production by organisms other than nitrifiers or denitrifiers. *Appl Env Microbiol.* **44**: 1342–1348.

-Bloesl, M. & Conrad, R. 1992. Influence of an increased pH on the composition of the nitrate-reducing microbial populations in an anaerobically incubated acidic forest soil. *Syst Appl Microbiol.* **15**: 624-627.

-Bollag, J.M. & Tung, G. 1972. Nitrous oxide release by soil fungi. *Soil Biol Biochem.* **4**: 271–276.

-Bothe, H., Jost, G., Schloter, M., Ward, B.B. & Witzel, K. 2000. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol Rev.* **24**: 673-90.

-Bouchotroch, S., Quesada, E., del Moral, A., Llamas, I. & Bejar, V. 2001. *Halomonas maura* sp. nov., a novel moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* **51**: 1625-32.

-Braker, G., Fesefeldt, A. & Witzel, K.P. 1998. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* **64**: 3769-75.

-Braker, G., Zhou, J., Wu, L., Devol, A.H. & Tiedje, J.M. 2000. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities. *Appl Environ Microbiol.* **66**: 2096-104.

-Braker, G., Ayala-del-Rio, H.L., Devol, A.H., Fesefeldt, A. & Tiedje, J.M. 2001. Community structure of denitrifiers, bacteria, and archaea along redox gradients in Pacific Northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nirS*) and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1893-901.

-Braker, G. & Tiedje, J.M. 2003. Nitric oxide reductase (*norB*) genes from pure cultures and environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* **69**: 3476-83.

- Bremner, J.M. & Shaw, K.** 1958. Denitrification in soil. II. Factors affecting denitrification. *J Agric Sci.* **51**: 40-52.
- Bremner, J.M.** 1977. Role of organic matter in volatilization of sulphur and nitrogen from soils, p. 229-240. In *Soil organic matter studies*, vol. 2. International Atomic Energy Agency, Vienna.
- Brenner, D.J., Fanning, G.R., Rake, A.V. & Johnson, K.E.** 1969. Batch procedure for thermal elution of DNA from hydroxyapatite. *Anal. Biochem.* **28**: 447-459.
- Brettar, I. & Höfle, M.G.** 1993. Nitrous oxide producing heterotrophic bacteria from the water column of the central Baltic: abundance and molecular identification. *Marine Ecology Progress Series.* **94**: 253-265.
- Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J. & Noller, H.F.** 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**: 4801-4805.
- Brycki, B., Seifert, K., Szymańska, K. & Domka, F.** 2000. The Effect of Oxidizing Biocides on desulfurication and denitrification processes. *Polish J Env Studies.* **9**: 363-367.
- Buisson, H., Cote, P., Praderie, M. & Paillard, H.** 1998. The use of immersed membranes for upgrading wastewater treatment plants. *Water Science and Technology.* **37**: 89-95.
- Burland, T.G.** 2000. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods Mol. Biol.* **132**: 71-91.
- Bursakov, S., Liu, M.Y., Payne, W.J., LeGall, J., Moura, I. & Moura, J.J.G.** 1995. Isolation and preliminary characterization of a soluble nitrate reductase from the sulfate reducing organism *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *Anaerobes* **1**: 55-60.
- Bursakov, S.A., Carneiro, C., Almendra, M.J., Duarte, R.O., Caldeira, J., Moura, I. & Moura, J.J.** 1997. Enzymatic properties and effect of ionic strength on periplasmic nitrate reductase (NAP) from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *Biochem Biophys Res Commun.* **239**: 816-822.

-Burth, I., Benckiser, G. & Ottow, J.C.G. 1982. N₂O-Freisetzung aus Nitrit (Denitrifikation) durch ubiquitäre Pilze unter aeroben Bedingungen. *Naturwissenschaften*. **69**: 598–599.

-Butterbach-Bahl, K., Willibald, G. & Papen, H. 2002. Soil core method for direct simultaneous determination of N₂ and N₂O emissions from forest soils. *Plant and Soil*. **240**: 105-116.

-Cabello, P., Roldan, M.D. & Moreno-Vivian, C. 2004. Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. *Microbiology*. **150**: 3527-46.

-Cabrera, A., Aguilera, M., Fuentes, S., Incerti, C., Russell, N.J., Ramos-Cormenzana, A. & Monteoliva-Sanchez, M. 2007. *Halomonas indalinina* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Cabo de Gata, Almeria, southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol*. **57**: 376-380.

-Callies, E. & Mannheim, E. 1978. Classification of the *Flavobacterium-Cytophaga* complex on the basis of respiratory quinones and fumarate respiration. *Int J Syst Bacteriol*. **28**: 14-19.

-Calvo, C., Martínez-Checa, F., Toledo, F.L., Porcel, J. & Quesada, E. 2002. Characteristics of bioemulsifiers synthesised in crude oil media by *Halomonas eurihalina* and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol*. **60**: 347-51.

-Camargo, J.A. & Alonso, A. 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environ Int*. **32**: 831-49.

-Campbell, W.H. 1999. Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology. 1999. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol. Biol*. **50**: 277-303.

-Campbell, W.H. 2001. Structure and function of eukaryotic NAD(P)H:nitrate reductase. *Cell Mol Life Sci*. **58**: 194-204.

-Carter, J.P., Hsaio, Y.H., Spiro, S. & Richardson, D.J. 1995a. Soil and sediment bacteria capable of aerobic nitrate respiration. *Appl Environ Microbiol*. **61**: 2852-8.

-Carter, J.P., Richardson, D.J. & Spiro, S. 1995b. Isolation and characterisation of a strain of *Pseudomonas putida* that can express a periplasmic nitrate reductase. *Arch Microbiol*. **163**: 159-66.

- Casciotti, K.L. & Ward, B.B. 2005. Phylogenetic analysis of nitric oxide reductase gene homologues from aerobic ammonia-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol Ecol.* **52**: 197-205.
- Casella, S., Shapleigh, J.P., Toffanin, A. & Basaglia, M. 2006. Investigation into the role of the truncated denitrification chain in *Rhizobium sulae* strain HCNT1. *Biochem Soc Trans.* **34**: 130-2.
- Castillo, F., Dobao, M.M., Reyes, F., Blasco, R., Roldan, M.D., Gavira, M., Caballero, F.J., Moreno-Vivian, C. & Martinez-Luque, M. 1996. Molecular and Regulatory Properties of the Nitrate Reducing Systems of Rhodobacter. *Curr Microbiol.* **33**: 341-6.
- Castresana, J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* **17**: 540-552.
- Cava, F. & Berenguer, J. 2006. Biochemical and regulatory properties of a respiratory island encoded by a conjugative plasmid in the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Biochem Soc Trans.* **34**: 97-100.
- Cavigelli, M.A. & Robertson, G.P. 2000. The functional significance of denitrifier community composition in a terrestrial ecosystem. *Ecology.* **81**: 1402-1414.
- Cha, R.S. & Tilly, W.G. 1993. Specificity, efficiency and fidelity of PCR. *PCR Methods and Applications*. **3**: 518-529.
- Chelo, I.M., Zé-Zé, L. & Tenreiro, R. 2007. Congruence of evolutionary relationships inside the *Leuconostoc-Oenococcus-Weissella* clade assessed by phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene, dnaA, gyrB, rpoC and dnaK. *Int J Syst Evol Microbiol.* **57**: 276-86.
- Chen, P., Cabrito, I., Moura, J.J., Moura, I. & Solomon, E.I. 2002. Spectroscopic and electronic structure studies of the mu(4)-sulfide bridged tetranuclear Cu(Z) cluster in N(2)O reductase: molecular insight into the catalytic mechanism. *J Am Chem Soc.* **124**: 10497-507.
- Chen, F., Xia, Q. & Ju, L.K. 2003. Aerobic denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* monitored by online NAD(P)H fluorescence. *Appl Environ Microbiol.* **69**: 6715-6722.

- Chêneby, D., Perrez, S., Devroe, C., Hallet, S., Couton, Y., Bizouard, F., Iuretig, G., Germon, J.C. & Philippot, L. 2004. Denitrifying bacteria in bulk and maize-rhizospheric soil: diversity and N₂O-reducing abilities. *Can J Microbiol.* **50**: 469-474.
- Christensen, W.B. 1946. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella*. *J Bacteriol.* **52**: 461-466.
- Clarke, P.H. 1953. Hydrogen sulphide production by bacteria. *J Gen Microbiol.* **8**: 397-407.
- Claus, G. & Kutzner, H.J. 1985. Autotrophic denitrification by *Thiobacillus denitrificans* in a packed bed reactor. *Appl Microbiol Biotechnol.* **22**: 289-296.
- Clauwaert, P., Rabaey, K., Aelterman, P., de Schamphelaire, L., Pham, T.H., Boeckx, P., Boon, N. & Verstraete, W. 2007. Biological denitrification in microbial fuel cells. *Environ Sci Technol.* **41**: 3354-60.
- Clifford, D. & Liu, X. 1993a. Biological denitrification of spent regenerant brine using a sequencing batch reactor. *Water Research.* **27**: 1477-1484.
- Clifford, D. & Liu, X. 1993b. Ion exchange for nitrate removal. *J Am Water Works Assoc.* 135-143.
- Cobet, A.B., Wirsen, C. & Jones, G.E. 1970. The effect of nickel on a marine bacterium, *Arthrobacter marinus* sp. nov. *Journal of General Microbiology.* **62**: 159-169.
- Coenye, T., Gevers, D., Van de Peer, Y., Vandamme, P. & Swings, J. 2005. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiol Rev.* **29**: 147-167.
- Conrad, R. 1996. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiol. Rev.* **60**: 609-640.
- Cook, N., Silverstein, J., Figueroa, L., Cutter, L., Hund, R. & Veydovec, W. 1993. pH control of denitrification of a high nitrate strength industrial wastewater. *Water Environmental Federation, 66th Ann Conf And Exp.*

- Coronado, M.J., Vargas, C., Kunte, H.J., Galinski, E.A., Ventosa, A. & Nieto, J.J.** 1995. Influence of salt concentration on the susceptibility of moderately halophilic bacteria to antimicrobials and its potential use for genetic transfer studies. *Curr. Microbiol.* **31**: 365-371.
- Cote, P., Buisson, H., Pound, C. & Arakaki, G.** 1997. Immersed membrane activated sludge for the reuse of municipal wastewater. *Desalination.* **113**: 189-196.
- Cowan, S.T. & Steel, K.J.** 1993. Manual for the identification of medical bacteria, 3rd edition. Cambridge University Press. Cambridge.
- Coyle, C.L., Zumft, W.G., Kroneck, P.M.H., Korner, H. & Jacob, W.** 1985. Nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas perfectomarina*. Purification and properties of a novel multicopper enzyme. *Eur J Biochem.* **153**: 459-467.
- Coyne, M.S., Arunakumari, A., Averill, B.A. & Tiedje, J.M.** 1989. Immunological identification and distribution of dissimilatory heme cd1 and nonheme copper nitrite reductases in denitrifying bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **55**: 2924-2931.
- de Boer, A.P., van der Oost, J., Reijnders, W.N., Westerhoff, H.V., Stouthamer, A.H. & van Spanning, R.J.** 1996. Mutational analysis of the *nor* gene cluster which encodes nitric-oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*. *Eur J Biochem.* **242**: 592-600.
- de Vries, S. & Schroder, I.** 2002. Comparison between the nitric oxide reductase family and its aerobic relatives, the cytochrome oxidases. *Biochem Soc Trans.* **30**: 662-7.
- de Vries, S., Strampraad, M.J., Lu, S., Moënne-Loccoz, P. & Schröder, I.** 2003. Purification and characterization of the MQH2: NO oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *J Biol Chem.* **278**: 35861-35868.
- del Moral, A., Quesada, E. & Ramos-Cormenzana, A.** 1987. Distribution and types of bacteria isolated from an inland saltern. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* **138**: 59-66.

-Dalsgaard, T., Canfield, D.E., Petersen, J., Thamdrup, B. & Acuña-González, J. 2003. N₂ production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. *Nature*. **422**: 606–608.

-Dar, S.A., Kuenen, J.G. & 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.

-Davidson, E.A., Swank, W.T. & Perry, T.O. 1986. Distinguishing between Nitrification and Denitrification as Sources of Gaseous Nitrogen Production in Soil. *Appl Environ Microbiol*. **52**: 1280-1286.

-Delorme, S., Philippot, L., Edel-Hermann, V., Deulvot, C., Mougel, C. & Lemanceau, P. 2003. Comparative genetic diversity of the *narG*, *nosZ*, and 16S rRNA genes in Fluorescent Pseudomonads. *Appl Environ Microbiol*. **69**: 1004-1012.

-Delwiche, C.C. & Bryan, B. A.. 1976. Denitrification. *Annu Rev Microbiol*. **30**: 241-262.

-Denariáz, G., Payne, W.J. & Le Gall, J. 1989. A halophilic denitrifier, *Bacillus halodenitrificans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*. **39**: 145–151.

-Denmead, O.T., Freney, J.R. & Simpson, J.R. 1979a. Nitrous oxide emission during denitrification in a flooded field. *Soil Sci Soc Am J*. **43**: 716-718.

-Denmead, O.T., Freney, J.R. & Simpson, J.R. 1979b. Studies of nitrous oxide emission from a grass sward. *Soil Sci Soc Am J*. **43**: 726-728.

-Dobson, S.J., James, S.R., Franzmann, P.D. & McMeekin, T.A. 1990. Emended description of *Halomonas halmophila* (NCMB 1971^T). *Int J Syst Bacteriol*. **40**: 462-463.

-Dobson S.J. & Franzmann P.D. 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.

-**Duckworth, A.W., Grant, W.D., Jones, B.E., Meijer, D., Márquez, M.C. & Ventosa, A.** 2000. *Halomonas magadii* sp. nov., a new member of the genus *Halomonas*, isolated from a soda lake of the East African Rift Valley. *Extremophiles*. **4**: 53-60.

-**Dunstan, R.H., Kelley, B.C. & Nicholas, D.J.** 1982. Fixation of dinitrogen derived from denitrification of nitrate in a photosynthetic bacterium, *Rhodospseudomonas sphaeroides* forma sp. denitrificans. *J Bacteriol.* **150**: 100–104.

-**Egly, T. & Zehnder, J.B.** 1994. Phosphate and nitrate removal. *Curr Opin Biotechnol.* **5**: 275–284.

-**Einsle, O. & Kroneck, P.M.** 2004. Structural basis of denitrification. *Biol Chem.* **385**: 875-83.

-**Elazari-Volcani, B.** 1940. Studies on the microflora of the Dead Sea. In Hebrew, English summary. Thesis, Hebrew University Jerusalem.

-**Ellington, M.J., Bhakoo, K.K., Sawers, G., Richardson, D.J. & Ferguson, S.J.** 2002. Hierarchy of carbon source selection in *Paracoccus pantotrophus*: strict correlation between reduction state of the carbon substrate and aerobic expression of the *nap* operon. *J Bacteriol.* **184**: 4767-4774.

-**Etchebehere, C. & Tiedje, J.** 2005. Presence of Two Different Active *nirS* Nitrite Reductase Genes in a Denitrifying *Thauera* sp. from a High-Nitrate-Removal-Rate Reactor. *Appl Environ Microbiol.* **71**: 5642–5645.

-**Euzeby, J.P.** 2007. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr/>

-**Ewing, W.H., Davis, B.R. y Reavis, R.W.** 1957. Phenylalanine and malonate media and their use in enteric bacteriology. *Publ Hlth Lab.* **15**:153.

-**Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.* **39**: 783-791.

-**Felsenstein, J.** 2002. PHYLIP (phylogenetic inference package), version 3,6a. Distributed by the author. Department of Genome Sciences. University of Washington, Seattle, USA.

-**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.

-**Fernández, N., Sierra-Alvarez, R., Field, J.A., Amils, R. & Sanz, J.L.** 2007. Microbial community dynamics in a chemolithotrophic denitrification reactor inoculated with methanogenic granular sludge. *Chemosphere.* Aug 7; [Epub ahead of print].

-**Ferragut, C. & Leclerc, H.** 1976. Etude comparative des methodes de determination du T_m de l'ADN bactérien. *Ann Microbiol.* **127**: 223-235.

-**Festy, B.** 1997. Are nitrogen oxides major atmospheric pollutants?. *Ann Pharm Fr.* **55**(4):143-53.

-**Firestone, M.K., Smith, M.S., Firestone, R.B. & Tiedje, J.M.** 1979. The influence of nitrate, nitrite and oxygen on the composition of the gaseous products of nitrification in soils. *Soil Sci Soc Amer J.* **43**: 1140-1144.

-**Firth, J.R., Edwards, C.** 2000. Denitrification by indigenous microbial populations of river water measured using membrane inlet mass spectrometry. *J Appl Microbiol.* **89**: 123-9.

-**Fischer, S.G. & Lerman, L.S.** 1983. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **80**: 1579-83

-**Flanagan, D.A., Gregory, L.G., Carter, J.P., Karakas-Sen, A., Richardson, D.J., Spiro, S.** 1999. Detection of genes for periplasmic nitrate reductase in nitrate respiring bacteria and in community DNA. *FEMS Microbiol Lett.* **177**: 263-70.

-**Flere, J.M.** 1997. Remediation of nitrate-contaminated water using sulfur and limestoneautotrophic denitrification processes. M. S. thesis, Univ. of Nebraska-Lincoln.

-Flere, J.M. y Zhang, T.C. 1999. Nitrate removal with sulfur-limestone autotrophic denitrification processes. *J Environ Eng.* **125**: 721-729.

-Franzmann, P.D., Burton, H.R. & McMeekin, T.A. 1987. *Halomonas subglaciescola*, a new species of halotolerant bacteria isolated from Antarctica. *Int J Syst Bacteriol.* **37**, 27-34.

-Franzmann, P.D., 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.

-Frazier, W.C. 1926. A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. *J Infect Dis.* **39**; 302.

-Frunzke, K. & Zumft, W.G. 1986. Inhibition of nitrous-oxide respiration by nitric oxide in the denitrifying bacterium *Pseudomonas perfectomarina*. *Biochim Biophys Acta.* **852**: 119–125.

-Frunzke, K. & Meyer, O. 1990. Nitrate respiration, denitrification, and utilization of nitrogen sources by aerobic carbon monoxide-oxidizing bacteria. *Arch Microbiol.* **154**: 168–174.

-Fuller, A. T. & Maxted, W. R. 1939. The production of hemolysin and peroxide by haemolytic streptococci in relation to the non-haemolytic variants of group A. *J Pathol Bacteriol.* **49**: 83-94.

-Gamble, T.N., Betlach, M.R. & Tiedje, J.M. 1977. Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. *Appl Environ Microbiol.* **33**: 926-39.

-Ganguly, S. & Jana, B.B. 2002. Cadmium induced adaptive responses of certain biogeochemical cycling bacteria in an aquatic system. *Water Res.* **36**: 1667-76.

-Garbeva, P., Baggs, E.M. & Prosser, J.I. 2007. Phylogeny of nitrite reductase (*nirK*) and nitric oxide reductase (*norB*) genes from *Nitrosospora* species isolated from soil. *FEMS Microbiol Lett.* **266**: 83-9.

-Garcia, M.T., Mellado, E., Ostos, J.C. & Ventosa, A. 2004. *Halomonas organivorans* sp. nov., a moderate halophile able to degrade aromatic compounds. *Int J Syst Evol Microbiol.*, **54**: 1723-1728.

-Garriga, M., Ehrmann, M.A., Arnau, J., Hugas, M. & Vogel, R.F. 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.

-Gauthier, M.J., Lafay, B., Christen, R., Fernandez, L., Acquaviva, M., Bonin, P. & Bertrand, J.C. 1992. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol.* **42**: 568-576.

-Gayon, U. & Dupetit, G. 1886. Recherches sur la reduction des nitrates par les infiniment petits. Mem. Sot. Sci. Phys. Nat. Bordeaux Ser. 3. 2: 201-307. Mem. *Soc Sci Phys Nat. Bordeaux Ser.* **3**: 201-307.

-Glass, C., Silverstein, J. & Oh, J. 1997. Inhibition of denitrification in activated sludge by nitrite. *Water Environment Research.* **69**: 1086-1093.

-Glass, C. & Silverstein, J. 1998a. Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation. *Water Research.* **32**: 831-839.

-Glass, C. & Silverstein, J. 1998b. Denitrification of high-nitrate, high-salinity wastewater. *Water Research.* **33**: 223-229.

-Glockner, A.B., Jüngst, A. & Zumft, W.G. 1993. Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in a mutationally cytochrome *cd₁*-free background (NirS-) of *Pseudomonas stutzeri*. *Arch Microbiol.* **160**: 18-26.

-González, P.J., Correia, C., Moura, I., Brondino, C.D. & Moura, J.J. 2006. Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. *J Inorg Biochem.* **100**: 1015-23.

-Goodfellow, M. & O'Donnell, A.G. 1993. Roots of bacterial systematics. En: Handbook of New Bacterial Systematics. Goodfellow, M. y O'Donnell, A.G. (eds.), pp. 3-54. Academic Press Ltd., London.

-Goodfellow, M., Manfio, G.P. & Chun, J. 1997. Towards a practical species concept for cultivable bacteria. En: Species: The Units of Biodiversity (Claridge, M.F. y Dawah, H.A., eds.), pp. 25-59. Chapman and Hall, London.

-Gordon, R.E. & Smith, M.M. 1953. Rapidly growing, acid-fast bacteria. I. Species' descriptions of *Mycobacterium phlei* Lehmann and Neumann and *Mycobacterium smegmatis* (Trevisan) Lehmann and Neumann. *J Bact.* **66**: 41.

-Goregues, C.M., Michotey, V.D. & Bonin, P.C. 2005. Molecular, biochemical, and physiological approaches for understanding the ecology of denitrification. *Microb Ecol.* **49**: 198-208.

-Greenberg, E.P. & Becker, G.E. 1977. Nitrous oxide as end product of denitrification by strains of fluorescent pseudomonads. *Can J Microbiol.* **23**: 903-907.

-Gregory, L.G., Bond, P.L., Richardson, D.J. & Spiro, S. 2003. Characterization of a nitrate-respiring bacterial community using the nitrate reductase gene (*narG*) as a functional marker. *Microbiology.* **149**: 229-37.

-Grimont, P.A. 1988. Use of DNA reassociation in bacterial classification. *Can J Microbiol.* **34**: 541-6.

-Groffman, P.M., Altabet, M.A., Böhlke, J.K., Butterbach-Bahl, K., David, M.B., Firestone, M.K., Giblin, A.E., Kana, T.M., Nielsen, L.P. & Voytek, M.A. 2006. Methods for measuring denitrification: diverse approaches to a difficult problem. *Ecol Appl.* **16**: 2091-122.

-Guo, J., Zhou, J., Wang, D., Tian, C., Wang, P. & Uddin, M.S. 2007. A novel moderately halophilic bacterium for decolorizing azo dye under high salt condition. *Biodegradation*. [Epub ahead of print].

-Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J.Mol. Biol.* **166**: 557-580.

-Hansen, E. W. 1971. Correlation of fatty acid composition with thermal resistance of *E. coli*. *Dan Tidsskr Farm.* **45**: 339-344.

-Hart, L.T., Larson, A.D., & McCleskey, C.S. 1965. Denitrification by *Corynebacterium nephridii*. *J Bacteriol.* **89**: 1104-1108.

-**Hastings, E.G.** 1903. Milchagar als Medium zur Demonstration der Erzeugung proteolytischer Enzyme. *Zentbl. Bakt. ParasitKde Abt. II.* **10**; 384.

-**Hastings, E.G.** 1904. The action of various classes of bacteria on casein as shown by milk-agar plates. *Zentbl. Bakt. ParasitKde Abt. II.* **12**; 590.

-**Hebert, A.M. & Vreeland, R.H.** 1987. Phenotypic comparison of halotolerant bacteria: *Halomonas halodurans* sp. nov., nom. rev., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 347-350.

-**Heylen K., Gevers D., Vanparys B., Wittebolle L., Geets J., Boon N. & De Vos P.** 2006. The incidence of *nirS* and *nirK* and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers. *Environ Microbiol.* **8**: 2012-2021.

-**Heiss, B., Frunzke, K. & Zumft, W.G.** 1989. Formation of the N-N bond from nitric oxide by a membrane-bound cytochrome *bc* complex of nitrate-respiring (denitrifying) *Pseudomonas stutzeri*. *J Bacteriol.* **171**: 3288-3297.

-**Hendriks, J., Oubrie, A., Castresana, J., Urbani, A., Gemeinhardt, S. & Saraste, M.** 2000. Nitric oxide reductases in bacteria. *Biochim Biophys Acta.* **1459**: 266-273.

-**Heuer, H. & Smalla, K.** 1997. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities, p. 353-373. In J. D. van Elsas, E. M. H. Wellington, and J. T. Trevors (ed.), *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.

-**Heyrman, J., Balcaen, A., De Vos, P. & Swings, J.** 2002. *Halomonas muralis* sp. nov., isolated from microbial biofilms colonizing the walls and murals of the Saint-Catherine chapel (Castle Herberstein, Austria). *Int J Syst Evol Microbiol.* **52**: 2049-2054.

-**Hill, K.E. & Wharton, D.C.** 1978. Reconstitution of the apoenzyme of cytochrome oxidase from *Pseudomonas aeruginosa* with heme *d₁* and other heme groups. *J Biol Chem.* **253**: 489-495.

-**Hill, A.R. & Cardaci, M.** 2004. Denitrification and Organic Carbon Availability in Riparian Wetland Soils and Subsurface Sediments. *Soil Sci Soc Am. J.* **68**: 320-325.

- Hille, R. 1996. The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chem. Rev.* **96**: 2757-2816.
- Hiraishi, A. & Khan, S.T. 2003. Application of polyhydroxyalkanoates for denitrification in water and wastewater treatment. *Appl Microbiol Biotechnol.* **61**: 103-109.
- Hochstein, L.I. & Tomlinson, G.A. Denitrification by extremely halophilic bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 1985: **27**: 329-31.
- Hochstein, L.I. & Lang, F. 1991. Purification and properties of a dissimilatory nitrate reductase from *Haloferax denitrificans*. *Arch Biochem Biophys.* **288**: 380-385.
- Householder, T.C., Fozo, E.M., Cardinale, J.A. & Clark, V.L. 2000. Gonococcal nitric oxide reductase is encoded by a single gene, *norB*, which is required for anaerobic growth and is induced by nitric oxide. *Infect Immun.* **68**: 5241-5246.
- Hu, B., Zheng, P., Li, J., Xu, X. & Jin, R. 2006. Identification of a denitrifying bacterium and verification of its anaerobic ammonium oxidation ability. *Sci China C Life Sci.* **49**: 460-466.
- Hugenholtz, P. & Pace, N.R. 1996. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends Biotechnol.* **14**: 190-197.
- Hutter, B. & Dick, T. 1999. Up-regulation of *narX*, encoding a putative 'fused nitrate reductase' in anaerobic dormant *Mycobacterium bovis* BCG. *FEMS Microbiol Lett.* **178**: 63-69.
- Huval, J.H., Latta, R., Wallace, R., Kushner, D.J. & Vreeland R.H. 1995. Description of two new species of *Halomonas*: *Halomonas israelensis* sp. nov. and *Halomonas canadensis* sp. nov. *Can J Microbiol.* **41**: 1124-1131.
- Hyman, M.R., Seefeldt, L.C., Morgan, T.V., Arp, D.J. & Mortenson, L.E. 1992. Kinetic and spectroscopic analysis of the inactivating effects of nitric oxide on the individual components of *Azotobacter vinelandii* nitrogenase. *Biochemistry* **31**: 2947-2955.
- Ilies, P. & Mavinic, D.S. 2001. The effect of decreased ambient temperature on the biological nitrification and denitrification of a high ammonia landfill leachate. *Water Res.* **35**: 2065-2072.

-**Imhoff, J.F.** 2001. True marine and halophilic anoxygenic phototrophic bacteria. *Arch Microbiol.* **176**: 243-54.

-**Jaccard, P.** 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vandoise Sci. Nat.* **44**: 223-270.

-**James, S.R., Dobson, S.J., Franzmann, P.D. & McMeekin, T.A.** 1990. *Halomonas meridiana*, a new species of extremely halotolerant bacteria isolated from Antarctic saline lakes. *Syst Appl Microbiol.* **13**: 270-277.

-**Jeffries, C.D., Holtman, D.F. & Guse, D.G.** 1957. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. *J Bacteriol.* **70**: 591.

-**Jensen, R.A.** 1985. Biochemical pathways in prokaryotes can be traced backward through evolutionary time. *Mol Biol Evol.* **2**: 92-108.

-**Jeon, C.O., Lim, J.M., Lee, J.R., Lee, G.S., Park, D.J., Lee, J.C., Oh, H.W. & Kim, C.J.** *Halomonas kribbensis* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol.* En prensa.

-**Jetten, M.S., Logemann, S., Muyzer, G., Robertson, L.A., de Vries S., van Loosdrecht, M.C. & Kuenen, J.G.** 1997. Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Antonie van Leeuwenhoek.* **71**: 75-93.

-**Jetten, M.S., Cirpus, I., Kartal, B., van Niftrik, L., van de Pas-Schoonen, K.T., Slikers, O., Haaijer, S., van der Star, W., Schmid, M., van de Vossenberg, J., Schmidt, I., Harhangi, H., van Loosdrecht, M, Gijs Kuenen, J, Op den Camp, H. & Strous, M.** 2005. 1994-2004: 10 years of research on the anaerobic oxidation of ammonium. *Biochem Soc Trans.* **33**: 119-23.

-**Johnston, D.W., Holding, A.J. & McCluskie, J.E.** 1974. Preliminary comparative studies on denitrification and methane production in Loch Leven, Kinross, and other freshwater lakes. *Proc R Soc Edinburgh Ser. B* **74**: 123-133.

- Jones, A.M., Hollocher, T.C. & Knowles, R. 1992. Nitrous oxide reductase of *Flexibacter canadensis*: a unique membrane-bound enzyme. *FEMS Microbiol Lett.* **92**: 205–209.
- Jorgensen, K.S. & Pauli, A.S.L. 1995. Polyphosphate accumulation among denitrifying bacteria in activated sludge. *Anaerobe* **1**: 161–168.
- Ju, L.K., Chen, F. & Xia, Q. 2005. Monitoring microaerobic denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* by online NAD(P)H fluorescence. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **32**: 622-8.
- Judo, M.S., Wedel, A.B. & Wilson, C. 1998. Stimulation and suppression of PCR-mediated recombination. *Nucleic Acids Res.* **26**: 1819-25.
- Jukes, T.H. & Cantor, C.R. 1969. Evolution of protein molecules. En: Mammalian Protein Metabolism, Munro, H. N. Ed. pp. 21-132. Boca Raton: Academic Press.
- Jungst, A. Braun, C. & Zumft, W.G. 1991. The *nirSTBM* region coding for cytochrome *cd₁*-dependent nitrite respiration of *Pseudomonas stutzeri* consists of a cluster of mono-, di- and tetraheme proteins, *FEBS Lett.* **279**: 205– 209.
- Ka, J.O., Urbance, J., Ye, R.W., Ahn, T.Y. & Tiedje, J.M. 1997. Diversity of oxygen and N-oxide regulation of nitrite reductases in denitrifying bacteria *FEMS Microbiol Lett.* **156**: 55-60.
- Kalendar, R. 2007. FastPCR: a PCR primer and probe design and repeat sequence searching software with additional tools for the manipulation and analysis of DNA and protein. (www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm).
- Kaye, J.Z. & Baross, J.A. 2000. High incidence of halotolerant bacteria in Pacific hydrothermal-vent and pelagic environments. *FEMS Microbiol Ecol.* **32**: 249-260.
- Kaye, J.Z., Márquez, M.C., Ventosa, A. & Baross, J.A. 2004. *Halomonas neptunia* sp. nov., *Halomonas sulfidaeris* sp. nov., *Halomonas axialensis* sp. nov. and *Halomonas hydrothermalis* sp. nov.: halophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal-vent environments. *Int J Syst Evol Microbiol.* **54**: 499-511.

-Kim, J.K., Park, K.J., Cho, K.S., Nam, S.W., Park, T.J. & Bajpai, R. 2005. Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains. *Bioresour Technol.* **96**: 1897-906.

-Kim, K.K., Jin, L., Yang, H.C. & Lee, S.T. 2007. *Halomonas gomseomensis* sp. nov., *Halomonas janggokensis* sp. nov., *Halomonas salaria* sp. nov. and *Halomonas denitrificans* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from saline water. *Int J Syst Evol Microbiol.* **57**: 675-81.

-Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**: 111-120.

-Kimura, M. 1983. The Neutral Theory of Molecular Evolution (Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK).

-King, E.O., Ward, M.K. & Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med.* **44**: 301.

-Knowles, R. 1982. Denitrification. *Microbiol Rev.* **46**: 43-70.

-Knowles, R. 1996. Denitrification: microbiology and ecology. *Life Support Biosph Sci.* **3**: 31-4.

-Kobayashi, M., Matsuo, Y., Takimoto, A., Suzuki, S., Maruo, F. & Shoun, H. 1996. Denitrification, a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondrion. *J Biol Chem.* **271**: 16263-7.

-Koenig, A. & Liu, L.H. 2004. Autotrophic denitrification of high-salinity wastewater using elemental sulfur: batch tests. *Wat Environ Res.* **76**: 37-46.

-Koike, I. & Hattori, A. 1975. Growth yield of a denitrifying bacterium, *Pseudomonas denitrificans*, under aerobic and denitrifying conditions. *J Gen Microbiol.* **88**: 1-10.

-Komada, T., Shimada, K. & Mori, T. 1969. Studies on anaerobic biphasic growth of a denitrifying bacterium, *Pseudomonas stutzeri*. *Plant Cell Physiol.* **88**: 855-865.

-Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P. & Winn, W.C. 1999. Diagnóstico microbiológico, 5ª ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina.

-**Körner, H. & Zumft, W. G.** 1989. Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*. *Appl Environ Microbiol.* **55**: 1670–1676.

-**Korner, H. & Mayer, F.** 1992. Periplasmic location of nitrous oxide reductase and its apoform in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. *Arch Microbiol.* **157**: 218-22.

-**Kortstee, G.J.J., Appeldoorn, K.J., Bonting, C.F.C., van Niel, E.W.J. & van Veen, H.W.** 1994. Biology of polyphosphate-accumulating bacteria involved in enhanced biological phosphorus removal. *FEMS Microbiol Rev.* **15**: 137-153.

-**Kortstee, G.J.J., Appeldoorn, K.J., Bonting, C.F.C., van Niel, E.W.J. & van Veen, H.W.** 2000. Recent developments in the biochemistry and ecology of enhanced biological phosphorus removal. *Biochemistry (Mosc).* **65**: 332-40

-**Koser, S.A.** 1923. Utilization of the salts of organic acids by the colon-aerogenes group. *J Bacteriol.* **8**: 493-520.

-**Kovacs, N.** 1928. Eine vereinfachte Methode zum Nachweiss der Indolbildung durch Bakterien. *Z ImmunForsch Exp Ther.* **55**: 311-314.

-**Kovacs, N.** 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature (London).* **178**: 703.

-**Kucera, I., Dadák, V. & Dobrý, R.** 1983. The distribution of redox equivalents in the anaerobic respiratory chain of *Paracoccus denitrificans*. *Eur J Biochem.* **130**: 359-64.

-**Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M.** 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**: 150-163.

-**Kushner, D.J.** 1978. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. En: *Microbial life in extreme environments*. pp. 317–368. D. J. Kushner (ed.), Academic Press, Ltd., London, United Kingdom.

-Kushner, D.J. & Kamekura, M. 1988. Physiology of halophilic eubacteria. In Halophilic Bacteria. Rodriguez-Valera (ed.). CRC Press, Boca Raton, pp. 109-138.

-Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., Garcia-Valdés, E. & Norberto J. Palleroni. 2006. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiol Mol Biol Reviews*. **70**: 510-547.

-Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115–148. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester, UK: Wiley.

-Lapage, S.P. & Bacomb, S. 1968. Use of selenite reduction in bacterial classification. *J Appl Bacteriol*. **31**: 568-580.

-Larpent, J.P. & Larpent-Gourgand, M. 1957. Mémento Technique de microbiologie. Technique et Documentation, Paris.

-Lashof, D.A. & Ahuja, D.R. 1990. Relative Contributions of Greenhouse Gas Emissions to Global Warming. *Nature*. **344**: 529-531.

-Lawrence, J.G. & Ochman, H. 1997. Amelioration of bacterial genomes: rates of change and exchange. *J Mol Evol*. **44**: 383-97.

-Lawyer, F.C., Stoffel, S., Saiki, R.K., Myambo, K., Drummond, R. & Gelfand, D.H. 1989. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J Biol Chem*. **264**: 6427-37.

-Lee, J.C., Jeon, C.O., Lim, J.M., Lee, S.M., Lee, J.M., Song, S.M., Park, D.J., Li, W.J. & Kim, C.J. 2005. *Halomonas taeanensis* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*. **55**: 2027-2032.

-Leifson, E. 1963. Determination of carbohydrate metabolism of marine bacteria. *J. Bacteriol*. **85**: 1183-1184.

-Lim, J.M., Yoon, J.H., Lee, J.C., Jeon, C.O., Park, D.J., Sung, C. & Kim, C.J. 2004. *Halomonas koreensis* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol.* **54**: 2037-2042.

-Lin, J.T. & Stewart, V. 1998. Nitrate assimilation by bacteria. *Adv Microb Physiol.* **39**: 1-30, 379.

-Lind, E. & Ursing, J. 1986. Clinical strains of *Enterobacter agglomerans* (Synonyms, *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae*) identified by DNA-DNA hybridization. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand. Sect B* **94**: 205-213.

-Linne von Berg, K.H. & Bothe, H. 1992. The distribution of denitrifying bacteria in soils monitored by DNA-probing. *FEMS Microbiology Letters* **86**: 331-340.

-Liu X.J., Chen, F. & Jiang, Y. 2003. Differentiation of *Nostoc* flagelliforme and its neighboring species using fatty-acid profiling as a chemotaxonomic tool. *Curr Microbiol.* **47**: 467-74.

-Logan, N.A. 1994. Blackwell Scientific Publications. London.

-Lorrain, M.J., Tartakovsky, B., Peisajovich-Gilkstein, A. & Guioti, S.R. 2004. Comparison of different carbon sources for ground water denitrification. *Environ Technol.* **25**: 1041-9.

-Lowe, G.H. 1962. The rapid detection of lactose fermentation in paracolon organisms by the demonstration of β -D-galactosidase. *J Med Lab Technol.* **19**: 21.

-Ludwig, W. & Schleifer, K. H. 1995. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Rev.* **15**: 155-173.

-Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M. & Schleifer, K. H. (1998). Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**: 554-568.

-Ludwig, W. & Schleifer, K.H. 1999. Phylogeny of Bacteria beyond the 16S r RNA standard. *ASM News.* **65**: 752-757.

-Ludwig, W. & Klenk, H.P. 2001. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, pp. 49-65. Editado por D. R. Boone, R. W. Castenholz & G. M. Garrity. New York: Springer.

-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 VanLeeuwenhoek*. **89**: 395-403.

-Lloyd, D., Boddy, L. & Davies, K.J.P. 1987. Persistence of bacterial denitrification capacity under aerobic conditions: The rule rather than the exception. *FEMS Microbiology Letters*. **45**: 185-190.

-MacConkey, A.T. 1908. Bile salt media and their advantages in some bacteriological examinations. *J Hyg Camb*. **8**: 322.

-MacMicking, J. D., Nathan, C., Hom, G., Chartrain, N., Fletcher, D.S., Trumbauer, M., Stevens, K., Xie, Q.W., Sokol, K., Hutchinson, N., Chen, H. & Mudgett, J.S. 1995. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* **81**: 641-650.

-Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J. 2004. *Biología de los microorganismos*, 10ª ed. Prentice Hall Iberia, Madrid.

-Madigan, M.T. & Oren, A. 1999. Thermophilic and halophilic extremophiles. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 265-269.

-Manconi, I., van der Maas, P. & Lens, P. 2006. Effect of copper dosing on sulfide inhibited reduction of nitric and nitrous oxide. *Nitric Oxide*. **15**: 400-407.

-Mansilla, M.C., Cybulski, L.E., Albanesi, D. & de Mendoza, D. 2004. Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. *J Bacteriol.* **186**: 6681-6688.

-Marazioti, C., Kornaros, M., Lyberatos, G. 2003. Kinetic modeling of a mixed culture of *Pseudomonas denitrificans* and *Bacillus subtilis* under aerobic and anoxic operating conditions. *Water Res.* **37**: 1239-1251.

-**Marmur, J.** 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol.* **3**: 207-208.

-**Marmur, J. & Doty, P.** 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J Mol Biol.* **5**: 109-118.

-**Marshall, K.C. & Goodman, A.E.** 1994. Effects of adhesion on microbial cell physiology. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **2**: 1-7.

-**Martinez-Canovas, M.J., Mata, J.A., Bejar, V. & Quesada, E.** 2002. Descripción de una nueva especie del género *Halomonas* productora de exopolisacárido. Comunicación presentada a la IV Reunión de Microbiología del medio acuático de la SEM. Sevilla.

-**Martinez-Canovas, M.J.** 2002. Selección de cepas extremófilas productoras de exopolisacáridos de interés biotecnológico. Estudio taxonómico de los microorganismos aislados y estudio de sus EPS. Tesis doctoral.

-**Martinez-Canovas, M.J., Quesada, E., Llamas, I. & Bejar, V.** 2004a. *Halomonas ventosae* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* **54**: 733-7.

-**Martinez-Canovas, M.J., Quesada, E., Martinez-Checa, F. & Bejar, V.** 2004b. A taxonomic study to establish the relationship between exopolysaccharide-producing bacterial strains living in diverse hypersaline habitats. *Curr. Microbiol.* **48**: 348-53.

-**Martinez-Canovas, M.J., Bejar, V., Martinez-Checa, F. & Quesada, E.** 2004c. *Halomonas anticariensis* sp. nov., from Fuente de Piedra, a saline-wetland wildfowl reserve in Málaga, southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol.* **54**: 1329-1332.

-**Martinez-Canovas, M.J., Bejar, V., Martinez-Checa, F., Paez, R. & Quesada, E.** 2004d. *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-Canovas, M.J., Quesada, E., Martínez-Checa, F., del Moral, A. & Bejar, V. 2004e. *Salipiger mucescens* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium isolated from hypersaline soil, belonging to the alpha-Proteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol.* **54**: 1735-40.

-Martínez-Checa, F., Bejar, V., Martínez-Canovas, M.J., Llamas, I. & Quesada, E. 2005a. *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., Bejar, V., Llamas, I., Del Moral, A. & Quesada, E. 2005b. *Alteromonas hispanica* sp. nov., a polyunsaturated-fatty-acid-producing, halophilic bacterium isolated from Fuente de Piedra, southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol.* **55**: 2385-90.

-Martínez-Checa, F., Quesada, E., Martínez-Canovas, M.J., Llamas, I. & Bejar, V. 2005c. *Palleronia marisminoris* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium belonging to the 'Alphaproteobacteria', isolated from a saline soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* **55**: 2525-30.

-Martínez-Checa, F., Toledo, F.L., 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**: 3130-5.

-Mata, J.A., Martínez-Canovas, J., Quesada, E. & Bejar, V. 2002. A detailed phenotypic characterisation of the type strains of *Halomonas* species. *Syst Appl Microbiol.* **25**: 360-75.

-Maturrano, L., Valens-Vadell, M., Rosselló-Mora, R. & Antón, J. 2006. *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.

-MacEwan, A.G., Greenfield, A.J., Wetzstein, H.G., Jackson, J.B. & Ferguson, S.J. 1985. Nitrous oxide reduction by members of the family *Rhodospirillaceae* and the nitrous oxide reductase of *Rhodopseudomonas capsulata*. *J Bacteriol.* **164**: 823-830.

-Matsubara, T. 1971. Studies on denitrification. XIII. Some properties of the N₂O-anaerobically grown cell. *J Biochem. (Tokyo)*. **69**: 991-1001.

-**Matthias, A.D., Blackmer, A.M. & Bremner, J. M.** 1980. A simple chamber technique for field measurement of emissions of nitrous oxide from soils. *J Environ Qual.* **9**: 251-256.

-**McFeters, G.A., Egli, T., Wilberg, E. & colaboradores.** 1990. Activity and adaptation of nitrilotriacetate (NTA)-degrading bacteria: Field and laboratory studies. *Water Research* **24**: 875-881.

-**Meiberg, J.B., Bruinenberg, M.P.M. & Harder, W.** 1980. Effect of dissolved oxygen tension on the metabolism of methylated amines in *Hyphomicrobium X* in the absence and presence of nitrate: Evidence for aerobic denitrification. *Journal of General Microbiology.* **120**: 453-463.

-**Mellado, E., Moore, E.R.B., Nieto, J.J. & 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., Moore, E. R. B., Nieto, J. J. & 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., Moore, E.R.B., Nieto, J.J. & Ventosa, A.** 1996. Analysis of 16S rRNA gene sequences of *Vibrio costicola* strains: description of *Salinivibrio costicola* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* **46**: 817-821.

-**Mensinga, T.T., Speijers, G.J. & Meulenbelt, J.** 2003. Health implications of exposure to environmental nitrogenous compounds. *Toxicol Rev.* **22**: 41-51.

-**Merchant, R., Pooley, H.M. & Karamata, D.** 1995. A periplasm in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **177**: 6176-83.

-**Mergel, A., Schmitz, O., Mallmann, T. & Bothe, H.** 2001. Relative abundance of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in layers of a forest soil. *FEMS Microbiol Ecol.* **36**: 33-42.

-Mesa, S., Göttfert, M. & Bedmar, E.J. 2001. The *nir*, *nor*, and *nos* denitrification genes are dispersed over the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. *Arch Microbiol.* **176**: 136-42.

-Mesa, S., Velasco, L., Manzanera, M.E., Delgado, M.J. & Bedmar, E.J. 2002. Characterization of the *norCBQD* genes, encoding nitric oxide reductase, in the nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiology.* **148**: 3553-60.

-Mycielski, R., Blaszczyk, M., Jackowska, A. & Olkowska, H. 1983. Denitrification of high concentrations of nitrites and nitrates in synthetic medium with different sources of organic carbon. II. Ethanol. *Acta Microbiol Pol.* **32**: 381-8.

-Moon, H.S., Chang, S.W., Nam, K., Choe, J. & Kim, J.Y. 2006. Effect of reactive media composition and co-contaminants on sulfur-based autotrophic denitrification. *Environ Pollut.* **144**: 802-7.

-Moraine, R.A. & Rogovin, P. 1966. Kinetics of polysaccharide B-1459 fermentation. *Biotechnol Bioengin.* **8**: 511-524.

-Moreira, D. & Philippe, H. 2000. Molecular phylogeny: pitfalls and progress. *Int Microbiol.* **3**: 9-16.

-Moreno-Vivian, C., Cabello, P., Martinez-Luque, M., Blasco, R. & Castillo, F. 1999. Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases *J Bacteriol.* **181**: 6573-84.

-Mormile, M.R., Romine, M.F., Garcia, M.T., Ventosa, A., Bailey, T.J. & Peyton, B.M. 1999. *Halomonas campisalis* sp. nov., a denitrifying, moderately haloalkaliphilic bacterium. *Syst Appl Microbiol.* **22**: 551-558.

-Mosier, A.R. 1980. Acetylene inhibition of ammonium oxidation in soil. *Soil Biol Biochem.* **12**: 443-444.

-Muller, V. & Oren, A. 2003. Metabolism of chloride in halophilic prokaryotes. *Extremophiles.* **7**: 261-266.

-Mütze, B. 1963. Der einfluss des lichtetes auf *Micrococcus denitrificans* Beijerinck. *Arch Mikrobiol.* **46**: 402–408.

-Muyzer, G., de Waal, E.C. & Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* **59**: 695-700.

-Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schäfer, H. & Wawer, C. 1998. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. En *Molecular Microbial Ecology Manual* (A.D.L.Akkermans, J.D. van Elsas y F.J. de Bruijn, Eds), pp. 1-27. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (Holanda).

-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**: 127-41.

-Myers, R.M., Fischer, S.G., Lerman, L.S. & Maniatis, T. 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **13**: 3131-45.

-Napier, J.M. Recovery and Disposal of Nitrate Wastes. En: Rep. No Y/DZ-457, Oak Ridge Y-12 Plant, Oak Ridge, TN.

-Nathan, C.F. & Hibbs, J.B. Jr. 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol.* **3**: 65-70.

-Nei, M. & Kumar, S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.

-Nittayajarn, A. & Baker, D.D. 2005. Methods for the quantification of *Frankia* cell biomass *Plant and Soil.* **118**: 199-204.

-Noda, N., Yoshie, S., Miyano, T., Tsuneda, S., Hirata, A. & Inamori, Y. 2002. PCR-DGGE analysis of denitrifying bacteria in a metallurgic wastewater treatment process. *Water Sci Technol.* **46**: 333-6.

-Nogales, B., Timmis, K.N., Nedwell, D.B. & Osborn, A.M. 2002. Detection and diversity of expressed *denitrification genes in estuarine sediments after reverse transcription-PCR amplification from mRNA*. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 5017-25.

-O'Hara, G.W. & Daniel, R.M. 1985. Rhizobial denitrification: a review. *Soil Biol Biochem.* **7**: 1-9.

-O'Toole, G.A. & Kolter, R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol.* **30**: 295-304.

-Olsen, I. 1990. Chemotaxonomy of yeasts. *Acta Odontol. Scand.* **48**: 19-25.

-Olsen, G.J., Woese, C.R. & Overbeek, R. 1994a. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J Bacteriol.* **176**: 1-6.

-Olsen, I. 1994b. Chemotaxonomy of Bacteroides: a review. *Acta Odontol. Scand.* **52**: 354-67.

-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.

-Oren, A. & Gurevich, P. 1994. Production of D-lactate, acetate, and pyruvate from glycerol in communities of halophilic archaea in the Dead Sea and in saltern crystallizer ponds. *FEMS Microbiol Ecol.* **14**: 147-156.

-Oren, A. 1995. Uptake and turnover of acetate in hypersaline environments. *FEMS Microbiol Ecol.* **18**: 75-84.

-Oren, A. 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev.* **63**: 334-48.

-Otani, Y., Hasegawa, K. & Hanaki, K. 2004. Comparison of aerobic denitrifying activity among three cultural species with various carbon sources. *Water Sci Technol.* **50**: 15-22.

-Owen, R.J. & Hill, L.R. 1979. The estimation of base compositions, base pairing and genome size of bacterial deoxyribonucleic acids. In *Identification Methods for Microbiologists*, 2nd edn, pp.277-296. Edited by F.A. Skinner and D.W. Lovelock, London: Academic Press.

-Owen, R.J. & Pitcher, D. 1985. Current methods for estimating DNA base composition and levels of DNA-DNA hybridization. En *Chemical methods in bacterial systematics*, pp. 67-93. Good-Fellow, M. y Minnikin, E. (ed.). Academic Press. London.

-Pace, N.R. 1996. New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *ASM News* **62**: 463-470.

-Paerl, H.W. & Merkel, S.M. 1982. Differential phosphorus assimilation in attached vs unattached microorganisms. *Archiv für Hydrobiologie*. **93**: 125-134.

-Page, R.D.M. 1996. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci*. **12**:357-358.

-Palleroni, N.J. 1997. Prokaryotic diversity and the importance of culturing. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **72**: 3-19.

-Palmer, T. & Santini, C.L., Iobbi-Nivol, C., Eaves, D.J., Boxer, D.H. & Giordano, G. 1996. Involvement of the *narJ* and *mob* gene products in distinct steps in the biosynthesis of the molybdoenzyme nitrate reductase in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. **20**: 875-84.

-Pantel, I., Lindgren, P.E., Neubauer, H. & Götz, F. 1998. Identification and characterization of the *Staphylococcus carnosus* nitrate reductase operon. *Mol Gen Genet*. **259**: 105-14.

-Pathak, B.K., Kazama, F., Saiki, Y. & Sumino, T. 2007. Presence and activity of anammox and denitrification process in low ammonium-fed bioreactors. *Bioresour Technol*. **98**: 2201-6.

-Payne, W.J. & Riley, P.S. 1969. Suppression by nitrate of enzymatic reduction of nitric oxide. *Proc Soc Exp Biol Med*. **132**: 258-260.

-Payne, W. J., P. S. Riley, and C. D. Cox. 1971. Separate nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide reducing fractions from *Pseudomonas perfectomarinus*. *J Bacteriol.* **106**: 356-361.

-Payne, W.J. 1973. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bacteriol Rev.* **37**: 409-52.

-Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J.M., Ramírez-Bahena, M.H., Mateos, P.F., Santa-Regina, I., Rodríguez-Barrueco, C., Martínez-Molina, E. & Velázquez, E. 2007. Reclassification of *Pseudomonas aurantiaca* as a synonym of *Pseudomonas chlororaphis* and proposal of three subspecies, *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* subsp. nov., *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* subsp. nov., comb. nov. and *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* subsp. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 1286-1290.

-Petri, R. & Imhoff, J.F. 2000. The relationship of nitrate reducing bacteria on the basis of *narH* gene sequences and comparison of *narH* and 16S rDNA based phylogeny. *Syst Appl Microbiol.* **23**: 47-57.

-Peyton, B.M., Mormile, M.R., Peterson, N.J. 2001. Nitrate reduction with *Halomonas campisalis*. Kinetics of denitrification at pH 9 and 12.5% NaCl. *Water Res.* **35**: 4237-4242.

-Philippot, L. & Hojberg, O. 1999. Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. *Biochim Biophys Acta.* **1446**: 1-23.

-Philippot, L. 2002. Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. *Biochim Biophys Acta.* **1577**: 355-76.

-Philippot, L. 2005a. Tracking nitrate reducers and denitrifiers in the environment. *Biochem Soc Trans.* 2005. **33**: 200-4.

-Philippot, L. 2005b. Denitrification in pathogenic bacteria: for better or worst? *Trends Microbiol.* **13**: 191-2.

-Phillips, C.J., Harris, D., Dollhopf, S.L., Gross, K.L., Prosser, J.I. & Paul, E.A. 2000. Effects of agronomic treatments on structure and function of ammonia-oxidizing communities. *Appl Environ Microbiol.* **66**: 5410-8.

-Pichinoty, F., Mandel, M., Greenway, B. & Garcia, J.L. 1977. Etude de 14 bactéries dénitrifiantes appartenant au groupe *Pseudomonas stutzeri* isolées du sol par culture d'enrichissement en présence d'oxyde nitreux. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* **128A**: 75–87.

-Poth, M. & Focht, D.D. 1985. ¹⁵N kinetic analysis of N₂O production by *Nitrosomonas europaea*: an examination of nitrifier denitrification. *Appl Environ Microbiol.* **49**: 1134–1141.

-Poth, M. 1986. Dinitrogen Production from Nitrite by a *Nitrosomonas* Isolate. *Appl Environ Microbiol.* **52**: 957-959.

-Potter, L.C. & Cole, J.A. 1999. Essential roles for the products of the *napABCD* genes, but not *napFGH*, in periplasmic nitrate reduction by *Escherichia coli* K-12. *Biochem J.* **344**: 69-76.

-Prakasam, T.B.S. & Loehr, R.C. 1972. Microbial nitrification and denitrification in concentrated wastes. *Water Res.* **6**: 859-89.

-Prather, M., Ehalt, D., Kirchhoff, V.W.J.H. y col. 2001. Atmospheric chemistry and greenhouse gases. Pages 239–288 in J. T. Houghton, Y. Ding, D. J. Griggs, M. Noguer, P. J. van der Linden, X. Dai, K. Maskell, and C. A. Johnson, editors. Climate change 2001: the scientific basis. Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, New York, USA.

-Priemé, A., Braker, G. & Tiedje, J.M. 2002. Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 1893-900.

-Quesada, E., Ventosa, A., Rodriguez-Valera, F., Megias, L. & Ramos-Cormenzana, A. 1983. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative bacteria from hypersaline soils. *J Gen Microbiol.* **129**: 2649-2657.

-Quesada, E., Ventosa, A., Ruiz-Berraquero, F. & Ramos-Cormenzana A. 1984. *Deleya halophila*, a new species of moderately halophilic bacteria. *Int J Syst Bacteriol.* **34**, 287-292.

-Quesada, E., Valderrama, M.J., Bejar, V., Ventosa, A., Gutiérrez, M.C., Ruiz-Berraquero, F. & Ramos-Cormenzana, A. 1990. *Volcaniella eurihalina* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic nonmotile gram-negative rod. *Int J Syst Bacteriol.* **40**: 261–267.

-Quesada, E., Bejar, V. & Calvo, C. 1993. Exopolysaccharide production by *Volcaniella eurihalina*. *Experientia*. **49**: 1037-1041. Respondía a la modificación del medio MY, xo ya no se si dejarla

-Quillaguamán, J., Hatti-Kaul, R., Mattiasson, B., Alvarez, M.T. & Delgado, O. 2004. *Halomonas boliviensis* sp. nov., an alkalitolerant, moderate halophile isolated from soil around a Bolivian hypersaline lake. *Int J Syst Evol Microbiol*. **54**: 721-725.

-Qiu, X., Wu, L., Huang, H., McDonel, P.E., Palumbo, A.V., Tiedje, J.M. & Zhou, J. 2001. Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Appl Environ Microbiol*. **67**: 880-7.

-Rainey, F.A., Kelly, D.P., Stackebrandt, E., Burghardt, J., Hiraishi, A., Katayama, Y. & Wood, A.P. 1999. A re-evaluation of the taxonomy of *Paracoccus denitrificans* and a proposal for the combination *Paracoccus pantotrophus* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*. **49**: 645-51.

-Rengpipat, S., Lowe, S.E. & Zeikus, J.G. 1988. Effect of extreme salt concentrations on the physiology and biochemistry of *Halobacteroides acetoethylicus*. *J Bacteriol*. **170**: 3065-71.

-Renner, E.D. & Becker, G.E. 1970. Production of nitric oxide and nitrous oxide during denitrification by *Corynebacterium nephridii*. *J Bacteriol*. **101**: 821-6.

-Rich, J.J., Heichen, R.S., Bottomley, P.J., Cromack, K. Jr & Myrold, D.D. 2003. Community composition and functioning of denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soils. *Appl Environ Microbiol*. **69**: 5974-82.

-Richardson, D.J. & Ferguson, S.J. 1992. The influence of carbon substrate on the activity of the periplasmic nitrate reductase in aerobically grown *Thiosphaera pantotropha*. *Arch Microbiol*. **157**: 535-537.

-Richardson, D.J., Bell, L.C., Moir, J.W.B. & Ferguson, S.J. 1994. A denitrifying strain of *Rhodobacter capsulatus*. *FEMS Microbiol Lett*. **120**: 323-328.

-Richardson, D.J. & Watmough, N.J. 1999. Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Curr Opin Chem Biol*. **3**: 207-19.

- Richardson, D.J.** 2001. Introduction: nitrate reduction and the nitrogen cycle. *Cell Mol Life Sci.* **58**: 163-4.
- Richardson, D.J., Berks, B.C., Russell, D.A., Spiro, S. & Taylor, C.J.** 2001. Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *Cell Mol Life Sci.* **58**: 165-78.
- Rivas, R., Velazquez, E., Zurdo-Pineiro, J.L., Mateos, P.F. & Martinez Molina, E.** 2004. Identification of microorganisms by PCR amplification and sequencing of a universal amplified ribosomal region present in both prokaryotes and eukaryotes. *J Microbiol Methods.* **56**: 413-26.
- Robertson, L.A., van Niel, E.W., Torremans, R.A. & Kuenen, J.G.** 1988. Simultaneous Nitrification and Denitrification in Aerobic Chemostat Cultures of *Thiosphaera pantotropha*. *Appl Environ Microbiol.* **54**: 2812-2818.
- Robertson, L.A., Cornelisse, R., de Vos, P., Hadjioetomo, R. & Kuenen, J.G.** 1989. Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **56**: 289-99.
- Robertson, L.A. & Kuenen, J.G.** 1990. Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **57**: 139-52.
- Robinson, J. & Gibbons, N.E.** 1952. The effect of salts on the growth of *Micrococcus halodentrificans* n. sp. *Canadian Journal of Botany.* **30**: 147-154.
- Rock, J.D., Mahnane, M.R., Anjum, M.F., Shaw, J.G., Read, R.C. & Moir, J.W.** 2005. The pathogen *Neisseria meningitidis* requires oxygen, but supplements growth by denitrification. Nitrite, nitric oxide and oxygen control respiratory flux at genetic and metabolic levels. *Mol Microbiol.* **58**: 800-9.
- Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F. & Ramos-Cormenzana, A.** 1981. Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentration. *Microbiol Ecol.* **7**: 235-243.
- Romanenko, L.A., Schumann, P., Rohde, M., Mikhailov, V.V. & Stackebrandt, E.** 2002. *Halomonas halocynthiae* sp. nov., isolated from the marine ascidian *Halocynthia aurantium*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **52**: 1767-1772.

-Romano, I., Nicolaus, B., Lama, L., Manca, M.C. & Gambacorta, A. 1996. Characterization of a haloalkalophilic strictly aerobic bacterium, isolated from Pantelleria island. *Syst Appl Microbiol.* **19**: 326-333.

-Romano, I., Giordano, A., Lama, L., Nicolaus, B. & Gambacorta, A. 2005. *Halomonas campaniensis* sp. nov., a haloalkaliphilic bacterium isolated from a mineral pool of Campania Region, Italy. *Syst Appl Microbiol.* **28**: 610-618.

-Rosenberger, S., Kruger, U., Witzig, R., Manz, W., Szewzyk, U. & Kraume, M. 2002. Performance of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal waste water. *Water Research.* **36**: 413-420.

-Rosselló-Mora, R.A., Garcia-Valdés, E. & Lalucat, J. 1993. Taxonomic relationship between *Pseudomonas perfectomarina* ZoBell and *Pseudomonas stutzeri*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 852-854.

-Rossello-Mora, R. & Amann, R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.* **25**: 39-67.

-Rotthauwe, J.H., Witzel, K.P. & 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**: 4704-12.

-Ruiz-Garcia, C. 2003. Producción de biosurfactantes a partir de bacterias halófilas moderadas. Tesis doctoral.

-Ryden, J.C., Lund, L.J. & Focht, D.D. 1979a. Direct measurement of denitrification loss from soils. I. Laboratory evaluation of acetylene inhibition of nitrous oxide reduction. *Soil Sci Soc Am J.* **43**: 104-110.

-Ryden, J.C., Lund, L.J., Letey, J. & Focht, D.D. 1979b. Direct measurement of denitrification loss from soils: II. Development and application of field methods. *Soil Sci Soc Am J.* **43**: 110-118.

-Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.

-Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* **4**: 406-425.

-Sakurai, T., Nakashima, S., Kataoka, K., Seo, D. & Sakurai, N. 2005. Diverse NO reduction by *Halomonas halodenitrificans* nitric oxide reductase. *Biochem Biophys Res Commun.* **333**: 483-7.

-Sakurai, N., Asada, A., Mano, S., Kataoka, K. & Sakurai, T. 2006. Tandem and single genes of three membrane-bound nitrate transporters in the nar gene cluster of the moderately halophilic denitrifier, *Halomonas halodenitrificans*. *DNA Seq.* **17**: 363-9.

-Sambrook, J. & Russell, D.W. 2001. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Harbour Laboratory Press, New York: Cold Spring Harbor.

-Sanchez-Porro, C., Martín, S., Mellado, E. & Ventosa, A. 2003. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *J Appl Microbiol.* **94**: 295-300.

-Satoh, T., Hoshino, Y. & Kitamura, H. 1974. Isolation of denitrifying photosynthetic bacteria. *Agric Biol Chem.* **38**: 1749-1751.

-Satoh, T., Hoshino, Y. & Kitamura, H. 1976. *Rhodopseudomonas sphaeroides* forma sp. *denitrificans*, a denitrifying strain as a subspecies of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Arch Microbiol.* **108**: 265-9.

-Satoh, T. 1977. Light-activated, -inhibited and -independent denitrification by a denitrifying phototrophic bacterium. *Arch Microbiol.* **115**: 293-8.

-Scala, D.J. & Kerkhof, L.J. 1998. Nitrous oxide reductase (nosZ) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three nosZ genes from marine sediments. *FEMS Microbiol Lett.* **162**: 61-8.

-Scala, D.J. & Kerkhof, L.J. 1999. Diversity of nitrous oxide reductase (*nosZ*) genes in continental shelf sediments. *Appl Environ Microbiol.* **65**: 1681-7.

-Scala, D.J. & Kerkhof, L.J. 2000. Horizontal heterogeneity of denitrifying bacterial communities in marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Appl Environ Microbiol.* **66**: 1980-6.

-Schaeffer, A. B. & Fulton, D. 1933. A simplified method of staining endospores. *Science* **77**: 194.

-Scholten, E., Lukow, T., Auling, G., Kroppenstedt, R.M., Rainey, F.A. & Diekmann, H. 1999 *Thauera mechernichensis* sp. nov., an aerobic denitrifier from a leachate treatment plant. *Int J Syst Bacteriol.* **49**: 1045-51.

-Seitzinger, S.P., Nielsen, L.P., Caffrey, J. & Christensen, P.B. 1993. Denitrification measurements in aquatic sediments: A comparison of three methods. *Biogeochemistry* **23**: 147-167.

-Shaw, S. & Clarke, P.H. 1955. Biochemical classification of *Proteus* and *Providencia* cultures. *J Gen Microbiol.* **13**: 155-161.

-Sheffield, V.C., Cox, D.R., Lerman, L.S. & Myers, R.M. 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 U.S.A.* **86**: 232-6.

-Shrestha, N.K., Hadano, S., Kamachi, T. & Okura, I. 2002. Dinitrogen production from ammonia by *Nitrosomonas europaea*. *Applied Catalysis A: General.* **237**: 33-39.

-Shoun, H. & Tanimoto, T. 1991. Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome *p₄₅₀* in the respiratory nitrite reduction. *J Biol Chem.* **266**: 11078-82.

-Shoun, H., Kim, D.H., Uchiyama, H. & Sugiyama, J. 1992. Denitrification by fungi. *FEMS Microbiol Lett.* **94**: 277-281.

-**Siddiqui, R.A., Warnecke-Eberz, U., Hengsberger, A., Schneider, B, Kostka, S. & Friedrich, B.** 1993. Structure and function of a periplasmic nitrate reductase in *Alcaligenes eutrophus* H16. *J Bacteriol.* **175**: 5867-76.

-**Sierra, G.** 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leewenhoek* **23**: 15.

-**Skerman, V.B.D.** 1967. A guide to identification of the genera of bacteria. 1st ed., Baltimore, Williams and Wilkins Co.

-**Smith, F.B.** 1938. An investigation of a taint in rib bones of bacon. The determination of halophilic vibrios. *Proceedings of the Royal Society Queensland.* **49**: 29-52.

-**Smith, M.S.** 1982. Dissimilatory Reduction of NO_2^- to NH_4 and N_2O by a Soil *Citrobacter* sp. *Appl Environ Microbiol.* **43**: 854-860.

-**Smith, M.S.** 1983. Nitrous oxide production by *Escherichia coli* is correlated with nitrate reductase activity. *Appl Environ Microbiol.* **45**: 1545-7.

-**Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. & Klenk, D.C.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* **150**: 76-85.

-**Snyder, S.W. & Hollocher, T.C.** 1987. Purification and some characteristics of nitrous oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem.* **262**: 6515-25.

-**Sneath, P.H.A. & Sokal, R.R.** 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. Freeman, W.H. y Co. San Francisco.

-**Sneath, P.H.A. & Collins, V.G.** 1974. A study in test reproducibility between laboratories: Report of a Pseudomonas working party. *Antonie van Leewenhoek.* **40**: 481.

-**Sneath, P.H.A.** 2006. Numerical taxonomy. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. Brenner, D.J., Noel, R. K., James, T.S. & Garrity, G.M. (eds.), pp. 39-42. Springer US.

-**Sokal, R.R. & Michener, C.D.** 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ Kansas Sci Bull.* **38**: 1409-1438.

-**Sorensen, J.** 1978. Occurrence of nitric and nitrous oxides in a coastal marine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**: 809-813.

-**Sorokin, D.Y., Tourova, T.P., Sjollem, K.A. & Kuenen, J.G.** 2003a. *Thialkalinivibrio nitratireducens* sp. nov., a nitrate-reducing member of an autotrophic denitrifying consortium from a soda lake. *Int J Syst Evol Microbiol.* **53**: 1779-83.

-**Sorokin, D.Y., Antipov, A.N. & Kuenen, J.G.** 2003b. Complete denitrification in coculture of obligately chemolithoautotrophic haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria from a hypersaline soda lake. *Arch Microbiol.* **180**: 127-33. Epub 2003 Jun 24.

-**Sorokin, D.Y. & Tindall, B.J.** 2006. The status of the genus name *Halovibrio* Fendrich 1989 and the identity of the strains *Pseudomonas halophila* DSM 3050 and *Halomonas variabilis* DSM 3051. Request for an Opinion. *Int J Syst Evol Microbiol.* **56**: 487-489.

-**Soto-Ramírez, N., Sanchez-Porro, C., Rosas, S., González, W., Quiñones, M., Ventosa, A. & Montalvo-Rodríguez, R.** 2007. *Halomonas avicenniae* sp. nov., isolated from the salty leaves of the black mangrove *Avicennia germinans* in Puerto Rico. *Int J Syst Evol Microbiol.* **57**: 900-905.

-**Spalding, R.F. & Exner, M.E.** 1993. Occurrence of nitrate in groundwater. *J Environ Qual.* **22**: 392-402.

-**Stackebrandt, E. & Goebel, B.M.** 1994. Taxonomy note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol.* **44**: 846-849.

-**Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G., M., Grimont, P.A.D., Kämpfer, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Roselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C. & Whitman,**

B. 2002. Report of the *ad hoc* committee for the re-evaluation of the definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol.* **52**: 1043-1047.

-**Stachelin, J.** 1992. The two ozone problems: too much in the troposphere, too little in the stratosphere. *Schweiz Rundsch Med Prax.* **81**: 315-21.

-**Stanier, R.Y., Palleroni, N.J. & Duodoroff, M.** 1966. The aerobic pseudomonads: A taxonomic study. *J Gen Micro Biol.* **43**:159-272.

-**Stetter, K.O.** 1996. Hyperthermophiles in the history of life. *Ciba Found Symp.***202**: 1-10; discussion 11-8.

-**Stewart, V., Lu, Y.R. & Darwin, A.J.** 2002. Periplasmic nitrate reductase (NapABC enzyme) supports anaerobic respiration by *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* **184**: 1314–1323.

-**Stolz, J.F. & Basu, P.** 2002. Evolution of nitrate reductase: molecular and structural variations on a common function. *Chembiochem.* **3**: 198-206.

-**Stouthamer, A.H.** 1976. Biochemistry and genetics of nitrate reductase in bacteria. *Adv Microb Physiol.* **14**: 315-375.

-**Stouthamer, A.H.** 1991. Metabolic regulation including anaerobic metabolism in *Paracoccus denitrificans*. *J Bioenerg Biomembr.* **23**: 163-185.

-**Stouthamer, A.H.** 1992. Metabolic pathways in *Paracoccus denitrificans* and closely related bacteria in relation to the phylogeny of prokaryotes. *Antonie van Leeuwenhoek.* **61**: 1-33.

-**Straub, K.L., Benz, M., Schink, B. & Widdel, F.** 1996. Anaerobic, nitratedependent microbial oxidation of ferrous iron. *Appl Environ Microbiol.* **62**: 1458–1460.

-**Stres, B., Mahne, I., Avgustin, G. & Tiedje, J.M.** 2004. Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene fragments differ between native and cultivated Michigan soils. *Appl Environ Microbiol.* **70**: 301-9.

- Su, J.J., Liu, B.Y., Lin, J. & Yang, C.P. 2001. Isolation of an aerobic denitrifying bacterial strain NS-2 from the activated sludge of piggery wastewater treatment systems in Taiwan possessing denitrification under 92% oxygen atmosphere. *J Appl Microbiol.* **91**: 853-860.
- Suharti, Strampraad, M.J., Schröder, I. & de Vries, S. 2001. A novel copper A containing menaquinol NO reductase from *Bacillus azotoformans*. *Biochemistry.* **40**: 2632-9.
- Swissa, M. & Benziman, M. 1976. Factors affecting the activity of citrate synthase of *Acetobacter xylinum* and its possible regulatory role. *Biochem J.* **153**: 173-9.
- Tan, Y.M., Liu, Y.Q., Su, F., Wang, L. & Luo, Q.F. 2006. Experimental study on denitrification using coated electrode of immobilized denitrifying bacteria. *Biomed Environ Sci.* **19**: 47-52.
- Tang, X., Madronich, S., Wallington, T. & Calamari, D. 1998. Changes in tropospheric composition and air quality. *J Photochem Photobiol B.* **46**: 83-95.
- Tavares, P., Pereira, A.S., Moura, J.J. & Moura, I. 2006. Metalloenzymes of the denitrification pathway. *J Inorg Biochem.* **100**: 2087-100.
- Teraguchi, S. & Hollocher, T.C. 1989. Purification and some characteristics of a cytochrome *c*-containing nitrous oxide reductase from *Wolinella succinogenes*. *J Biol Chem.* **264**: 1972-9.
- Teixeira, P. & Oliveira, R. 2002. Metabolism of *Alcaligenes denitrificans* in biofilm vs planktonic cells. *J Appl Microbiol.* **92**: 256-260.
- Thauer, R.K., Jungermann, K. & Decker, K. 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev.* **41**: 100-180.
- Throbäck, I. N., Enwall, K., Jarvis, A. & Hallin, S. 2004. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiology Ecology* **49**: 401-417.

- Throbäck, I.N., Johansson, M., Rosenquist, M., Pell, M., Hansson, M. & Hallin, S.** 2007. Silver (Ag⁺) reduces denitrification and induces enrichment of novel nirK genotypes in soil. *FEMS Microbiol Lett.* **270**: 189-94.
- Thomas, K.L., Lloyd, D. & Boddy, L.** 1994. Effects of oxygen, pH and nitrate concentration on denitrification by *Pseudomonas* species. *FEMS Microbiol Lett.* **118**: 181-6.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G.** 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876-82.
- Tiedje, J.M.** 1978. Denitrification in soil, p. 362-366. In D. Schlessinger (ed.), *Microbiology-1978*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Tiedje, J.M. & Stevens, T.O.** 1988. The ecology of an anaerobic dechlorinating consortium. *Basic Life Sci.* **45**: 3-14.
- Tiedje, J.M.** 1994. Denitrifiers. *Methods of Soil Analysis, Part 2*. pp 245-267. Microbiological and Biochemical Properties. Soil Sci. Soc. Amer., Madison, Wisconsin.
- Timmer-ten Hoor, A.** 1975. A new type of thiosulphate oxidizing, nitrate reducing microorganism: *Thiomicrospira denitrificans* sp. nov. *Neth. J. Sea Res.* **9**:344–350.
- Toerien, D.F., Gerber, A., Lotter, L.H. & Cloete, T.E.** 1990. Enhanced biological phosphorus removal in activated sludge systems, p. 173–219. In K. C. Marshall (ed.), *Advances in microbial ecology*, vol. 11. Plenum Press, New York, N.Y.
- Tomlinson, G.A., Jahnke, L.L. & Hochstein, L.I.** 1986. *Halobacterium denitrificans* sp. nov., an extremely halophilic denitrifying bacterium. *Int J Syst Bacteriol.* **36**: 66-70.
- Tsuneda, S., Mikami, M., Kimochi, Y. & Hirata, A.** 2005. Effect of salinity on nitrous oxide emission in the biological nitrogen removal process for industrial wastewater. *J Hazard Mater.* **119**: 93-8.

-Tsuruta, S., Takaya, N., Zhang, L., Shoun, H., Kimura, K., Hamamoto, M. & Nakase, T. 1998. Denitrification by yeasts and occurrence of cytochrome *p₄₅₀nor* in *Trichosporon cutaneum*. *FEMS Microbiol Lett.* **168**: 105-10.

-Tuomanien, J.M., Hietanen, S., Kuparinen, J., Martikainen, P.J. & Servomaa, K. 2003. Baltic sea cyanobacterial bloom contains denitrification and nitrification genes, but has negligible denitrification activity. *FEMS Microbiol Ecol.* **45**: 83-96.

-Uilenberg, G., Thiaucourt, F., Jongejan, F. 2004. On molecular taxonomy: what is in a name?. *Exp Appl Acarol.* **32**:301-12.

-Valderrama, M.J., Quesada, E., Bejar, V., Ventosa, A., Gutierrez, M.C., Ruiz-Berraquero, F. & Ramos-Cormenzana, A. 1991. *Deleya salina* sp. nov., a moderately halophilic gram-negative bacterium. *Int J Syst Bacteriol.* **41**: 377-384.

-van Landschoot, A. & De Ley, J. 1983. Intra- and intergeneric similarities of the rRNA cistrons of *Alteromonas*, *Marinomonas* (gen. nov.) and some other gram-negative bacteria. *J Gen Microbiol.* **129**: 3057-3074.

-van Niel, E.W., Braber, K.J., Robertson, L.A. & Kuenen, J.G. 1992. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Alcaligenes faecalis* strain TUD. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **62**: 231-7.

-Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. & Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev.* **60**: 407-38.

-Vasyurenko, Z.P. & Frolov, A.F. 1986. Fatty acid composition of bacteria as a chemotaxonomic criterion. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* **30**: 287-93.

-Ventosa, A., Quesada, E., Rodriguez-Valera, F, Ruiz-Berraquero, F. & Ramos-Cormenzana. 1982. Numerical taxonomy of moderately halophilic gram-negative rods. *J Gen Microbiol.* **128**: 1959-1968.

-Ventosa, A., Gutierrez, M.C., Garcia, M.T. & 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., Nieto, J.J. & Oren, A. 1998. Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**: 504-44.
- Vermeer, I.T. & van Maanen, J.M. 2001. Nitrate exposure and the endogenous formation of carcinogenic nitrosamines in humans. *Rev Environ Health.* **16**: 105-16.
- Viebrock, A. & Zumft, W.G. 1988. Molecular cloning, heterologous expression, and primary structure of the structural gene for the copper enzyme nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. *J Bacteriol.* **170**: 4658-68.
- Volcani, B.E. 1940. Studies on the microflora of the Dead Sea. Ph.D. thesis, The Hebrew University of Jerusalem.
- Volkl, P., Huber, R., Drobner, E., Rachel, R., Burggraf, S., Trincone, A. & Stetter, K.O. 1993. *Pyrobaculum aerophilum* sp. nov., a novel nitrate-reducing hyperthermophilic archaeum. *Appl Environ Microbiol.* **59**: 2918-26.
- Vollack, K.U., Xie, J., Härtig, E., Römling, U. & Zumft, W.G. 1998. Localization of denitrification genes on the chromosomal map of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* **144**: 441-8.
- Vorholt, J.A., Hafenbradl, D., Stetter, K.O. & Thauer, R.K. 1997. Pathways of autotrophic CO₂ fixation and of dissimilatory nitrate reduction to N₂O in *Ferroglobus placidus*. *Arch Microbiol.* **167**: 19-23.
- Vreeland, R.H., Litchfield, C.D., Martin, E.L. & Elliot, E. 1980. *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. *Int J Syst Bacteriol.* **30**: 485-495.
- Waibel, A.E., Peter, T., Carslaw, K.S., Oelhaf, H., Wetzel, G., Crutzen, P.J., Poschl, U., Tsias, A., Reimer, E. & Fischer, H. 1999. Arctic ozone loss due to denitrification. *Science.* **283**: 2064-9.
- Wallenstein, M.D., Myrold, D.D., Firestone, M. & Voytek, M. 2006. Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: insights from molecular methods. *Ecol Appl.* **16**: 2143-52.

- Wang, H., Tseng, C.P. & Gunsalus, R.P. 1999. The *napF* and *narG* nitrate reductase operons in *Escherichia coli* are differentially expressed in response to submicromolar concentrations of nitrate but not nitrite. *J Bacteriol.* **181**: 5303-5308.
- Wang, Y.N., Cai, H., Yu, S.L., Wang, Z.Y., Liu, J. & Wu, X.L. 2007a. *Halomonas gudaonensis* sp. nov., isolated from a saline soil contaminated by crude oil. *Int J Syst Evol Microbiol.* **57**: 911-915.
- Wang, Y.N., Cai, H., Chi, C.Q., Lu, A.H., Lin, X.G., Jiang, Z.F. & Wu, X.L. 2007b. *Halomonas shengliensis* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, crude-oil-utilizing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* **57**: 1222-1226.
- Ward, B.B. 1996. Nitrification and Denitrification: Probing the Nitrogen Cycle in Aquatic Environments. *Microb Ecol.* **32**: 247-261.
- Watmough, N.J., Butland, G., Cheesman, M.R., Moir, J.W., Richardson, D.J. & Spiro, S. 1999. Nitric oxide in bacteria: synthesis and consumption. *Biochim Biophys Acta.* **1411**: 456-474.
- Watson, G.M. & Tabita, F.R. 1997. Microbial ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: a molecule for phylogenetic and enzymological investigation. *FEMS Microbiol. Lett.* **146**: 13-22.
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R. & 9 other authors. 1987. International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol.* **37**: 463-464.
- Weber, I., C. Fritz, S. Ruttkowski, A. Kreft, & Bange, F.C. 2000. Anaerobic nitrate reductase (*narGHJI*) activity of *Mycobacterium bovis* BCG in vitro and its contribution to virulence in immunodeficient mice. *Mol Microbiol.* **35**:1017-1025.
- Wei, X.Q., Charles, I.G., Smith, A., Ure, J., Feng, G.J., Huang, F.P., Xu, D., Muller, W., Moncada, S. & Liew, F.Y. 1995. Altered immune response in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature.* **375**: 408-411.

- Weier, K.L., Doran, J.W., Power, J.F. & Walters, D.T. 1993. Denitrification and the dinitrogen/nitrous oxide ratio as affected by soil water, available carbon, and nitrate. *Soil Sci Soc Am J.* **57**: 66–72.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. & Lane D.J. 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *J Bacteriol.* **173**: 697-703.
- Werber, M.M. & Mevarech, M. 1978. Purification and characterization of a highly acidic 2Fe-ferredoxin from *Halobacterium* of the dead sea. *Arch Biochem Biophys.* **187**: 447-456.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* **51**: 221-271.
- Wolf, Y.I., Rogozin, I.B., Grishin, N.V. & Koonin, E.V. 2002. Genome trees and the tree of life. *Trends Genet.* **18**: 472-479.
- Wu, Y., Hayes, V.M., Osinga, J., Mulder, I.M., Looman, M.W., Buys, C.H. & Hofstra, R.M. 1998. Improvement of fragment and primer selection for mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **26**: 5432-5440.
- Xu, Y., Miao, L., Li, X.C., Xiao, X. & Qian, P.Y. 2007. Antibacterial and antilarval activity of deep-sea bacteria from sediments of the West Pacific Ocean. *Biofouling.* **23**: 131-137.
- Xu, X.W., Wu, Y.H., Zhou, Z., Wang, C.S., Zhou, Y.G., Zhang, H.B., Wang, Y. & Wu, M. *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.* En prensa.
- Yamanaka, T., Kijimoto, S. & Okunuki, K. 1963. Biological significance of *Pseudomonas* cytochrome oxidase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biochem.* **53**: 416–421.
- Yang, Y., Chen, Y.X., Tian, G.M. & Zhang, Z.J. 2005. Microbial activity related to N cycling in the rhizosphere of maize stressed by heavy metals. *J Environ Sci (China)*. **17**: 448-51.

-Yoon, J.H., Lee, K.C., Kho, Y.H., Kang, K.H., Kim, C.J. & Park, Y.H. 2002. *Halomonas alimentaria* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Int J Syst Evol Microbiol.* **52**: 123-130.

-Yoon, J.H., Choi, S.H., Lee, K.C., Kho, Y.H., Kang, K.H. & Park, Y.H. 2001. *Halomonas marisflavae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from the Yellow Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol.* **51**: 1171-1177.

-Yoshie, S., Noda, N., Miyano, T., Tsuneda, S., Hirata, A. & Inamori, Y. 2002. Characterization of microbial community in nitrogen removal process of metallurgic wastewater by PCR-DGGE. *Water Sci Technol.* **46**: 93-98.

-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.

-Yoshie, S., Ogawa, T., Makino, H., Hirose, H., Tsuneda, S. & Hirata, A. 2006a. Characteristics of bacteria showing high denitrification activity in saline wastewater. *Lett Appl Microbiol.* **42**: 277-83.

-Yoshie, S., Makino, H., Hirose, H., Shirogane, K., Tsuneda, S. & Hirata, A. 2006b. Molecular analysis of halophilic bacterial community for high-rate denitrification of saline industrial wastewater. *Appl Microbiol Biotechnol.* **72**: 182-9.

-Yoshinari, T. 1980. N₂O reduction by *Vibrio succinogenes*. *Appl Environ Microbiol.* **39**: 81-84.

-Young, J.M., Takikawa, Y., Gardan, L. & Stead, D.E. 1992. Changing Concepts in the Taxonomy of Plant Pathogenic Bacteria. *Annu Rev Physiol.* **30**: 67-105.

-Zahran, H.H. 1997. Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Biol Fertil Soils.* **25**: 211-223.

-Zhang, T.C. 2004. Development of sulfur-limestone autotrophic denitrification processes for treatment of nitrate-contaminated groundwater in small communities. Civil Engineering Department at the University of Nebraska-Lincoln (UNL). Final Report.

-Ziemke, F., Höfle, M.G., Lalucat, J. & Roselló -Mora, R. 1998. Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **48**: 179±186.

-Zobell, C.E. & Upham, H.C. 1944. A list of marine bacteria including descriptions of sixty new species. *Bulletin Scripps Institution of Oceanography University of California (Technical Series)*. **5**: 239-292.

-Zhou, Q., Takenaka, S., Murakami, S., Seesuriyachan, P., Kuntiya, A. & Aoki, K. 2007. Screening and characterization of bacteria that can utilize ammonium and nitrate ions simultaneously under controlled cultural conditions. *J Biosci Bioeng*. **103**: 185-91.

-Zumft, W. G., Viebrock, A. & Körner, H. 1988. Biochemical and physiological aspects of denitrification. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* **42**: 245–279.

-Zumft, W. G. 1992. The denitrifying prokaryotes, p. 554–582. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*, 2nd ed., vol. 1. Springer-Verlag, New York, N.Y.

-Zumft, W.G., Braun, C. & Cuypers, H. 1994. Nitric oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri*: primary structure and gene organization of a novel bacterial cytochrome *bc* complex. *Eur J Biochem.* **219**: 481–490.

-Zumft, W.G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev.* **61**: 533-616.

-Zumft, W.G. 2005. Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type. *J Inorg Biochem.* **99**: 194-215.