

ARTÍCULO ORIGINAL

Aislamiento de cepas del género *Halomonas* con interés biotecnológico en Rambla Salada (Murcia).**Isolation of strains of the genus *Halomonas* with biotechnological interest from Rambla Salada (Murcia).**

Luque R*, Quesada E, Béjar V y Llamas I.

Grupo Exopolisacáridos Microbianos BIO-188. Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

*rluque@ugr.es

RESUMEN

El género *Halomonas* es uno de los taxones bacterianos más representativos dentro de las bacterias halófilas moderadas. Se encuentra incluido en el Phylum *Proteobacteria*, clase *Gamma-Proteobacteria*, familia *Halomonadaceae*¹. Son en su mayoría de bacterias halófilas moderadas, con un requerimiento de NaCl para su óptimo crecimiento que oscila entre un 3-15% (p/v). Las especies de esta familia han demostrado ser un grupo de microorganismos extremófilos con un gran potencial biotecnológico, por la producción de solutos compatibles que les confiere capacidad para estabilizar y proteger enzimas así como aplicaciones en tecnología enzimática, en la industria cosmética y dermofarmacia, medicina y agricultura. Estas especies son capaces de producir también compuestos extracelulares como exopolisacáridos y enzimas extracelulares. Los primeros tienen gran interés industrial debido a sus propiedades viscosizantes, estabilizantes, emulgentes y formadoras de geles. Nuestro grupo de investigación a lo largo de estos años ha caracterizado una decena de estos polímeros destacando los de *H. eurihalina* y *H. maura* por sus propiedades viscosizantes y emulgentes^{2,3} y los de *H. stenophila* por sus propiedades antitumorales⁴.

En cuanto a las enzimas extracelulares, tales como lipasas y amilasas, se mantienen estables en un amplio rango de concentraciones salinas y proporcionan así nuevas posibilidades en los procesos biocatalíticos. Otras aplicaciones biotecnológicas son la producción de polihidroxicanoatos así como la degradación de compuestos tóxicos.

Debido al gran interés biotecnológico de las bacterias halófilas moderadas, nuestro grupo de investigación lleva a cabo un estudio de biodiversidad de microorganismos halófilos en Rambla Salada (Murcia) con el fin de aislar nuevas especies de *Halomonas* productoras de compuestos de aplicación industrial y/o biotecnológica.

Se han realizado cuatro muestreos durante dos años en Rambla Salada (Murcia, España). Las muestras han sido procesadas mediante las técnicas de microbiología clásicas y las bacterias aisladas han sido caracterizadas fenotípicamente y filogenéticamente. Las cepas pertenecientes al género *Halomonas* se sembraron en los medios adecuados para estudiar cada una de las funciones biológicas, y se seleccionaron aquellas cepas que dieron una actividad positiva.

Se han aislado 164 cepas del género *Halomonas*, algunas de ellas con actividad lipasa, proteínasa y/o dextranasa y casi todas son productoras de exopolisacáridos. La presencia de estas cepas con actividad positiva para determinadas funciones biológicas con interés industrial y biotecnológico ponen de manifiesto la necesidad de seguir investigando en este sentido.

PALABRAS CLAVE: *Halomonadaceae*, biotecnología, bacterias halófilas.

ABSTRACT

The genus *Halomonas* is one of the most representative taxa amongst the moderately halophilic bacteria. This genus is included into the family *Halomonadaceae*, class *Gamma-Proteobacteria*, Phylum *Proteobacteria*¹. It requires NaCl concentrations 3-15% w/v for optimum growth.

Halomonas species have aroused interest amongst biotechnologists because of their ability to accumulate organic compatible solutes which provide stability and protection of enzymes and other molecules and

Fecha de recepción (Date received): 15-04-2010

Fecha de aceptación (Date accepted): 10-06-2010

Ars Pharm 2010; 51.Suplemento 3: 453-462.

have interest in enzymatic technology, cosmetic, medicine and agriculture. They also produce extracellular compounds, such as exoenzymes and exopolysaccharides (EPS). The extracellular enzymes, such as lipase and amylase, are stable within a wide salt concentration range; this property is important in biocatalytic processes. Other biotechnological applications of the *Halomonas* species are the production of *polyhydroxyalkanoates* and the degradation of aromatic compounds.

The halophilic EPS are commercially valuable products because of their biotechnology applications as viscosifying, stabilizers and gelling agents. Our research group has characterized to date ten exopolysaccharides-producing halophilic species. Two of them, *H. eurihalina* and *H. maura* produce polymers with viscosifying and emulsifying properties^{2,3} and *H. stenophila* synthesizes and EPS with antitumoral properties⁴.

Isolate new species of the genus *Halomonas* with industrial and/or medical applications from Rambla Salada (Murcia, Spain).

Samples of saline soils, sediments and waters were taken periodically from Rambla Salada (Murcia, Spain) along two years. The samples were processed by classical methods and the isolated strains were identified by mean of phenotypic and phylogenetic techniques. The species belonging to the genus *Halomonas* were analyzed in order to find compounds of biotechnological interest.

We have isolated 164 strains of the genus *Halomonas*. Some of them have lipases protease and/or deoxyribonuclease activities and most of them are exopolysaccharide-producing bacteria. The results presented in this work show that extreme environments, such as Rambla Salada, constitute an unexplorable resource of discovering new bacteria and biomolecules.

KEYWORDS: *Halomonadaceae*, biotechnology, halophilic bacteria

INTRODUCCIÓN

El género *Halomonas* es uno de los taxones bacterianos más representativos dentro de las bacterias halófilas moderadas. Se encuentra incluido en el phylum *Proteobacteria*, clase *Gamma-Proteobacteria*, familia *Halomonadaceae*¹. En la actualidad *Halomonas* contiene más de 70 especies, 12 de ellas han sido descritas por miembros de nuestro grupo de investigación^{2,13}. Debido a este alto número de especies la heterogeneidad fenotípica entre ellas también es elevada^{1,14,15}. De manera generalizada podemos decir que se trata en su mayoría de bacterias halófilas moderadas que presentan un requerimiento de NaCl para su óptimo crecimiento que oscila entre un 3-15% (p/v). *Halomonas* es un bacilo Gram negativo, quimioheterótrofo con un metabolismo bastante versátil. La mayoría de las especies realizan respiración aerobia y un gran número de ellas también utilizan otros compuestos como últimos aceptores de electrones, mientras que otro grupo minoritario es capaz de realizar fermentaciones. Otra característica a tener en cuenta es que estas bacterias pueden crecer en una gran variedad de compuestos como única fuente de carbono y energía¹⁶.

Los solutos compatibles son pequeñas moléculas orgánicas solubles que las bacterias halófilas acumulan en su citoplasma para poder vivir en el ambiente salino. Dichos solutos tienen un gran interés biotecnológico porque sirven para estabilizar y proteger enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, estructuras celulares e incluso células enteras sometidas a temperaturas extremas, desecación, alta salinidad y otras condiciones adversas. También se han descrito sus posibles aplicaciones en tecnología enzimática, en la industria cosmética y dermofarmacia, medicina y agricultura^{17,18,19,20}.

Algunas especies del género *Halomonas* producen exopolisacáridos (EPSs) y enzimas extracelulares también con interés biotecnológico. Los EPS son polímeros constituidos por carbohidratos que se depositan por fuera de la pared celular o se excretan al medio. Su

composición química y estructura puede ser muy variada por lo que son moléculas versátiles con aplicaciones muy diversas en distintos campos biotecnológicos debido a sus propiedades viscosizantes, estabilizantes, emulsificantes, formadoras de geles y a su contenido en sulfatos. Nuestro grupo de investigación, durante las últimas dos décadas, ha caracterizado una decena de estos polímeros. Entre ellos destaca el EPS de *Halomonas eurihalina* por su capacidad de formar geles^{21,22,23,24}; el de *Halomonas maura* por sus propiedades viscosizantes y emulgentes^{25,26}; y el de *Halomonas stenophila* por sus propiedades antitumorales debido al alto contenido en grupos sulfato presente en el exopolisacárido²⁷. En cuanto a las enzimas extracelulares, éstas presentan un gran campo de aplicación por la estabilidad de su actividad en un amplio rango de concentraciones salinas proporcionando así nuevas posibilidades en los procesos biocatalíticos. La primera de estas enzimas extracelulares caracterizada a nivel bioquímico y molecular ha sido una alfa-amilasa producida por *Halomonas meridiana*^{28, 29}. Por otra parte Sanchez-Porro y colaboradores (2003) llevaron a cabo un estudio de las bacterias halófilas moderadas productoras de enzimas hidrolíticas extracelulares presentes en ambientes hipersalinos. Como resultado del mismo encontraron una gran variedad de enzimas con potencial biotecnológico, incluyendo amilasas, DNAsas, lipasas, proteasas y pululanases en las especies del género *Halomonas*³⁰.

Los polihidroxialcanoatos (PHAs) son poliésteres sintetizados por los microorganismos. Tienen numerosas aplicaciones industriales como la producción de plásticos biodegradables utilizados en la elaboración de papel de embalaje o en la fabricación de materiales utilizados en medicina. Aún no se han estudiado la producción de PHA en las especies del género *Halomonas*, si bien, este polímero es acumulado por muchas de las especies de este género¹⁵.

Otros compuestos con aplicación biotecnológica son los antibióticos. Hasta la fecha los más ampliamente utilizados en clínica son metabolitos producidos por bacterias del phylum *Actinobacteria* y de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*. La búsqueda de metabolitos bacterianos a partir de estos microorganismos está disminuyendo hoy en día debido a la falta de hallazgo de nuevas moléculas. Por este motivo, y debido a que las infecciones causadas por bacterias multirresistentes están aumentando, nuestro grupo de investigación está llevando a cabo un estudio que permita aislar cepas con capacidad antibiótica procedentes de ambientes hipersalinos de Andalucía utilizando para ello condiciones de cultivo que simulen las propias de su medio ambiente.

Por último, los miembros de la familia *Halomonadaceae* también pueden ser utilizados en la degradación de compuestos tóxicos a salinidades altas e intermedias, permitiendo así el tratamiento de los residuos salinos industriales y la destoxificación de los ambientes salinos contaminados¹⁷.

Los medios ambientes extremos son una fuente inagotable de microorganismos con aplicación biotecnológica. Un ejemplo de este tipo de hábitats es Rambla Salada, un paraje natural que forma parte del espacio protegido por la comunidad Murciana (BORM 10/9/1998). La mayor parte del año predominan en este hábitat los “cauces secos”, aunque

existen tramos o puntos donde afloran aguas subterráneas. El origen de las sales está en la disolución de materiales evaporíticos (fundamentalmente yesos) que forman parte de los sedimentos de las cuencas vertientes de las ramblas. El rango de salinidad es muy amplio y alcanza valores en algunos puntos de entre el 15 y el 18% (p/v). Este ambiente hipersalino ha sido objeto del presente estudio microbiológico que tiene como finalidad aislar bacterias pertenecientes al género *Halomonas* productoras de compuestos de interés industrial.

OBJETIVO

Llevar a cabo un estudio de biodiversidad de los microorganismos halófilos presentes en Rambla Salada (Murcia) con el fin de aislar, seleccionar y estudiar nuevas especies del género *Halomonas* de interés biotecnológico por su capacidad para producir enzimas extracelulares, exopolisacáridos y/o antibióticos.

METODOLOGÍA

Lugares de muestreo y análisis fisicoquímico

Los muestreos se han realizado durante los años 2006 y 2007 en Rambla Salada, Murcia. Se han tomado muestras de suelos, aguas y sedimentos en cuatro lugares: la zona de la Finca de la Salina, una surgencia de agua sulfurosa salina, el canal del trasvase Tajo-Segura, y la Rambla Ajauque en el Humedal de Derramadores (Figura 1). En cada una de las zonas muestreadas se ha llevado a cabo un análisis fisicoquímico que incluye entre otras medidas el análisis del contenido en sales.

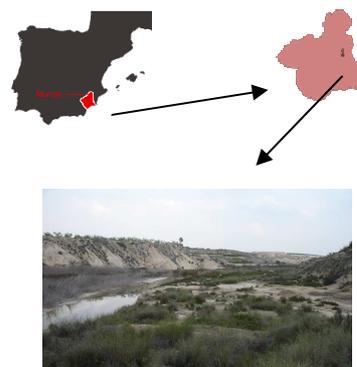


Fig. 1: Localización geográfica de Rambla Salada (Murcia)
Fotografía de la Finca de la Salina, uno de los sitios muestreados.

Aislamiento de las cepas bacterianas

Las muestras fueron procesadas mediante las técnicas de microbiología clásica. Para ello 1 g de muestra se suspendió en 9 ml de solución de sales Subow al 5% (p/v)³¹ y tras las diluciones oportunas, estas se sembraron en placas que contenían medio de cultivo MY³² con distintas concentraciones salinas (0,5%–30%, p/v) con el fin de aislar la población quimioheterótrofa aerobia. Tras 3 días de incubación a 37°C se seleccionaron las cepas al azar en función de su diversidad colonial^{33,34}.

Identificación de los aislados

Se realizó un estudio filogenético mediante el análisis de la secuencia parcial del gen ribosomal ARN 16S de 500 pb correspondiente a la región hipervariable V1 a V3⁵.

Selección de bacterias halófilas del género *Halomonas* con actividad hidrolítica

Las cepas pertenecientes al género *Halomonas* se sembraron en distintos medios para estudiar la presencia de proteasas, lipasas, amilasas y DNAsas. Se utilizó para ello el medio complejo MY al 5% (p/v) de sales²¹, adicionado de los sustratos correspondientes (leche, Tween 20, Tween 80, almidón y DNA)¹⁵.

La selección de las bacterias con actividad enzimática se realizó analizando la aparición de un halo de aclaramiento alrededor de la zona del crecimiento bacteriano (Figura 2).

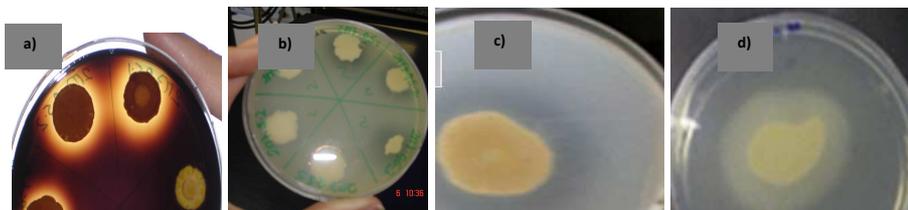


Fig. 2: Fotografías del ensayo en placa realizado para la selección de bacterias productoras de las actividades enzimáticas: Hidrólisis del almidón (a), hidrólisis del DNA (b), hidrólisis de la caseína (c), hidrólisis del Tween 20.

Selección de bacterias halófilas del género *Halomonas* con actividad antimicrobiana

El aislamiento de bacterias productoras de sustancias con actividad antimicrobiana se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Nkanga, y col (1978)³⁵. Para ello, las placas de LB al 2% se cubrieron con 5 ml de una sobrecapa de cultivo de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) y *Staphylococcus aureus* (MB167) preparado en medio LB y adicionado de agar (0,7%, p/v) con una densidad óptica de 0,2 a 600 nm. Una vez solidificada la sobrecapa, se sembraron sobre la misma cada una de las cepas y posteriormente las placas se incubaron 18 horas a 37°C. Se seleccionarán aquellas cepas que originen zonas de inhibición del crecimiento de las bacterias control.

Selección de bacterias halófilas del género *Halomonas* productoras de exopolisacáridos de interés industrial.

Las cepas del género *Halomonas* que originaron colonias de aspecto mucoso fueron seleccionadas para un posterior estudio del exopolisacárido. La extracción del EPS se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Quesada y col. (1993)²¹.

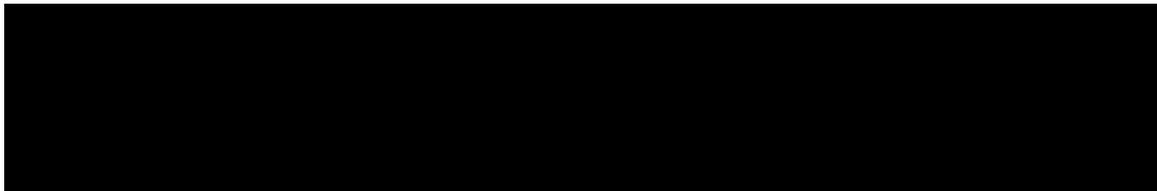
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los lugares de muestreo situados en las cuatro zonas de Rambla Salada elegidas para el presente estudio mostraron un contenido en sales solubles que osciló entre el 3 y el 15 % (p/v).

En las muestras procedentes de agua, suelo y sedimento de Rambla Salada se seleccionaron al azar un total de 365 cepas en función de su morfología colonial. Tras el análisis de la secuencia parcial del gen ribosomal ARN 16S se identificaron 164 de estas cepas como pertenecientes al género *Halomonas*, lo que corresponde al 45% del total.

La gran mayoría de las cepas estudiadas, concretamente 133 cepas, tenía más de una actividad enzimática hidrolítica (Tabla 1) lo que supone el 81% de ellas. Solamente 3 cepas de *Halomonas* no presentaron ninguna de las actividades enzimáticas analizadas. Por otra parte, hay que destacar que una cepa resultó tener las cinco enzimas ensayadas.

Tabla 1. Número de actividades enzimáticas presentes en las 164 cepas estudiadas.



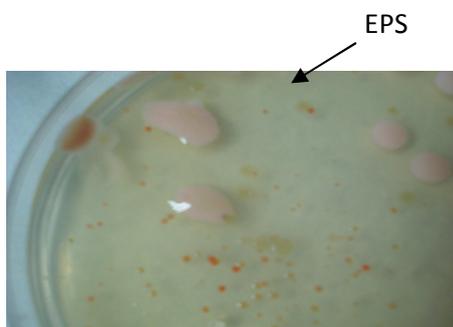
De las 164 cepas seleccionadas 24 mostraron actividad amilasa (15%), 101 tenían actividad DNAsa (62%), 68 pusieron de manifiesto actividad proteasa (41%) y 116 revelaron actividad lipasa (71%). Los resultados indican pues que la actividad lipasa, concretamente sobre Tween 20 es la más predominante dentro del género *Halomonas* al igual que ocurre en el estudio llevado a cabo por Sánchez-Porro y col. (2003)²⁸.

Hasta el momento, hemos seleccionado dos cepas de entre las 164 estudiadas por su alta actividad hidrolítica: la cepa M4-16 con actividad sobre el Tween 20 y la cepa M2-57 por producir una amilasa. Nuestro siguiente objetivo, será estudiar estas actividades hidrolíticas bajo distintos parámetros físico-químicos (concentraciones de sal, temperaturas y pH) con objeto de establecer cuál puede ser su aplicación en procesos biocatalíticos. La cepa M2-57 es

especialmente interesante porque existen pocas cepas de *Halomonas* con tal actividad.

En cuanto a la selección de bacterias productoras de exopolisacáridos, el 15% de las cepas aisladas presentaron un aspecto colonial mucoso como el que se muestra en la Figura 3, lo que indica que son posibles productores de EPS. En este momento estamos analizando la producción de los polímeros de las distintas cepas y hasta la fecha, hemos seleccionado la cepa M3-98 con una producción del 0.6g/L de EPS por lo que en un trabajo futuro estudiaremos su composición química y propiedades físicas para conocer así las posibles aplicaciones biotecnológicas del mismo.

Fig 3: Fotografía de una placa con colonias mucosas posibles productoras de EPS de la cepa M3-98



En cuanto a la actividad antimicrobiana ensayada hasta el momento, no hemos encontrado ninguna cepa de *Halomonas* antimicrobiana, por lo que no descartamos realizar un nuevo estudio mediante otra técnica de ensayo directo de dicha actividad pero utilizando condiciones que recreen unas condiciones similares a las encontradas en la naturaleza. Otra posibilidad es utilizar un rango más amplio de cepas reveladoras.

CONCLUSIÓN

De un total de 365 cepas seleccionadas de las muestras procedentes de agua, suelo y sedimento de Rambla Salada, 164 es decir un 45%, pertenecen al género *Halomonas*; esto indica que *Halomonas* es el microorganismos quimioheterótrofo aerobio cultivable que predomina en Rambla Salada.

Entre las cepas identificadas como *Halomonas* sp. hemos seleccionado 3 con potencial interés biotecnológico: la cepa M4-14 capaz de hidrolizar el Tween 20; la cepa M2-57 productora de una amilasa extracelular; y la cepa M4-38 que sintetiza un exopolisacárido con una alto rendimiento. Estas 3 cepas serán objeto de posteriores estudios para desarrollar su posible aplicación biotecnológica.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado con los proyectos: CGL 2005-05947 y CGL2008-02399/BOS.

BIBLIOGRAFIA

1. Arahal, D.R. and Ventosa, A. (2006). The family Halomonadaceae. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt (eds). *The Prokaryotes*, 3rd edition, vol. 6 (Proteobacteria: Gamma Subclass). Springer, New York, 811-835.
2. Quesada, E., Ventosa, A., Ruiz-Berraquero, F. and Ramos-Cormenzana, A. (1984). *Deleanda halophila*, a new species of moderately halophilic bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 34, 287-292.
3. Quesada, E., Valderrama, M.J., Béjar, V., Ventosa, A., Gutiérrez, M.C., Ruiz-Berraquero, F. and Ramos Cormenzana, A. (1990). *Volcaniella eurihalina* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic non motile gram-negative rod. *Int J System Bacteriol* 40, 261-267.
4. Valderrama, M.J., Quesada, E., Béjar, V., Ventosa, A., Gutiérrez, M.C., Ruiz-Berraquero, F., and Ramos Cormenzana, A. (1991). *Deleanda salina* sp. nov., a moderately halophilic gram-negative bacterium. *Int J System Bacteriol* 41, 377-384.
5. Bouchotroch, S., Quesada, E., Del Moral, A., Llamas, I., and Béjar, V. (2001). *Halomonas maura* sp. nov., a novel moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 1625-1632.
6. Martínez-Cánovas, M.J., Béjar, V., Martínez-Checa, F. and Quesada, E. (2004). *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.
7. Martínez-Cánovas, M.J., Quesada, E., Llamas, I. and Béjar, V. (2004). *Halomonas ventosae* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 733-737.
8. Martínez-Checa, F., Béjar, V., Martínez-Cánovas, M.J., Llamas, I. and Quesada, E. (2005). *Halomonas almeriensis* sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium from Cabo de Gata, Almería, south-east Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 2007-2011.
9. González-Domenech, C.M., Martínez-Checa, F., Quesada, E. and Béjar, V. (2008). *Halomonas cerina* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 803-809.
10. González-Domenech, C.M., Béjar, V., Martínez-Checa, F. and Quesada, E. (2008). *Halomonas nitroreducens* sp. nov., a novel nitrate- and nitrite-reducing species. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 872-876.
11. González-Domenech, C.M., Martínez-Checa, F., Quesada, E. and Béjar, V. (2009). *Halomonas fontilapidosi* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 1290-1296.
12. Amjres, A., Béjar, V., Quesada, E., Abrini, J., and Llamas, I. (2010). *Halomonas rifensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing, halophilic bacterium isolated from Brikcha, a solar saltern in Chefchaouen, Morocco. *Int J Syst Evol Microbiol* (en prensa).
13. Llamas, I., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Martínez-Cánovas, M.J., Molina, I. and Quesada, E. (2010). *Halomonas stenophila* sp. nov., a halophilic bacterium that produces sulphate exopolysaccharides with biological activity. *Int J Syst Evol Microbiol* (en prensa).
14. Garritand, G.M., Bell, J.A. and Lilburn, T. (2005). Class III. Gammaproteobacteria class. nov. In: D. J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley and G.M. Garritand (eds.). *Bergeand's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition, vol. 2 (The Proteobacteria), part B (The Gammaproteobacteria). Springer, New York, 1.

15. -Mata, J.A., Martínez-Cánovas, M.J., Quesada, E., and Béjar, V. (2002). A detailed phenotypic characterization of the type strains of Halomonas species. *Syst Appl Microbiol* 25, 360-375.
16. Arahal, D. R., Vreeland, R. H., Litchfield, C. D., Mormile, M. R., Tindall, B. J., Oren, A., Béjar, V., Quesada, E. and Ventosa, A. (2007). Recommended minimal standards for describing new taxa of the family Halomonadaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 2436-2446.
17. Mellado, E. and Ventosa, A. (2003). Biotechnological potential of moderately and extremeland halophilic microorganisms. In: J. L. Barredo (ed.). *Microorganisms for Health Care, Food and Enzyme Production*. Research Signpost, Kerala, 233-256.
18. Galinski, E. A. and Tindall, B. J. (1992). Biotechnological prospects for halophiles and halotolerant microorganisms. In: R. A. Herbert and R. J. Sharp (eds). *Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles*. Chapman and Hall, New York, pp. 76-114.
19. Ventosa, A. and Nieto, J. J. (1995). Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World J Microb Biotechnol* 11, 86-94.
20. Margesin, R. and Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* 5, 73-83.
21. Quesada, E., Béjar, V. and Calvo, C. (1993). Exopolysaccharide production by *Volcaniella eurihalina*. *Experientia* 49, 1037-1041.
22. Béjar, V., Llamas, I., Calvo, C. and Quesada, E. (1998). Characterization of exopolysaccharides produced by 19 halophilic strains of the species *Halomonas eurihalina*. *Appl Biochem Biotechnol* 59, 77-86.
23. Martínez-Checa, F., Calvo, C., Caba, M.A., Ferrer, M.R., Béjar, V. y Quesada, E. (1996). Efecto de las condiciones nutricionales sobre la viscosidad y la capacidad emulgente del biopolímero V2-7 de *Volcaniella eurihalina*. *Microbiología SEM* 12, 55-60.
24. Calvo, C., Martínez-Checa, F., Mota, A., Béjar, V. and Quesada, E. (1998). Effect of cations, pH and sulfate content on the viscositand and emulsifying activity of the *Halomonas eurihalina* exopolysaccharide. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol* 20, 205-209.
25. Arias, S., del Moral, A., Ferrer, MR., Tallón, R., Quesada, E. and Béjar, V. (2003). Mauran, an exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura*, with a novel composition and interesting properties for biotechnology. *Extremophiles* 7, 319-326.
26. Quesada E., Béjar V., Ferrer M.R., Calvo C., Llamas I., Martínez-Checa F., Arias S., Ruiz-García C., Páez R., Martínez-Cánovas M.J. and del Moral A. (2004). Moderately Halophilic exopolysaccharide-producing bacteria. En *Halophilic Microorganisms*. A. Ventosa (ed) Springer-Verlag, Berlin, Heilderberg, 298-314.
27. Ruiz-Ruiz, C., Srivastava, G., Carranza, D., Mata, J., Llamas, I., Santamaría, M., Quesada, E. and Molina, I. (2010). An exopolysaccharide produced by the novel halophilic bacterium *halomonas stenophila* strain b100 selectively induces apoptosis in human t leukaemia cells. *Appl Microbiol Biotechrs*, (en revisión).
28. Coronado, M.J., Vargas, C., Hofemeister, J., Ventosa, A. and Nieto, J.J. (2000). Production and biochemical characterization of an alpha-amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. *FEMS Microbiol Lett* 183, 67-71.
29. Coronado, M.J., Vargas, C., Mellado, E., Tegos, G., Drainas, C., Nieto, J.J. and Ventosa, A. (2000). The α -amylase gene amyH of the moderate halophile *Halomonas meridiana*: Cloning and molecular characterization. *Microbiology* 146, 861-868.
30. Sanchez-Porro, C., Martín, S., Mellado, E., and Ventosa, A. (2003). Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracelular hydrolytic enzymes. *J Appl Microbiol* 94, 295-300.
31. Rodríguez-Varela, F., Ruiz-Berraquero, F. and Ramos-Cormenzana, A. (1981). Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentration. *Microbiol Ecol* 7, 235-243.
32. Moraine, R. A. and Rogovin, P. (1966). Kinetics of polysaccharide B-1459 fermentation. *Biotechnol Bioengin* 8, 511-524.
33. Ventosa, A., Quesada, E., Rodríguez-Varela, F., Ruiz-Berraquero, F. and Ramos-Cormenzana, A. (1982). Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. *J Gen Microbiol* 128, 1959-1968.
34. Quesada, E., Ventosa, A., Rodríguez-Varela, F. and Ramos-Cormenzana, A. (1982). Types

- and properties of some bacteria isolated from hypersaline soils. *J Appl Bacteriol* 53, 155-161.
35. Nkanga, E.-J. and Hagedorn, C. (1978). Detection of antibiotic-producing *Streptomyces* inhabiting forest soils. *Antimicrob Agents Chemother* 14, 51-59
-