



Universitat de Girona

DIVERSITAT DE BACTERIS VERDS DEL SOFRE EN LLACUNES SALINES I OSMOADAPTACIÓ AMB Nεacetylβlisina

Xavier TRIADÓ i MARGARIT

ISBN: 978-84-691-7410-4

Dipòsit legal: GI-1297-2008

<http://hdl.handle.net/10803/7872>

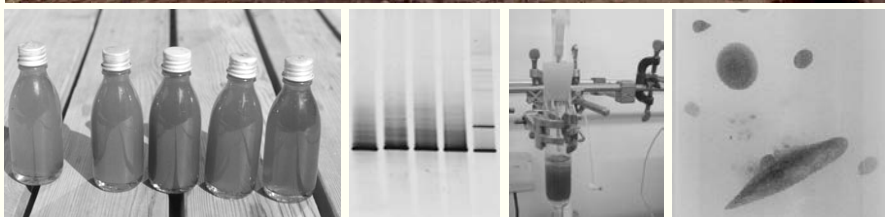
ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Diversitat de Bacteris Verds del Sofre en llacunes salines i osmoadaptació amb N^ε-acetil-β-lisina

*“Diversity of Green Sulfur Bacteria in saline lagoons
and osmoadaptation by N^ε-acetyl-β-lysine”*



Xavier Triadó i Margarit

2008



Universitat de Girona
Institut d'Ecologia Aquàtica

Memòria de la tesi doctoral

**Diversitat de Bacteris Verds del Sofre
en llacunes salines i osmoadaptació amb
N^ε-acetil-β-lisina**

Xavier Triadó i Margarit

2008



Universitat de Girona
Institut d'Ecologia Aquàtica
Secció de Microbiologia

Diversitat de Bacteris Verds del Sofre en llacunes salines i osmoadaptació amb N^ε-acetil-β-lisina

Memòria redactada per Xavier Triadó i Margarit, inscrita al programa de doctorat en Ciències: Química i Física de les Molècules i els Materials, Biotecnologia i Ciències de la Salut de la Universitat de Girona per optar al grau de Doctor en Biologia per la Universitat de Girona.

El present treball s'ha realitzat als laboratoris del grup de recerca en Ecologia Microbiana Molecular de la Universitat de Girona sota la direcció del Dr. Xavier Vila i Portella.

Vist-i-plau
El Director de la Tesi

Autor

Xavier Vila i Portella
Professor titular de Microbiologia

Xavier Triadó i Margarit

Girona, 2008

A la memòria d'en Josep,

als pares, germana i Tresa

Agraïments

Uf! quantes vegades havia pensat en aquest moment...la veritat és que a mesura que anava escrivint tot aquest feix de pàgines he tingut molts moments per fer memòria i pensar amb tots vosaltres - d'aquests moments que perds una mica el fil i et penses a pensar amb cada situació concreta que té relació amb el paràgraf que escrius...-. Només us puc dir gràcies i també dir-vos que em sento feliç d'haver format part d'aquest pessic de la vostra història i que a la vegada formeu part de la crònica que hi ha al darrere d'aquest document. Suposo que ara mateix no tinc massa memòria històrica, i per això m'atreveria a dir que encara tinc empena per fer algunes tesis més..., però això encara forma part d'un futur incert, difícil de predir. De moment aquesta, d'acord?

Una especial atenció a tot el grup de Micro de la UdG. A "Micro de dalt", renoi! quin despatx...A la Marga, sempre apunt per donar ànims en tot moment i un somriure a la vida, gràcies; a la Marta i la Noemi, unes bones amigues per treballar, compartir i sobretot riure de qualsevol cosa, per més insignificant i irrellevant que sigui; a la Laia C., per ajudar a fer les coses més senzilles del que realment pensem que són; a la Geno que sempre està apunt per escoltar i fer-te sentir comprès; Gela, gràcies per tot!; Olaya, quina sensació de plenitud durant les jornades de despatx; a l'Àlex que sempre està apunt per una rialla; en Marc, completament *full energy*; Xavi F., quines elucubracions i converses tant intenses, Javi, gràcies per ésser el meu professor de "poiata"; Gich, el teu esperit positiu s'encomana; a la Laia M., sempre apunt per fer les coses com cal fer-les; Anna, ets de les que sempre veus el got mig ple, continua així!; Mireia i Nuri, un toc de festa! Una menció especial també als *seniors* - al meu entendre, uns grans mestres al laboratori i a la vida -. Catxo, gràcies per la paciència, generositat i bon fer; Bo, com t'ho diria...gràcies per tot! i per obrir les portes de bat a bat! Jesús, el teu entusiasme i empena és d'admirar; Carles, com m'agrada escoltar-te! Finalment, Xavi V., gràcies per fer-me de guia i sobretot per ésser més tossut que jo quan has cregut que feia falta. Amb tu he après molt més que microbiologia.

Records també a la gent de Bioquímica (sempre amb alguna trama divertida per compartir!), a la resta de persones del col·lectiu coffee Girls (quins inicis, eh?!) i també a la gent del “pis de dalt”, és a dir, tota la gent del laboratori de química orgànica que m’han fet sentir ben vingut durant totes les tardes inacabables de *rotovapor*.

Moltes gràcies també a tot el suport que he rebut de la gent dels Serveis Tècnics de Recerca de la UdG. A en Xevi F. per endinsar-se fins molt enllà del que delimita la seva tasca professional. A la Lluïsa M. per l’entusiasme i dedicació. A en Vicenç per les tertúlies tant agradables i instructives.

Also, I would like to thank all people from the Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie (University of Bonn) to give me a warm welcome and to make me feel as a one of the family during my stay.

Finalment...el meu agraïment més important a vosaltres: Pare, Mare, Marta i Tresa. No sabia com dir-ho...això que teniu a les mans ha estat possible gràcies a vosaltres, una abraçada...

Gràcies i que tingueu un bon camí.

Índex

Índex general	11
Presentació	15
Presentation	16
Resum	17
Summary	19
1. Introducció	21
1.1. Els Bacteris Verds del Sofre. Contextualització en el món bacterià i trets característics	23
1.1.1. Característiques generals i grups de Bacteris Fotosintètics Anoxigènics	23
1.1.2. Característiques principals del grup de Bacteris Verds del Sofre	27
1.2. Classificació i microfilogènia: taxonomia filogenètica dels BVS	34
1.3. La vida en presència de sals	40
1.3.1. Tipus de masses d'aigua en relació a la salinitat	40
1.3.2. Organismes halotolerants i halòfils	42
1.3.3. Biodiversitat en ambients salins	44
1.4. Mecanismes d'adaptació a ambients salins	46
1.4.1. Conviure amb la sal, un problema osmòtic	46
1.4.2. Osmoadaptació: el repte de viure en un ambient hostil.	48
1.4.3. Solutos compatibles: la solució més comú	50
1.4.4. El transport de soluts compatibles	57
1.4.5. Aplicacions biotecnològiques dels soluts compatibles	58
1.5. Els Bacteris Verds del Sofre en ambients salins	60
2. Objectius	65
2.1. Objectius (en Català)	67
2.2. Objectives (in English)	70

1. Resultats i discussió	73
Capítol I. Latent populations of Green Sulfur Bacteria in coastal and endorheic salt lagoons of the NE Iberian Peninsula	75
Abstract	77
Introduction	78
Material and methods	80
Results	91
Discussion	108
Addenda	119
Capítol II. Novel Green Sulfur Bacteria phylotypes detected in saline environments: ecophysiological characters versus phylogenetic taxonomy	133
Abstract	135
Introduction	136
Material and methods	138
Results	144
Discussion	155
Addenda	161
Capítol III. Accumulation of N ^ε -acetyl-β-lysine as an osmoadaptation strategy under salt stress conditions in Green Sulfur Bacteria and <i>Bacillus cereus</i>	165
Abstract	167
Introduction	168
Material and methods	171
Results and Discussion	176
Addenda	205

4. Discussió general i propostes de recerca	215
4.1. Les poblacions de BVS en ambients salins eutrofitzats	217
4.2. Efectes de la metodologia en l'estimació de la diversitat de BVS	223
4.3. Classificació taxonòmica versus classificació filogenètica. Consideracions per a la classificació dels Bacteris Verds del Sofre	225
4.4. Idoneïtat de N ^ε -acetil-β-lisina per a les estratègies osmoadaptatives dels BVS en ambients extrems. Noves perspectives en l'estudi dels BVS	229
4.5. Aproximació preliminar als mecanismes de regulació en la síntesi del solut compatible N ^ε -acetil-β-lisina: el model de <i>Bacillus cereus</i>	232
4.6. Evidències de la possible transferència lateral dels gens candidats a la síntesi del compost N ^ε -acetil-β-lisina	237
4.7. Efectes potencials de N ^ε -acetil-β-lisina en l'estabilitat de les macromolècules	238
5. Conclusions	243
5.1. Conclusions (en Català)	245
5.2. Conclusions (in English)	251
Apèndix	257
Metodologia I. Cultiu, aïllament i preservació de bacteris fototròfics anoxigènics	259
Metodologia II. Mètodes de biologia molecular basats en l'estudi del DNA i anàlisi bioinformàtica	273
Metodologia III. Extracció, determinació i quantificació de soluts compatibles	305
Summary tables. Nomenclature conversion table of GSB species. Phenotypic and genetic features of GSB species included in the phylogenetic-taxonomical analysis	313
Referències / References	325

Presentació

Aquesta memòria de tesi doctoral recull els principals resultats obtinguts en el treball desenvolupat per aprofundir en el coneixement del grup de Bacteris Verds del Sofre (BVS) des del punt de vista de la relació amb la salinitat, amb tres perspectives diferents: ecològica, taxonòmica i fisiològica. Els tres capítols del bloc central segueixen el format d'articles científics, els quals han estat enviats a revistes d'àmbit internacional per a la seva publicació. Els articles, tot i conservar el text original, es presenten aquí en una versió ampliada que, amb l'objectiu de millorar-ne la lectura i comprensió, inclouen dades addicionals (en format de taules, figures i Addenda), les quals per motius d'extensió dels documents no poden ésser normalment incloses en els manuscrits enviats a les revistes científiques.

Aquests capítols van precedits d'una introducció on s'ha revisat l'estat actual del coneixement del grup de BVS, amb especial èmfasi als representants halotolerants i halòfils i a la classificació actual del grup. A més, s'hi han detallat diversos conceptes clau relacionats amb la presència de sals en el medi i els tipus d'adaptacions desenvolupades per part dels microorganismes per poder viure en aquests ambients, entre les quals hi pren un paper destacat l'acumulació de soluts compatibles com a mecanisme d'osmoadaptació.

S'ha inclòs també un apartat de discussió general amb un doble objectiu: d'una banda, tractar conjuntament els diferents àmbits de cadascun dels capítols amb el denominador comú de la salinitat; i per altra banda, poder presentar diferents propostes de recerca o qüestions que hom considera que poden ser interessants a l'hora de plantejar nous treballs en relació amb les diferents àrees d'estudi.

A la part final del treball s'ha inclòs un apèndix amb annexos metodològics i taules resum, que més que reproduir els aspectes ja descrits en els capítols anteriors, pretenen poder servir com a elements de consulta, especialment en alguns detalls de la metodologia utilitzada.

Presentation

This thesis compile the main results obtained during the work developed to go more deeply into the knowledge of Green Sulfur Bacteria (GSB) in relation with the salinity of media from three different perspectives: ecological, taxonomical and physiological. The three chapters that constitute the central part follow the scientific articles format; all of them have been submitted to international scientific journals for their publication. The articles, which conserve the text of the original manuscripts, have been presented here as extended versions (including additional tables, figures and Addenda) in order to improve their reading and make them more understanding.

These chapters are preceded by an introduction where the present knowledge of GSB has been reviewed, with special attention to halotolerant and halophilic species and current classification criteria. In addition, several key notions related to the presence of salts in the media and the kind of strategies developed by microorganisms under salt stress, principally the type of compatible solutes accumulated for the osmoadaptation, have been detailed.

A general discussion has been included to serve a double purpose: to group different areas of each chapter from the point of view of salinity; and, on the other hand, to present novel research proposals which could be interesting to develop in future works.

Several methodological annexes and summary tables have been enclosed at the end of this report. These chapters, rather than reproduce and translate the same descriptions include above, pretend to be useful when consulting some methodological aspects or specific features of microorganisms included in the analyses.

Resum

Aquest treball ha permès aprofundir en el coneixement del grup de Bacteris Verds del Sofre (BVS), específicament dels seus representants halotolerants i/o halòfils que es troben presents en ambients salins i hipersalins. S'ha treballat des de tres perspectives d'estudi diferents: una, ecològica, basada en l'anàlisi de la riquesa específica d'aquestes poblacions en els ambients naturals i l'anàlisi de diferents paràmetres ambientals que poden afectar el seu desenvolupament; una altra, en el marc de la taxonomia i classificació del grup; finalment, una altra de fisiològica, a partir de l'estudi del tipus de estratègies utilitzades per a l'osmoadaptació (basades en l'acumulació de soluts compatibles). En aquesta última part, la troballa d'un solut compatible que és nou dins el domini *Bacteria*, detectat inicialment en BVS, i posteriorment també en *Bacillus cereus*, ha determinat que el treball prengué un dimensió més amplia, orientada principalment a l'estudi d'aquesta estratègia osmoadaptativa.

S'han estudiat diferents ambients del NE de la península Ibèrica: principalment, dues llacunes atalassohalines hipersalines (La Salada de Chiprana i La Playa) a la depressió de l'Ebre i una llacuna costanera (La Massona) al Parc Natural dels Aiguamolls de l'Empordà. S'hi han trobat densitats molt baixes de poblacions de Bacteris Verds del Sofre (BVS), tan sols detectables per mitjà de l'aproximació molecular per PCR-DGGE i, complementàriament, per les tècniques de cultiu. Entre els diferents factors ambientals que poden restringir el desenvolupament d'aquestes poblacions de BVS en els seus hàbitats naturals n'hi ha de meteorològics, que afecten la dinàmica limnològica de les llacunes, antropogènics (relacionats amb l'eutrofització) i d'altres que responen a característiques ambientals singulars. Tanmateix, s'han pogut detectar filotips ambientals afiliats amb diferents espècies dels gèneres *Prosthecochloris*, *Chlorobium* i *Chlorobaculum*. Les poblacions de *Prosthecochloris* spp. han estat detectades majoritàriament en les aigües hipersalines i atalassohalines dels sistemes endorreics de La Salada de Chiprana i La Playa; en canvi, els filotips ambientals afiliats amb l'espècie *Chlorobium phaeovibrioides* s'han trobat exclusivament en els ambients costaners. Alhora, s'han aïllat diferents cultius, majoritàriament soques del gènere *Prosthecochloris*, però també de l'espècie *Chlorobaculum parvum*. *Prosthecochloris vibrioformis* ha presentat una elevada cultivabilitat en els rangs amplis de condicions imposades en el laboratori, i ha estat l'espècie majoritàriament recuperada en els cultius d'enriquiment amb independència de l'origen de la mostra.

En les anàlisis de l'afiliació filogenètica de les seqüències del 16S rDNA i de gens concatenats (*fmoA*, *pscB*, *bchG* i *bchU*), ambdues topologies d'arbre han presentat un estructura general similar, d'acord amb les bases plantejades en el context de la classificació vigent (taxonomia filogenètica). Malgrat aquesta estructura consistent, però, els caràcters fenotípics no presenten una distribució coherent amb l'estructura filogenètica; així, el requeriment de sals, un dels únics caràcters fenotípics amb significació taxonòmica en el sistema de classificació actual (taxonòmico-filogenètic), també perd la seva connotació taxonòmica, si es consideren els resultats aportats. Aquest fet evidencia, per tant, unes limitacions en un nivell d'aproximació microfilogenètic a l'hora d'inferir les capacitats fisiològiques o els requeriments ecològics d'un determinat filotip ambiental. Dins del grup de BVS, la diversitat d'organismes halotolerants o halòfils no estaria només restringida a les branques filogenètiques definides per als membres halòfils (grups 1, 2, 4a i 5) sinó que es podria fer extensiva a altres branques (grups 3b i 4b) on només s'hi havien descrit espècies d'aigua dolça.

El solut compatible N^ε-acetil-β-lisina (NeABL) ha estat trobat per primera vegada en representants del domini *Bacteria*: diferents espècies de BVS (dels gèneres *Prosthecochloris*, *Chlorobium* i *Chlorobaculum*) i també *Bacillus cereus*. La composició del conjunt de soluts compatibles acumulats en BVS és homogènia i constituïda per NeABL, β-glutamat, trehalosa i α-glutamat. De forma majoritària, s'han trobat unes elevades ràtios d'acumulació de NeABL a *Bacillus cereus* CECT148^T. Per les seves taxes de creixement elevades i la facilitat de la separació cromatogràfica, assolible amb un sol pas perquè el conjunt de soluts és més simple que en els BVS, es proposa com a microorganisme candidat per a la producció d'elevades quantitats de NeABL. Els gens ortòlegs que presumptivament codifiquen per als enzims lisina-2,3-aminomutasa i β-lisina acetiltransferasa, relacionats amb la síntesi de NeABL, han estat detectats en les seqüències genòmiques de 31 espècies, corresponents a 5 filums diferents (*Euryarchaeota*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*). S'ha trobat que aquests microorganismes presenten una elevada similitud en base a les seqüències peptídiques de la lisina-2,3-aminomutasa, tot i que existeix una gran divergència filogenètica (amb el 16S rDNA com a marcador de referència) entre alguns d'ells. Aquest fet suggereix el possible esdeveniment de diversos fenòmens de transferència horitzontal de gens al llarg de la seva història evolutiva, doncs la majoria comparteixen característiques ecològiques i fisiològiques que ho fan possible (són generalment microorganismes halotolerants o halòfils i anaerobis estrictes) i fins i tot alguns poden presentar associacions sintròfiques.

Summary

This work has allowed us to go deeper into the knowledge of Green Sulfur Bacteria (GSB), specifically those halotolerant and/or halophilic members of the group found in saline and hypersaline environments. The study has been carried out from three different perspectives: one, ecological, based on the analysis of specific richness of GSB populations and the analysis of different environmental factors affecting the development of their populations in natural habitats; another one based on the taxonomical analysis and discussion of the group's classification criteria; finally, one physiological part focused on the study of osmoadaptive strategies (based on the accumulation of compatible solutes). During the performance of this last part, the finding of a novel compatible solute within the bacterial domain, initially detected in GSB, and subsequently in *Bacillus cereus* too, determined an extend of the aims of the work, principally oriented to the study of this osmoadaptive strategy.

Different salt environments of NE Iberian Peninsula have been studied: mainly, two hypersaline athalassohaline lagoons (La Salada de Chiprana and La Playa) located in the Ebro Depression and a coastal lagoon (La Massona) in the Empordà Marshes Natural Park. GSB populations presented very low densities in such environments, which could be only detected by using the DNA-based molecular approach (PCR-DGGE) or cultivation procedures. Both methodological approaches provided complementary information about species composition. Different environmental factors preventing the development of GSB in their natural habitats could be considered: meteorological factors, which might affect on limnological dynamics of the lagoons, anthropogenic factors (related to the eutrophication of water bodies), and others related to singular environmental characteristics. However, several environmental phylotypes affiliated within different species of *Prosthecochloris*, *Chlorobium* and *Chlorobaculum* genera could be detected. As a general trend, *Prosthecochloris* spp. populations have been detected mainly in the hypersaline athalassohaline waters of endorheic inland lagoons (Chiprana Lagoon and Playa Lagoon); in contrast, the environmental phylotypes affiliated within the species *Chlorobium phaeovibrioides* have been exclusively detected in the coastal lagoons. In addition, several GSB strains (mainly belonging to *Prosthecochloris* genus, but also to the species *Chlorobaculum parvum*) have been isolated. *Prosthecochloris vibriiformis* presented a notable cultivability under a wide range of laboratory conditions and was the most commonly found species during the enrichment process, independently of sample origin.

Phylogenetic structures obtained by using 16S rDNA gene sequences and concatenated protein coding genes sequences (*fmoA*, *pscB*, *bchG* i *bchU*) have resulted in similar tree topologies, in agreement to the current classification criteria (phylogenetic-taxonomy). Albeit its regular structure, phenotypic characters do not present a congruent relationship with phylogenetic structure; instead, even the requirements of salts (one of few phenotypic properties found to be significant for the current classification criteria) loses its taxonomical significance if the present results are considered. Therefore, some limitations rise when studying GSB from a microphylogenetic perspective, because physiological capacities or ecological requirements of environmental phylotypes can not be inferred from sequence data. Within GSB group, salt tolerance does not seem to be restricted to specific subgroups, as those defined by the halophilic ones (groups 1, 2, 4a and 5), but is widespread through other phylogenetic branches (groups 3b and 4b), which were considered to contain only freshwater bacteria.

The compatible solute N^ε-acetyl-β-lysine (NeABL) has been found to accumulate in several strains of GSB (of *Prosthecochloris*, *Chlorobium*, *Chlorobaculum* genera) and *Bacillus cereus* under salt stress. Hence, its use for osmoadaptation is described for the first time in the bacterial domain. A similar mixture of compatible solutes including trehalose, α-glutamate, β-glutamate and NeABL has been detected in all tested GSB strains. Generally, *Bacillus cereus* CECT148^T has presented high accumulation rates of NeABL. In addition, the high growth rates and the simplicity of separation procedures (in comparison with GSB) are different advantages which allow us to consider *B. cereus* as a suitable microorganism for the large-scale production of NeABL. Orthologous genes putatively encoding two enzymes involved in NeABL production (lysine-2,3-aminomutase and β-lysine acetylase) have been identified in the genomic sequences of 31 species, distributed into 5 different phyla (*Euryarchaeota*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*). These species show a high genetic similarity according to their lysine-2,3-aminomutase protein sequence affiliation analysis, in spite of the high phylogenetic distance (based on their 16S rDNA gene sequences) among some of the microbial groups represented. Therefore, it could be reasonable to hypothesize that horizontal gene transfer events may have occurred along their evolutionary history, since most of them share ecological and physiological characteristics (generally, they are halotolerant or halophilic and strictly anaerobic microorganisms) and even syntrophic relationships can be established between some of them.

1. Introducció

1. Introducció

1.1. Els Bacteris Verds del Sofre. Contextualització en el món bacterià i trets característics

1.1.1. Característiques generals i grups de Bacteris Fotosintètics Anoxigènics (BFA)

Els bacteris fotosintètics anoxigènics (BFA) fixen el CO₂ en condicions anaeròbiques a partir de l'energia lumínica i sense produir O₂ (fotosíntesi anoxigènica). L'energia lumínica és transmesa per mitjà d'uns pigments característics, les bacterioclороfil·les i també carotenoides, que els hi confereixen coloracions distintives en funció del tipus de pigment (diferents tonalitats de verd, marró, vermell, porpra, ...). Són, per tant, productors primaris, al igual que els cianobacteris, les algues i les plantes superiors, però en difereixen en el seu metabolisme, ja que no utilitzen l'aigua com a font d'electrons sinó que realitzen la fotosíntesi amb el sulfhídric (H₂S), i/o en determinades espècies, altres compostos reduïts del sofre (S⁰, S₂O₃²⁻), l'hidrogen molecular (H₂) i compostos orgànics simples.

Els BFA, tot i la seva condició d'organismes fotosintètics en condicions d'absència d'oxigen i sense generar oxigen, constitueixen un grup de bacteris molt divers en base a les diferències morfològiques, les capacitats fisiològiques i l'afiliació filogenètica. S'hi distingeixen cinc subgrups que es distribueixen en quatre fílums (Imhoff, 1995; Imhoff, 2001a; Madigan, 2001; Imhoff, 2006): (i) els Bacteris Verds del Sofre (*Green Sulfur Bacteria*, *GSB*) que constitueixen un grup filogenètic diferenciat amb categoria de fílum (*Chlorobi*), (ii) algunes espècies del fílum *Chloroflexi* que constitueixen el subgrup de bacteris filamentosos fotosintètics anoxigènics [*Filamentous Anoxygenic Phototrophs (FAPs)*], (iii) *Proteobacteria* fotosintètics els quals es troben repartits en les subdivisions *α-Proteobacteria* (“*Rhodospirillum* i relatius”) i *β-Proteobacteria* (“*Rhodocyclus* i relatius”) en el cas dels Bacteris Vermells No del Sofre (*Purple Non-Sulfur Bacteria*) i *γ-Proteobacteria* en el cas dels Bacteris Vermells del Sofre (*Purple Sulfur Bacteria*), (iv) finalment els *Heliobacteria* pertanyent als *Firmicutes* i estretament relacionats amb la classe *Clostridia*.

Totes els membres d'aquests grups, a excepció dels *Heliobacteria*, són capaços de créixer fotoautotròficament (fixar CO₂ en presència de llum i compostos reduïts del sofre o H₂). Tot i així, en molts casos el metabolisme ftoheterotròfic (compostos orgànics simples com a font de carboni) esdevé el metabolisme preferent. Les principals característiques diferenciadores d'aquests grups es poden trobar resumides a la taula I-1. Una altra característica important i alhora comuna a la majoria de BFA és la capacitat de portar a terme la fixació de nitrogen (reducció de N₂ a NH₃). Tot i que l'abast ecològic de la fixació de nitrogen en BFA no és conegut, l'amplia distribució d'aquests organismes i el fet que moltes espècies són diazotròpiques, suggereix que la contribució en els inputs de nitrogen fixat (en definitiva, en la fertilitat del sòl) pot ser significativa, especialment en els ambients més especialitzats com ara el tapissos microbians i els sòls d'arrossars (Madigan, 1995).

Els bacteris fototròfics del sofre (Bacteris Verds i Vermells del Sofre, pertanyents als grups *Chlorobi* i *γ-Proteobacteria*, respectivament), malgrat les evidents diferències pigmentaries (responsables de la diferent coloració), metabòliques i filogenètiques, han estat considerats sovint com a una unitat a causa de les característiques fisiològiques i ecològiques que tenen en comú. Ambdós tipus de microorganismes es troben en ambients anaerobis exposats a la llum amb presència de sulfhídric (Pfennig, 1967). Cal diferenciar però, tant a nivell d'aparell fotosintètic, de fisiologia, com a nivell filogenètic els bacteris vermells del sofre, constituïts per les famílies *Chromatiaceae* i *Ectothiorhodospiraceae*, (Imhoff, 1992, 1995) dels bacteris verds del sofre (BVS), també anomenats *Chlorobiaceae* (Pfennig, 1967; Imhoff, 1995) (taula I-1). Allà on coincideixen les condicions favorables (llum i sulfhídric), es poden observar macroscòpicament (a partir de les mostres) acumulacions d'aquests bacteris pigmentats. Es poden trobar en una gran diversitat d'ambients: metalímnion i hipolímnion de llacs estratificats, llacunes costaneres, estuaris, fiords, tapissos microbians, sediments anaerobis, llacunes hipersalines, salines, fonts termals sulfuroses, llacs antàrtics, plantes de tractament d'aigües residuals (Pfennig, 1989), fins i tot han estat aïllats a partir d'esponges marines (Imhoff and Trüper, 1976). Es poden desenvolupar de manera espectacular en èpoques concretes del cicle anual de determinats ambients, en els qual les poblacions són observables macroscòpicament per la

Taula I-1. Característiques fenotípiques principals dels diferents grups de Bacteris Fotosintètics Anoxigènics (BFA). *BChl* bacterioclorofil·la, *car* caroté, *Cbt* clorobactè, *CR* centre de reacció, *Isr* Isoreniaratè, *Okn* Okenona, *Rho* rodopinal, *Spr* Espiril·loxantina

Grup	Morfologia	Motilitat	Pigmentació	Estructures especialitzades per a la fotosíntesi	donador electrons en el metabolisme fotolitotròfic	fotoheterotròfia	quimioheterotròfia (principalment a la foscor)
Bacteris Verds del Sofre (<i>Chlorobiaceae</i>)	inconspícua; bacils (curvats), esfèrica amb prosteques	absent en la majoria d'espècies; <i>gliding</i> en <i>Chloroherpeton</i> , vacúols en alguns casos.	BChl <i>c</i> , <i>d</i> , <i>e</i> (BChl <i>a</i>). Carotenoides Cbt, Isr, γ -car i derivats	Chlorosomes: vesícules de pigments antena. Proteïna <i>FMO</i> característica del grup. CR tipus 1.	S ²⁻ , S ⁰ , algunes espècies S ₂ O ₃ ²⁻ , H ₂ , Fe ²⁺ . Grànuls de S ⁰ excretats a l'exterior.	Potencialment totes les espècies.	No descrita.
Bacteris Filamentosos Fotosintètics Anoxigènics (<i>FAPs</i>) (<i>Chloroflexaceae</i>)	Filaments multicel·lulars	<i>Gliding</i> , vacúols en alguns casos.	BChl <i>a</i> , en algunes gèneres BChl <i>c</i> o <i>d</i> . B + γ - car i glucòsids.	Prolongacions de la membrana. Chlorosomes en alguns gèneres; CR tipus 2.	S ²⁻ , H ₂ . Grànuls de S ⁰ excretats a l'exterior.	Totes les espècies. Metabolisme preferent.	Probablement totes les espècies.
Bacteris Vermells del Sofre (<i>Chromatiaceae</i> , <i>Ectothiorhodospiraceae</i>)	Molt diversa: bacilar, oval, esfèrica, vibri, espiral, pleomòrfica	La majoria flagel, algunes vacúols de gas. Altres no mòbils.	BChl <i>a</i> , BChl <i>b</i> . Carotenoides de les sèries de Spr, Okn, Rho.	Sistema membranes internes. Lamelars en <i>Ectothiorhodospiraceae</i> i vesiculars en <i>Chromatiaceae</i> . CR tipus 2.	S ²⁻ , S ⁰ , algunes espècies H ₂ , S ₂ O ₃ ²⁻ , SO ₃ ²⁻ . Grànuls de S ⁰ intracitoplasmàtics en <i>Chromatiaceae</i> .	Moltes espècies.	Algunes poques espècies. També algunes quimiolitotròfia.
Bacteris Vermells No del Sofre	Molt diversa: espiral, bacilar, bacils curvats, mig cercle, esfèrica.	Moltes flagel, no vacúols de gas.	BChl <i>a</i> , també BChl <i>b</i> en <i>α-Proteobacteria</i> . Carotenoides: sèries Spr, Okn, Rho.	Sistemes de membranes internes; lamelars, vesiculars, tubs i piles. CR tipus 2.	En moltes espècies s'utilitza H ₂ , S ²⁻ .	Totes les espècies. Metabolisme preferent.	Moltes espècies. Algunes poques també quimiolitotròfia.
Heliobacteris (<i>Heliobacteriaceae</i>)	Bacils o filaments curts, spirils. Formadors de endospores.	<i>Gliding</i> o flagels, no vacúols de gas.	BChl <i>g</i> . Carotenoides: <i>diaponeurosporene</i>	No observades. CR tipus 1.	Metabolisme fotoautotròfic no observat.	Totes les espècies. Metabolisme preferent.	Totes les espècies.

coloració que pren l'aigua. També és possible caracteritzar i distingir-los entre altres grups d'organismes a partir de l'observació al microscopi òptic o per mitjà de tècniques espectrofotomètriques. Presenten una varietat de morfotips superior a la majoria de grups bacterians, de manera que en alguns casos es poden diferenciar gèneres i espècies per la seva morfologia característica al microscopi òptic, obtenint-ne una classificació amb valor temptatiu. Tot i així, el nombre de caràcters que presenten valor taxonòmic és limitat, i per tant, per a la correcta classificació cal complementar la determinació amb l'anàlisi de l'afiliació filogenètica de la seqüència del gen del 16S rRNA. Aquest mètode de classificació, que ha estat àmpliament acceptat (per extensió també en tot el conjunt dels microorganismes), constitueix en la actualitat el marc de referència (taxonomia filogenètica) a partir del qual s'ha construït el sistema de classificació dels diferents grups de BFA, deixant de banda l'antiga classificació basada en caràcters morfològics i funcionals, és a dir, fenotípics (Garrity and Holt, 2001; Imhoff, 2001a; Madigan, 2001; Imhoff, 2003).

El cultiu en el laboratori de BFA és possible gràcies al desenvolupament i perfeccionament de diferents medis sintètics adequats (Pfennig, 1967, 1989), tot i així, el mètode presenta diverses limitacions. Dificultat en el cultiu i manipulació (durant la qual s'han de preservar les condicions anòxiques). El procés resulta selectiu, ja que són preferentment enriquides les soques que presenten una major adaptabilitat a les condicions artificials imposades al laboratori; per contra, en alguns casos, aquestes soques no són les que predominen en el medi natural, les quals poden presentar alguns tipus de requeriments metabòlics desconeguts. D'aquesta manera, cal combinar diferents estratègies d'enriquiment per afavorir la diversitat de soques aïllades. L'obtenció de cultius axènics no és possible en alguns casos a causa de la interdependència que presenten determinades espècies ((Mendez-Alvarez et al., 2001). Les soques aïllades poden perdre determinades propietats en el cultiu de laboratori com ara vacúols de gas, motilitat o l'agregació característica (Casamayor, 1997).

1.1.2. Característiques principals del grup de Bacteris Verds del Sofre

Els *Chlorobi* (Bacteris Verds del Sofre; GSB de l'anglès Green Sulfur Bacteria) constitueixen un fílum diferenciat amb un important aïllament filogenètic dins el domini *Bacteria*. Els seus membres presenten una arrel filogenètica comuna amb els del fílum *Bacteroidetes* (Overmann, 2001). Dins del grup podem trobar una única classe (*Chlorobia*), ordre (*Chlorobiales*) i família (*Chlorobiaceae*).

Els Bacteris Verds del Sofre (BVS) es caracteritzen per una morfologia cel·lular esfèrica, ovoide, o de vibri, i per la motilitat absent o escassa, ja que no es troben espècies flagel·lades. Alguns gèneres, però, com ara *Ancalochloris* i *Chloroherpeton*; algunes espècies del gènere *Prosthecochloris* i *Chlorobium* (anteriorment classificades dins el gènere: '*Pelodictyon*'), i l'espècie '*Clathrochloris sulfurica*' presenten vacúols de gas que els confereixen la capacitat de moure's en l'eix vertical. L'espècie *Chloroherpeton thalassium* (i espècies relacionades com *Chp. limnophilum*) presenta també la capacitat de desplaçar-se per mitjà d'un tipus característic de moviment lliscant, que rep el nom de *gliding* (Gibson et al., 1984; Eichler, 1988). Totes les soques aïllades presenten una tinció de Gram de tipus negatiu. Per la seva innocuïtat es classifiquen dins el grup 1 de l'escala que estableix la toxicitat i patogenicitat d'una determinada espècie (World-Health-Organisation, 1993). Les principals característiques fenotípiques dels diferents membres del grup es troben resumides en les taules annexades al document (Apèndix, *Summary tables*: taules A4-3, A4-4 i A4-2).

L'aparell fotosintètic dels BVS, com en tots els bacteris fotosintètics, està constituït per tres elements bàsics: el complex antena, els centres de reacció (CR) i la cadena de transport electrònic. En els BVS (com també en els FAPs) els pigments antena, BChl *c*, *d* o *e* i els diferents homòlegs estructurals a més a més de l'antena accessòria o carotenoides, es troben empaquetats dins unes estructures vesiculars particulars de monocapa lipídica que reben el nom de clorosomes i que van ésser descrites per primera vegada com a vesícules de *Chlorobium* (Cohen-Bazire, 1963). La biogènesi d'aquestes estructures característiques així com l'organització dels pigments antena dins del clorosoma en agregats lamel·lars (matrius paral·leles semicristal·lines) han estat descrites recentment (Psencik et al., 2004; Psencik et al., 2006; Hohmann-

Marriott and Blankenship, 2007). Els clorosomes estan units a la cara interna de la membrana citoplasmàtica per mitjà d'un complex proteic que conté petites quantitats de BChl *a*, el qual és anomenat làmina basal (*baseplate*). Aquesta estructura actua d'intermediària en la transferència d'energia cap al CR. Al seu torn, entre la làmina basal del clorosoma i els CR trobem uns complexos pigment-proteïna que són característic i únics del grup de BVS (no detectats en els FAPs). Aquests complexos estan constituïts per una proteïna trimerica anomenada FMO (Fenna-Matthews-Olson) associada a BChl *a* i es relacionen també amb la transferència d'energia d'excitació del clorosoma cap al CR (Fenna et al., 1974). Per la condició d'estructura singular i comuna dins del grup, el gen que codifica per a la unitat monomèrica de la proteïna FMO (*fmoA*) s'ha utilitzat complementàriament al 16S rRNA per a l'anàlisi de les relacions filogenètiques entre els seus membres, i alhora, ha estat útil en l'estudi de les comunitats d'aquests bacteris en els seus ambients d'origen (Alexander et al., 2002; Alexander and Imhoff, 2006).

En relació al tipus de pigment antena que presenten les espècies de BVS es poden distingir dos grups pigmentaris, fàcilment identificables per la diferent coloració (a nivell macroscòpic) que confereixen a les seves poblacions. Els de pigmentació verda que contenen bacterioclorofil·la (BChl) *c* o *d* i clorobactè com a carotenoide principal, a més a més de hidroxiclorobactè (Schmidt, 1978) i γ -carotè en algunes espècies, com *Chp. thalassium* i *Chl. chlorochromatii* (Overmann, 2001; Vogl et al., 2006), i els bacteris de pigmentació marró, que presenten BChl *e* i els carotenoides isorenieratè i β -isorenieratè (Liaan-Jensen, 1965). El contingut de pigments antena en les diferents espècies és elevat, en general un ordre de magnitud superior a les espècies de BPS, i constitueix un dels requisits per a l'adaptació a les baixes intensitats de llum a què poden créixer (Overmann, 2000). A la vegada, la resposta fisiològica dels organismes a condicions limitants d'irradiància es basa en el increment del contingut específic de pigments que es tradueix en una major eficiència de l'aparell fotosintètic (Van Gemerden and Mas, 1995). Les dades ambientals han permès estimar els valors d'intensitats lumíniques (de la regió espectral de P.A.R.; 400-700 nm) necessaris per al desenvolupament de les poblacions de BVS en ambients aquàtics (Vila, 1996); entre el 0,05 % i el 0,04 % de P.A.R. que arriba a la superfície és suficient per a les espècies de pigmentació verda o marró respectivament,

mentre que els BPS i les poblacions epilimnètiques d'algues i cianobacteris – situades per sobre en l'eix vertical de la columna d'aigua- requereixen intensitats lumíniques més elevades (0,1 % i 0,33 % P.A.R. respectivament). L'exemple més destacat de l'adaptació a les baixes intensitats de llum és el de la població de '*Chlorobium phaeobacteroides*' MN1 detectada al mar Negre (Overmann, 1992; Manske et al., 2005) la qual constitueixen la població de (micro)organismes fotosintètics més ben adaptada a les baixes intensitats lumíniques que es coneix. En les aproximacions experimentals a partir de cultius de laboratori es va arribar a conclusions similars (Biebl and Pfennig, 1978); només una quarta part de la intensitat lumínica utilitzada pels BPS és necessària per al desenvolupament de les poblacions de BVS quan creixen a taxes comparables. Alhora gran part de les soques de BVS són inhibides a intensitats de llum elevades, per sobre de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Overmann, 2000).

El sulfhídric (H_2S), font de poder reductor (donador d'electrons), és oxidat a sofre (S^0) el qual és expulsat al medi extracel·lular; aquesta característica es pot observar fàcilment al microscopi òptic per la presència de glòbuls refringents de sofre elemental a l'entorn de les cèl·lules. Després de l'exhauriment del sulfhídric, el grànuls de sofre poden ser oxidats a sulfat (SO_4^{2-}) per moltes de les espècies. Algunes soques també poden utilitzar altres compostos reduïts del sofre com ara el tiosulfat ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) i altres espècies químiques de politionats, com el tetracionat ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$) (Brune, 1989). El metabolisme del tiosulfat es relaciona amb la presència d'un plasmidi identificat en diferents soques de l'espècie *Chlorobaculum thiosulfatophilum*, anteriorment coneguda com a *Chlorobium limicola* sp. *thiosulfatophilum* (Mendez-Alvarez et al., 1994). La relació d'espècies que presenten aquesta capacitat dins el grup de BVS ha estat llistada en l'apèndix *Summary tables* (taula A4-4).

L'assimilació autotròfica del CO_2 es realitza per la via reductiva dels àcids tricarbòxilics, o cicle d'Arnon (Sirevag et al., 1977) el requeriment energètic del qual, en ATP per molècula de CO_2 fixada, és menor en relació al cicle de Calvin (via metabòlica utilitzada en el grup de BPS). Aquest fet, conjuntament amb l'absència d'un flux invers d'electrons en l'obtenció de poder reductor durant el procés fotosintètic, explica els baixos requeriments energètics dels BVS en relació al grup de BPS (Overmann, 2000). Tots els

gèneres presenten espècies potencialment mixotròfiques (concepte equiparat a fotoassimilació o fotolitoheterotròfia), ja que alguns compostos orgànics simples poden ser fotoassimilats en presència de sulfhídric i bicarbonat. Dels 40 substrats provats rutinàriament per a la caracterització de les espècies només el piruvat, acetat i propionat són fotoassimilats (tots alhora o independentment) per les soques analitzades. El mecanisme d'incorporació en el cas de l'acetat es dóna per mitjà de la carboxilació reductiva (per incorporació de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$) en presència dels equivalents de sulfhídric necessaris per a la reducció amb conjunció amb una ferredoxina reduïda (Overmann, 2000, 2001). El sulfhídric n'és el reductor (donador d'electrons) inorgànic que és oxidat a S^0 per un procés de fotòlisi (l'energia de la llum permet l'alliberament dels electrons de la molècula de H_2S) i d'aquí l'equiparació de termes entre mixotròfia i fotoassimilació o fotolitoheterotròfia. Alhora, cap de les espècies pot créixer quimiotròficament amb oxigen molecular com a acceptor terminal d'electrons, capacitat que per contra, és àmpliament estesa en els altres grups de BFA (taula I-1).

D'aquesta manera, la flexibilitat metabòlica dels BVS és limitada si es compara amb la resta de BFA. Anàlisis recents de les seqüències de genoma de BVS han permès estimar que la diversitat de gens presumptivament implicats en el transport de substrats orgànics i la seva regulació seria baixa, i per tant, es pot suposar que la capacitat de resposta als canvis fisicoquímics de l'ambient és limitada (Bryant and Frigaard, 2006).

Per les seves limitades capacitats fisiològiques aquests bacteris només poden créixer allà on coincideixen els gradients, habitualment oposats, de llum i sulfhídric. Els hàbitats on es desenvolupen representen en general ambients majoritàriament planctònics de petites masses d'aigua: llacs estratificats o cubetes meromíctiques, llacunes costaneres i fiords a excepció de la població observada en el mar Negre, que constitueix la massa d'aigua anòxica més gran que es coneix (Overmann, 2000). Tot i així, petites poblacions de BVS poden sobreviure en un rang ampli d'hàbitats diferents, ja que han estat enriquides a partir de llocs i sediments anòxics d'una àmplia varietat d'ambients salins i d'aigua dolça (Trüper, 1992; Van Gemerden and Mas, 1995); en les estructures de tapisos microbians, tot i que en poden ser constituents habituals, generalment també hi presenten densitats de població

baixes, no observables macroscòpicament (Martinez-Alonso et al., 2005), a excepció d'alguns casos particulars (Overmann, 2000).

En els ambients naturals, la disponibilitat de llum esdevé el principal factor limitant per al desenvolupament de les poblacions de BFA (Van Gernerden and Mas, 1995). La intensitat lumínica va disminuint en l'eix vertical de forma exponencial, a mida que els fotons són absorbits o desviats pel medi, constituït per aigua, substàncies dissoltes i elements particulats (Kirk, 1983). Les característiques del medi determinen una major o menor absorció de la llum en les capes d'aigua situades per sobre del metalimnion; i conseqüentment la quantitat de llum disponible per a la fotosíntesi anoxigènica. Alhora, el contingut de partícules de les masses d'aigua, principal responsable de l'extinció de la llum, pot presentar diferents rangs espectrals d'absorció que modifiquen la distribució espectral de la llum de diferent manera, és a dir, el contingut de les capes superiors determina també la qualitat de la llum transmesa (els rangs de longitud d'ona dels fotons que arriben a una certa fondària).

Tot i la dependència de la llum solar per a la fotosíntesi, recentment ha estat descrit l'aïllament d'una soca de pigmentació verda de BVS (GSB1) en les proximitats d'una fumarola hidrotermal, la qual podria aprofitar la radiació geotèrmica emanada de la boca de la fumarola juntament amb els compostos reduïts de sofre que creen un entorn reductor adequat (Beatty et al., 2005). La radiació geotèrmica inclou les longituds d'ona que són absorbides pels pigments fotosintètics (regió del infraroig; $\lambda > 700$ nm). Aquesta descoberta constitueix el primer model descrit de fotosíntesi potencialment independent de la llum solar i alhora representa un increment de la diversitat d'hàbitats en els quals la fotosíntesi és possible. Tot i així, la soca aïllada seria un membre poc abundant en la comunitat microbiana d'aquest hàbitat particular. Les anàlisis filogenètiques han permès classificar-la dins del gènere *Prosthecochloris* i el nom de '*Chlorobium bathyomarinum*' ha estat proposat (sense tenir en compte la nomenclatura vigent).

Si bé, la intensitat lumínica és un factor limitant, la qualitat de la llum (composició espectral) és un dels factors més influents en la composició d'espècies de BVS que predominen en un ambient (Parkin and Brock, 1980;

Montesinos et al., 1983; Vila and Abella, 1994). En general les espècies de pigmentació verda dominen a les interfícies òxic / anòxic poc profundes i per sota de les poblacions de BPS o en ambients distròfics (amb un contingut elevat de substàncies húmiques) on l'espectre de llum està enriquit en longituds d'ona llarga (del vermell i infraroig, $\lambda > 600$ nm) i en una proporció menor de la regió del blau (450 nm). Per contra, les espècies de pigmentació marró es desenvolupen millor on l'espectre de llum és enriquit en la regió central (entre 500 i 600 nm), com passa en les capes profundes de les cubetes anòxiques, especialment quan no s'hi desenvolupen poblacions de BPS. El contingut intracel·lular elevat de carotenoides (isorenieratè i β -isorenieratè) en les espècies marrons (fins a quatre vegades superior respecte les espècies verdes), amb una absorció més intensa en la regió central de l'espectre lumínic, determina una avantatge selectiu en aquestes condicions i es considera una adaptació singular dels BVS de color marró a la fondària (Vila and Abella, 1994).

La concentració de sulfhídric pot afavorir el predomini d'unes determinades estratègies sobre les altres en l'ambient pelàgic, encara que de manera relativa perquè hi ha també altres factors relacionats (intensitat lumínica i temperatura). En general, en capes de la columna d'aigua on les concentracions de sulfhídric són baixes, resulten avantatjades aquelles espècies o soques que presenten sistemes actius o passius per frenar la sedimentació cap a la zona afòtica (Overmann 2001). Així, les espècies formadores de vesícules de gas (Apèndix *Summary tables*: taula A4-4) o aquelles que viuen en simbiosi amb formes mòbils (constituïnt consorcis fotosintètics) han estat observades sovint a rangs de concentració de sulfhídric baixos, entre 0.05 – 2 mM, mentre que la resta de formes predominen en llocs on les concentracions de sulfhídric a la zona fòtica són més elevades (4 - 8 mM). Aquest factor (en combinació amb d'altres) també ha estat utilitzat com a estratègia d'enriquiment selectiu en el laboratori (Abella and Garcia-Gil, 1988; Overmann, 2001). Una descripció àmpliament desenvolupada dels mètodes per a l'enriquiment, aïllament i preservació dels membres dels BVS es pot trobar a l'apèndix *Metodologia I*.

Dins el grup de BVS mereix una menció especial l'establiment de relacions simbiòtiques amb altres procariotes en agregats coneguts com a consorcis

fotosintètics. Diversos BVS, d'ambdós tipus pigmentaris (verds i marrons), han estat trobats associats amb bacteris quimirotòfics. En aquests tipus d'associacions, els BVS (anomenats epibionts) es disposen al voltant d'una cèl·lula central, no pigmentada, generalment flagel·lada o amb vacúols de gas. S'han descrit nou tipus diferents, set dels quals presenten un cèl·lula central flagel·lada (Overmann and Schubert, 2002). Es distingeixen en base al color, la forma dels epibionts i la presència de vesícules de gas (Overmann, 2001). Els consorcis fotosintètics han estat trobats específicament en ambients d'aigua dolça, i per tant, no existeix cap evidència de la seva presència en ambients salins. Recentment ha estat possible caracteritzar l'afiliació filogenètica de la cèl·lula central del consorci fotosintètic "*Chlorochromatium aggregatum*" dins la família *Comamonadaceae* (estretament relacionat amb representants del gènere *Rhodoferrax* i en segon terme *Polaromonas* i *Variovorax*) de la classe β -*Proteobacteria* (Kanzler et al., 2005). Tot i així, no es coneix massa bé el tipus d'interaccions que s'estableixen entre ambdós membres del consorci. En cultius de consorcis intactes s'ha observat però que presenten una resposta escotofòbica (fototaxi), que els epibionts creixen fotolitoautotòficament amb sulfhídric i que el consorci no esdevé independent dels compostos orgànics, ja que la cèl·lula central presenta quimiotaxi per a 2-oxoglutarat (Overmann and Schubert, 2002; Kanzler et al., 2005). A la vegada, la possibilitat d'obtenir cultius purs dels epibionts (de l'espècie *Chlorobium chlorochromatii* aïllada del consorci "*Chlorochromatium aggregatum*") indica que la relació simbiòtica no és necessàriament obligada (Vogl et al., 2006). Cal considerar també en aquestes interaccions els diversos efectes estimulants que tenen les espècies constituents de la microbiota acompanyant detectada en els cultius d'enriquiment (Kanzler et al., 2005). En definitiva, els consorcis fotosintètics representen un model molt útil i a la vegada interessantíssim per a l'estudi de la transducció dels senyals i coevolució entre membres de grups bacterians diferents.

Els BVS, i per extensió els BFA, presenten diferents possibilitats d'aplicació i aprofitament molt interessant tot i que, generalment tant sols representen l'alternativa a altres processos més àmpliament utilitzats. Les seves potencials aplicacions es situen en àmbits molt diferents: tractament d'aigües residuals, utilització com a aliment en la aquicultura i l'aviram, potenciació de

creixement de conreus d'arrossars, utilització de concentrats cel·lulars com a fertilitzants de conreus, eliminació de les olors ofensives provocades per la presència del gas sulfhídric - el qual és tòxic (neurotòxic) per l'home i els animals i fins i tot letal a elevades concentracions -, producció de compostos amb potencial interès per a la indústria farmacèutica, i potencials aplicacions en el procés de producció de combustibles biogènics (Kobayashi and Kobayashi, 1995). *Chlorobium limicola* ha estat utilitzat com a biocatalitzador en la desulfuració (eliminació del sofre, principalment en forma de H₂S) del gas natural i constitueix una alternativa al mètode de Claus (Cork, 1982).

Finalment, cal destacar la valuosa contribució de diferents institucions dedicades a la seqüenciació de genomes que també han treballat amb diferents soques del grup de BVS. Actualment es disposa de diversos genomes complerts (*Chlorobaculum tepidum* ATCC 49652^T, *Chlorobium luteolum* DSM 273^T, *Chl. chorochromatii* CaD3) i altres, en la fase de final d'edició, disponibles en format borrador (*Chl. clathratiforme* DSM 5477^T, '*Chl. ferroxidans*' DSM 13031^T, *Chl. phaeobacteroides* DSM 266^T, *Chl. limicola* DSM 245^T, *Chl. phaeovibrioides* DSM 265, *Prosthecochloris aestuarii* DSM 271^T i '*Chl. phaeobacteroides*' BS1). Els projectes de seqüenciació dels genomes de *Chloroherpeton thalassium* ATCC 35110^T i *Cba. parvum* DSM 263^T (NCIB 8327d) també han estat engegats. La diversitat de soques és representativa de la diversitat de grups filogenètics coneguts dins el grup. Amb tots aquests projectes s'obre un ventall molt ampli de possibilitats d'estudi, tant en el marc de la comparació genètica, com en la recerca de noves capacitats fisiològiques encara desconegudes, i discerniment a nivell genètic de les ja conegudes; a la vegada suposa una ampliació de l'horitzó de coneixement amb la possibilitat de trobar noves aplicacions.

1.2. Classificació i microfilogènia: taxonomia filogenètica dels BVS

El sistema de classificació utilitzat tradicionalment per al grup de BVS distingia 5 gèneres (*Anchalochloris*, *Chlorobium*, *Chloroherpeton*, *Pelodictyon* i *Prosthecochloris*), a més a més del proposat *Clathrochloris*, la classificació del qual havia presentat algunes dificultats en revisions anteriors (Pfennig, 1989). A causa de la homogeneïtat de les seves capacitats fisiològiques, els gèneres es diferenciaven en relació a la morfologia (bacil·lar, esfèrica, ovoide, filamentosa i presència de prosteques), la motilitat,

i la capacitat de contenir vesícules de gas. Alhora es distingien 14 espècies en base a la morfologia i la dotació de pigments fotosintètics (Pfennig, 1989; Overmann, 2000, 2001). La capacitat d'utilització del tiosulfat com a donador d'electrons era considerada com un caràcter amb importància taxonòmica al nivell de subespècie.

La consolidació i acceptació dels nous sistemes de classificació (*New Bacterial Systematics*) basats en l'anàlisi de l'afiliació filogenètica de la seqüència del gen del 16S rRNA, i posterior aplicació en els diferents membres de BVS, va representar un punt d'inflexió en la visió tradicional de la classificació del grup. Si bé en un principi es va pensar que l'enfoc morfològic-funcional seria fàcilment contrastable amb una aproximació filogenètica (Truper, 1987), les primeres anàlisis filogenètiques, amb un nombre significatiu d'espècies i gèneres representats (Overmann, 1997), van denotar un desajust entre els caràcters fenotípics, utilitzats tradicionalment per a la classificació, i l'afiliació filogenètica de les soques analitzades. En aquestes anàlisis la similitud observada entre els diferents representants és elevada ($> 90.1\%$, $K_{nuc} < 0.11$) a excepció de *Chloroherpeton thalassium* (85.5–87 %) que constitueix la branca més aïllada dins de la radiació del grup. Amb homologia amb els resultats de comparació de les seqüències del 16S rDNA, els valors de % molar de G + C van confirmar l'origen filogenètic diferent de les soques representades en les diverses branques de l'arbre filogenètic. Anàlisis posteriors realitzades amb un major nombre de seqüències del gen del 16S rRNA i altres del gen *fmoA*, de la proteïna Fenna-Matthews-Olson (Alexander et al., 2002), han permès observar una elevada congruència de les relacions filogenètiques determinades amb ambdós gens. Aquest fet confereix alhora una major robustesa als resultats obtinguts a partir del gen del 16S rRNA. Coetàniament (Figueras, 2002; Garcia-Gil, 2003), s'han estudiat també altres gens funcionals implicats en l'aparell fotosintètic (gens *pscB* i *bchG* respectivament) i s'han obtingut estructures filogenètiques en desacord a les del 16S rDNA, les quals han estat interpretades com a històries evolutives diferents dels components analitzats de l'aparell fotosintètic. Tot i així, el nombre de soques utilitzat per a aquestes anàlisis hauria estat presumiblement massa baix o poc representatiu dels gèneres coneguts del grup de BVS.

Malgrat que s'ha observat una bona correlació entre les dades genètiques aportades per diferents autors (Figueras, 1997; Overmann, 1997; Mendez-Alvarez et al., 2001; Alexander et al., 2002), la majoria de caràcters fenotípics no presenten significació taxonòmica en aplicar els criteris de la classificació filogenètica. Aquest fet planteja un problema en la classificació del grup, ja que qualsevol taxonomia basada en dades filogenètiques hauria de mostrar una bona consistència en relació als caràcters fenotípics utilitzats en la classificació (Vandamme, 1996). Així, entre els constituents del grup és comú trobar heterogeneïtat de caràcters fenotípics entre filotips similars i similituds entre filotips distants. En aquest punt cal considerar la possibilitat d'esdeveniment de diversos processos de transferència lateral de gens com un dels factors claus a l'hora d'explicar-ne les causes (Bryant and Frigaard, 2006).

A partir del desajust observat entre els caràcters fenotípics i l'afiliació filogenètica s'ha plantejat una nova classificació del grup basada en les seqüències dels gens del 16S rRNA i *fmoA* suportada per el contingut G + C i les seqüències signatura, a més d'uns pocs caràcters fenotípics (Imhoff, 2003); la discussió preliminar que establia les bases del nou sistema de classificació ja va ésser realitzada en treballs anteriors (Alexander et al., 2002). Per al sistema de classificació vigent ha estat necessària la reorganització d'algunes espècies i la descripció del nou gènere *Chlorobaculum* a més a més de les correccions realitzades en els gèneres *Prosthecochloris* i *Chlorobium*; el gènere *Chloroherpeton* s'ha mantingut intacte. En aquests estudis només s'han considerat les espècies o soques descrites en cultiu pur per a les quals es coneixia la seqüència del 16S rDNA. La informació disponible dels epibionts de consorcis fotosintètics tampoc hi està inclosa perquè no s'havia descrit encara cap aïllat en cultiu pur. Tot i així, actualment se sap que les seqüències d'epibionts conegudes s'afilien dins el gènere *Chlorobium*, en el qual formen grups distants a la resta de soques de vida lliure (Frostl and Overmann, 2000; Glaeser and Overmann, 2004; Vogl et al., 2006). D'aquesta manera, en estudis recents ha estat possible obtenir en cultiu pur un epibiont simbiòtic el qual s'ha classificat com a una nova espècie dins del gènere: *Chlorobium chlorochromatii* (Vogl et al., 2006). La correlació entre la nomenclatura antiga i la vigent per a la majoria de les soques descrites en cultiu pur de BVS es pot consultar a l'apèndix *Summary tables* (taula A4-1).

Entre els pocs caràcters fenotípics amb significació taxonòmica dins del sistema de classificació vigent cal considerar els requeriments de sals (Alexander et al., 2002; Imhoff, 2003); alhora la composició de lípids i àcids grassos també ha estat considerada útil (Imhoff and Bias-Imhoff, 1995). En relació al comportament en medi salí (tolerància i/o requeriment), es considera que les soques relacionades filogenèticament presenten uns requeriments de sals similars (Overmann, 2000), i totes les seqüències obtingudes a partir d'ambients salins, amb localitzacions geogràfiques molt diverses, queden agrupades dins de les branques definides per les espècies marines de BVS (Imhoff, 2001b; Alexander et al., 2002); a la vegada les espècies halòfiles no ha estat observades en ambients d'aigua dolça (Gorlenko, 1988). Aquestes constatacions han estat útils a l'hora de reforçar el brancom observat en l'estructura filogenètica del grup, la qual ha estat utilitzada com a referència en l'elaboració del sistema de classificació vigent.

Així, actualment es distingeixen quatre grups filogenètics els quals també es consideren vàlids per explicar el comportament diferenciat en medi salí dels seus membres (Alexander et al., 2002a) (figura I-1). El *grup 1*, el més significativament separat de tots els altres i amb un elevat nombre de seqüències signatura conté, en la seva totalitat, soques amb requeriments de sals. Aquestes observacions, tot i estar basades en poques dades fisiològiques, han portat a hipotetitzar sobre el possible origen del grup en els ambients marins (Imhoff, 2001b; Mendez-Alvarez et al., 2001; Alexander et al., 2002) i els seus membres han estat considerats com a *true marine* (halòfils “verdaders”) BVS. En tot cas, una característica integradora de tots els membres d'aquest grup seria en el seu origen, ja que tots han estat aïllats a partir d'ambients marins i hipersalins (Vila et al., 2002). Tots els integrants d'aquesta branca han estat assignats al gènere *Prosthecochloris* en el sistema de classificació actual.

Els membres dels *grups 2 i 3*, estretament relacionats a nivell filogenètic, han estat inclosos dins un mateix gènere (*Chlorobium*), però, si bé tots els membres del *grup 2* presenten requeriments de baixes concentracions de sals

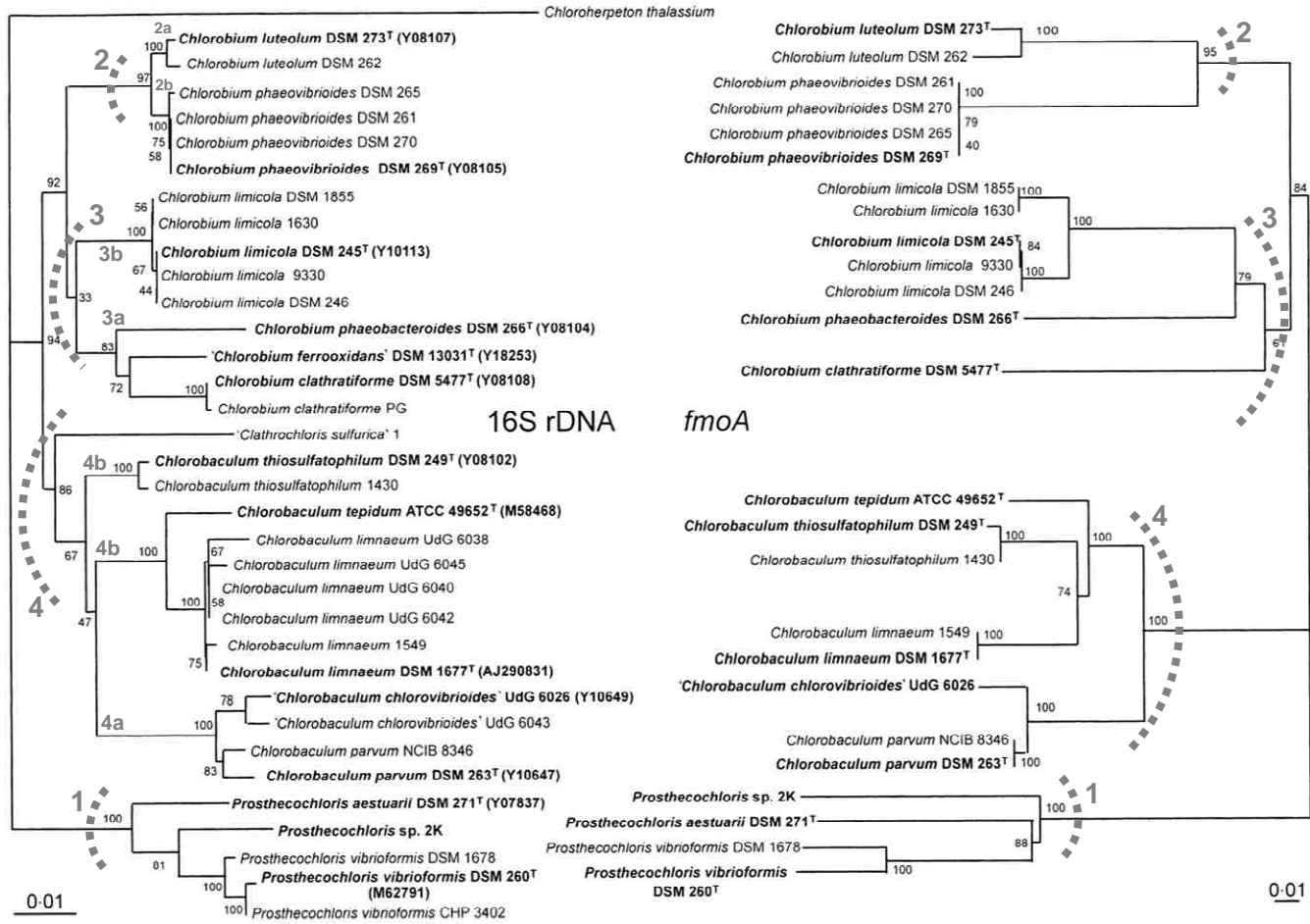


Figura I-1.

Figura I-1. Anàlisi de l'afiliació de seqüències dels gens del 16S rRNA i *fmoA* realitzades per Alexander *et al.* (2002) i presentades per Imhoff (2003) utilitzant els nous criteris de classificació dins el grup de BVS. Els diferents grups filogenètics proposats per aquests autors es detallen a l'inici de l'embranchement que defineix cadascun dels grups. Es dona una elevada correlació entre ambdues topologies.

(> 1% NaCl), aquests requeriments no s'han observat en les soques constituents del *grup 3* (se les considera d'aigua dolça). En base a la topologia de l'arbre filogenètic i les diferències en les seqüències signatura de les seqüències de FMO s'han pogut distingir encara dos subgrups (a, b) en cadascun dels grups (2 i 3) però no tenen més transcendència que la que mostra el marc de la comparació genètica. El *grup 4*, clarament separat dels altres a nivell genètic, ha estat assignat al nou gènere *Chlorobaculum*. Dins d'aquest grup també és possible fer la distinció entre els subgrups *4a* i *4b* en base als paràmetres anteriors (topologia de l'arbre filogenètic i les diferències en les seqüències signatura), però alhora pels requeriments de sals que presenten els seus constituents: les soques incloses en el *grup 4a* presenten requeriments de baixes concentracions de sals, mentre que les del *grup 4b* són estrictament d'aigua dolça.

Estudis recents realitzats per (Alexander and Imhoff, 2006) amb mostres de quatre ambients salins (tres de marins i un d'hipersalí) han permès reiterar les postulacions d'estricta separació entre els BVS originaris d'ambients marins i els d'aigua dolça. Totes les seqüències van afiliar-se a branques prèviament establertes per a les soques halòfiles. Tot i així, de la gran quantitat de clons recuperats, el gènere *Prosthecochloris* s'ha mostrat com a predominant a excepció d'algunes poques seqüències afiliades als representants del *grup 4a*. En aquest treball no s'ha obtingut cap representació de les soques halòfiles presents en el gènere *Chlorobium* (*grup 2*), les quals han estat trobades regularment en hàbitats costaners marins (Truper, 1970; Puchkova, 1984; Figueras, 2002), com tampoc de l'espècie *Prosthecochloris vibrioformis*, la qual ha estat trobada freqüentment en ambients marins i hipersalins i es coneix a partir de cultius purs (Pelsh, 1936; Vila et al., 2002). Coetàniament, en mostres fòssils de sediments marins (sapropel del Mediterrani oriental) ha estat possible recuperar seqüències que s'afilien amb filotips típicament considerats d'aigua dolça o d'altres d'aigua salabrosa (Coolen and Overmann,

2007). Aquestes troballes però, han estat interpretades com a resultat de la sedimentació de microorganismes al·lòctons, possiblement d'ambients costaners adjacents, més que per la presència de poblacions de BVS autòctones en el moment de la formació dels sediments.

1.3. La vida en presència de sals

1.3.1. Tipus de masses d'aigua en relació a la salinitat.

Les característiques dels ambients salins i hipersalins, com a hàbitats per als organismes halòfils i halotolerants (principalment procariotes), són primerament definides en relació al contingut total de sals però també a la composició iònica (Rodríguez-Valera, 1993; Oren, 2000).

Els rangs i criteris utilitzats per a la classificació de les masses d'aigua (com també dels organismes que s'hi desenvolupen) en relació a la concentració de sals (en percentatge de sals dissoltes per volum d'aigua) són objecte de controvèrsia, ja que existeixen diferències apreciables entre els valors límits dels intervals definits per a cada tipologia, segon les fonts.

En general un ambient aquàtic es considera de caràcter salí si presenta una concentració de sals $> 0,3\%$ (Rodríguez-Valera, 1993), tot i que altres classificacions fan referència a tant sols una concentració $> 0,05\%$ (Por, 1972) o $> 0,02\%$ (Margalef, 1983). Per sota d'aquest límit variable tenim aigua dolça. Per sobre, i fins al $2,9\%$ -o el 2% (Imhoff, 2001b) - s'utilitza el terme d'aigua salabrosa. Al voltant dels valors de concentració de sals observats en les masses d'aigua oceànica ($3,0 - 3,5\%$) es defineix la categoria d'aigua marina, que a la vegada pot presentar un rang de concentracions variable; generalment considerada entre el 3 i 5% , però en alguns casos fins a un interval de $2 - 7\%$ (Por, 1972; Imhoff, 2001b). Les aigües de concentracions superiors a les definides per a l'aigua marina generalment es consideren hipersalines, si bé el límit inferior no és clar, i varia entre el 3 i 12% (Edgerton and Brimblecombe, 1981; Rodríguez-Valera, 1993). Per definir aquest límit, un dels arguments utilitzats freqüentment és el valor de concentració a partir del qual s'observa una disminució dràstica de la diversitat d'espècies. En altres casos es considera que a concentracions elevades ($10 - 12\%$) la salinitat és el principal factor condicionant de la biota present en un determinat hàbitat, ja que aquesta no varia en funció de la

localització geogràfica (Rodríguez-Valera, 1993). Dins de la categoria d'aigües hipersalines també podem trobar diferents matisos en relació al tipus d'organismes que s'hi desenvolupen. Generalment, en ambients d'origen marí, és possible establir un límit superior de resistència de totes les formes biològiques al voltant del 35% de salinitat, coincidint amb les concentracions en què el NaCl precipita (Dassarma and Arora, 2002).

Un altre tipus de terminologia paral·lela és la que s'estableix amb el terme salmorra, en relació a les masses d'aigua d'una concentració > 5%, tot i que en un context col·loquial s'equipara a solucions saturades (de concentració molt més elevada).

Els criteris de classificació més afins als que s'utilitzen en aquest treball s'especifiquen a la figura I-3 conjuntament amb les diferents categories d'organismes segons el seu òptim de salinitat.

En funció de la composició iònica, podem classificar les masses d'aigua en relació a l'origen i la naturalesa de les sals. Així és possible diferenciar entre aigües talassohalines i atalassohalines; comunament s'utilitza també aquesta terminologia en relació a l'ambient. Les aigües talassohalines (del grec *thalasso*; el mar), en un sentit ampli, són les que presenten una composició de sals similar a l'aigua de mar (Brock, 1979); en un sentit estricte, són les que estan relacionades en un origen amb el mar i subjectes a l'evaporació (Rodríguez-Valera, 1993; Oren, 2000). L'exemple més comú d'aquest últim cas seria una llacuna costanera amb aportacions periòdiques d'aigua de mar. L'altre tipus d'aigües salades, les atalassohalines, deriven de la dissolució de les sals d'origen continental. En la majoria dels casos el resultat n'és una composició diferent de la que presenta l'aigua de mar (per falta d'algun ió o per una proporció diferent).

Les concentracions de sals d'un determinat ambient es poden expressar de diferents formes: molaritat (mol l^{-1}), molalitat (mol kg^{-1}), pes de sals / volum de solució – generalment en g per 100 ml (%), o en g l^{-1} , o pes de sals / pes de solució – en g Kg^{-1} (‰). Així, generalment els limnòlegs i oceanògrafs es refereixen a les concentracions de sals dels ambients amb unitats de ‰, mentre que la composició de medis es descriu en unitats de g l^{-1} o mol l^{-1} ; en

els treballs de fisiologia és comú també expressar les concentracions en %. En relació al tipus d'unitats, existeix una falta d'equivalència entre les relacions “pes de sals / volum de solució” i “pes de sals / pes de solució”, sobretot quan es refereixen a elevades salinitats (Oren, 2002b). En el present treball s'han utilitzat les unitats en la manera especificada, si bé en alguns casos s'ha optat per descriure els ambients en % per facilitar la comprensió i comparació de salinitats entre l'ambient i les condicions de cultiu provades en el laboratori.

1.3.2. *Organismes halotolerants i halòfils*

En funció del grau de tolerància o de requeriment de sals es poden distingir diferents categories d'organismes en relació a la seva ecofisiologia. En un context general es defineixen diferents graus de dependència amb les sals del medi (figura I-2). En primer lloc, podem identificar organismes *halotolerants*, els quals no requereixen presència de sals per al creixement, però poden créixer i fins i tot esdevenir competidors forts en ambients de salinitat elevada, des d'ambients marins fins a hipersalins (Oren, 2000; Imhoff, 2001b). En segon lloc, els organismes *halòfils*, els quals presenten uns requeriments específics de sals, és a dir, l'òptim de creixement es dona en presència de sals. En funció de la concentració de sals del seu òptim es diferencia entre *halòfils febles o discrets* (de l'anglès *slightly halophilic*), *halòfils moderats* i *halòfils extrems*. Existeixen diferents esquemes de classificació que difereixen en els límits de concentració de sals en què s'estableixen les diferents subdivisions (Larsen, 1962; Kushner, 1978, 1985; Caumette, 1993; Imhoff, 1993; Imhoff, 2001b). Aquest límits, en tant que artificials, responen en alguns casos a la tipologia i amplitud (en relació als rangs de salinitat on es desenvolupen) del conjunt d'organismes estudiats. Algunes de les classificacions, també utilitzades en aquest treball, es poden trobar recollides a la figura I-3. Tot i que aquests sistemes de classificació estan bàsicament pensats per al comportament respecte del clorur de sodi (NaCl), caldria considerar també altres ions, sobretot en ambients atalassohalins (Edgerton and Brimblecombe, 1981).

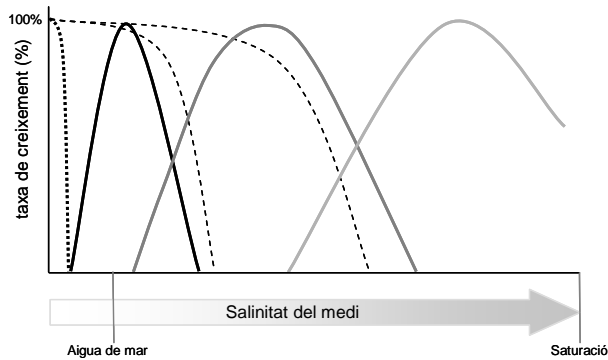


Figura I-2. Taxa de creixement relatiu en relació a la concentració de sals dissoltes en el medi (generalment NaCl). El grau de tolerància o de requeriment de sals que poden presentar els diferents organismes permet distingir diferents categories: organismes d'aigua dolça, no-halòfils (punts), halotolerants amb diferents graus de tolerància (ratlles), halòfils febles (línia contínua negra), halòfils moderats (línia contínua gris fosc) i halòfils extrems (línia contínua gris clar).

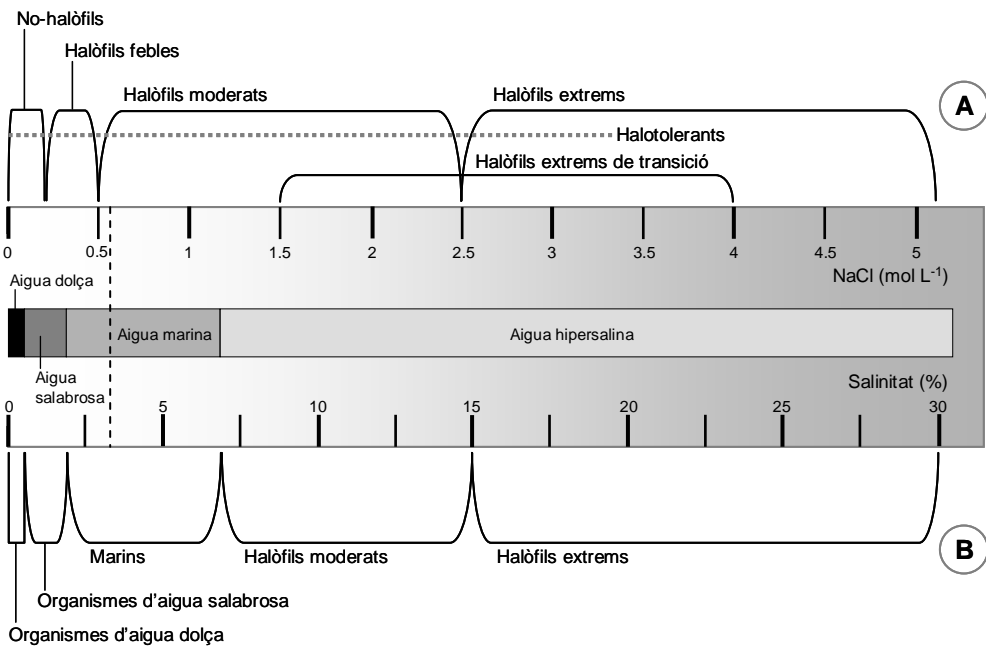


Figura I-3. Classificació dels (micro)organismes en relació a les concentracions de sals òptimes per al creixement. Es representen la classificació proposada per Kushner (1978, 1985) en A i la classificació utilitzada per Imhoff (2001) en el context dels bacteris fotosintètics anoxigènics en B. El valor de la salinitat mitjana de l'aigua marina es marca amb la línia discontinua vertical.

Comunament s'empra el terme *eurihali/ina* per fer referència als organismes d'origen marí amb capacitat per adaptar-se a un ampli rang de salinitats, i el terme *estenohali/ina* per parlar dels organismes adaptats a viure entre límits propers de concentracions de sals. Tot i així, aquesta terminologia no s'utilitza massa en microbiologia, però sí en altres camps com ara la limnologia i l'oceanografia. Per altra banda cal considerar també el terme *osmòfil* per anomenar els organismes capaços de desenvolupar-se en un medi que presenta elevades concentracions de sucres (sacàrids).

1.3.3. Biodiversitat en ambients salins

Els sistemes salins són generalment habitats per una varietat de formes de vida limitada (en queden exclosos la gran majoria d'organismes multicel·lulars; sobretot animals i vegetals), però no pas per això poc diversa i a voltes sorprenent. Diferents tipus d'organismes han estat observats en la totalitat del rang de concentracions de sals trobades en els ambients naturals, des d'ambients d'aigua dolça fins a hipersalins de caràcter extrem. Dels diferents treballs desenvolupats en el context de la salinitat són d'especial interès aquells que es focalitzen en l'estudi d'organismes que creixen òptimament a concentracions elevades, principalment per l'interès associat a les possibles aplicacions biotecnològiques.

La diversitat circumscriu als ambients salins i hipersalins és majoritàriament deguda a la diversitat de les seves comunitats microbianes adaptades a les condicions d'estrès salí (Oren, 2002a). Així, per exemple dins els eucariotes multicel·lulars només han estat descrites unes poques espècies capaces de tolerar les condicions d'hipersalinitat (Dassarma and Arora, 2002). El límit superior per a un organisme vertebrat s'estima al voltant de 1 M de NaCl (per exemple en algunes espècies de peixos del gènere *Tilapia*). Alhora un nombre limitat de gèneres vegetals (angiospermes) es presenten en qualitat de halòfils obligats o facultatius; tant en relació a sols salins com a sistemes aquàtics epicontinents hipersalins (Barceló et al., 1980). Més destacable és el cas dels invertebrats; diversos grups originaris de les aigües epicontinentals, entre els quals hi ha representants de *Rotifera*, *Anostraca*, *Copepoda* i *Ostracoda* i diversos grups d'insectes (principalment dels ordres *Diptera* i *Coleoptera*), han presentat una adaptabilitat més que notable en ambients de caràcter hipersalí (Margalef, 1983). Una sinopsi de la diversitat d'organismes halòfils

representativa de la totalitat d'organismes vius (unicel·lulars i multicel·lulars) va ésser publicada per DasSarma i Arora (2002).

La diversitat de microorganismes halotolerants i halòfils a la natura és important tant a nivell filogenètic com fisiològic (Oren, 2002a). En primer lloc, diferents micoorganismes halòfils i halotolerants pertanyen als tres dominis dels organismes vius: *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. D'entre els que presenten un caràcter marcadament halòfil cal destacar-ne els següents grups. En el domini dels *Archaea*, la família dels *Halobacteriaceae*, halòfils extrems aerobis freqüentment observats en ambients de caràcter extrem (responsables en part de la coloració vermellova d'aquest ambients), i diferents representants de les famílies de metanogènics (anaerobis) dins dels *Euryarchaeota*. En el domini *Eucarya*, els representants són escassos, però destaca un organisme halotolerant: l'alga verda (fílum *Chlorophyta*) del gènere *Dunaliella*, el qual es troba àmpliament distribuït en els ambients salins i hipersalins (on pot desenvolupar-se fins a densitats elevades). En el domini *Bacteria* és possible trobar representants halòfils i halotolerants dispersats en tots els fílums i ordres coneguts (Oren, 2002b), amb diferents capacitats fisiològiques: quimioheterotrofs aerobis i anaerobis, fotoautotrofs i ftoheterotrofs (oxigènics i anoxigènics) i quimiolitotrofs (Ollivier et al., 1994; Oren, 1999). D'entre tots aquests, per les relacions ecològiques amb el grup de BVS, caldria destacar-ne la resta de grups de bacteris fotosintètics. Entre els cianobacteris, hi destaquen el gènere *Halospirulina* (Nübel et al., 2000), el grup *Halothece* (Garcia-Pichel et al., 1998) i l'espècie cosmopolita *Microcoleus chthonoplastes* (Garcia-Pichel et al., 1996). Entre els bacteris fotosintètics anoxigènics cal destacar el grup *Halorhodospira* – *Ectothiorhodospira* (Imhoff, 2001b; Imhoff, 2001a). En un sentit ampli, però, entre els halòfils del domini *Bacteria* sovintegen més les formes moderades que les extremes.

Per contra, la diversitat dels diferents tipus de metabolismes decreix en relació a l'augment de la salinitat en el medi. El llindar de concentració de sals en el qual un determinat metabolisme deixa de donar-se (situació que es resol amb l'absència de les formes microbianes respectives) està correlacionat amb la quantitat d'energia generada i el cost energètic de l'adaptació osmòtica (Oren, 1999). Aquest és el cas de determinats metabolismes de tipus dissimilatori,

com ara la nitrificació autotròfica (tant en els oxidadors d'amoni com en oxidadors de nitrit), la metanogènesi a partir d'hidrogen o acetat i el metabolisme d'oxidació d'acetat que presenten alguns sulfat-reductors.

1.4. Mecanismes d'adaptació a ambients salins

1.4.1. Conviure amb la sal, un problema osmòtic

L'estrès osmòtic pot ésser un dels factors ambientals restrictius en el desenvolupament dels organismes, degut a concentracions elevades de sals o soluts no iònics en el medi extracel·lular que provoquen un dèficit d'aigua (Galinski, 1995). És en essència un problema de disponibilitat d'aigua, definida en termes físics com a activitat de l'aigua (A_w) (Madigan et al., 1997).

L'esdeveniment d'aquest procés respon a la semipermeabilitat de les membranes biològiques, que deixen passar a través seu partícules de dissolvent (aigua), però no de soluts. Així, si dues dissolucions de diferent concentració (en relació al medi intra- i extracel·lular) estan separades per una membrana semipermeable, la tendència natural a igualar-se les concentracions només pot ésser satisfeta mitjançant el pas de dissolvent (aigua) des de la dissolució més diluïda cap a la més concentrada. Aquesta difusió s'anomena osmosi i el qualificatiu d'osmòtic fa referència a aquest fenomen o mesures derivades d'aquest. En una situació d'equilibri el citoplasma presenta una concentració de soluts lleugerament major a la que es troba en el medi extracel·lular, de manera que l'aigua tendeix a difondre cap al interior de la cèl·lula (balanç d'aigua positiu) amb l'objectiu de generar la turgència cel·lular necessària per permetre l'extensió, el creixement i divisió (Sleator and Hill, 2001). Per contra, en un ambient amb baixa activitat de l'aigua (hiperosmòtic), com són els ambients salins, hi ha una tendència de sortida de l'aigua intracel·lular (exosmosi) amb el risc associat de plasmòlisi (contracció del citoplasma deguda a la pèrdua d'aigua). En un context més general les adaptacions relacionades amb la compensació de l'estrès osmòtic també poden incloure aquelles que es donen en un ambient hipoosmòtic, en el qual cal impedir l'entrada d'aigua per evitar una situació de turgència (figura I-4). També es pot utilitzar aquest concepte quan es dona un augment o davallada sobtada de la concentració de soluts en el medi. Aquestes àrea d'estudi no

s'ha tractat en el present treball, ja que només s'ha treballat en l'anàlisi de les estratègies desenvolupades per al manteniment de les funcions cel·lulars en situació de dèficit hídric (A_w baixa), com les que es poden donar en masses d'aigua amb concentracions de sals elevades i relativament constants en el temps.

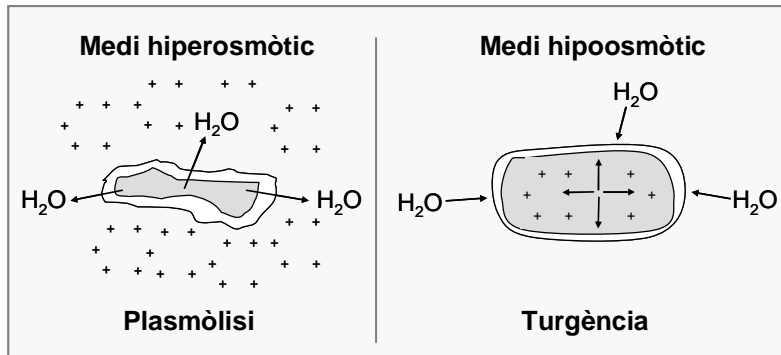


Figura I-4. Processos d'osmosi en medis de diferent concentració de soluts. En un medi hiperosmòtic cal evitar la pèrdua d'aigua mentre que en un medi hiposmòtic cal regular-ne l'entrada.

Generalment s'utilitza el terme osmolaritat en referència a la mesura de la concentració d'una dissolució aquosa osmòticament activa. Aquesta mesura depèn del nombre de partícules en dissolució (ions o unitats de solut), però és independent del tipus de partícules (també del nombre de càrregues). Així quan parlem d'un medi d'elevada osmolaritat es pot equiparar a una solució d'elevada concentració de soluts, amb una baixa activitat de l'aigua, ja sigui per la presència de sals o d'altres compostos no iònics (sucres, saba dels vegetals, mel, entre d'altres). En relació directa amb aquesta mesura quantitativa apareix també el paràmetre de pressió osmòtica (mesura proposada per Jacobus Henricus Van't Hoff) que permet quantificar la pressió que cal exercir sobre la dissolució per evitar l'osmosi. Alhora, cal diferenciar dels termes anteriors el concepte de força iònica, el qual inclou la concentració dels ions en solució i la càrrega que presenten. Dins el citoplasma cal mantenir unes condicions constants per aquest paràmetre, ja que per contra es podrien veure afectades l'estructura i plegament de proteïnes (directament relacionades amb l'activitat enzimàtica) (Sleator and Hill, 2001).

1.4.2. *Osmoadaptació: el repte de viure en un ambient hostil.*

En un sentit ampli es defineix com a *osmoadaptació* el conjunt de capacitats adquirides, tant a nivell fisiològic com genètic, per a l'adaptació a un ambient amb elevada osmolaritat (Galinski, 1995), si bé el terme *osmoregulació* ha estat freqüentment utilitzat de manera similar (Brown et al., 1986). En altres ocasions, s'ha definit aquest últim, en un sentit més estricte, per referir-se a les respostes de regulació implicades en l'actuació dels sensors que monitoritzen els canvis ambientals i els transformen en senyals fisiològics per a la cèl·lula (Reed, 1984).

Per poder sobreviure i créixer en un medi d'elevada osmolaritat és necessari disposar dels mecanismes adequats per poder mantenir un equilibri osmòtic a través de la membrana (Brown, 1976). A la natura, es coneixen dos tipus principals d'estratègies per resoldre aquesta situació: una basada en l'acumulació de sals dins del citoplasma i l'altra basada en l'acumulació de soluts orgànics (Truper and Galinski, 1989; Galinski and Trüper, 1994). La primera solució ha estat descrita només en uns pocs grups de procariotes: els *Archaea* aerobis de l'ordre dels *Halobacteriales*, els *Bacteria* anaerobis de l'ordre dels *Haloanaerobiales* (Oren, 2000) i el recentment descobert *Salinibacter ruber* (Oren et al., 2002), emparentat amb membres de la classe *Bacteroidetes* (Soria-Carrasco et al., 2007). En la majoria dels casos l'anió dominant és el Cl⁻, mentre que el catió acumulat sol ser el K⁺ o de vegades també el Na⁺. L'elevada concentració de sals dins la cèl·lula requereix adaptacions específiques de tota la maquinària enzimàtica intracel·lular ja que aquests ions poden assolir-hi concentracions de l'ordre de mols (fins a 7 M de KCl en espècies de *Halobacterium*); en conseqüència el contingut del citoplasma és exposat a una força iònica elevada (Sleator and Hill, 2001). Aquest tipus d'adaptació requereix canvis genètics importants que es tradueixen en canvis en la composició d'aminoàcids de les proteïnes i en la seva conformació de plegament (Dennis and Shimmin, 1997; Sleator and Hill, 2001). Alhora, aquestes profundes transformacions requereixen unes condicions constants, dins un rang estret i elevat de concentracions de sals (Oren, 2000).

La segona estratègia per a l'osmoadaptació implica l'exclusió de les sals o soluts inorgànics i la conseqüent acumulació de soluts orgànics (Galinski,

1995). Aquests compostos orgànics, anomenats *soluts compatibles* (Brown and Simpson, 1972), són transportats del medi o sintetitzats per la cèl·lula, i permeten el manteniment de les funcions de les macromolècules i de la cèl·lula en un medi extern d'osmolaritat elevada perquè no alteren les condicions “normals” del citoplasma (d'una força iònica baixa) (figura I-5). Ja que aquest és un camp d'interès en el present treball, en els següents apartats es descriuran amb més detall els diferents aspectes relacionats amb l'acumulació de soluts compatibles com a estratègia per a l'osmoadaptació.

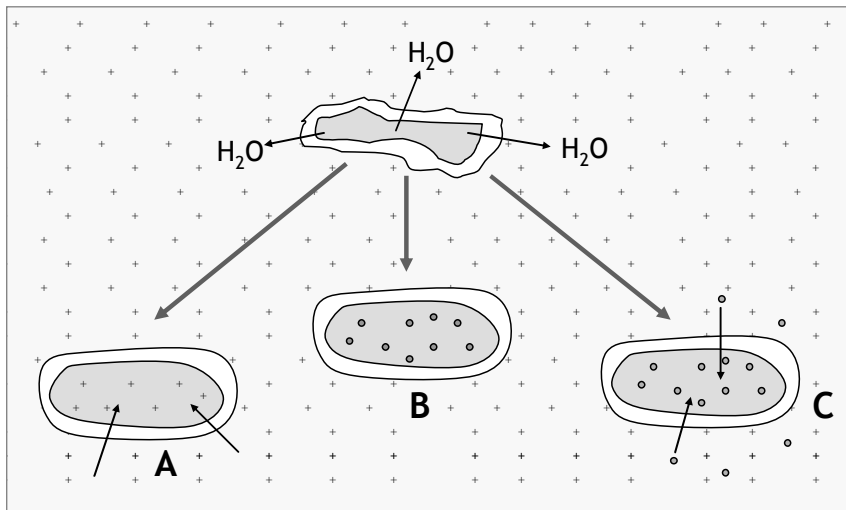


Figura I-5. Diferents estratègies desenvolupades en un medi d'osmolaritat elevada (presència de sals o soluts) per tal de poder establir un equilibri osmòtic a través de la membrana. L'objectiu principal és evitar la pèrdua d'aigua (veure part superior de la figura) i així mantenir les funcions cel·lulars. Els mecanismes descrits són: (A) entrada dels soluts externs dins de la cèl·lula; (B i C) els soluts externs són exclosos, a la vegada que de manera intrínseca hi ha una acumulació de soluts orgànics (soluts compatibles). En alguns casos són sintetitzats *de novo* (B), i en d'altres, hi ha un transport actiu de determinats compostos presents en el medi extracel·lular, els quals són acumulats en qualitat de soluts compatibles (C). Figura redibuixada a partir de Galinski (1995).

Els mecanismes d'adaptació relacionats amb l'acumulació de soluts compatibles en una situació de xoc hiperosmòtic impliquen un resposta de tipus bifàsic. En una resposta primària, la cèl·lula respon amb un increment dels nivell intracitoplasmàtics de K^+ (i del contraió glutamat). Seguidament (en una resposta secundària) es produeix l'acumulació, per síntesi o transport actiu, d'elevades concentracions de compostos osmoprotectors (soluts compatibles) (Sleator and Hill, 2001). La naturalesa dels compostos acumulats depèn de les característiques genètiques de l'organisme en qüestió i

del tipus de medi. En condicions d'osmolaritat constant els nivells de K^+ es mantenen relativament baixos (Roberts, 2005), de manera que els soluts compatibles contribueixen majoritàriament a l'osmoadaptació.

Finalment cal considerar que el concepte d'osmoadaptació no està només restringit a modificacions en la composició del citoplasma. Especialment a salinitats elevades (genèricament: $> 5\%$ NaCl), també són necessaris canvis en les membranes. La cara externa de la membrana citoplasmàtica i l'espai periplasmàtic estan sempre en contacte amb l'ambient salí, i per tant requereixen petites modificacions. El potencial per ajustar la membrana en relació a la salinitat externa sembla ser un dels requisits que probablement distingeixen els organismes no halòfils, amb una certa capacitat d'adaptació, dels vertaders halòfils o halotolerants.

1.4.3. Soluts compatibles: la solució més comú

La característica essencial dels compostos anomenats soluts compatibles, com el seu nom indica, recau en el fet que la seva acumulació (en concentracions elevades) és compatible amb el manteniment del metabolisme cel·lular, encara que poden modular activitats enzimàtiques de manera individual. El concepte de compatibilitat inclou protecció contra la inactivació, la inhibició i desnaturalització de enzims i estructures macromoleculares en condicions de baixa A_w (Brown, 1976) i absència d'interacció amb els substrats i cofactors (Yancey et al., 1982). La seva acumulació permet mantenir la pressió de turgència, el volum cel·lular i la concentració d'electròlits (força iònica) (Roberts, 2005); alhora la concentració dins la cèl·lula és regulada per la concentració de sals del medi (Galinski and Louis, 1999). La utilització de soluts compatibles, a diferència de l'acumulació de soluts inorgànics, confereix un grau elevat de flexibilitat i adaptabilitat als canvis de concentració de sals, ja que la maquinària enzimàtica pot ser operativa en un rang molt ampli de concentracions de soluts compatibles (Oren, 2002b).

Entre els diferents tipus de soluts orgànics coneguts com a soluts compatibles podem trobar:

- poliols (alcohols polihidroxílic) i derivats: glicerol, arabitol, manitol, eritritol, α -diglicerol fosfat, di-*myo*-inositol-1,1'-fosfat (DIP), 2,3-difosfoglicerat (cíclic).
- sacàrids i derivats (heteròsids): sacarosa, trehalosa, glucosilglicerol, α -mannosilglicerat, α -mannosilgliceramida, mannosil-DIP i 2-sulfatotrehalosa.
- Aminoàcids i derivats, entre els quals podem distingir:
 - o Aminoàcids: prolina, L- α -glutamat, glutamina i formes isomèriques (β -glutamat, β -glutamina, β -alanina).
 - o Diaminoàcids N-acetilats: N δ -acetilornitina, N γ -acetyldiaminobutirat, N ϵ -acetil- α -lisina, N ϵ -acetil- β -lisina.
 - o Derivats de glutamina amida: N α -carbamoilglutamina amida (CGA), N α -acetilglutaminilglutamina amida (AGGA).
 - o zwitterions amb grups N-metilats (betaïnes, carnitina): la betaïna (glicina-betaïna) és el més habitual. Altres: prolina-betaïna.
 - o zwitterions amb grups dimetilsulfoni (*thetines*): dimetilsulfonipropionat (DMSP).
 - o ectoïnes (que poden ser comparades a una condensació cíclica dels productes de diaminoacids N-acetilats): ectoïna, (β -)hidroxiectoïna.
- Altres: hidroxibutirat i poli- β -hidroxibutirat (PHB).

Químicament, aquests soluts orgànics es poden agrupar en tres categories (Roberts, 2005): zwitterions (compostos d'estructura betaïnica, que presenten càrregues positives i negatives simultàniament ionitzades), soluts no carregats

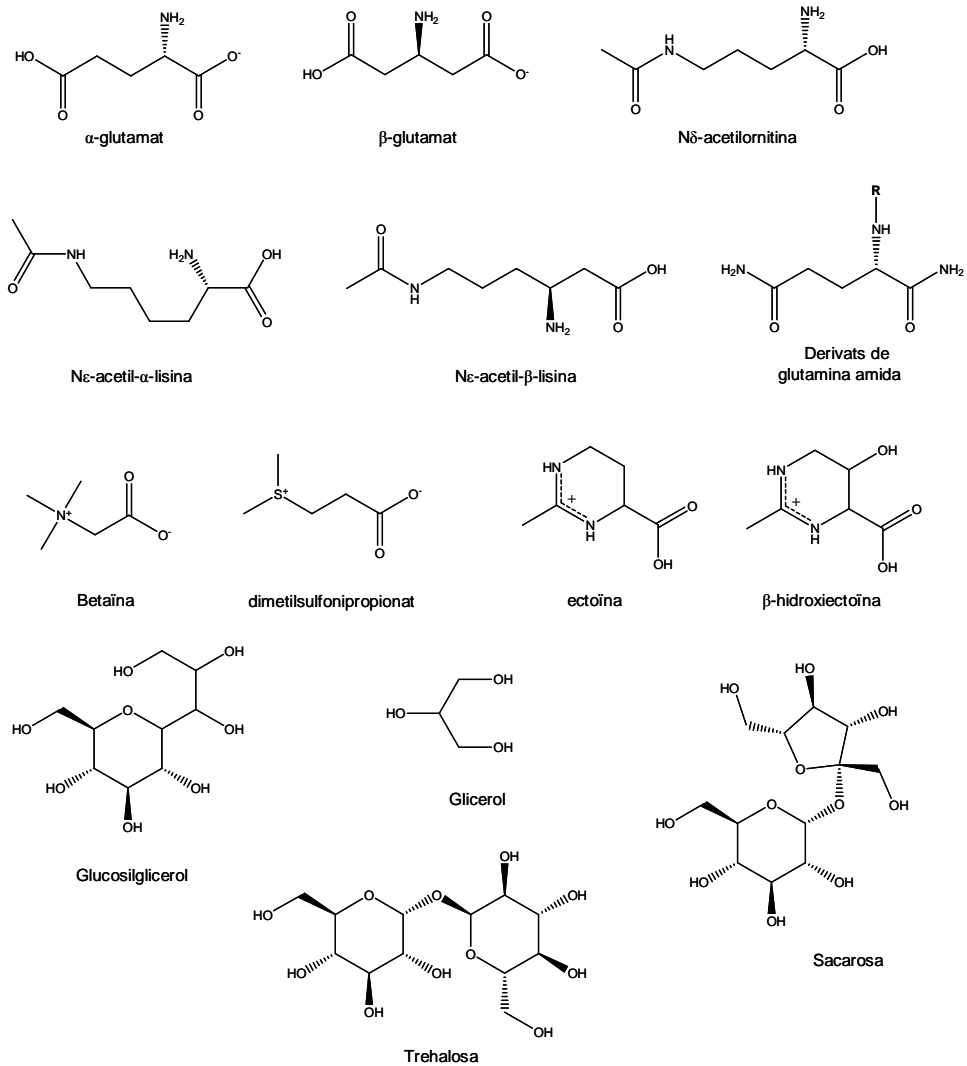


Figura I-6. Estructura molecular d'alguns dels soluts compatibles principals sintetitzats per microorganismes halòfils i halotolerants.

i soluts anònics; aquests últims generalment actuen com a contraions del catió K^+ , menys freqüentment Na^+ , el qual també actua en el balanç osmòtic. L'estructura molecular d'alguns dels compostos inclosos en aquestes categories es pot veure a la figura I-6. És ben conegut (Reed et al., 1986) que solen ser molècules de baix pes molecular, polars, amb una elevada solubilitat en aigua, sovint amb càrrega o zwitterions en condicions de pH fisiològic. També s'ha observat (Galinski, 1993) que l'única característica comuna respon a la combinació de grups polars i altres relativament

hidrofòbics, els quals es troben en un equilibri dèbil dins de la molècula. La conformació estèrica resultant té efectes sobre la l'estabilització de les macromolècules (principalment proteïnes). Existeixen múltiples teories, recollides en diferents revisions i treballs originals (Clegg et al., 1982; Galinski, 1993; Galinski et al., 1997; Timasheff, 1998; Bolen and Baskakov, 2001; Sleator and Hill, 2001; Roberts, 2005), que intenten explicar el tipus d'interacció entre els diferents components (aigua, soluts i macromolècules). Es poden separar en dos grans grups: les que postulen un tipus d'interacció directa solut-macromolècula i les que relacionen el fenomen amb el tipus d'interacció entre aigua i solut i els canvis induïts a l'estructura de l'aigua. D'una manera o altre, o fins i tot considerant una barreja dels diferents tipus d'efectes, tots els models coincideixen en que hi ha una exclusió preferencial dels soluts compatibles en la superfície immediata de les proteïnes o altres macromolècules intracitoplasmàtiques; així, termodinàmicament, la conseqüència és la mateixa: el manteniment de la solvatació i un efecte general d'estabilització que s'oposa a la desnaturalització (desplegament) de les proteïnes i altres estructures macromoleculares que són làbils. L'efecte estabilitzador dels soluts compatibles no és només efectiu en condicions d'estrès salí, sinó també a altres factors d'estrès, com ara les temperatures elevades, la congelació o la dessecació (Welsh, 2000), presència de radicals lliures d'oxigen (Benaroudj et al., 2001), i presumiblement les elevades pressions, com s'ha determinat amb l'addició de glicerol en assaigs *in vitro* de plegament/desplegament de proteïnes (Font, 2006). Alhora, en altres observacions experimentals s'ha trobat que els soluts compatibles poden tenir efectes en l'estabilitat termodinàmica del DNA de doble cadena. L'addició d'elevades concentracions de soluts compatibles de tipus zwitteriònic provoca un increment de la constant dielèctrica de la solució (ϵ), i al seu torn, una disminució de les interaccions iòniques entre el DNA i els cations (segons la llei de Coulomb) (Flock et al., 1996a, 1996b). En relació a la teoria de condensació dels contraions de Manning (Manning, 1978), aquest efecte provoca una reducció de la fracció de càrregues de fòsfat neutralitzades que es tradueix amb una disminució de la temperatura de fusió del DNA (Schnoor et al., 2004), fet que planteja noves aplicacions biotecnològiques (apartat 1.4.5). Amb independència de l'efecte sobre el polielectròlit, s'ha observat que la betaïna (en concentracions elevades) també elimina la dependència de la composició de bases en el comportament de fusió del DNA, és a dir, en

aquestes condicions s'igualen l'estabilitat entre les unions AT i GC (Rees et al., 1993). Elevades concentracions de soluts compatibles també poden alterar l'accessibilitat de les nucleases al DNA (Malin et al., 1999).

Dins les cèl·lules, aquest compostos normalment es troben combinats, en una configuració determinada que en alguns casos s'anomena *cocktail* (còctel) de soluts orgànics. Així, els diferents bacteris i arquees que són halotolerants o halòfils, generalment sintetitzen diversos soluts, que tots conjuntament contribueixen al balanç osmòtic. Quan es detecta només un compost, es pot relacionar en la majoria dels casos amb el transport actiu (*uptake*) d'un solut present en el medi extracel·lular (Roberts, 2005).

L'acumulació de soluts compatibles ha estat observada en els tres dominis d'organismes vius (Roberts, 2005): en la majoria de bacteris halòfils i halotolerants, en els representants halòfils i halotolerants dels *Archaea* metanogènics, i en els microorganismes halòfils del domini *Eukarya* (Oren, 2002b). La dispersió d'una determinada estratègia (bàsicament en referència a la capacitat de síntesi) i la configuració de soluts orgànics més comuns en diferents grups de microorganismes halòfils ha estat revisada recentment per aquests autors. A partir d'aquests treballs, i d'altres anteriors (Galinski, 1995; Kempf and Bremer, 1998), es pot deduir que organismes molt diferenciats filogenèticament poden presentar estratègies comuns, si bé hi ha determinats compostos que han estat definits com a característics d'alguns grups d'organismes. Algunes de les generalitzacions que es poden fer en base a la seva distribució es detallen a continuació:

- En termes generals els bacteris i eucariotes acumulen soluts compatibles de càrrega neutre. Els arquees tendeixen a acumular formes d'estructures similars, però a diferència dels anteriors la majoria tenen càrrega negativa (Martin et al., 1999). Això és especialment significatiu en el cas dels sacàrids i poliols, en els quals la càrrega negativa és atorgada per l'addició d'un grup carboxilat, fosfat o sulfat (Roebler and Müller, 2001). Aquestes diferències han estat relacionades amb el contingut de K^+ intracel·lular, que és en general més elevat en arquees.

- La síntesi *de novo* dels poliols com ara glicerol, arabitol, inositol, i mannitol és comuna en fongs halòfils o osmòfils, algues i plantes tolerants a la sal, però no ha estat observada en procariotes. Com a única excepció es coneix l'acumulació de mannitol com a solut principal en *Pseudomonas putida* S12 (Kets et al., 1996).
- Els soluts compatibles identificats en bacteris i arquees termòfils comprenen una varietat definida de heteròsids i derivats de poliols majoritàriament de tipus aniònic, entre els quals s'hi troba α -mannosilglicerat (firoin), α -mannosilgliceramida, mannosil-DIP, α -diglicerol fosfat, di-*myo*-inositol-1,1'-fosfat (DIP), 2,3-difosfoglicerat (cíclic) (Roebler and Müller, 2001; Roberts, 2005).
- El solut compatible més comunament utilitzat (en plantes, mamífers, procariotes) és la betaïna, fins i tot en organismes que no presenten la capacitat de síntesi del compost (Imhoff and Rodriguez-Valera, 1984; Roebler and Müller, 2001).
- Els zwitterions cíclics derivats d'aminoàcids (ectoïna i hidroxiectoïna) només han estat detectats en el domini *Bacteria*, tot i que, l'ectoïna presenta una àmplia distribució entre bacteris halotolerants i halòfils de grups filogenèticament distants (Roberts, 2005).
- L'acumulació de β -aminoàcids ha estat majoritàriament observada en arquees metanogènics. Entre aquest tipus de compostos destaca el solut compatible N^ε-acetil- β -lisina, el qual només es coneix d'aquest grup (formes halotolerants i halòfils mesofílics i unes poques varietats termofíliques) (Sowers, 1990; Robertson, 1992; Sowers and Gunsalus, 1995; Pflüger et al., 2003).
- Els derivats de glutamina amida (CGA i AGGA) presenten, en principi, una distribució restringida als representants de la classe *Proteobacteria* (Smith and Smith, 1989; Galinski and Oren, 1991;

D'souza-Ault et al., 1993), principalment entre el grups de BFA dels α i γ -*Proteobacteria*.

- Els altres compostos poden presentar una àmplia distribució, que en diversos casos inclou organismes dels tres dominis d'éssers vius.

En relació a aspectes de tipus fisiològic encara són possibles algunes generalitzacions més (Galinski, 1995; Oren, 2002b):

- Els disacàrids sacarosa i trehalosa presenten un potencial limitat en el paper de soluts compatibles. Generalment es troben en petites proporcions en combinació amb altres soluts en els organismes halòfils. Aquests disacàrids permeten una correcta estabilització de les membranes, proteïnes i en general de tota la maquinària cel·lular oposant-se a la deshidratació (Louis et al., 1994).
- A excepció de la betaïna, totes les formes nitrogenades de soluts compatibles són derivades de la ruta de biosíntesi del glutamat i l'aspartat.
- Els aminoàcids aniònics (glutamat, β -glutamat, betaïna-glutamat, entre d'altres) no s'acumulen mai a concentracions elevades; com a valor màxim aproximat es pot considerar 0,4 M.
- Tots els soluts compatibles que s'utilitzen a concentracions de l'ordre de 0,5 M i superiors són compostos polars, amb una elevada solubilitat i sense càrrega neta.

En termes de despesa energètica, l'acumulació de soluts compatibles comporta un cost important per a la cèl·lula, més que l'estratègia d'acumulació de sals en el citoplasma. Aquest consum és més important com més gran és la molècula que s'utilitza com a solut compatible; així, l'acumulació de molècules petites com el glicerol (3 carbonis) o betaïna i ectoïna (5 i 6 carbonis respectivament) és menys costosa, energèticament parlant, que l'acumulació de disacàrids (12 carbonis). El consum energètic per a la síntesi de soluts compatibles pot ser considerablement superior als

requeriments energètics per a la biosíntesi de proteïnes, àcids nuclèics, paret cel·lular, etc (Oren, 1999).

1.4.4. *El transport de soluts compatibles*

El transport actiu de soluts compatibles presents en el medi sembla tenir preferència respecte la síntesi *de novo* (Galinski and Trüper, 1994), ja que el transport de soluts és una activitat molt més econòmica que la biosíntesi.

Els soluts compatibles són alliberats al medi per la senescència o deshidratació de les cèl·lules o per l'excreció de l'excés de soluts en una situació de xoc hipoosmòtic; en aquestes condicions els soluts compatibles estan a l'abast dels altres membres de la comunitat, els quals poden utilitzar-los per a la funció estabilitzadora, o com a font de carboni, nitrogen i energia, en el cas de ser degradats. En conseqüència, el metabolisme dels soluts compatibles té un impacte significatiu en el funcionament dels sistemes salins i hipersalins (Oren, 2002b), que fins i tot pot tenir efectes a una escala global (Welsh, 2000).

Molts microorganismes posseeixen diversos sistemes per al transport de soluts compatibles. Aquests, constituïts per proteïnes integrals de membrana, presenten en general una elevada afinitat per als seus substrats (amb valors de K_m del rang de μM) i una bona capacitat per permetre l'acumulació de grans quantitats de soluts. Poden presentar especificitat per un o diversos compostos a la vegada, essent la última opció la més avantatjosa, ja que permet aprofitar millor l'espectre de soluts compatibles que hi pot haver en un ambient. El nivell d'activació és osmòticament controlat, i/o el nivell d'expressió dels gens que codifiquen per als transportadors és sovint induït en medis d'elevada osmolaritat (Kempf and Bremer, 1998; Poolman and Glaesker, 1998). Així, els transportadors de soluts compatibles funcionen de manera més eficient en condicions d'elevada osmolaritat i elevada força iònica, condicions que en general són inhibidores dels sistemes de transport de nutrients (Kempf and Bremer, 1998). Alhora, l'activitat de transport redueix de manera important la síntesi de soluts.

Actualment es coneixen diferents sistemes de transport en una varietat de grups de bacteris i arquees (Kempf and Bremer, 1998; Pflüger and Müller,

2004; Roberts, 2005). En general, n'hi ha dos tipus principals (corresponents a dues superfamílies de transportadors): el transportadors secundaris i els anomenats *ATP binding cassette (ABC) transporters*. Els transportadors secundaris (també anomenats co-transportadors), són proteïnes integrals de membrana de tipus simport que utilitzen la força motriu de protons o el gradient favorable de sodi per forçar el desplaçament en contra de gradient de la molècula d'interès des del medi, un solut compatible. El segon tipus de transportadors, *ABC transporters*, utilitzen l'energia de l'hidròlisi d'ATP per transportar diferents substrats a través de la membrana. Estructuralment estan constituïts per dos dominis transmembrana específics pel substrat d'interès amb un domini de lligació en la part externa i un domini d'unió de l'ATP en la part interna de la membrana, que constitueix els anomenats "cassettes".

En el present treball, aquest àmbit d'estudi s'ha restringit a la detecció de la capacitat transportadora de soluts compatibles per part de les soques de BVS analitzades (representatives del gènere *Prosthecochloris*). Per fer-ho, s'han utilitzat diferents medis de cultiu suplementats cadascun amb els diferents compostos d'interès. Aquesta via d'anàlisi s'ha desenvolupat a un nivell de recerca preliminar i prospectiva, en tant que, el nombre de soques i el nivell d'aproximació (tant metodològic com conceptual) haurien de ser d'un abast més ampli en futurs treballs.

1.4.5. Aplicacions biotecnològiques dels soluts compatibles

Els diferents efectes que tenen els soluts compatibles sobre les macromolècules i les solucions els converteixen en compostos útils per a aplicacions biotecnològiques diverses. Tot i així, un dels principals colls d'ampolla en la utilització de soluts compatibles en aplicacions *in vivo* i/o *in vitro* és la generació de les quantitats suficients per aconseguir l'efecte desitjat; és especialment en les aplicacions *in vitro* on són necessàries grans quantitats de soluts (Roberts, 2005). Actualment existeixen diferents mètodes de producció a gran escala de soluts compatibles sintetitzats únicament per microorganismes (Sauer and Galinski, 1998; Schiraldi et al., 2006).

Entre les diferents aplicacions biotecnològiques podem trobar:

- Utilització de soluts compatibles com a xaparones químiques per al plegament de proteïnes. Algunes proteïnes recombinants sobreexpressades poden ser insolubles o presentar una forma no funcional (a vegades parcialment desnaturalitzades i/o mal plegades amb la possibilitat de formar cossos d'inclusió) i per tant necessiten l'ajut de moduladors de plegament (en aquest cas els soluts compatibles) per poder adoptar la seva estructura nativa i funcional (Roberts, 2005).
- La capacitat de disminuir la temperatura de fusió del DNA ha propiciat la utilització de soluts compatibles en la millora de la recció de PCR quan es treballa amb productes d'elevat contingut de bases GC (> 70% GC) (Henke et al., 1997; Schnoor et al., 2004).
- La preservació (criopreservació) de microorganismes és un altre camp on els soluts compatibles hi tenen un paper destacat. Sovint s'utilitzen solucions d'agents crioprotectors com ara el glicerol o la trehalosa (Malik, 1991). Recentment també ha estat determinada la capacitat de la betaïna com a crioprotector, la qual ha estat útil en un rang ampli de microorganismes procariotes i alhora amb diferents variants metodològiques de criopreservació (Cleland et al., 2004). La capacitat d'estabilització no es limita només a la preservació de microorganismes, sinó que l'aplicació és extensible a la preservació de vectors retrovirals i adenovirals utilitzats en teràpia gènica (Cruz et al., 2006).
- La recuperació i enumeració de bacteris estressats en un medi de cultiu pot ser millorada amb modificacions simples com ara l'addició de betaïna (Marthi and Lighthart, 1990).
- La taxa de supervivència d'agents de biocontrol de patògens vegetals pot ésser millorada per mitjà de l'osmoadaptació de l'agent de biocontrol (addició de sals i betaïna en el medi utilitzat per l'inòcul) (Bonaterra et al., 2005; Bonaterra et al., 2007).

- La capacitat de protecció per part dels soluts compatibles de diferents factors d'estrès ambiental ha suscitat l'aplicació d'aquests en la indústria cosmètica i farmacològica. Concretament, l'ectoïna ha estat caracteritzada com a un protector de la pell per als danys derivats de la radiació ultraviolada (Buenger and Driller, 2004). Alhora, s'han desenvolupat diferents projectes per estudiar la utilitat dels compostos en la prevenció i/o curació dels efectes derivats de les teràpies contra el càncer en els teixits (Roberts, 2005). Altres estudis presenten la possibilitat d'utilització dels soluts compatibles com a additius de drogues basades en proteases (Kolp et al., 2006).
- La creació de vegetals transgènics resistents a diferents factors d'estrès és un altre dels possibles camps d'aplicació dels soluts compatibles. La introducció dels gens responsables de la síntesi de determinats compostos (ectoïna i betaïna) ha permès observar una major tolerància dels transgènics a l'estrès osmòtic, calor i fred (Roberts, 2005).

1.5. Els Bacteris Verds del Sofre en ambients salins

La majoria dels BVS que es coneix que toleren o requereixen sal estan adaptats a un rang baix de concentracions de sals. Així, en els hàbitats salins els BVS generalment es poden desenvolupar en el rang de concentracions de les aigües salabroses (>0.5-2 %) i marines (fins a 6-7%) (Caumette, 1993; Imhoff, 2001b). Rarament han estat observats en ambients amb una salinitat superior al 10 % (Gorlenko, 1988). D'aquesta manera, les espècies halòfiles de BVS es classifiquen en relació als seus requeriments (òptims de creixement) dins el grup de les espècies marines o halòfils febles (òptim entre 1% i 5% de NaCl). Per contra, no hi ha cap descripció en referència a la condició d'espècie o soca halotolerant en el grup de BVS.

La relació de soques i d'espècies cultivades (descrites i dipositades a les col·leccions tipus) amb els requeriments específics (òptims), les concentracions de sal tolerades i l'ambient d'origen es detallen a l'apèndix *Summary tables* (taula A4-3).

Aquest llistat podria encara ésser més extens si consideréssim el conjunt de morfoespècies descrites (en relació als criteris del sistema de classificació anterior). Malauradament la informació disponible per aquestes espècies és incompleta i en alguns casos el cultiu originari, utilitzat per a la descripció, s'ha perdut. D'aquesta manera, la relació entre les característiques fisiològiques i l'assignació filogenètica no es possible, ja que no es disposa de la seqüència del 16S rDNA. Alguns exemples d'espècies afectades per aquesta situació i que han estat observades amb certa regularitat són *Prosthecochloris phaeoasteroidea* i també *Pelodictyon phaeum*.

De la mateixa manera, existeix certa imprecisió en la citació de determinades espècies observades regularment en ambients salins, però de les quals no existeix cap dada genètica. Així, amb el canvi de perspectiva que s'ha produït amb l'aplicació del nou sistema de classificació, on els criteris fenotípics han estat substituïts per criteris filogenètics, i donada l'adequació dels requeriments de sals en les bases plantejades en el sistema de classificació vigent, moltes descripcions anteriors (majoritàriament prèvies a 1995) han perdut rellevància, ja que aporten una informació parcial (manca la informació filogenètica). Aquest és el cas de les citacions, relativament nombroses, al voltant de les espècies anteriorment anomenades '*Chlorobium vibrioforme*', '*Chl. phaeovibrioides*', i en menor nombre de '*Chl. limicola*' (en el context de classificació anterior).

Així, les espècies *Prosthecochloris aestuarii* i '*Chlorobium vibrioforme*' han estat freqüentment observades en ambients marins. També s'ha detectat en alguns ambients salabrosos i marins la presència d'altres espècies de BVS de pigmentació verda com ara '*Pelodictyon luteolum*', '*Chl. chlorovibrioides*', '*Chl. limicola*' i *Chloroherpeton thalassium*, i també espècies de pigmentació marró com ara '*Chl. phaeobacteroides*', '*Chl. phaeovibrioides*', '*Pld. phaeum*' i '*Ptc. phaeoasteroidea*' (Gorlenko, 1988; Caumette, 1993; Imhoff, 2001b).

Apart de les diverses descripcions de BVS realitzades en ambients salabrosos i marins susciten un interès especial les realitzades en ambients de caràcter extrem, per l'elevada concentració de sals (> 4% NaCl) o per la combinació de diferents factors adversos, com ara salinitat i temperatures elevades (> 45°C) o baixes (> 20°C). Valors de pH per sobre de 8 o per sota de 6 també es

consideren extrems (Madigan, 2003). Aquestes condicions, en general poc comunes en relació a la majoria de descripcions de BVS, poden ser d'interès per la possibilitat de descriure noves espècies del grup, variants morfofuncionals (Abella and Garcia-Gil, 1988) i fins i tot mostrar capacitats fisiològiques no determinades en els altres BVS coneguts.

Poblacions de l'espècie *Prosthecochloris aestuarii* han estat trobades en ambients que comprenen un rang ample de concentracions, des d'aigües salabroses (0,7 %) fins a hipersalines (17 i 21 %) amb temperatures que oscil·len els -4°C i 28°C (Puchkova, 1984; Gorlenko, 1988). *Prosthecochloris* sp. ha estat observat també en tapisos microbians (dominats per cianobacteris) de la font salina d'aigües termals (54°C) Talgi (Dagestan, Caucasus) (Gorlenko, 1988). En altres estudis realitzats al Solar Lake (Península Sinai, Egipte) ha estat possible observar poblacions ben establertes de *Prosthecochloris* sp. (constituïnt una làmina diferenciada) dins de la comunitat de procariotes fotosintètics creixent a salinitats de 18-20 % a temperatures de 55 i 61°C (Cohen et al., 1977). La morfoespècie '*Chlorobium vibrioforme*' (en relació al sistema de classificació anterior) ha estat trobada també en un rang de salinitat des del 0,7% al 10,3% (Gorlenko, 1988).

Amb unes condicions igualment adverses, l'anàlisi de les mostres d'aigua de sis llacs antàrtics permanentment glaçats de la regió de Vestfold Hills (Est Antàrtida) revela també la presència de BVS en aquestes condicions (presència de sals i baixes temperatures) (Achenbach et al., 2001).

Altres descripcions anteriors (Anderson, 1958) fan referència a la presència de poblacions temptativament classificades com a '*Chlorobium*' sp. (en el context previ a qualsevol dels sistemes de classificació tractats) en la llacuna atalassohalina de *Hot Lake* (North Central Washington, USA). Aquesta cubeta, originada com a resultat de l'activitat minera d'extracció d'epsomita (cristalls de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), presentava una comunitat densa de BVS creixent a salinitats al voltant del 20 % de sals i temperatures pròximes als 50°C . També, en la cubeta hipersalina (atalassohalina) de Bad Water (Death Valley, California, USA) ha estat detectat un filotip afiliat dins el gènere *Prosthecochloris* (Alexander and Imhoff, 2006).

Alguns treballs han estat orientats a l'estudi de les poblacions de BVS presents en les masses d'aigua hipersalina (atalassohalina) de les llacunes endorreiques continentals de la Península Ibèrica, com ara la "Salada de Chiprana" (Guerrero et al., 1991; Vila et al., 2002). La descripció i la sinopsi de la informació disponible en relació al desenvolupament de poblacions de BVS en aquest ambient, així com dels altres estudiats en el present treball (Llacuna de la Massona, "La Playa" i "Es Cibollar"), es detalla en els capítols de resultats I i II.

Les investigacions en el marc de les adaptacions a la salinitat dels BVS són escasses, pràcticament inexistentes. Així, existeix només un treball previ on es descriu l'acumulació de soluts compatibles com al tipus d'estratègia osmoadaptativa adoptada en el cas dels BVS (Welsh, 1993). Les primeres descripcions corresponen a la soca halòfila *Chlorobium vibrioforme* 6030 (que amb la nomenclatura vigent ha adoptat el nom de *Prosthecochloris vibrioformis* DSM 260^T) i la soca d'aigua dolça *Chlorobium limicola* Kios 6230 (actualment anomenada *Chlorobaculum thiosulfatophilum* DSM 249^T). Ambdós organismes acumulaven únicament trehalosa quan creixien en cultius de laboratori al 3% NaCl; alhora que presentaven la capacitat de transportar activament betaïna (quan era subministrada des del medi); la quantitat de betaïna acumulada superava el 20% del total d'osmòlits presents a dins la cèl·lula.



2. Objectius / Objectives

2. Objectius / Objectives

2.1. Objectius (en Català)

L'objectiu principal del treball de recerca és aprofundir en el coneixement del grup de Bacteris Verds del Sofre (BVS) des del punt de vista de la relació amb la salinitat. L'estudi s'ha restringit als representants halotolerants o halòfils del grup amb tres línies de treball que corresponen a diferents àmbits de coneixement, com són la descripció del biòtop i la riquesa específica de les comunitats de BVS en els ambients naturals, l'avaluació de la significació taxonòmica de la capacitat de desenvolupament en ambients salins en el marc de discussió de la taxonomia-filogenètica del grup, i l'anàlisi de les estratègies fisiològiques desenvolupades per a l'osmoadaptació en medi salí.

De bon començament, aquest treball es va formular a partir d'una qüestió central dins d'un context ecològic: Quina és la riquesa d'espècies de BVS en ambients salins i quins són els factors que governen la seva selecció? Necessàriament al voltant d'aquesta pregunta calia també abordar alguns aspectes relacionats amb la descripció del biòtop i de la dinàmica limnològica dels ambients objecte d'estudi i la determinació de la variabilitat de les comunitats de BVS entre diferents tipus d'ambients, costaners o d'interior. L'obtenció de les primeres dades moleculars d'aquestes espècies a partir de l'aproximació basada en l'estudi del 16S rDNA, la disponibilitat de soques aïllades d'aquests ambients i la revisió de la bibliografia relacionada amb la identificació i classificació dels BVS van suggerir una altra qüestió en un marc d'estudi taxonòmic: Constitueixen els bacteris d'ambients salins un grup filogenètic clarament diferenciat de la resta d'espècies dins del fílum *Chlorobi*? En aquest cas caldria considerar també la significació taxonòmica dels requeriments de sals en aquest grup. Justament, la capacitat d'adaptació a aquest condicionant, la presència de sals, obliga a disposar d'algun mecanisme que permeti ajustar el diferencial de pressió osmòtica per evitar la plasmòlisi. D'aquesta manera, quan els treballs de caracterització dels requeriments i rangs de tolerància a les sals per part de les diferents soques aïllades van definir uns límits molt elevats de resistència a la salinitat, va sorgir una altra qüestió que va encaminar el treball cap a un context ecofisiològic: Quina era l'estratègia desenvolupada per aquestes soques? Podien disposar d'algun nou tipus d'osmòlit no descrit en el grup de BVS o

fins i tot en taxons d'ordre superior? La resolució d'aquest interrogant va conduir la recerca cap altres camps, allunyats de l'àmbit dels BVS, però amb el denominador comú de la N^ε-acetil-β-lisina i els gens presumptivament implicats en la síntesi d'aquest solut compatible.

Els objectius concrets de la tesi, formulats a partir d'aquestes qüestions al llarg del desenvolupament del treball, han estat els següents:

1. Aprofundir en el coneixement de la dinàmica limnològica de la llacuna “La Salada de Chiprana”, i especialment en els factors que determinen l'anòxia i el desenvolupament de les poblacions de BFS.
2. Realitzar una primera caracterització limnològica del sistema de cubetes anòxiques de la llacuna de “La Playa”.
3. Determinar la composició específica de les comunitats de BVS en els ambients salins i hipersalins estudiats (“La Salada de Chiprana”, “La Playa”, “La Massona”)
4. Aïllar i caracteritzar diferents representants de la comunitat de BVS dels ambients d'estudi. Determinar els condicionants implicats en l'enriquiment selectiu dels diferents grups bacterians de BFS halotolerants i halòfils.
5. Avaluar la significació taxonòmica del requeriment o tolerància de sals en el cas particular del grup de BVS.
6. Determinar les estratègies d'osmoadaptació en representants del grup de BVS.
7. Detectar i seqüenciar els gens presumptivament implicats en la síntesi del solut compatible N^ε-acetil-β-lisina, el qual ha estat descrit per primera vegada en representants del domini dels bacteris gràcies a aquest treball.

8. Determinar la capacitat de síntesi de N^ε-acetil-β-lisina en altres microorganismes amb la dotació gènica específica per a la síntesi d'aquest solut compatible utilitzant com a model *Bacillus cereus* i avaluar la idoneïtat d'aquest com a organisme candidat a la producció de N^ε-acetil-β-lisina.

9. Analitzar les relacions entre els gens ortòlegs presumptivament implicats en la síntesi del solut compatible N^ε-acetil-β-lisina presents en diferents microorganismes procariotes.

2.2. *Objectives (in English)*

The aim of this work is to extend the knowledge of Green Sulfur Bacteria (GSB), specifically those halotolerant and/or halophilic members of the group found in saline environments. The study has been carried out from three different perspectives, corresponding to different knowledge areas: describing the specific richness of GSB communities and environmentally relevant parameters of their habitats, evaluating the taxonomic significance of the requirements and tolerance of salts in the media and discussing the group's classification criteria, and analyzing the physiological responses developed for the osmoadaptation (in particular those related to the accumulation of compatible solutes) in saline media.

At the beginning, this work was devised to solve a central question in an ecological scene: which are the GSB species richness in saline environments and the factors governing their selection? To answer it, several aspects related to the biotope description and limnological dynamics of these environments had to be tackled, as well as the variability of the GSB communities among different kinds of environments, both coastal and inland. As soon as the first molecular data were obtained from these species by 16S rDNA approach, several isolated strains were available and a deeper knowledge of the literature related to the identification and classification of GSB was achieved, another question emerged in a taxonomic framework: Do the bacteria from saline environments constitute a differentiated phylogenetic group into the *Chlorobi* phylum? In this particular case, the taxonomic significance of the requirements of salts into the group should be also considered. To adapt to this environmental factor, the presence of salts, some kind of mechanism allowing the adjustment of the osmotic pressure differential must be required, in order to avoid a drastic loss of water. In the same way, high threshold values were determined in the analysis of the salt ranges tolerated by the isolated strains, and thus another question came out from an ecophysiological point of view: Which was the osmoadaptation strategy adopted by these strains? Could they have any novel osmolyte not previously described in the GSB group or even in higher-order taxons? In order to investigate these subjects, the research moved to other topics, sometimes far from GSB, in relation to the compatible solute N^ε-acetyl-β-lysine and the presumptive genes involved in its synthesis.

The specific objectives of this work can be summarized as:

1. To extend the knowledge of limnological dynamics of Chiprana Lagoon, and particularly the factors determining anoxic conditions and the development of the GSB populations.
2. To carry out a first limnological characterization of the anoxic man-made ponds in the Playa Lagoon.
3. To determine the specific composition of GSB communities in saline and hypersaline study sites (“La Salada de Chiprana”, “La Playa” and “La Massona”).
4. To isolate and characterize different members of such communities. To find out the determining factors related to the selective enrichment of different halotolerant and halophilic Anoxygenic Photosynthetic Bacteria.
5. To evaluate the taxonomic significance of the requirement or tolerance of salts in GSB members.
6. To determine the osmoadaptive strategies (particularly those related to the accumulation of compatible solutes) in different species of the GSB group.
7. To detect and sequence the presumptive genes involved in the synthesis of compatible solute N^ε-acetyl-β-lysine, which has been described for the first time in the bacterial domain in the present work.
8. To determine the ability to synthesize N^ε-acetyl-β-lysine in other microorganisms harboring the presumptive genes involved in its synthesis by using *Bacillus cereus* as a model and to evaluate the suitability of this species for large-scale production of N^ε-acetyl-β-lysine.
9. To analyze the relations among orthologous genes sequences putatively encoding two enzymes involved in N^ε-acetyl-β-lysine synthesis found in several prokaryotic microorganisms.

3. Resultats i discussió

Capítol I. Latent populations of Green Sulfur Bacteria in coastal and endorheic salt lagoons of the NE Iberian Peninsula

Latent populations of Green Sulfur Bacteria in coastal and endorheic salt lagoons of the NE Iberian Peninsula

Xavier Triadó-Margarit*, Xavier Vila, and Charles A. Abella

Laboratory of Microbiology, Institute of Aquatic Ecology, University of Girona, Campus Montilivi, E-17071, Girona, Spain

Running title: Latent GSB populations in salt lagoons

Author for correspondence: (*), e-mail: xavier.triado@udg.es; phone: +34-972-418261; fax: +34-972-418150

Abstract

The species composition of green sulfur bacteria (GSB) from several saline inland and coastal water bodies has been analyzed by molecular methods (the PCR-DGGE approach) and by classical microbiological procedures (microscopic observations, selective enrichment and isolation). The temporal dynamics of the phototrophic microbial community and the evolution of environmental parameters were also determined. It was not possible to detect GSB in the Chiprana and Massona lagoons by microscopic observations or HPLC pigment analyses, although the development of dense GSB populations had been documented earlier. However, several phylotypes could be retrieved and identified, after specific amplification of 16S rDNA fragments, from enrichment cultures and environmental samples. The two methodological approaches provided complementary descriptions of species richness. GSB enrichment tests revealed that salt content and pH seem to be more selective than salt composition. Oxygen produced by a periphyton sediment layer in the Chiprana Lagoon or light limitation due to algal blooms in the Massona Lagoon might explain growth limitation of these latent GSB populations. The eutrophication of water bodies due to nutrient-rich freshwater inflows seems to be related to the factors preventing GSB development.

Key words: latent populations, anoxic hypolimnion, eutrophication, endorheic lagoons, periphyton.

Abbreviations: APB - anoxygenic photosynthetic bacteria; BChl - bacteriochlorophyll; Car - carotene; *Cba.*-*Chlorobaculum*; Cbt - chlorobactene; Chl - chlorophyll; *Chl.* - *Chlorobium*; DGGE - denaturing gradient gel electrophoresis; FL2, FL3 -fluorescence channel; FSC - forward scattering; GSB - Green Sulfur Bacteria; HPLC - high performance liquid chromatography; Isr - Isorenieratene; Okn - okenone; PAR -photosynthetically available radiation; PCR - polymerase chain reaction; PSB - Purple Sulfur Bacteria; *Ptc.* - *Prosthecochloris*; Spr - spirilloxanthin; SSC - side scattering

Introduction

Green Sulfur Bacteria (GSB) populations frequently develop where light reaches anoxic water layers or sediments with reduced sulfur compounds (Overmann, 2001). Water bodies stratified by temperature or salinity gradients are appropriate habitats for the development of these planktonic populations (Van Gemerden, 1995) because the development of anoxic conditions is favored at the bottom. In saline habitats, GSB are generally able to grow within the range of salt concentrations found in brackish (<0.5-2 %) and marine waters (up to 6-7%) (Imhoff, 2001b). Therefore, halophilic GSB are classified as marine or slightly halophilic bacteria which generally present optimal growth at salinities between 1% and 5% NaCl. Furthermore, some GSB populations have been observed in hypersaline habitats (up to 20% salts) such as solar lakes and even athalassohaline lakes resulting of mining activities (Anderson, 1958; Cohen et al., 1977; Puchkova, 1984). In addition, a few studies (Guerrero et al., 1991; Vila et al., 2002) have focused on GSB populations inhabiting hypersaline athalassohaline waters of Spanish inland endorheic lakes such as Lake Chiprana (Ebro Depression, Spain).

The two principal types of saline aquatic systems, endorheic and coastal water bodies, have been studied in this work. The Chiprana Lagoon (“la Salada de Chiprana”) is the only permanent hypersaline inland lagoon of Western Europe. It originated as a playa lagoon of temporary water which became permanent as a result of human activities on the landscape, mainly changes in agricultural practices beginning in the 15th century (Valero-Garcés et al.,

2000). The lagoon is well known for its limnology and phototrophic community (Guerrero et al., 1991; Vidondo et al., 1993; Díaz et al., 1998; Vila et al., 2002), its paleolimnology (Valero-Garcés et al., 2000) and the physiology and structure of its microbial mat community (Camacho and De Wit, 2003; Jonkers et al., 2003; Ludwig et al., 2006). Previous limnological data indicate that it has a mixed meromictic and holomictic character, since various meteorological phenomena strongly determine stratification preservation or breakdown. Concerning Anoxygenic Photosynthetic Bacteria (APB), dense GSB populations (resembling the previously mentioned *Chlorobium vibrioforme*) were found during the stratification periods. In addition, other GSB, such as *Prosthecochloris aestuarii* and some brown-pigmented species, were found at lower concentrations (Guerrero et al., 1991; Vila et al., 2002). Due to its uniqueness, fragility and particular ecological value, the Chiprana Lagoon has been included in various protection plans and conservation treaties such as the Ramsar Convention on Wetlands (1994), the European network for nature and people (Natura 2000) and the natural resources management plan (PORN) recently approved (April 2006) by the regional government of Aragon.

The Massona Lagoon (“la Massona”), a coastal lagoon with a meromictic basin located in a marsh area, has been previously studied from the same limnological point of view (Armengol et al., 1983; Riera and Abella, 1986; Domínguez-Planella, 1987; Guerrero et al., 1987; Riera et al., 1987; Riera, 1991), and a notable GSB richness was described during stratification periods. Brown pigmented species (mainly the formerly know *Chlorobium phaeovibrioides*, but also the isolated *Prosthecochloris phaeoasteroidea* and *Pelodictyon phaeum*) were dominant in the stable phases, although green species (*Prosthecochloris aestuarii* and *Chlorobium vibrioforme*) competed with them during unstable periods associated with sea water intrusion episodes.

In this work, GSB species composition has been studied in several different salt environments: hypersaline athalassohaline in the Chiprana Lagoon and two man-made ponds in the Playa Lagoon, and a thalassohaline coastal water body in the Massona Lagoon. In addition, some results from the Cibollar Lagoon (Mallorca Island) are also presented. The temporal dynamics of the photosynthetic bacterial populations have also been studied, and phototrophic

community and habitat description of two man-made ponds in the Playa Lagoon are presented for the first time. The molecular approach based on Polymerase Chain Reaction (PCR) and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) has been used exhaustively in the study of GSB populations inhabiting these environments, conferring a higher resolution than earlier descriptions based on microscopic observations and cultivation methods. Nevertheless, the culture-independent molecular methods have been complemented with enriched procedures. Several latent GSB populations could be identified from enrichment cultures and specifically amplified sequences of 16S rDNA. The optimal selective enrichment conditions for GSB were also analyzed.

The effects of anthropological activities, the main cause of eutrophication, have been documented in these environments, and despite recently developed management actions, these results suggest that nutrient inputs could still be significant and even determine or limit the development of phototrophic communities.

Material and methods

Study sites

Athalassohaline environments

The Chiprana Lagoon (“La Salada de Chiprana”) (41°14’30”N; 0°10’50”W), located in the Ebro Depression (Aragon, Spain), - see Figure C1-1 -, is the only permanent hypersaline inland lake in Western Europe. It has a total surface area of 31 ha and sinuous paleochannels (elongated sandstone-bodies) differentiate three main basins (Vidondo et al., 1993; Valero-Garcés et al., 2000) (Figure C1-2). The principal salts are magnesium sulphate and sodium chloride. Its depth (about 5.6 m) and salinity (from 53‰ at the surface to 84‰ at the bottom) (Vidondo et al., 1993) are strongly conditioned by rainfall, groundwater flow, runoff and irrigation returns. Nutrient-rich freshwater returns from agricultural activities are diverted to an adjacent shallow lagoon, the “Laguna de las Rocas” (also called “La Salabrosa”), and thence to the Chiprana Lagoon through a channel excavated in the 1980s. Stratification of the water column is related to the saline gradient, especially after periods of rainfall. However, its temporal dynamics over longer periods show a high

variability conditioned by meteorological phenomena (Camacho and De Wit, 2003). The development of anoxic conditions and the accumulation of high concentrations of sulfide (up to 7 mM) have been observed in the hypolimnion during different stratification periods (Vidondo et al., 1993; Vila et al., 2002). Under these conditions, a dense GSB community dominated by members of formerly named “*Chlorobium vibrioforme*” was found in the environment. Sampling dates for this study were 001211, 010124, 010322, 010419, 010725, 011004, 011204 and 020326.

The endorheic, temporary system of the Playa Lagoon, “La Playa” (41°25’N; 0°10’W), used to make salt until the early 1960s, contains various man-made ponds with permanent water as a result of groundwater inputs (Alcorlo, 1999a; Alcorlo and Baltanás, 1999b). Two ponds, called Playa I and Playa II, were sampled. These ponds are shallow water bodies with a maximum depth of 1m in Playa I and 2m in Playa II. Both systems are considered as independent environments because of their isolation from the entire endorheic basin (Figure C1-1, C1-3 and C1-4). The salt composition is dominated by sodium chloride and, to a lesser extent, by magnesium sulphate (Montes and Martino, 1987). Playa I is characterized by intense red-colored waters. The ponds were sampled on 010724, 011003 and 020130.

Thalassohaline environments

The Massona Lagoon (“La Massona”) (42°12’32”N; 3°6’40”E) is a coastal lagoon located in the Empordà Marshes Natural Park (NE Catalonia, Spain) (Figure C1-5). It has a specific morphometry with two well-defined parts: a shallow elongated part (never exceeding 2.5-3 m depth) and a deeper circular basin (max. depth 10.4 m) near the shoreline. This basin is meromictic and its temporal dynamics are strongly conditioned by seawater inputs during strong storms, seepage inputs, the action of winds as well as the entry of freshwater, which is rich in nutrients, from the surrounding wetlands through the “Corredor” irrigation channel. The development of GSB populations in the basin, dominated mainly by a brown-pigmented species, formerly known as “*Chlorobium phaeovibrioides*”, has been described for previous summer periods (Riera, 1991). However, competition between brown and green species was observed during unstable phases of the annual cycle (stratification periods occur in winter or late spring) after each seawater intrusion.

Samplings in the basin were performed on 020710, 030926, 040730, 041018 and 050701.

In addition, the coastal lagoon “Es Cibollar” (Mallorca Island, Spain) was sampled once on 010718. Several previous studies revealed the presence of anoxygenic phototrophic bacterial populations in this environment (Vila, 1996).

Sampling procedures and measurement of physical and chemical parameters

Samples were taken using a special sampling device designed for the study of multilayered gradients and to minimize turbulence (Jorgensen et al., 1979), consisting of a peristaltic water pump which is connected to a tube with a double-cone shaped end. Water samples were maintained in the dark and cold until processed. Physical and chemical parameters such as conductivity, temperature, oxygen concentration, pH and Eh were measured *in situ* with a DataSonde 3 multiparametric probe (Hydrolab, USA). The sulfide concentration was determined in the laboratory using the Pachmayr colorimetric method (Trüper and Schlegel, 1964) from 10 ml of water previously fixed with 0.1 ml of 1M NaOH and 0.1 ml of 1M zinc acetate. Light measurements for Photosynthetically Available Radiation (PAR) were performed with a spherical quantummeter LI-250 Light Meter (LI-COR). Total salinity was determined in athalassohaline environments by filtering water samples through 47 mm, 0.22 μm pore diameter cellulose nitrate filters (Millipore), followed by evaporation at 100°C (overnight) and drying at 480°C for 4 h. The parameters p_{440} and g_{440} were calculated according to Kirk (Kirk, 1980; Kirk, 1983) to determine the contribution of particulate and soluble fractions to light attenuation in the Massona Lagoon. g_{440} values were determined by measuring A_{440} from filtered water samples (0.22 μm pore diameter). p_{440} values were calculated as the difference between total absorption at 440 nm and g_{440} . Nutrient data, at odd times, from the Massona Lagoon and its source channel were determined using standard methods (Grasshoff et al., 1983).



Figure CI-1. Location of endorheic systems studied in the Ebro Depression: Chiprana Lagoon and Playa Lagoon.

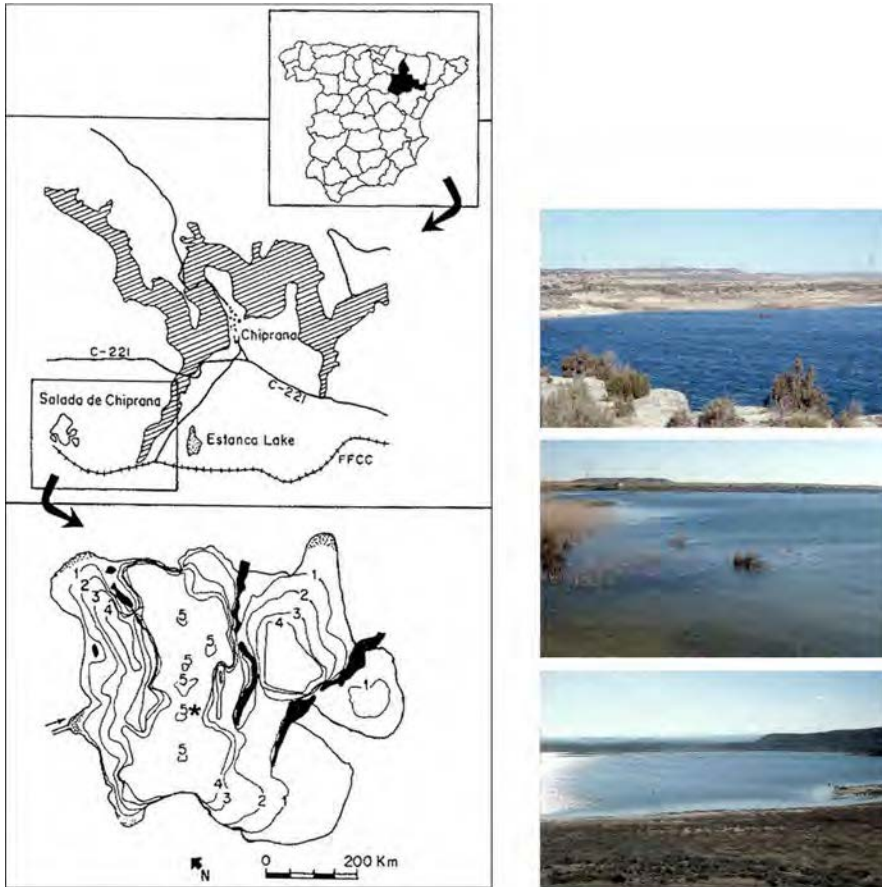


Figure C1-2. Geographic location of Chiprana lake (Vidondo, 1993) and panoramic pictures from different points (author: Xavier Vila). The bathymetric map (Vidondo, 1993) contains an indication of the sampling point in the deepest zone (*). Black elongated areas in the map correspond to the presence of submersed paleochannels. The arrow indicates the excavated canal which allows nutrient-rich freshwater to flow into the saline water body from the adjacent lagoon “la Salabrosa”, also known as “las Rocas”.



Figure CI-3. General views (left) of Playa lagoon pond I and a detail (right) of the sampling procedure with samples from the APB plate (author: Xavier Vila).



Figure CI-4. General views of Playa lagoon pond II and the sampling process, at different moments of the year (author: Xavier Vila).

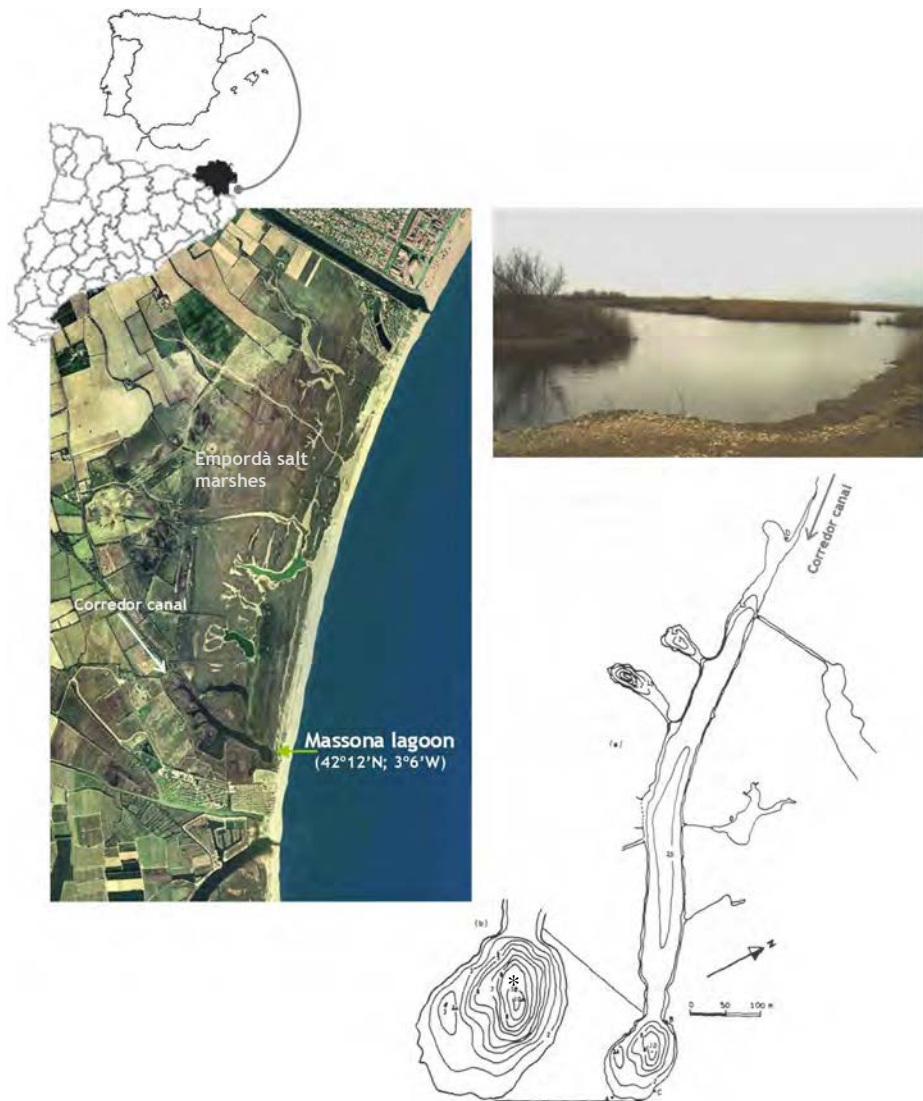


Figure C1-5. Geographic location, panoramic view (author: Alex Sànchez) and bathymetric map of Massona. Orthophotography shows its location within the Empordà salt marshes. Bathymetric map (Riera, 1987) shows its particular morphometry with two well-defined parts: a deeper circular basin near the seashore, where the sampling point (*) was located, and a shallow elongated one. The location of Corredor canal (also known as “Rec Gallinera”) has been indicated.

Analysis of photosynthetic pigments

Identification and quantification of photosynthetic pigments in water samples and laboratory cultures were achieved by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis to determine and relatively quantify the phototrophic microbial populations present in the samples (environmental or enrichment samples). A known volume of cell suspension was filtered through 47 mm, 0.22 μm pore-diameter cellulose nitrate filters (Millipore, Billerica, MA, USA) covered with a thin layer of 2.5% MgCO_3 (Montesinos, 1982). Magnesium carbonate as well as the retained cells were collected and a known volume of acetone-methanol solution (7:2) (Scharlau HPLC grade, Scharlab, S.L., Barcelona, Spain) was added. The extracts were sonicated at -33 Hz for 15 s with a Braun T-Labsonic 2000 and stored for 24 h at -20°C in the dark to ensure complete extraction of pigments (Montesinos et al., 1983). Prior to HPLC analyses, the extracts were centrifuged at 13,400 g for 15 min and clear supernatants were mixed with 1M ammonium acetate (10% final concentration), which was used as an ion-pairing agent to improve the resolution during pigment separation (Borrego and Garcia-Gil, 1994). Samples were analyzed by reverse-phase HPLC, according to Borrego and Garcia-Gil (1994), in a liquid chromatography instrument (Waters 510 Pumps and Waters 996 Diode Array Detector) provided with a Nova-Pack C-18 60 Å column (4 μm , 250 mm by 4.6 mm) in line with a precolumn packed with the same material. The contents of the photosynthetic pigment, chlorophyll (Chl), bacteriochlorophylls (BChl) and carotenoids, were calculated using the appropriate molar absorption coefficients (Oelze, 1985; Borrego et al., 1999) from absorption at λ_{max} for each pigment and the areas of the corresponding peaks. λ_{max} for different identified pigments were: 429 nm (BChl d), 434 nm (Chl a and BChl c), 453 nm (isorenieratene and relatives, and β -carotene), 463 nm (chlorobactene and relatives), 473 nm (BChl e), 487 nm (okenone, spirilloxanthin), and 771 nm (BChl a).

Flow cytometry analyses

Qualitative measurements for the presumptive determination of the phytoplanktonic community structure in the Massona Lagoon were performed with a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Oxford, UK) equipped with a laser emitting at 488 nm. Autofluorescence of the

cyanobacterial phycobiliproteins (fluorescence channel FL2) could be discriminated from autofluorescence of chlorophyll pigments (fluorescence channel FL3). The data were acquired in list mode and processed with WinMDI software (The Scripps Institute, Flow Cytometry Core Facility, California, USA).

Enrichment cultures under selective conditions and isolation procedures

A vast range of enrichment conditions concerning total salt content in the media (2, 6.5 and 11%), salt composition similar to athalassohaline and marine waters (Table C1-1) and pH (7, 8 and 9) were tested with water and sediment samples of different origins (Chiprana Lagoon at 010725, Playa ponds at 010724 and Cibollar Lagoon at 010718).

Table C1-1. Composition of modified Pfennig media (Pfennig and Trüper, 1992; Overmann, 2000), as it has been used for the enrichment procedures. Athalassohaline media composition has been established from the ionic composition described for the Chiprana Lagoon water (Guerrero et al., 1991).

Composition (g·L ⁻¹)	<i>Athalassohaline-like</i>		
	2%	6.5%	11%
KH ₂ PO ₄	0.35	0.35	0.35
NH ₄ Cl	0.2	0.2	0.2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.0	1.0	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	18.75	85.0	134.0
NaCl	5.23	17.0	28.8
Na ₂ SO ₄	1.0	4.0	4.0
	<i>Marine-like</i>		
	2%	6.5%	11%
KH ₂ PO ₄	0.34	0.34	0.34
NH ₄ Cl	0.4	0.4	0.4
KCl	0.34	0.34	0.34
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	0.5	0.5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.3	0.3	0.3
NaCl	20.0	65.0	111.0

The diversity of conditions was designed to obtain as much richness as possible from GSB isolates and to determine preferential enrichment conditions. Modified mineral media in septa-bottles (125 ml) were inoculated (10%) and incubated at 25°C under saturating light intensities (50-100 μE m⁻² s⁻¹). An electron donor (1mM final concentration) and a carbon source were periodically supplied (refeeding solution) during the incubation (Siefert and Pfennig, 1984). A pre-enrichment process was carried out when the density of

phototrophic bacteria in the environment was very low (macroscopically not detectable). In addition, when environmental samples presented neither significant sulfur concentrations nor negative Eh values, they were pre-enriched by the addition of H₂S at 1 mM of final concentration. Photosynthetic pigments were extracted from 2 ml enrichment samples with the procedure described above. HPLC measurements were used for the identification and relative quantification of dominant pigment groups of several different photosynthetic bacteria. A representative concentration of 0.2 µg l⁻¹ was attributed to pigments found in low proportion (detected as traces). Standardized pigment concentration values were used to construct a data base matrix. The Euclidean square distance coefficient was applied to transform data for further cluster analysis using the UPGMA algorithm. Calculations were made using the statistical package *SPSS* v 11.0 (Chicago, Illinois, USA). Selected enrichment samples were processed for further isolation of GSB by several deep agar dilution series (Van Niel, 1971; Pfennig and Trüper, 1992; Overmann, 2000).

DNA extraction and PCR amplification

Genomic DNA was obtained from environmental samples using the phenol/chloroform method (Moore, 1996). DNA from pure cultures was extracted in six freeze-thaw cycles (3 min at -80°C and 3 min at 100°C). Alternatively, the WizardTM Genomic DNA (Promega, Madison, USA) purification kit was used according to the manufacturer's indications for pure culture DNA extraction. DNA lysates were quantified using Picogreen® (Invitrogen Corporation, Molecular Probes) and adjusted to a final concentration of 25 ng µl⁻¹ before PCR reaction. The universal set of primers, Eub27f and Eub1492r (Weisburg et al., 1991), was used to amplify 16S rDNA gene fragments of all *Bacteria* in order to test the quality of lysates. 16S rDNA of GSB was specifically amplified by using both sets of primers: GCEub341f with (GC clamp added at 5'-end) (Muyzer et al., 1993)-GSB822r (Overmann et al., 1999a) and GS.619f – GS.1144r-GC (Achenbach et al., 2001). Each PCR reaction contained 25 ng of DNA template, 10 µmol of each primer, 5 µl of 10x PCR buffer, 0.2 mmol of each dNTP, 1.5 mmol of MgCl₂ and 1 U *AmpliTaq* polymerase (Applied Biosystems, Foster City, USA) in a total volume of 50 µl. Amplification reactions were performed using a PE 9700 thermal cycler (Applied Biosystems).

The program for 16S rDNA amplification with primers Eub27f and Eub1492 consisted of 35 cycles. In the 10 initial cycles 30 s of denaturation at 94°C, 1 min of annealing at 52°C and 1 min of elongation at 72°C were applied. During the following 25 cycles an annealing temperature step-down was applied until 50°C. The program for partial amplification of specific GSB 16S rRNA genes with primers GCEub341f (GC) and GSB822r was 1 min of denaturation at 94°C, 1 min of annealing at 50°C and 1 min of elongation at 72°C for 30 cycles. The annealing temperature for the GS.619f - GS.1144r (GC) specific set of primers was 55°C. Amplification products were analyzed by standard agarose gel electrophoresis. *Nested* PCR was applied when any specific amplification product was obtained from environmental samples by regular PCR.

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and sequencing of the 16S rRNA gene

Specifically amplified 16S rDNA fragments from both environmental and enrichment samples were separated by loading PCR products onto 6% (wt/vol) polyacrylamide gels in 1x TAE solution (Biorad, USA). Gel solutions at 20% and 60% of denaturant (formamide and urea) were applied. Samples were run at 120 V during 14-16 h in a Ingeny phorU® DGGE system (Ingeny International BV, The Netherlands). The gels were stained with SybrGold® (Invitrogen Corporation, Molecular Probes) for 45 min, and the gel pictures were digitalized with the Scion Image (TDI, Spain) PC image capture system. DNA bands were excised from the gel and eluted in an appropriate volume (25-50 µl) of Tris-HCl (pH 8.5) at 65°C during 45 min. Recovered fragments were reamplified with the same set of primers and the obtained products were purified with the QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN).

Cycle sequencing was performed with the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) according to the instructions supplied by the manufacturer. Samples were analyzed in an ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems).

Sequence analyses

Sequences were manually refined using BioEdit Sequence Alignment Editor software (Hall, 1999). Consensus sequence construction was performed from

forward and reverse sequence alignment with the MultAlin program (Corpet, 1988). In order to assess the chimera formation during PCR amplifications, sequences were analyzed with the Bellerophon program (Hugenholtz and Huber, 2003; Huber et al., 2004) using Jukes-Cantor (Jukes and Cantor, 1969) and Huber-Hugenholtz corrections and also the CHIMERA_CHECK program version 2.7 available in the Ribosomal Database Project (RDP-II) release 8.1 webpage (Cole et al., 2003).

The BLASTN 2.2.14 algorithm (basic local alignment search tool) (Altschul et al., 1997) was used to search for close evolutionary relatives of 16S rDNA sequences in GenBank, EMBL, DDBJ and PDB databases. Partial sequences of fragments recovered from DGGE gels were submitted with the accession numbers DQ984143-DQ984180.

Results

Habitat description of microbial populations

The Chiprana Lagoon was sampled at different dates from December 2000 to March 2002. Two periods were differentiated according to the stratification of the water body. Stratification according to temperature and conductivity gradients was observed in different sampling dates from December 2000 to March 2001. Between April 2001 and March 2002, the lagoon was mixed (Figure C1-6a), although weak stratification began at the end of this period. During the stratification period, the *chemocline* descended from 1-2 m to 2.5-3.5 m depth and an inverse temperature gradient was present, with an increment of 4 to 6.5°C from surface to bottom waters, due to the stabilizing effect of the vertical salinity gradient (Vidondo, 1993). Anoxic conditions developed in the hypolimnion where the concentration of sulfide ranged from 0.3 to 0.55 mM. These values were lower than those found in 1998 (Vila et al., 2002) when dense populations of anoxygenic phototrophic bacteria, largely dominated by GSB populations, were found at the bottom of the lagoon. Conductivity ranged from 54 mS cm⁻¹ at the surface to 63 mS cm⁻¹ at the bottom during the stratification period, but lower values could be found during mixing periods (Table C1-2). The average salinity value determined in the non-stratification situation detected in July 2001 was around 65‰ (hypersaline water) corresponding to a conductivity value of 49.7 mS cm⁻¹.

Playa I remained stratified throughout the study period (from July 2001 to January 2002.). The gradient of conductivity strongly determined the distribution of other parameters such as oxygen, Eh potential and temperature (although its low depth) and allowed the preservation of anoxic conditions at the bottom (Figure C1-6b). Conductivity ranged from 73 to 85 mS cm⁻¹ (between 0,4-0,6 m depth) during the summer and fall of 2001, and from 40 mS cm⁻¹ at the surface to 85 mS cm⁻¹ at the bottom in January of 2002 when the system increased its volume (until 1 m depth) by rainfall. Salinity values were estimated at 80‰. High concentrations of sulfide were found at the bottom (6-10 mM), but it was depleted in the immediate upper layers where the highest concentrations of purple sulfur bacteria were present.

Table C1-2. Values of main physical and chemical parameters measured in the water bodies.

Environment	Salt composition	Salinity (%)	Conductivity (mS cm ⁻¹)	Chemocline depth (m) ^b	H ₂ S max. concentrations (mM)
Chiprana	<i>Athalassohaline</i> ^a	6.5-8.4	49.0-64.4	2.2	0.3 - 0.55
Playa I	<i>Athalassohaline</i> ^a	7.0-8.0	73-85	0.4-0.6	6 - 10
Playa II	<i>Athalassohaline</i> ^a	15.1-20.0	82-105	-	1.8 - 3.4
Massona	<i>Thalassohaline</i>	0.1-5.0	1.4-55.7	5.1	1.0 - 8.0
Cibollar	<i>Thalassohaline</i>	1.3-3.9	16.1-53.1	4.5	8.3

(a) MgSO₄ and NaCl as main salts

(b) Mean values from different sampling dates.

Playa II was characterized by high conductivity values (up to 109 mS cm⁻¹). Salinity values of 200‰ were calculated. The chemocline was not well defined during July and October 2001, although anoxic conditions were present at the deeper layers (Figure C1-6c). Conductivity decreased in the surface in January 2002 because of the effect of rainfall and ranged from 82 to 105 mS cm⁻¹ (top to bottom). Sulfide accumulation rose in the hypolimnion with maximum concentrations between 1.8-3.4 mM close to the sediment.

The Massona Lagoon presented a well-defined vertical stratification of the water column in all sampling dates from 2002 to 2005. Physical and chemical parameters always presented similar distributions along depth (Figure C1-6d). Two layers with different densities were differentiated according to gradient of conductivity and temperature: an upper layer with brackish waters (8 mS cm⁻¹) and temperature values ranging from 26 to 22°C; and a more dense part

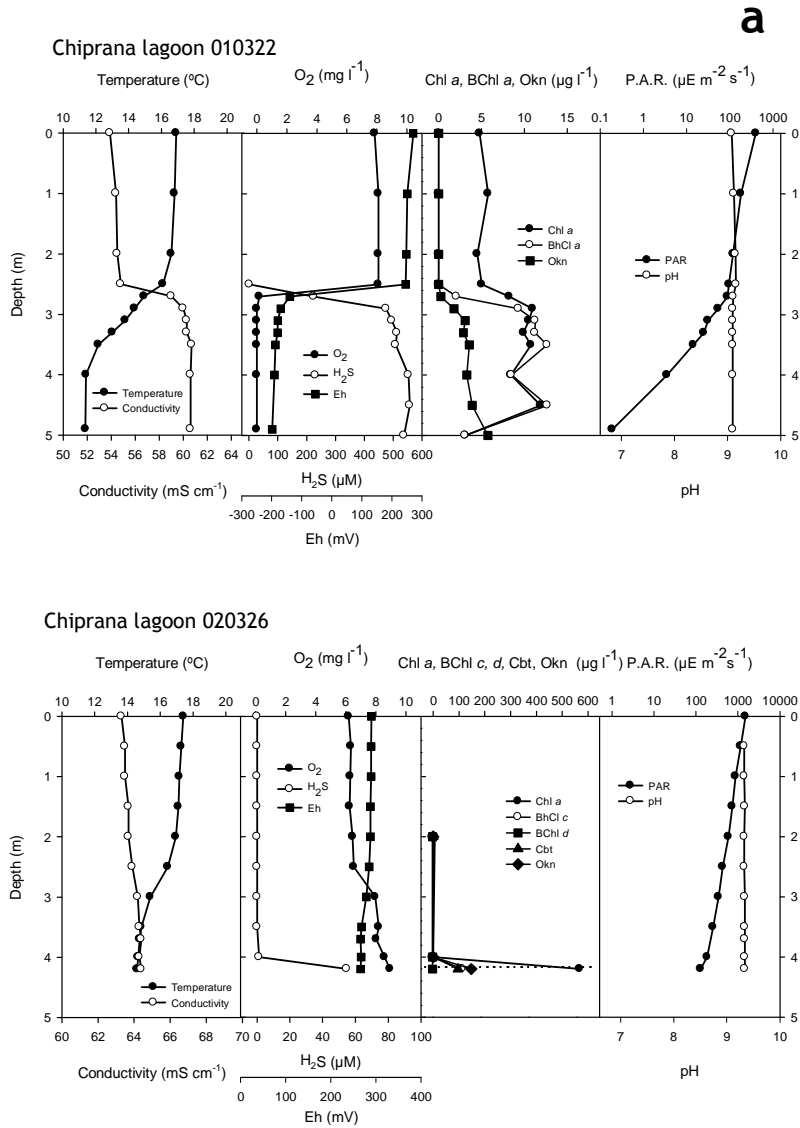


Figure C1-6. Vertical distribution of physical and chemical parameters and photosynthetic pigments in the water column of studied lakes at different times; only most representative situations according the variation of such parameters has been shown. Whole data from all sampling dates could be found in *Addenda C1-2*. Dotted lines indicate the upper part of a transition layer between water and sediment. *BChl* bacteriochlorophyll, *Cbt* chlorobactene, *Chl* chlorophyll, *Okn* Okenone, *rh* rare homolog of bacteriochlorophyll like pigment., *Spr* spirilloxanthin.

b

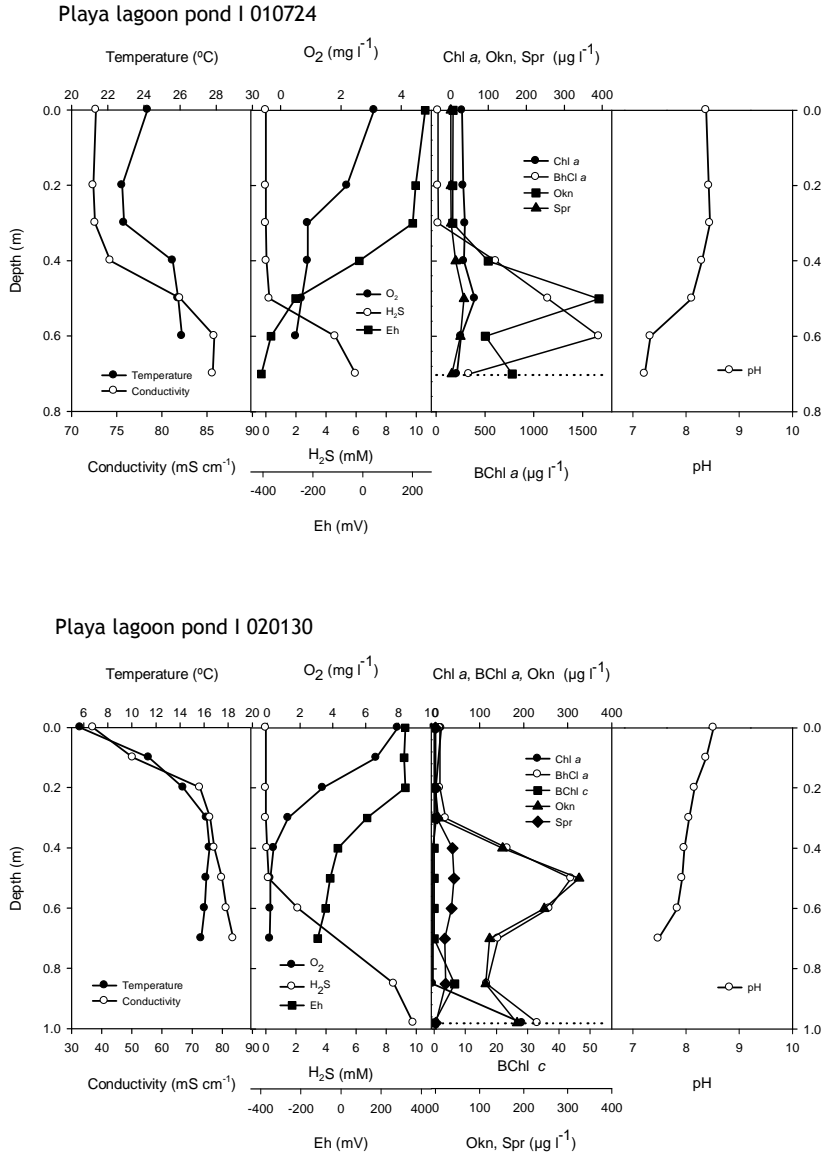
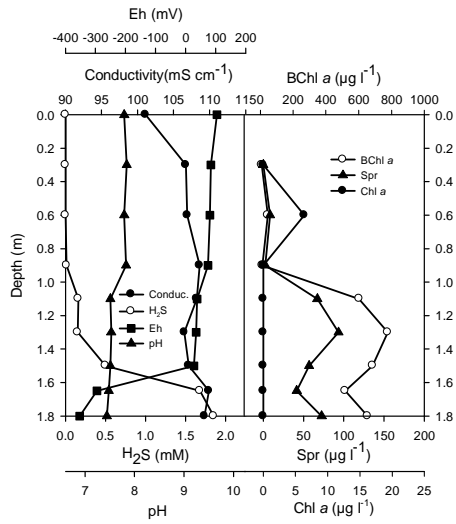


Figure CI- 6. (Continued, part b).

C

Playa lagoon pond II 010724



Playa lagoon pond II 020130

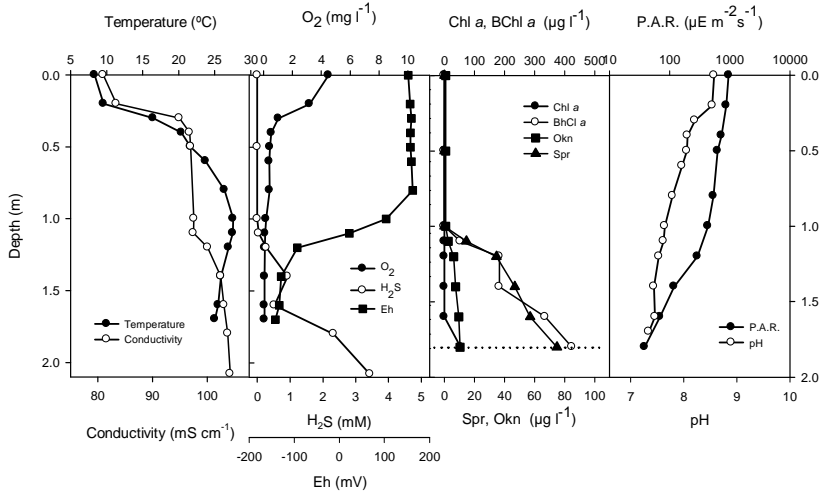


Figure CI-6. (Continued, part c).

d

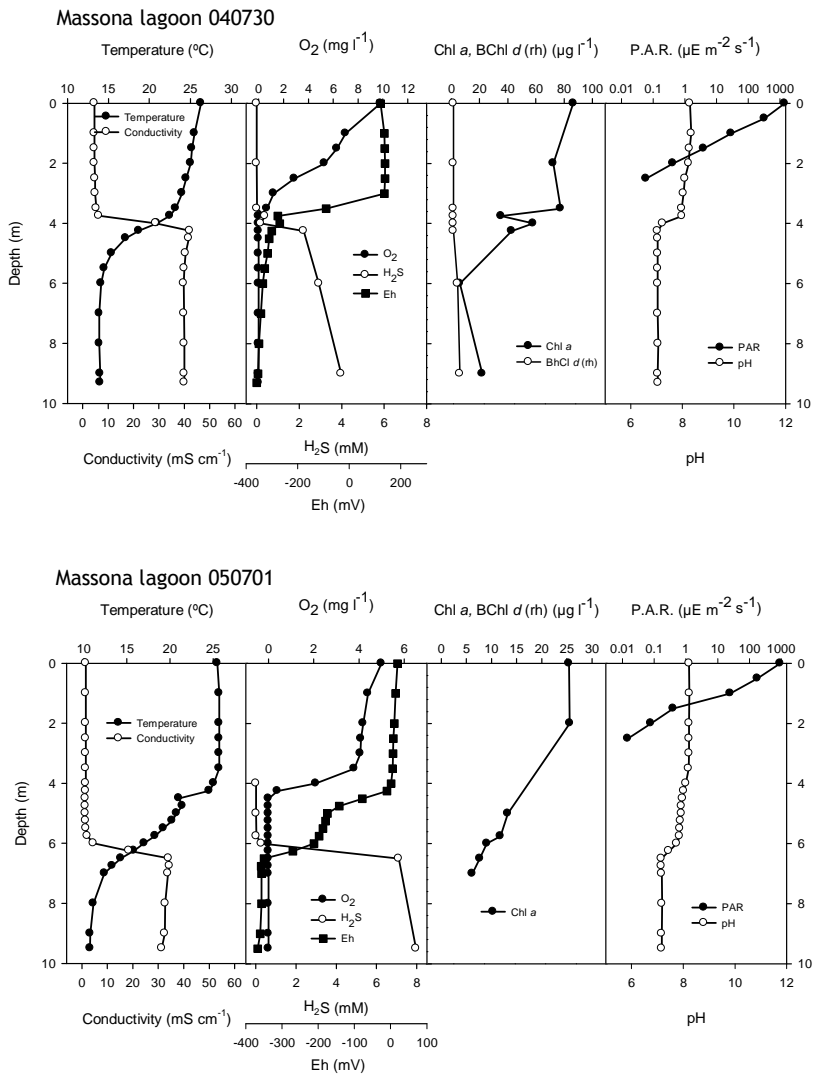


Figure C1-6. (Continued, part d).

on the bottom with salt concentrations similar to seawater (varying from 40 to 55 mS cm⁻¹) and lower temperatures (13 °C). A steep vertical gradient was found between 3.5-4.5 m depth for both parameters and other chemical parameters (oxygen and sulphide concentrations, Eh potential). Anoxic conditions were present in the monimolimnion with a high sulphide concentration (up to 7mM) due to intense sulphate-reducing activity probably fed by the seepage inputs of seawater. Light attenuation occurred quickly in the upper layers (between 1.75-2.25 m depth). Absorption of the soluble fraction g440 (Kirk, 1980; Kirk, 1983) was negligible, indicating a low content of *humic* acids and therefore a high contribution of particulate matter (photosynthetic organisms and inorganic particles) to light attenuation.

A singular situation was observed in July 2005 when anoxic conditions extended beyond the *chemocline*, concomitant with the temperature gradient. This anoxic layer (from 4.2 to 5.75 m depth) presented lower conductivity values (1.4 mS cm⁻¹) and lower sulphide concentrations (3.2 to 32 µM) than those measured in the monimolimnion (below 6 m depth) (Figure C1-6d).

Characterization of photosynthetic bacterial populations from morphology and photosynthetic pigment contents

Chiprana Lagoon

During the stratification period two photosynthetic populations were detected by pigment composition and microscopic observations: a unicellular *Synechococcus*-like cyanobacterium (at a maximum Chl *a* concentration of 45 µg l⁻¹) and a Purple Sulfur Bacteria (PSB) population tentatively assigned to *Marichromatium* spp. (*Chromatiaceae*), with BChl *a* and okenone (13 and 5 µg l⁻¹ respectively). GSB populations were not detected using either approach. When the lagoon was mixed, an increase of Chl *a* contents (up to 663 µg l⁻¹) was detected in the deepest zone, in contact with the sediment. It was related to the development of *periphyton*, mainly composed of cyanobacteria and diatoms, whose development in the benthic zone had previously been described (Díaz et al., 1998) and associated with anthropogenic perturbations resulting from an increase in the nutrient load. Trace concentrations of BChl *c*, *d* and *e* and carotenoid chlorobactene and okenone were detected at the bottom but it is unclear if they could be related to active APB populations.

Playa I

Red-colored waters observed in the man-made pond (Figure C1-3) agree with the development of dense PSB populations, since pigment analyses revealed maximum BChl *a* contents from 800 to 4500 $\mu\text{g l}^{-1}$. Different characteristic carotenoids and microscopic observations allowed determination of at least two populations: a dominant rod-shaped, gas vesicle-forming species, related to the detection of high amounts of okenone and tentatively identified as *Lamprobacter modestohalophilus*, and small rod tentatively classified as *Marichromatium gracile* as a result of the detection of spirilloxanthin. Low concentrations (5-10 $\mu\text{g l}^{-1}$) of BChl *c* were found below the PSB plate. Chl *a* was present in contact with the sediment and increased during the winter (from 25 to 200 $\mu\text{g l}^{-1}$), probably favored by the lower densities of PSB.

Playa II

According to microscopic observations and pigment analyses, two different PSB populations dominated the photosynthetic community. The prevailing one, although not clearly identified, was morphologically similar to *Thiohalocapsa* spp. because it has a spherical shape and is non-motile, non-gas vesicle-forming (Caumette et al., 1991; Imhoff, 2001b). However, instead of the expected okenone, a high amount of spirilloxanthin was detected. Another population, detected at lower densities, was tentatively assigned to *Lamprobacter modestohalophilus*, since it was morphologically similar to the rod-shaped, gas vesicle-forming PSB found in Playa I (Figure C1-6b/c). GSB were not detected by either microscopic observation or photosynthetic pigment analyses.

Massona Lagoon

Photosynthetic pigment analyses showed the presence of a high amount of Chl *a* (25-150 $\mu\text{g l}^{-1}$) with maximum concentration in the mixolimnion (0-4/6 m depth). Other characteristic pigments of oxygenic phytoplanktonic organisms, such as Chl *b* and the carotenoids lutein, zeaxanthin, violoxanthin, neoxanthin and β -carotene (Jeffrey et al., 1997; Mackey et al., 1997), were also identified by HPLC based on their characteristic spectra and different retention times. Cytometric analyses revealed only one peak in the Forward Scattering (FSC)-Side Scattering (SSC) and FSC-FL3 channels and no

phycobiliprotein autofluorescence in FL2 (Figure C1-7). Thus, the combination of cytometric and pigment data suggests the development of a dominant epilimnetic population of *Chlorophyceae*. Bacteriochlorophylls and carotenoids were not found along the water column during the studied period, with the exception of two unknown pigments with absorption spectra similar to BChl *e* and BChl *d* found only as traces ($<5 \mu\text{g l}^{-1}$). However, they could not be unequivocally related to the presence of GSB populations because they presented different chromatographic behavior than expected from their standards (Borrego and Garcia-Gil, 1994). Microscopic observations of environmental samples did not reveal the presence of GSB-like cells.

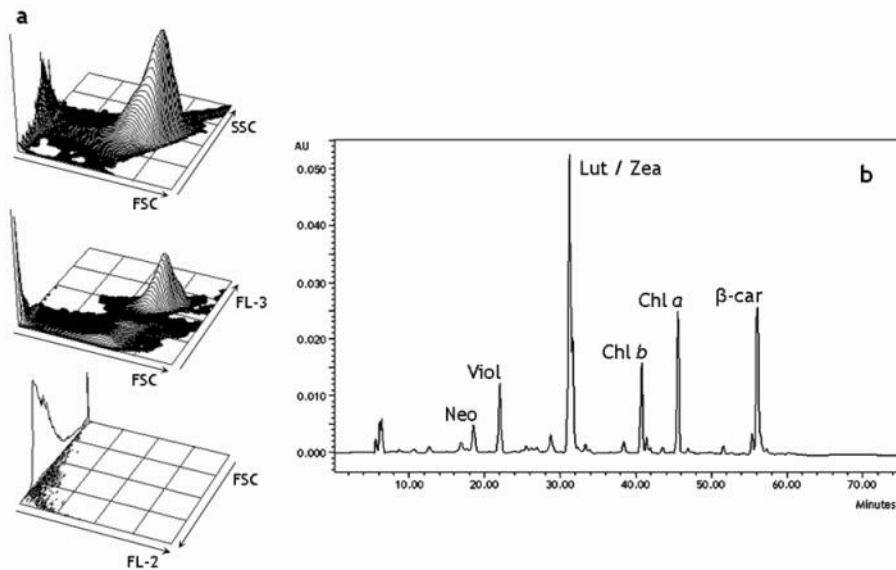


Figure C1-7. Cytometric and HPLC analysis of epilimnetic water samples of Massona lagoon. (a) Cytometric results obtained at FSC, SSC, FL-2 and FL-3 channels indicate that a single non-cyanobacterial population dominated the photic zone, according to the lack of signal in the FL2 channel (absence of autofluorescence from ficobiliproteins). (b) HPLC chromatogram recorded at 453 nm allow to identify the main photosynthetic pigments (Chlorophylls and eukaryotic carotenoids) found in the epilimnion during almost all sampling dates.

Enrichment of GSB populations under selective conditions

Different salt compositions, total salinities and pH values were used to modify a Pfennig mineral medium (Pfennig, 1965; Pfennig and Trüper, 1992; Overmann, 2000) in order to have a battery of different enrichment conditions. Samples from the Chiprana Lagoon, the Playa ponds I and II and the coastal meromictic brackish-seawater Cibollar Lagoon were used as inocula. Therefore, 90 different enrichment cultures were incubated (Table C1-3). After 15 days, 54 out of 90 enrichment cultures showed a significant growth for the different groups of phototrophic bacteria (oxygenic or anoxygenic) which were monitored according to the photosynthetic pigment contents in culture extracts (*Addenda* C1-1). It was possible to identify pigments belonging to two distinct pigmentary groups within GSB: BChl *c*, *d* and the carotenoids chlorobactene, β , Ψ -carotene with the OH derivatives for green-pigmented species; BChl *e* and the carotenoids isorenieratene and β -isorenieratene for brown-pigmented species. BChl *a*, okenone, spirilloxanthin were used to monitor PSB populations and Chl *a* and β -carotene for oxygenic phototrophic bacteria (cyanobacteria and algae). Pigment composition of the cultures was processed by cluster analysis to determine similarities among the enrichments (Figure C1-8) and the results were related to enrichment conditions. Cluster *1a* contains enrichments with a high proportion of chlorophyll pigments. They were obtained from a wide range of conditions and inocula. The oxygenation of cultures by oxygenic photosynthesis was responsible of the inhibition of anoxygenic phototrophic bacteria during incubation. Group *1b* includes those enrichments that contained a high amount of brown *GSB* pigments, usually with *PSB* pigments. The growth of brown species has only been observed in those enrichments obtained from the Cibollar Lagoon at high concentrations of salt (6.5/11% NaCl) in media with a thalassohaline-like composition. A third group (*1c*) was dominated by cultures with a high proportion of *PSB* pigments (including different carotenoids such as okenone and spirilloxanthin), mainly obtained at high values for both pH (8-9) and salinity (6.5/ 11% of salts). These cultures were obtained from different inocula. Finally, a high amount of green *GSB* pigments characterized cluster 2, which is composed of enrichments obtained from different origins at high salinities (6.5/11% of salts) and low to slightly alkaline pH values (7-8). Salt composition (*athalassohaline*- or *thalassohaline*-like) did not influence the *GSB* enrichment process.

Table CI-3. Set of enrichment cultures performed for the determination of selective enrichment conditions of salt-tolerant or halophilic GSB species. A battery of growth conditions such as different composition of media, salinity and pH were applied to samples of different origin. Numbers identify positive enrichments, (-) indicates samples where growth was not detectable, (*) indicates the samples processed for isolation of bacteria and identification by molecular analyses (PCR-DGGE). Letters refer to the tentative morphotype identification of the isolated cultures: *a* brown-pigmented *Ptc. vibrioformis*, *b* green-pigmented *Ptc. vibrioformis*, *c Ptc. aestuarii*, *d Thiohalocapsa*-like morphotype, *e Lamprobacter*-like morphotype, *f* unclassified *Chromatiaceae*.

Culture conditions			Origin of samples											
Salinity		pH	Cibollar			Chiprana lagoon			Playa I			Playa II		
composition of media	Salinity (%)		4.8 m	4.8 m	sediment	0.4 m	0.7 m	sediment	1.3 m	1.8 m	sediment			
<i>athalasso.</i>	2	7		(-)	(-)	13* e	16	28	(-)	(-)	47			
<i>athalasso.</i>	2	8		(-)	(-)	(-)	17* b	29	39	43	48			
<i>athalasso.</i>	6.5	7		(-)	(-)	(-)	18* b	30* b	(-)	(-)	49* b			
<i>athalasso.</i>	6.5	8		(-)	(-)	14	19* b	31	40	(-)	(-)			
<i>athalasso.</i>	6.5	9		(-)	(-)	(-)	20* e, f	(-)	41	44	50* d, e			
<i>athalasso.</i>	11	8			5* c	(-)	15* e	21* e	32* f	42	(-)	51* b		
<i>marine</i>	2	7	(-)	(-)	(-)		22	33		45	52			
<i>marine</i>	2	8	(-)	(-)	(-)		23* e	34* e		(-)	53			
<i>marine</i>	6.5	7	1* a	6* d	9* b		24* b	35		(-)	(-)			
<i>marine</i>	6.5	8	2	(-)	10		25	36		(-)	54			
<i>marine</i>	11	7	3	7	11		26	37		46*	(-)			
<i>marine</i>	11	8	4 * a	8	12 * b		27* e	38		(-)	(-)			

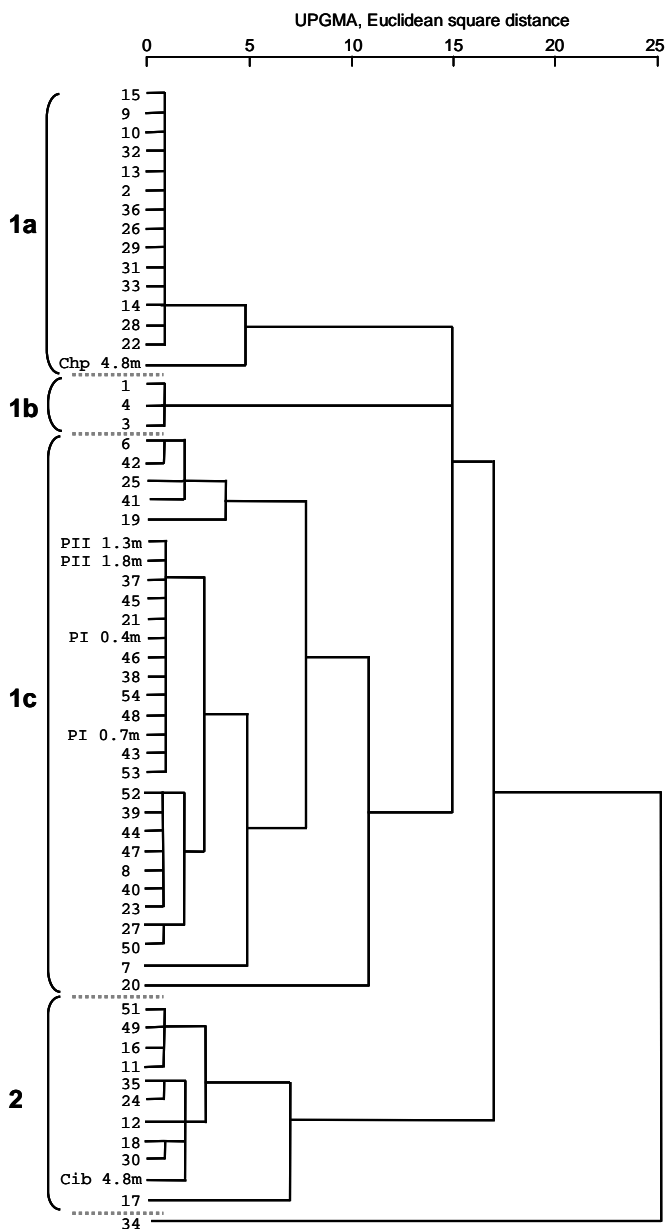


Figure C1-8. Hierarchical cluster analyses of quantitative pigment data, which are related to the dominant populations of photosynthetic microorganisms, obtained from enrichments. The dendrogram has been constructed using average linkage UPGMA algorithm from the Euclidean square distance matrix. The numbers are related to the codes of enrichment cultures, as in *Table C1-3*. Four major clusters are identified according to the pigment composition of samples: *1a* high proportion of chlorophyllic pigments from eukaryotic phytoplankton, *1b* high amounts of brown GSB pigments with PSB pigments, *1c* high amounts of PSB pigments, *2* high amounts of GSB pigments. Enrichment 34 only presented traces of photosynthetic eukaryotic pigments.

GSB enrichment was positively achieved from different environmental samples of all studied environments. Usually, no traces of GSB are detected in the environment sample using microscopic or molecular (HPLC) approaches. GSB were enriched even when the original sample did not present adequate chemical conditions (Eh values, high concentrations of sulfide) for the development of such populations in the environment (e.g., samples from the Chiprana Lagoon). Nevertheless, a pre-enrichment process - with the addition of sulfide solution at 1mM final concentration - was necessary before inoculation in a modified Pfennig mineral medium. GSB enrichments from the Massona Lagoon were also successfully obtained when environmental samples below the euphotic zone were pre-enriched in saturating light conditions (Figure C1-9).

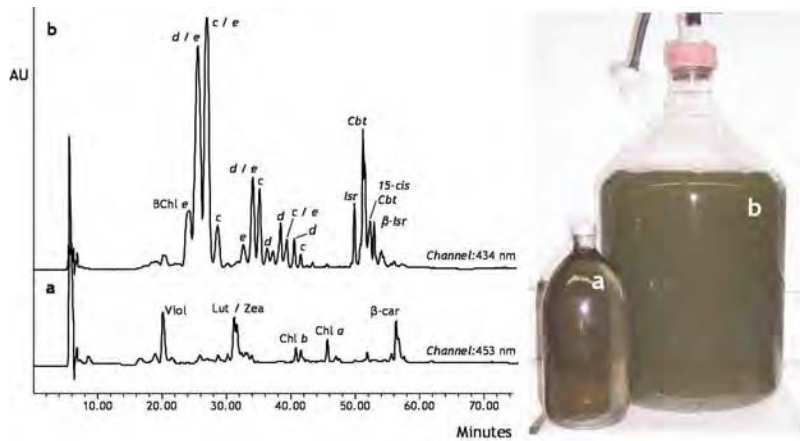


Figure C1-9. Comparison between photosynthetic pigment composition from HPLC chromatograms (left) of: (a) an environmental sample of Massona lagoon at 6.5 m depth in July 2005, (b) its pre-enrichment after incubation (10 days). Samples in bottles at the picture (right) correspond to these two situations.

GSB detection by PCR-DGGE from environmental and enrichment samples

A molecular approach with DGGE and sequence analysis was used to compare 16S rDNA PCR amplification products obtained from environmental samples, enrichments and strains isolated from these environments. PCR products obtained from the Massona Lagoon by DGGE analysis showed a significant diversity of GSB phylotypes (Figure C1-10c). At least six different phylopecies, according to BLAST results, were detected from samples and enrichments (Table C1-4). However, a large uniformity in the pattern of bands can be observed at different depths for each sampling date, with the exception of July 2002. Each sample contained just one or two different bands. The dominant populations detected from the environment could change in different annual periods. Pre-enrichment cultures often indicate the presence of phylotypes that were undetectable in the environmental samples (Figure C1-10c).

Prosthecochloris spp. (emended Imhoff 2003) was almost the only species detected in athallassohaline environments (Table C1-4). As exceptions, two sequences, one from Playa II (DGGE: PII-1) and the other from Cibollar (Cib-2), presented 96.3% similarity with other sequences (acc. number: AJ290834, AJ290833, AJ290828, Y08107) belonging to different genera (*Prosthecochloris* and *Chlorobium*). Therefore, they are considerably distant and might be understood as members of a new phylotype within the GSB group. Moreover, these sequences were closely related (similarity of 97%) to an uncultured epibiont of phototrophic consortia “*Chlorochromatium magnum*” phylomorphotype E (accession number: AJ272094) (Frostl and Overmann, 2000; Glaeser and Overmann, 2004) (Table C1-5). Since epibionts in phototrophic consortia and free-living relatives (according to phylogenetic analyses) have been found exclusively in freshwater lakes, the origin (associated or free living state) of this DNA fragment is, interestingly, unresolved. It is also interesting that nested-PCR allowed the detection of another phylotype (Chp-5) affiliated with the *Chlorobaculum* genus from a water sample of the Chiprana Lagoon (during the stratification period in January 2001).

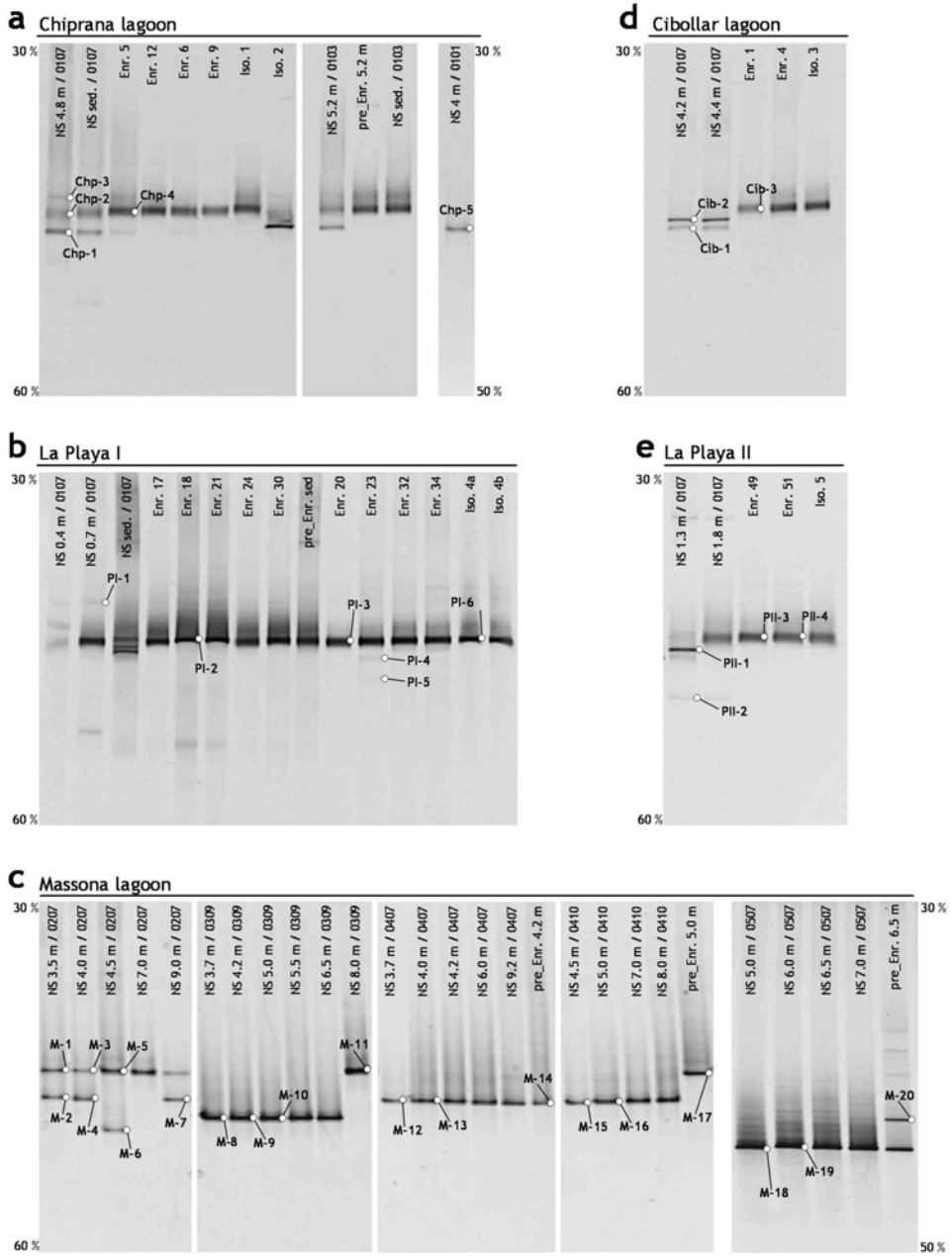


Figure C1-10. DGGE analyses of GSB-specific amplification 16S rDNA fragments from environmental samples and enrichment cultures. Information related to depth and sampling date (yy-mm) is indicated at each lane of the gels. The numeration of enrichment samples correspond to Table C1-3. Sequence codes for bands cut out from DGGE gels correspond to Table C1-4. NS natural samples, Enr enrichment samples, Iso isolated strains (1, 3, 4a, 4b, 5: *Ptc.vibrioformis*; 2: *Ptc.aestuarii*).

Table C1-4. BLAST sequence results of 16S rDNA fragments retrieved from DGGE gels. Sequence codes indicate the origin: *Chp* Chiprana Lagoon, *PI* Playa I, *PII* Playa II, *M* Massona Lagoon and *Cib* Cibollar Lagoon. (*) Phylogenetic group classification within GSB according to Alexander *et al.* (2002).

Sequence code	Similarity	Closest environmental clones or bacterial strains (accession n°) from BLAST analysis	Group*
Chp-1 PI-4	99% 99%	<i>Ptc. aestuarii</i> CHP3401 (AJ291826)	1
M-6	99%	<i>Ptc. aestuarii</i> DSM271 ^T (Y07837). Uncultured GSB clones: K-706 (AJ428431); K-500 (AJ428429); K-101 (AJ428423); K-100 (AJ428422)	1
Chp-2 Chp-3 Chp-4 PI-1 PI-2 PI-3 PI-6 PII-2 PII-3 PII-4 Cib-3	99% 99% 99% 98% 100% 100% 100% 99% 99% 100% 99%	<i>Prosthecochloris</i> sp. CIB 2401 (AJ291828), <i>Ptc. vibrioformis</i> CHP3402 (AJ291827); DSM 260 ^T (M62791)	1
M-1 M-3 M-5 M-11 M-17 M-20	99% 99% 99% 99% 100% 99%	<i>Prosthecochloris</i> sp. CIB 2401 (AJ291828), <i>Ptc. vibrioformis</i> CHP 3402 (AJ291827)	1
PI-5	97%	<i>Chl. luteolum</i> DSM 273 ^T (Y08107) // Uncultured bacterium clone 21ws (AB154452), clone SI_05 (AJ580961)	2a
M-2 M-7 M-12 M-13 M-14 M-15 M-16 M-19	99% 99% 99% 99% 99% 99% 99%	<i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 270 (AJ290834); DSM 261 (AJ290828); DSM 269 (Y08105)	2b
Cib-1	100%	<i>Chl. phaeovibrioides</i> DSM 270 (AJ290834); DSM 261 (AJ290828)	2b
M-4	99%	<i>Chl. limicola</i> DSM 246 (AJ290824); DSM 1855 (AJ290832); 9330 (AJ290827); DSM 245 ^T (Y10113)	3b
M-18	98%	<i>Chl. limicola</i> DSM 246 (AJ290824); DSM 245 ^T (Y10113), DSM 1855 (AJ290832); 1630 (AJ290826); UdG6037 (AJ299414); 9330 (AJ290827)	3b
M-9 M-10	99% 99%	<i>Cba. limnaeum</i> DSM 1677 ^T (AJ290831); DSM 1549 (AJ299413)	4b
M-8	99%	<i>Cba. tepidum</i> ATCC 49652 ^T / NCZ / TLS (M58468)	4b
Chp-5	98%	<i>Cba. tepidum</i> ATCC 49652 ^T / NCZ / TLS (M58468), <i>Chlorobaculum</i> sp. (AY394833; AY394832; AY394831; AY394830)	4b
PII-1 Cib-2	97 / 96% 97 / 96%	Uncultured Chlorobi bacterium, phototrophic consortium " <i>Chlorochromatium magnum</i> " (AJ272094) / <i>Chl.luteolum</i> DSM 273 ^T (Y08107)	-

Table CI-5. Dissimilarity values (%) among 16S rDNA sequences from different type species of GSB, DGGE band *PII-1* and epibiont consortia “*Chlorochromatium aggregatum*” and “*Chlorochromatium magnum*”. Jukes and Cantor (1969) correction has been applied as a model of nucleotide substitution when performing the matrix.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1 <i>Prosthecochloris aestuarii</i> DSM 271 ^T	-															
2 <i>Ptc.vibrioformis</i> DSM 260 ^T	5.26	-														
3 <i>Chlorobium luteolum</i> DSM 273 ^T	8.04	5.99	-													
4 <i>Chl.phaeovibrioides</i> DSM 269 ^T	6.28	4.77	1.64	-												
5 <i>Chl.phaeobacteroides</i> DSM 266 ^T	5.78	5.52	5.52	3.80	-											
6 “ <i>Chl.ferrooxidans</i> ” DSM 13031 ^T	5.76	5.48	4.76	3.07	3.07	-										
7 <i>Chl.clathratiforme</i> DSM 5477 ^T	5.79	5.53	4.54	2.84	3.08	0.23	-									
8 <i>Chl.limicola</i> DSM 245 ^T	5.77	3.79	3.55	2.35	3.56	2.82	2.84	-								
9 <i>Chlorobaculum parvum</i> DSM 263 ^T	8.03	8.83	5.24	6.08	7.46	6.87	6.65	6.08	-							
10 <i>Cba.thiosulfatophilum</i> DSM 249 ^T	7.29	8.04	4.04	5.28	7.05	5.02	4.80	4.78	3.64	-						
11 <i>Cba.tepidum</i> ATCC 49652 ^T / NCZ	5.58	6.81	5.06	5.33	6.86	5.55	5.34	4.82	3.93	2.13	-					
12 <i>Cba.limnaeum</i> DSM 1677 ^T	5.51	6.73	5.25	5.51	6.77	5.73	5.53	5.01	4.42	2.35	0.70	-				
13 <i>Chloroherpeton thalassium</i> ATCC 35110 ^T	10.19	11.02	10.19	10.51	10.52	10.73	10.80	10.79	11.63	10.80	11.14	10.73	-			
14 “ <i>Chlorobium chlorochromatii</i> ” CaD (epibiont consortia)	7.27	7.23	5.00	4.77	5.52	4.74	4.78	5.26	7.99	7.02	7.58	7.74	10.44	-		
15 Uncultured epibiont consortia 100“ <i>Chlorochromatium magnum</i> ” (AJ272094)	4.78	3.06	3.31	2.11	3.32	2.82	2.60	2.35	5.79	5.03	4.57	4.27	10.47	4.76	-	
16 DGGE band PII-1	5.03	3.78	3.31	3.56	5.28	4.76	4.79	4.04	6.34	5.53	4.57	4.51	10.47	4.76	2.58	-

The different *DGGE* band patterns obtained from natural samples of these environments indicated a higher GSB richness in comparison to the respective enrichment cultures (Figure C1-10). The same DNA band has been found in most of these enrichments. The resulting sequence clustered into the marine group of *Prosthecochloris* spp., close to *Ptc. vibrioformis* (comb. nov. Imhoff 2003). These strains have demonstrated a high ability to grow under a wide range of laboratory conditions. Only one other sequence, obtained from enrichment 23 of Playa I, was closely related to *Chlorobium* spp. (emended Imhoff 2003), and specifically to *Chl. luteolum* (comb. nov. Imhoff, 2003) with a similarity of 97.3%.

Nested-PCR was a suitable way to obtain amplification products from natural samples when GSB were not detected by regular PCR (e.g. sediment sample of Playa I), probably due to a small amount of GSB genomic DNA copies in the extracts. However, the multiplicity of bands observed in the *DGGE* pattern from this sediment sample (Figure C1-10b, lane NS sed / 0107) might not be directly correlated to true species richness in the environment because artefact fragments could appear due to the higher bias of nested-PCR.

Discussion

Environmental factors impairing the development of APB communities

Man-made ponds in the Playa Lagoon

The permanent water ponds in the Playa Lagoon have been described as the main discharge points of subterranean fluxes of the region (Alcorlo and Baltanás, 1999b). The combination of rainwater and groundwater inputs prevents desiccation in any period of the year. The morphometry of the ponds (small basins with vertical walls, 1-2 m) and the protection conferred by the walls from the strong winds prevailing in the region (“*cierzo*”) strongly determine the preservation of anoxia at the bottom. In addition, the high salt contents and the salinity gradient have a stabilizing effect on chemical gradients along the water column and even make the development of inverse thermal stratification at different periods (including summer, fall and winter) feasible. These singular, man-made systems probably present a mixture of crenogenic and ectogenic meromixis.

The dominance of PSB populations can be explained by the higher efficiency of these microorganisms at high light intensities (close to $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ just a few centimeters under the surface) in comparison with GSB (Borrego et al., 1993). The lower concentration of salts tolerated by *Lamprobacter modestohalophilus* (up to 9% NaCl) in comparison to *Thiohalocapsa halophila* (up to 20% NaCl) (Caumette et al., 1991; Caumette, 1993; Imhoff et al., 1998) agrees with the low proportion of the former detected in pond II (with a high salinity, around 20% dissolved salts). Furthermore, GSB populations detected in pond II by molecular and cultivation methods, but undetectable by microscopic observations and pigment analyses, probably present a low efficiency growing in this high salinity, since GSB species are commonly upper-limited at salinity concentrations of marine or slightly hypersaline waters (up to 9 % NaCl) (Caumette, 1993; Imhoff, 2001b).

In pond II, photosynthetic microorganisms, including PSB, could be subjected to a high grazing pressure by the dense population of *Artemia parthenogenetica* found there. Natural grazing activity over these bacterial populations by aerobic zooplankton has already been described (Overmann et al., 1999b). However, the contribution of PSB to the primary production in the system is still unknown.

Chiprana Lagoon

The limnological results confirm that the seasonal behavior of the lake is a mixture of holomictic and meromictic (Vidondo et al., 1993). Different factors like basin shape, anthropological agents and meteorological phenomena (precipitations and wind) can be involved in the development and loss of stratification, a process of ectogenic origin that can be related to rainfall, runoff inputs and the irrigation returns from the adjacent freshwater lagoon “Laguna las Rocas”. Major precipitations were reported during October and November of 2000 (data not shown) prior to the stratification period. Breakdown of the stratification was mainly influenced by the strong winds prevailing in the region (*cierzo*). Meteorological data indicate that high values of total wind velocity per month were registered before the sampling dates when the lake was mixed (Figure C1-11). In addition, the open shape of the main basin with a large surface area (31.5 ha) and shallow waters (mean depth 2.3 m), as well as the smooth reliefs of the region, can favor exposure to

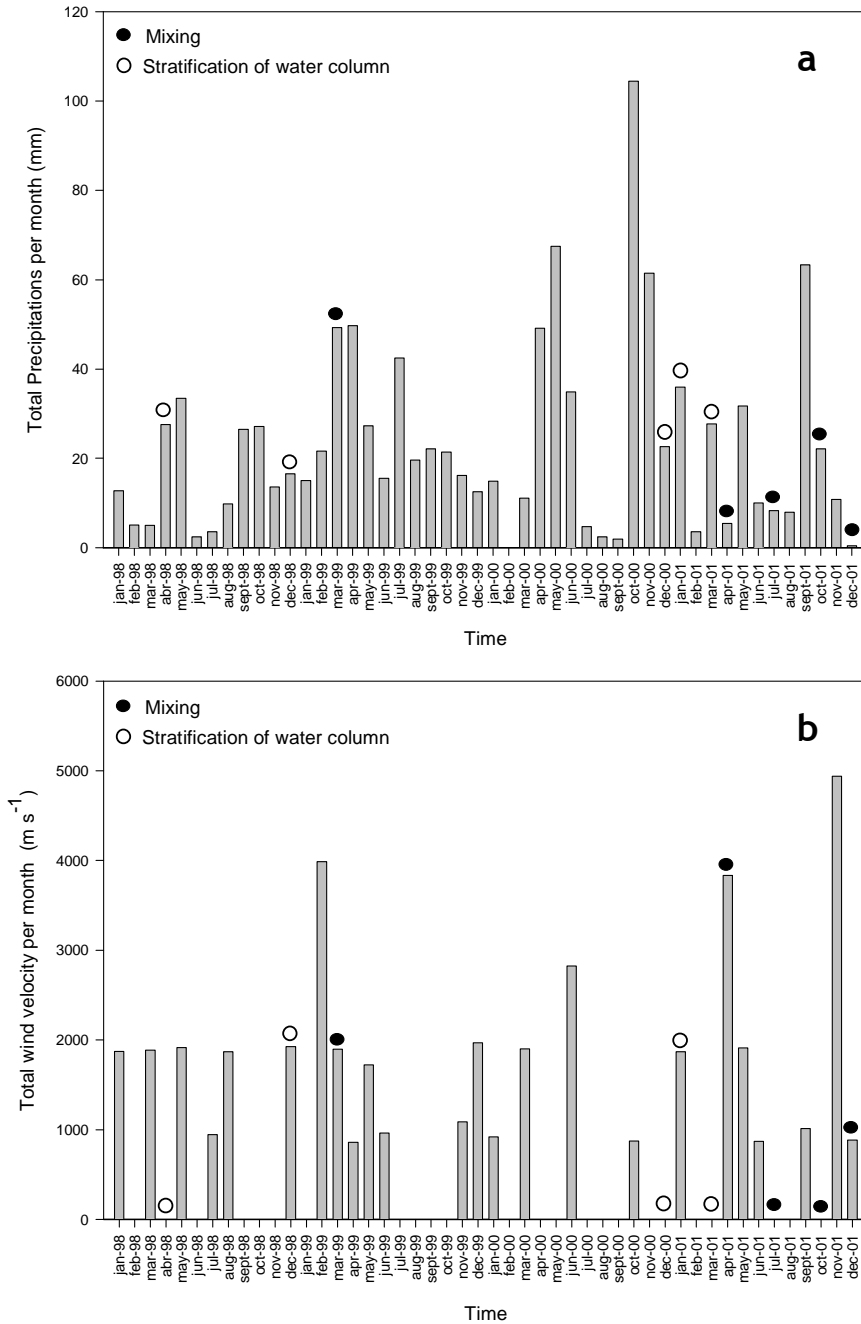


Figure C1-11. Meteorological data from the automatic station of Zaragoza airport (41°39'43"N; 10°02'92"W) during the years 1998-2001: **(a)** Precipitation, as total mm (equivalent to $l \cdot m^{-2}$) per month. **(b)** Wind velocity, calculated from total values of wind velocity per day during each month (only the 50 greatest events have been considered for this meteor). Dots correspond to sampling dates, either performed by Vila *et al.* (2002) during 1998/99 period or those performed during this work (2001). The stratification/mixing situation of water column has been also indicated.

the winds and, as a result, the mixing event. Thus, an intense rainfall period followed by an episode of calm without the influence of wind could be optimal for the development of stratification. However, planktonic GSB populations have not been detected from either macro-microscopic observations or pigment analyses, although physical and chemical conditions suitable for their development have been found during the stratification period.

Physical, chemical and biological conditions in the water column during spring 2002 were completely different from those registered the year before. Chl *a* concentrations in contact with the sediment rose from 28.5 $\mu\text{g l}^{-1}$ in October 2001 up to 568 $\mu\text{g l}^{-1}$ in March 2002, whereas photosynthetic pigments were almost absent from the entire water column. In addition, an unusual oxygen profile was observed (maximum oxygen concentration of 9 mg l^{-1} at the bottom) when weak conductivity and temperature gradients indicated the beginning of a stratification period in the early spring of 2002 (Figure C1-6a). The development of this oxygenic photosynthetic benthic community (composed mainly of diatoms and cyanobacteria) could be favored by the availability of both nutrients and light. Meteorological factors are probably the final reason for these changes since low rainfall inputs registered during the spring, summer and autumn of 2001 could require more intensive crop irrigation with a resulting rise in the nutrient load (Figure C1-11). Previous data from 1989 and 1994/95 indicate that the irrigation returns from agricultural activities were responsible for an increase in the nutrient load observed as well as for a marked decrease in the diversity of the primary producer community (Díaz et al., 1998). A notable growth of periphyton was also detected in the 1994/95 annual cycle. Accumulated nutrients (phosphorus) could be unavailable in the water column as a result of their immobilization (Díaz et al., 1998) in the form of tightly bound chemical complexes (mainly with Mg^{2+} and Ca^{2+}) leading to low levels of orthophosphate in the water. Afterwards, phosphorus could be released from the sediment surface because sulphate (present at high concentrations in the sediment) could chemically compete with ionic species (Caraco et al., 1989). In close agreement with this hypothesis, in October 2000 and May 2001 (Ludwig et al., 2006) pore water (0-4 mm) from the benthic community presented the highest phosphate levels in comparison to the water column (up

to 25-fold). Moreover, the development of periphyton can cause further clarification of the water column and major light availability at the bottom, because it has a stabilizing effect on the sediment surface that restricts nutrient resuspension from the benthic community. Oxygen production by primary producers on the sediment could hinder anoxia in the hypolimnetic water and, therefore, prevent the development of GSB and PSB populations. Consequently, the development of GSB seems to be limited by an excess of nutrient accumulation in the system (Figure C1-12).

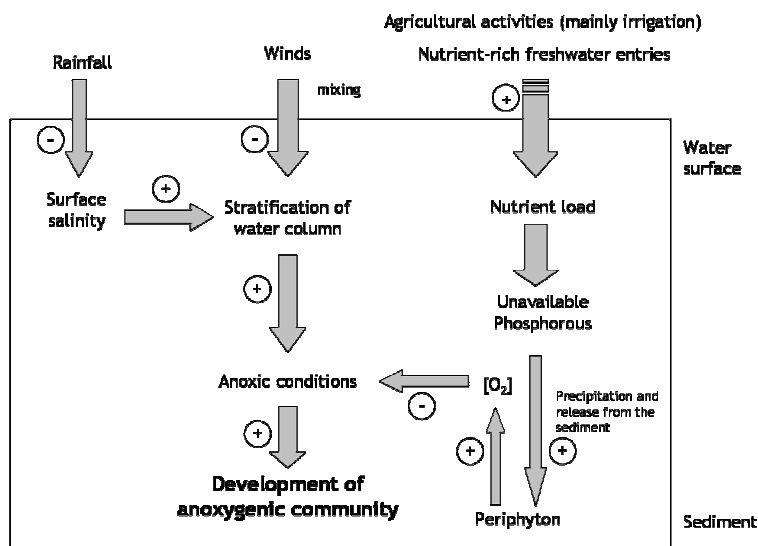


Figure C1-12. Pattern of effects and interactions of biotic and abiotic factors on the development of an oxygenic phototrophic community. The diagram has been modified from Díaz *et al.* (1998).

Although different protection measures have been adopted to protect the lake and its vicinities, with the inclusion in the Ramsar Convention (1994) and the European network for nature and people (Natura 2000), and the recently approved (April 2006) natural resources management plan (PORN) by the regional government of Aragon, additional consideration should be given to attain the environmental conditions previous to the intensification of irrigation practices; nowadays, almost a 65% of total cultivated surface is irrigated (on-line available data of the Agricultural and Food Department of Aragón: <http://portal.aragob.es/pls/portal30/url/folder/agr>). Present rules are aimed at

regulating freshwater inputs, in order to prevent changes in salinity, and they do not take into consideration the nutrient contents because nutrient measurements from the water column show low values and the column is therefore presumed to be oligotrophic (Boné Pueyo, 2006). However, nutrient inputs might still be significant and could be accumulating in the sediment through the proposed model. Additional management procedures should be oriented to reduce nutrient loads.

Massona Lagoon

Light, essential for phototrophic bacteria, was found to be deficient in the anoxic, sulfide-containing layers of the Massona Lagoon during the entire studied period (July 2002 to July 2005). Therefore, APB could not develop in the anoxic layers, in which light (quantitatively and qualitatively) had been already described as the main selective factor (Riera and Abella, 1986). In addition, eutrophication, due to anthropological activities, was previously reported to be the main factor involved in steep light attenuation in the lagoon (Armengol et al., 1983). Present data suggest an increase of light attenuation due to particulate suspended material (phytoplankton as well as non-photosynthetic microorganisms or inorganic particulate materials). During 1980-81, chlorophyll *a* concentrations between 0 and 4 m depth ranged from 73.8 to 255.2 mg m⁻² and, consequently, phytoplankton was considered as the main factor involved in the light extinction, which occurred at 4-5 m depth (Armengol et al., 1983). During the 1985-86 cycle, chlorophyll *a* concentrations (between 0-4 m) were quite dense (263.9 mg Chl *a* m⁻² at 850725; 115.2 mg Chl *a* m⁻² at 860111 and 73.8 mg Chl *a* m⁻² at 860503) and light extinction occurred between 5 and 6 m depth (Riera et al., 1987). At that time, however, dense laminar GSB populations (up to 1·10⁸ cell ml⁻¹) developed between 4 and 6 m depth. During the samplings performed from 2002 to 2005, Chl *a* concentrations determined in the epilimnion were considerably higher: (Chl *a* in mg m⁻²) 625.4 at 020710, 422.2 at 030926, 291.0 at 040730, 188.5 at 041018 and 134.7 at 050701. Phytoplankton was dominated by a single *Chlorophyceae* population at all depths and times. In contrast, a higher heterogeneity had been found in previous studies (Domínguez-Planella, 1987), when dominant populations of *Chlorophyceae* were also accompanied by *Cyanobacteria* or *Cryptophyceae*. Therefore, Chl *a*

concentrations indicate that phytoplankton is at present, through light attenuation, one of the main limiting factors for GSB populations.

Almost complete light attenuation (<0.1% PAR) occurs between 1.75 and 2.25 m depth (Figure C1-13). In addition, it should be considered that non-photosynthetic materials could also be responsible for light attenuation since the steepest light attenuation occurred when Chl *a* concentrations were the lowest of the studied period (134 mg m⁻² at 050701). But *gilvin* light absorption effect would not be significant because p_{440} / g_{440} presented high values ranging from 11.5 to 13 between 0 and 2 m depth at this date. High nutrient concentrations (3540 mg m⁻³ total N and 780 mg m⁻³ total P at 050701) determined at the main freshwater input of the lagoon (“Rec Corredor”, also called “Rec Gallinera”) indicate the tributary’s significant contribution to eutrophication.

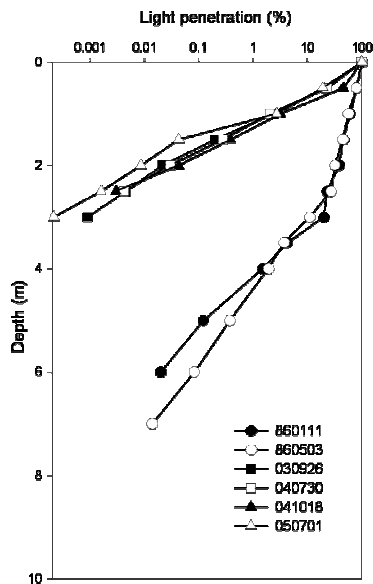


Figure C1-13. Vertical attenuation profiles of PAR values in the Massona Lagoon at different sampling dates from 2003 to 2005 in comparison with those obtained during the 1985-86 annual cycle (Riera and Abella, 1986). All profiles correspond to situations of stratification in the lagoon. Since minimal light intensities required for the development of GSB were estimated around 0.04-0.05% of PAR (Vila, 1996), suitable light conditions during this study period would be found in the oxic layers, up to 1.5-2 m depth.

Estimation of GSB richness from both PCR-DGGE and classical cultivation approaches

Both PCR-DGGE and classical cultivation procedures were successful for the detection of GSB populations in most of the samples, but they were not detected from either photosynthetic pigment analyses or microscopic observations. Interestingly, high phylogenetic diversity arose from these molecular studies since several phylotypes belonging to different deep-branching groups of GSB (Alexander, 2002) have been found at each studied site (Table C1-4). Some of these phylotypes have been able to develop viable populations under appropriate enrichment conditions. This hidden GSB richness can be thought of as potentially active populations that would develop in the phototrophic community under suitable conditions. Therefore, retrieved sequences from environmental samples and enrichments revealed the presence of poorly developed, latent GSB populations.

The broad range of culture conditions suggests that pH and salt content, rather than salt composition or sample origin (water column or sediment), could determine the selective enrichment of GSB populations. Neutral or slightly alkaline pH values (7-8) were found to be more appropriate for enrichment of GSB, while PSB dominated the enrichments at higher pH values (8-9). These results agree with the pH values measured in natural habitats where populations were detected (Figure C1-6b).

Specific requirements of Mg^{2+} and Ca^{2+} have not been detected from enrichments with different salt compositions (marine-like or athalassohaline-like). Salt composition was not found to be a determinant factor for selective enrichment of different GSB species. However, the results would not be representative of most GSB species if *Prosthecochloris vibriiformis*, which was enriched in almost all tested conditions, had particularly low ion requirements. Moreover, the athalassohaline-like media composition, with $MgSO_4$ and NaCl as primary salts, does not significantly increase osmolarity values in comparison to thalassohaline-like media, and the salt tolerance in GSB species seems to be only based on compatible solutes accumulation (Triadó-Margarit, submitted results).

Members of the GSB marine cluster (*Prosthecochloris* genus) were dominant in the enrichments. *Prosthecochloris vibrioformis* showed a high cultivability under a wide range of tested laboratory conditions (Figure C1-10a/b/d/e). Other halotolerant or brackish species were detected by molecular methods in the environments but they were more difficult to enrich in synthetic media. In addition, enrichments did not provide brown-pigmented GSB from athalassohaline environmental samples, which are more commonly found in deep anoxic layers (Vila and Abella, 1994), although they had been previously found, at low densities, in the anoxygenic phototrophic community of the Chiprana Lagoon (Guerrero et al., 1991). For this reason, other enrichment strategies or improvements of media composition could be useful to retrieve a higher GSB species richness from such environments (lower or higher concentrations, increasing salt content, incubation at higher or lower light intensities).

The molecular approach, based on PCR and DGGE, demonstrates a high capacity for the detection of poorly developed populations, even more than other culture-independent techniques such as HPLC pigment analysis in environmental samples. However, a comparison with enrichment procedures indicates that this molecular approach has some limitations. Several phlotypes of the *Prosthecochloris* spp. (e.g. M-17, M-20) were not detected directly from environmental samples, but rather from enrichments. Furthermore, those undetected populations were found to present a notable cultivability under laboratory conditions (Figure C1-10c/d). Therefore, classical cultivation procedures should not be underestimated because they can be useful to detect GSB in such environments and complementary to DNA-based molecular methods to assess species richness. Similar conclusions have also been reached in studies performed with microbial mats (Martínez-Alonso, 2005). Although PCR-DGGE is useful to detect latent populations in the environment, some of them still remain undetected unless enrichment procedures are used. Detection of bacterial populations by the molecular approach is restricted to predominant populations in the community (Casamayor et al., 2000). However, it must not be overlooked that differences in the complementarities between primers and 16S rDNA fragments can produce some bias in PCR-DGGE results.

The causes affecting the growth of GSB can even prevent the development of other members of the anoxygenic photosynthetic community, impairing the functions developed by these organisms and causing breakdowns of the biogeochemical processes, while at the same time conserving microbial species richness. Since biological diversity itself can drive diversity through niche creation (Brent and Kolm, 2005), a loss of functional diversity and inter-/intra-specific interactions can result. The final factor preventing the development of GSB seems to be related to the eutrophication caused by the nutrient-rich freshwater inflows of both lagoons.

Acknowledgements

We thank Dr. C. Borrego for his helpful support in HPLC pigment analyses; Dr. Ll. Bañeras for his advice on culture performance; J. Rodríguez for instruction on DNA-based techniques and J. Cáliz for his valuable help during culture maintenance and assistance during field work. X. Triadó-Margarit. was the recipient of a doctoral scholarship (2001 FI 00702) from the Autonomous Government of Catalonia.

Addenda

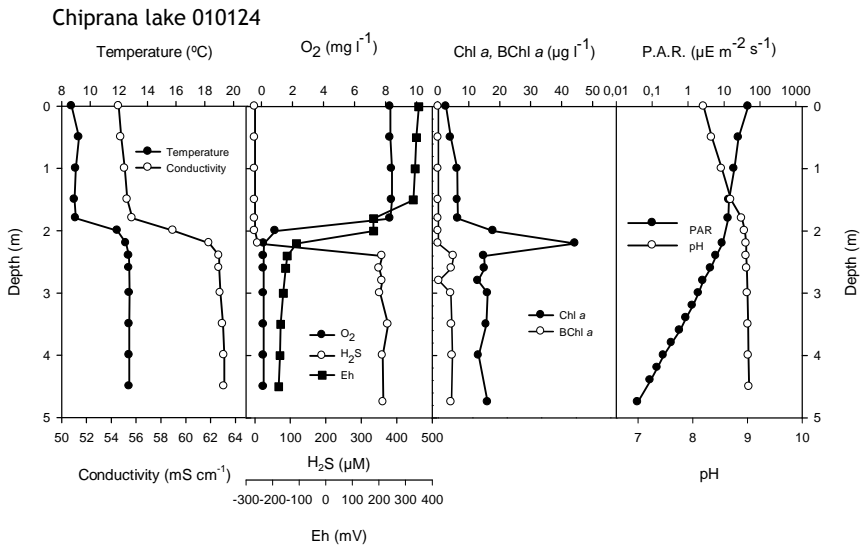
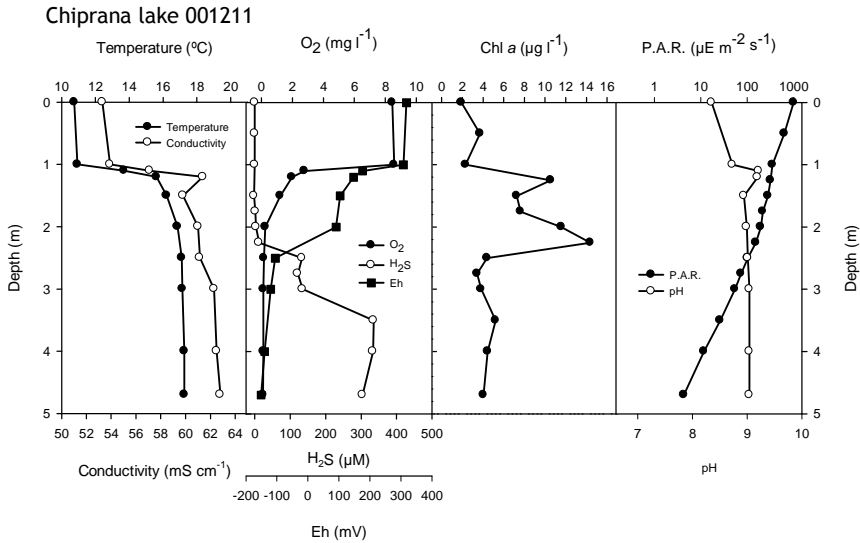
C1 - Latent GSB populations in salt lagoons

Addenda CI-I. (Continued).

n° (OTU)	Photosynthetic pigments														
	Chl <i>a</i>	BChl <i>a</i>	BChl <i>c</i>	BChl <i>d</i>	BChl <i>e</i>	Cbt	OH-Cbt	β,Ψ-Car	OH-β, Ψ Car	Isr	β-Isr	Okn	Spr	β-Car (algae)	Chl <i>a</i> _der
31	456,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,4	58,1
32	11,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	303,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,8	20,4
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	844,6	491,3	2447,9	-	41,6	-	-	-	-	-	340,1	59,5	-	-
36	36,2	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-
37	-	906,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	113,7	193,2	-	-
38	-	1355,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	527,6	101,9	-	-
39	44,8	1012,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	557,4	54,9	-	-
40	76,6	299,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	167,3	13,7	-	-
41	146,3	93,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	48,3	-	-	-
42	248,8	214,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	152,0	15,1	-	-
43	-	933,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	522,6	100,1	-	-
44	-	961,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	550,5	52,7	-	-
45	-	114,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	34,0	-	-
46	-	607,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	229,4	59,2	-	-
47	-	1132,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	657,0	-	-	-
48	-	1049,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	526,1	37,5	-	-
49	-	1494,2	6021,2	27965,4	-	1634,8	41,2	-	406,1	-	-	-	77,0	-	-
50	-	277,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	357,3	25,4	-	-
51	-	0,9	1897,4	3032,2	-	149,9	-	18,2	11,9	-	-	19,6	-	-	-
52	-	925,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	497,9	89,1	-	-
53	-	791,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	436,4	78,9	-	-
54	-	534,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	226,9	28,4	-	-
Cibollar (4.8 m) ^a	24,8	25,9	69,5	682,6	250,3	11,4	-	-	2,1	23,1	22,2	9,1	-	12,1	-
Playa I (0.4 m) ^a	36,3	613,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	97,9	16,3	2,3	-
Playa I (0.7 m) ^a	17,3	337,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	162,8	4,0	7,1	-
Chiprana (4.8 m) ^a	7,9	-	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,2	-
Playa II (1.3 m) ^a	-	777,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	93,6	1,8	-
Playa II (1.8 m) ^a	-	654,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	72,6	38,0	-

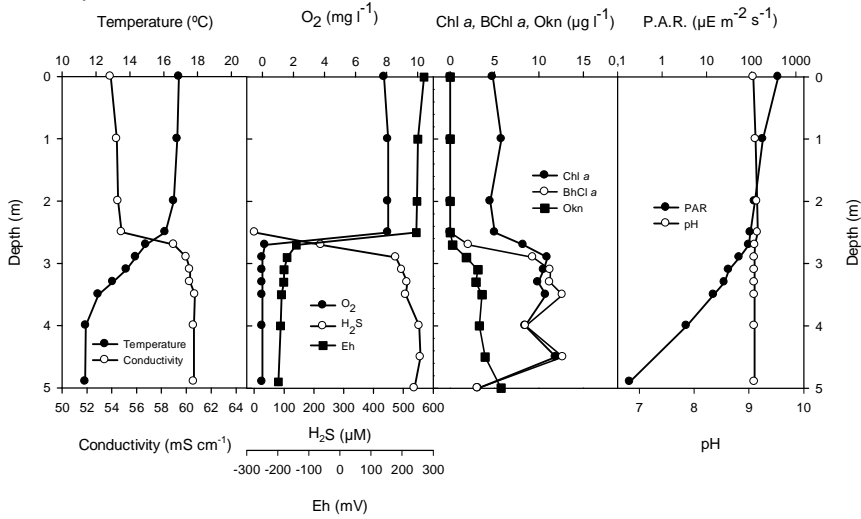
^a) Correspond to environmental samples (water or sediment) used as inoculate for the enrichments.

Addenda C1-2. Vertical distribution of relevant physical and chemical parameters and photosynthetic pigments (as indicators of the presence of photosynthetic microorganisms) in the water column of studied lakes. Dotted lines indicate the upper part of a transition layer between water and sediment. *BChl* bacteriochlorophyll, *Chl* Chlorophyll, *Cbt* chlorobactene, *Iso* Isorenieratene, *Okn* okenone, *Spr* spirilloxanthin, *rh* rare homolog of bacteriochlorophyll like pigment.

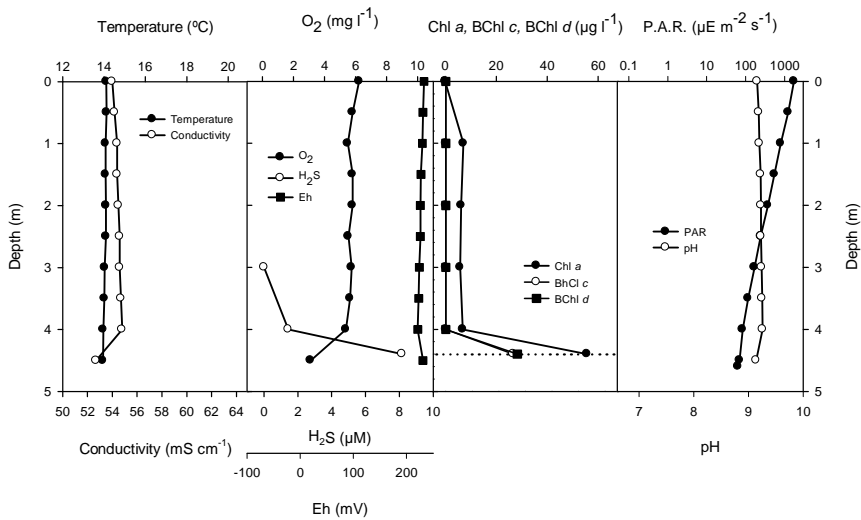


Addenda CI-2. (Continued).

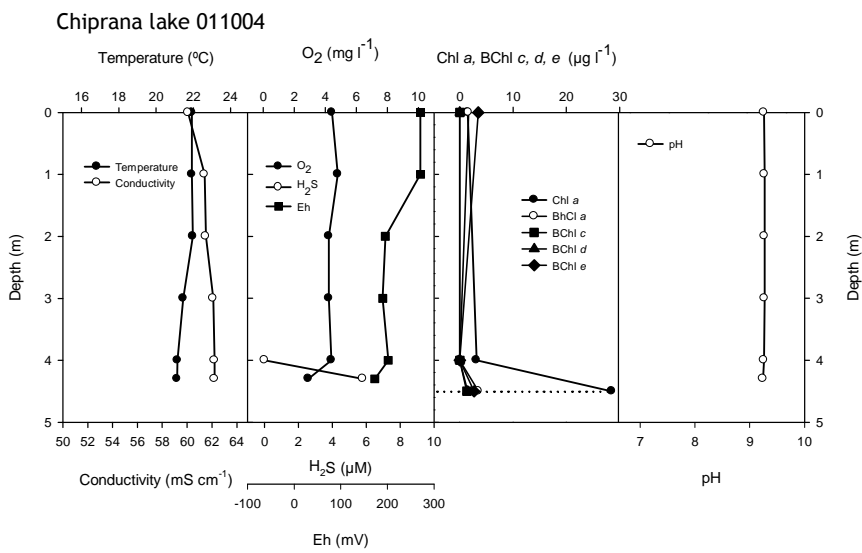
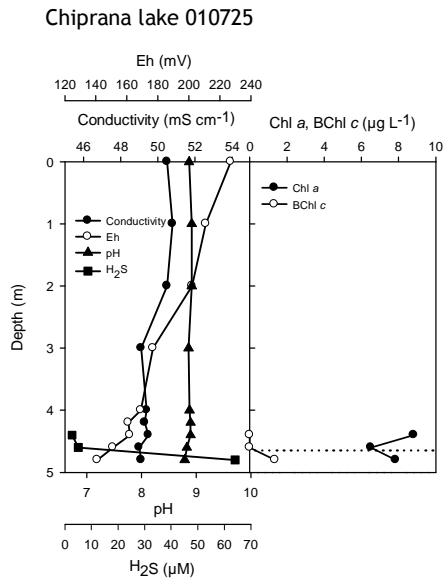
Chiprana lake 010322



Chiprana lake 010419

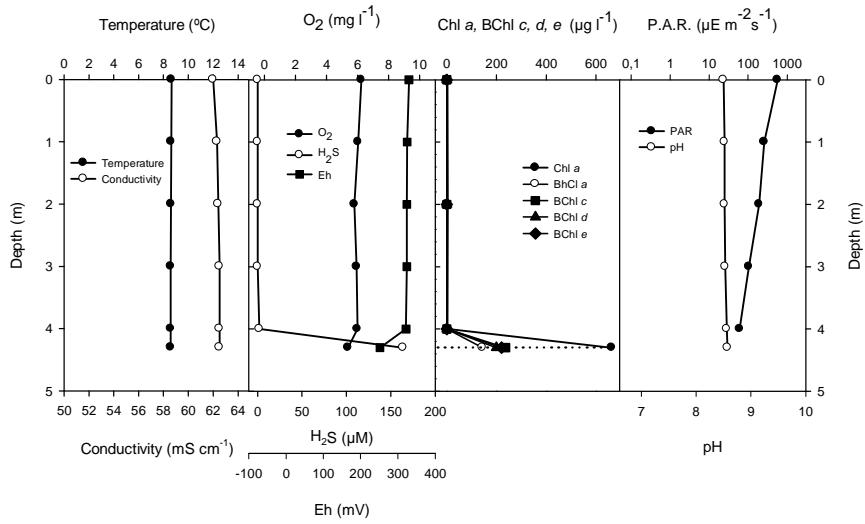


Addenda C1-2. (Continued).

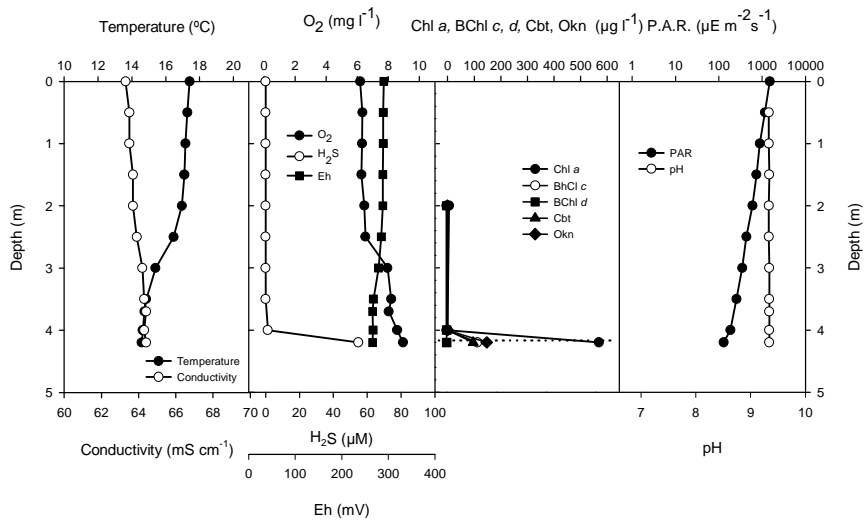


Addenda CI-2. (Continued).

Chiprana lake 011204

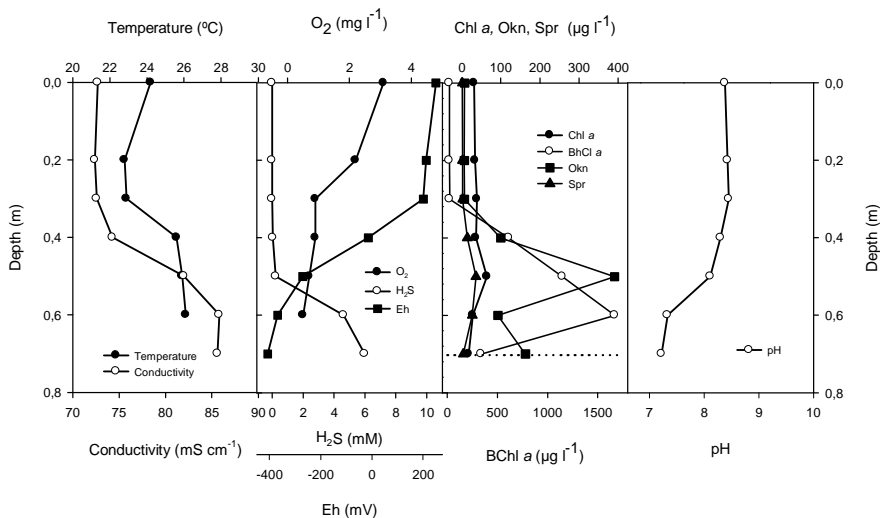


Chiprana lake 020326

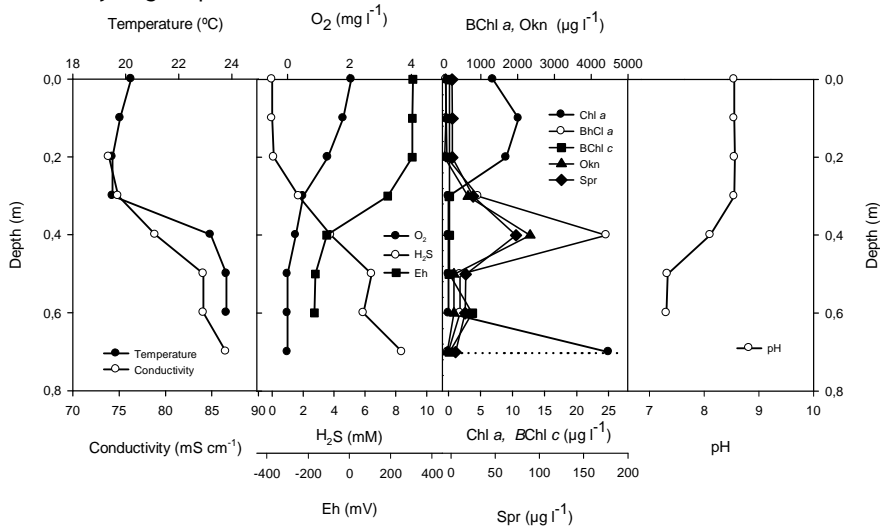


Addenda C1-2. (Continued).

Playa lagoon pond I 010724

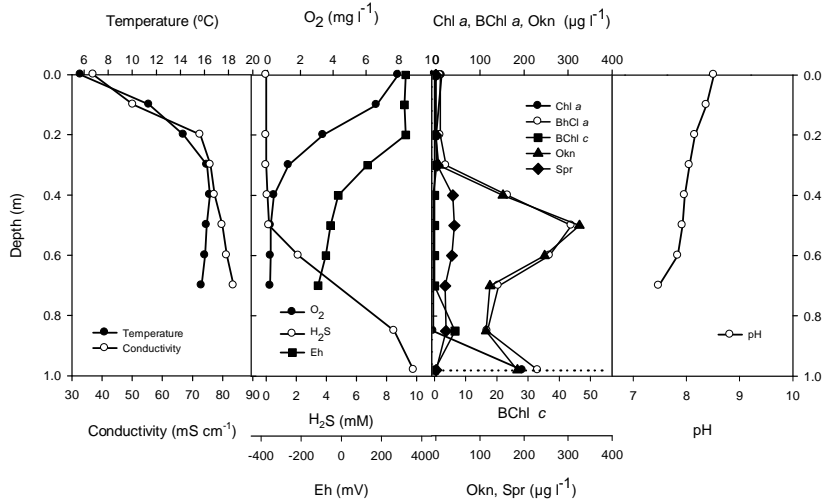


Playa lagoon pond I 011003

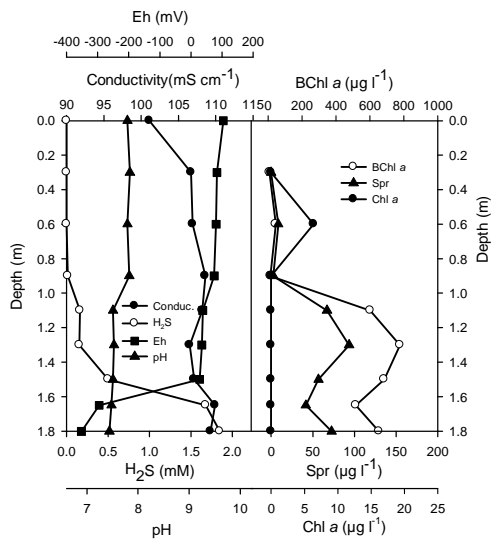


Addenda C1-2. (Continued).

Playa lagoon pond I 020130

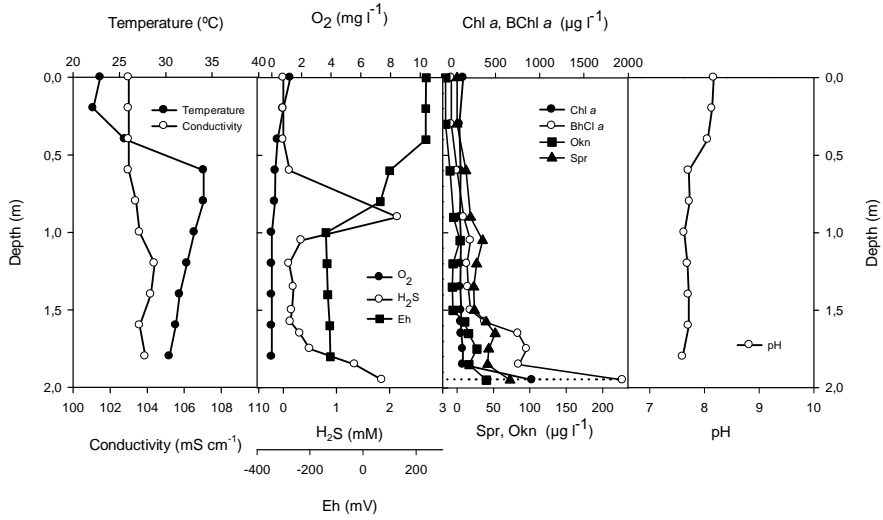


Playa lagoon pond II 010724

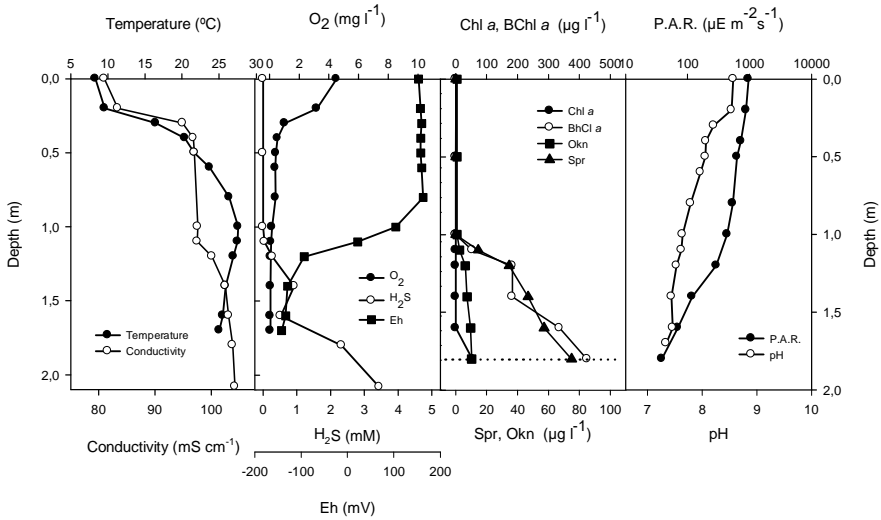


Addenda C1-2. (Continued).

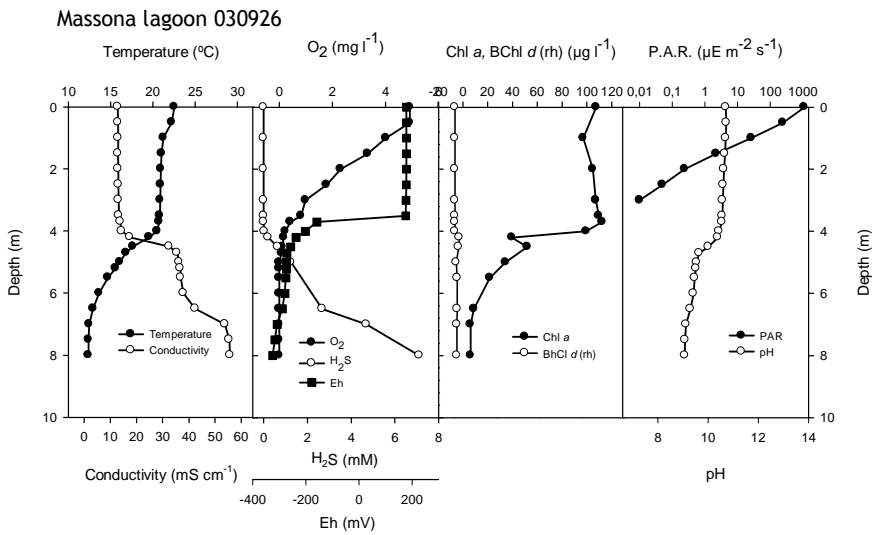
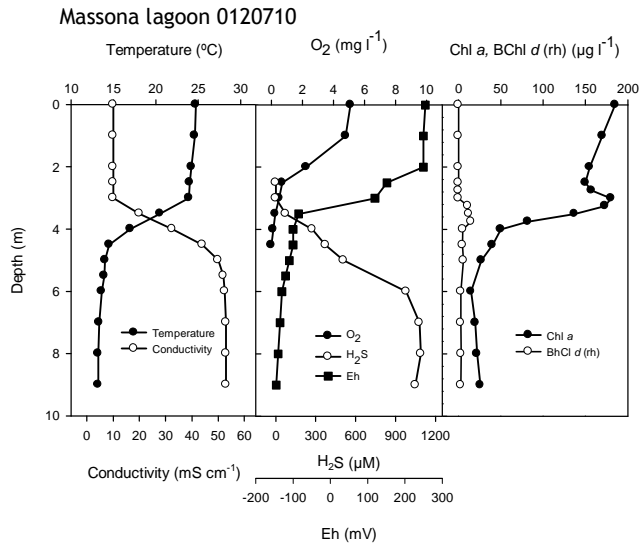
Playa lagoon pond II 011003



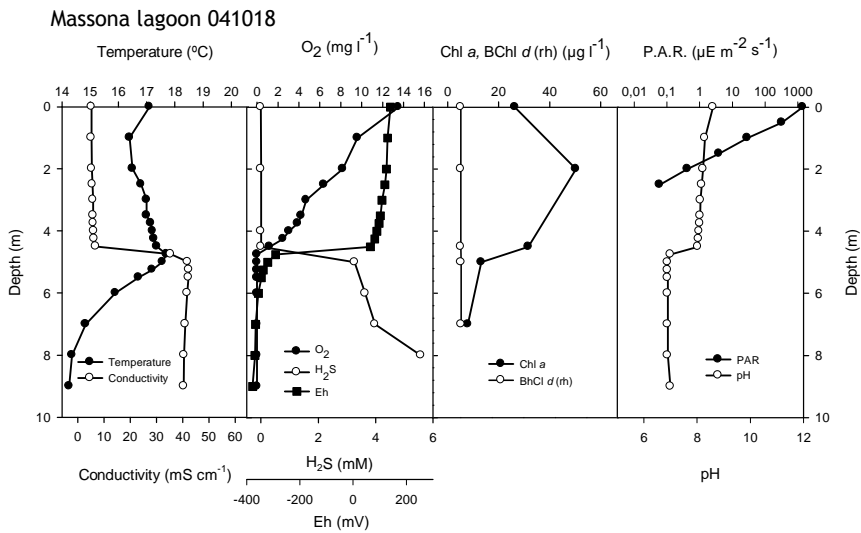
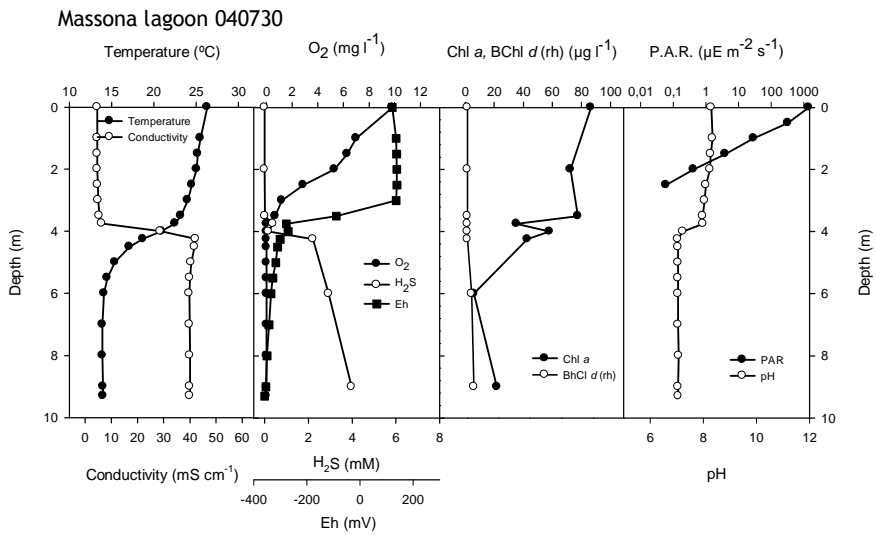
Playa lagoon pond II 020130



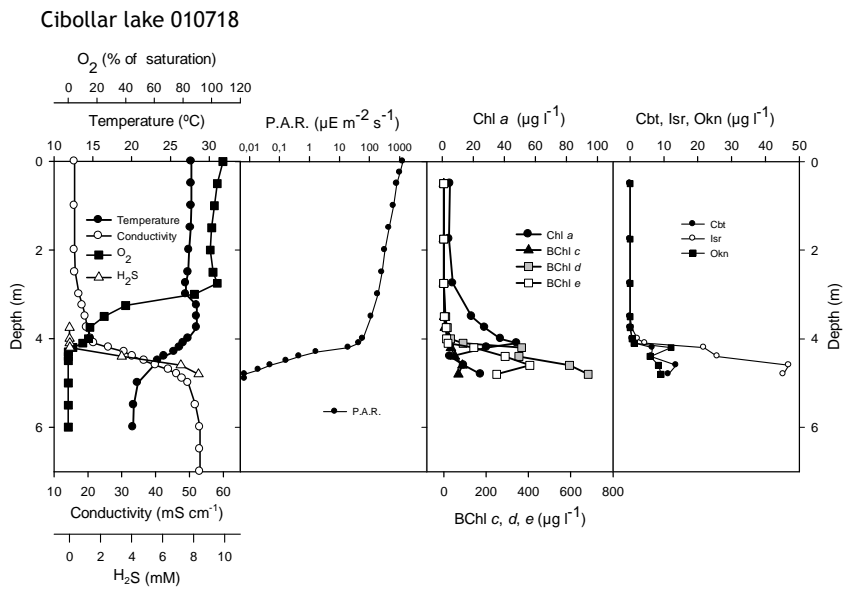
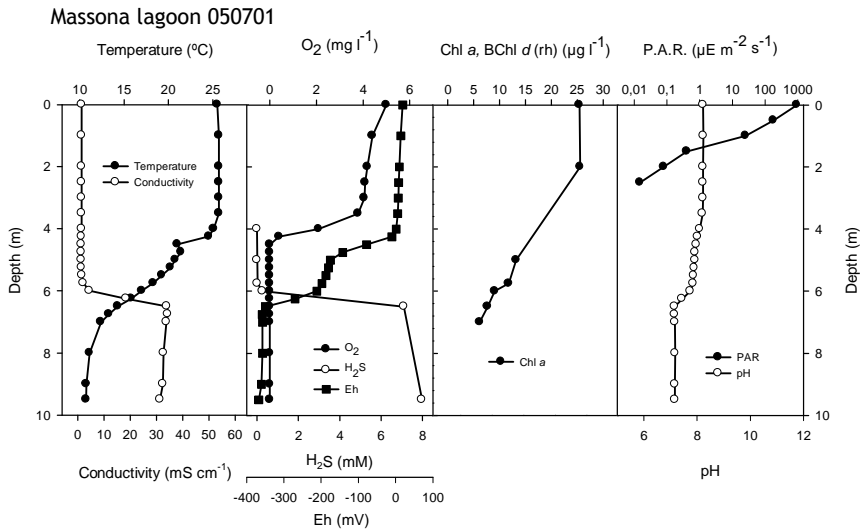
Addenda C1-2. (Continued).



Addenda C1-2. (Continued).



Addenda C1-2. (Continued).



Capítol II. Novel Green Sulfur Bacteria phylotypes detected in saline environments: ecophysiological characters versus phylogenetic taxonomy

Novel Green Sulfur Bacteria phlotypes detected in saline environments: ecophysiological characters versus phylogenetic taxonomy

Xavier Triadó-Margarit*, Xavier Vila, and Charles A. Abella

Laboratory of Microbiology, Institute of Aquatic Ecology, University of Girona, Campus Montilivi, E-17071, Girona, Spain

Running title: Novel GSB phlotypes detected in saline environments.

Author for correspondence: (*), e-mail: xavier.triado@udg.es; phone: +34-972-418261; fax: +34-972-418150

Abstract

The taxonomic significance of salt tolerance and salt requirements in Green Sulfur Bacteria (GSB) has been analyzed with environmental populations and enrichment cultures from several saline systems (inland and coastal water bodies) with different salinities (salt composition and concentration). There is evidence to indicate that salinity should be considered as a selection factor for the development of particular GSB populations according to phylotype changes along vertical saline gradients in which bacteria with suitable strategies to counterbalance high osmolarity conditions could grow at their respective appropriate depths. Novel phlotypes of salt-tolerant GSB have been found and affiliated into phylogenetic groups in which neither halotolerant nor halophilic species have been known to date. Therefore, salt tolerance does not seem to be restricted to members of any specific subgroup but widespread among all the different phylogenetic branches of the GSB group, and several closely-related phlotypes have dissimilar salt tolerance capacities. In addition, a partial physiological characterization and the phylogenetic affiliation of seven GSB isolates are presented. The phenotypic characters and the phylogenetic structure of GSB present some incongruities. Although complementary, phylogenetic analysis of concatenated genes largely supports the phylogenetic tree of the 16S rRNA gene and the main branching groups described. Since the current phylogenetic-based taxonomic scheme does not present phenotypic consistency, phenotypic traits should be studied on purpose in order to know the ecophysiological features of GSB phlotypes.

Key words: Green Sulfur Bacteria, halophilic, halotolerant, phylogenetic tree, phylogeny, salt requirement, salt tolerance, taxonomy, 16S rDNA.

Abbreviations: BChl - bacteriochlorophyll; Car - carotene; *Cba.*-*Chlorobaculum*; Cbt - chlorobactene; *Chl.* - *Chlorobium*; DGGE - denaturing gradient gel electrophoresis; GSB - Green Sulfur Bacteria; Isr - Isorenieratene; PCR - polymerase chain reaction; *Ptc.* - *Prosthecochloris*.

Introduction

Chlorobi (green sulfur bacteria) is a separate phylum in the domain *Bacteria* which shares a common root with the phylum *Bacteroidetes* (Overmann, 2001). It contains a unique class, order and family (*Chlorobiaceae*) and constitutes a phylogenetically isolated group within the bacterial radiation (Overmann, 2000). Almost all species have high similarity values among 16S rRNA gene sequences ($>90.1\%$ / $K_{\text{nuc}} < 0.11$), the sole exception being *Chloroherpeton thalassium* (85.5-87%), which is the most distantly related and deep-branching in the group. They are metabolically limited, physiologically well-defined and quite homogeneous. All GSB are strictly anaerobic and obligate photolithotrophs with sulfide or other reduced sulfur compounds as electron donors. Autotrophic CO₂ assimilation is carried out by the reductive tricarboxylic acid cycle (Arnon cycle). As exclusive features of the group, GSB have light-harvesting structures (chlorosomes) and specific antenna pigments: bacteriochlorophylls *c* and *d* in green-pigmented strains or *e* in brown-pigmented ones. A small number of simple organic substrates (mainly acetate and propionate) may be photoassimilated in the presence of both sulfide and bicarbonate.

Traditional classification distinguished five genera (*Ancalochloris*, *Chlorobium*, *Chloroherpeton*, *Pelodictyon* and *Prosthecochloris*) and 14 species in the GSB group. Genera were classified according to morphology, motility, and gas vesicle formation. Species were distinguished according to morphology and pigment composition (Pfennig and Trüper, 1989a; Overmann, 2000, 2001). However, analyses of the phylogenetic structure based on the 16S rRNA gene (Figueras et al., 1997; Overmann and Tuschak, 1997; Alexander et al., 2002) revealed that most of phenotypic traits do not

have taxonomic significance. For this reason, a new phylogenetic taxonomy based on 16S rRNA and *fmoA* and supported by the G+C content of DNA was established (Imhoff, 2003). This new classification system meant the reorganization of species and the description of the novel genus *Chlorobaculum* besides the emended *Prosthecochloris* and *Chlorobium* genera (see also “Apèndix” - *Summary tables*: Table A4-1 -). Furthermore, very few phenotypic properties were found to be significant for the current taxonomic classification: only salt requirements and, to a lesser degree, lipid and fatty acid composition. Related strains should have similar salt requirements (Overmann, 2000) and, as far as is currently known, the 16S rDNA fragments retrieved from saline environments, even from places which are geographically very distant, only cluster to the phylogenetic branches that are defined for marine GSB (Imhoff, 2001b; Alexander et al., 2002). Recently, GSB communities from several saline habitats (both marine and hypersaline) have been investigated using gene sequences of 16S rRNA and *fmo* (Fenna-Matthews-Olson protein) with similar conclusions (Alexander and Imhoff, 2006). Therefore, salt requirement is considered to be useful for supporting the phylogenetic branching within the GSB in the current taxonomical classification.

In this work, the taxonomic significance of the ability to develop in salt environments has been studied using different environmental samples and enrichment cultures from different saline systems: three inland hypersaline environments (the Chiprana Lagoon and two man-made ponds in the Playa Lagoon) and two coastal environments (the Massona Lagoon and the Cibollar Lagoon). A freshwater sediment sample from the Onyar River was also studied. Results allowed to describe several novel halotolerant phylotypes of GSB and also analyze the taxonomic significance of this trait and the incongruity observed between phenotypic characters and phylogenetic GSB structure. In addition, we present the partial physiological characterization and phylogenetic affiliation of several GSB isolates.

Material and methods

Sample source

Water and pre-sediment samples were obtained from aquatic environments which present distinct hydrologic regimes and GSB populations (Triadó-Margarit et al., submitted): endorheic systems (the Chiprana Lagoon and the Playa Lagoon), and coastal lagoons (the Massona Lagoon and the Cibollar Lagoon).

The Chiprana Lagoon (“La Salada de Chiprana”, 41°14’30”N; 0°10’50”W), located in the Ebro depression (Aragón, Spain), is the only permanent hypersaline endorheic lake of Western Europe. The water has an athalassohaline composition, with magnesium sulfate and sodium chloride as the main salts and an overall salinity from 53‰ to 84‰. The development of anoxygenic photosynthetic bacteria in the hypolimnion had been documented previously during stratification periods. The guild of anoxygenic phototrophs was mainly dominated by dense populations of GSB (Guerrero et al., 1991; Vila et al., 2002) resembling the formerly named *Chlorobium vibrioforme*.

The endorheic system of the Playa Lagoon (“Laguna de la Playa”, 41°25’N; 0°10’W), also located in the Ebro depression (Aragon, Spain), was used as a saltern until the early 60s and contained different man-made shallow ponds with permanent water. Two ponds, named Playa I and Playa II, were sampled. The salt composition is dominated by sodium chloride and in a lower proportion by magnesium sulphate (athalassohaline composition) (Montes and Martino, 1987), with a total salinity of 8‰ (Playa I) and 20‰ (Playa II). Playa I is characterized by waters of an intense red color. This is related to the development of dense microbial populations mainly dominated by Purple Sulfur Bacteria.

The Massona Lagoon (“La Massona”, 42°12’32”N; 3°6’40”E) is a coastal brackish-marine lagoon located in a marsh area (Aiguamolls Empordà, NE Catalonia, Spain). It has a particular morphometry with two well-defined parts: a deep circular meromictic basin and a shallow elongated area. GSB populations developed in the basin and were mainly dominated by a brown-pigmented species formerly known as *Chlorobium phaeovibrioides*, but the

development of green-pigmented species was documented too (Riera and Abella, 1991).

The Cibollar Lagoon (“Es Cibollar”, Albufera d’Alcúdia, Mallorca Island, Spain, 39°50’N; 3°10’E), another coastal environment, was also sampled once. The presence of anoxygenic phototrophic bacteria was already known (Vila, 1996) and GSB populations were dominated by brown-pigmented species. In addition, a freshwater sediment sample from the Onyar River (Girona, Spain) was used for the enrichment of GSB in an experimental laboratory system (Winogradsky column)

Field measurements and sampling procedures

Physical and chemical parameters relevant for GSB populations such as conductivity, oxygen concentration, pH and Eh were registered *in situ* with a DataSonde 3 multiparametric probe (Hydrolab, Co.). In addition, sulfide concentration was determined in the laboratory by the Pachmayr colorimetric method (Trüper and Schlegel, 1964). Samples were collected with a special device designed for studying multilayered gradients, which minimizes turbulence (Jorgensen et al., 1979). Water and pre-sediment samples were stored in screw-cap bottles and kept in the dark and cold until processed.

Enrichment, isolation and characterization of GSB

Environmental samples (water or pre-sediment) were inoculated (10% v/v) in 125 ml septa-bottles containing modified Pfennig medium (Pfennig and Trüper, 1992; Overmann, 2001), with different salt contents, salt composition and pH. Enrichment cultures were incubated at 25°C under saturating light intensities (50-100 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Electron donor (1mM final concentration) and carbon source were supplied periodically during the enrichment (Siefert and Pfennig, 1984). Purification and isolation of GSB from enrichment samples were attained by applying several deep agar dilution series (Van Niel, 1971; Pfennig and Trüper, 1992; Overmann, 2000). A variety of culture conditions were tested in order to increase diversity of GSB isolates and analyze the enrichment process (Triadó-Margarit et al., submitted).

The strains isolated with this procedure were partially characterized according to macroscopic and microscopic observations, pigment composition, thiosulfate utilization and behavior in media with different salt contents. The last feature was determined by inoculation of triplicates of each tested condition (10% v/v) in completely filled 12.5 ml screw cap tubes containing modified Pfennig media. Cultures were fed twice during incubation time (15 days) by adding freshly neutral sulfide solution and a supplement of ammonium acetate at 1 mM and 2 mM final concentration respectively. Growth was measured by optical density determination at 650 nm (CECIL instruments). Pigment content of the isolated GSB has been determined by HPLC analyses on acetone:methanol photosynthetic pigment extracts, as described previously (Triadó-Margarit et al., submitted). Pigment assignments were achieved according to the spectral characteristics and retention time on the chromatographic run described for the standards (Borrego and Garcia-Gil, 1994).

16S rDNA amplification, DGGE and sequencing

Genomic DNA from environmental samples and enrichments was obtained using the standard phenol/chloroform method (Moore, 1996). DNA from pure cultures was extracted with the WizardTM Genomic DNA (Promega) purification kit following the manufacturer's indications. DNA extracts were quantified using Picogreen® (Molecular Probes) and adjusted to a final concentration of 25 ng· μl^{-1} before the PCR reaction. The universal set of primers Eub27f and Eub1492r (Weisburg et al., 1991) was used to amplify a fragment of the 16S rDNA gene in order to test the quality of extracts. 16S rDNA of GSB was specifically amplified by using both sets of primers GCEub341f - GSB822r (Muyzer et al., 1993; Overmann et al., 1999a) and GS.619f - GCGS.1144r (Achenbach et al., 2001). Each PCR reaction comprised 25 ng DNA templates, 10 μmol s of each primer, 5 μl of 10x PCR buffer, 0.2 mmols of each deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 1.5 mmols of MgCl_2 and 1 U AmpliTaq polymerase (Applied Biosystems) in a total volume of 50 μl . All reactions were performed in a PE 9700 thermal cycler (Applied Biosystems). The program for amplification of the 16S rDNA gene with primers Eub27f and Eub1492r consisted of 35 cycles with 30 s denaturation at 94°C, 1 min annealing and 1 min elongation at 72°C. The annealing temperature was 52°C during 10 cycles, followed by a temperature

step down until 50°C during 25 cycles. The programs for specific partial amplification of the 16S rDNA gene with primers *GCEub341f* - *GSB822r* and *GS.619f* – *GCGS.1144r* included 1 min denaturation at 94°C, 1 min annealing at specific temperature and 1 min elongation at 72°C until completing 30 cycles. Annealing temperatures were 50°C for *GCEub341f* - *GSB822r* and 55°C for *GS.619f* – *GCGS.1144r*. Other primer combinations specific for GSB (*Eub27f* - *GSB822r*, *GS.619f* - *Eub1492r*) were used to obtain longer 16S rDNA sequences from isolated cultures, using the same conditions as for the respective GSB specific primers. Amplification products were checked by standard agarose gel electrophoresis.

Specifically amplified 16S rDNA fragments from environmental and enrichment samples were separated by DGGE. PCR products were loaded onto 6% (wt/vol) polyacrylamide gels in 1x TAE solution (Biorad). DGGE gels contained a 20 to 60% gradient of urea and formamide solution increasing in the direction of electrophoresis. They were run at 120 V during 14-16 h in an Ingeny phorU® DGGE system. Gels were stained with SybrGold® (Molecular Probes) for 45 min and the gel images were digitalized with a Scion Image (TDI) PC image capturing system. DNA containing bands were excised from the gel and eluted in an appropriate volume (25-50 µl) of Tris-HCl (pH 8.5) at 65°C during 45 min. Recovered fragments were reamplified with the same set of primers and the products were purified with the QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN). Sequentiation was performed with the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), following the instructions supplied by the manufacturer. Samples were analyzed in an ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems).

Almost complete 16S rDNA sequences of isolates are available in the GeneBank/EMBL database with accession numbers EF064309-EF064316. Partial sequences obtained from the environment have accession numbers from DQ984143 to DQ984180 (Triadó-Margarit et al., submitted results) and EF064306-EF064308.

Sequence analyses and phylogenetic tree construction

Sequences were checked using different online tools for chimera identification: Bellerophon program (Hugenholtz and Huber, 2003; Huber et al., 2004) using Jukes-Cantor (Jukes and Cantor, 1969) and Huber-Hugenholtz corrections, and also the CHIMERA_CHECK program version 2.7 available in the Ribosomal Database Project (RDP-II) webpage release 8.1 (Cole et al., 2003).

Distance matrices were constructed from alignments performed with the CLUSTAL_W program (Thompson et al., 1994), which were subsequently computed in the DNA_DIST program included in PHYLIP: Phylogeny Inference Package v.3.6 (Felsenstein, 1989). Distances were corrected by employing Jukes-Cantor (Jukes and Cantor, 1969) and Kimura-2 (Kimura, 1980) algorithms.

Phylogenetic analysis based on comparing 16S rDNA sequences was performed with the ARB phylogeny package (Ludwig et al., 2004). The ARB_EDIT4 tool was used for automatic alignment. It was manually refined according to the 16S rRNA secondary structure diagram for the *Chlorobiaceae* type strain DSM 260^T available at the Comparative RNA Web (CRW) site (www.rna.icmb.utexas.edu) (Cannone et al., 2002). Phylogenetic trees were constructed with 16S rDNA sequences of the GSB group presented in the updated database (ssu_jan04_corr_opt.arb) of the ARB project web site (www.arb-home.de) and sequences available in public databases. Almost complete 16S rDNA sequences of isolated strains were also included in the tree. Sequences longer than 1250 bp (including variable regions) were used for the calculation employing the maximum likelihood (Fast DNA_ML v1.2.2), neighbor joining (DNADIST with jukes-cantor correction, ARB package) and maximum parsimony (DNAPARS, PHYLIP package v3.2) algorithms. The sequence of *Chloroherpeton thalassium* ATCC 35110^T was selected as outgroup, since it is known as the most isolated branch within the GSB radiation (Overmann, 2001). Partial sequences retrieved from DGGE gels were inserted in the tree keeping the overall tree topology by using the Parsimony Interactive tool implemented in the ARB software package. Bootstrap values were calculated separately using 100 resamplings of data sets with SEQBOOT from the PHYLIP program package. Afterwards,

multiple data sets were computed with a DNA_ML program and the CONSENSE program was used to generate consensus tree.

Tree reconstructions based on concatenating protein coding genes *pscB*, *fmoA* (both genes involved in the biosynthesis of reaction center proteins of the photosystem), *bchG* (bacteriochlorophyll *a* biosynthesis) and *bchU* (addition of C-20 methyl group during bacteriochlorophyll *c* and *e* biosynthesis) were performed to investigate the genetic relationships among GSB from genetic markers independent of 16S rDNA. Individual protein sequences were obtained from the available GSB genomic sequences (or from a nucleotide database) following confirmation through BLASTp analysis (Altschul et al., 1997) of their uniqueness within the genome and their high sequence similarity (E-value $<1e^{-50}$) to their *Chlorobaculum tepidum* orthologues. The concatenated protein alignment was performed with MAFFT v5.8 (Kazutaka et al., 2005), applying the iterative refinement method E-INS-i. The alignment was manually refined further using the Jalview Java alignment editor (Clamp et al., 2004), which resulted in 1079 total sites for the tree reconstruction. A maximum likelihood tree was constructed with PHYML (Guindon and Gascuel, 2003). The JTT amino-acid model substitution (Jones et al., 1992) and a gamma rate distribution using 5 substitution rate categories were used for the calculation. The gamma distribution parameter and the proportion of invariable sites were estimated from the data by maximizing the likelihood of the phylogeny. Since the concatenation approach yields more accurate trees than those obtained with consensus gene tree phylogenies, even when the concatenated sequences have evolved with very different substitution patterns (Gadagkar et al., 2005), the concatenated sequence tree approach was chosen to study phylogenetic relatedness.

Results

Isolated GSB strains

Enrichment cultures and further purification in agar dilution series allowed several strains from studied environments to be isolated. Green vibrioid forms were the most frequent phenotype obtained and were classified as *Prosthecochloris vibriiformis* according to the assemblage of their 16S rDNA sequences. These strains presented a higher cultivability than other GSB from the same environments under a variety of laboratory conditions, based on a modified salty Pfennig medium (Triadó-Margarit et al., submitted). Only two strains had different phenotypic and genetic features and they were classified as *Ptc. aestuarii* and *Chlorobaculum parvum*.

The main characteristics, such as morphology, pigment content, growth behavior under salt stress and origin, are shown in Table C2-1; see also photomicrographs and growth related information of isolates strains in figure C2-1 and C2-2, respectively. Two general features of the isolated strains are the use of ammonium salts as nitrogen sources and the photoassimilation of acetate in the presence of sulfide and bicarbonate because greater densities are reached when this compound is supplied to the cultures, except for the strain UdG7009Lms.

Most of isolated *Prosthecochloris* strains are able to grow at high salt concentrations (up to 7% NaCl or even as much as 9-10% NaCl) and are regarded as halophilic bacteria according to their salt optimum. Moreover, the halotolerant strain *Chlorobaculum parvum* UdG6501Lms is also able to grow up to 7% NaCl (Table C2-1; Figure C2-2). Interestingly, the halophilic strains UdG7005Chp, UdG7009Lms and UdG7007Lpa have the ability to grow in the absence of significant concentrations of salts (<0.15% NaCl) (Figure C2-2) and could therefore be considered as non-strict halophilic bacteria. This is an unusual characteristic among halophilic anoxygenic phototrophic bacteria because they are usually unable to grow at low salt concentrations, with the exception of a few purple sulfur and non-sulfur bacteria: *Ectothiorhodospira shaposhnikovii*, *Rhodovulum sulfidophilum* and *Rhodobaca bogoriensis* (Imhoff, 2001a).

Strain UdG7004Chp was classified as *Ptc. aestuarii* according to traditional classification criteria (Overmann, 2001) but presented only 96.69% 16S rDNA sequence similarity with type strain DSM 271^T (Table C2-2).

Table C2-1. Isolated strains of Green Sulfur Bacteria and their characteristics.

Strain code	Species name ^a (Group ^b)	Shape, size (µm)	Major photosynthetic pigments	Cell suspension color	Gas vesicles	Use of thiosulfate	Salt required	Salt optimum	Range of salts tolerated	Origin
UdG7004Chp	<i>Prosthecochloris</i> sp. (1)	spherical with prosthecae ; 1.1 ± 0.09	<i>BChl c, d, Cbt (trans, 9-15 cis)</i> , β Ψ - <i>car (trans, 15cis)</i>	yellowish green	-	-	≥1%	1-3%	1-7%	Chiprana Lagoon
UdG7005Chp	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i> (1)	vibrioid ; 0.7 ± 0.09 x 1.5 ± 0.24	<i>BChl c, d, Cbt (trans, 9-15cis)</i> , β , Ψ - <i>car (trans, 15cis)</i>	intense green	-	-	-	1-5%	0-10%	Chiprana Lagoon
UdG7006Lms	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i> (1)	curved rod, vibrioid ; 0.6 ± 0.04 x 1.5 ± 0.28	<i>BChl e, Iso (trans, 15cis)</i>	chocolate brown (reddish)	-	-	-/+ ²	2-5%	0 ² -7%	Massona Lagoon
UdG7009Lms	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i> (1)	curved rod, vibrioid ¹ ; 0.6 ± 0.10 x 1.6 ± 0.30. Cells are clustered in irregular oval colonies	<i>BChl c, d, Cbt (trans, 9-15cis)</i> , <i>OH-der.</i>	intense green	-	-	-	1-3%	0-7%	Massona Lagoon
UdG7010Lms	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i> (1)	curved rod, vibrioid ; 0.6 x 1.5	<i>BChl e, Iso (trans, 15cis)</i> , β - <i>Iso</i>	chocolate brown (reddish)	-	-	≥1%	1-3%	1-6%	Massona Lagoon
UdG7007Lpa	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i> (1)	vibrioid and C-shaped ; 0.6 ± 0.08 x 1.4 ± 0.15	<i>BChl c, d, Cbt (trans, 9-15cis)</i>	intense green	-	-	-	[0] ³ ; 1-7%	0-9%	Playa Lagoon
UdG7008Cib	<i>Prosthecochloris</i> sp. (1)	ND	<i>BChl e, Iso (trans, 15cis)</i> , β - <i>Iso (9,15cis)</i> , β - <i>car</i>	chocolate brown	-/+	-	ND	ND	ND	Cibollar Lagoon,
UdG6501Lms	<i>Chlorobaculum parvum</i> (4a)	vibrioid ; 0.8 ± 0.13 x 1.4 ± 0.18	<i>BChl c, d, Cbt (trans, 9-15 cis)</i>	intense to dark green	-	+	-	0-5%	0-7%	Massona Lagoon

^a) Species designation was done according to the nomenclature and descriptions emended by Imhoff (2003).

^b) Phylogenetic group classification within GSB according to Alexander et al. (2002)

¹) Cells are often clustered in irregular oval colonies.

²) Slight growth was observed in the absence of significant concentrations of salt (≤0.15% of NaCl). Mean value of final absorbance in this situation was equivalent to ~ 40 % of mean value determined for salt optimal growth condition.

³) Mean value of final absorbance in this situation was equivalent to ~ 70 % of mean value determined for salt optimal growth condition.

ND not determined.

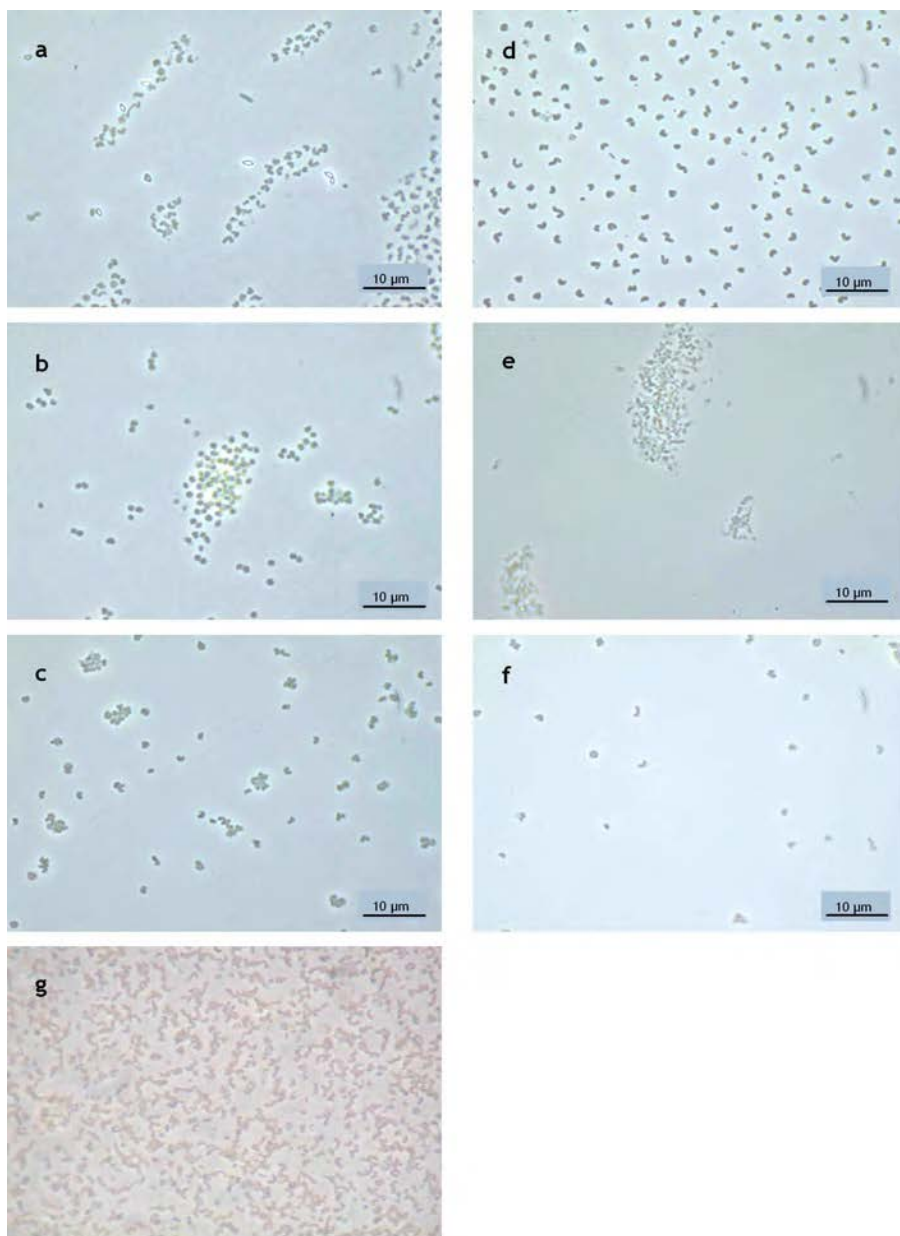


Figure C2-1. Phase contrast photomicrographs of isolated GSB. The strains are *Chlorobaculum parvum* UdG6501Lms (a), *Prosthecochloris aestuarii* UdG7004Chp (b), *Prosthecochloris vibrioformis* UdG7005Chp (c), *Ptc.vibrioformis* UdG7007Lpa (d), *Prosthecochloris* sp. UdG7009 (e), *Ptc.vibrioformis* UdG7006Lms, also representative of strain UdG7010Lms (f), *Prosthecochloris* sp. UdG7008Cib (g).

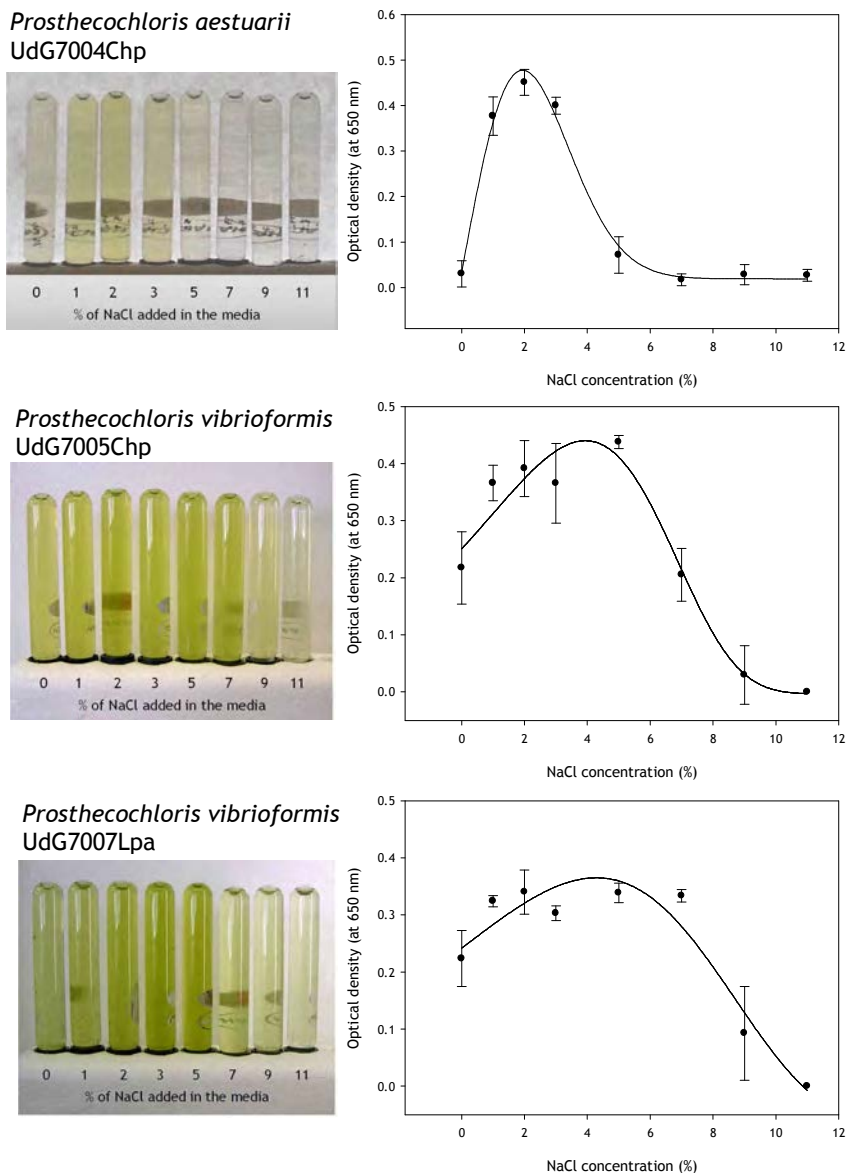
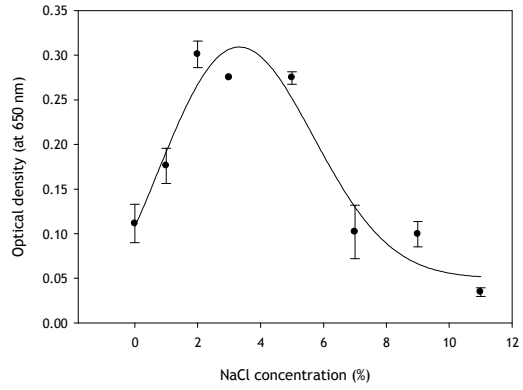
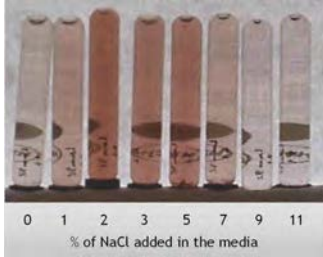
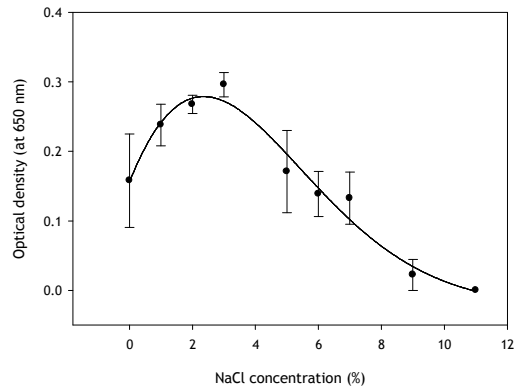
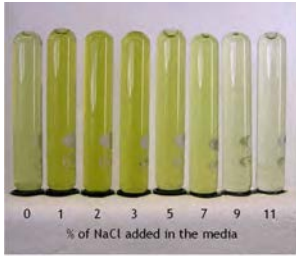


Figure C2-2. Phototrophic growth of isolated strains at different NaCl concentrations (0-11%). Triplicates of cultures were replenished twice by addition of sulfide and a supplement of ammonium acetate (1 and 2 mM final concentration). Optical density was measured after full oxidation of sulfide and sulfur. Photographs of screw cap tubes series correspond to the representative final situation drawn in the growth curves. In addition, growth experiments with different pre-adapted NaCl-containing cultures (used as inoculate) did not result in a significantly different behaviour of the strain UdG6501Lms.

Prosthecochloris vibrioformis
UdG7006Lms



Prosthecochloris sp.
UdG7009Lms



Prosthecochloris vibrioformis
UdG7010Lms

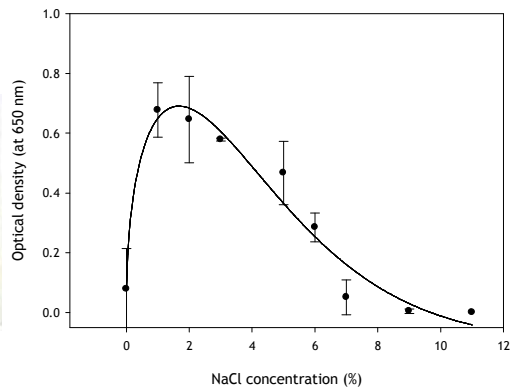
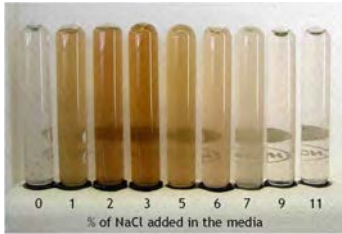


Figure C2-2. (Continued).

Chlorobaculum parvum UdG6501Lms

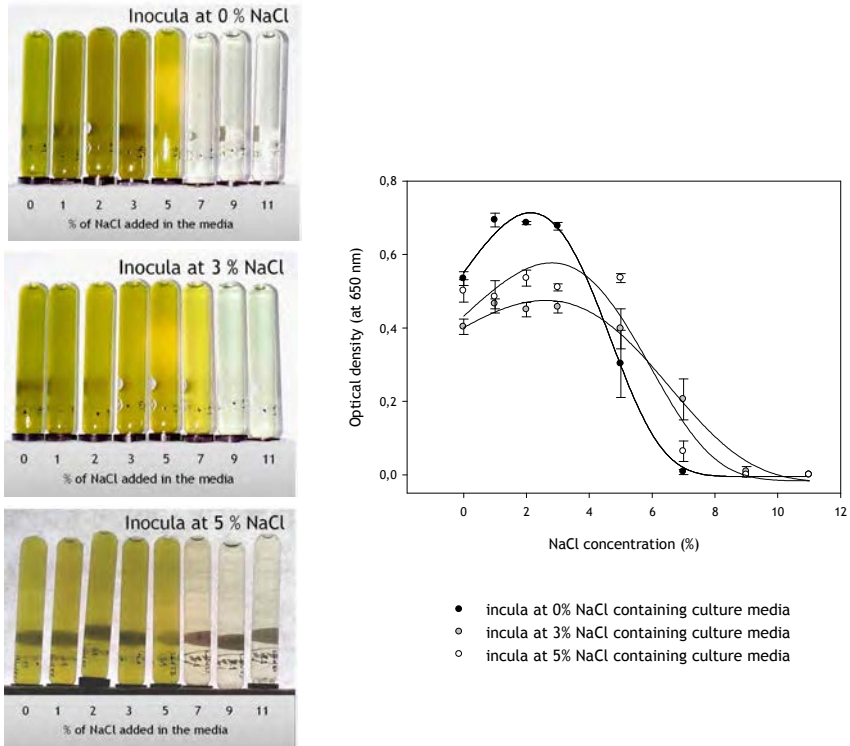


Figure C2-2. (Continued).

Table C2-2. Dissimilarity (%) among 16S rDNA sequences from different species of the *Prosthecochloris* genus and the strain UdG7004Chp, primarily classified as *Ptc. aestuarii* based. The Jukes and Cantor (1969) corrections were applied as a model of nucleotide substitution.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 Strain UdG7004Chp	-								
2 <i>Ptc.aestuarii</i> 2K	1.72	-							
3 <i>Ptc.vibrioformis</i> DSM1678	2.87	2.46	-						
4 <i>Ptc.vibrioformis</i> DSM260 ^T	2.97	2.55	0.73	-					
5 <i>Ptc.aestuarii</i> DSM271 ^T	3.31	2.72	3.73	4.70	-				
6 <i>Ptc.aestuarii</i> CHP3401	0.16	1.88	3.04	3.59	3.68	-			
7 “ <i>Ptc.indicum</i> ” SKGSB	1.77	0.57	2.73	3.18	3.40	2.43	-		
8 <i>Prosthecochloris</i> sp. 4Vi	4.19	3.67	3.14	3.87	3.89	4.60	3.77	-	
9 <i>Prosthecochloris</i> sp. Vk	5.14	4.41	3.89	5.05	5.28	5.68	5.04	0.08	-

16S rDNA sequence affiliation and salt behavior of environmental phylotypes

Partial sequences recovered from nature can provide valuable phylogenetic information when they have the same degree of similarity as full sequences (Stakebrandt and Goebel, 1994; Vandamme et al., 1996) but the sequence affiliation is missing phenotypic and ecological information. However, salt tolerance capacity can be inferred from the conditions impairing in environments since salt concentrations are usually selective. Therefore, they can produce diversification of niches where different species are dominant. These niches could also be distributed along vertical gradients of salinity, as was found in the Massona Lagoon. The DGGE molecular approach is a good tool for detecting the best adapted populations to the environmental conditions since it limits the detection to predominant populations at each moment or situation (Casamayor et al., 2000).

Several examples of the selectivity of salty conditions can be deduced from the environmentally-related information of recovered 16S rDNA fragments (Table C2-3) and their phylogenetic affiliation into the GSB group (Figure C2-3):

- (i) Freshwater strains develop in environments with low salinity values, from 0.08% to 0.88% of salts. Several phylotypes from these environments (Massona lagoon and Onyar River) were affiliated with other previously known freshwater strains: *Cba. tepidum* ATCC49652^T in the case of sequence M-8 and *Chl. limicola* DSM 245^T cluster for M-18 and O-2. Other phylotypes (M-9, M-19 and O1/O3) with different phylogenetic affiliations (Figure C2-3) were detected instead where the conductivity values were higher (Table C2-3).

Figure C2-3. Phylogenetic tree reconstruction from 16S rRNA gene sequences of GSB. The consensus tree is based on the maximum likelihood algorithm. Inconsistencies of the treeing results (with different methods) are shown as multifurcations. Numbers at nodes refer to bootstrap values (>50%) obtained after 100 resamplings. Solid circles indicate the branches that were consistent with calculations obtained by pairwise distance (Jukes and Cantor correction). Empty circles represent those branches consistent with the maximum-parsimony method. Partial (retrieved from DGGE) and long sequences (from axenic cultures) generated in the present study are highlighted. Bar = 0.10 fixed point mutation per nucleotide position. *UEPC* refer to partial sequences recovered from uncultured epibiont bacteria of phototrophic consortia.

Figure C2-3.

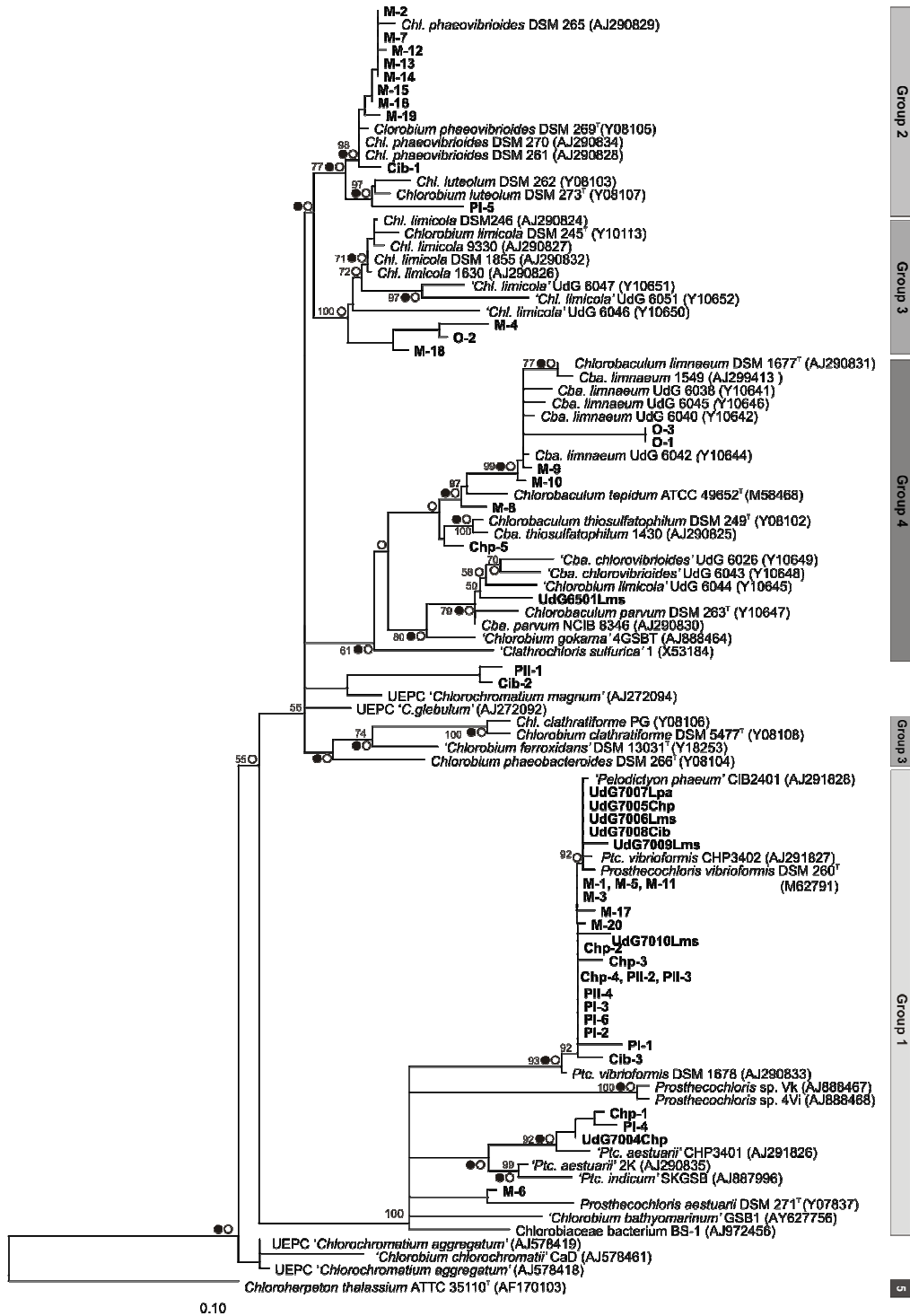


Table C2-3. Environmental information related to 16S rDNA phylotypes included in the phylogenetic analysis. The identification code indicates the origin: *Chp* for the Chiprana Lagoon, *PI* and *PII* for ponds I and II in the Playa Lagoon, *M* for the Massona Lagoon, *Cib* for the Cibollars Lagoon and *O* for a sediment sample from the Onyar River. Dotted lines separate sampling sets. Salinity (%) in the coastal environments was calculated from the respective conductivity values using the standard conversion equation (Fofonoff and Millard, 1983). Since inland systems usually present different salt compositions, the resulting conductivity values are not comparable. *TS* refers to total dissolved salts in the media.

code Id.	accession number	sort of sample	depth (m)	conductivity (mS·cm ⁻¹)	salinity (%)	H ₂ S (mM)	pH
Chp-1	DQ984163	pre-sediment	4.8	49.1	6.5	0.064	8.79
Chp-2	DQ984164	"	4.8				
Chp-3	DQ984165	"	4.8				
Chp-4	DQ984166	enrichment	4.8 ^a		11 (TS) ^b	1.0 ^b	8 ^b
Chp-5	DQ984167	water	4	63.1	8.3	0.360	9.02
PI-1	DQ984168	pre-sediment	0.7	85.6	8.0	5.98	7.22
PI-2	DQ984169	enrichment	0.7 ^a		6.5 (TS) ^b	1.0 ^b	7 ^b
PI-3	DQ984170	"	0.7 ^a		6.5 (TS) ^b	1.0 ^b	9 ^b
PI-4	DQ984171	"	0.7 ^a		2 (NaCl) ^b	1.0 ^b	8 ^b
PI-5	DQ984172	"	0.7 ^a		2 (NaCl) ^b	1.0 ^b	8 ^b
PI-6	DQ984173	Isolated strain					
PII-1	DQ984174	water	1.3	106.5	19.5	0.155	7.53
PII-2	DQ984175	"	1.3				
PII-3	DQ984176	enrichment	1.8 ^a	109.3 ^c	20 ^c / 6.5 (TS) ^b	1.85 ^c / 1.0 ^b	7.44 ^c / 7 ^b
PII-4	DQ984177	"	1.8 ^a		11 (TS) ^b	1.0 ^b	8 ^b
M-1	DQ984143	water	3.5	20	1.32	0.0075	-
M-2	DQ984144	"	3.5				
M-3	DQ984145	"	4.0	32.5	2.44	0.275	-
M-4	DQ984146	"	4.0				
M-5	DQ984147	"	4.5	44	3.64	0.375	-
M-6	DQ984148	"	4.5				
M-7	DQ984149	pre-sediment	9.0	53	4.65	1.05	-
M-8	DQ984150	water	3.7	13.9	0.88	0.004	-
M-9	DQ984151	"	4.2	17.5	1.16	0.213	-
M-10	DQ984152	"	5.0	36.3	2.82	1.26	-
M-11	DQ984153	"	8.0	55.7	5.03	7.11	-
M-12	DQ984154	"	3.75	6.34	0.36	0.392	7.99
M-13	DQ984155	"	4.0	28.8	1.95	1.9	7.24
M-14	DQ984156	pre-enrichment	4.25 ^a	42.13	3.13	2.21	7.04
M-15	DQ984157	water	4.5	6.87	0.45	0.007	8.03
M-16	DQ984158	"	5	41.95	3.2	3.27	6.9
M-17	DQ984159	pre-enrichment	5 ^a				
M-18	DQ984160	water	5.0	1.41	0.08	0.011	7.93
M-19	DQ984161	"	6.0	4.5	0.28	0.272	7.75
M-20	DQ984162	pre-enrichment	6.5 ^a	34	2.75	7.102	7.16
Cib-1	DQ984178	water	4.2	26.2	1.56	0.024	-
Cib-2	DQ984179	"	4.2				-
Cib-3	DQ984180	enrichment	4.8 ^a	46.3 ^c	3.18 ^c / 6.5 (NaCl) ^b	8.3 ^c / 1.0 ^b	7 ^b
O-1	EF064306	enrichment	-	3.76 ^b	0.21	1.0 ^b	7 ^b
O-2	EF064307	"	-	3.76 ^b	0.21	1.0 ^b	7 ^b
O-3	EF064308	"	-	16.93 - 29.73 ^b	1.06-1.97	1.0 ^b	7 ^b

(^a) Sample depth which was used to the enrichment culture. (^b) Culture conditions. (^c) Environmental data.

- (ii) The phylotypes that resemble strains of the *Chl. phaeovibrioides* DSM 269^T cluster (several strains from the Massona Lagoon and also a strain from Cibollar Lagoon) have been detected in a wide range of salinity conditions, from brackish waters (0.28-0.45%) in the case of sequences M-12, M-15 and M-19 to marine waters (up to 4.7%) for the sequences M-2, M-7, M-13, M-14, M-16 and Cib-1. *Chl. phaeovibrioides*-like phylotypes were dominant in the conditions of the Massona Lagoon, although many aspects concerning their autoecology (e.g. pigmentation or gas vesicle formation) are still unclear because it has not been possible to obtain them in pure culture. Sulfide and pH do not seem to be selective for the distribution of *Chl. phaeovibrioides*-like phylotypes, since they have been found at different pH values (6.9-8.03) and a wide range of sulfide concentrations, from traces (0.007mM) to the highest concentrations measured in the Massona Lagoon (7.1mM).
- (iii) The phylotypes clustered into the *Prosthecochloris* genus were exclusively found at salinity concentrations over 1% and they were the most common phylotypes in hypersaline waters (inland systems of the Chiprana Lake and both man-made ponds of the Playa Lagoon), as determined by DGGE (Triadó-Margarit et al., submitted) and further affiliation sequence analyses. Among them, those that are closely related to *Ptc. vibriiformis* DSM 260^T were found to grow in a wide range of salinities (different concentrations and compositions) and pH in laboratory cultures (Triadó-Margarit et al., submitted). In addition, DGGE band patterns at two different moments in the time course of pre-enrichment cultures (triplicates) indicate that *Ptc. vibriiformis*-like phylotypes (M-17 and M-20) were enriched and finally dominated over the species detected in the environment (Figure C2-4a).
- (iv) Some novel phylotypes of salt-tolerant GSB have been found and affiliated into phylogenetic groups where either halotolerant or halophilic species were unknown. However, all the 16S rDNA sequences previously retrieved (Imhoff, 2001b; Alexander et al., 2002; Alexander and Imhoff, 2006) from saline environments (even from geographically very distant places) only clustered to the

phylogenetic branches defined for marine GSB. As exceptions, some of the fossil sequences recovered from Mediterranean sediments (217,000-year-old sapropel layers) by (Coolen and Overmann, 2007) grouped with freshwater types of GSB; nevertheless, these findings were interpreted as allochthonous deposits. The phylotype defined by sequences M-9 and M-10 was found in the Massona Lagoon at salinities ranging from 1.2% to 3.6% and clustered within the *Cba. limnaeum* DSM 1667^T species group, which is considered to contain only freshwater bacteria according to the current taxonomical classification (Imhoff, 2003). Quite interestingly, another phylotype that clustered within this group (sequences O1 and O3) was positively enriched by adding salt (at 1-2%) to a freshwater pre-enriched sample containing two GSB strains (Figure C2-4b). The sequence Chp-5 revealed the existence of another halotolerant phylotype, which was recovered from the hypersaline waters of the Chiprana Lagoon (at 8.3% salinity), but phylogenetically related to the freshwater species *Cba. thiosulfatophilum* DSM 249^T. Therefore, GSB phylogenetic group 4b, which is currently considered to contain only freshwater species (Alexander et al., 2002), includes these novel phylotypes, which represent previously unknown salt-tolerant GSB. The sequence M-4 recovered from a brackish water sample (salinity 2.4%) was clustered within the *Chl. limicola* DSM 245^T (group 3) and more closely related to the phylotype O-2, which is unable to grow under salty conditions, as indicated by enrichment cultures performed at different salt concentrations (0-2%) (Figure C2-4b).

- (v) The sequences PII-1 and Cib-2, recovered from hypersaline water (19.5% salt) and brackish water (1.56% salt) respectively, define another novel phylotype (Triadó-Margarit et al., submitted) which is closely related to an uncultured epibiont of phototrophic consortia “*Chlorochromatium magnum*” phylomorphotype E (accession number: AJ272094). To date, epibionts in phototrophic consortia (which form several distinct phylogenetic clusters) and free-living relatives have been found exclusively in freshwater lakes (Glaeser and Overmann, 2004). However, the nature (associated or free living state) of this phylotype is interestingly unresolved.

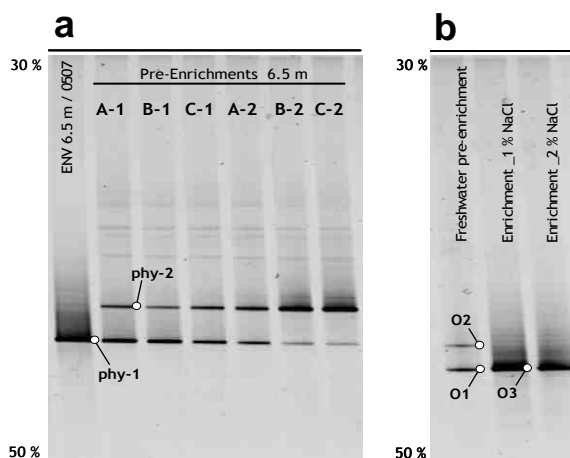


Figure C2-4. DGGE gels containing PCR-amplified 16S rDNA fragments from environmental samples and several enrichment cultures obtained from the same samples: **(a)** Environmental sample from Massona Lagoon and pre-enrichments analyzed with different replicates (A, B and C) at two different times (1 and 2). ENV environmental sample, *phy-1* phylotype affiliated to *Chlorobium phaeovibrioides* DSM 269^T, *phy-2* phylotype affiliated to *Prosthecochloris vibrioformis* DSM 260^T. **(b)** Sediment sample from the Onyar River (Girona, Spain) enriched by means of a Winogradsky column (freshwater pre-enrichment) and further salty enrichments performed from it.

Discussion

Genetic evidences for a novel species into the Prosthecochloris genus

A differentiated cluster of sequences was found into the *Prosthecochloris* genus, in relation to the strain UdG7004Chp, which morphologically resembles *Ptc. aestuarii* species but it is genetically clearly distinct (based on its 16S rDNA) from the type strain, DSM 271. Moreover, analyses at the secondary structure level showed appropriate internal base pairing in almost all detected positions. The specific nucleotide changes are: position 246, A; 473, C; 477, U-; 1000, A; 1002, C; 1007, CUCU; 1017, A; 1019, AGAG; 1032, G; 1037, A; 1040, U; 1258, AA; 1261, AA; 1272, U; 1290, A; 1293, U; 1346, -; 1366, - (according to the *E. coli* numbering system). In addition, significant differences in the sequence signatures of both prostheated strains (DSM 271^T and UdG7004Chp) with respect to the other type strain of the genus (*Ptc. vibrioformis* DSM 260^T) were also found (Addenda C2-1).

In contrast, high 16S rDNA sequence similarities were found between the strain UdG7004Chp and the strains SKGSB (98.23%, already named as '*Ptc. indicum*' in the databases), 2K (98.28%) and CHP3401 (99.84%), which was previously isolated from the same environment. Recently, several phylotypes detected in Bad Water (a hypersaline system in Death Valley, CA, USA) by Alexander and Imhoff (2006) were also found to be similar to the CHP3401 strain and were regarded as characteristic of inland, hypersaline systems. They could all be included together in a novel species of the genus *Prosthecochloris*, as was already suggested by Imhoff (2003). Since the strain SKGSB (acc. n° AJ887996) remain unpublished, and no pure cultures of *Ptc. aestuarii* 2K (Imhoff, 2003) and CHP3401 are presently available, the strain UdG7004Chp is currently the only culture that could be used as type strain.

Taxonomic significance of salt tolerance and salt requirement within the GSB group

Strains classified within the *Prosthecochloris* genus are regarded as those that have the highest salt requirements among GSB and are therefore considered as truly marine GSB (Imhoff, 2001b; Alexander et al., 2002). In fact, most of the halophilic isolated strains (of *Prosthecochloris* genus) obtained in this work are able to grow at high salt concentrations (Table C2-1). Phylotypes detected in environmental samples and enrichment cultures from the studied environments also confirm that all members of group 1 are halophilic bacteria (either strict or non-strict halophiles). These results indicate that all members of *Prosthecochloris* group are homogeneous from both, the ecological and physiological point of view, since all of them have been exclusively isolated from salty environments (Imhoff, 2001b; Vila et al., 2002; Alexander and Imhoff, 2006) and present a similar salt behavior.

However, all isolated strains (both *Prosthecochloris* spp. and *Chlorobaculum* sp.) have similar salinity ranges of optimal growth, between 1 and 5 % (brackish to marine water), and therefore species of group 1 share a common behavior with other strains of salt-dependent GSB (Caumette, 1993; Figueras et al., 1997; Imhoff, 2001b; Overmann, 2001; Imhoff, 2003). Moreover, experiments with several GSB strains from the genera *Chlorobium*, *Chlorobaculum* and *Prosthecochloris* (Triadó-Margarit et al., submitted) allowed a homogeneous osmoadaptation strategy based on the accumulation

of the same combination of compatible solutes to be described. The sequences obtained from these saline environments (both coastal and inland) are widely distributed along the GSB phylogenetic tree and several phylotypes corresponding to halotolerant or halophilic bacteria have been clustered in groups that should contain only freshwater bacteria (Imhoff, 2001b; Alexander et al., 2002), such as *Chlorobium* and *Chlorobaculum* (3 and 4b). In addition, the freshwater strain UdG6044 isolated from Round Lake in Wisconsin (Figueras et al., 1997) was affiliated into the *Cba. parvum-Cba. chlorovibrioides* cluster (4a), which is currently regarded as a brackish and marine bacterial group. Therefore, closely-related phylotypes (cultured or uncultured) of groups 3 and 4 can present different salt behavior and salt requirements. *Chlorobaculum* and *Chlorobium* genera are heterogeneous on these traits, even though the strains and uncultured phylotypes they contain can present similar phylogenetic affiliations, and salt requirements should be considered a significant phenotypic feature only to characterize all members of group 1.

It could be reasonable to distinguish between halophilic, halotolerant and freshwater GSB strains. However, salt tolerance would be a more suitable feature than salt requirements for an ecophysiological characterization, since both halotolerant and slightly halophilic GSB have been detected in different salt environments and they also seem to have similar salt behavior and strategies for osmoadaptation. All salt tolerant GSB can thrive in brackish to hypersaline water environments and even become strong competitors in the anoxygenic phototrophic community.

Further considerations on the phylogeny of GSB

The relationship between the phenotypical traits of GSB and their phylogenetic relatedness on the basis of the 16S rRNA gene has been investigated thoroughly (Figueras et al., 1997; Overmann and Tuschak, 1997; Imhoff, 2001b; Mendez-Alvarez et al., 2001; Vila et al., 2002). Functional genes such as *pscB* and *fmoA* (involved in the biosynthesis of reaction center proteins of the photosystem) and *bchG* (bacteriochlorophyll *a* biosynthesis) have also been investigated to perform complementary phylogenetic analyses (Alexander et al., 2002; Figueras, 2002; Garcia-Gil et al., 2003; Imhoff, 2003). The conclusions have always been similar: the properties used for the

traditional classification system (phenotypic characters such as morphology, pigmentation, gas vesicle formation, etc.) do not agree with their phylogeny. Consequently, a phylogenetic-based taxonomy was proposed based on 16S rRNA and *fmoA*, and supported by the DNA G+C content (Imhoff, 2003). This implied reorganizing the species and describing the novel genus *Chlorobaculum*. Only a few phenotypic properties were found to be significant for the current taxonomic classification: salt requirements and, to a lesser degree, lipids and fatty acid composition (“Apèndix” - *Summary tables*: Tables A4-2, A4-3, A4-4 -). However, present results raise some questions on the feasibility of using some phenotypic characters to understand phylogenetic grouping. Among GSB, it is common to find phenotypic heterogeneity in the phylogenetic groups and homology among groups. In addition, a phylogenetically-based taxonomic scheme should also present phenotypic consistency (Vandamme et al., 1996).

16S rDNA phylogenetic-based structure currently has a largely congruent relationship with sequences of the *fmoA* gene (Alexander et al., 2002); however, dissimilar phylogenetic structures were found with other functional genes (*pscB* and *bchG*), which was proposed to be a result of separate evolutionary pathways (Figueras, 2002; Garcia-Gil et al., 2003). Present analyses performed with data available in the databases for these phylogenetic markers besides the gene *bchU* (addition C-20 methyl group during bacteriochlorophyll *c* and *e* biosynthesis) have resulted in a tree topology similar to the one obtained with the 16S rRNA gene (with 3 main phylogenetic branches corresponding to three genera and four differentiated groups), which also supports the reliability of using 16S rDNA as a genetic marker (Figure C2-5). Recently, a similar finding has also been described when using concatenated protein coding genes for the phylogenetic analyses (Soria-Carrasco, 2007). Nevertheless, the present phylogenetic structure still does not have phenotypic significance. A possible explanation for this confusing picture could be lateral transfer processes. Recent findings (Bryant and Frigaard, 2006) suggest lateral transfer as a probable explanation for the polyphyletic nature of the “brown” phenotype among GSB since both genes presumably involved in the introduction of the C-7 formyl group during BChl *e* biosynthesis are adjacent to other genes involved in the isorenieratene biosynthesis. This gene proximity would greatly facilitate their lateral transfer among GSB.

Interestingly, whole-genome comparisons could provide more clues to candidate genes that are responsible for defined physiological (phenotypic) differences such as salt tolerance, thermotolerance, symbiotic interactions within phototrophic consortia, gas vesicle formation, morphology and motility. Investigations into this could give some explanations for the polyphyletic nature of some of these phenotypic traits within the GSB group and be fully informative in metagenomic studies of photic environments at the community level.

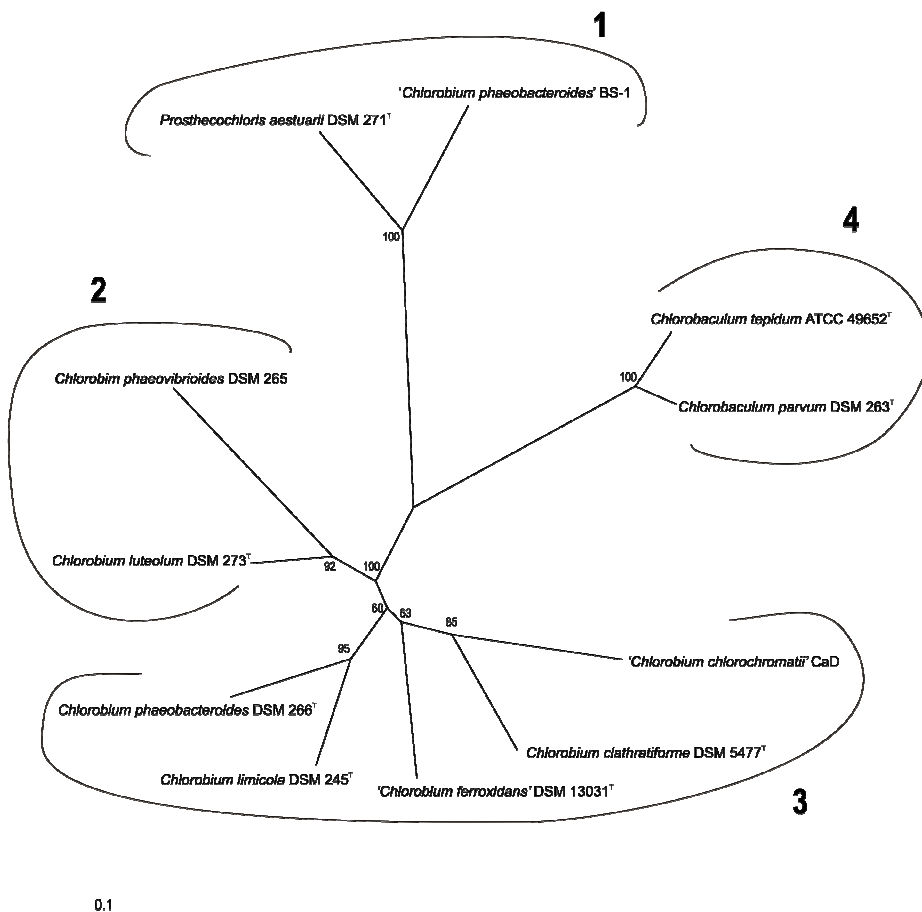


Figure C2-5. Phylogenetic reconstruction based on the concatenation of the gene products of *fmoA*, *pscB*, *bchG* and *bchU* genes. The tree is based on the maximum likelihood algorithm. Numbers in the nodes represent bootstrap support from 100 replicas. The scale bar represents 0.1 substitutions per amino-acid position. Groups are numbered (1-4) according to the GSB phylogenetic classification proposed by Alexander et al. (2002).

Thus, the molecular approach based on the 16S rRNA gene is a powerful tool for studying GSB from a macrophylogenetic perspective, which leads to a metabolically limited, physiologically well-defined and genetically closely related group. However, more detailed environmental studies should be complemented with classical cultivation procedures and microscopic observations as well, in order to accurately characterize both phylogenetic affiliations and environmental niches. Furthermore, strain designation should reflect phenotypic traits which are useful for describing the potential environmental niche of these bacteria and that are not related to their phylogeny. Relevant descriptors for environmental niche strain circumscription could be photosynthetic pigment composition, salinity tolerance, thermotolerance, symbiotic interactions or other physiological relevant properties (e.g. thiosulfate utilization or ability to grow in high concentrations of reduced sulfur compounds). Other notable properties could be morphology (also aggregation), motility, gas vesicle formation and singular origin locations.

The phylogenetic structure of Chlorobi cannot be considered to be nearly completed because genomic data and isolated cultures of the formerly described morphospecies *Pelodictyon aggregatum*, *Anchalochloris perflievii*, *Prosthecochloris phaeoasteroidea*, *Chloroherpeton limnophilum*, epibionts of photosynthetic consortium *Cylindrogloea bacterifera* (Eichler and Pfennig, 1988; Gorlenko, 1988) and probably others not yet known, are still missing. For this reason, it is necessary to invest time and effort into performing and refining culture procedures in order to obtain novel isolates of this species. Their phylogenetic and phenotypic characterizations would allow the present knowledge on the relations between phenotypic features and taxonomy to be extended, especially ecophysiological characters and phylogenetic-based taxonomy.

Acknowledgements

We thank our colleagues from the Laboratory of Molecular Microbiology of the University of Girona for helpful discussions of the results and further advices on data sequence analysis. X. Triadó-Margarit was the recipient of a doctoral scholarship (2001 FI 00702) from the Autonomous Government of Catalonia.

Addenda

**C2 - Novel GSB phylotypes detected
in saline environments**

	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
Strain UdG7004Chp	GGTGTAAACGGTGAATGTGTAGATATCGGAAAGAACCAGCTGGCGAAGGCAGTCTTCTGGTCGCAACTGACGCTCAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCGGA									
Ptc.aestuarii 2K	GGTGTAAACGGTGAATGTGTAGATATCGGAAAGAACCAGCTGGCGAAGGCAGTCTTCTGGTCGCAACTGACGCTCAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCGGA									
Ptc.aestuarii type strain DSM271	GGTGTAAACGGTGAATGTGTAGATATCGGAAAGAACCAGCTGGCGAAGGCAGTCTTCTGGTCGCAACTGACGCTCAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCGGA									
Ptc.indicum type strain SKGSB	GGTGTAAACGGTGAATGTGTAGATATCGGAAAGAACCAGCTGGCGAAGGCAGTCTTCTGGTCGCAACTGACGCTCAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCGGA									
	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
Strain UdG7004Chp	ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGATGAATACTAGATGTTGGTCATTCTGATCAGTGTCCGAGCTAACCGCTTAAGTATTCACCT									
Ptc.aestuarii 2K	ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGATGAATACTAGATGTTGGTCATTCTGATCAGTGTCCGAGCTAACCGCTTAAGTATTCACCT									
Ptc.aestuarii type strain DSM271	ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGATGAATACTAGATGTTGGTCATTCTGATCAGTGTCCGAGCTAACCGCTTAAGTATTCACCT									
Ptc.indicum type strain SKGSB	ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGATGAATACTAGATGTTGGTCATTCTGATCAGTGTCCGAGCTAACCGCTTAAGTATTCACCT									
	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
Strain UdG7004Chp	GGGAAGTACGCTCGCAAGAGTGAAGCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAACAGCGTGGATCATGTGGTTTAATTGATGCAACGCGAAGAACCTTAC									
Ptc.aestuarii 2K	GGGAAGTACGCTCGCAAGAGTGAAGCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAACAGCGTGGATCATGTGGTTTAATTGATGCAACGCGAAGAACCTTAC									
Ptc.aestuarii type strain DSM271	GGGAAGTACGCTCGCAAGAGTGAAGCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAACAGCGTGGATCATGTGGTTTAATTGATGCAACGCGAAGAACCTTAC									
Ptc.indicum type strain SKGSB	GGGAAGTACGCTCGCAAGAGTGAAGCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAACAGCGTGGATCATGTGGTTTAATTGATGCAACGCGAAGAACCTTAC									
	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
Strain UdG7004Chp	CTGGCTTGACATGCTAAGCTAACTCTCTCAAAAGAGGCTCCCTCGGGGAGCTAGCACAGGTGCTGCATGGCTGCTCAGCTCGTCTCGTGAGATGTT									
Ptc.aestuarii 2K	CTGGCTTGACATGCTAAGCTAACTCTCTCAAAAGAGGCTCCCTCGGGGAGCTAGCACAGGTGCTGCATGGCTGCTCAGCTCGTCTCGTGAGATGTT									
Ptc.aestuarii type strain DSM271	CTGGCTTGACATGCTAAGCTAACTCTCTCAAAAGAGGCTCCCTCGGGGAGCTAGCACAGGTGCTGCATGGCTGCTCAGCTCGTCTCGTGAGATGTT									
Ptc.indicum type strain SKGSB	CTGGCTTGACATGCTAAGCTAACTCTCTCAAAAGAGGCTCCCTCGGGGAGCTAGCACAGGTGCTGCATGGCTGCTCAGCTCGTCTCGTGAGATGTT									
	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
Strain UdG7004Chp	GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTACAATTAGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGGACTCTAATTGAACTGCCTACGCAAGTAGTGAGGAAGGAGG									
P.aestuarii 2K	GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTACAATTAGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGGACTCTAATTGAACTGCCTACGCAAGTAGTGAGGAAGGAGG									
P.aestuarii type strain DSM271	GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTACAATTAGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGGACTCTAATTGAACTGCCTACGCAAGTAGTGAGGAAGGAGG									
P.indicum type strain SKGSB	GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTACAATTAGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGGACTCTAATTGAACTGCCTACGCAAGTAGTGAGGAAGGAGG									
	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
Strain UdG7004Chp	GGATGACGTCGAAGTCCCTCATGGCCCTTACCTCAGGGCTACACACGTGATACAATGGTACTACAGAGGGCAAGCCGCAAGTAGAGGAATCCCTTAA									
Ptc.aestuarii 2K	GGATGACGTCGAAGTCCCTCATGGCCCTTACCTCAGGGCTACACACGTGATACAATGGTACTACAGAGGGCAAGCCGCAAGTAGAGGAATCCCTTAA									
Ptc.aestuarii type strain DSM271	GGATGACGTCGAAGTCCCTCATGGCCCTTACCTCAGGGCTACACACGTGATACAATGGTACTACAGAGGGCAAGCCGCAAGTAGAGGAATCCCTTAA									
Ptc.indicum type strain SKGSB	GGATGACGTCGAAGTCCCTCATGGCCCTTACCTCAGGGCTACACACGTGATACAATGGTACTACAGAGGGCAAGCCGCAAGTAGAGGAATCCCTTAA									
	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
Strain UdG7004Chp	AAGTATCTAGTCCGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGCTGGAAATCGCTAATAATCGGATGTAATCGGAGATCAGCATGCTGCGGTGAATGTGTTCCCGG									
Ptc.aestuarii 2K	AAGTATCTAGTCCGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGCTGGAAATCGCTAATAATCGGATGTAATCGGAGATCAGCATGCTGCGGTGAATGTGTTCCCGG									
Ptc.aestuarii type strain DSM271	AAGTATCTAGTCCGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGCTGGAAATCGCTAATAATCGGATGTAATCGGAGATCAGCATGCTGCGGTGAATGTGTTCCCGG									
Ptc.indicum type strain SKGSB	AAGTATCTAGTCCGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGCTGGAAATCGCTAATAATCGGATGTAATCGGAGATCAGCATGCTGCGGTGAATGTGTTCCCGG									

Addenda C2-1. (Continued).

Capítol III. Accumulation of N^ε-acetyl-β-lysine as an osmoadaptation strategy under salt stress conditions in Green Sulfur Bacteria and *Bacillus cereus*

Accumulation of N^ε-acetyl-β-lysine as an osmoadaptation strategy under salt stress conditions in Green Sulfur Bacteria and *Bacillus cereus*

Xavier Triadó-Margarit^{1*}, Xavier Vila¹, Erwin A. Galinski²

¹Laboratory of Microbiology, Institute of Aquatic Ecology, University of Girona, Campus Montilivi, E-17071, Girona, Spain

²Institute of Microbiology and Biotechnology, University of Bonn, Meckenheimer Allee 168, D-53115 Bonn, Germany

Running title: Accumulation of N^ε-acetyl-β-lysine as an osmoadaptation strategy

Author for correspondence: (*), e-mail: xavier.triado@udg.es; phone: +34-972-418261; fax: +34-972-418150

Abstract

The compatible solute N^ε-acetyl-β-lysine (NeABL), thus far considered unique to methanogenic *Archaea*, has been found to accumulate in several strains of Green Sulfur Bacteria (GSB) and *Bacillus cereus* under salt stress. A similar mixture of compatible solutes including trehalose, α-glutamate, β-glutamate and NeABL has been detected in salt tolerant GSB strains of different phylogenetic branches. The ability of *B.cereus* to synthesize NeABL was predicted from available genomic data and confirmed with cultures grown in salt-containing media. The concentration of this compound showed a relationship with the salt content in the media. Therefore, NeABL synthesis has been found to be osmotically regulated. The high growth rates, aerobic conditions and simplicity of separation procedures suggest that *B.cereus* CECT148^T could be useful for NeABL production and the development of its potential applications. Available genomic data enabled us to detect a significant number of orthologous sequences of putative genes that encode two enzymes involved in NeABL production in microbial genomes. Protein sequence affiliation analysis of lysine-2,3-aminomutase orthologs in combination with the presence of β-lysine acetylase shows a high genetic similarity among the species having both genes, which could indicate horizontal gene transfer. Present results describe for the first time the use of this unusual strategy for osmoadaptation in the bacterial domain.

Key words: *Bacillus*, compatible solutes, green sulfur bacteria, halophile, halotolerant, N^ε-acetyl-β-lysine, osmoadaptation, salt stress.

Abbreviations: *Cba.*-*Chlorobaculum*; *Chl.* - *Chlorobium*; GSB - green sulfur bacteria; LAMG – putative gene encoding lysine-2,3-aminomutase; LATG – putative gene encoding β-lysine-acetyltransferase; NeABL - N^ε-acetyl-β-lysine; NMR – nuclear magnetic resonance spectroscopy; PCR - polymerase chain reaction; *Ptc.* *Prosthecochloris*.

Introduction

The physiological response of living cells when adapting to a medium of low water activity (a_w), containing either salts or non-ionic solutes, entails the accumulation of osmolytes in the cytoplasm. This leads to turgor adjustment and prevents cell dehydration. Two major strategies have been developed in nature: the salt-in-cytoplasm type and the organic-osmolyte type (Galinski and Trüper, 1994). The salt-in-cytoplasm strategy achieves osmotic equilibrium through the intracellular accumulation of inorganic salts (mainly KCl). It requires extensive adaptations of intracellular machineries to high ionic strength, which at the same time limits growth to such highly saline environments. The extremely halophilic archaeal family *Halobacteriaceae* and the halophilic anaerobic bacterial order *Haloanaerobiales* are two well-known examples of the use of this mechanism. The organic-osmolyte strategy, however, involves the uptake or synthesis of low molecular weight, water-soluble, organic compounds, known as compatible solutes (Brown, 1976), which allow the cell to maintain macromolecular and cellular functions in highly saline media without changing its cytoplasmic environment. This strategy has been found in all three domains of life (Roberts, 2005). The different types of organic compounds include polyols and derivatives, sugars and derivatives, a number of natural amino acids and their derivatives, including some isomeric forms, glutamine amide derivatives, zwitterionic trimethyl ammonium (betaines) and dimethylsulfonium compounds, and ectoines (Galinski, 1995). In comparison, β-amino acids and derivatives are relatively rare and their synthesis is an unusual strategy for coping with osmotic stress, which has only been detected in a few organisms (Henrichs, 1985; Robertson, 1990; Sowers, 1990; Dassarma, 2002; Roberts, 2005). In particular the N-acetylated diamino acid N^ε-acetyl-β-lysine (NeABL) was

previously considered a different compatible solute of methanogenic *Archaea* (Sowers, 1990; Pflüger et al., 2003; Roberts, 2005). It has been found in a broad range of mesophilic and a few thermophilic species belonging to the *Methanococcales*, *Methanomicrobiales* and *Methanosarcinales* orders. In methanogenic *Archaea*, the compound is synthesized by two enzymes (Figure C3-1). The first step involves forming β-lysine from α-lysine through the action of a lysine-2,3-aminomutase (Ruzicka et al., 2000). The second step is mediated by a β-lysine acetyltransferase, which acetylates the amino group in epsilon position. This sequence of events transforms the basic amino acid lysine into a zwitterionic, uncharged and highly water-soluble molecule. The genes encoding these two enzymes have been identified in methanogenic *Archaea* and shown to be essential for the biosynthesis of NeABL using mutational inactivation experiments (Pflüger et al., 2003). In five methanogens analyzed, the genes were organized in regular tandem fashion on the chromosome.

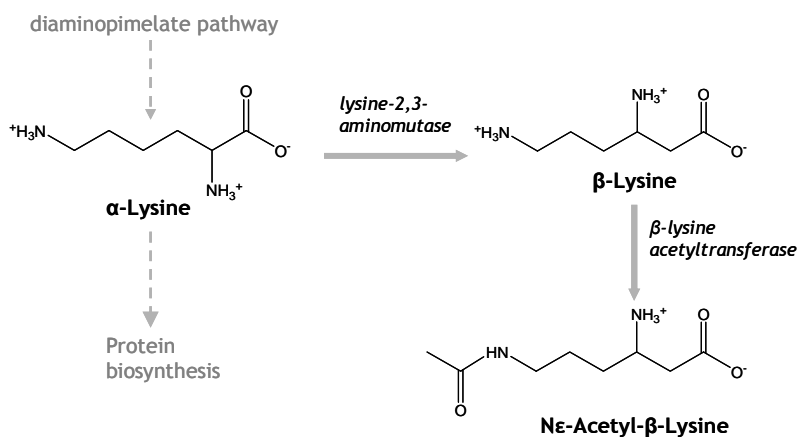


Figure C3-1. Pathway of NeABL synthesis determined in methanogenic archaea (Pflüger, 2003). This pathway is assumed to be also used for its synthesis in bacteria. α-lysine is converted by the activity of a lysine-2,3-aminomutase to β-lysine, which is then acetylated to N(ε)-acetyl-β-lysine.

Using β -amino acids constitutes an excellent strategy for osmoadaptation since they are not incorporated into proteins or other macromolecules (Roberts, 2005) and cannot be used as substrates for enzymes that utilize L- α -amino acids. As a general rule, β -amino acids should therefore not interfere with the cell's universal metabolic pathways (either catabolic or anabolic).

The first investigations into the osmoadaptation of GSB species (Welsh, 1993) were performed with the halophilic *Chlorobium vibrioforme* 6030 (currently known as *Prosthecochloris vibriiformis* DSM 260^T) and the freshwater strain *Chlorobium limicola* Kios 6230 (currently known as *Chlorobaculum thiosulfatophilum* DSM 249^T). The disaccharide trehalose was found to be the only solute present at osmotically significant levels when the strains were grown at 3% NaCl. Furthermore, these strains were able to take up betaine when it was supplied in the growth medium and accumulate it at significant levels (above 20%).

The compatible solute content of several *Bacilli* has also been investigated previously (Severin et al., 1992; Del Moral, 1994; Galinski and Trüper, 1994; Kempf and Bremer, 1998; Kuhlmann and Bremer, 2002). These species were able to accumulate a variety of compounds such as natural amino acids (proline, glutamate, alanine), ectoine, betaine and the N-acetylated diamino acids N ^{δ} -acetylornithin and N ^{ϵ} -acetyl-lysine. Glutamate was found to be the major compatible solute in *B.cereus* DSM 31^T (eq. ATCC 14579 and CECT 148^T) when grown in Spizizen's minimal medium (Kuhlmann and Bremer, 2002).

Here we identify a novel osmoadaptation strategy in the bacterial domain: the synthesis of the compatible solute N ^{ϵ} -acetyl- β -lysine under salt stress in GSB and *Bacillus cereus* and the behavior of several species containing NeABL at different salt concentrations. The physiological features of *B.cereus* CECT148^T suggest that it might be a good model for large-scale production of NeABL. Tree reconstruction based on deduced lysine-2,3-aminomutase protein sequences of orthologous genes were used to analyze the reasons for a non-conservative phylogenetic structure among represented species.

Material and Methods

Organisms and growth conditions

GSB were obtained from: (i) cultures of the type strains *Prosthecochloris vibrioformis* DSM 260^T, *Chlorobium phaeovibrioides* DSM 269^T, *Chlorobium luteolum* DSM 273^T, and *Chlorobaculum thiosulfatophilum* DSM 249^T; (ii) several isolated strains from both hypersaline athalassohaline inland water bodies and coastal lagoons (Triado-Margarit, submitted), namely *Prosthecochloris* sp. UdG7004Chp, *Ptc.vibrioformis* strains UdG7005Chp, UdG7006Lms, UdG7007Lpa, UdG7010Lms, *Prosthecochloris* sp. UdG7009Lms, and *Chlorobaculum parvum* UdG6501Lms; and (iii) enrichment and pre-enrichment cultures from the Massona Lagoon (Empordà Marshes, Catalonia). The type strains, isolated strains and enrichment cultures were grown in modified Pfennig mineral medium (Pfennig, 1992; Overmann, 2001). Pre-enrichment cultures were performed by incubating environmental water samples under regular conditions (see below). The basic medium composition per litre was as follows: 0.34 g KH₂PO₄, 0.4 g NH₄Cl, 0.34 g KCl, 0.5 g MgSO₄·7H₂O, 0.3 g CaCl₂·2H₂O. NaCl was added at different concentrations depend on the experiment. After sterilization, NaHCO₃ and Na₂S are added from concentrated autoclaved solutions; 1 mL vitamin B₁₂ solution (20 mg·L⁻¹) and 1 ml trace element solution SL-10 are also added (sterilized by filtration). During the preparation, access of air is prevented by continuous flushing with CO₂ when cooling media after autoclaving (≈ 35 min) and N₂ until finish. The pH of the medium was adjusted to 6.8-7.0 with a sterile 2M H₂SO₄ or 2M Na₂CO₃ solution. Cultures were incubated at 25°C under saturating light intensities (50-100 μE·m⁻²·s⁻¹). Electron donor (H₂S, 1mM final concentration) and carbon source were supplied periodically during the incubation (Siefert, 1984). Cultures were also supplemented by adding an ammonium acetate solution at 2mM final concentration. Cultures were grown in 10-l glass bottles under continuous stirring to obtain enough biomass for the NMR experiments or in 50-100 ml screw-capped bottles for quantification analyses (by inoculation of duplicates of each tested condition). For uptake experiments, several compatible solutes such as proline, betaine, ectoine, hydroxyectoine, mannitol and trehalose at 1mM final concentration were added to different NaCl-containing cultures (3% and 6%) of the strains *Prosthecochloris* sp. UdG7009Lms and *Ptc.vibrioformis* UdG7010Lms.

Bacillus cereus CECT 148^T (eq. ATCC 14579, DSM 31) was grown in both a Luria-Bertani (LB) medium and a glucose-mineral salt medium supplemented with yeast extract (GY) (Del Moral, 1994) with different NaCl concentrations (0-5%). GY contained (g·l⁻¹): FeSO₄·7H₂O, 0.01 g; NH₄Cl, 2.0 g; K₂HPO₄, 0.5 g; Tris, 12 g; D-glucose, 10 g; yeast extract, 0.1 g; vitamin solution V7 (Imhoff, 1977), 1 ml; pH 7.5 (titrated with 1M HCl). The glucose and vitamin solutions were sterilized by filtration. Cultures were grown on a rotary shaker (200 rpm) at 35°C in 400-ml portions in 1-l Erlenmeyer flasks. Growth was turbidimetrically monitored in a SHIMADZU UV-2501PC spectrophotometer at 650 nm.

Extraction of compatible solutes

Cells were harvested at the stationary phase by centrifugation at 10,500 x g for 20 min at ≤10°C. Large culture volumes necessary for NMR experiments were centrifuged in a Westfalia separator. The cell pellet was washed once in isotonic solution and was subsequently centrifuged once again at 10,500 x g for 15 min. Two additional wash steps were added when processing samples for uptake experiments. Lyophilized bacterial cell mass was extracted following a modification of the method described by Galinski and Herzog (Galinski, 1990). Four volumes (w/v) of modified Bligh & Dyer solution (Bligh, 1959) (methanol/chloroform/water; 10:5:4 by vol.) were used as extraction mixture and vigorously stirred for 1 h; then 1 volume each of chloroform and water were added to the suspension, shaken vigorously (30 min) and centrifuged (5000 x g, 10 min) to promote phase separation. The recovered aqueous top layer was used to determine compatible solutes.

NMR analyses

A minimum of 1 g dried bacterial cell mass was used for natural abundance ¹³C-NMR analyses. After extraction, the aqueous solute-containing phase was concentrated by evaporating the solvent at reduced pressure. The residue was dissolved in 1 ml D₂O (to provide an internal lock signal) and filtered. NMR experiments were recorded on a Bruker Avance DPX 200 Fourier transform spectrometer operating at 50.32 MHz (¹³C) and 200 MHz for the proton channel at 300 K. An aliquot of TSP-d₄ (3-(trimethylsilyl) -2, 2, 3, 3, d₄ propionic acid sodium salt) served as an internal reference. 2D-NMR

connectivities (HMQC, HMBC, COSY) were recorded for preliminary structural determination and further confirmation of NeABL.

Molecular mass determination

Electrospray mass spectrometry analyses were recorded in the positive ion mode on a Navigator quadrupole mass spectrometer (Finnigan AQA ThermoQuest) equipped with an electrospray ion source at a probe tip voltage of 3 kV. Desalted samples (on AG11A8 column, BioRad) were introduced directly into the mass spectrometer ion source. The mobile-phase flow (100 μL/min of 70:30 v/v Acetonitrile/H₂O) was delivered to the vaporization nozzle of the electrospray ion source (165 °C) and nitrogen was employed both as a drying and nebulizing gas. Skimmer cone voltages were varied between 10 and 30 eV. Theoretical isotope patterns were calculated using the Isoform program and used to aid assignment.

HPLC quantification analyses of compatible solutes

Zwitterionic amino acid derivatives and sugars were analyzed according to the method of Galinski and Herzog (Galinski, 1990). For HPLC quantifications, the proportion of the extraction solvent was increased and shaking intervals were reduced to 10 min each. Compatible solutes from 30 mg of lyophilized cells were extracted with 0.5 ml of the modified Bligh & Dyer solution as stated above. An aliquot of the aqueous compatible solute containing phase was diluted with a known volume of 70% (v/v) acetonitrile and analyzed on a Waters 600E HPLC system in isocratic mode equipped with a Jasco UV-1570 UV detector (operating at 210 nm), a Waters 2414 refractive index detector and a 5μm Nucleosil 100 NH₂ (Teknokroma), 25 x 0.46 cm reversed phase column. The mobile phase consisted of 70% (v/v) acetonitrile at a flow rate of 1 ml·min⁻¹. Compatible solute quantification was related to the protein concentration determined using the method of Lowry *et al.* (Lowry *et al.*, 1951).

Preparation of N(ε)acetyl-β-Lysine

Cba.parvum UdG6501Lms was used for the isolation and further structural characterization of NeABL because it was the fastest-growing GSB strain assayed. A minimum of 5 g of lyophilized bacterial cell mass was extracted

by applying the extraction method cited above. The resulting aqueous supernatant phase was concentrated by evaporating the solvent at reduced pressure and subsequently desalted on a column of AG11A8 (Bio-Rad) (2 x 72 cm). When necessary, separation of NeABL from other compounds was achieved by a cation exchanger column (Dowex 50W x8 / 100-200 mesh) in Na⁺ form and elution with a pH gradient (1M NaHCO₃ – 1M Na₂CO₃). Carbonate residues were subsequently removed by chromatography on an ion retardation column (AG11A8).

Preparation of genomic DNA

Genomic DNA from all GSB cultures was extracted from 1.5 ml of cell culture by using the WizardTM Genomic DNA (Promega) purification kit according to the manufacturer's instructions. DNA lysates were quantified using Picogreen® (Molecular Probes) and adjusted to a final concentration of 25 ng·µl⁻¹ before PCR reaction.

Amplification and sequencing of the lysine 2,3 aminomutase gene in GSB species

Degenerate oligonucleotide primers for the putative gene encoding *lysine 2,3 aminomutase* (LAMG) were manually designed based on an alignment of the sequences of the KamA gene of *Methanococcus maripaludis* S2, the MA3979 gene of *Methanosarcina acetivorans* str. C2A, the MM0934 gene of *M.mazei* Gö1, the kamA gene of *Clostridium subterminale* SB4, the BH2255 gene of *Bacillus halodurans* C-125, the kamA gene of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str.168 and the BC_2251 gene of *Bacillus cereus* ATCC 14579. The primer pairs were evaluated for possible primer-primer interactions and melting temperature using the software Oligo Analyzer v3.0 (Integrated DNA Technologies, Inc.) available at the web site <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>. The specificity of the selected primers was checked by local alignments of the primers within the genome sequence available for the freshwater species *Chlorobaculum tepidum* ATCC 49652^T. Finally, the degenerate primers used for the amplifications were AM-for (5'-ACS CAY CGB TAY CCS GA-3') and AM-rev (5'-CSG GSG CRT CSA CVA C-3'), giving a partial fragment of approximately 650 bp. The PCR program had the following conditions: 3 min at 95°C for the initial denaturation step; 45 s denaturation at 95°C, 30 s

annealing at the specific temperature and 1.5 min elongation at 72°C until completing 30 cycles; at the end, 10 min at 72°C for the final elongation. Annealing temperature was 58°C for the first cycle; during the following 15 cycles, it was lowered by 0.5°C each (touch-down); finally, it was maintained at 50°C during the remaining cycles. DNA extracts from '*Chlorobaculum limnaeum*' (in enrichment culture), *Cba. parvum* (UdG6501Lms), *Cba.thiosulfatophilum* DSM 249^T, *Chlorobium tepidum* ATCC 49652^T, *Chl. phaeovibrioides* DSM269^T, *Prosthecochloris aestuarii* (UdG7004Chp), *Prosthecochloris* sp. 2K, *Prosthecochloris* sp. UdG7009Lms, *Ptc. vibrioformis* (DSM 260^T, UdG7005Chp, UdG7006.Lms, UdG7007Lpa, UdG7010Lms) were used to check the amplification. DNA extract from *Methanosarcina mazei* Gö1 was used as a positive control. Candidate PCR products were cloned into pGEM-T vector (Promega), and the inserts were sequenced by using M13 forward and reverse primers. Cycle sequencing was performed with the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) according to the instructions supplied by the manufacturer. Samples were analyzed in an ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems). The recovered partial LAMG sequences were submitted with the accession numbers EF193018-EF193019.

Selecting orthologous gene sequences from genomic databases

Gene orthologs encoding for lysine-2,3-aminomutase (LAMG) and β-lysine acetyltransferase (LATG) were selected from those presenting high similarity values (cut-off E value <1e-50; >50% amino acid sequence similarity) in BLASTp analyses (Altschul, 1997) performed with 663 complete genomes, or chosen directly from databases when either the gene product was previously known or the Enzyme Commission number (EC) was disclosed in the sequence description. Different query sequences from phylogenetically distant species were used to improve the BLASTp search. The GC content of the putative NeABL operon sequences was determined with the GeeCee program (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/geecce.html>).

Tree construction

Amino acid sequences giving hits for LAMG were aligned with MAFFT v5.8 (Kazutaka, 2005) using the iterative refinement method L-INS-i. The alignment was further refined manually with the Jalview Java alignment

editor (Clamp, 2004), which resulted in 498 total sites for the tree reconstruction. A maximum likelihood tree was constructed with PHYML (Guindon, 2003). The JTT amino-acid model substitution (Jones, 1992) and a gamma rate distribution using 5 substitution rate categories was used for the calculation. The gamma distribution parameter and the proportion of invariable sites were estimated from the data by maximizing the likelihood of the phylogeny.

Results and Discussion

Structural identification of compatible solutes accumulated in GSB strains

Disaccharide trehalose was found to be the only solute present in osmotically significant levels in two strains of GSB when grown at 3% NaCl (Welsh, 1993b). However, it could be expected to find novel osmolytes at elevated salinity because the isolated GSB strains were able to grow at high NaCl concentrations (up to 9-10% in some strains of *Prosthecochloris vibriiformis*) and disaccharides alone, such as trehalose, only have limited potential as osmoadaptors (Galinski, 1995). ^{13}C NMR data from several GSB type strains (*Ptc.vibriiformis* DSM 260^T, *Cba.thiosulfatophilum* DSM 249^T, *Chlorobium phaeovibrioides* DSM 269^T, *Chl.luteolum* DSM 273^T) together with data from isolated strains enabled us to disclose the spectrum of internal compatible solutes in members of all major phylogenetic groups of GSB (Figure C3-2; Table C3-1). Experimental results suggested a common strategy among halophilic and halotolerant strains, in spite of their different phylogenetic affiliation, based on accumulating trehalose and several compounds not previously described in this group. The novel compounds could be related to osmoadaptation strategies since the halotolerant GSB strain *Cba.parvum* UdG6501Lms did not accumulate any organic compound at significant levels in freshwater-like media (Figure C3-3).

Figure C3-2. Natural abundance ^{13}C NMR spectra (recorded in D_2O as a solvent) of aqueous cell extracts of: *Prosthecochloris vibriiformis* UdG7005Chp grown at 3% NaCl (a) and 7% NaCl (b), *Chlorobaculum parvum* UdG6501Lms grown at 3% NaCl (c) and 7% NaCl (d). The different compounds identified and their related chemical shifts are: trehalose at 95.90, 74.88, 74.49, 73.40, 72.01, 62.95; glutamate at 183.89, 177.12, 57.10, 35.94, 29.26; β -glutamate at 180.52, 49.51 (CH group), 41.00 and presumptive N^{ϵ} -acetyl- β -lysine at 180.80, 176.41, 51.75 (CH group), 41.42, 40.82, 31.98, 26.82 and 25.06 (CH₃ group). TMSP was used as the internal reference.

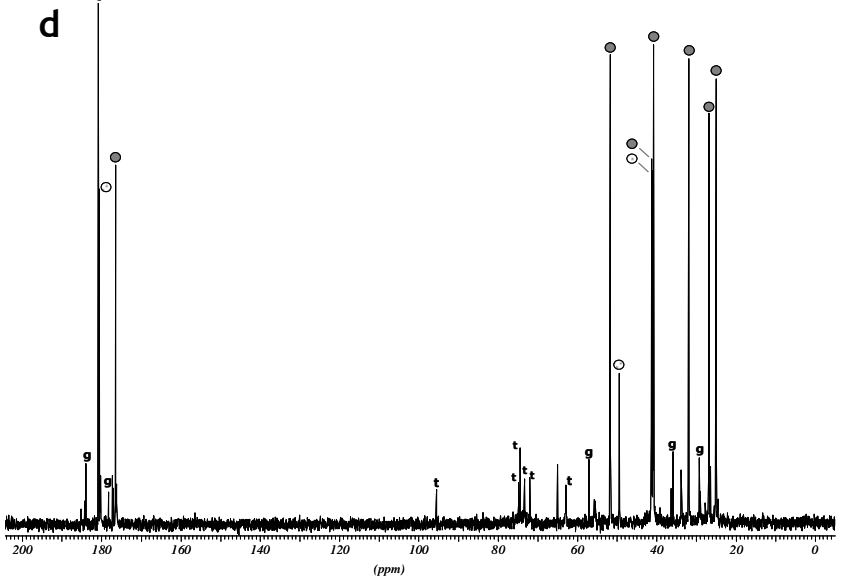
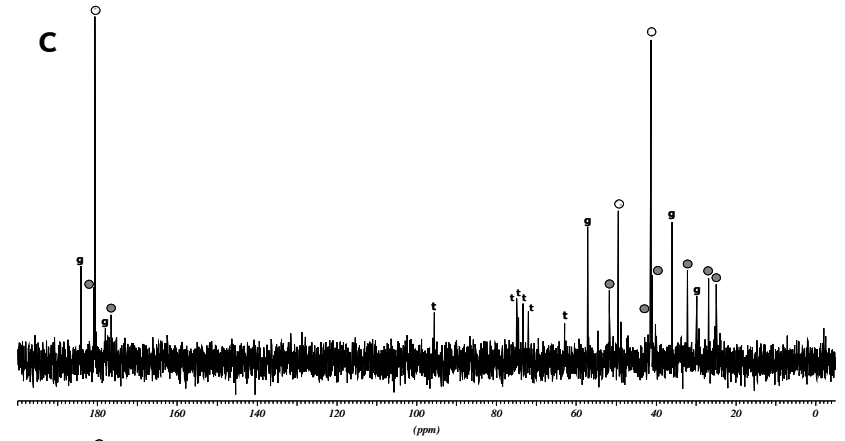
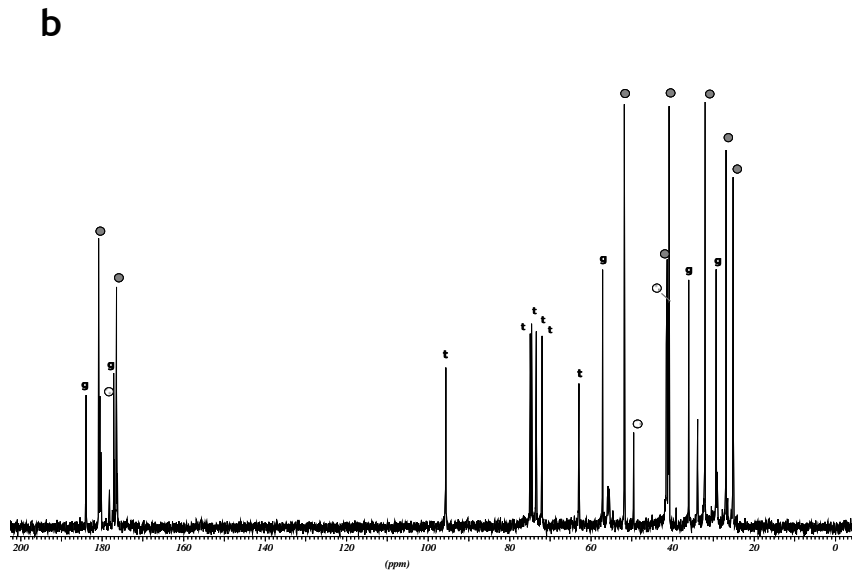
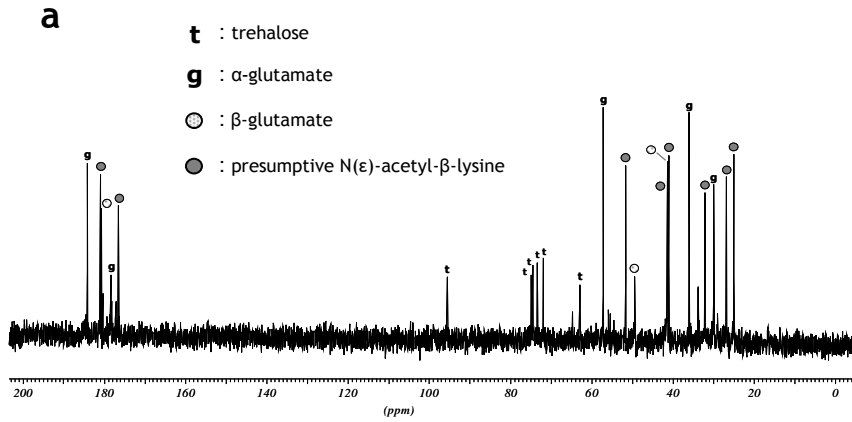


Table C3-1. Growth behavior under salt stress and description of osmolytes accumulated by GSB strains and enrichment cultures. *B* brackish, *M* marine, *SHF* slightly halotolerant freshwater bacteria, *glu* glutamate, *βglu* β-glutamate, *NAGGN* Nα-acetylglutaminylglutamine amide, *tre* trehalose, *ect* ectoine, *hye* hydroxyectoine, *bet* betaine.

Species name ^a / (Group ^b)	Strain code	Salt re- quired	Salt response	NeABL concentration (mmols · g protein ⁻¹)			other compatible solutes synthesized ^d	other compatible solutes taken up ^d
				3% NaCl	5% NaCl	7% NaCl		
<i>Prosthecochloris</i> sp. (1)	UdG7004Chp	≥1 ^c	B/M ^c	0.22	0.35	-	glu, βglu, tre	
<i>Prosthecochloris vibrioformis</i> (1)	UdG7005Chp	- ^c	M ^c	0.15	0.37	1.11	glu, βglu, tre	
<i>Prosthecochloris vibrioformis</i> (1)	UdG7006Lms	-/+ ^c	M ^c	0.19	0.54	0.94	glu, βglu, tre	
<i>Prosthecochloris</i> sp. (1)	UdG7009Lms	- ^c	B/M ^c	0.10-0.31	1.19-1.36 (6%)	-	glu, βglu, tre	bet (0.47-2.60 at 6%)
<i>Prosthecochloris vibrioformis</i> (1)	UdG7010Lms	≥1 ^c	M ^c	0.22-0.37	0.53-1.26 (6%)	1.51	glu, βglu, tre	etc (up to 0.2 at 6%) hye (up to 0.16 at 6%)
<i>Prosthecochloris vibrioformis</i> (1)	UdG7007Lpa	- ^c	M ^c	0.55-0.61	1.95-2.11	2.49	ND	
<i>Chlorobaculum parvum</i> (4a)	UdG6501Lms	- ^c	SHF ^c	0.07-0.10	0.33-0.48	0.14-0.18	glu, βglu, tre, presumed NAGGN	
<i>Prosthecochloris vibrioformis</i> (1)	DSM 260 ^T	>1 ^a	B/M ^a	0.23-0.50	1.42	-	glu, tre ^e ect (0.03 at 3-5%)	bet ^e
<i>Chlorobium phaeovibrioides</i> (2b)	DSM 269 ^T	>1 ^a	B ^a	0.2	0.95	-	glu, tre	
<i>Chlorobium luteolum</i> (2a)	DSM 273 ^T	>1 ^a	M ^a	0.07	0.0	0.0	ND	
<i>Chlorobaculum thiosulfatophilum</i> (4b)	DSM 249 ^T	- ^a	F ^a	-	-	-	tre ^e	bet ^e
<i>Chlorobaculum limnaeum</i> -like (4b)	in enrichment	-	SHF ^c	0.04 (1% NaCl)				

(a)- Data and species designation according to nomenclature and descriptions emended by Imhoff (2003); (b)- Phylogenetic group classification within GSB according to Alexander et al. (2002); (c)- Data from Triadó-Margarit et al. (submitted); (d)- When determined, quantification data are indicated as mmols · g protein⁻¹; (e)- Data from Welsh and Herbert (Welsh, 1993), but NeABL remained undetected. Uptake determinations showed significant contribution of betaine towards the total organic solutes pool.

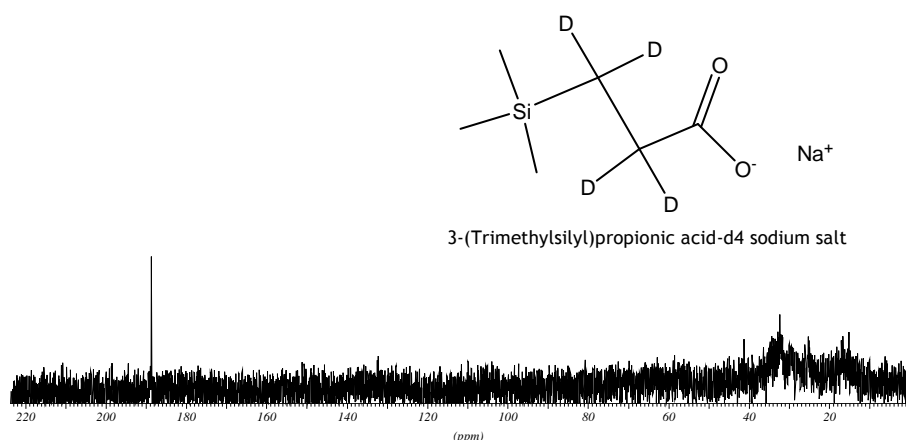


Figure C3-3. Natural abundance ^{13}C NMR spectrum (recorded in D_2O as a solvent) of an aqueous cell extract of *Chlorobaculum parvum* UdG6501Lms grown in a freshwater-like Pfennig's medium. Chemical shifts shown in the spectrum (at 188.64 and 0.00 ppm) belong to TSP-d₄ (3-(trimethylsilyl) propionic-2, 2, 3, 3, d₄ acid sodium salt, which has been used as reference compound into the aqueous extracts. It is clearly seen that the halotolerant strain did not accumulate any organic compound at significant amounts to be recorded during NMR experiments (>45000 scans) when growing in freshwater-like medium.

Besides L- α -glutamate, a frequent osmolyte in many bacteria and archaea (Roberts, 2005), almost all tested GSB strains accumulated β -glutamate (an atypical isomeric form of α -glutamate) when grown in salt-containing media. β -glutamate has been identified as an osmolyte in methanogenic *Archaea* (Robertson, 1990; Lai, 1991; Robertson, 1992; Roberts, 2005), and also in three genera of bacteria. It has been found in the free amino acid pool of a marine gamma-proteobacterium *Alteromonas luteoviolacea* (Henrichs, 1985), in several species of the actinobacterial genus *Nocardiopsis* (Severin et al., 1992; Galinski and Trüper, 1994; Dassarma, 2002) and in the anoxygenic phototrophic bacterium *Thiohalocapsa halophila* DSM 6210^T (Severin et al., 1992). Anionic solutes, such as glutamate and β -glutamate, could serve as counterion for elevated intracellular K^+ concentration.

Both, glutamate isomers and trehalose were confirmed with their respective commercial standards (Addenda C3-1).

The most prominent ^{13}C chemical shifts (at salinities above 3%) were consistent with the accumulation of a compound that was previously unknown as a compatible solute in *Bacteria*, and tentatively identified as N^ε-acetyl-β-lysine (NeABL) according to $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMQC, HMBC) and $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (COSY) connectivities in 2D-NMR experiments and ^{13}C DEPT-135 data (Figures C3-4, C3-5, C3-6, C3-7). Electrospray mass spectrometry (HPLC-MS) analyses showed a molecular peak at m/z 188.5 for the suspected compound. Therefore, the molecular formula of $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$ was proposed. The observed MS signals proved to be consistent with the theoretical isotope pattern of such a molecule (Figure C3-8). Subsequently, the proposed structure was confirmed through its chromatographic preparation and purification. Interestingly, NeABL presented an unexpected behavior during preparation process. It revealed as a strong binding compound in anion exchange resin (Serdolit®, SERVA / - $\text{N}^+\text{R}_3\text{-OH}$). In contrast, only the performance of a basic pH gradient ($\text{NaHCO}_3 - \text{Na}_2\text{CO}_3$ buffer) in a cation exchange resin (Dowex 50W® x8, SERVA / Na^+ form) resulted to be enough to sequentially elute the different compounds contained in the original extract (mainly NeABL and β-glutamate), through differences in such pKa values. The reason of this unexpected behavior is still undetermined, but probably either the hydrophobic part of the molecule or the amino group in beta position could be responsible of this unexpected chromatographic behavior (Figures C3-9, C3-10, C3-11, C3-12).

Ptc.vibrioformis DSM 260^T is also able to synthesize ectoine at 3-5% NaCl although it has only been found as a minor component of the cocktail of organic solutes (0.03 mmols·g protein⁻¹). Similarly, Nα-acetylglutaminyllutamine amide (NAGGN) has been presumptively identified in aqueous extracts of *Cba.parvum* UdG6501Lms grown at 5% NaCl.

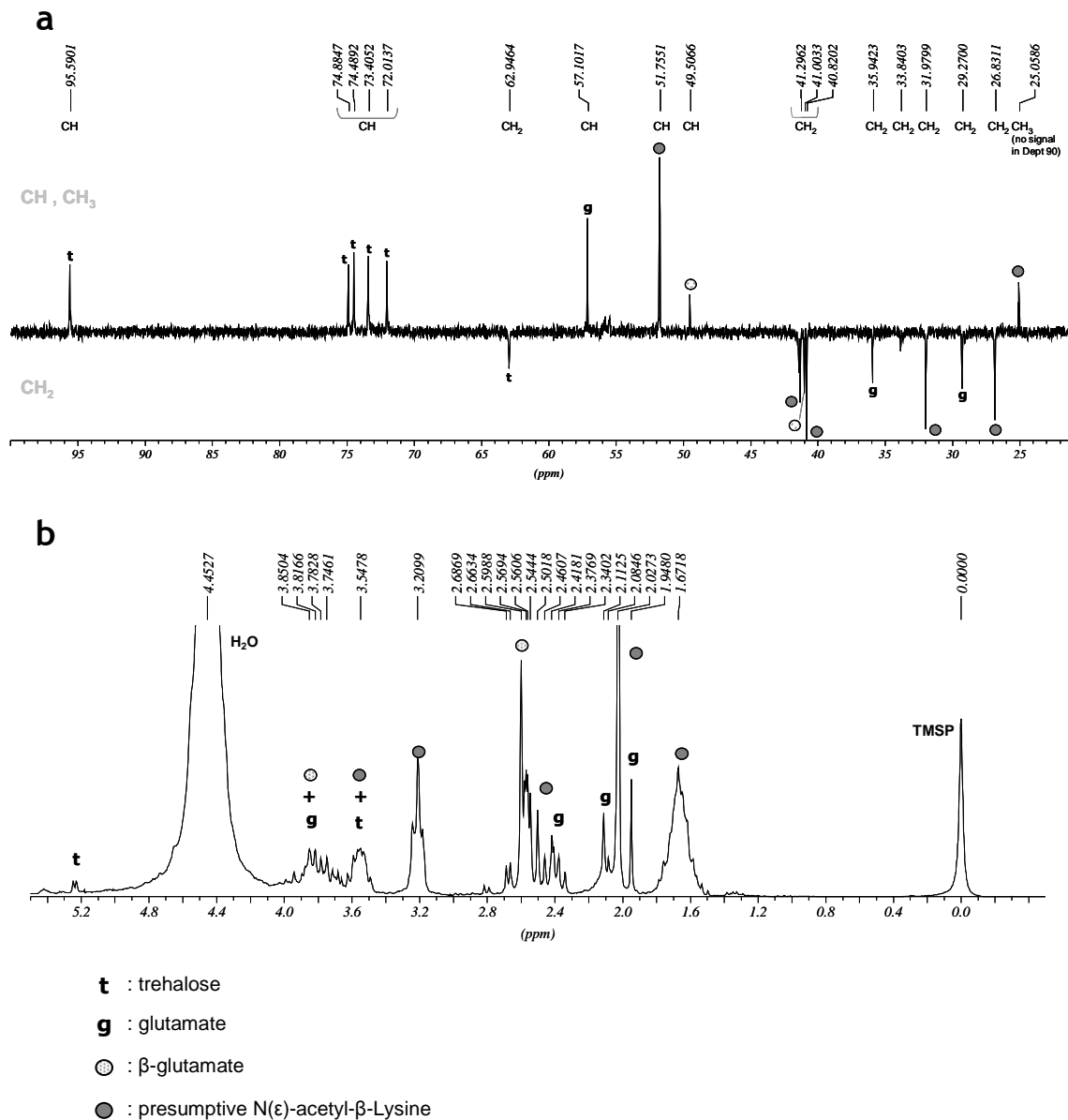
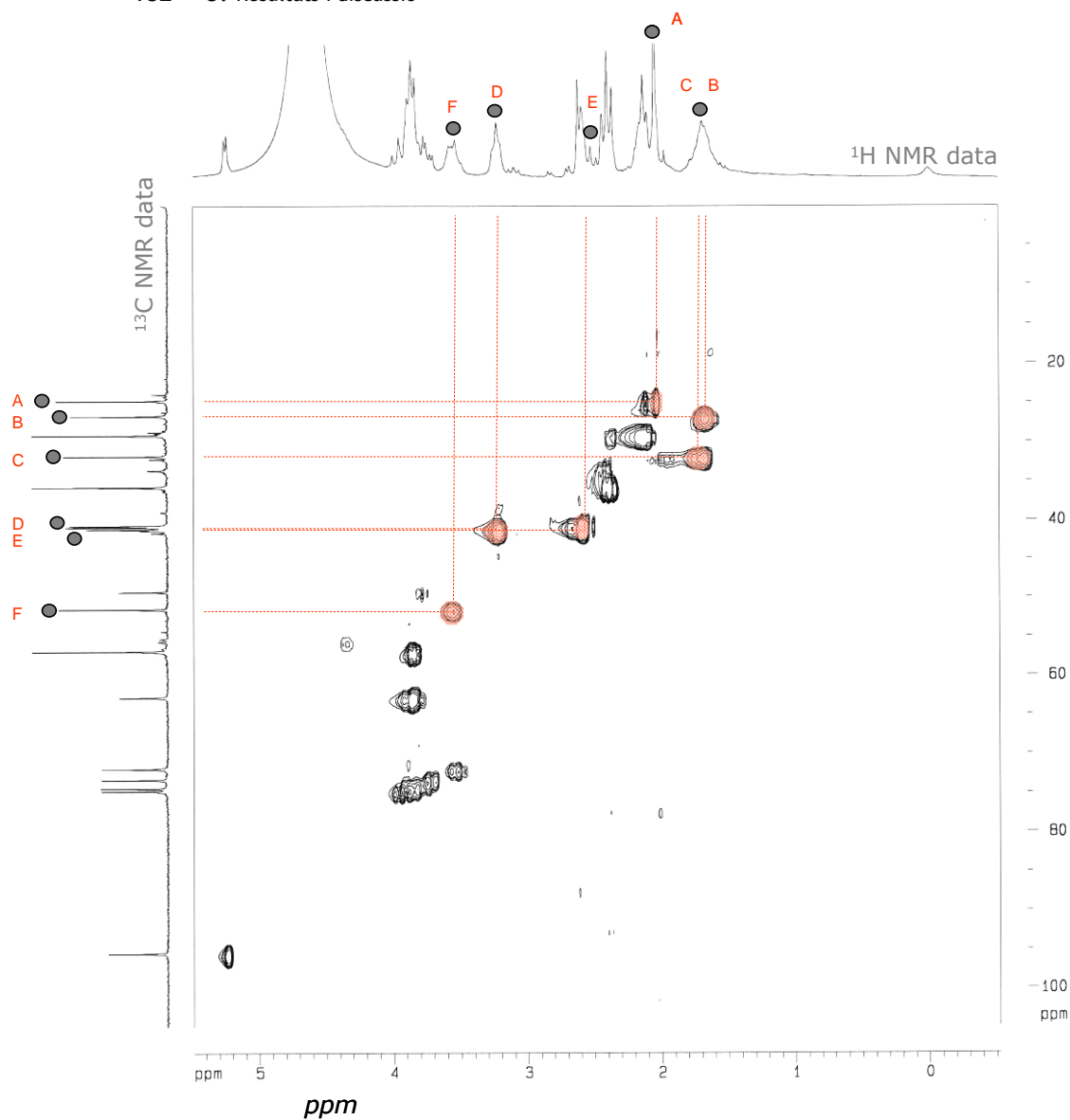


Figure C3-4. ¹³C DEPT-135 NMR spectrum (recorded in D₂O as a solvent) of an aqueous cell extract of *Prosthecochloris vibrioformis* UdG7005Chp grown in a modified Pfennig mineral medium containing 7% NaCl (a). Resolved ¹H-NMR spectrum of an aqueous cell extract of *Chlorobaculum parvum* UdG6501Lms grown in a modified Pfennig mineral medium containing 7% NaCl (b). TMSP has been used as internal reference.



	^{13}C	^1H	
CH_3	25.06	2.02	A
CH_2	26.82	1.67	B
CH_2	31.98	1.67	C
CH_2	40.82	3.20	D
CH_2	41.29	2.35-2.45	E
CH	51.75	3.54	F

Figure C3-5. Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC) 2D NMR spectrum (recorded in D_2O as a solvent) of an aqueous cell extract of *Prosthecochloris aestuarii* UdG7004Chp grown in a modified Pfennig mineral medium containing 3% NaCl. $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ connectivities corresponding to the presumptive N(ϵ)acetyl- β -Lysine are highlighted in the spectrum. Chemical shifts (in ppm) for the candidate compound are shown in the attached table. TMSp has been used as internal reference.

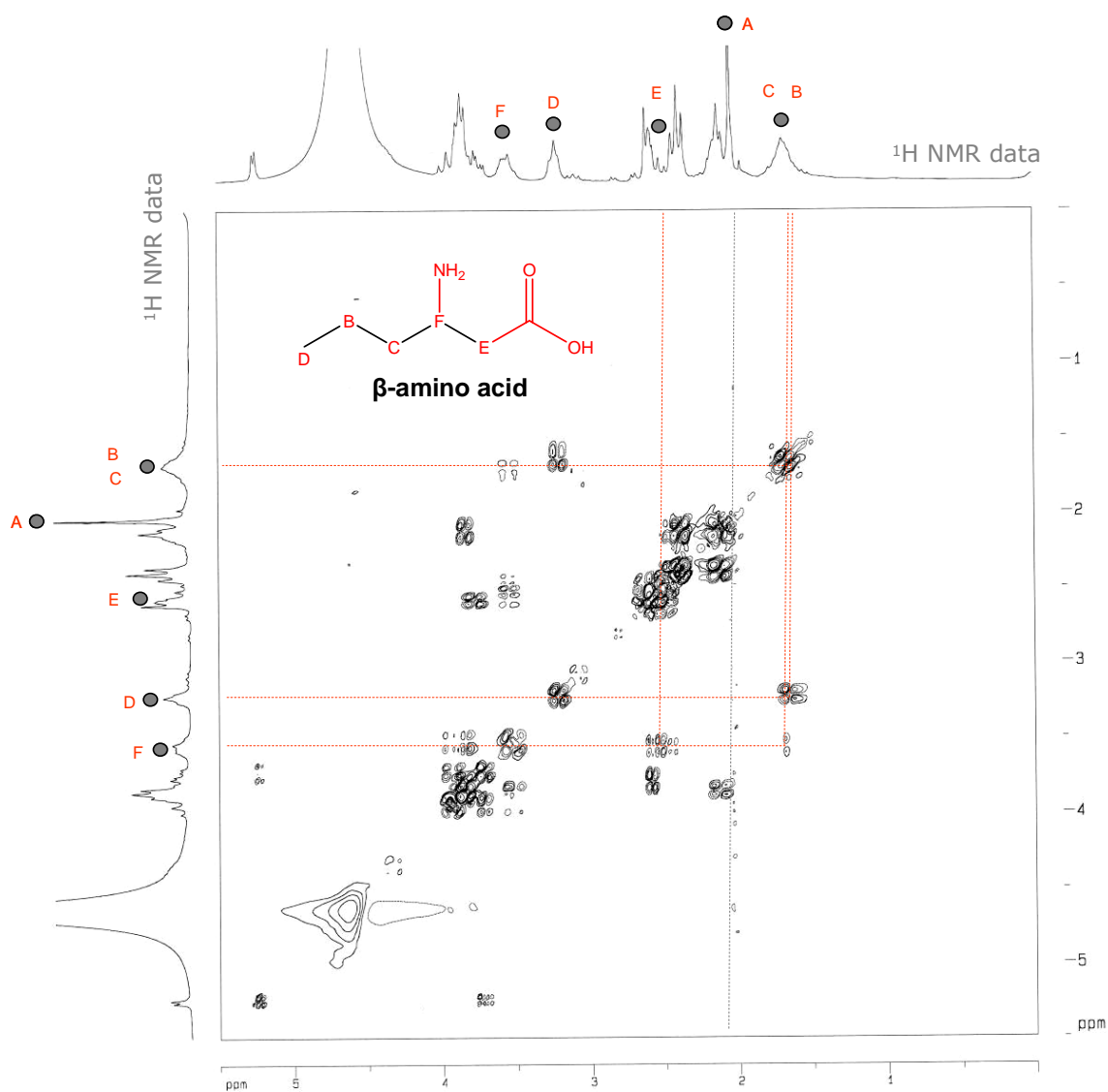


Figure C3-6. 2D NMR-COSY (Correlation Spectroscopy) spectrum (recorded in D₂O as a solvent) of an aqueous cell extract of *Prosthecochloris aestuarii* UdG7004Chp grown in a modified Pfennig mineral medium containing 3% NaCl. Resonances whose chemical shifts correspond to the presumptive N(ε)acetyl-β-Lysine are pointed out with grey dots. Basic chain structure corresponding to a β-amino acid, which was deduced from the analysis, is shown. Chemical shifts (in ppm) for candidate resonances are shown in the attached table. TMSp has been used as internal reference.

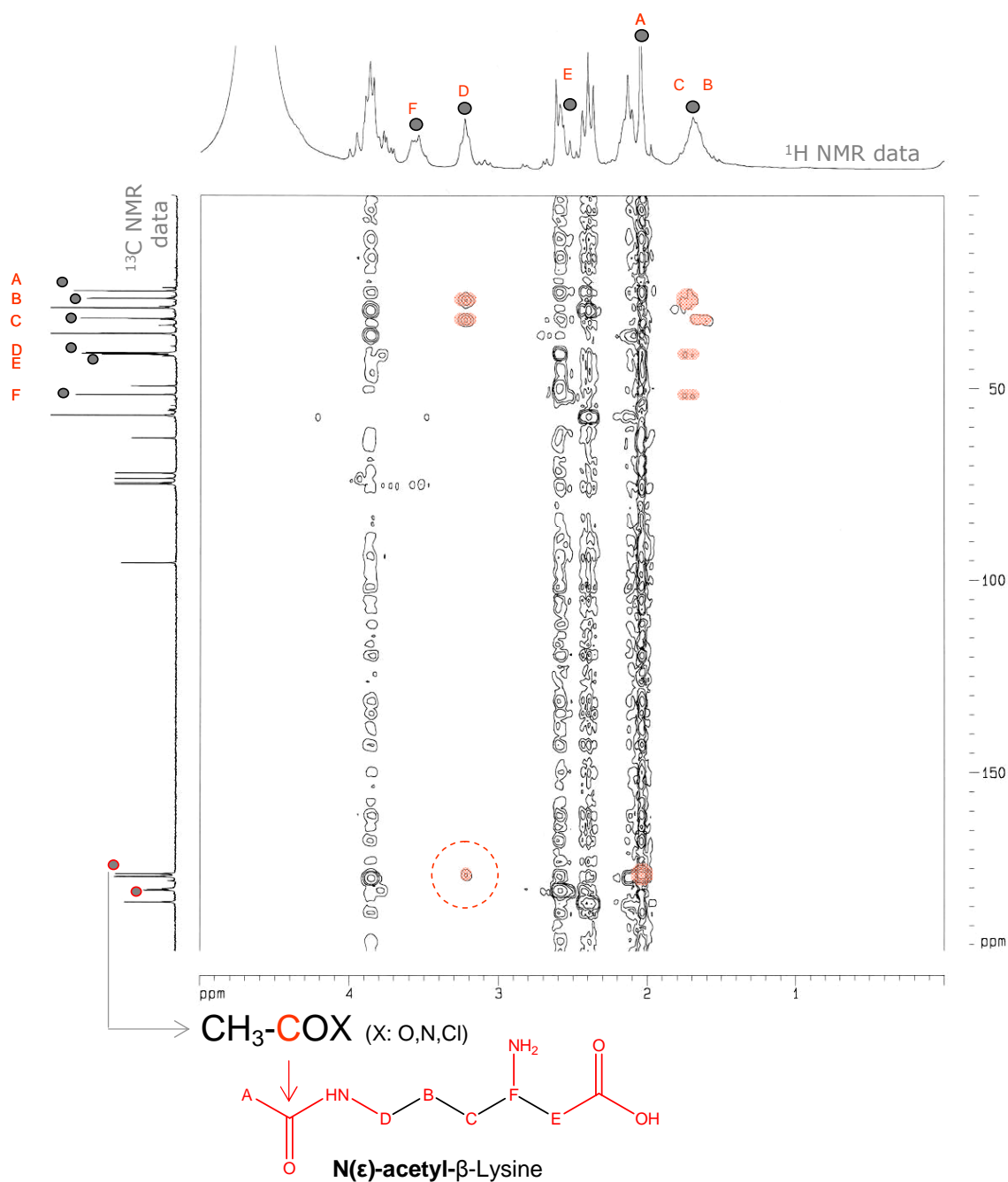


Figure C3-7. Heteronuclear Multiple Bond Coherence (HMBC) 2D NMR spectrum (recorded in D₂O as a solvent) used to determine long-range carbon to hydrogen connectivity of an aqueous cell extract of *Prosthecochloris aestuarii* UdG7004Chp grown in a modified Pfennig mineral medium containing 3% NaCl. Resonances whose chemical shifts correspond to the presumptive N(ε)acetyl-β-Lysine are pointed out with grey dots. ¹H – ¹³C connectivities corresponding to the presumptive N(ε)acetyl-β-Lysine are highlighted in the spectrum. Connectivity signal between proton in the D position and carbon of acetyl group revealed the structure of the molecule. TMS⁺ has been used as internal reference.

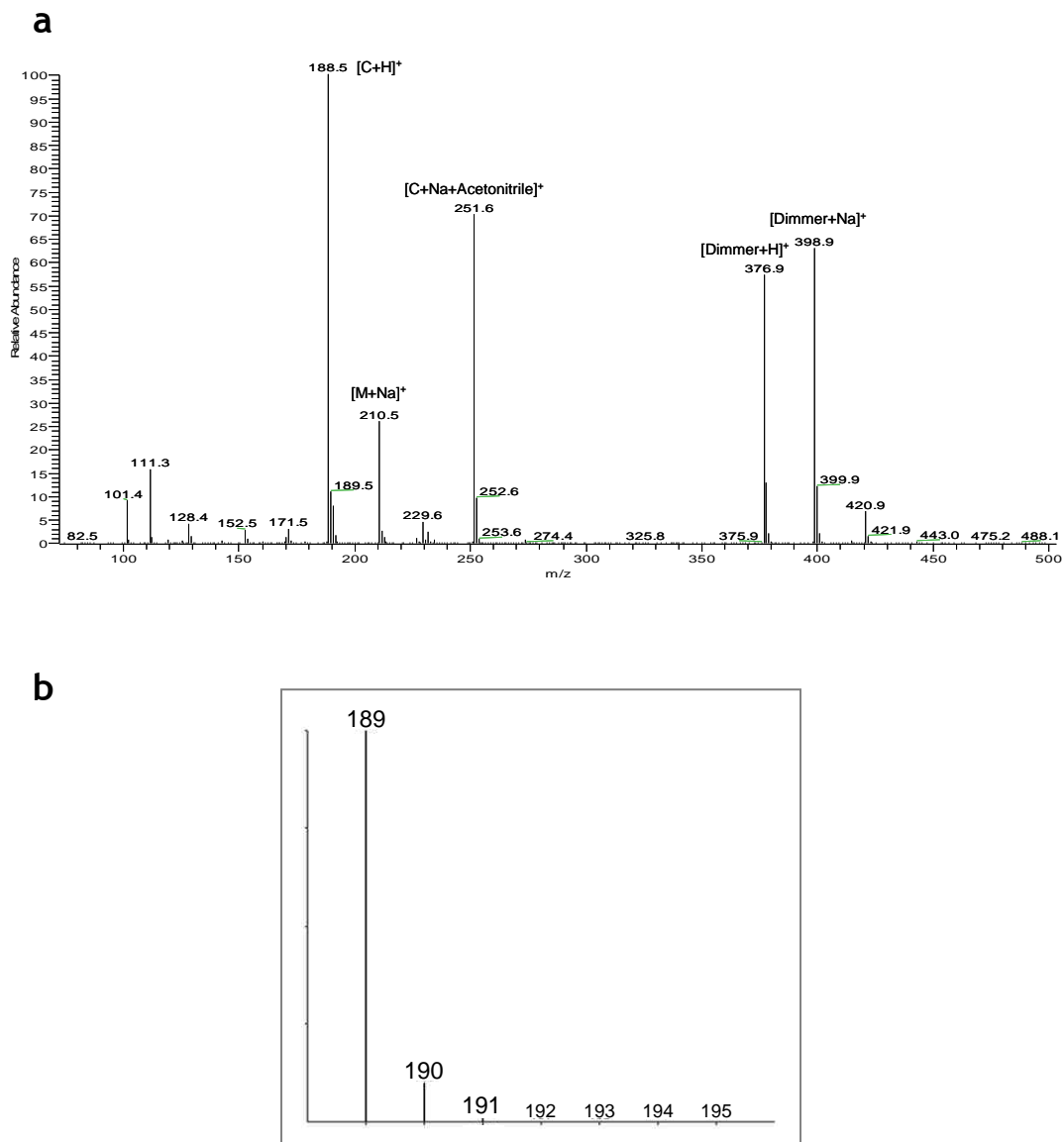


Figure C3-8. Electrospray mass spectrum (**a**) recorded on ion positive mode of a desalted aqueous cell extract of *Chlorobaculum parvum* UdG6501Lms grown in a modified Pfennig mineral medium containing 5% NaCl and supplemented with ammonium acetate 2mM final concentration. The organic compound tentatively identified as N(ε)acetyl-β-Lysine gave a molecular peak at m/z 188.5 corresponding to a molecular mass of 188 uma. Suspected dimer formation would confirm this molecular mass. It could correspond to the proposed molecular formula of $C_8H_{16}N_2O_3$. Theoretical isotope pattern (**b**) for $C_8H_{16}N_2O_3$.

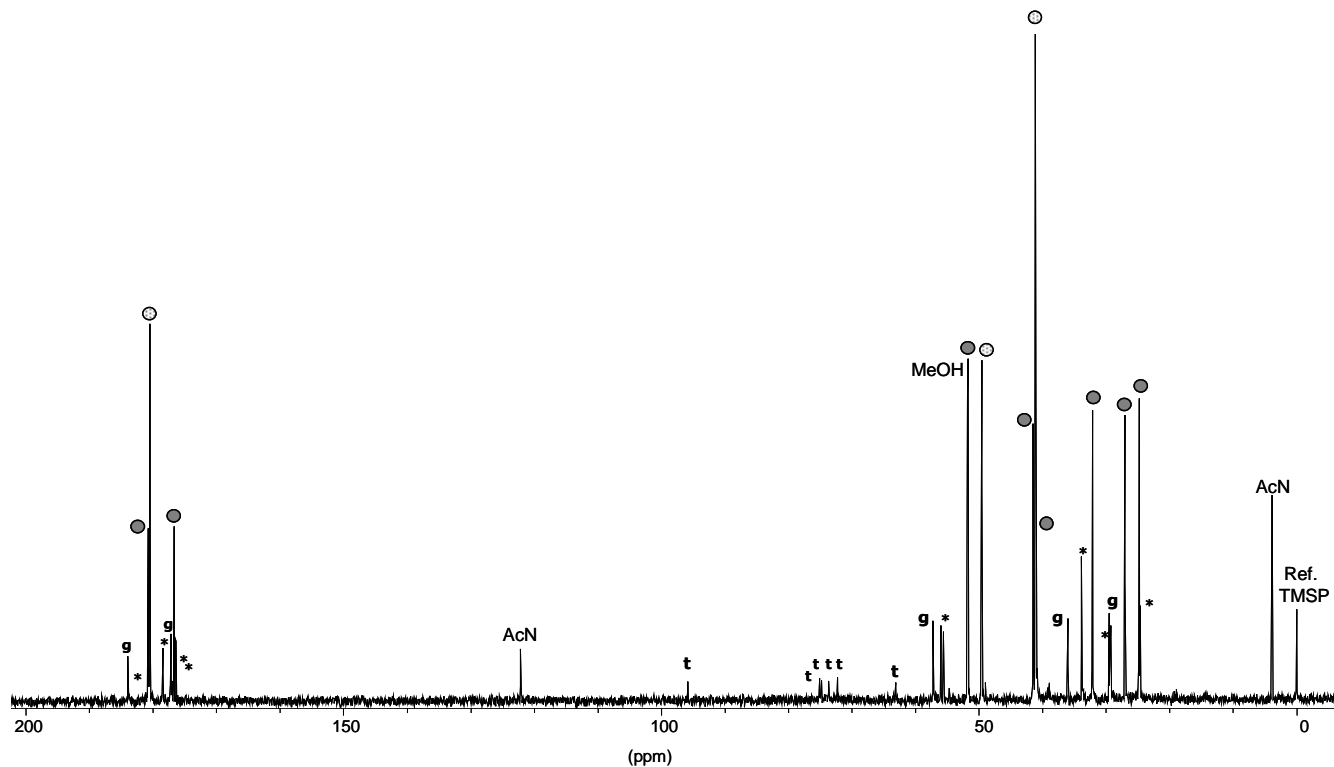


Figure C3-9. Natural abundance ^{13}C NMR spectrum (recorded in D_2O as a solvent) of an aqueous cell extract of *Chlorobaculum parvum* UdG6501Lms grown in a modified Pfennig mineral medium containing 5% NaCl prior to the preparation of the compound N(ϵ)acetyl- β -Lysine. The different compounds identified are: trehalose with chemical shifts (ppm) at 95.90, 74.88, 74.49, 73.40, 72.01, 62.95; glutamate at 183.89, 177.12, 57.10, 35.94, 29.26; β -glutamate at 180.52, 49.51 (CH group), 41.00 and presumptive N(ϵ)-acetyl- β -lysine at 180.80, 176.41, 51.75 (CH group), 41.42, 40.82, 31.98, 26.82 and 25.06 (CH₃ group). (*) Resonances at 183.9, 178.4, 176.7, 176.3, 56.0, 33.8, 29.3 and 24.6 ppm were tentatively assigned to N α -acetylglutaminylglutamine amide (NAGGN). This compound would constitute only a minor component of the compatible solutes containing extracts.

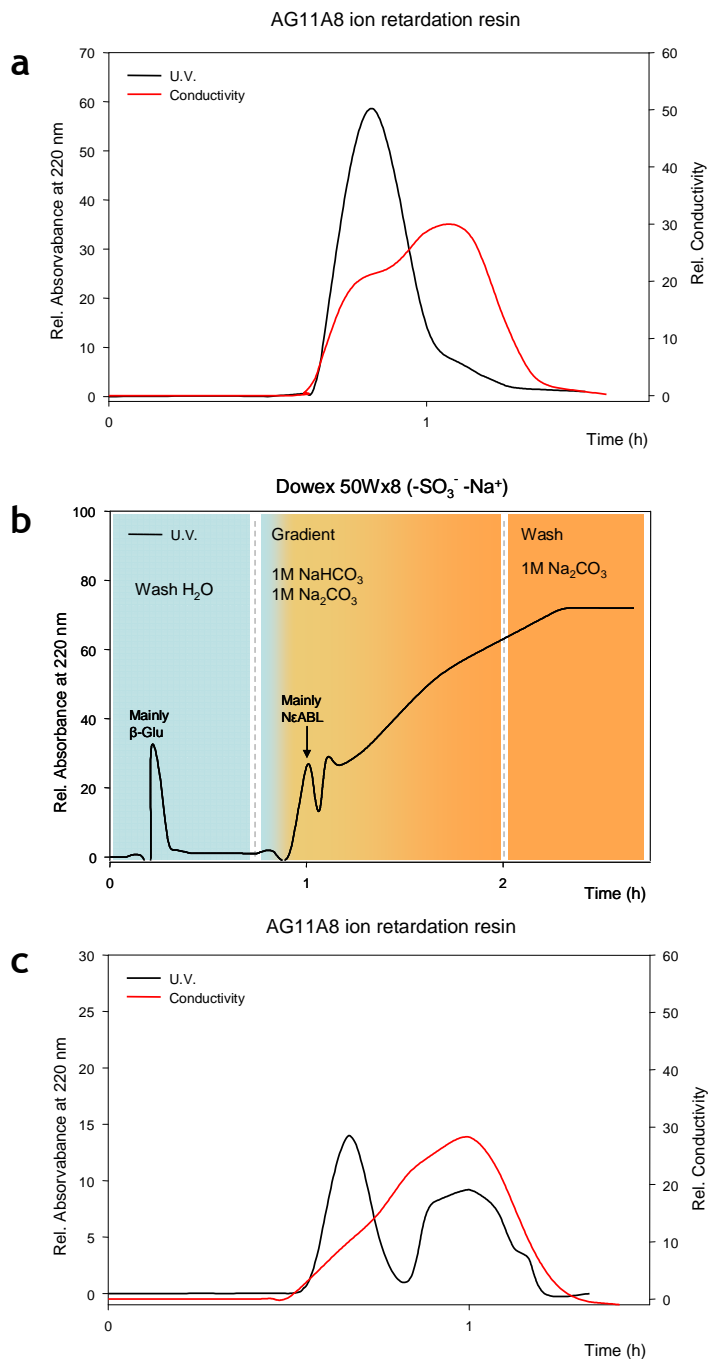


Figure C3-10. Chromatographic preparation of N(ε)acetyl-β-Lysine from cell extracts of *Chlorobaculum parvum* UdG6501Lms shown in figure C3-9. Desalination initial step (**a**) on an AG11A8 (Bio-Rad) resin. Elution of compound of interest (**b**) was achieved by using a linear pH gradient (1M NaHCO₃– 1M Na₂CO₃) on a cation exchanger column (Dowex 50W x8 / Na⁺ form). Carbonate residues were further removed (**c**) by chromatography on an ion retardation column (AG11A8).

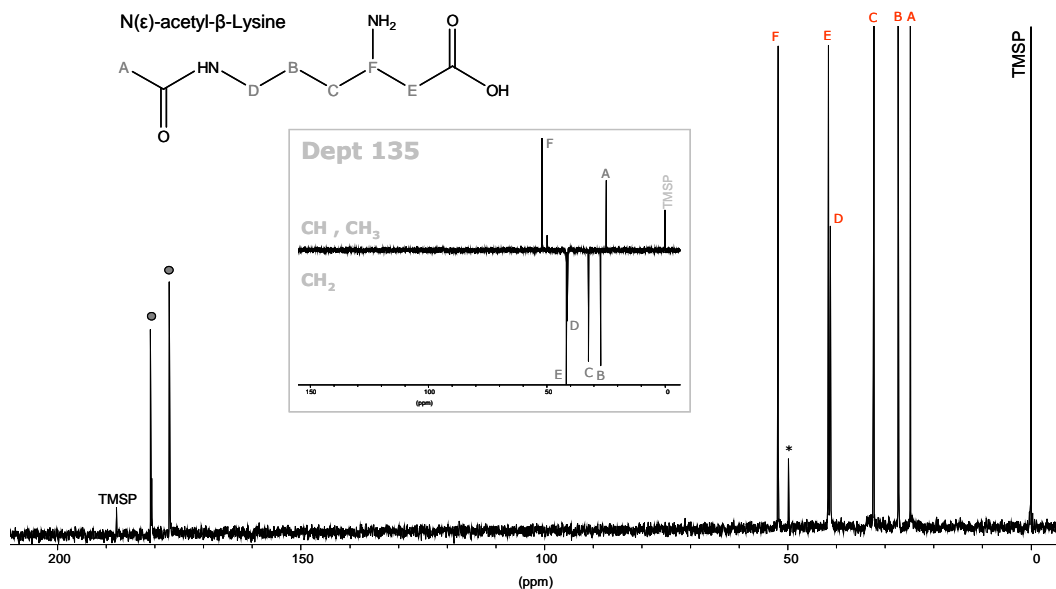


Figure C3-11. Natural abundance ^{13}C NMR spectrum (recorded in D_2O as a solvent) of a purified aqueous extract of N(ε)acetyl-β-Lysine. ^{13}C DEPT-135 spectrum allowed confirming the basic structure of the molecule. Chemical shifts at 180.85, 176.98, 51.96, 41.65, 41.22, 32.33, 27.23 and 24.74 ppm are from this compound. (*) Other contaminant compounds found at minor proportions.

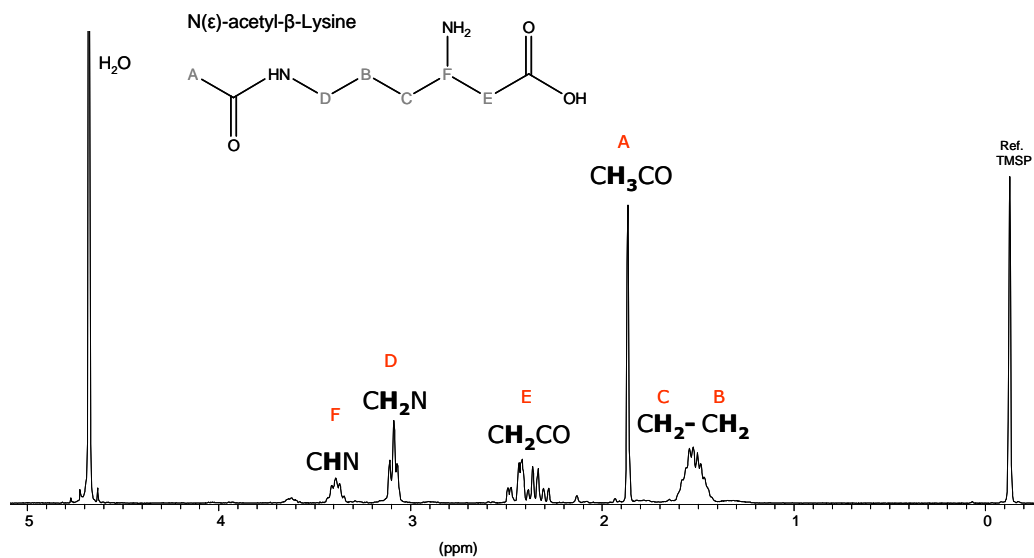


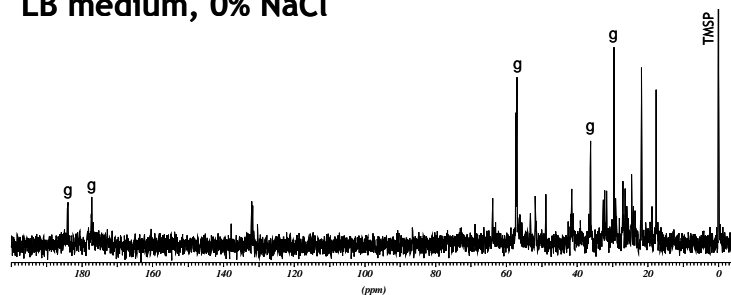
Figure C3-12. ^1H -NMR spectrum (recorded in D_2O as a solvent) of a purified aqueous extract of N(ε)acetyl-β-Lysine (recorded in D_2O as a solvent).

NeABL synthetic capacity in Bacillus species

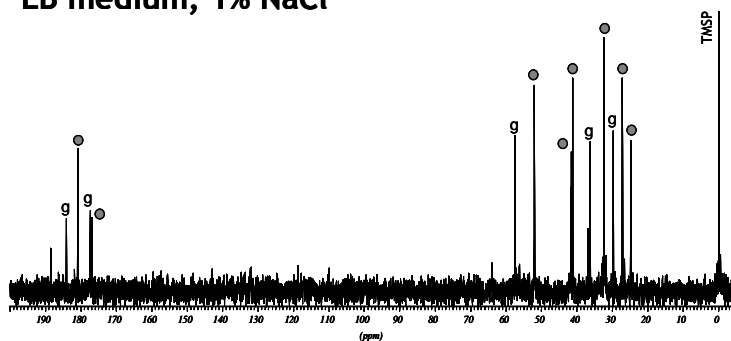
Orthologous protein sequences of the enzymes involved in the NeABL synthesis (lysine-2,3-aminomutase and β-lysine acetyltransferase) were detected from available genomic data in many halotolerant and halophilic bacterial species. *Bacillus cereus* ATCC 14579 (eq. CECT 148^T, DSM 31) was one of the halotolerant species with putative genes. A candidate gene sequence that encodes lysine-2,3-aminomutase can be found in its genome in the gene position 2201018..2202439 (NP_832014), close to the candidate gene sequence encoding β-lysine acetyltransferase (gene position 2198358..2199257, NP_832012). Therefore, NeABL synthesis was predicted for the *Bacillus cereus* species. Natural abundance ¹³C NMR experiments subsequently confirmed the accumulation of NeABL by *Bacillus cereus* CECT 148^T when grown in both rich (LB) and glucose-mineral (GY) media, at NaCl concentrations of 1% and above (Figure C3-13). *B.cereus* CECT 148^T is the first aerobic microorganism to be shown to have the ability to synthesize the compatible solute NeABL.

β-amino acids are relatively rare in biological structures (Thiruvengadam, 1983) and, specifically, the accumulation of β-amino acids (and derivatives) for osmoadaptation. β-glutamate and N^ε-acetyl-β-lysine have only been detected in a few organisms to date, and N^ε-acetyl-β-lysine has been considered unique to methanogenic *Archaea* (Sowers, 1990; Pflüger et al., 2003; Roberts, 2005). It has been found in several species belonging to the *Methanococcales*, *Methanomicrobiales* and *Methanosarcinales* orders. Therefore, the data presented here provides the first evidence of NeABL accumulation under salt stress in the bacterial domain. Moreover, the ability to synthesize NeABL is not confined to a specific bacterial group since it has been found in strains belonging to different phyla (*Chlorobia* and *Firmicutes*).

LB medium, 0% NaCl



LB medium, 1% NaCl



LB medium, 5% NaCl

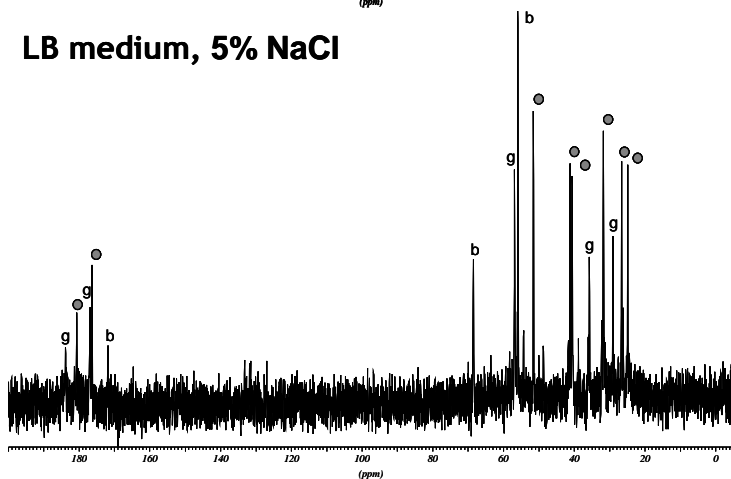


Figure C3-13. Natural abundance ^{13}C NMR spectra (recorded in D_2O as a solvent) from cell extracts of *Bacillus cereus* CECT 148^T strain (eq. ATCC 14579; DSM 31) growing in LB medium at different % NaCl. The different compounds identified and their related chemical shifts are: glutamate (*g*) at 183.89, 177.12, 57.10, 35.94, 29.26; betaine (*b*) at 56.08, 56.16, 56.23, 68.89, 172.00; *N*^c-acetyl- β -lysine (grey dots) at 180.80, 176.41, 51.75, 41.42, 40.82, 31.98, 26.82 and 25.06. TMSP was used as the reference compound or internal reference.

Salinity effects on the accumulation of compatible solutes in GSB species

Both isolated and type GSB strains were grown in media of different NaCl concentrations to determine differences in the composition of major compatible solutes from ¹³C NMR spectra. Although GSB species had essentially the same cocktail of compatible solutes, different ratios among these compounds were found in different strains and salt concentrations. Changes in the relative intensity of signal in NMR spectra, which can be related to the proportion of each compound in the original extract, indicated that anionic solutes, either L- α -glutamate or β -glutamate, were the main organic compounds accumulated for osmotic balance at low NaCl content (3%) (Figure C3-2). As a general trend, the highest NeABL ratios were achieved at the highest NaCl contents tolerated by each strain (Table C3-1). *Ptc.vibrioformis* isolates presented the highest concentration values of accumulated NeABL, ranging between 0.37 mmols·g protein⁻¹ (strain UdG7005Chp) and 2.11 mmols·g protein⁻¹ (strain UdG7007Lpa), when grown in 5% NaCl. The relationship between NeABL concentration and salt content in the media led us to hypothesize that the synthesis of this compound is osmotically regulated. According to this hypothesis, the activity of one of its biosynthetic enzymes (lysine-2,3-aminomutase) was limited in *Methanococcus thermolithotrophicus* when adapted to low NaCl concentrations (Martin et al., 2000). Furthermore, other experiments with *Methanosarcina mazei* (Pflüger et al., 2003) revealed that the transcription of genes encoding NeABL synthesis was induced at high salt concentrations. However, the molecular basis for regulating NeABL synthesis has not yet been described in any biological system.

Uptake experiments were performed with the isolated strains *Prosthecochloris* sp. UdG7009Lms and *Prosthecochloris vibrioformis* UdG7010Lms which enabled us to detect differences in their transport capacities. Significant amounts of compatible solutes that accumulated from the medium were only found at the highest salt concentrations (6% NaCl). Usually, the level of activity of osmolyte transporters and/or the expression of the genes encoding such systems are osmotically controlled and they are higher in high osmolality media (Kempf, 1998).

Results showed that the strain UdG7009Lms was able to transport betaine from external media. The betaine uptake capacity was also previously determined (Welsh, 1993) in two GSB species (type strains DSM 260^T and DSM 249^T). Internal concentration values ranged between 0.47 and 2.60 mmols betaine·g protein⁻¹. Despite the broad range of measured values, the betaine:NeABL ratio remained fairly constant at 1.2:1.0. In addition, this strain also presented low affinity for ectoine and hydroxyectoine, which were poorly accumulated (<0.02 mmols·g protein⁻¹). However, the strain UdG7010Lms was able to take up ectoine (up to 0.2 mmols·g protein⁻¹) and hydroxyectoine (up to 0.16 mmols·g protein⁻¹), but not betaine. The differences between their uptake capacities may reflect different transport systems for osmoprotectants: the strain UdG7009Lms would present a transport system of broad substrate specificity, albeit with relatively low affinity for ectoine and hydroxyectoine, and the strain UdG7010Lms would present a specific osmolyte transporter for ectoines.

Pre-enrichment cultures, which reproduce field conditions, were performed to determine the relative contribution of NeABL in the cocktail of organic compounds accumulated under these conditions (brackish to marine water). Data from ¹³C NMR measurements revealed that characteristic chemical shifts for β-amino acids (both β-glutamate and NeABL) were the minor signals, but the spectra showed both trehalose and glutamate as the main compounds (Figure C3-14). NeABL concentrations in pre-enrichment cultures (0.02 mmols·g protein⁻¹ when growing at 34 mS·cm⁻¹) were much lower than in pure cultures at a similar salinity (3% NaCl) (Table C3-1). The lower nitrogen content in environmental water samples (30.8 ppm NH₄⁺) compared with synthetic culture media (93.5 ppm NH₄⁺) could probably determine a lower synthesis of nitrogen containing forms, such as NeABL, which contains two nitrogen atoms. However, these results should be considered carefully since pre-enrichment cultures contained a mixture of at least two predominant species (one *Prosthecochloris* sp. and one *Chlorobium* sp.) and could present different behavior in both the ratio and composition of the accumulated compatible solutes.

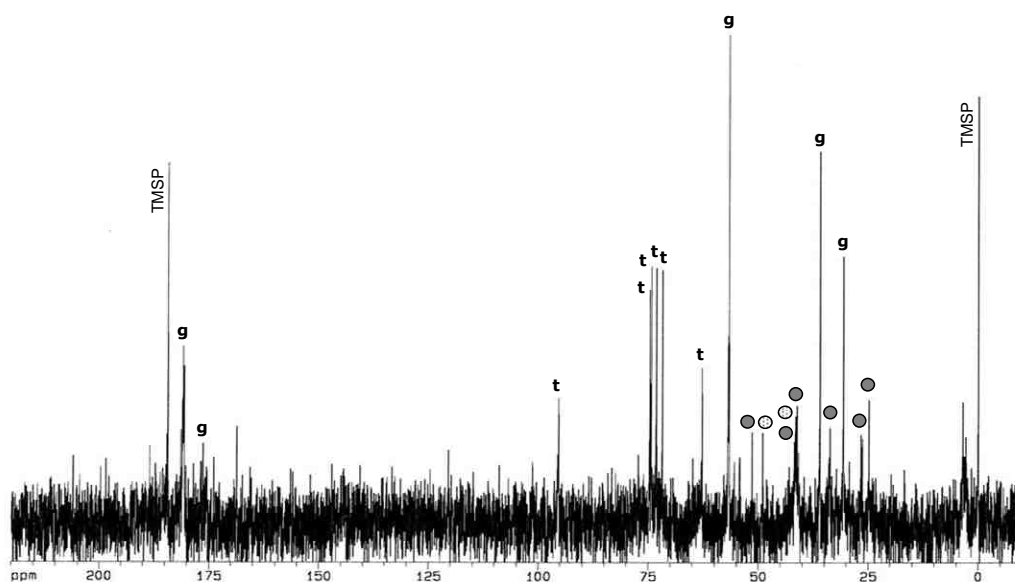


Figure C3-14. Natural abundance ^{13}C NMR spectrum (recorded in D_2O as a solvent) of an aqueous cell extract of a 10L pre-enrichment culture from Massona lagoon containing *Prosthecochloris* and *Chlorobium* species. Environmental parameters on the pre-enrichment process were conductivity at $34 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ (marine-like water) and $7.1 \text{ mM H}_2\text{S}$, 30.8 ppm NH_4^+ and pH 7.16 (as starting conditions). Cultures were incubated at 25°C under saturating light intensities ($50\text{--}100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Resonances related to the accumulation of β -aminoacids like β -glutamate and N(ϵ)acetyl- β -Lysine were found as minor signals in the extracts.

Shifts in the osmolyte composition in Bacillus cereus

Bacillus cereus CECT 148^T (eq. ATCC 14579, DSM 31) was grown in both rich (LB) and glucose-mineral (GY) media at different salt concentrations. The strain was able to accumulate NeABL in both LB and minimal media in the presence of NaCl. Significant amounts of NeABL were detected in cells grown in LB media even at low NaCl concentrations (0.1%). In contrast, characteristic resonances of NeABL were undetectable in media without salt (Figure C3-13). Intracellular NeABL concentrations increased from $0.3 \text{ mmols}\cdot\text{g protein}^{-1}$ at 1% NaCl to $1.67 \text{ mmols}\cdot\text{g protein}^{-1}$ at 5% NaCl in LB media (see also Figure C3-13). Therefore, the synthesis of NeABL also seems to be osmotically regulated in *B. cereus*. ^{13}C NMR data of dehydrated components of the medium (a mixture of organic compounds) did not show characteristic chemical shifts for NeABL in LB medium, which also indicates *de novo* synthesis of this osmolyte (Addenda C3-2).

Besides NeABL, the contribution of betaine to the osmotic balance was also significant ($0.2 \text{ mmols} \cdot \text{g protein}^{-1}$) in LB medium at high salinities (5-7%). However, betaine was present in the yeast extract and therefore the possibility of an uptake of this compound from rich media and supplemented synthetic media must be considered. Putative gene sequences encoding an ATP binding cassette (ABC) transporter for betaine could be found in the genome of *B.cereus* ATCC 14579 at gene position 2177843..2180305 (accession numbers NP_831997 and NP_831998) and also between gene position 2758539..2761602 (NP_832542, NP_832543 and NP_832544). In addition, putative gene sequences encoding secondary transporters of the betaine-carnitine-choline transporter family (BCCT) could also be found in its genome (between gene position 5145966..5147483 with acc. number NP_834901 and 533657..535207 with acc. number NP_830372).

***Bacillus cereus* as a production strain for NeABL**

The production of large amounts of NeABL could become a “bottleneck” for studying its potential applications, as for example in the stabilization of proteins and the protection of whole microorganisms. Consequently, applied studies could aim at identifying production strains for NeABL and developing simple and rapid separation processes. The ‘bacterial milking’ process (Sauer and Galinski, 1998) or a recently-developed method based on osmotic down-shock coupled with thermal permeabilization (Schiraldi et al., 2006) could be suitable methodological starting points.

NeABL accumulation rates ($0.3 \text{ mmols} \cdot \text{g protein}^{-1}$ on LB medium at 1% NaCl) in *B.cereus* are similar to those measured in GSB ($0.33\text{-}0.48 \text{ mmols} \cdot \text{g protein}^{-1}$ at 5% NaCl in *Cba.parvum* UdG6501Lms). These values are also comparable to those described previously in methanogenic *Archaea* (Pflüger et al., 2003). However, *B.cereus* has several advantages in comparison with GSB and methanogenic *Archaea*. It has a significantly higher growth rate (0.21 h^{-1} at 1 to 5% of NaCl) than the fastest-growing GSB isolated strain UdG6501Lms (ranging from 0.026 h^{-1} to 0.006 h^{-1} at 3% NaCl), comparable to *Methanococcus maripaludis* (0.306 h^{-1} at 2.2-4.7% of NaCl) (Pflüger et al., 2003). However, the culture procedure for bacilli is easier since they can be grown aerobically. Finally, the process of NeABL purification can be achieved in a single chromatographic separation through a desalination process with AG11A8 (Bio-Rad) resin (Figure C3-15).

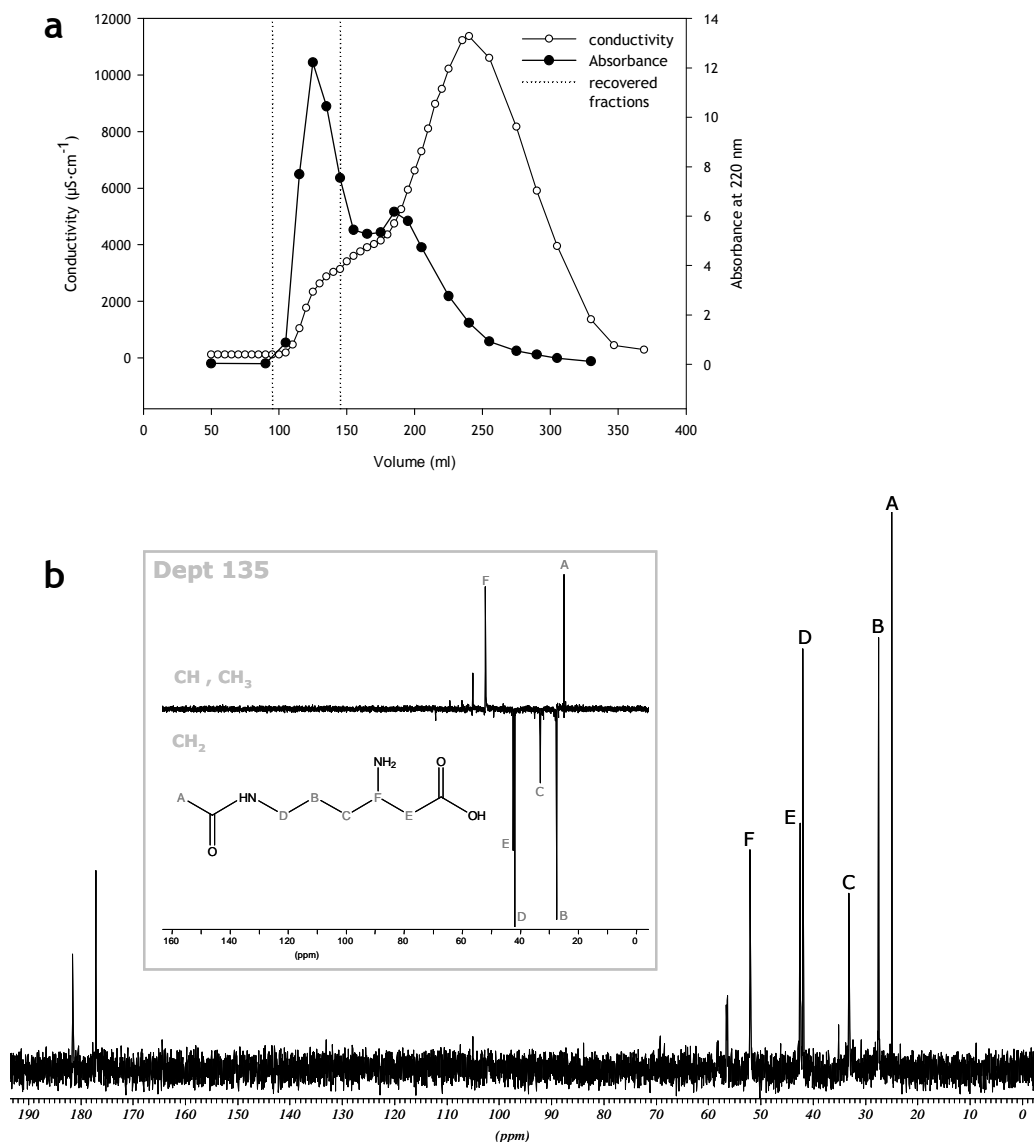


Figure C3-15. Chromatographic preparation (a) of N^ε-acetyl-β-lysine from cell extracts of *Bacillus cereus* CECT 148^T strain (eq. ATCC 14579; DSM 31) grown in LB medium supplemented with 1% NaCl. Desalinization and retardation of glutamate present in the original extract were achieved in a single chromatographic run on an AG11A8 (Bio-Rad) column and the recovered fractions were concentrated. Natural abundance ¹³C NMR spectrum (b), recorded in D₂O as a solvent, of a purified aqueous extract of N^ε-acetyl-β-lysine. ¹³C DEPT-135 spectrum confirmed the basic structure of the molecule. Chemical shifts at 180.85, 176.98, 51.96, 41.65, 41.22, 32.33, 27.23 and 24.74 ppm correspond to this compound. TMSp was used as the internal reference.

When *B.cereus* is grown at low salinity values (1% NaCl) and low C/N ratios (as in LB medium) only two compounds are accumulated: the organic anionic α -glutamate and the zwitterionic NeABL. After cell harvesting and compatible solute extraction, an ion retardation step is sufficient to retain salts and glutamate and recover a purified extract of NeABL. Therefore, *B.cereus* CECT 148^T could be considered a suitable organism for the large-scale production of NeABL. Further improvements could be directed towards creating deletion mutants defective in betaine uptake.

Although the wide knowledge of the species synthesizing NeABL and its molecular basis (Sowers, 1990; Lai, 1991; Robertson, 1992; Sowers and Gunsalus, 1995; Martin et al., 2000; Roebler and Müller, 2001; Oren, 2002b; Pflüger et al., 2003; Müller et al., 2005; Roberts, 2005), still lack studies directed to determine and quantify the capabilities of such compound to assess its potential applications.

Phylogenetic dispersion of putative genes related to NeABL synthesis

BLASTp searches (Altschul, 1997) for the enzymes assumed to catalyze NeABL synthesis against whole microbial genomes have allowed us to detect a substantial number of orthologous genes encoding both enzymes. Lysine-2,3-aminomutase orthologs (LAMG) have been identified in 57 species belonging to 10 different phyla of both archaeal and bacterial domains (*Addenda* C3-3). However, orthologous lysine-2,3-aminomutase gene products could also play a role in the use of lysine for growth (the of β -lysine is the first step in lysine degradation) and may therefore be unrelated to the biosynthesis of NeABL, especially when the acetylating gene (LATG) is not detectable on the genome. This capacity was described in *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586 (Barker et al., 1982) and *Clostridium subterminale* Sb4 (Ruzicka et al., 2000). Probably, most of the *Clostridia* shown in the tree are lysine-fermenting. β -lysine has found to be also an important moiety in the formation of several antibiotics, such as viomycin, tuberactinomycin and streptothricin in *Streptomyces* species (including *S.vinaceus* ATCC 11861) (Thiruvengadam, 1983; Thomas et al., 2003).

LATG orthologs have been found close to the aminomutase in 31 species out of 57, representing 5 different phyla (*Addenda* C3-4). It is therefore intriguing to speculate that some of the species presenting the two orthologous

sequences will be able to synthesize NeABL, as is the case of *B.cereus*. Several halophilic GSB and halotolerant *Bacillus* species were included in the group of all species presenting candidate sequences in their genomes (Table C3-2). Within the GSB group, these candidate gene sequences were not found in the genomes of the freshwater species *Chlorobaculum tepidum* ATCC 49652^T, *Chl.limicola* DSM 245^T, *Chlorobium phaeobacteroides* DSM 266^T, *Chl.clathratiforme* DSM 5477^T, *Chl.chlorocromatii* CaD3 and '*Chlorobium ferroxidans*' DSM 13031.

Table C3-2. List of *Chlorobia* and *Bacillus* species presenting orthologous gene sequences that encode putative *lysine 2,3 aminomutase* and *β-lysine acetyltransferase* (these orthologs are usually located in the vicinities of putative *lysine 2,3-aminomutase* gene sequences). EC Enzyme Commission number detailed in the sequence description, aa number of amino acid residues for predicted protein.

Organism source lineage	Gene; locus tag	Protein description	EC	aa	acc. number	Gene position ^a
Class; species						
<i>Chlorobia</i>						
<i>Chl.luteolum</i> DSM 273	Plut_1576	unknown function DUF160	-	438	YP_375473	1766019..1767335
" <i>Chl. phaeobacteroides</i> " BS1	Cpham1DRAFT_2179	unknown function DUF160	-	481	ZP_00532091	17041..18486
<i>Chl.phaeovibrioides</i> DSM 265	CvibDRAFT_1018	unknown function DUF160	-	441	ZP_00661171	143539..144864
<i>Ptc.aestuarii</i> DSM 271	PaesDRAFT_1501	unknown function DUF160	-	450	ZP_00591649	65374..66726
<i>Bacilli</i>						
<i>B.anthraxis</i> str.Ames	KamA; BA2300	L-lysine 2,3-aminomutase	-	473	NP_844685	2147642..2149063
<i>B.cereus</i> ATCC 10987	KamA; BCE_2334	L-lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2	473	NP_978644	2237415..2238836
<i>B.cereus</i> ATCC 14579	BC_2251	L-lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2	473	NP_832014	2201018..2202439
<i>B.cereus</i> E33L	KamA; BCZK2079	L-lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2	473	YP_083670	2203403..2204824
<i>B.cereus</i> G9241	KamA; BCE_G9241_2268	L-lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2	473	ZP_00236699	104915..106336
<i>B. cereus</i> subsp. <i>cytotoxis</i> NVH391-98	Bcer98DRAFT_2665	unknown function DUF160	-	472	ZP_01178593	93760..95178
<i>B.halodurans</i> C-125	BH2255	L-lysine 2,3-aminomutase	-	468	NP_243121	2381323..2382729
<i>Bacillus</i> sp. NRRLB-14911	B14911_22782	L-lysine 2,3-aminomutase	-	495	ZP_01170701	11357..12844
<i>B.subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str.168	KamA; BSU19690	L-lysine 2,3-aminomutase	degr. Lys	471	NP_389850	2138652..2140067
<i>B. thuringiensis</i> serovar israelensis ATCC 35646	RBTH_01472	L-lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2	202	ZP_00743973	(-)
<i>B. thuringiensis</i> serovar konkukian str. 97-27	KamA; BT9727_2083	lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2	473	YP_036410	2167260..2168681
<i>B.weihenstephanensis</i> KBAB4	BcerKBAB4DRAFT_2934	unknown function DUF160	-	472	ZP_01184116	79862..81280

When present, LAMG orthologs are often described as proteins of unknown function, as for example DUF 160. Since the criteria used for assigning orthology are rather stringent (E value <1e-50; >50% amino acid sequence similarity), those sequences presenting the former description could be regarded as putative lysine-2,3-aminomutase coding genes. In addition, PCR amplifications using degenerate sets of primers allowed us to retrieve partial sequences of LAMG in *Prosthecochloris vibriiformis* species (strains

UdG7005Chp and UdG7006Lms) (*Addenda* C3-6). However, no amplifications were obtained from DNA extracts of other species tested (*Chlorobaculum parvum* UdG6501Lms, *Chlorobium phaeovibrioides* DSM 269^T, *Prosthecochloris aestuarii* UdG7004Chp, *Prosthecochloris* sp. 2k) (Figure C3-16).

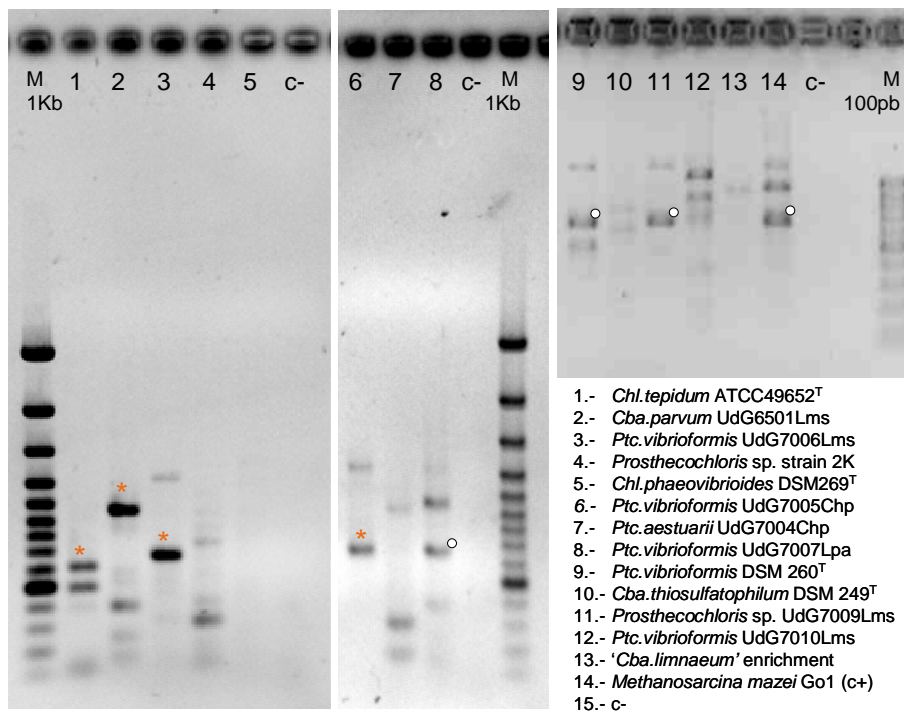


Figure C3-16. PCR-amplification products of putative gene encoding for *lysine-2,3-aminomutase* in different GSB species and *Methanosarcina mazei* Go1 (used as positive control). A partial fragment of approximately 650 bp was expected with the specific set of primers. (*) Candidate amplification products which were cloned into pGEM-T vector (Promega); white dots indicate other amplification products presenting the expected length.

The degenerate oligonucleotide primer approach was used to obtain candidate gene sequences in GSB species, because genomic data for halophilic GSB species were unavailable at the time the analyses were performed. Available protein sequences of methanogenic *Archaea* and some *Firmicutes* enabled us to detect two highly conserved and specific regions which fulfilled all basic guidelines for primer selection (*Addenda* C3-5). However, newly available genome sequences of four halophilic GSB (strains DSM 271^T, DSM 273^T, DSM 265, BS1) revealed an amino acid substitution in one of the selected primer regions (VVDAP in *Ptc.vibrioformis* vs. VIDAP in other species),

which would produce 2 mismatches at the primer's 3'-end (Figure C3-18). This might explain why only *Ptc.vibrioformis* strains were successfully amplified during PCR assays. However, the overall homology of all available GSB candidate sequences is considerably high (>80% of homologous positions). In addition, genomic data support the view that the mechanisms for the conversion of α-lysine to β-lysine could be identical (Chen et al., 2000; Ruzicka et al., 2000; Pflüger et al., 2003). Characteristic amino acid residues binding the cofactors S-adenosylmethionine (SAM), iron (Fe/S clusters), zinc and pyridoxal 5'-phosphate (PLP) involved in the activity of lysine-2,3-aminomutase (Frey, 1993; Chen and Frey, 2001) have been identified in available genome sequences of GSB (Figure C3-18) and also *B.cereus* ATCC 14579.

Although the genes presumptively involved in NeABL synthesis have already been identified in *Archaea* (Pflüger et al., 2003), the molecular basis for the salt-dependent regulation of NeABL formation is still unknown. Interestingly, a regular structure of gene organization of putative genes encoding NeABL can be inferred from genomic data of GSB and *Bacillus* species (Figure C3-17). These genes were usually clustered together with other presumptive regulatory genes and it is suggested that they are involved in both the synthesis and regulation processes of this osmolyte.

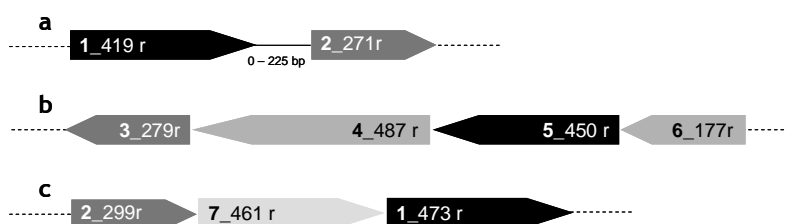


Figure C3-17. Genomic organization of the genes encoding putative enzymes for the biosynthesis of NeABL in methanogenic *Archaea* (a), halophilic GSB strains (b) and some *Bacillus* species (c). *B.halodurans* C-125, *B.subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 and *B.thuringiensis* serovar *israelensis* ATCC 35646 should be considered as exceptions to this regular gene organization due to differences in either the order or direction of these genes. The common number of amino acid residues (r) of the deduced protein for each gene is indicated. Protein descriptions of encoding genes are: 1 lysine-2,3-aminomutase; 2 β-lysine acetyltransferase; 3 putative acetyltransferase (GNAT family), GCN5-related N-acetyltransferase; 4 Na⁺/solute symporter (not present in strain DSM 273^T); 5 protein of unknown function DUF160; 6 regulatory protein, MarR; 7 L-lysine aminomutase regulator, arginine utilization regulatory proteins RocR.

200 — 3. Resultats i discussió

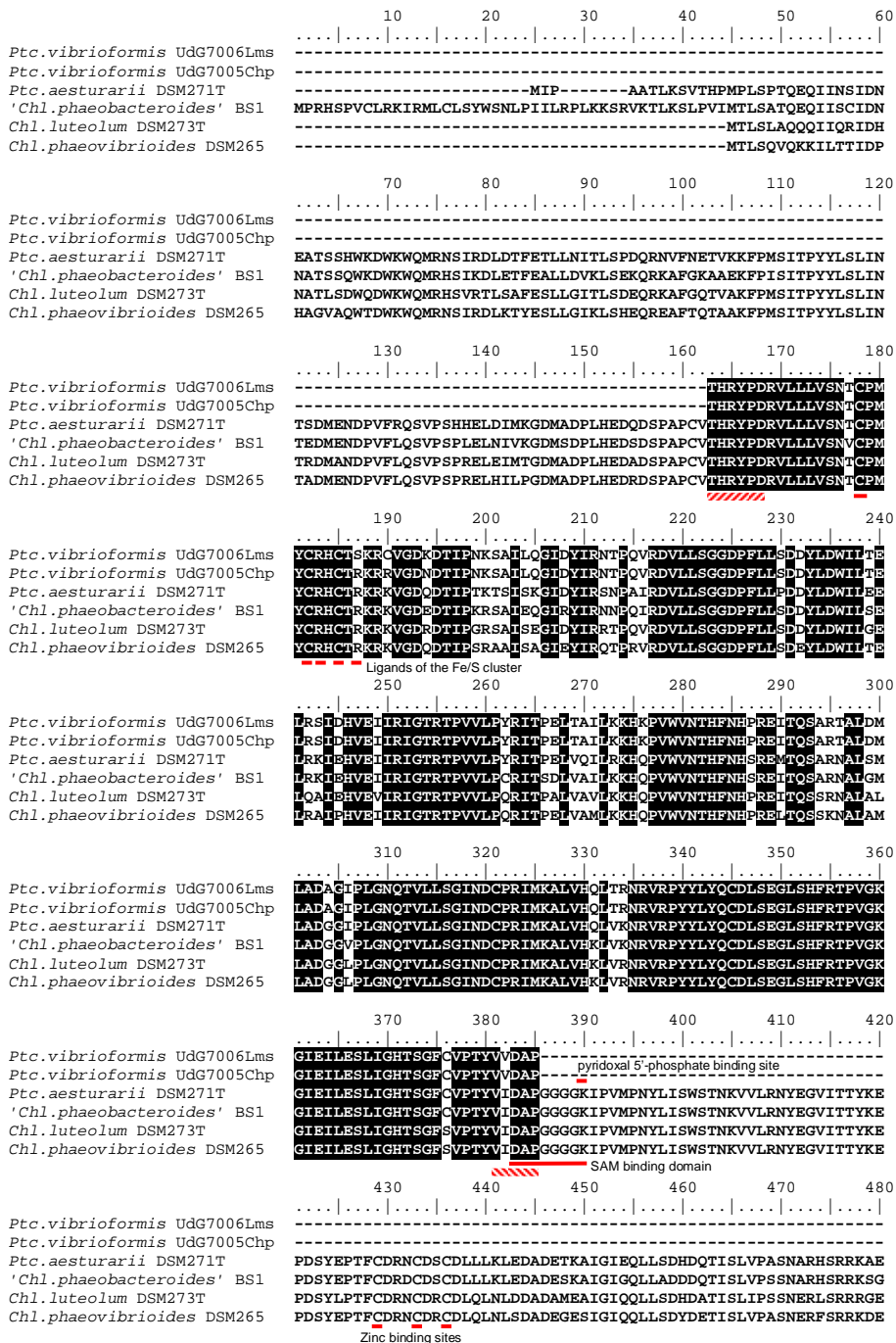


Figure C3-18. Alignment of partial amino acid sequences of putative lysine-2,3-aminomutase from the isolates UdG7006Lms and UdG7005Chp with the orthologs found in several genomes of halophilic GSB. Shaded lines indicate the regions corresponding to primer annealing. Solid lines indicate characteristic amino acid residues binding the cofactor determined for the activity of the enzyme.

Tree reconstruction from putative lysine-2,3-aminomutase amino acid sequences does not reproduce current macro-phylogenetic relationships based on 16S rRNA genes (Figure C3-19; for comparisons Figure C3-20). Nevertheless, the tree presents a semi-conservative phylogenetic structure forming groups in which different species belonging to the same Class are mostly clustered together. As exceptions, members of δ -proteobacteria are largely widespread throughout the tree and neither *Methanococcoides burtonii* DSM 6242 nor *Methanoculleus marisnigri* JR1 affiliate with other *Methanomicrobia* with these orthologs. Homologous LAMG sequences could also be found within a single species of *Alkaliphilus metalliredigenes* QYMF, *Desulfotomaculum reducens* MI-1, *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4. These gene sequences have probably diverged by gene duplication and therefore they should be regarded as paralogous genes.

Interestingly, most of the species which have the two putative genes for NeABL synthesis have been found to be closely related according to LAMG sequences in a cluster that includes all the species known to accumulate NeABL. All of them diverge from a common branch in the tree, in spite of the high phylogenetic distance (according to 16S rDNA) between the different microbial groups, as for example between methanogenic archaea and GSB. However, they share some ecological and physiological traits, since all microorganisms are halophilic or halotolerant and strictly anaerobic. In addition, syntrophic interactions have been described between some of them: the *Pelobacter* species can ferment ethanol in syntrophic cooperation with methanogens (Bryant et al., 1967) and *Syntrophus aciditrophicus* degrades some organic compounds when growing in syntrophic association with hydrogen-using microorganisms such as methanogens or sulfate reducers (Jackson et al., 1999). The *Bacillus* species, harboring the two presumptive genes, formed a cluster equidistant to the other species with the two presumptive genes. This group is characterized by a facultatively aerobic metabolism and presents an ecological niche circumscription potentially different of strictly anaerobic ones, which could determine differentiated evolutionary patterns. Since phylogenetically divergent groups of microorganisms with the two putative genes for NeABL synthesis display strong sequence similarities in their lysine-2,3-aminomutase gene products, it would be reasonable to hypothesize that horizontal gene transfer events may have occurred along their evolutionary history.

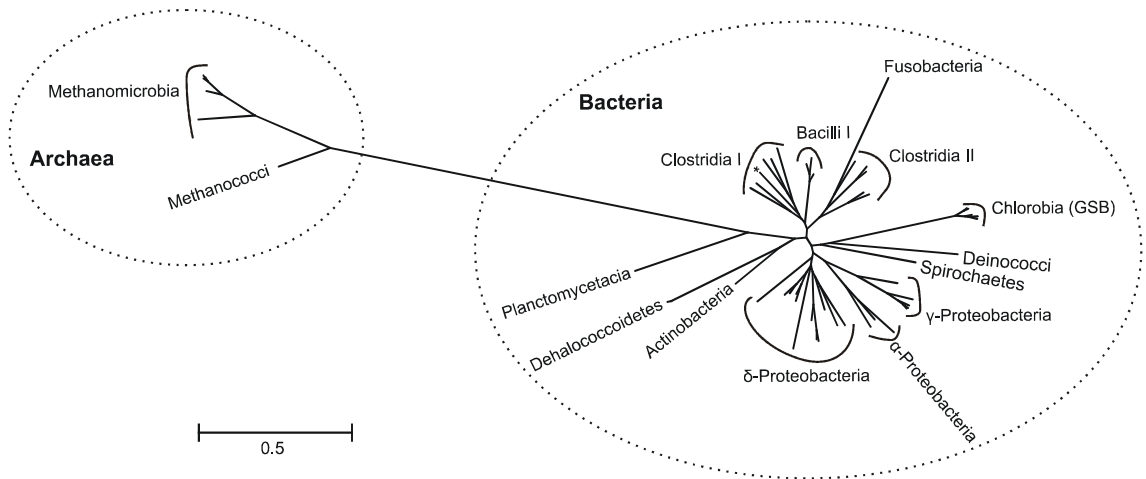


Figure C3-20. Schematic (unrooted) representation of phylogenetic relationships (16S rRNA gene) among different prokaryotes presenting orthologous genes encoding for putative *lysine 2,3 aminomutase*. The relationships are presented at the taxonomic level of Class. Refers to *Addenda C3-3* to see a complete list of species presenting orthologous genes encoding for putative *lysine 2,3 aminomutase*. A high phylogenetic divergence between those members of *Bacteria* and *Archaea*, as well as the paraphyletic origin of members of *Clostridia* (*Firmicutes*) and *Bacilli* (*Firmicutes*) (Wolf, 2004), can be noticed.

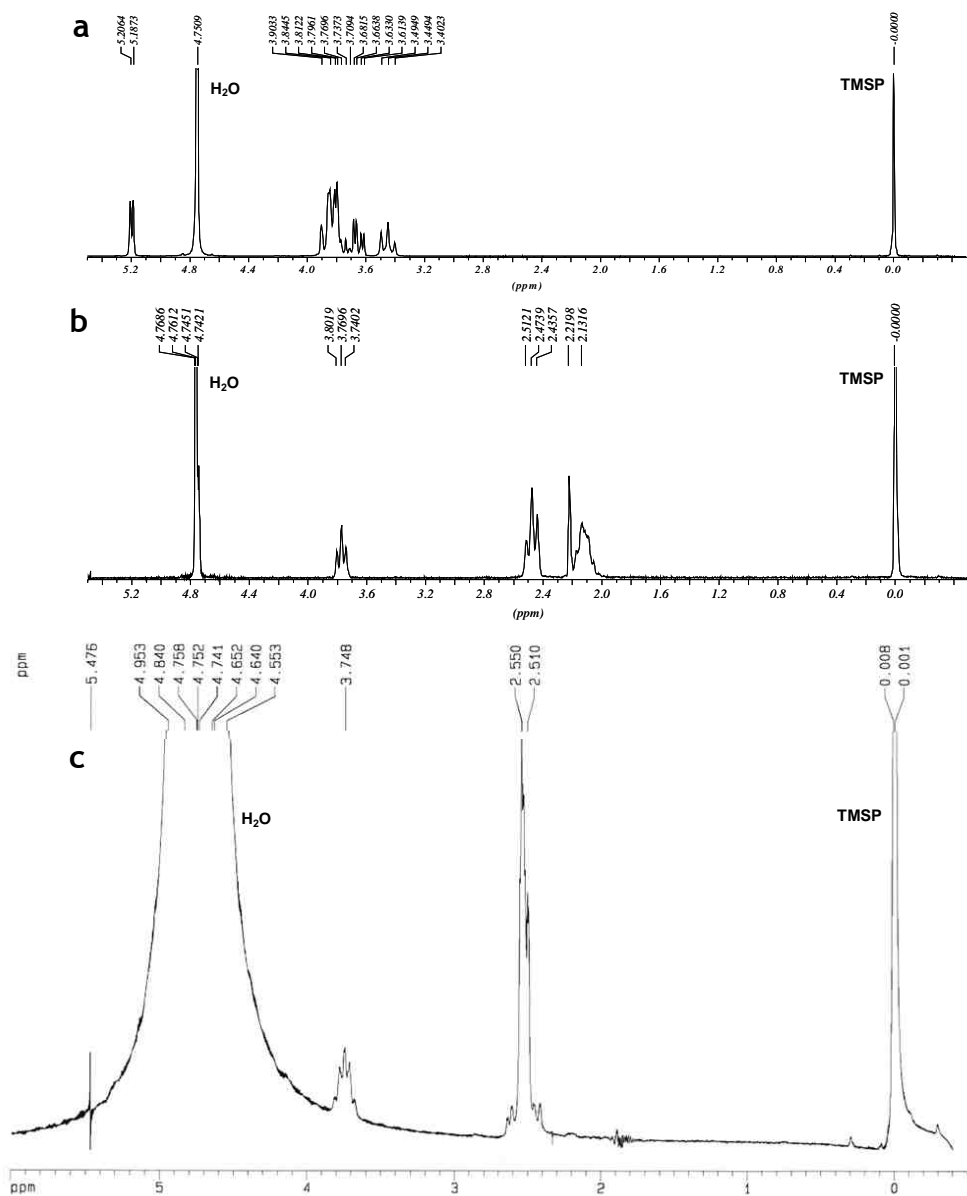
Acknowledgements

We would like to thank Dr. Matthias Kurz and Dr. Christian Dahl for their helpful support and instruction on degenerate-primer techniques; Marlene Stein for her skillful assistance in laboratory work from the Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie; Lluïsa Matas and Xavier Fontrodona, from the Technical Research Services of the University of Girona, for their valuable help during the NMR experiment as well as fruitful discussions. X. Triadó-Margarit was the recipient of a doctoral scholarship (2001 FI 00702) from the Government of Catalonia.

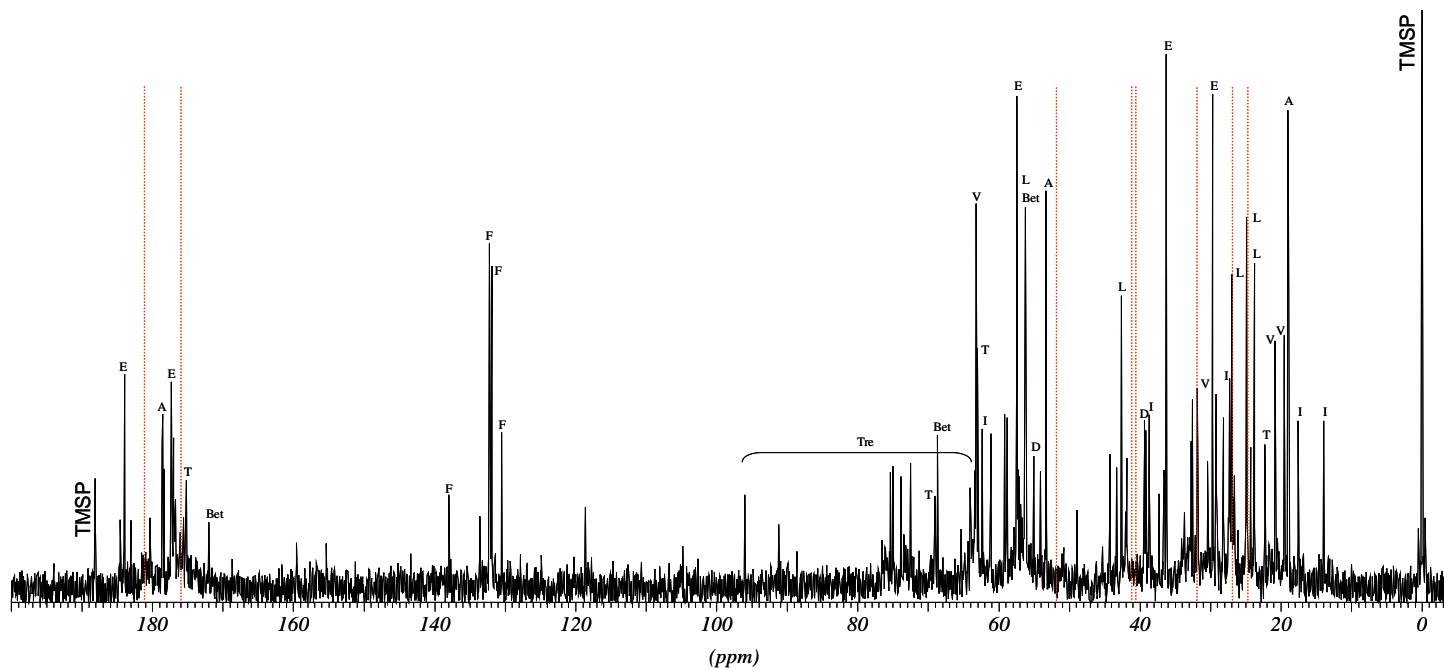
Addenda

C3 - Accumulation of N^ε-acetyl-β-lysine as an osmoadaptation strategy

Addenda C3-1. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of the standard molecules (recorded in D_2O as a solvent) of trehalose (*a*), glutamate (*b*) and β -glutamate (*c*).



Addenda C3-2. Natural abundance ^{13}C NMR spectrum (recorded in D_2O as a solvent) of Oxoid yeast extract. Dotted red lines represent characteristic chemical shifts for N(ϵ)acetyl- β -Lysine, which are absent in the spectrum. Letters represent international codes for amino acids; Bet, betaine; Tre, Trehalose.



Addenda C3-3. List of microorganisms presenting orthologous gene sequences encoding for putative *lysine 2,3 aminomutase*. *EC* Enzyme Commission number detailed in the sequence description, *aa* number of amino acid residues for predicted protein, *AT* presence or absence of orthologous gene sequence encoding for putative *β -lysine acetyltransferase* (usually these orthologs are located in the vicinities of putative *lysine 2,3 aminomutase* gene sequences). ⁽⁴⁾ Gene position in the complete genome of each microorganism.

Organism source lineage					Gene; locus tag	Protein description	EC	aa	acc. number	Gene position ^a	AT	
kindom	Phylum	Class	Order	Species / strain								
Archaea	Euryarchaeota	Methanococci	Methanococcales	<i>Methanococcus maripaludis</i> S2	KamA; MMP0861	Lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2	433	NP_987981	852237..853538	+	
		Methanomicrobia	Methanomicrobiales	<i>Methanoculleus marisnigri</i> JR1	MemarDRAFT_2272	Protein of unknown function DUF160	-	437	ZP_01391545	1054022..1055335	+	
			Methanosarcinales		<i>Methanococcoides burtonii</i> DSM 6242	Mbur_0274	Protein of unknown function DUF160	-	435	YP_565029	251519..252826	+
					<i>Methanosarcina acetivorans</i> str. C2A	MA3979	Lysine 2,3-aminomutase	-	419	NP_618848	4883154..4884413	+
					<i>Methanosarcina barkeri</i> str. fusaro	Mbar_A0670	Lysine 2,3-aminomutase	-	414	YP_304229	798061..799305	+
					<i>Methanosarcina mazei</i> Go1	MM0934	Lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2	419	NP_632958	1102502..1103761	+
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales unclassified	<i>Streptomyces vinaceus</i> ATCC 11861	vioP	Lysine 2,3-aminomutase	-	445	AAP92506	27303..28640	-	
				<i>Symbiobacterium thermophilum</i> IAM 14863	STH35	Lysine 2,3-aminomutase	-	448	YP_073864	44210..45556	-	
	Chlorobi	Chlorobia	Chlorobiales	<i>Chlorobium luteolum</i> DSM 273	Plut_1576	Protein of unknown function DUF160	-	438	YP_375473	1766019..1767335	+	
				" <i>Chlorobium phaeobacteroides</i> " BS1	Cpham1DRAFT_2179	Protein of unknown function DUF160	-	481	ZP_00532091	17041..18486	+	
				<i>Chlorobium phaeovibrioides</i> DSM 265	CvibDRAFT_1018	Protein of unknown function DUF160	-	441	ZP_00661171	143539..144864	+	
				<i>Prosthecochloris aestuarii</i> DSM 271	PaesDRAFT_1501	Protein of unknown function DUF160	-	450	ZP_00591649	65374..66726	+	
	Chloroflexi	Dehalococcoidetes		<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> 195	DET0221	L-lysine 2,3-aminomutase, putative/acetyltransferase, GNAT family	-	708*	YP_180969	212825..214951	+	
				<i>Dehalococcoides</i> sp. BAV1	DehaBAV1DRAFT_1145	Protein of unknown function DUF160	-	730*	ZP_01138444	261689..263881	+	
				<i>Dehalococcoides</i> sp. CBDB1	KamA; cdbb_A219	L-lysine 2,3-aminomutase homologue, probable frameshift	-	708*	YP_307378	195748..197874	+	
	<i>Deinococcus-Thermus</i>	Deinococci	Deinococcales	<i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300	Dgeo_0988	Protein of unknown function DUF160	-	483	YP_604457	1059124..1060575	-	
	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	<i>Bacillus anthracis</i> str. Ames	KamA; BA2300	L-lysine 2,3-aminomutase	-	473	NP_844685	2147642..2149063	+	
				<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10987	KamA; BCE_2334	L-lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2	473	NP_978644	2237415..2238836	+	
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579				BC_2251	L-lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2	473	NP_832014	2201018..2202439	+		
<i>Bacillus cereus</i> E33L				KamA; BCZK2079	L-lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2	473	YP_083670	2203403..2204824	+		
<i>Bacillus cereus</i> G9241				KamA; BCE_G9241_2268	L-lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2	473	ZP_00236699	104915..106336	+		
<i>Bacillus cereus</i> subsp. cytotoxis NVH391-98				Beer98DRAFT_2665	Protein of unknown function DUF160	-	472	ZP_01178593	93760..95178	+		
<i>Bacillus halodurans</i> C-125				BH2255	L-lysine 2,3-aminomutase	-	468	NP_243121	2381323..2382729	+		
<i>Bacillus</i> sp. NRRLB-14911				B14911_22782	L-lysine 2,3-aminomutase	-	495	ZP_01170701	11357..12844	+		

Addenda C3-3. (Continued).

Organism source lineage					Gene; locus tag	Protein description	EC	aa	acc. number	Gene position ^a	AT					
kindom	Phylum	Class	Order	Species / strain												
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str.168	KamA; BSU19690	L-lysine 2,3-aminomutase	degr. Lys	471	NP_389850	2138652..2140067	+					
				<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar israelensis ATCC 35646	RBTH_01472	L-lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2	202	ZP_00743973	(-)	+					
				<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar konkukian str. 97-27	KamA; BT9727_2083	lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2	473	YP_036410	2167260..2168681	+					
				<i>Bacillus weihenstephanensis</i> KBAB4	BcerKBAB4DRAFT_2934	Protein of unknown function DUF160	-	472	ZP_01184116	79862..81280	+					
		Clostridia	Clostridiales		Clostridiales	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> QYMF	AmetDRAFT_1209 / AmetDRAFT_2021	Protein of unknown function DUF160	-	422 / 414	ZP_00800922 / ZP_00800903	10867..12135 / 15068..16312	-			
						<i>Caldicellulosiraptor saccharolyticus</i> DSM8903	CsacDRAFT_1501	Protein of unknown function DUF160	-	407	ZP_00885076	7309..8532	-			
						<i>Carboxythermus hydrogeniformans</i> Z-2901	CHY_2479	putative L-lysine 2,3-aminomutase	-	411	YP_361273	2220067..2221302	-			
						<i>Clostridium difficile</i> QCD-32g58	CdifQ_02002451	hypothetical protein CdifQ_02002451	-	422	ZP_01230643	31696..32964	-			
						<i>Clostridium phytofermentans</i> ISDg	CphyDRAFT_1309	Protein of unknown function DUF160	-	393	ZP_01354039	25738..26919	-			
						<i>Clostridium</i> sp. OhILAs	ClosDRAFT_0916	Protein of unknown function DUF160	-	416	ZP_01361129	146938..148188	-			
						<i>Clostridium subterminale</i> SB4	kamA	L-lysine 2,3-aminomutase	-	416	AAD43134	(-)	-			
						<i>Clostridium tetani</i> E88		Lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2		Q896V8		-			
						<i>Desulfotobacterium hafniense</i> DCB-2	Dhaf_0147	lysine 2,3-aminomutase YodO family protein	-	413	ZP_01372297	7316..8557	-			
						<i>Desulfotobacterium hafniense</i> Y51	DSY4027	hypothetical protein DSY4027	-	413	YP_520260	4597787..4599028	-			
						<i>Desulfotomaculum reducens</i> MI-1	DredDRAFT_1109 / DredDRAFT_0127	Protein of unknown function DUF160	-	422 / 406	ZP_01148336 / ZP_01149424	64330..65598 / 38912..40132	-			
						Thermoanaerobacteriales	Thermoanaerobacter	tengcongensis	MB4	KamA2; TTE1204 / KamA; TTE0723	Lysine 2,3-aminomutase	-	419 / 417	NP_622830 / NP_622381	1203424..1204683 / 724887..726140	-
										Fusobacteria	Fusobacteria	Fusobacteriales	<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586	FN1866	Lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2
							<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>vincentii</i> ATCC 49256	FNV1027	Lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2			425	ZP_00144440	2562..3839	-
						Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales		<i>Rhodopirellula baltica</i> SH1	KamA; RB1214	Lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2		CAD71970	4160..5305

Addenda C3-3. (Continued).

Organism source lineage					Gene; locus tag	Protein description	EC	aa	acc. number	Gene position ^a	AT				
kindom	Phylum	Class	Order	Species / strain											
Bacteria	Proteobacteria	α -Proteobacteria	Rhodospirillales	<i>Gluconobacter oxydans</i> 621H	GOX0234	Lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2	356	AAW60017	249409..250479	-				
			Rhizobiales	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF 303099	ml11971	L-lysine 2,3-aminomutase	-	367	NP_103429	1621403..1622506	-				
				<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009	KamA; RPA2515	Lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2	363	CAE27956	66323..67414	-				
		γ -Proteobacteria	Enterobacteriales	Escherichia coli UTI89		yjeK; UTI89_C4744	Lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2	342	ABE10151	4646428..4647456	-			
					<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi str.CT18	yjeK; STY4693	conserved hypothetical protein	-	342	NP_458772	4555035..4556063	-			
					<i>Yersinia pestis</i> biovar Medievalis str. 91001	kamA; YP_0509	Lysine 2,3-aminomutase	-	342	NP_991902	545562..546590	-			
				Pseudomonadales	Vibrionales	<i>Psychrobacter arcticum</i> 273-4	kamA; Psyc_1679	Lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2	335	AAZ19527	2078442..2079449	-		
						<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6	VV11263	Lysine 2,3-aminomutase	-	340	NP_760192	1248251..1249273	-		
				δ -Proteobacteria	Bdellovibrionales	Desulfobacterales	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> HD100	kamA; Bd3344	lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2	428	CAE78150	129934..131220	-	
		<i>Desulfotalea psychrophila</i> LSv54	DP2159				L-lysine 2,3-aminomutase	-	439	YP_065895	2476800..2478119	+			
		<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G20	Dde_0189				Protein of unknown function DUF160	-	454	YP_386685	174319..175683	+			
		<i>Desulfuromonas acetoxidans</i> DSM 684	Dace_1088				Protein of unknown function DUF160	-	437	ZP_01313247	3647..4960	+			
		<i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA	kamA; GSU1754				Lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2	353	AAR35131	1916898..1917959	-			
		<i>Pelobacter carbinolicus</i> DSM 2380	Pcar_1401				probable L-lysine 2,3-aminomutase	-	457	YP_356817	1645986..1647359	+			
		<i>Pelobacter propionicus</i> DSM 2379	PproDRAFT_2337				Protein of unknown function DUF160	-	440	ZP_00676639	66549..67871	+			
		Myxococcales	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-C				Adeh_2548	protein of unknown function DUF160	-	375	YP_465755	2877465..2878592	-		
			<i>Myxococcus xanthus</i> DK1622				kamA; MXAN_4698	L-lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2	410	YP_632864	5886132..5887364	-		
			<i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3-1				STIAU_1839	L-lysine 2,3-aminomutase	-	378	ZP_01467275	5195..6328	-		
		Syntrophobacteriales	<i>Syntrophus aciditrophicus</i> SB				SYN_02634	L-lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2	486	YP_462858	2827849..2829309	+		
			<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> MPOB				SfumDRAFT_1005	Protein of unknown function DUF160	-	460	ZP_00667190	30967..32349	-		
		Spirochaetes	Spirochaetes				Spirochaetales	<i>Leptospira interrogans</i> serovar lai str. 56601	LB_298	Lysine 2,3-aminomutase	5.4.3.2	365	AAN51857	298418..299515	-

Addenda C3-4. List of microorganisms presenting orthologous gene sequences encoding for putative β -lysine acetyltransferase. EC Enzyme Commission number detailed in the sequence description, aa number of amino acid residues for predicted protein. ^(d) Gene position in the complete genome of each microorganism.

Organism source lineage					Gene; locus tag	Protein description	EC	aa	acc. number	Gene position ^d		
kindom	Phylum	Class	Order	Species / strain								
Archaea	Euryarchaeota	Methanococci	Methanococcales	<i>Methanococcus maripaludis</i> S2	yodP; MMP0862	GCN5-related N-acetyltransferase	-	274	NP_987982	853539..854363		
				<i>Methanomicrobium marisnigri</i> JR1	MemarDRAFT_2273	GCN5-related N-acetyltransferase	-	279	ZP_01391546	1055325..1056164		
		Methanosarcinales	Methanosarcinales	<i>Methanococcoides burtonii</i> DSM 6242	Mbur_0273	GCN5-related N-acetyltransferase	-	279	YP_565028	250683..251522		
				<i>Methanosarcina acetivorans</i> str. C2A	MA3978	acetyltransferase (GNAT) family protein	-	291	NP_618847	4882134..4883009		
				<i>Methanosarcina barkeri</i> str. Fusaro	Mbar_A0671	acetyltransferase (GNAT) family protein	-	325	YP_304230	799381..800358		
				<i>Methanosarcina mazei</i> Go1	MM0935	Beta-lysine acetyltransferase	-	271	NP_632959	1103966..1104781		
		Bacteria	Chlorobi	Chlorobia	Chlorobiales	<i>Chlorobium luteolum</i> DSM 273	Plut_1575	L-lysine 2,3-aminomutase, putative/acetyltransferase, GNAT family	-	311	YP_375472	1764949..1765884
						" <i>Chlorobium phaeobacteroides</i> " BS1	Cphamn1DRAFT_2181	GCN5-related N-acetyltransferase	-	278	ZP_00532093	19953..20789
						<i>Chlorobium phaeovibrioides</i> DSM 265	CvibDRAFT_1016	GCN5-related N-acetyltransferase	-	277	ZP_00661169	141273..142106
						<i>Prosthecochloris aestuarii</i> DSM 271	PaesDRAFT_1499	GCN5-related N-acetyltransferase	-	279	ZP_00591647	63090..63929
<i>Chloroflexi</i>	<i>Dehalococcoidetes</i>					<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> 195	DET0221	L-lysine 2,3-aminomutase, putative/acetyltransferase, GNAT family	-	708*	YP_180969	212825..214951
						<i>Dehalococcoides</i> sp. BAV1	DehaBAV1DRAFT_1145	Protein of unknown function DUF160	-	730*	ZP_01138444	261689..263881
						<i>Dehalococcoides</i> sp. CBDB1	KamA; cbdb_A219	L-lysine 2,3-aminomutase homologue, probable frameshift	-	708*	YP_307378	195748..197874

Addenda C3-4. (Continued)

Organism source lineage					Gene; locus tag	Protein description	EC	aa	acc. number	Gene position ^a
kindom	Phylum	Class	Order	Species / strain						
	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillus anthracis</i> str. Ames	BA2298	acetyltransferase, GNAT family	-	281	NP_844683	2145101..2145946
				<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10987	BCE_2332	acetyltransferase, GNAT family	-	281	NP_978642	2234873..2235718
				<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	BC2249	Beta-lysine acetyltransferase	2.3.1.-	299	NP_832012	2198358..2199257
				<i>Bacillus cereus</i> E33L	BCZK2077	acetyltransferase, GNAT family	-	281	YP_083668	2200862..2201707
				<i>Bacillus cereus</i> G9241	BCE_G9241_2265	beta-lysine acetyltransferase	-	281	ZP_00236696	108032..108877
				<i>Bacillus cereus</i> subsp. <i>cytotoxis</i> NVH391-98	Bcer98DRAFT_2667	GCN5-related N-acetyltransferase	-	284	ZP_01178595	97121..97975
				<i>Bacillus halodurans</i> C-125	BH2257	hypothetical protein BH2257	-	268	NP_243123	2383273..2384079
				<i>Bacillus</i> sp. NRRLB-14911	B14911_22772	Hypothetic Beta-lysine acetyltransferase	-	288	ZP_01170699	8999..9865
				<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	yodP; BSU19700	hypothetical protein BSU19700	-	275	NP_389851	2140096..2140923
				<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i> ATCC 35646	RBTH_02368	Beta-lysine acetyltransferase	2.3.1.-	218	ZP_00743528	(-)
				<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>konkukian</i> str. 97-27	BT9727_2081	acetyltransferase, GNAT family	-	281	YP_036408	2164720..2165565
				<i>Bacillus weihenstephanensis</i> KBAB4	BcerKBAB4DRAFT_2937	GCN5-related N-acetyltransferase	-	299	ZP_01184119	83056..83955
	<i>Proteobacteria</i>	<i>δ-Proteobacteria</i>	<i>Desulfobacterales</i>	<i>Desulfotalea psychrophila</i> LSv54	DP2160	hypothetical protein DP2160	-	294	YP_065896	2478085..2478969
			<i>Desulfovibrionales</i>	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G20	Dde_0188	hypothetical protein Dde_0188	-	298	YP_386684	173418..174314
			<i>Desulfuromonadales</i>	<i>Desulfuromonas acetoxidans</i> DSM 684	Dace_1087	GCN5-related N-acetyltransferase	-	278	ZP_01313246	2814..3650
			<i>Desulfuromonadales</i>	<i>Pelobacter carbinolicus</i> DSM 2380	Pear_1402	L-lysine 2,3-aminomutase, putative/acetyltransferase, GNAT family	-	278	YP_356818	1647364..1648200
			<i>Desulfuromonadales</i>	<i>Pelobacter propionicus</i> DSM 2379	PproDRAFT_2338	GCN5-related N-acetyltransferase	-	296	ZP_00676640	67855..68745
			<i>Syntrophobacterales</i>	<i>Syntrophus aciditrophicus</i> SB	SYN_02633	beta-lysine acetyltransferase	2.3.1.-	287	YP_462859	2829306..2830169

Addenda C3-6. Partial nucleotide sequence (**a**) of putative gene encoding for *lysine-2,3-aminomutase* in *Prosthecochloris vibrioformis* UdG7006Lms together with its deduced amino acid sequence. Alignment (**b**) of deduced partial *lysine-2,3-aminomutase* amino acid sequences obtained from two strains of *Ptc.vibrioformis*.

a

T H R Y P D R V L L L V S N T C P M	18
ACG CAC CGG TAT CCC GAC AGG GTA CTG CTC CTG GTC AGC AAT ACC TGC CCC ATG	54
Y C R H C T S K R C V G D K D T I P	36
TAC TGC CGC CAC TGT ACC AGC AAA CGT TGC GTT GGC GAT AAA GAC ACC ATT CCG	108
N K S A I L Q G I D Y I R N T P Q V	54
AAC AAA TCG GCA ATC CTG CAA GGC ATC GAC TAC ATC CGC AAC ACN CCC CAG GTA	162
R D V L L S G G D P F L L S D D Y L	72
CGT GAC GTC CTC CTG AGC GGA GGG GAT CCG TTC CTG CTG TCA GAC GAC TAC CTC	216
D W I L T E L R S I D H V E I I R I	90
GAC TGG ATC CTC ACA GAA CTG AGA AGT ATC GAC CAC GTT GAA ATT ATC CGT ATC	270
G T R T P V V L P Y R I T P E L T A	108
GGG ACT CGT ACC CCG GTT GTA CTC CCT TAC CGC ATC ACC CCG GAA CTG ACA GCT	324
I L K K H K P V W V N T H F N H P R	126
ATC CTC AAA AAA CAC AAG CCG GTC TGG GTC AAC ACC CAT TTC AAC CAT CCG CGG	378
E I T Q S A R T A L D M L A D A G I	144
GAA ATC ACC CAG TCA GCC CGC ACA GCG CTC GAC ATG CTT GCC GAT GCA GGC ATC	432
P L G N Q T V L L S G I N D C P R I	162
CCC CTC GGT AAC CAG ACA GTC CTG CTC TCC GGC ATC AAC GAC TGC CCG AGA ATC	486
M K A L V H Q L T R N R V R P Y Y L	180
ATG AAA GCG CTC GTC CAC CAG CTT ACA AGG AAC CGT GTG CGT CCA TAT TAC CTC	540
Y Q C D L S E G L S H F R T P V G K	198
TAC CAG TGC GAT CTT TCC GAA GGG CTA TCC CAC TTC AGA ACC CCT GTC GGC AAG	594
G I E I L E S L I G H T S G F C V P	216
GGC ATT GAA ATC CTC GAA AGC CTT ATA GGC CAT ACA AGC GGC TTC TGT GTC CCC	648
T Y V V D A P	223
ACC TAC GTC GTC GAC GCC CCC	669

b

1	10	20	30	40	50	60	70
UdG7006Lms	F H R Y P D R V L L V S N T C P M Y C R H C T S K R C V G D N D T I P N K S A I L Q G I D Y I R N T P Q V R D V L L S G G D P F L L S D D						
UdG7005Chp	F H R Y P D R V L L V S N T C P M Y C R H C T S K R C V G D N D T I P N K S A I L Q G I D Y I R N T P Q V R D V L L S G G D P F L L S D D						
80	90	100	110	120	130	140	
UdG7006Lms	Y L D W I L T E L R S I D H V E I I R I G T R T P V V L P Y R I T P E L T A I L K K H K P V W V N T H F N H P R E I T Q S A R T A L D M L A						
UdG7005Chp	Y L D W I L T E L R S I D H V E I I R I G T R T P V V L P Y R I T P E L T A I L K K H K P V W V N T H F N H P R E I T Q S A R T A L D M L A						
150	160	170	180	190	200	210	
UdG7006Lms	D A G I P L G N Q T V L L S G I N D C P R I M K A L V H Q L T R N R V R P Y Y L Y Q C D L S E G L S H F R T P V G K G I E I L E S L I G H T						
UdG7005Chp	D A G I P L G N Q T V L L S G I N D C P R I M K A L V H Q L T R N R V R P Y Y L Y Q C D L S E G L S H F R T P V G K G I E I L E S L I G H T						
220							
UdG7006Lms	S G F C V P T Y V V D A P						
UdG7005Chp	S G F C V P T Y V V D A P						

4. Discussió general i propostes de recerca

4. Discussió general i propostes de recerca

4.1. *Les poblacions de BVS en ambients salins eutrofitzats*

La caracterització limnològica de les llacunes (La Salada de Chiprana i La Massona) i de les comunitats de BFA que s'hi desenvolupen no és una característica inèdita del present treball, sinó que ja es va iniciar a la dècada dels anys 80 (Riera and Abella, 1986; Guerrero et al., 1987; Guerrero et al., 1991; Riera and Abella, 1991; Vidondo et al., 1993; Díaz et al., 1998; Alcorlo and Baltanás, 1999b; Vila et al., 2002); per contra, les dades presentades en el cas de la Playa són la primera descripció realitzada de les poblacions de microorganismes del sistema de pous construïts de les salines. Durant els primers treballs es va poder determinar la presència de comunitats denses de BFA entre les quals destacaven les poblacions de BVS (a voltes presentaven densitats considerables de l'ordre de $10^6 - 10^8$ cèl·lules·ml⁻¹) (Riera and Abella, 1986; Vila et al., 2002) - d'aquí va sorgir l'interès per a l'estudi d'aquests ambients en particular -. Si bé les descripcions anteriors s'havien realitzat en base a les observacions microscòpiques, espectrofotomètriques (en l'anàlisi dels pigments fotosintètics) i les derivades del cultiu de laboratori, l'aplicació de les tècniques moleculars basades en l'anàlisi del 16S rDNA (PCR-DGGE) s'ha realitzat per primera vegada i de manera exhaustiva, en els ambients citats, a partir d'aquest treball; en tant que permetia una millor resolució en l'aproximació a la riquesa específica de les comunitats de BVS.

En el transcurs dels diferents mostratges, a diferència de períodes anteriors, les comunitats de BVS van presentar densitats molt baixes, indetectables per mitjà de mètodes directes (observacions microscòpiques i macroscòpiques) o per altres mètodes indirectes de notable sensibilitat com ara les tècniques espectrofotomètriques (HPLC). D'aquesta manera els filotips detectats formen part de poblacions poc denses, latents, les quals podrien proliferar (fins assolir densitats importants) en presència d'unes condicions més adequades (llum, anòxia i sulfhídric), com les imposades en el cultiu d'enriquiment. Tot i així, el qualificatiu de latent s'atribueix en base a l'accepció més general del mot ("que existeix sense manifestar-se"), en contraposició al predomini de les poblacions de BVS observat en aquests ambients durant estadis anteriors (Riera and Abella, 1986; Vila et al., 2002), i amb independència de l'activitat individual de les cèl·lules. És en aquesta última observació on és necessària la

distinció entre el concepte de cèl·lula latent (relatiu a una activitat metabòlica baixa o inexistent, en qualitat de dorment) i el concepte de població latent que es pot entendre com a un romanent d'estadis anteriors, durant els quals es presentaven les condicions necessàries per al seu desenvolupament, i amb una taxa de renovació baixa que manté la població a densitats baixes. Per altra banda, es podria desestimar la possibilitat de detecció de no viables (en mostres d'aigua) si es considera que la persistència del DNA es restringeix als dies següents o unes poques setmanes després de la mort cel·lular (Nocker and Camper, 2006). Alhora, ha estat possible enriquir diferents representants de la comunitat de BVS a partir dels cultius de laboratori.

En un sentit més estricte, la utilització d'aquest qualificatiu (poblacions latents) hauria d'estar suportada per dades quantitatives (del nombre de bacteris i de l'activitat), i evidentment amb una tècnica prou sensible, és a dir, amb el llindar mínim de detecció prou baix per poder detectar les poblacions de BVS presents; en aquest sentit, una alternativa metodològica per a la quantificació a partir de les mostres ambientals podria passar per la utilització de les tècniques moleculars basades en l'estudi del DNA, concretament l'aproximació basada en la utilització de la PCR a temps real (*Real Time PCR*) per a l'estimació del nombre. Per a la determinació de l'activitat (metabòlica) de la població o poblacions objectes d'anàlisi caldria contemplar també algunes de les seves variants metodològiques: com ara la RT-qPCR (*Reverse Transcriptase_Quantitative PCR*) en la mesura del nivell d'expressió gènica (m-RNA) d'algun dels gens clau en el metabolisme fotosintètic (alternativament relacionat amb la síntesi de pigments o amb els donadors d'electrons); alhora, podria ésser també una opció viable realitzar aquesta aproximació en base a la quantificació dels nivells de rRNA, si es té en compte que la quantitat de rRNA varia en funció de la taxa de creixement (Amann, 1995). D'aquesta manera, es podria millorar la sensibilitat de la detecció en disposar d'un major nombre de dianes inicials.

D'altra banda, la quantificació per mitjà de tècniques d'hibridació *in situ* amb sondes fluorescents (FISH) podria esdevenir una alternativa metodològica a la plantejada anteriorment (PCR a temps real), tot i que aquesta elecció podria comportar altres limitacions (potser més), ja que la detecció/recompte de cèl·lules pot estar condicionada per la baixa densitat i per la baixa

activitat/taxa de creixement que se suposa que tenen aquestes poblacions. Es poden enumerar diferents factors - majoritàriament recollits en l'extensa revisió que va realitzar Amann i col·laboradors (1995) sobre aquesta metodologia -, que podrien tenir un paper advers en l'assoliment de l'objectiu últim, la determinació del nombre de bacteris. En primer lloc, cal considerar la dificultat per poder detectar cèl·lules a densitats inferiors a 10^5 cèl·lules/mL de la població o poblacions objecte d'estudi (si es considera un volum de mostra estàndard de 10 μ L). Per aconseguir aquestes densitats a la mostra analitzada és necessari realitzar un procés de concentració de la mostra original, que pot requerir, per tant, uns volums molt importants (fins a 10 L de mostra original si es consideren densitats inferiors a 10^2 cèl·lules/mL) i la combinació de diferents tècniques de filtració (tangencial i de membrana). Tot i l'elevada sensibilitat que presenta la tècnica de FISH, el possible efecte d'ombra de la microbiota acompanyant és més que probable, sobretot en les mostres en les quals ha estat possible observar densitats elevades d'altres poblacions de microorganismes fotosintètics (BPS en el cas de la llacuna de La Playa com a exemple més destacat o microorganismes fotosintètics oxigènics en altres casos).

En segon lloc, caldria considerar els problemes relacionats amb la baixa intensitat de senyal, bé per un nombre baix de dianes (ribosomes), per una accessibilitat insuficient de les mateixes i/o per problemes derivats del procés d'optimització del mètode (disseny de sondes, establiment de les condicions d'hibridació, etc.). És en el primer dels factors enumerats anteriorment on podem trobar una de les principals limitacions, en tant que la concentració intracel·lular de rRNA i la taxa de creixement són dos paràmetres correlacionats. Així, generalment una taxa de creixement baixa de les poblacions es pot relacionar amb un contingut baix de rRNA, afectant a la qualitat del senyal. Aquest cas podria ben ser el d'unes poblacions persistents (latents) en unes condicions ambientals desfavorables (en el cas dels BVS, per una baixa intensitat de llum, absència o concentracions molt baixes de compostos reduïts del sofre, o en una situació de competidor feble).

D'aquesta manera, i amb la finalitat d'incrementar la sensibilitat de la tècnica, caldria utilitzar necessàriament la variant metodològica del *CARD-FISH* (*Catalyzed Reporter Deposition-FISH*), un mètode més ràpid i menys

susceptible als problemes d'especificitat que presenten altres mètodes indirectes utilitzats amb la mateixa finalitat (com ara els mètodes d'immunofluorescència). Aquesta variant permet augmentar el contrast quan la mostra presenta un fons autofluorescent o una elevada proporció de cèl·lules amb capacitat autofluorescent (com és el cas dels microorganismes fotosintètics).

Finalment es pot valorar *a priori* que, si bé la utilització de la PCR a temps real (*Real Time PCR*) comporta algunes limitacions, com ara les intrínseques al procés d'amplificació (possibilitat de formació de quimeres), aquesta aproximació està exempta de les limitacions (en la detecció) relacionades amb la baixa activitat i/o baixa taxa de creixement de les poblacions, (que es tradueix en una baixa proporció de dianes de rRNA) observades amb la tècnica d'hibridació *in situ* amb sondes fluorescents (FISH) en l'estimació del nombre de bacteris. Tanmateix, l'elevat nivell de concreció que planteja aquesta pregunta ecològica (estimació del nombre de bacteris i de l'activitat) requeriria un treball molt profund de desenvolupament de les eines metodològiques necessàries per assolir el propòsit, que no es veuria recompensat per la millora aportada en el coneixement d'aquestes poblacions. Cal considerar també que, en qualitat de poblacions latents, la seva incidència en la dinàmica dels processos biogeoquímics és mínima.

En l'anàlisi de la riquesa específica de BVS en els ambients d'estudi ha estat possible descriure una varietat de filotips notable si considerem conjuntament els resultats obtinguts a partir dels diferents mostratges. Per contra, en les mostres obtingudes en un mateix mostratge generalment s'ha observat una tendència a la uniformitat dels filotips detectats (veure capítol I de resultats i discussió) amb independència de l'origen de la mostra (aigua o sediment) o fondària. D'aquesta manera, es pot intuir una certa dinàmica de substitució en el tipus de població dominant en cadascun dels períodes (fenomen principalment observat en la llacuna de la Massona) que es pot relacionar, tot i les baixes densitats, amb l'esdeveniment de processos de competència entre aquestes poblacions. Tot i així, cal tenir present que en algunes ocasions la conformació particular del gradient vertical de conductivitat (relatiu a salinitat) ha permès observar una selectivitat en la distribució dels filotips, en tant que la salinitat pot esdevenir un factor selectiu per les espècies adaptades

a un nínxol particular; diferenciant espècies pròpiament d'aigua dolça, d'aquelles que poden tolerar una determinada proporció de sals o les que són estrictament halòfiles. D'aquesta manera, la tolerància a la salinitat és un caràcter que es pot inferir a partir de les condicions imperants en el medi. Malgrat que la densitat de les poblacions de BVS en els ambients estudiats ha estat baixa, en relació a períodes anteriors, les conseqüències derivades d'aquest condicionant ambiental s'han pogut detectar.

Hi ha diferents factors ambientals que poden restringir el desenvolupament d'aquestes poblacions en els seus hàbitats naturals, i per extensió a la resta d'integrants de la comunitat de fotosintètics anoxigènics: factors meteorològics, antropogènics i d'altres que responen a característiques singulars de l'ambient.

L'eutrofització d'origen cultural, es podria considerar el factor principal pel qual es donaria un desenvolupament escàs de les poblacions de BFA en els sistemes de la Massona i la “Salada de Chiprana”, tot i que per l'orientació de l'estudi (emmarcat en la descripció de la riquesa específica de BVS i la discussió taxonòmica) aquesta consideració es formula a partir de l'observació de les conseqüències derivades de l'eutrofització en els sistemes i no pas a partir de l'anàlisi de l'estat tròfic. Per contra, la baixa densitat de les poblacions de BVS en els pous construïts de la llacuna de “La Playa” es podria atribuir a fenòmens naturals que situarien els BVS en qualitat de competidor feble respecte les poblacions de BPS, les quals hi predominen amb claredat.

En el cas de la llacuna la “Salada de Chiprana” la discussió entorn de l'eutrofització pren un caire més especulatiu per la manca de dades de camp durant l'últim període de transició barreja-estratificació on es trobava un màxim de concentració d'oxigen per sota de la haloclina; situació, en part, raonable si considerem que l'objectiu principal del treball es cenneix a l'estudi de bacteris fotosintètics anoxigènics, i concretament els BVS que, contràriament a les condicions observades, necessiten un ambient reduït. En el cas de la llacuna de la Massona, ja en els primers estudis, al principi de la dècada dels 80, s'apuntava l'eutrofització com a la causa més important de la escassa penetració de la llum registrada, la qual cosa també tenia efectes en el

balanç tèrmic global de la llacuna i de retruc en el seu comportament (Armengol et al., 1983). En estudis posteriors de la comunitat de BFA en aquest ambient (període 1985-1986) (Riera and Abella, 1986) es va poder assenyalar que la qualitat de llum era el principal determinant de la composició d'espècies de bacteris fototròfics, encara que en aquests temps la llum no era quantitativament limitant pel desenvolupament de les poblacions de BVS.

Els factors implicats en la limitació del creixement de les poblacions de BVS, que poden alhora fer-se extensius a d'altres membres de la comunitat de fotosintètics anoxigènics, no impliquen en si una pèrdua de la riquesa específica del sistema (les diferents poblacions es mantenen en qualitat de latents) però sí que representen una pèrdua en l'esdeveniment de determinades transformacions derivades del seu metabolisme (causant una alteració de la dinàmica dels processos biogeoquímics desenvolupada anteriorment). D'aquesta manera i en el context de la comunitat de microorganismes podem parlar d'una pèrdua en la diversitat funcional i de les relacions inter- i intra-específiques que es donen entre els membres de la comunitat de BFA.

Les observacions derivades d'aquest treball, tot i no estar orientat a l'anàlisi de l'estat tròfic del sistema, indiquen que els aports de nutrients (provinents principalment de l'activitat agrícola) podrien ésser encara importants i per tant caldria desenvolupar accions correctores addicionals per garantir la regulació de la seva entrada, per així minimitzar els efectes derivats de l'eutrofització. En ambdós casos caldria considerar l'opció de construcció d'un sistema d'aiguamolls de nova creació per a l'acció de filtratge (biològic) a les proximitats del sistema per tal d'interceptar i a la vegada netejar els aports de rec abans de ésser reconduïts a la llacuna.

4.2. Efectes de la metodologia en l'estimació de la diversitat de BVS

L'aproximació molecular basada en PCR-DGGE utilitzada per a la descripció de la riquesa específica de la comunitat de BVS ha estat una bona solució si considerem la baixa densitat d'aquestes poblacions en els seus ambients durant els períodes estudiats. Donada aquesta situació, cap altre aproximació s'hauria mostrat tant resolutiva com la utilitzada, ja que l'obtenció de resultats en la majoria dels casos està condicionada per un llindar mínim de detecció superior al que presenta aquesta tècnica. Tot i així, també ha estat possible observar la limitació de la tècnica alhora de detectar algunes poblacions de BVS que es trobarien en molt baix nombre i que per altra banda s'han pogut detectar a partir del cultiu d'enriquiment. En l'estudi de les comunitats microbianes complexes s'ha demostrat que certes seqüències del gen 16S rRNA poden ésser únicament detectades per la tècnica de PCR-DGGE quan representen el 9% del total de DNA motlle (Gich, 2001). Per tant, es limita la detecció a les poblacions predominants a cada moment i situació particular de l'ambient (Casamayor et al., 2000).

L'aproximació basada en el cultiu ha contribuït positivament en la descripció de les poblacions presents en els ambients, si bé hi ha alguns filotips que presentarien una elevada cultivabilitat. Així, entre els diferents filotips detectats es podria considerar que aquells que corresponen a l'espècie *Prosthecochloris vibrioformis* serien més fàcilment recuperats en cultiu, ja que aquesta ha estat l'espècie predominant en els cultius d'enriquiment. Per aquest motiu, sembla òbvia la puntualització entorn la necessitat de diversificar les estratègies de cultiu d'enriquiment si es vol aconseguir una millor aproximació a la riquesa específica real i/o recuperació en cultiu de les espècies presents. Caldria tenir en compte així: la utilització de diferents condicions d'intensitat de llum, diferents concentracions de sulfhídric, un rang més ampli de concentracions de sals (des de absència de sals fins a concentracions hipersalines); alhora, caldria considerar la utilització d'aigua de l'ambient (esterilitzada per filtració) o extractes minerals del sediment per així reproduir més fidelment les condicions ambientals, en tant que es pretén complementar el medi de cultiu amb els metabòlits (encara que desconeguts) que poden afavorir el desenvolupament dels filotips no cultivats.

Complementàriament, durant el treball també s'ha assajat l'efecte de l'addició de suplementes de soluts compatibles en el medi (1mM concentració final) durant el procés d'enriquiment. En aquests experiments no es van observar diferències substancials en la composició d'espècies dels enriquiments, però sí que es va detectar que s'afavoria el desenvolupament de les que es trobaven regularment en l'enriquiment (principalment *Ptc. vibrioformis* i *Chl. phaeovibrioides*). D'aquesta manera es van obtenir densitats més grans (respecte les observades en els controls) quan s'afegia ectoïna, manitol o trehalosa en el medi. Tot i així, es desconeix el possible paper d'aquests compostos una vegada transportats a dins la cèl·lula, perquè poden desenvolupar la funció de solut compatible però també podrien servir de font de carboni o de nitrogen (Welsh, 2000; Vargas et al., 2006).

Així, amb un ventall d'estratègies d'enriquiment més ampli es podria afavorir l'obtenció d'aïllats en cultiu pur (i en el seu defecte, d'enriquiment) dels filotips nous (halotolerants) descrits en aquest treball. Aquest punt esdevé un dels objectius més interessants en l'estudi del grup de BVS per a la realització de posteriors treballs, ja que d'aquesta manera es podria dur a terme la caracterització fisiològica dels aïllats i les dades obtingudes es podrien comparar amb d'altres ja conegudes d'espècies aïllades d'ambients salins. D'aquesta manera es podrien aportar més dades interessants en l'estudi de la significació taxonòmica dels caràcters fenotípics i estudiar la relació entre aquests caràcters i l'estructura filogenètica del grup. La identificació d'espècies halotolerants per mitjà de l'addició de sals en mostres d'ambients d'aigua dolça podria ésser un altre vessant metodològic en aquest tipus d'estudis.

El treball desenvolupat per a la caracterització dels aïllats en cultiu pur permet intuir la presència d'una diversitat d'ecotips que ha estat subestimada en la descripció de les comunitats de BVS. En essència, la diversitat de morfotips que es poden descriure en relació al contingut pigmentari, i el comportament en estrès salí observat entre els diferents aïllats és elevada dins els diferents representants aïllats de l'espècie *Prosthecochloris vibrioformis*. El millor exemple el podem trobar entre les soques UdG7009Lms i UdG7010Lms, aïllades del mateix ambient i de la mateixa mostra, les quals presenten una seqüència del 16S rDNA pràcticament idèntica, amb un comportament

electroforètic (de fusió) a la DGGE idèntic, però amb diferències fenotípiques observables (morfologia, composició de pigments i requeriments de sals) (veure capítol II de resultats i discussió; taula C2-1 i figures C2-1, C2-2). Aquests aïllats podrien representar poblacions diferenciades amb diferents adaptacions determinades genèticament i probablement ocupar nínxols ecològics diferenciats. Aquesta hipòtesi podria ser extensible també a d'altres filotips, tot i que es fa necessari disposar de diferents soques en cultiu d'aquests filotips per corroborar-ho.

4.3. Classificació taxonòmica versus classificació filogenètica. ***Consideracions per a la classificació dels Bacteris Verds del Sofre***

Les topologies obtingudes en les anàlisis de l'afiliació filogenètica de les seqüències del 16S rDNA i l'aproximació realitzada en l'anàlisi de gens concatenats (a partir dels productes gènics de *fmoA*, *pscB*, *bchG* i *bchU*) ens permeten considerar que l'estructura descrita en el context de la taxonomia filogenètica, basada en les seqüències dels gens del 16S rRNA i *fmoA* i suportada per el contingut G + C (Imhoff, 2003) presenta una base molt consistent. Així, en ambdós tipus d'anàlisis s'ha obtingut una estructura general de la topologia similar, amb 3 branques filogenètiques principals corresponents als 3 gèneres i 4 grups filogenètics descrits dins del grup.

Malgrat aquesta estructura constant i la bona correlació de les dades genètiques, la majoria de caràcters fenotípics no presenten significació taxonòmica, observació que ja es va formular en els inicis dels treballs filogenètics (en base al 16S rDNA) dels BVS; en el primer treball realitzat amb un nombre representatiu de la diversitat d'espècies del grup (Overmann and Tuschak, 1997) ja es va poder apuntar que caràcters com la formació de vesícules de gas, composició de pigments i morfologia cel·lular no reflectien les relacions genètiques existents entre les soques. Aquest pensament ha estat mantingut en treballs posteriors (Figueras et al., 1997; Mendez-Alvarez et al., 2001; Alexander et al., 2002; Figueras et al., 2002; Vila et al., 2002; Garcia-Gil et al., 2003; Imhoff, 2003). En el present sistema de classificació encara es considera, però, els requeriments de sals com a un dels caràcters fenotípics amb significació taxonòmica (Imhoff, 2003). No obstant, els resultats obtinguts en aquest treball afegeixen més dubtes en la versemblança d'aquest caràcter en el context de la classificació actual del grup (taxonomia-

filogenètica). D'aquesta manera, considerant les diferents observacions experimentals (mostres naturals i cultius de laboratori), ha estat possible definir nous filotips dins del grup, que presentarien una característica inèdita si considerem la seva afiliació filogenètica: corresponen a bacteris halotolerants o halòfils (en definitiva, que es poden desenvolupar en presència de sals i que per tant disposen de les capacitats metabòliques necessàries per a l'osmoadaptació) estretament relacionats amb espècies considerades d'aigua dolça (limnòfiles). Concretament, els nous filotips han quedat afiliats dins les branques filogenètiques definides per les espècies *Cba. limnaeum* DSM 1667^T (grup 4b), *Cba. thiosulfatophilum* DSM 249^T (grup 4b), *Chl. limicola* DSM 245^T (grup 3b). També cal tenir en compte un nou filotip dins de la filogènia dels BVS, detectat al pou de la Playa I i a la llacuna de Es Cibollar, que com a parent més proper presentaria un epibiont no cultivat del consorci fotosintètic "*Chlorochromatium magnum*" filomorfortip E. La seva naturalesa, de vida lliure o epibiont, constitueix un dubte interessant si es té en compte que no existeix cap evidència de la presència de consorcis fotosintètics en ambients salins (Frostl and Overmann, 2000; Glaeser and Overmann, 2004; Vogl et al., 2006). En definitiva, les dades aportades permetrien considerar que si bé existeixen unes branques filogenètiques definides per als membres halòfils del grup (el gènere *Prosthecochloris* corresponent al grup 1, els vibris del gènere *Chlorobium* corresponents al grup 2, les espècies incloses dins el grup 4a del gènere *Chlorobaculum* i el representant conegut del gènere *Chloroherpeton* que defineix el grup 5), la diversitat d'organismes halotolerants o halòfils no estaria només restringida a aquests grups sinó que es podria fer extensiva a altres branques (grups 3b i 4b) on només s'hi ha descrit espècies d'aigua dolça.

Amb el desajust existent entre les relacions genètiques i el caràcters fenotípics s'evidencia una situació ja coneguda en el context de la taxonomia del grup: és comú trobar heterogeneïtat de caràcters fenotípics entre filotips similars i similituds entre filotips distants. Aquesta situació es pot entendre com al resultat de l'esdeveniment de múltiples processos de transferència lateral de gens entre els diferents membres del grup, com ja apunten treballs recents (Bryant and Frigaard, 2006); alhora que es podria considerar la pèrdua o inactivació de marcadors genètics implicats en l'expressió de caràcters fenotípics de significació ecofisiològica, és a dir que determinen la pèrdua

d'una determinada capacitat metabòlica relacionada amb un caràcter morfo- i/o fisiològicament contrastable. D'aquesta manera, les bases plantejades en el context de la taxonomia filogenètica, en la qual el marcador de referència és el 16S rDNA, denoten unes limitacions evidents en un nivell d'aproximació microfilogenètic (relacions dins del grup), per les raons exposades anteriorment. Qualsevol taxonomia basada en dades filogenètiques hauria de mostrar una bona consistència en relació als caràcters fenotípics utilitzats en la classificació (Vandamme et al., 1996). Tanmateix, aquest marcador resulta molt útil alhora de contextualitzar les capacitats fisiològiques dels filotips detectats en un nivell d'aproximació macrofilogenètic (treballs basats en l'estudi de categories taxonòmiques d'ordre superior), ja que ens situa en un grup fisiològicament ben definit (fotolitoautotrofs anaerobis estrictes) i d'una versatilitat metabòlica molt limitada. A partir d'aquesta consideració, qualsevol tipus d'aproximació polifàsica, en tant que elabora una classificació a partir de la utilització conjunta de diferents marcadors genètics i diferents caràcters fenotípics, podria resultar amb un problema similar al plantejat. Si bé la utilització del 16S rDNA ens permet determinar l'afiliació filogenètica d'un determinada seqüència ambiental o un cultiu, la informació relacionada amb la seva autoecologia requereix anàlisis i observacions complementàries focalitzades en l'estudi de les capacitats fisiològiques i/o del nínxol ecològic dels membres objecte d'estudi.

Els criteris utilitzats regularment per a la divisió dels diferents tàxons - generalment s'accepta el 97% de similitud de seqüència del 16S rDNA com a valor de tall absolut per a la circumscripció de les espècies (Rosselló-Mora and Amann, 2001) - no s'han aplicat objectivament per alguns dels casos en el sistema de classificació reformat (Imhoff, 2003). Un dels exemples especialment rellevants és el que s'observa entre les espècies *Cba. parvum* DSM 263^T i '*Cba. chlorovibrioides*' UdG6026. Val a dir que aquesta última ha estat proposada com a soca tipus en substitució del cultiu DSM 1377, que no es troba disponible (Imhoff, 2003). La distinció d'aquestes dues espècies havia estat basada anteriorment en relació a les diferències de mida (Figueras et al., 1997), que en alguns casos és només de 0,1 µm. Així, la diferència és massa petita per no estar subjecte a l'influència de les condicions de creixement i l'error experimental (Mendez-Alvarez et al., 2001). Concretament, els valors de similitud observats entre les seves seqüències del 16S rDNA és del 99.10%, i la variació del contingut de G + C entre els

representants analitzats supera escassament el 2.5%; aquestes diferències (morfològiques i genètiques) no són suficients per poder-les considerar dues espècies diferenciades. Aquestes observacions ja van ésser formulades anteriorment per Figueras (1997) i Méndez-Álvarez (2001) però no han estat considerades alhora de reformar el sistema de classificació del grup, dut a terme per Imhoff (2003).

Per altra banda, la terminologia adoptada del sistema de classificació anterior en l'actual aporta informació fenotípica que pot ésser rellevant per la soca de referència, però no és en alguns casos representativa de les soques o filotips identificats dins aquests grups. En conseqüència, els termes “*phaeovibrioides*” (de la terminologia grecoromana es pot traduir com a “marró, forma de vibri”), “*limicola*” (“habitant dels fangs o llots” de llacs), “*chlorovibrioides*” (“vibri verd-i-groc”), “*luteolum*” (“groguenc”), “*limnaeum*” (“pertanyent o que viu als llacs”) aporten informació relacionada amb el contingut de pigments, morfologia o d'hàbitat que pot no ésser significativa per a la totalitat dels seus membres. D'aquesta manera caldria substituir aquests termes per d'altres independents de la diversitat de característiques observades entre les soques d'una espècie i a la vegada complementar la designació de les diferents soques amb els descriptors que són importants en la circumscripció del seu nínxol ecològic i que com ja s'ha comentat no es poden deduir a partir de l'afiliació filogenètica.

Finalment cal tenir en compte que l'estructura filogenètica del grup no es pot considerar complerta ja que hi ha encara diferents espècies observades amb anterioritat a la implementació dels estudis genètics, de les quals s'han perdut els seus cultius i no s'han tornat a aïllar. Aquestes descripcions corresponen a les espècies *Anchalochloris perfilievii*, *Pelodictyon phaeum*, *Prosthecochloris phaeoasteroidea* i els epibionts del consorci fotosintètic *Pelochromatium roseo-viride*, ja incloses en les descripcions que apareixen en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Overmann, 2001), com també d'altres: *Chloroherpeton limnophilum* (Eichler and Pfennig, 1988), *Pelodictyon aggregatum* (Gorlenko, 1988) i els epibionts del consorci *Cylindrogloea bacterifera*, el qual només ha estat observat una vegada (Trüper and Pfennig, 1971). Cal, per tant, treballar en l'obtenció d'aquest i altres cultius per ampliar el coneixement actual en el marc de la classificació i fisiologia del grup de BVS.

4.4. Idoneïtat de N^o-acetil-β-lisina per a les estratègies osmoadaptatives dels BVS en ambients extrems. Noves perspectives en l'estudi dels BVS

El treball desenvolupat en aquest estudi dels BVS en ambients salins ha permès conèixer diferents aspectes relacionats amb la riquesa específica d'aquestes poblacions en els ambients naturals, discutir diferents aspectes de la classificació del grup i alhora determinar un tipus d'estratègies relacionades amb l'osmoadaptació (el tipus dels soluts compatibles acumulats). És a l'entorn d'aquest últim punt, l'estudi de les adaptacions i, concretament, del paper de la molècula de NeABL en diferents condicions ambientals inductores d'estrès, que es poden plantejar diverses qüestions interessants de resoldre en el futur. Aquests i altres reptes en l'estudi de BVS s'exposen a continuació.

En el marc de la recerca de la biodiversitat i de les adaptacions que presenten els BVS, un dels elements de principal interès es pot trobar en l'estudi dels sistemes aquàtics (tant atalassohalins com talassohalins) extrems: pel seu caràcter hipersalí (> 4% NaCl) o per la combinació de diferents factors adversos, com ara salinitat i temperatures elevades (> 45°C) o baixes (< 20°C) i/o valors de pH superiors a 8 o inferiors a 6. Existeixen diferents referències, encara que la majoria mancades de precisió perquè aporten un informació parcial (és a dir, no es disposa de la informació filogenètica), de la detecció i/o observació de poblacions de BVS en aquestes condicions ambientals poc comunes (la majoria de descripcions realitzades es restringeixen a ambients de règim marí) (Anderson, 1958; Cohen et al., 1977; Puchkova, 1984; Gorlenko, 1988; Achenbach et al., 2001; Alexander and Imhoff, 2006). Aquests estudis podrien suposar un avenç considerable en el coneixement de la diversitat real d'espècies del grup, a partir de la descripció de noves espècies i/o variants morfo-funcionals com les proposades en treballs anteriors (Abella and Garcia-Gil, 1988); mostrar capacitats fisiològiques no determinades en la resta de BVS; i alhora apropar-se als límits fisiològics de tolerància d'aquest grup de microorganismes.

Concretament, es planteja una qüestió interessant en relació a la configuració de soluts compatibles acumulats en ambients salins a elevades temperatures, ja que tots els compostos detectats en BVS (NeABL, Glutamat, β-glutamat i trehalosa) han estat observats com a estratègies adequades en espècies d'arquees i bacteris termòfils i/o hipertermòfils (Santos and Da Costa, 2002;

Roberts, 2005; Empadinhas and Da Costa, 2006). En el cas oposat (baixes temperatures en presència de sals), també es pot formular la mateixa proposta d'estudi si considerem la capacitat de crioprotecció ja reconeguda per alguns soluts compatibles i la capacitat de disminució de la temperatura eutètica que presenten aquests; 244°K (equivalent a -29°C) en el cas de la trehalosa i 227°K (-47°C) en el cas del glicerol (Ruiz et al., 2007). Resulta alhora interessant l'estudi de les estratègies desenvolupades en pressions elevades amb presència de sals: s'ha demostrat (Font, 2006) que la presència de glicerol reverteix l'efecte desnaturalitzant de la pressió i la temperatura sobre una variant de RNasa A. Un referent ambiental d'aquestes condicions tant poc freqüents (si considerem l'hàbitat de les poblacions de BVS) el podem trobar en el cultiu obtingut a partir d'una fumarola hidrotermal de la regió de East Pacific Rice a 2391 m de profunditat (Beatty et al., 2005) que constitueix un cas inèdit de la utilització d'una radiació no solar per a la realització del metabolisme fotosintètic.

En l'estudi de la resposta desenvolupada (en relació a l'acumulació de soluts compatibles) en aquestes condicions 'extremes' s'haurien de provar diferents variants de medis i condicions ambientals, en tant que la composició del conjunt de soluts acumulats pot ésser susceptible de variar en funció de diversos paràmetres com ara la concentració de nutrients o la salinitat. Alhora, un dels aspectes més interessants d'aquest tipus d'estudis passaria per la caracterització de la resposta adoptada per les poblacions de BVS en les condicions naturals (estudiant diferents tipus de sistemes i reproduint les condicions dels hàbitats naturals). L'anàlisi realitzada a partir d'una mostra ambiental de la llacuna de la Massona ha evidenciat la qualitat de compostos minoritaris dels β -amino àcids (β -glutamat i NeABL) en les condicions ambientals (34 mS·cm⁻¹, 7.1 mM H₂S, 30.8 ppm NH₄⁺ i pH 7.16; amb una salinitat similar a la del mar i una concentració de nutrients inferior a la imposada en el cultiu de laboratori) (veure capítol III de resultats i discussió; Figura C3-14). Tot i això, la contribució d'aquests compostos pot dependre també de les condicions de cada ambient en particular. En definitiva és tant interessant l'estudi de les capacitats fisiològiques d'un determinat microorganisme com el coneixement de la resposta adoptada per part d'aquest en el seu ambient natural.

En el marc metodològic caldria considerar encara algunes millores: quantificar la contribució de cadascun dels osmòlits acumulats en les diferents condicions (i no només la concentració del principal osmòlit objecte d'estudi, NeABL), i alhora quantificar els nivells de K^+ intracel·lular (comparant els valors obtinguts amb els descrits per a altres grups bacterians). En aquest punt caldria considerar la substitució dels mètodes més freqüentment utilitzats per a la quantificació (diferents programes de HPLC) per una metodologia descrita recentment (Motta et al., 2004) que permet determinar i quantificar directament a partir del cultiu sense necessitat de passar per un procés previ d'extracció, que d'altra banda en la majoria dels casos no permet quantificar aquells osmòlits que es troben en qualitat de traces. Aquest mètode, basat en l'aplicació combinada d'experiments de 1H RMN en una i dues dimensions, és ràpid i presenta una sensibilitat notable (en part perquè requereix poca manipulació).

Els treballs focalitzats en el marc taxonòmic (de la classificació dintre del grup de BVS) poden suposar una altra línia de recerca de cara a treballs futurs. En aquest àmbit, l'estudi de la significació taxonòmica dels requeriments de sals es pot dur a terme a partir d'una doble perspectiva, tant a partir d'estudis ambientals com a partir de la caracterització del enriquiment o aïllats en cultiu pur. En el primer cas (estudis ambientals) esdevenen especialment interessants aquells sistemes amb un gradient ampli de salinitat (com més millor) perquè podrien contenir una major diversitat d'organismes, cadascun dels quals pot presentar un nínxol particular. En aquest punt seria també interessant poder treballar en sistemes que presentin una comunitat de bacteris fotosintètics ben desenvolupada (arribant a densitats elevades), d'aquesta manera les metodologies utilitzades en les aproximacions experimentals poden ésser diverses (microscòpiques, espectrofotomètriques, per citometria, basades en l'estudi del DNA, etc.).

4.5. Aproximació preliminar als mecanismes de regulació en la síntesi del solut compatible N^ε-acetil-β-lisina: el model de *Bacillus cereus*

En l'estudi de l'osmoregulació, s'ha acumulat una gran quantitat de coneixement relatiu a les respostes genètiques i fisiològiques desenvolupades pels microorganismes a l'osmolaritat elevada, però, sens dubte, si hi ha un terreny en el qual encara queda moltes passes per fer és el que està relacionat amb l'estudi del senyals o paràmetres inductors i/o reguladors del desenvolupament d'aquestes respostes (Sleator and Hill, 2001). Mentre la regulació de la majoria de respostes biològiques té lloc en funció del reconeixement de molècules que actuen com a senyals per a receptors específics, en el cas de l'osmoregulació hi pot haver també determinats paràmetres ambientals implicats. D'entre els possibles mecanismes osmosensors es consideren -i en alguns casos es coneixen- aquells que detecten canvis en la pressió hidrostàtica interna, els que mesuren diferencials de pressió de membrana, els que monitoritzen l'osmolaritat (interna o externa) o l'activitat de l'aigua (a_w) i els que mesuren els canvis produïts en l'àrea de la membrana citoplasmàtica.

En aquest context, l'estudi de l'acumulació de NeABL en *B. cereus* permet hipotetitzar sobre la possible funció de senyal inductora de la resposta que realitzaria la molècula de NaCl (o els seus ions). Així, ha estat possible determinar amb certa precisió el rang de concentracions de sals a partir del qual es detecten els senyals característics del compost en els espectres de ¹³C de RMN. Si bé la sensibilitat de la tècnica (en relació a la concentració) no és prou bona, sí que permet afirmar que la seva detecció implica la presència d'unes concentracions prou importants com per poder considerar que el compost en qüestió contribueix d'una manera significativa en el conjunt d'aminoàcids lliures del citoplasma. Així, és interessant apuntar que tant sols el canvi de 0% a 0,1% de NaCl en el medi LB ha fet possible la detecció del compost, que a la vegada es presentava en una proporció relativa similar a la que tenia al 1% de NaCl (sota unes condicions estàndards) (figura DG-1).

D'aquesta manera, i a tall d'especulació, el mecanisme osmosensor podria contenir un sistema de proteïna transmembrana amb un domini d'unió extern i específic per un o més soluts (com ara l'ió Na⁺), el qual estaria inclòs en un sistema de regulació de dos components.

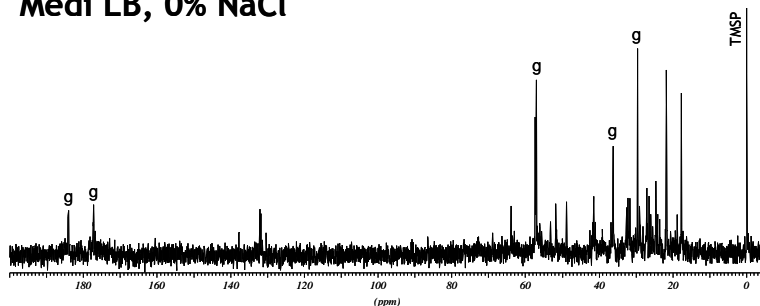
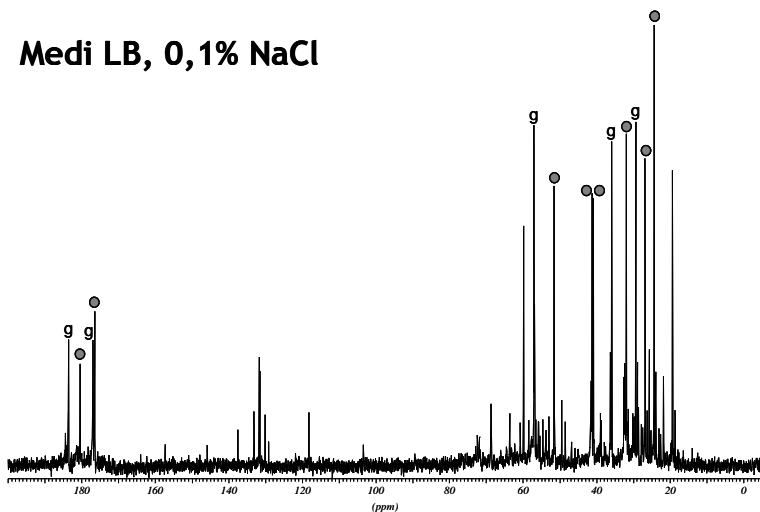
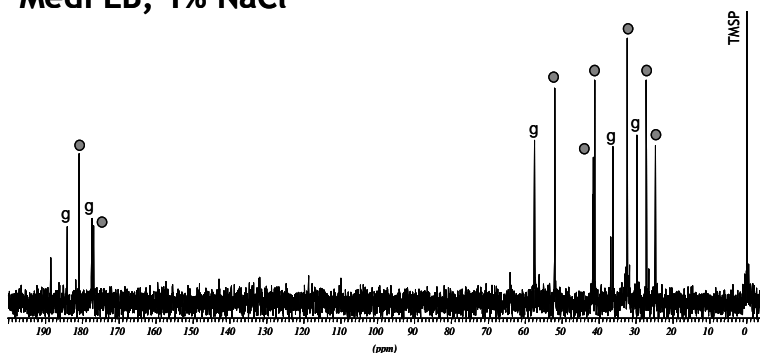
Medi LB, 0% NaCl**Medi LB, 0,1% NaCl****Medi LB, 1% NaCl**

Figura DG-1. Espectres de ^{13}C NMR (utilitzant D_2O com a solvent) d'extractes cel·lulars de *Bacillus cereus* CECT 148^T (eq. ATCC 14579; DSM 31) creixent en medi LB a diferents concentracions (en %) de NaCl. Els diferents compostos identificats en relació als desplaçaments químics (en ppm) són: glutamat (*g*) a 183,89; 177,12; 57,10; 35,94; 29,26 i N^ϵ -acetil- β -lisina (*punts grisos*) a 180,80; 176,41; 51,75; 41,42; 40,82; 31,98; 26,82 i 25,06. Com a referència interna s'ha utilitzat TMSp (TSP- d_4 (3-(trimethylsilyl) -2, 2, 3, 3, d_4 propionic acid sodium salt)).

D'altra banda, la composició del còctel de soluts compatibles en *B. cereus* en medis amb diferents proporcions C/N ha presentat variacions importants (figura DG-2). Cal destacar en aquest punt el patró de soluts clarament diferenciat que s'ha obtingut a partir del medi amb doble contingut de glucosa (proporció C/N més alta: 13,7). En aquesta condició, els senyals de major intensitat han estat els corresponents als sacàrids glucosa i trehalosa. Altres soluts compatibles que contenen nitrogen com ara glutamina, ectoïna i hidroxiectoïna han estat acumulats, tot i que aparentment en una proporció baixa si considerem la poca intensitat del senyals observada en els espectres de ^{13}C . Per contra, no s'ha detectat la presència de NeABL i betaïna. Així, a partir dels canvis observats, es constata l'elevada capacitat d'adaptació de *B. cereus* a les diferents condicions imposades en el medi, que estan en coherència al seu elevat potencial genètic. El contingut (en relació a la intensitat de senyal) de l'osmòlit NeABL incrementa a proporcions C/N baixes ($< 7,4$) i especialment en medi ric, LB (proporció C/N 3,2), la qual cosa indica que la síntesi d'aquest compost podria ésser inhibida en condicions de limitació de nitrogen. Aquesta observació és coherent amb el contingut doble de nitrogen (dos grups amino) de NeABL a diferència a altres soluts amb un contingut baix o nul de nitrogen en la seva estructura (ex: glutamat, glucosa i trehalosa). En treballs anteriors (Del Moral, 1994) ha estat possible observar resultats semblants en altres espècies de *Bacillus*.

Figura DG-2. Espectres de ^{13}C NMR (utilitzant D_2O com a solvent) d'extractes cel·lulars de *Bacillus cereus* CECT 148^T (eq. ATCC 14579; DSM 31) creixent en medis (GY i LB al 5% de NaCl) amb diferents proporcions de C/N. La variació del contingut de glucosa o NH_4^+ , les úniques font de carboni i nitrogen respectivament en el medi GY, ha permès obtenir les diferents proporcions d'aquests dos elements. Per a la determinació de les proporcions de C/N s'ha utilitzat un analitzador elemental CE Instruments 1110 CHNS-O (ThermoFinnigan); el valor indicat s'obté a partir de triplicats de mesura del medi deshidratat. Els diferents compostos identificats en relació als desplaçaments químics (en ppm) són: *trehalosa* (*t*) a 95,90; 74,88; 74,49; 73,40; 72,01; 62,95; *glucosa* (*gc*) a 98,41; 94,65; 78,48; 78,28; 76,73; 75,33; 74,04; 73,98; 72,24; 63,39; 63,26; *glutamat* (*g*) a 183,89; 177,12; 57,10; 35,94; 29,26; *betaïna* (*b*) a 172,00; 68,89; 56,23; 56,16; 56,08; *ectoïna* (*e*) a 179,50; 163,33; 56,01; 40,05; 24,22; 20,98; *hidroxiectoïna* (*y*) a 177,05; 163,26; 62,57; 62,17; 45,34; 20,68; *N^ε-acetil-β-lisina* (punts grisos) a 180,80; 176,41; 51,75; 41,42; 40,82; 31,98; 26,82 i 25,06; *tris hydroxymethyl aminomethane* (*tr*). Com a referència interna s'ha utilitzat TMSP (TSP- d_4 (3-(trimethylsilyl) -2, 2, 3, 3, d_4 propionic acid sodium salt)).

Es considera que l'acumulació de trehalosa és una estratègia que es desenvolupa quan es dóna una situació de limitació de nitrogen, en la qual la trehalosa esdevé un substitut de les formes nitrogenades, com ara la betaïna (Galinski, 1990; Galinski, 1995). Paral·lelament s'ha observat que la soca UdG6501Lms (*Cba. Parvum*, BVS) no acumula trehalosa quan el medi mineral és enriquit periòdicament amb una solució d'acetat d'amoni (a concentració final 2mM). D'aquesta manera, la concentració de nitrogen sembla ser més influent que la de carboni en els canvis observats en la configuració del conjunt de soluts acumulats.

Aquesta argumentació, però, presenta algunes incongruències que caldria considerar, especialment, per a l'elaboració d'hipòtesis en el plantejament de treballs futurs relacionats amb la modulació de la resposta osmoadaptativa de *B. cereus* (i altres organismes productors de NeABL) en diferents condicions ambientals. Sens dubte, l'element discordant es troba en l'acumulació d'ectoïna, hidroxiectoïna i glutamina (tot i que en petites quantitats) en la condició de menor concentració de nitrogen (proporció C/N més elevada), ja que aquestes molècules també presenten dos grups amino en la seva conformació. Una alternativa a la síntesi d'aquests compostos, que resoldria aquesta incongruència aparent, seria que l'acumulació d'aquests osmòlits estigués relacionada amb un fenomen de transport actiu (*uptake*) des del medi (el qual conté un suplement d'extracte de llevat). Complementàriament, i amb la finalitat de detectar gens presumptivament relacionats amb la síntesi d'ectoïna i glutamina, s'han realitzat diferents anàlisis de BLAST (Altschul, 1997) en les quals s'ha utilitzat com a diana la seqüència disponible del genoma de *B. cereus* ATCC 14579^T. En el cas de l'ectoïna, s'han utilitzat les seqüències de l'operó biosintètic *ectABC* de *Bacillus pasteurii* (també anomenat *Sporosarcina pasteurii*) i també seqüències de *Halomonas* sp. NJ223. En el cas de la glutamina s'han utilitzat les seqüències de glutamina sintetasa (glutamat-amoni lligasa) de les soques *B. cereus* E33L, *B. cereus* subsp. *cytotoxicus* NVH91-98 i *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168. A partir d'aquestes cerques no s'ha obtingut cap alineament significatiu. Encara que aquests resultats indiquen que molt probablement la soca no pot produir ectoïna, hidroxiectoïna o glutamina, no es pot descartar que existeixin diferències entre les soques. S'ha determinat que *B. cereus* DSM 31^T (eq. CECT 148^T i ATCC 14579^T) no acumula cap d'aquests compostos en medi

mínim Spizizen (Kuhlmann and Bremer, 2002; Bursy et al., 2007), tot i que la capacitat de sintetitzar ectoïna i hidroxiectoïna sembla ésser comú en el conjunt del grup *Bacilli*. El cultiu amb aquest medi (que no conté extracte de llevat) impossibilita el transport actiu d'osmòlits, per tant, seria necessari cultivar la soca CECT 148^T en aquest medi per confirmar-ne la hipòtesi. Per altra banda, la possibilitat de transport dels osmòlits des del medi pren força si es considera la detecció de seqüències presumptivament relacionades amb la síntesi de transportadors secundaris de la classe *BCCT* (*betaine choline carnitine transporter family*) i transportadors de la classe *ATP binding cassette transporter* del tipus *ehu* (*ectoïne / hydroxyectoïne uptake*). Amb aquestes observacions és obvi que encara són necessàries diferents investigacions, tant fisiològiques com genètiques, per aclarir les variacions observades en el patró d'osmòlits en les diferents condicions. La utilització del cultiu continu es podria considerar l'opció metodològica més adequada.

Finalment, és interessant també contemplar, en el context de la limitació de nitrogen, que el gen presumptivament relacionat amb la regulació de la L-lisina aminomutasa (*L-lysine aminomutase regulator*, alternativament *arginine utilization regulatory proteins RocR*) trobat regularment en les espècies del grup *Bacilli* que presenten els gens candidats a la síntesi de NeABL (veure capítol III de resultats i discussió; Figura C3-17) presenta un domini específic del factor sigma 54 (σ^{54}) (alternativament factor *sigma L* en espècies de G^+), l'activació del qual es relaciona amb les condicions de limitació de nitrogen. Així, a partir d'aquesta observació resta oberta una altra via de recerca en el marc de la regulació de la síntesi del compost NeABL en les espècies del grup *Bacilli* (prenent com a model *B. cereus*).

4.6. Evidències de la possible transferència lateral dels gens candidats a la síntesi del compost *N*^e-acetil- β -lisina

Els diferents microorganismes que contenen les seqüències d'ambdós gens candidats a la síntesi de NeABL, que en alguns casos corresponen a tàxons clarament diferenciats (per exemple, a nivell de domini: arquees i bacteris), presenten una estreta afiliació en base a les seqüències de proteïna de la lisina-2,3-aminomutasa. Aquest fet suggereix l'esdeveniment de diversos fenòmens de transferència horitzontal (lateral) de gens al llarg de la seva història evolutiva, que alhora podria ajudar a explicar la naturalesa polifilètica

d'aquesta estratègia osmoadaptativa. Tot i així, a partir d'aquest punt es podria realitzar la confirmació d'aquest fenomen i la determinació de l'origen dels fragments transferits (en el cas dels microorganismes estudiats, BVS i *B. cereus*) per tal de reconstruir la possible història evolutiva. En un primer nivell d'anàlisi (aproximatiu), basat en la determinació de possibles variacions en el contingut de GC entre el fragment de seqüència de l'operó en qüestió i la resta del genoma, no ha estat possible observar diferències importants per a aquest paràmetre. Per a l'anàlisi, s'han utilitzat els valors de referència disponibles a les bases de dades i s'han comparat amb els valors obtinguts per a la regió de l'operó candidat, calculats per mitjà del programa GeeCee (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/geecee.html>). D'aquesta manera, per poder estudiar en profunditat aquest aspecte seria necessari realitzar una anàlisi bioinformàtica basada en la teoria de *Chaos Game Representation* (CGR) (Deschavanne et al., 1999; Dufraigne et al., 2005), en la qual es determina una seqüència signatura genòmica a partir de la freqüència de tetranucleòtids (256; 4⁴ possibles combinacions) de la totalitat del genoma i s'identifiquen les regions atípiques (és a dir, les que varien significativament respecte d'aquest valor mitjà). Posteriorment, les regions atípiques, en el cas d'incloure el fragment de seqüència de l'operó en qüestió, podrien ésser analitzades individualment per determinar-ne el seu possible origen. Paral·lelament, un altre paràmetre útil en aquestes aproximacions és troba en l'estudi de les desviacions observades en el *codon usage* (preferència en la utilització de bases de la tercera posició del codó).

4.7. Efectes potencials de N^ε-acetil-β-lisina en l'estabilitat de les macromolècules

Al llarg de la discussió general s'han presentat diferents propostes de recerca o preguntes que hom considera interessants alhora de plantejar nous treballs en relació amb les diferents àrees d'estudi tractades. Es poden considerar, però, altres propostes addicionals que fan referència principalment a l'estudi de la molècula de NeABL, en aquest cas, des d'un vessant purament fisiològic i amb una perspectiva orientada a la recerca de les possibles aplicacions.

Tots els treballs publicats amb referències a la molècula de NeABL (Sowers, 1990; Lai, 1991; Robertson, 1992; Sowers and Gunsalus, 1995; Martin et al., 2000; Roebler and Müller, 2001; Oren, 2002b; Pflüger et al., 2003; Müller et

al., 2005; Roberts, 2005) han estat emmarcats principalment en l'estudi de la dispersió d'aquesta estratègia d'osmoadaptació (capacitat de síntesi) en el grup d'arques metanogènics, però manca encara un treball on s'exposi una caracterització de la molècula (amb comparació amb d'altres osmòlits) en termes de potencial de termoestabilització, estabilització en presència de sals i baroadaptació en proteïnes per mitjà d'assaigs *in-vitro*. També, resulta molt interessant estudiar el possible efecte de protecció d'aquest compost en presència de radicals lliures d'oxigen durant el creixement.

Existeixen diferents raons per les quals és especialment interessant un estudi d'aquest tipus. En primer lloc, la utilització de β -aminoàcids constitueix una estratègia excel·lent per a l'osmoadaptació, ja que aquests compostos no són incorporats en proteïnes o altres macromolècules (Roberts, 2005), i a la vegada no poden ser utilitzats com a substractes pels enzims que utilitzen L- α -aminoàcids. D'aquesta manera queda exclosa la interferència d'aquest tipus de compostos en el metabolisme cel·lular (catabòlic o anabòlic). En segon lloc, l'acetilació terminal d'aquest diaminoàcid, que transforma un catió (en origen) en un zwitterió amb un grup N-acetil polar i no carregat, li confereix una millor capacitat estabilitzadora que els isòmers α -acetilats (Galinski, 1993). Presenta, a més a més, una distància relativa entre els grups carregats de més de dos enllaços; condició que ha estat observada com a propícia en els compostos iònics dipolars del tipus amino-carbonil (Truper and Galinski, 1989). Finalment, la combinació de regions hidrofòbiques i polars dins de la molècula - característica que és comuna a totes les formes d'osmòlits (Galinski, 1993) - d'una manera particular, i la disposició del carboni asimètric (quiral) en posició beta, que representa una variació important en relació a la majoria de formes conegudes d'osmòlits, representen altres valors afegits pel seu estudi.

Per altra banda, l'anàlisi de la capacitat de disminució de la temperatura de fusió del DNA i la valoració de la possible aplicació del compost en la millora de la reacció de PCR quan es treballa amb extractes d'un elevat contingut de bases GC podria constituir una altra de les línies de recerca en l'àmbit de l'aplicació. En aquestes condicions (quan el contingut de bases GC del DNA motlle és $> 70\%$) el pas inicial de desnaturalització del DNA (de cadena doble a cadena simple) que es dona a cada cicle de la reacció pot esdevenir un punt

crític en l'obtenció de producte amplificat, ja que la fusió de la molècula diana es pot produir només a temperatures molt elevades (>90 °C). En treballs anteriors ja s'ha documentat aquesta aplicació per diversos soluts compatibles (betaïna, ectoïna i derivats) (Henke et al., 1997; Schnoor et al., 2004), però, en el cas que ens ocupa, resulta especialment interessant poder valorar les possibles variacions en el comportament de la solució, en tant que no s'ha analitzat encara l'efecte de la localització del carboni quiral en posició beta en aquest tipus d'aplicació.

Cal considerar que un dels principals colls d'ampolla d'aquest llarg procés encaminat a la recerca de possibles aplicacions, com també en el seu posterior escalat industrial, es troba en la producció del compost en quantitats elevades; d'aquesta manera cal disposar del model (microbiològic) més eficaç possible per a la producció del compost. En aquest treball s'ha considerat la viabilitat de *B. cereus* com a possible model de producció de NeABL. Amb l'objectiu de determinar l'existència d'un altre candidat millor, útil en la producció, caldria avaluar la possible capacitat de síntesi d'aquest compost en altres espècies candidates del grup *Bacillus* i caracteritzar-les en base als diferents paràmetres relacionats amb la producció. El treball desenvolupat per a determinar la dispersió d'aquesta capacitat també es podria fer extensiu a altres espècies del domini *Bacteria*, que al igual que els BVS i *B. cereus* presenten, a priori, la dotació genètica necessària per a la síntesi del compost (veure capítol III de resultats i discussió; *Addenda* C3-3 i C3-4).

La síntesi del compost per part d'altres representants del grup *Bacillus* és molt probable si es té en compte que aquesta capacitat es va inferir a partir de les dades genètiques en el cas de *B. cereus*. L'organització gènica dels fragments presumptivament implicats en la síntesi de NeABL presenta una estructura regular en la majoria d'espècies, alhora que el grau d'homologia de les seqüències de proteïna d'ambdós gens implicats és molt elevat (> 70 %) entre els diferents membres del grup. Entre les possibles espècies candidates seria especialment important jutjar-ne els següents paràmetres: la facilitat de cultiu (no patogenicitat, condició aeròbia), l'obtenció de rendiments elevats de producció i facilitat de separació del compost d'interès durant la realització dels extractes. Algunes de les possibles millores a introduir en el procés de producció podrien estar orientades a l'obtenció de mutants defectius en la

capacitat de transport d'osmòlits (principalment betaïna i ectoïna) per mitjà de la tècnica de *knockout* (mutagènesi dirigida). D'aquesta manera, s'afavoriria l'acumulació d'una diversitat menor de soluts i de retruc es simplificaria la tasca de separació i purificació del compost. Tanmateix, la producció de NeABL a partir d'un bioprocés és, en un principi, més a l'abast que el desenvolupament d'un procés de síntesi química.

5. Conclusions

5. Conclusions

5.1. Conclusions (en Català)

1. La Salada de Chiprana presenta un comportament estacional mixte, entre holomíctic i meromíctic. Durant el període estudiat (que comprèn més d'un cicle anual) no s'ha observat una dinàmica limnològica estacional periòdica i repetitiva. La comparació de les dades obtingudes en aquest treball amb les d'altres estudis anteriors tampoc ha permès definir una dinàmica entre períodes interanuals. El desenvolupament de la estratificació va lligat principalment a un procés d'origen ectogènic, relacionat amb l'escorrentia de precipitacions i excedents de reg derivats de l'activitat agrícola que hi arriben. El manteniment de la meromixis es pot veure compromès per diferents factors ambientals; principalment per l'acció dels agents meteorològics (vent i pluges), ja que la morfometria de la llacuna i orografia del terreny permeten una elevada incidència d'aquests factors. A tall de generalització, l'esdeveniment d'un període intens de pluges, seguit d'un episodi de calma sense la influència del vent podria ser una de les seqüències de successos meteorològics òptimes pel desenvolupament i manteniment de l'estratificació i l'anòxia al fons.
2. Les dues cubetes del sistema de pous construïts a la llacuna de La Playa, que s'han descrit per primera vegada en el context limnològic i microbiològic, van presentar una estratificació permanent (meromixis) durant el període d'estudi. En aquests pous, la morfometria singular de les cubetes (de mida reduïda i amb parets i murs verticals), la protecció que confereixen els murs envers els vents que imperen a la zona (*cierzo*) i l'efecte estabilitzador del gradient acusat de sals possibiliten el manteniment de l'anòxia en el fons.
3. Les comunitats de BVS han presentat densitats molt baixes en els diferents ambients estudiats, que no s'han pogut detectar per mètodes directes (observacions microscòpiques) o per altres mètodes indirectes de notable sensibilitat (HPLC). Tan sols l'aproximació molecular per PCR-DGGE i els procediments d'enriquiment i cultiu han estat útils per detectar les poblacions naturals. D'aquesta manera, els filotips detectats formen part de poblacions poc denses que, en qualitat de latents, podrien

proliferar en presència d'unes condicions més adequades, com les imposades en els cultius d'enriquiment.

4. Entre els diferents factors ambientals que poden restringir el desenvolupament d'aquestes poblacions de BVS en els seus hàbitats naturals, a més a més dels factors meteorològics que poden incidir en la dinàmica limnològica de les llacunes, n'hi ha d'antropogènics (d'eutrofització) i d'altres que responen a característiques singulars de l'ambient.
 - A la Massona, l'eutrofització d'origen cultural es podria considerar el factor principal pel qual es donaria un desenvolupament escàs de les poblacions de BFA. L'absència de llum a la part anòxica, per la presència de denses poblacions algals en l'*epilimnion*, és un efecte derivat d'un procés d'eutrofització creixent que explica la situació actual, considerablement diferent de la que s'havia trobat en els estudis de la segona meitat dels anys vuitanta.
 - El desenvolupament del *perifiton* podria actuar com a un factor advers pel desenvolupament de la comunitat de microorganismes anoxigènics a la Salada de Chiprana, on s'ha observat una certa tendència a l'oxigenació de la part més profunda al final del període d'estudi. Aquesta situació es veuria afavorida igualment per l'eutrofització derivada de l'activitat agrícola, ja que l'increment en les concentracions de nutrients potenciaria el desenvolupament del *perifiton* oxigènic.
 - La baixa densitat de les poblacions de BVS en els pous construïts de la llacuna de "La Playa" es podria atribuir a processos de competència amb les poblacions de BPS. Els nivells elevats de radiació lumínica que arriben a la zona d'anòxia permanent beneficiarien a les poblacions de BPS.
5. L'aproximació molecular basada en PCR-DGGE i l'estudi microbiològic basat en la metodologia d'enriquiment i cultiu han estat dues estratègies adequades i complementàries per a la descripció de la riquesa específica de la comunitat de BVS degut a la baixa densitat d'aquestes poblacions en els ambients. Tot i que l'aproximació molecular permet assolir un llindar mínim de detecció molt baix, limita la seva resolució a les poblacions predominants. Al seu torn, les tècniques de cultiu utilitzades han presentat

una elevada eficiència per a la recuperació i detecció d'algunes poblacions de BVS, que en alguns casos fins i tot podien ser indetectables per les tècniques moleculars. No obstant, no han estat útils per poder recuperar la totalitat dels filotips detectats, sinó únicament alguns filotips que presentarien una elevada cultivabilitat, com és el cas dels que pertanyen a l'espècie *Prosthecochloris vibrioformis*.

6. Els filotips ambientals afiliats dins del gènere *Prosthecochloris* han estat detectats exclusivament a concentracions de sals superiors al 1% i, en un context general, presenten una major prevalença en les aigües hipersalines i atalassohalines de la Salada de Chiprana i La Playa. Per contra, els filotips ambientals afiliats dins el grup 2a (segons la classificació d'Alexander, 2002), del qual *Chlorobium phaeovibrioides* DSM 269^T n'és la soca tipus, han estat trobats exclusivament en els ambients costaners (la Massona i Es Cibollar), en un rang de concentracions ampli (des de 0,28-4,7%). Altres paràmetres com ara la concentració de sulfhídric o el pH tampoc semblen condicionar la seva distribució.
7. Les topologies obtingudes en les anàlisis de l'afiliació filogenètica de les seqüències del 16S rDNA i l'aproximació realitzada en l'anàlisi de gens concatenats (a partir dels productes gènics de *fmoA*, *pscB*, *bchG* i *bchU*) ens permeten considerar que l'estructura filogenètica dels BVS actualment vigent (Imhoff, 2003), basada en les seqüències dels gens del 16S rRNA i *fmoA* i suportada per el contingut G + C, presenta una base molt consistent. Així, en ambdós tipus d'anàlisis s'ha obtingut una estructura general de la topologia similar, amb 3 branques filogenètiques principals (corresponents als 3 gèneres) i 4 subgrups.
8. L'anàlisi de l'afiliació filogenètica de les seqüències del 16S rDNA detectades ha permès definir bacteris halotolerants o halòfils estretament relacionats amb espècies considerades d'aigua dolça. Això representa una característica inèdita si es considera que el requeriment de sals és un dels únics caràcters fenotípics amb significació taxonòmica en el sistema de classificació actual. Si bé existeixen unes branques filogenètiques ben definides per als membres halòfils del grup (el gènere *Prosthecochloris* en el grup 1, els vibris del gènere *Chlorobium* corresponents al grup 2, les espècies del gènere *Chlorobaculum* incloses dins el grup 4a i el

representant del gènere *Chloroherpeton* que defineix el grup 5), la diversitat d'organismes halotolerants o halòfils no estaria només restringida a aquests grups sinó que es podria fer extensiva a altres branques (grups 3b i 4b) on només s'hi havien descrit bacteris d'aigua dolça. Així, s'han trobat filotips halotolerants dins les branques filogenètiques definides per les espècies *Cba. limnaeum* DSM 1667^T (grup 4b), *Cba. thiosulfatophilum* DSM 249^T (grup 4b), *Chl. limicola* DSM 245^T (grup 3b) i per un epibiont no cultivat del consorci fotosintètic “*Chlorochromatium magnum*” filomorfofitip E.

9. Els caràcters fenotípics no presenten una distribució coherent amb l'estructura filogenètica, malgrat aquesta estructura constant i la bona correlació de les dades genètiques. Per tant, les bases plantejades en el context de la taxonomia filogenètica, en la qual el marcador de referència és el 16S rDNA, denoten unes limitacions evidents en un nivell d'aproximació microfilogenètic (relacions dins del grup) alhora d'inferir les capacitats fisiològiques o els requeriments ecològics d'un determinat filotip. Tanmateix, aquest marcador resulta molt útil alhora de contextualitzar els filotips detectats en un nivell d'aproximació macrofilogenètic, ja que ens situa en un grup ben definit fisiològicament i ecològicament (fotolitoautòtrofs anaerobis estrictes).
10. La soca UdG7004Chp, morfològicament similar a *Prosthecochloris aestuarii*, constitueix conjuntament amb les soques SKGSB, 2K, CHP3401 i altres filotips ambientals detectats en el sistema hipersalí continental de Bad Water (Alexander 2006) una branca genèticament diferenciada dins del gènere *Prosthecochloris*. Tots podrien ésser inclosos en una nova espècie del gènere *Prosthecochloris*. A més, la soca UdG7004Chp es podria utilitzar com a cultiu de referència, ja que no es coneix l'existència de cap altre cultiu pur dins d'aquest grup.
11. El solut compatible N^e-acetil-β-lisina (NeABL), ha estat trobat per primera vegada en representants del domini *Bacteria*: diferents espècies de BVS i també *Bacillus cereus*. Fins ara, la seva acumulació es considerava com una estratègia per a l'osmoadaptació única dels arquees metanogènics. La composició del conjunt de soluts compatibles acumulats en medi salí ha estat homogènia en les diferents soques del grup de BVS

analitzades, representatives dels gèneres *Prosthecochloris*, *Chlorobium* i *Chlorobaculum*. Si bé fins ara es considerava l'acumulació de trehalosa com a únic mecanisme d'adaptació utilitzat en condicions d'estrès salí pels BVS, ha estat possible descriure també l'acumulació regular de α -glutamat i β -glutamat, a més de NeABL, en totes les soques analitzades. Generalment, la concentració de NeABL ha augmentat en relació a la concentració de sals presents en el medi, fins esdevenir l'osmòlit principal a la concentració més elevada (5-7 % w/v NaCl). Les observacions realitzades a partir de cultius de *B. cereus* creixent a diferents ràtios de C/N permeten hipotetitzar que la síntesi de NeABL pot està condicionada per la proporció de nitrogen en el medi (formes assimilables de compostos nitrogenats), ja que la síntesi del compost sembla ésser inhibida en les ràtios més elevades de C/N provades (13,7).

12. Els gens que codifiquen pels enzims lisina-2,3-aminomutasa (LAMG) i β -lisina acetiltransferasa (LATG), presumptivament relacionats amb la síntesi de NeABL, han estat detectats en les seqüències genòmiques de 31 espècies (del total de genomes microbians disponibles a les bases de dades), corresponents a 5 filums (*Euryarchaeota*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*). També ha estat possible obtenir la seqüència parcial del gen LAMG de les soques de l'espècie *Prosthecochloris vibrioformis* UdG7005Chp i UdG7006Lms per mitjà de la utilització d'encebadors degenerats en la PCR. A partir de les dades genòmiques, es va creure que *B. cereus* podia tenir la capacitat de sintetitzar NeABL i es va confirmar en cultius crescuts en medi salí.
13. *B. cereus* CECT148^T (eq. ATCC 14579, DSM 31) es proposa com a microorganisme candidat per a la producció d'elevades quantitats de NeABL. Així, les elevades ràtios d'acumulació del compost (comparables a les que es troben en BVS i en arquees metanogènics), les elevades taxes de creixement del bacteri i la simplicitat de la separació cromatogràfica quan creix en medi LB al 1% NaCl, a més de la condició aeròbia (la qual pot simplificar el procediment de cultiu), són diferents factors avantatjosos per poder considerar l'adequació de *B. cereus* en un bioprocés productiu d'aquest tipus.

14. Els diferents microorganismes que contenen les seqüències ortòlogues d'ambdós gens candidats a la síntesi de NeABL presenten una estreta afiliació en base a les seqüències peptídiques de la lisina-2,3-aminomutasa, malgrat l'elevada divergència filogenètica entre alguns d'ells. Aquest fet suggereix l'esdeveniment de diversos fenòmens de transferència horitzontal de gens al llarg de la seva història evolutiva, que alhora podrien ajudar a explicar la naturalesa polifilètica d'aquesta estratègia osmoadaptativa.

5.2. Conclusions (in English)

1. The Chiprana Lagoon (“La Salada de Chiprana”) shows a mixed meromictic and holomictic character. A cyclical limnological dynamics has not been observed during the studied period (covering over an annual cycle). In addition, it has not allowed defining a year to year dynamics either when comparing data from this work with previous studies. The development of stratification, a process of ectogenic origin, can be related to rainfall, runoff inputs and the irrigation returns from agricultural activities. On the opposite, breakdown of the meromixis was mainly influenced by the strong winds prevailing in the region, since the open shape of the main basin, with shallow waters, as well as the smooth reliefs of the region, can favor exposure to the winds. Thus, an intense rainfall period followed by an episode of calm without the influence of wind could be optimal for the development of stratification and anoxic conditions in the bottom.
2. The two man-made ponds in the Playa Lagoon, whose phototrophic microbial community and habitat characteristics have been described for the first time, presented permanent stratification (meromixis) during whole studied period. The morphometry of the ponds (small basins with vertical walls), the protection from the strong winds conferred by the walls and the stabilizing effect on chemical gradients of the steep salinity gradient strongly determine the preservation of anoxia at the bottom.
3. Both PCR-DGGE and classical cultivation procedures were successful for the detection of poorly developed, latent GSB populations of studied sites, but they were not detected from either photosynthetic pigment analyses or microscopic observations. This hidden GSB richness can be thought of as potentially active populations that would develop in the phototrophic community under suitable conditions, as some of these phylotypes have been able to develop viable populations under enrichment conditions.

4. The anthropogenic factors (related to the eutrophication of water bodies due to nutrient-rich freshwater inflows), and others subjected to singular environmental characteristics, besides meteorological factors which could affect on limnological dynamics of the lagoons, could be considered as some of different environmental factors preventing the development of GSB in their natural habitats.
 - Anthropological eutrophication could be deemed as the main factor affecting the growth of anoxygenic photosynthetic bacteria (including GSB) in Massona Lagoon, since light, essential for phototrophic bacteria, was found to be deficient in the anoxic, sulfide-containing layers during the entire studied period. Present data suggest an increase of light attenuation in comparison with previous stages (eighties), mainly related to the presence of dense phytoplanktonic populations in the *epilimnion*.
 - The development of an oxygenic photosynthetic benthic community (periphyton) could be favored by the availability of both nutrients and light in Chiprana Lagoon. Oxygen production by primary producers on the sediment could hinder anoxia in the bottom, and therefore, prevent the development of GSB populations.
 - The dominance of PSB populations in Playa Lagoon could be explained as a result of a competence process; the high light intensities recorded in anoxic layers could favor PSB populations, which normally present a higher efficiency under these conditions.
5. Both, DNA-based molecular approach and classical cultivation procedures have been suitable and complementary methods to assess species richness. Although PCR-DGGE is useful to detect poorly developed populations in the environment, some of them still remain undetected unless enrichment procedures are used, since detection of bacterial populations by the molecular approach is restricted to predominant populations in the community. However, enrichment procedures have not been useful to grow all detected phylotypes but rather those (even undetected) populations which were found to present a notable cultivability under laboratory conditions, as observed with several phylotypes of *Prosthecochloris vibrioformis*.

6. The phylotypes clustered into the *Prosthecochloris* genus have been exclusively found at salinity concentrations over 1% and they have been the most common phylotypes in hypersaline and athalassohaline water of Chiprana Lagoon and Playa Lagoon. Quite the opposite, environmental phylotypes closely affiliated with the strains of the *Chl. phaeovibrioides* DSM 269^T cluster (group 2a) have been solely found in coastal lagoons (Massona Lagoon and Cibollar Lagoon). They have been detected in a wide range of salinity conditions (from 0.3 to 4.7%). Sulfide and pH do not seem to be selective for the distribution of *Chl. phaeovibrioides*-like phylotypes.
7. Phylogenetic structures obtained by using 16S rDNA gene sequences and concatenated protein coding genes sequences of *fmoA*, *pscB*, *bchG* and *bchU* genes have resulted in a similar tree topology, presenting the 3 main phylogenetic branches (corresponding to 3 genera) and 4 differentiated subgroups established by Imhoff (2003) in the new phylogenetic taxonomy (based on 16S rDNA and *fmoA* genes, and supported by the G+C content of DNA). These observations allow supporting the reliability of the present phylogenetic structure.
8. Novel phylotypes of salt-tolerant GSB have been found and affiliated into phylogenetic groups in which neither halotolerant nor halophilic species were known to date. This should be understood as a new characteristic in the GSB group, since the requirements of salts is one of the few phenotypic properties found to be significant for the current classification criteria. Therefore, salt tolerance does not seem to be restricted to specific subgroups, as those of the halophilic ones (*Prosthecochloris* genera, group 1; *Chlorobium* vibrioid species, group 2; *Chlorobaculum* species of group 4a; *Chloroherpeton thalassium*, group 5), but is widespread through other phylogenetic branches (groups 3b and 4b), which are considered to contain only freshwater bacteria. Specifically, halotolerant phylotypes have been found to affiliate with phylogenetic branches defined by *Cba. limnaeum* DSM 1667^T (group 4b), *Cba. thiosulfatophilum* DSM 249^T (group 4b), *Chl. limicola* DSM 245^T (group 3b) and an uncultured epibiont bacteria of phototrophic consortia “*Chlorochromatium magnum*” phylomorphotype E.

9. Phenotypic characters do not present a congruent relationship with phylogenetic structure, albeit its regular structure when comparing results of affiliation analyses from different genetic data. Therefore, using 16S rDNA as a reference genetic marker, as in case of phylogenetic taxonomy, involve some limitations when studying GSB from a microphylogenetic perspective, because physiological capacities or ecological requirements can not be inferred from sequence data. However, this genetic marker is a powerful tool for characterizing detected phylotypes from a macrophylogenetic perspective, which leads to a physiologically and ecologically well-defined group (strictly anaerobic, photolithoautotrophic bacteria).
10. The strain UdG7004Chp, which morphologically resembles *Prosthecochloris aestuarii*, constitutes a genetically differentiated branch into the *Prosthecochloris* genera together with the strains SKGSB, 2K, CHP3401 and other environmental phylotypes detected in the inland hypersaline system of Bad Water (Alexander 2006). These strains and closely related phylotypes could be included into a new species into the *Prosthecochloris* genera. Besides, the strain UdG7004Chp could be used as a strain of reference, since other pure cultures of these members are currently unknown.
11. The compatible solute N^ε-acetyl-β-lysine (NeABL), thus far considered unique to methanogenic *Archaea*, has been found to accumulate in several strains of GSB and *Bacillus cereus* under salt stress. Hence, the use of this unusual strategy for osmoadaptation is described for the first time in the bacterial domain. A similar mixture of compatible solutes including trehalose, α-glutamate, β-glutamate and NeABL has been detected in salt tolerant GSB strains of different phylogenetic branches representative of *Prosthecochloris*, *Chlorobium* and *Chlorobaculum* genera. The concentration of this compound is related to the salt content in the media; as a general trend, the highest NeABL ratios were achieved at the highest NaCl contents tolerated by each strain (normally, 5-7% w/v NaCl). Observations on *B. cereus* growing in media with different C/N ratios allow to hypothesize that NeABL synthesis could depend on the nitrogen proportion in the medium (assimilable nitrogen), since the synthesis of this compound seem to be inhibited in the highest C/N ratios tested (13.7).

12. Orthologous genes putatively encoding two enzymes involved in NeABL production (lysine-2,3-aminomutase, LAMG; β -lysine acetylase, LATG) have been identified in 31 species (from whole available microbial genomes). These species are distributed into 5 different phyla (*Euryarchaeota*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*). In addition, PCR amplifications using degenerate sets of primers allowed us to retrieve partial sequences of LAMG in *Prosthecochloris vibrioformis* UdG7005Chp and UdG7006Lms strains. The ability of *B.cereus* to synthesize NeABL was predicted from available genomic data and confirmed with cultures grown in salt-containing media.
13. *B. cereus* CECT148^T (eq. ATCC 14579, DSM 31) could be considered a suitable organism for the large-scale production of NeABL. The high accumulation rates (similar to those determined in GSB and methanogenic *Archaea*), the high growth rates, the simplicity of separation procedures (when growing in LB media at 1% w/v NaCl), besides aerobic growth conditions (which could simplify culture process) are different advantages when using *B. cereus* for this purpose.
14. Protein sequence affiliation analysis of lysine-2,3-aminomutase orthologs in combination with the presence of β -lysine acetylase shows a high genetic similarity among the species having both genes, in spite of the high phylogenetic distance among some of the microbial groups represented. Therefore, it could be reasonable to hypothesize that horizontal gene transfer events may have occurred along their evolutionary history. This assumption could help us to explain the polyphyletic nature of this osmoadaptive strategy.

Apèndix

Metodologia I. Cultiu, aïllament i preservació de bacteris fototròfics anoxigènics.

Índex

1.1. Medis, solucions i procediments pel cultiu, purificació i aïllament de BFS.....	259
1.1.1. Introducció.....	259
1.1.2. Composició i preparació dels medis de cultiu.....	260
1.1.3. Solució de <i>refeeding</i> dels enriquiments i cultius.....	263
1.1.4. Inoculació dels cultius líquids i condicions d'incubació.....	263
1.1.5. Mètode per a la purificació i aïllament de BFS: Dilucions seriades en agar-shakes.....	265
1.2. Preservació de les soques de BVS.....	267
1.2.1. Introducció.....	267
1.2.2. Preservació de les soques de BVS a intervals curts.....	268
1.2.3. Mètode per a la preservació de les soques de BVS per congelació en condicions anaeròbiques.....	268

1.1. Medis, solucions i procediments pel cultiu, purificació i aïllament de BFS

1.1.1. Introducció

El medi va ser dissenyat en un inici per Pfennig (Pfennig, 1965) i modificat posteriorment (Trüper, 1992), pel cultiu i enriquiment del BFS (BVS i BPS). Durant l'estudi s'han utilitzat medis de diferent composició salina, salinitat (%) i pH. D'una banda, s'han preparat medis amb una composició de sals dominada pel sulfat magnèsic i el clorur sòdic (*Athalassohaline-like*). Aquest tipus de medi s'ha modificat en base al medi dissenyat per R.Guyoneaud (comunicació personal) a partir de la composició salina de "La Salada de Chiprana" (Depressió de L'Ebre, Aragó) definida anteriorment (Guerrero, 1991). Per altra banda també s'han preparat medis amb el clorur sòdic com a sal dominant (*Marine-like*). La salinitat dels medis ha variat entre el 2, 6,5 i el 11% (w/v) mentre que el pH ha variat entre 7, 8 i 9 en funció del medi. Els resultats d'aquest procés experimental es poden trobar recollits en el capítol I de resultats i discussió de l'apartat de resultats i discussió. L'afiliació filogenètica d'algunes soques de BVS enriquides en el procés és descrita en el capítol II de resultats i discussió. Pel cultiu dels aïllats obtinguts durant l'estudi s'ha utilitzat un medi únic per a tots els casos basat en la composició *marine-like* tot i que en funció de l'objectiu s'ha variat la proporció de NaCl o altres components. La composició de la solució de sals minerals dels diferents medis es detalla a la taula A1-1. La resta de solucions i el procés de preparació són idèntics en ambdós medis utilitzats.

1.1.2. Composició i preparació dels medis de cultiu

Per a la preparació del medi cal formular separatament tres solucions de sals: *A*, solució de sals minerals; *B*, solució de font de carboni; *C*, solució de sulfhídric. Aquestes solucions s'esterilitzen per separat i es barregen conjuntament amb la solució de vitamina i de micronutrients seguint el procediment de preparació indicat més endavant.

A: solució de sals minerals

La composició de les solucions de sals minerals utilitzades en els diferents tipus de medis (*athalassohaline-* o *marine-like*) es detalla a continuació (taula A1-1).

Taula A1-1. Medis de diferent composició de sals utilitzats en el procés experimental d'enriquiment de bacteris verds del sofre. Solució de sals minerals per a 2 litre de medi.

Sals	<i>Athalassohaline-like</i>		
	2%	6.5%	11%
KH ₂ PO ₄	0.70	0.70	0.70
NH ₄ Cl	0.4	0.4	0.4
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.0	2.0	2.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	37.5	170.0	268.0
NaCl	10.46	34.0	57.6
Na ₂ SO ₄	2.0	8.0	8.0
<i>Marine-like</i>			
	2%	6.5%	11%
KH ₂ PO ₄	0.68	0.68	0.68
NH ₄ Cl	0.8	0.8	0.8
KCl	0.68	0.68	0.68
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0	1.0	1.0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.6	0.6	0.6
NaCl	40.0	130.0	222.0

Dissoldre bé les sals del medi desitjat en una ampolla especial per a la preparació de medi de cultiu amb l'ajuda d'un agitador magnètic (veure figura A1-1).

B: Solució font de carboni

Aigua destil·lada.....35.0 ml
NaHCO₃.....3.0 g

Bullir l'aigua durant 10 minuts (desgasificar). Afegir la sal i dissoldre per mitjà d'agitació. Seguidament, bombollear la solució amb un flux constant de CO₂ durant 5-10 minuts.

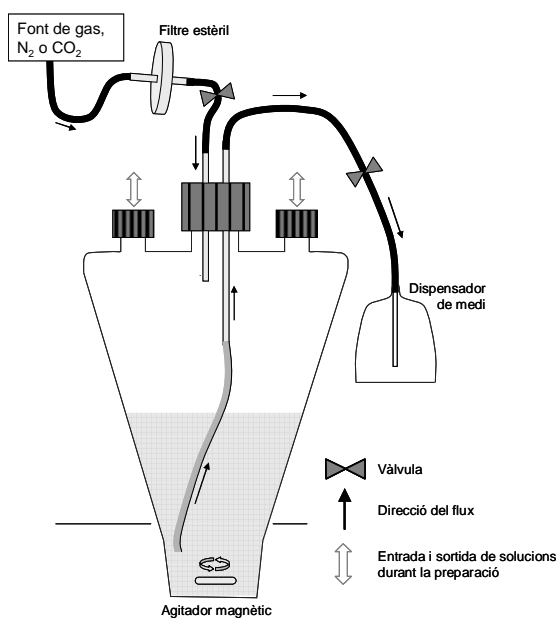


Figura A1-1. Ampolla especial utilitzada per la realització del medi mineral Pfennig.

C: Solució de Sulfídric 1M

Aigua destil·lada.....	5.0 ml
Na ₂ S · 9 H ₂ O.....	1.2 g

Dissoldre el cristalls de sulfídric amb aigua prèviament desgasificada (per ebullició). Un cop dissolts bombollear la solució amb N₂, passar la solució en un tub de vidre amb atmosfera saturada de N₂.

Procediment de preparació de medi

Per a 2L de medi:

1. Preparar les solucions A, B y C.
2. Esterilitzar a l'autoclau les tres solucions.
3. Refredar la solució A, primer amb aigua i sota pressió de N₂ (durant 5 minuts, just després de treure la solució de l'autoclau). Seguidament, refredar sota pressió de CO₂ (durant 35-40 minuts).

4. Quan el medi està a temperatura ambient, afegir les solucions següents en l'ordre donat (sempre sota pressió de N₂ i agitació constant):
 - El contingut d'una ampolla de solució B.
 - 2 ml de la solució salina d'elements traça esterilizada per filtració (SL10 per bacteris BVS y SL12 per BPS).
 - 2 ml de la solució C. Parar l'agitació en el moment d'afegir aquesta solució.
5. Ajustar el pH (segons el pH desitjat) del medi amb HCl 1M y NaOH 1M o alternativament amb H₂SO₄ (2M) y Na₂CO₃ (2M).
6. Afegir 0.5 ml de solució de vitamina B₁₂ (20 mg·l⁻¹) esterilizada per filtració. La concentració final de vitamina en el medi és 10 µg·l⁻¹.
7. Distribuir el medi en ampolles de vidre esterilitzades, amb compte de no oxidar el medi per excés de turbulències. Guardar les ampolles a temperatura ambient i protegides de la llum.

La solució d'elements traça (micronutrients) y la solució de vitamina no es poden autoclavar perquè són termolàbils. Per tant, s'han d'esterilitzar per filtració en el moment d'afegir-les en el medi , amb una xeringa i un filtre estèril aplicable a la xeringa.

Solucions de micronutrients (SL10, SL12)

SL10	SL12
H ₂ O destil·lada, 100 ml	H ₂ O destil·lada, 100 ml
FeCl ₂ ·4H ₂ O, 0.15 g	EDTA, 0.3 g
ZnCl ₂ , 7 mg	FeSO ₄ ·7H ₂ O, 0.11 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O, 10 mg	CaCl ₂ ·6H ₂ O, 19 mg
H ₃ BO ₃ , 0.6 mg	MnCl ₂ ·2H ₂ O, 5 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O, 19 mg	ZnCl ₂ , 4.2 mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O, 0.2 mg	NiCl ₂ ·6H ₂ O, 2.4 mg
NiCl ₂ ·6H ₂ O, 0.4 mg	NaMoO ₄ ·2H ₂ O, 1.8 mg
NaMoO ₄ ·2H ₂ O, 3.6 mg	H ₃ BO ₃ , 30 mg
HCl (25%), 1 ml	CuCl ₂ ·2H ₂ O, 0.2 mg

La solució, un cop formulada, s'esterilitza per filtració i es conserva a 4°C.

1.1.3. Solució de refeeding dels enriquiments i cultius

S'utilitza el terme *refeeding* per a donar nom a l'aportació periòdica de donador d'electrons (H_2S o S_2O_3^-) i font de carboni (CO_3^-) al medi de cultiu durant el període d'incubació. Aquests compostos disminueixen la seva concentració en el medi per l'efecte del consum dels microorganismes. La composició de la solució és:

H_2O destil·lada, 500 ml

$\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 12 g

Na_2CO_3 anhidre, 4,5 g

Preparació de la solució de refeeding

1. Desgasificar (per ebullició) aigua destil·lada durant 10 minuts (700 ml aprox.)
2. Hidratar els cristalls de sulfhídric
3. Pesar els components de la solució per separat
4. Dissoldre els components en una ampolla especial per a la preparació de medi. Treballar sota pressió de N_2 .
5. Ajustar el pH a 7 amb HCl concentrat.
6. Dispensar la solució en tubs de 10 ml.
7. Autoclavar i tancar bé els tubs per evitar la oxidació del sulfhídric.
8. Conservar a 4 °C.

1.1.4. Inoculació de cultius líquids i condicions d' incubació

Amb independència de l'origen de les poblacions de BFA que volem fer créixer, cultiu purs o mostres naturals per a enriquiments, és en general recomanable que el volum d'inòcul no sigui inferior al 5% (V/V). Això garanteix, en la majoria dels casos, un volum d'inòcul suficient per assegurar la viabilitat de les poblacions que volem cultivar. Durant el període de incubació cal assegurar l'aportació periòdica de donador d'electrons (H_2S o S_2O_3^-) i font de carboni (CO_3^-) (veure solució de *refeeding*). L'esgotament de la font de poder reductor es pot intuir quan els cultius han perdut la textura lletosa (degut a l'oxidació de H_2S i el conseqüent alliberament de S^0 al medi).

L'enriquiment de les poblacions de BVS en el laboratori es pot aconseguir amb relativa facilitat si s'utilitzen mostres d'ambients aquàtics anòxics (aigua, fangs o

sediment). En el disseny experimental cal contemplar diferents estratègies d'enriquiments (condicions de incubació) a partir d'una mateixa mostra si es vol afavorir la diversitat d'espècies recuperades. D'altra banda, les soques aïllades podrien correspondre a un patró uniforme, que a més a més pot no ser el mateix que domina en les condicions naturals. Així, es poden variar diferents paràmetres com ara la intensitat i qualitat de la llum (llum de fluorescent o de tungstè com també l'aplicació de filtres selectius per determinades longituds d'ona), la temperatura, la concentració de sulfhídric, addició de tiosulfat o altres compostos reduïts del sofre, addició de determinats agents reductors (com el ditionit de sodi; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), la concentració i composició de sals, el pH i es poden afegir diferents suplementos orgànics que poden afavorir el desenvolupament de determinades soques. En general les intensitats de llum elevades ($50\text{-}200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, llum de fluorescent) i temperatures entre $30\text{-}35^\circ\text{C}$ són selectives per les soques de pigmentació verda (Overmann, 2000). Els valors de intensitat de la llum entre $20\text{-}50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ no són considerats selectius en el procés d'enriquiment. Les espècies d'aigua dolça que presenten vacúols, com ara *Chlorobium clathratiforme* i *Ancalochloris perfilievii* han estat enriquides amb èxit només a concentracions baixes de sulfhídric ($\leq 2 \text{ mM}$), baixes temperatures ($\leq 20^\circ\text{C}$) i intensitats de llum baixes ($10\text{-}20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (Overmann, 2000, 2001). L'enriquiment de BVS a partir de mostres que presenten una proporció clarament dominant de BPS es pot aconseguir amb intensitats de llum baixes ($0.5\text{-}5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, llum fluorescent) (Overmann et al., 1991). Paral·lelament, en treballs anteriors (Abella and Garcia-Gil, 1988) també va ésser descrita la jerarquia de paràmetres ambientals (intensitat de llum, la qualitat de llum i la concentració de sulfhídric) que poden afavorir la selecció d'una determinada espècie en cultiu a partir de diferents ambients d'origen. Els BVS es poden seleccionar a partir de intensitats de llum baixes ($< 0.01 \%$ llum incident en la superfície); la qualitat de llum determinaria l'enriquiment d'espècies de pigmentació verda (llum predominant de la banda espectral de blau-verd) o marró (banda espectral del verd-groc, part central de l'espectre); i el sulfhídric en elevades concentracions determinaria l'enriquiment de les espècies del gènere *Chlorobium* i *Prosthecochloris* (en general les espècies que no presenten vacúols de gas), mentre que en baixes concentracions s'afavoriria el creixement de les espècies mòbils anteriorment classificades dins el gènere: '*Pelodictyon*' (que presenten vacúols de gas) i les diferents variants de consorcis fotosintètics.

1.1.5. Mètode per a la purificació i aïllament de BFS: Dilucions seriades en agar-shakes

L'aïllament de BFS per a l'obtenció de cultius d'aïllats purs s'ha realitzat en base a dilucions seriades en medi mineral semisòlid (agar al 0,3%), conegut també com a *agar-shakes*. Amb aquest mètode s'han processat diferents tipus de mostres: ambientals, d'enriquiments, o colònies aïllades. El mètode va ser descrit per Van Niel (Van Niel, 1971), i va ser posteriorment modificat per Widdel (1983) i Pfennig i Trüper (1992). Per a l'obtenció de cultius purs d'aïllats és aconsellable repetir el procés un mínim de 3 vegades consecutives. El procés descrit ha estat també utilitzat amb èxit en el recompte de les poblacions de BFA. Constitueix un mètode eficaç per a l'aïllament directe de les poblacions dominants en un ambient determinat, que per altra banda, en un procés d'enriquiment previ podrien ésser desplaçades per altres poblacions amb una major eficiència a créixer en el medi de cultiu sintètic.

Preparació del Medi

Preparar una solució d'agar al 3,3 % (es preveuen unes pèrdues del 10 % durant el procés, així la concentració d'agar al final és del 3 %)

1. Pesar 3.3 g d'agar. Dissoldre l'agar en un *erlenmeyer* o proveta amb 100 ml d'aigua destil·lada. Agitar i un cop dissolt, deixar precipitar.
2. Decantar el contingut d'aigua.

Repetir els passos a) i b) fins a 6 vegades. En els primers rentats afegir 2 ml d'*etanol* absolut (amb la finalitat de rentar els lípids).

3. Dissoldre la solució (100 ml) al microones fins que el contingut sigui transparent; procurar no bullir la solució.
4. Repartir l'agar en tubs, afegint 3 ml a cada tub. L'agar solidifica a 45 °C, per tant a l'hora de repartir podem mantenir-lo en un bany a 50-55 °C. Tapar els tubs.
5. Esterilitzar a l'autoclau.

Addició del medi mineral

En aquest pas és necessari disposar del medi mineral desitjat preparat amb anterioritat.

1. Mantenir els tubs amb agar en un bany a 100 °C, per tal de fondre l'agar. El medi mineral s'ha de mantenir en un altre bany a 50 °C.
2. Afegir en els tubs amb agar, 7 ml de medi mineral.
3. Homogeneïtzar ràpidament per inversió (*shake*).
4. Guardar els tubs durant el procés en un bany a 50 °C per evitar la solidificació de l'agar mentre s'espera per a la inoculació del medi.

Inoculació del medi semisòlid

S'han utilitzat els tubs que contenen la barreja d'agar i medi mineral (semisòlid) per a preparar una sèrie de dilucions a partir de la mostra desitjada. Cada sèrie ha estat constituïda de 7 o 8 tubs. El volum d'inòcul inicial pot variar en relació a la densitat cel·lular de la mostra a processar. Generalment entre 50-100 µl de la mostra han estat suficients.

1. Sempre treballant a prop de la flama, fer dilucions a partir del primer tub, aportant un volum de 1 ml en els tubs successius. Procurar homogeneïtzar per inversió cada cop que s'inocula un tub. És important treballar ràpid per evitar la solidificació del medi durant la inoculació.
2. Deixar solidificar a temperatura ambient.
3. Substituir l'atmosfera d'aire del tub per N₂ o una barreja de N₂ i CO₂. Opcionalment es pot afegir una sobrecapa de parafina:vaselina (1:3; v/v) prèviament esterilitzada.
4. Mantenir els tubs inoculats a la foscor durant 12-16 h abans d'incubar a la llum.

Passat un període de temps de incubació, variable en funció de la mostra (1-2 mesos), es podrà observar en els tubs el creixement de colònies aïllades.

Extracció de les colònies de microorganismes

Cal escollir les colònies més crescudes i millor aïllades en la sèrie de tubs de cultiu de la mostra.

1. Retirar el tap de parafina:vaselina (si existeix) a la flama.
2. Localitzar la colònia desitjada. Si la colònia es localitza en el fons del tub cal retirar l'excés d'agar per ebullició fins a mig centímetre de la colònia en qüestió.
3. Extreure la colònia amb una pipeta *Pasteur* estèril (de punta capil·lar) amb l'ajuda d'una lupa binocular.
4. Resuspendre la colònia extreta amb un volum petit de medi mineral Pfennig (0,1-0,3 ml) en un tub *ependorf*.
5. Observar al microscopi la morfologia i la puresa de la colònia extreta. Identificació tentativa segons el criteri de Bergey's (Pfennig i Trüper, 1989a; 1989b; Overmann, 2001).
6. Prosseguir segons la puresa observada. Les colònies pures es poden provar de cultivar en medi líquid. És aconsellable realitzar una sèrie de purificació encara que la colònia en qüestió sembli pura, d'aquesta manera, en cas de detectar microorganismes contaminants ja es disposarà d'una sèrie de purificació en estat de creixement avançat.

1.2. Preservació de les soques de BVS

1.2.1. Introducció

Les dificultats en el cultiu i manteniment d'aquests microorganismes (i per extensió de tots els grups de bacteris fotosintètics anoxigènics) és ben coneguda (Van Niel, 1971; Pfennig and Trüper, 1981). Tot i que, els medis i mètodes per a l'aïllament i cultiu han millorat considerablement i presenten una bona eficiència per a la recuperació i cultiu dels diferents membres del grup de BVS (Imhoff, 2001b), la preservació i manteniment dels cultius han presentat certs problemes (Malik, 1991). Generalment els cultius són mantinguts vius en medi líquid i alimentats periòdicament aportant font de carboni i poder reductor (*refeeding*). Aquest procés però, pot comportar una despesa de temps considerable i és, a més, susceptible de provocar contaminacions i variacions fenotípiques a les soques per mutacions.

La criopreservació de microorganismes amb nitrogen líquid (-196 °C) pot ésser un mètode bo per a la conservació a llarg termini; generalment és considerat el més eficient de tots els mètodes. Altres, com ara la liofilització (*freeze-drying*) o *liquid-drying* (Malik, 1992) en condicions anaeròbiques o simple emmagatzament a -30 °C, han presentat també una bona viabilitat i estabilitat de les soques. El mètode és simple, efectiu i econòmic en relació a l'espai i el cost. No són necessàries cambres d'anaerobiosi, subministrament continu de nitrogen gas ni equip de liofilització o bomba de buit.

El mètode de criopreservació ha estat adaptat a partir dels procediments utilitzats per la *Deutsche Sammlung von Mikro-organism und Zellkulturen* (DSMZ) per al manteniment dels bacteris fototròfics (Malik, 1991). Totes les soques existents de bacteris fototròfics en la col·lecció de la DSMZ han estat preservades amb èxit per aquest mètode.

1.2.2. Preservació de les soques de BVS a intervals curts

La preservació durant períodes de temps curts (de 3 o 4 mesos) es pot aconseguir si es mantenen els cultius a les fosques i a 4°C (Overmann, 2000). Cal assegurar que el cultius que es volen preservar presenten una densitat cel·lular elevada (aquest fet pot afavorir-ne la recuperació) i que la font de poder reductor (H₂S) s'ha consumit totalment. Abans d'excedir el temps recomanat de preservació cal revifar els cultius amb l'addició de font de poder reductor i font de carboni (addició de solució de *refeeding*) i incubar-los en les condicions de llum adequades: en un primer moment, llum crepuscular durant un període de temps prudencial (generalment 12-24 h per una millor adaptació dels cultius), posteriorment es podran incubar a intensitats de llum saturants (50-100 μE·m⁻²·s⁻¹). Finalment, després del consum de totes les formes reduïdes de sofre es pot iniciar altre cop el procés descrit.

1.2.3. Mètode per a la preservació de les soques de BVS per congelació en condicions anaeròbiques

La temperatura de congelació utilitzada en el procés ha estat de -80°C. Aquestes condicions es poden garantir el manteniment i estabilitat de les soques per períodes llargs de temps que comprenen una escala anual (> 3 anys). La viabilitat després d'un cicle de congelació dels cultius aïllats en aquest treball ha estat avaluada a partir de l'aplicació del procediment de recuperació descrit. Tots els cultius testats han pogut ésser recuperats després de l'aplicació del protocol.

Material

- Vials de 2 ml amb tap roscat negre amb halo per a la injecció i *septum* de butil (indicats per al treball en condicions anaeròbiques). Les ampolles són rentades i esbandides amb aigua destil·lada. Es tanquen sense rosca fort i s'autoclaven.
 - Poden ser utilitzats diferents agents crioprotectors com glicerol o dimethylsulphoxide (DMSO) i trehalosa. Totes les solucions es prepararan amb Medi Pfennig com a diluent. En les soques halòfiles cal mantenir la concentració de NaCl òptima per al creixement.
- Solucions d'agents crioprotectors
 - Solució de glicerol (20 % w/v en medi mineral Pfennig). La solució mare de glicerol pot ser esterilitzada per filtració.
 - Solució DMSO (20 % v/v en medi mineral Pfennig). La solució mare és esterilitzada per filtració (filtre teflon) o pot ser autoclavada a 114 °C durant 10 min.
 - Solució de trehalosa (5 % w/v en medi mineral Pfennig). La solució mare pot ser esterilitzada per filtració.
 - Altre material per al procés: tub de butil, sistema de filtració de gasos estèril, agulles de xeringa curtes i llargues i adaptadors per a tub i xeringa i font de N₂ gas.

Preparació de la suspensió cel·lular per a congelar

1. Inocular dels cultius en tubs roscats amb tap negre amb halo i contratap de butil.
2. Incubar a temperatura ambient, amb la il·luminació adequada i realitzar els *refeeding* dels cultius fins a obtenir una elevada densitat.
3. Els cultius crescuts són centrifugats 30 min a 4000 g.

4. Transferir el sobrenedant sota pressió de N₂ gas (flux estèril) amb l'ajuda d'una agulla de xeringa (10-15 cm) i un tub de butil per a l'evacuació. Durant el procés el *pellet* es manté en condicions d'anaerobiosi (figura A1-2).
5. Afegir una solució de crioprotector (2-2,5 ml) amb una xeringa estèril i lliure de oxigen. Incubar les suspensions en un bany de gel (15 min amb la solució de DMSO i 30 min amb solució de glicerol i trehalose) per equilibrar el crioprotector.

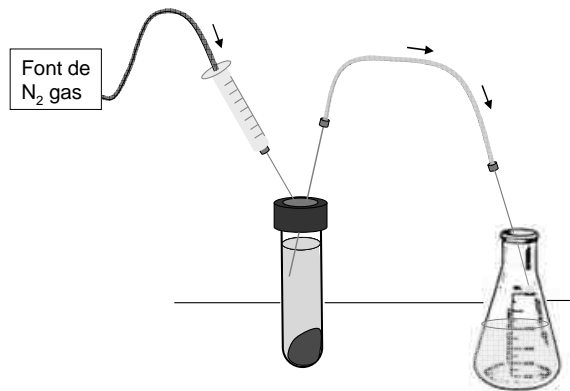


Figura A1-2. Representació esquemàtica del procés de transferència del sobrenedant en condicions anaeròbies. Les fletxes indiquen la direcció del flux de gas o líquid.

Càrrega dels vials i congelació

1. Evacuar tot l'aire dels vials amb una xeringa de 5-10 ml per tal de generar les condicions de buit i anaerobiosi en els vials. Amb aquest pas també facilitem la recàrrega dels vials.
2. Transferir 1 ml de suspensió equilibrada amb una xeringa estèril lliure d'oxigen.
3. Tancar immediatament les ampolles. Segellar amb *parafilm*.
4. Congelar a -30 °C durant 1 h.
5. Congelar a -80 °C. Els cultius congelats es poden mantenir estables a llarg termini (períodes de temps d'escala anual).

Recuperació de cultius

1. Els vials congelats són parcialment descongelats per una immersió ràpida (10 segons) en un bany a 37 °C (submergir fins al coll del vial).
2. Esterilitzar el *septum* amb una gota d'alcohol i flama.
3. Extreure un petit volum (0,05-0,1 ml) de la suspensió amb una xeringa estèril lliure d'oxigen i transferir-lo en un tub de 10 ml de medi de cultiu.
4. Congelar la resta de la suspensió (parcialment descongelada). Cada ampolla pot ser utilitzada per més d'una inoculació.

En aquest procés també es vol aconseguir diluir l'agent crioprotector a l'ordre de 100 vegades. El DMSO pot ésser tòxic pel cultiu a temperatura ambient.

Estimació de la viabilitat dels cultius

El percentatge de supervivents és calculat a partir de la comparació de recomptes de cèl·lules viables abans i després de congelar. Per a la determinació es pot utilitzar els mètodes estàndards de recompte en placa (en condicions d'anaerobiosi) o dilucions seriades en *agar-shakes*. Per contra, en espècies en què el creixement sobre o dins l'agar sigui difícil es pot utilitzar la tècnica del NMP (dilucions només en medi líquid). Pel recompte, 0,5 ml de la suspensió cel·lular -líquida abans de congelar o parcialment descongelada després de la congelació- es dilueixen amb 4,5 ml de medi fresc (Pfennig) i es procedeix a diluir la suspensió fins a valors de 10^{-6} o 10^{-8} respecte la mostra original. Alternativament, per a comprovar la viabilitat dels cultius pot realitzar-se un procés de *recuperació de cultius* després del procés de congelació, tot i que en aquest cas l'estimació no té un valor quantitatiu.

Transport

Pel transport, cal mantenir els cultius congelats a ≈ -30 °C (inclosos en gel sec) en un sistema d'emalatge que permeti un bon aïllament tèrmic (caixa poliestirè expandit; *porexpan*).

Metodologia II. Mètodes de biologia molecular basats en l'estudi del DNA i anàlisi bioinformàtica.

Índex

2.1. Extracció de DNA genòmic.....	274
2.1.1. Introducció.....	274
2.1.2. Obtenció de concentrats cel·lulars.....	274
2.1.3. Procediment d'extracció.....	274
2.2. Quantificació de DNA.....	276
2.2.1. Quantificació espectrofotomètrica.....	276
2.2.2. Quantificació per fluorescència amb el <i>Picogreen</i> ® dsDNA Quantitation Reagent Kit.....	277
2.3. Reacció en Cadena de la Polimerasa: <i>PCR</i>	278
2.3.1. Introducció.....	278
2.3.2. Condicions de treball.....	278
2.3.3. Encebadors.....	279
2.3.4. La reacció d'amplificació: preparatius i programes de temperatures dels cicles.....	283
2.3.4.1. Amplificació del gen 16S rDNA.....	284
2.3.4.2. Amplificació del gen Lisina-2,3-aminomutasa.....	285
2.3.5. <i>Nested PCR</i>	286
2.3.6. Validació dels extractes de DNA.....	286
2.4. Electroforesi en gel d'agarosa.....	288
2.5. Mètodes de neteja i purificació de productes de <i>PCR</i>	289
2.6. DGGE: Separació de productes de <i>PCR</i>	290
2.6.1. Introducció.....	290
2.6.2. Preparació del gel.....	291
2.6.3. Càrrega de les mostres i condicions d'electroforesi.....	292
2.6.4. Elució del DNA contingut en les bandes dels gels de poliacrilamida.....	293
2.7. Seqüenciació de DNA.....	293
2.7.1. Introducció.....	293
2.7.2. Seqüenciació amb <i>ddNTP ABI PRISM</i>	294
2.8. Anàlisi de les seqüències.....	297
2.8.1. Construcció d'una seqüència unitària consens a partir dels fragments <i>forward</i> i <i>reverse</i>	297
2.8.2. Comparació de les seqüències en les bases de dades.....	297
2.8.3. Avaluació de la qualitat de les seqüències obtingudes.....	297
2.8.4. Anàlisi comparativa de les seqüències del 16S rDNA.....	298
2.8.4.1. Alineament de les seqüències.....	298
2.8.4.2. Construcció d'arbres filogenètics.....	299
2.8.5. Mètodes d'anàlisi comparativa de seqüències peptídiques.....	301
2.9. Solucions estoc i reactius utilitzats en l'anàlisi molecular.....	302
2.9.1. Extracció de DNA genòmic.....	302
2.9.2. Quantificació de DNA per <i>Picogreen</i> ®.....	303
2.9.3. Electroforesi amb gel d'agarosa.....	303

2.1. Extracció de DNA genòmic

2.1.1. Introducció

L'extracció de DNA genòmic de les mostres naturals i enriquiments s'ha realitzat per mitjà de la tècnica d'extracció amb fenol/cloroform descrita per Moore (Moore, 1996). Aquest mètode es basa en la capacitat de desnaturalització i solubilització de proteïnes en fenol (Kiriby, 1957) i amb la dissolució del DNA en una fase aquosa que el manté separat de la fase orgànica (Marmur, 1961). La precipitació del DNA s'ha realitzat amb l'addició d'etanol i sals (Sambrook, 1989). Posteriorment s'ha netejat amb etanol al 70% i s'ha precipitat per centrifugació (Shapiro, 1981).

2.1.2. Obtenció dels concentrats cel·lulars

Per a l'obtenció dels concentrats cel·lulars s'han centrifugat entre 100 i 500 mL de mostra a 10000 rpm durant 20 minuts amb una centrífuga SORVAL RC-5B. Posteriorment, el sediment de centrifugació s'ha recollit en tubs *ependorf* de 2 mL, i s'ha resuspès amb 0,34 mL de tampó de llisi (LB) (veure apartat 2.9.1.). El concentrat cel·lular s'ha conservat a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fins al moment de l'extracció del DNA genòmic.

Com a alternativa a aquest procés es pot concentrar la mostra a partir de la filtració d'un volum conegut amb filtres de policarbonat de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ de diàmetre de porus (Isopore®, Millipore). El filtre s'ha dipositat en un tub *ependorf* i s'hi ha afegit 0,34 mL de tampó de lisi (LB). Els concentrats s'han conservat a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fins al moment de l'extracció. El filtre es dissol durant el procés i no interfereix en el rendiment final de l'extracció.

2.1.3. Procediment d'extracció

De manera prèvia al protocol d'extracció, es poden sotmetre les mostres a 5 cicles de congelació a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ i descongelació en un bany a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ per tal d'augmentar el rendiment de l'extracció de DNA de les mostres naturals i enriquiments.

El protocol d'extracció (fenol/cloroform) seguit ha estat el següent:

1. Descongelar els concentrats cel·lulars.
2. Afegir $10\text{ }\mu\text{L}$ lisozim d'una solució ($35\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) preparada recentment amb tampó de lisi (LB). La concentració final és de $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Aquest pas permet una digestió parcial de les membranes bacterianes fet que incrementa l'eficiència de l'extracció (Smalla, 1993).

3. Incubar en un bany a 37 °C durant 45'. Agitar vigorosament (*vortex*) els tubs a intervals de 10'.
4. Afegir 10 µL de proteïnasa K d'una solució (8µg·µL⁻¹) preparada recentment amb tampó LB. La concentració final és de 0,2 mg·mL⁻¹.
5. Afegir 40 µL d'una solució SDS (*sodium dodecyl sulfate*) al 10% (wt/v). La concentració final en el llisat és de 1%.
6. Incubar en un bany a 55 °C durant 1 h. Vortejar els tubs a intervals de 10'.

El tractament físic de congelació i descongelació, la digestió enzimàtica amb el lisozim i proteïnasa K i el tractament químic amb SDS provoca la lisi de les cèl·lules i l'alliberació del contingut cel·lular.

7. Afegir 400 µL de PCI (fenol-cloroform-alcohol isoamílic, 25:24:1, v/v/v; pH 8). Barrejar per inversió durant 3-4' per tal d'emulsionar.
8. Centrifugar a 10.000 rpm durant 10'.
9. Transferir l'epifase a un nou tub estèril (*ependorf*). Repetir el pas nº7.
10. Rentar l'extracte amb 400 µL de la solució de CI (Cloroform-alcohol isoamílic, 24:1; v/v)
11. Centrifugar a 10.000 rpm durant 10'.
12. Transferir l'epifase a un nou tub estèril.
13. Afegir 40 µL d'una solució d'acetat sòdic 3M i barrejar per inversió.
14. Afegir 1 mL d'etanol fred (100%) i barrejar curosament per inversió. Alternativament es pot utilitzar isopropanol per a la precipitació del DNA (Wilson, 1994).
15. Guardar els extractes a -20 °C durant un mínim de 2 h (o tota la nit).
16. Centrifugar els tubs a 12.000 rpm durant 10'.
17. Aspirar l'etanol amb cura de no resuspendre el sediment de centrifugació.
18. Rentar el sediment de centrifugació amb 750 µL d'etanol fred (70%). Centrifugar durant 1-2' a 10.000 rpm (opcional).
19. Aspirar l'etanol al 70 % amb cura de no resuspendre el sediment de centrifugació. Deixar evaporar les restes d'etanol a 37 °C durant 15'.
20. Redissoldre el sediment de centrifugació de DNA amb 25-50 µL d'amortidor Tris-HCl 10mM pH 8, alternativament aigua Milli-Q estèril.

L'extracció del DNA genòmic dels cultius purs s'ha realitzat per mitjà del kit comercial de purificació WizardTM Genomic DNA (Promega). Durant el procés s'han seguit les especificacions d'ús del fabricant. Alternativament es pot aplicar un procés

de tractament físic (congelar-descongelar), descrit anteriorment. Tot i així, aquest últim no es aconsellable quan es volen aconseguir extractes amb un grau elevat de puresa.

2.2. Quantificació del DNA

2.2.1. Quantificació espectrofotomètrica

La concentració i puresa final del DNA genòmic extret s'ha determinat espectrofotomètricament (Shimadzu UV 2501 PC) amb una cubeta de quars d'1 cm de pas òptic. S'ha realitzat un espectre d'absorbància amb un rang de 220 nm a 320 nm. A partir de l'espectre s'han mesurat les absorbàncies a 230, 260 i 280 nm (A_{230} , A_{260} , A_{280} respectivament). La mesura analítica de la puresa del DNA s'ha determinat mitjançant la relació d'absorbàncies A_{260}/A_{280} (Sambrook, 1989). Si la relació està entre 1,8 i 2,0 la preparació de DNA es considera pura (Gallagher, 1989). Alhora, una relació $A_{260}/A_{280} > 2,2$ indica un bon grau de desproteïnitació. Per contra, si la relació d'absorbàncies és inferior a 1,8 indica la presència d'inhibidors potencials com ara àcids húmics (que donen una coloració de tonalitat marró a l'extracte), proteïnes o fenol (A_{230}). Aquest inhibidors es poden eliminar per mitjà d'un procés d'extracció addicional, la realització d'un pas afegit de precipitació amb etanol o un procés de purificació per ultrafiltració (Devereux and Wilkinson, 2004). La presència d'inhibidors en l'extracte final pot induir resultats d'amplificació negativa falsos (falsos negatius). Per controlar aquest tipus d'error en les reaccions d'amplificació (PCR) cal afegir controls interns (una alíquota de DNA que es pot amplificar en les condicions donades), a més a més del volum d'extracte utilitzat com a DNA motlle; un resultat negatiu d'amplificació, en aquestes circumstàncies, indica la presència d'inhibidors en la barreja de la reacció. Alternativament, es pot comprovar la qualitat de l'extracte quan s'utilitza aquest mateix en una reacció d'amplificació inespecífica (veure apartat 2.3.6.).

Per calcular la concentració de DNA genòmic ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) cal multiplicar l' A_{260} per un factor de 50, ja que una concentració aproximada de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de dsDNA correspondria a una DO d'1 (Sambrook, 1989).

2.2.2 Quantificació per fluorescència amb el Picogreen® dsDNA Quantitation Reagent Kit

El reactiu *Picogreen*® és un fluorocrom que s'adhereix al dsDNA. La quantificació per fluorescència permet detectar i mesurar amb molta precisió petites quantitats de dsDNA que no són possibles de detectar espectrofotomètricament. Per altra banda, la fluorescència mesurada prové en la seva major part del dsDNA, per la qual cosa no es mesura el ssDNA ni l'RNA presents a la mostra (Kleppe, 1971; Mullis, 1987; Saiki, 1988; Sambrook, 1989). Per contra, la utilització d'aquest mètode no permet obtenir les mesures analítiques de determinació de la puresa del DNA, tal i com s'ha realitzat amb la tècnica de quantificació per espectrofotometria. Les mostres són excitades amb una longitud d'ona de 460 nm i es mesura la fluorescència a 540 nm. El protocol d'utilització del *Kit* ha estat el següent:

1. Dipositar 1-5 µL de l'extracte de DNA en un *ependorf*. Per a la calibració interna s'utilitza una solució estàndard de DNA d'esperma de salmó (100 µg·mL⁻¹).
2. Afegir tampó TE fins a un volum final de 900 µL per cada mostra. Mesclar molt bé.
3. Afegir 100 µL de la solució de *Picogreen*® que prèviament s'ha de diluir 40 vegades. Mesclar molt bé.
4. Incubar 10' a la foscor.
5. Mesurar a l'espectrofluorímetre l'emissió de fluorescència a 540 nm. La concentració de DNA es calcula a partir d'una recta patró realitzada amb estàndards de concentració coneguda.

Durant la realització del protocol és necessària la utilització de guants de nitril (Touch N Tuff) ja que el *Picogreen*® està catalogat com a cancerigen.

Un cop determinada la puresa i concentració dels extractes de DNA per mitjà de la combinació de les tècniques anteriorment descrites, s'han fet alíquotes de tots els extractes a una concentració de DNA de 25 ng·µL⁻¹ (concentració apropiada per a la utilització dels extractes com a DNA motlle en la reacció de PCR), utilitzant la mesura de concentració determinada per la tècnica de *Picogreen*® com a valor de referència. Generalment, per a la reacció de PCR són necessaris entre 10 i 50 ng de DNA genòmic.

2.3. Reacció en cadena de la polimerasa: PCR

2.3.1. Introducció

Les bases teòriques de la reacció en cadena de la polimerasa foren exposades per primer cop per (Klepe, 1971) i posteriorment es va utilitzar com a tècnica per generar gran quantitat de gens de còpia única a partir del DNA genòmic (Mullis and Faloona, 1987; Saiki, 1988). La reacció en cadena de la polimerasa és un procediment ràpid per l'amplificació *in vitro* d'un segment específic de DNA. Cada element de la PCR pot afectar l'eficiència de l'amplificació. Així, es poden considerar diferents paràmetres:

- La puresa dels reactius.
- La distància complementarietat, longitud i seqüència dels oligonucleòtids.
- La quantitat i la puresa del DNA motlle.
- El tipus d'enzim.
- La concentració de sals.
- La concentració de desoxiribonucleòtids trifosfatats (dNTPs).
- Les temperatures i temps de desnaturalització, aparellament i extensió del cicle tèrmic.

Tots aquests factors han de ser avaluats i s'han de programar amb cura abans de dur a terme qualsevol intent d'amplificar un gen de DNA (Innis and Gelfand, 1990), especialment quan es treballa amb encebadors degenerats (en el cas que ens ocupa: els encebadors utilitzats per a l'amplificació del gen presumptivament relacionat amb la codificació de Lisina-2,3-aminomutasa en BVS).

2.3.2. Condicions de treball

Per tal de minimitzar la possibilitat d'amplificacions inespecífiques a causa de molècules de DNA contaminant, la preparació de la barreja de la reacció s'ha realitzat en una vitrina de flux laminar prèviament irradiada amb llum UV, juntament amb tot el material a utilitzar, durant un mínim de 15 minuts. Tot el material ha estat esterilitzat a l'autoclau i s'ha utilitzat exclusivament per a la PCR. S'ha utilitzat un joc de pipetes automàtiques exclusivament per a aquest procés; s'han fet servir puntes amb filtre.

2.3.3. Encebadors

En l'estudi s'han utilitzat diferents parelles d'encebadors. Per al 16S rDNA, una parella d'encebadors universals i dues d'específiques per al grup dels BVS. Per a l'amplificació del gen presumptiu de la síntesi de Lisina-2,3-aminomutasa, s'han dissenyat i avaluat diferents parelles d'encebadors degenerats.

Els encebadors han estat sintetitzats i posteriorment purificats per cromatografia de fase reversa per la casa comercial (TIB Molbiol), posteriorment -ja en el laboratori- han estat alíquotats a una concentració de $10 \text{ pmols}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ($10 \mu\text{M}$) i en petits volums ($25 \mu\text{L}$) per afavorir la conservació de la solució mare; d'altra banda, els successius processos de congelació i descongelació poden provocar el trencament i pèrdua de qualitat dels oligonucleòtids. Les alíquotes s'han conservat a -20°C .

Encebadors del 16S rDNA universals

Els encebadors universals són oligonucleòtids sintètics de seqüència complementària a zones conservades a l'inici i al final del gen del 16S rRNA, presents a la pràctica totalitat dels *Bacteria*. La parella d'encebadors ha permès amplificar fragments d'aquest gen d'aproximadament 1500 pb de qualsevol *Bacteria* present en l'extracte de DNA inicial. La parella d'encebadors formada per Eub27f i Eub1492r correspon a una modificació dels encebadors D1 i P1 (Weisburg et al., 1991). La modificació consisteix en l'eliminació de la zona *polylinker* (la qual conté múltiples dianes de restricció) de l'encebador, fet que no afecta a la zona d'hibridació.

Encebador Eub27f:

5' – AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG – 3'

La regió de la hibridació es correspon a les posicions 8 a 27 respecte a la numeració d'*Escherichia coli* (Brosius et al., 1978). El contingut G+C és del 50% i la temperatura d'aparellament (T_a) és de 55°C . La T_a s'ha obtingut de restar 5°C a la T_d calculada amb l'expressió de Suggs (Suggs et al., 1981).

Encebador Eub1492r:

5' – ACG CTT ACC TTG TTA CGA CTT – 3'

La regió de la hibridació es correspon a les posicions 1492 a 1513 respecte a la numeració d'*E. coli* (Weisburg et al., 1991). El contingut G+C és del 43% i, igual que la seva parella, presentava una T_a de 55°C .

Encebadors del 16S rDNA específics per al grup de BVS

Els encebadors específics són oligonucleòtids sintètics de seqüència complementària a zones variables pel conjunt dels *Bacteria*, però conservades en el grup específic del que es vol obtenir el fragment amplificat del 16S rRNA. En relació al tipus d'anàlisi efectuada, PCR específica i posterior separació dels productes d'amplificació per electroforesi en gel de poliacrilamida amb gradient desnaturalitzant (DGGE), ha estat necessari afegir un fragment de guanines i citosines (GC clamp) en l'extrem 5' d'un dels encebadors. La finalitat i funció d'aquesta modificació s'explica en l'apartat 2.6.1..

Encebador GCEub341f:

5' – CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CCC
TAC GGG AGG CAG CAG – 3'

La regió d'hibridació es correspon a la posició 341 a 356 respecte a la numeració d'*E.coli* (Muyzer et al., 1993). La part subratllada correspon a la seqüència de guanines i citosines (GC clamp) afegida al encebador per tal de poder separar el producte amplificat per DGGE. La temperatura d'anellament és de 50 °C. La seqüència de GC no s'ha considerat en el càlcul de la Ta.

Encebador GSB822r:

5' – ATG ACC AAC ATC TAG TAT – 3'

La regió d'hibridació es correspon a la posició 822 a 839 respecte a la numeració d'*E.coli* (Overmann et al., 1999a). El contingut G+C és de 31,6% i presenta una Ta de 50 °C.

Encebadors GS.619f i GS.1144r-GC:

GS.619f: 5' – GGGGTAAATCCATGTGCT – 3'

GS.1144r-GC: 5' – CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGCCCGCCCGCCCCGCCC
CAGTTCARTTAGAGTCC– 3'

La regió d'hibridació es correspon, segons el cas, a la posició 619-638 o 1144-1161 respecte a la numeració d'*E.coli* en cada cas. La combinació d'aquest parell d'encebadors permet obtenir un producte d'amplificació de 525 pb. La Ta d'aquesta parella d'encebadors ha estat 55 °C, condició que ja va demostrar ésser efectiva en el treball corresponent a la seva descripció (Achenbach et al., 2001).

Encebadors degenerats

Aquest tipus d'oligonucleòtids es caracteritzen per presentar una barreja de d'encebadors de la mateixa longitud però amb diferent composició de bases (Compton, 1990), és a dir, hi ha determinades posicions que poden variar en la seva base, per tant es diu que presenten una certa degeneració (variable segons s'estableixi). Aquests s'utilitzen per a la recerca de gens nous o altres que no han estat encara ben caracteritzats. En el cas que ens ocupa, els encebadors degenerats han estat utilitzats per a l'amplificació del gen presumptiu de la Lisina-2,3-aminomutasa en BVS, enzim que al seu torn es relaciona amb la síntesi del solut compatible N^ε-acetil-β-lisina (Pflüger et al., 2003). Durant l'estudi també es van desenvolupar diferents dissenys i assaigs amb encebadors destinats a l'amplificació del gen presumptiu de la β-lisina-acetiltransferasa (segons pas de síntesi del compost d'interès) en BVS, malauradament, però, no va ésser possible obtenir cap resultat positiu. D'aquesta manera, aquests no han estat considerats en la descripció del capítol de resultats corresponent (veure capítol de resultats i discussió III).

Els encebadors degenerats es van dissenyar manualment a partir de diferents seqüències disponibles a les bases de dades DDBJ/EMBL/GenBank. En el treball de disseny dels encebadors, l'objectiu principal és poder obtenir una parella que s'hibridi eficaçment amb el DNA diana, és a dir, que permeti l'amplificació del fragment desitjat. Alhora, un bon disseny dels encebadors pot millorar l'eficiència i rendiment de la reacció (Devereux and Wilkinson, 2004). Els criteris de referència (recomanats) pel disseny d'encebadors van ésser detallats per Innis i Gelfand (Innis and Gelfand, 1990) i Saiki (Saiki, 1988). Aquests es poden concretar en:

- longitud del oligonucleòtid entre 18 i 24 bases
- extrems 3' no complementaris per evitar la formació de *primer-dimer*
- que no presentin una estructura interna secundària
- el contingut de G+C hauria d'estar comprès en el rang de 40-60%
- el valor de T_m dels encebadors hauria d'ajustar-se al rang de 55-65 °C

Per al disseny es van utilitzar les seqüències descrites de Lisina-2,3-aminomutasa en diferents espècies d'arquees metanogènics (Pflüger et al., 2003) i altres seqüències d'espècies que presentaven un grau elevat de similitud (seqüències candidates obtingudes a partir de l'anàlisi de BLAST; veure taula A2-1). A partir de l'alineament de les seqüències deduïdes de proteïna es van determinar les regions amb un elevat grau de conservació (regions consens) i es van dissenyar diferents parelles

d'encebadors, tenint en compte el tipus de *codon usage* determinat pel grup d'estudi (BVS). Entre les diferents parelles obtingudes es van escollir les que presentaven un menor grau de degeneració, temperatures d'aparellament similar i que permetien obtenir una longitud de fragment d'amplificació superior a les 500 bases. La probabilitat de interacció entre els encebadors (*hairpin*, formació de dímers i *crossdimer*), la presència de palíndroms i la temperatura de fusió de les parelles d'encebadors seleccionades van ésser avaluades per mitjà del *software* disponible *online* Oligo Analyzer v3.0 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). Existeixen, però, altres programaris a la xarxa que permeten realitzar anàlisis similars; només a tall de referència es podria indicar també el programari NetPrimer (PREMIER Biosoft International).

Taula A2-1. Llistat de seqüències utilitzades en el disseny dels encebadors degenerats (AM-for i AM-rev).

Microorganisme	gen	codi d'accés
<i>Methanococcus maripaludis</i> S2	KamA	NP_987981
<i>Methanosarcina acetivorans</i> str. C2A	MA3979	NP_618848
<i>M.mazei</i> Gö1	MM0934	NP_632958
<i>Clostridium subterminale</i> SB4	kamA	AAD43134
<i>Bacillus halodurans</i> C-125	BH2255	NP_243121
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str.168	kamA	NP_389850
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	BC_2251	NP_832014

L'especificitat dels encebadors dissenyats va ésser indirectament avaluada per mitjà d'anàlisis de BLAST (alineaments dels oligonucleòtids) en la seqüència del genoma de *Chlorobaculum tepidum* ATCC 49652^T - degut al caràcter limnòfil d'aquest representant del grup de BVS calia esperar un resultat negatiu en els alineaments-. Com a resultat de tot el procés cal destacar la parella d'encebadors: AM-for (5'-ACS CAY CGB TAY CCS GA-3') / AMrev (5'-CSG GSG CRT CSA CVA C-3') utilitzada per a l'amplificació del gen de Lisina-2,3-aminomutasa, la qual ha permès amplificar un fragment de 650 pb. El codi de degeneració és indicat en relació a la notació estàndard: R=A o G; S=C o G; Y=C o T; B=C o G o T; V=A o C o G.

2.3.4. La reacció d'amplificació: preparatius i programes de temperatura dels cicles

Les condicions de la reacció de PCR s'han definit a partir de les pautes generals (Innis i Gelfand, 1990; Giovannoni, 1991). S'ha treballat amb volums de reacció de 50 µL en microtubs de polipropilè de 200 µL de parets fines (QSP). S'ha utilitzat l'amortidor de reacció 10 x (Tris-HCl pH 8,8 100 mM, KCl 500 mM, Tritó X-100 1%) i la *Taq* DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* (Boehringer Mannheim). S'ha realitzat una barreja prèvia de tots els reactius, de volum variable, en funció del nombre de mostres. La barreja s'ha repartit en diferents tubs (tants com mostres), on finalment s'hi ha afegit el DNA motlle. S'han utilitzat generalment 25 ng de DNA motlle per a la reacció. Com a control negatiu s'ha utilitzat aigua Milli-Q estèril. Els volums de referència utilitzats en la preparació de la reacció d'amplificació es detalla a continuació, tot i així cal considerar les possibles modificacions derivades del procés d'optimització de la reacció:

Reacció d'amplificació

Amortidor de reacció (10x).....	5 µL
Solució MgCl ₂ (25 mM).....	3 µL
dNTP (10 mM).....	4 µL
Encebador <i>forward</i> (10 µM).....	1 µL
Encebador <i>reverse</i> (10 µM).....	1 µL
DNA polimerasa termoestable.....	1 U
Aigua Milli-Q estèril.....	fins a 49 µL
DNA motlle (25 ng µL ⁻¹).....	1 µL

Els programes de temperatures utilitzats en les reaccions d'amplificació han estat lleugerament diferents ja que depenen principalment de les característiques dels encebadors. Aquests programes s'han basat en protocols descrits anteriorment (Wilson et al., 1990; Weisburg et al.,1991) per amplificar el gen del 16S rDNA. Les amplificacions s'han realitzat en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems). Un cop finalitzada la reacció de PCR, una alíquota del producte (4 µL) s'ha fet córrer en un minigel d'agarosa per tal de confirmar la correcta amplificació (veure apartat 2.4.). El producte d'amplificació era posteriorment purificat (veure apartat 2.5.) i es guardava al congelador a -20 °C.

2.3.4.1. Programes de temperatures d'amplificació del gen 16S rDNA

Programa d'amplificació del 16S rDNA amb la parella d'encebadors universals (Eub 27f-Eub1492r)

1. 92 °C 2' Desnaturalització inicial
2. 94 °C 30'' Desnaturalització
3. 52 °C 1' Aparellament
4. 72 °C 2' Extensió
5. 72 °C 7' Extensió final
6. 4 °C (pausa) Conservació

Els tres passos cíclics del 2 al 4 s'han repetit 30 vegades.

Programa d'amplificació parcial del 16S rDNA amb la parella d'encebadors específics (semiespecífics) (GC341f-GSB822r)

1. 94 °C 2' Desnaturalització inicial
2. 94 °C 30'' Desnaturalització
3. 50 °C 1' Aparellament
4. 72 °C 1' Extensió
5. 72 °C 7' Extensió final
6. 4 °C (pausa) Conservació

Els tres passos cíclics del 2 al 4 s'han repetit 30 vegades.

Programa d'amplificació parcial del 16S rDNA amb la parella d'encebadors específics (GS.619f/GS.1144r-GC)

1. 94 °C 2' Desnaturalització inicial
2. 94 °C 30'' Desnaturalització
3. 55 °C 1' Aparellament
4. 72 °C 1' Extensió
5. 72 °C 7' Extensió final
6. 4 °C (pausa) Conservació

Els tres passos cíclics del 2 al 4 s'han repetit 30 vegades.

Programa d'amplificació parcial del 16S rDNA amb parelles d'encebadors específics (semiespecífics) (Eub 27f -GSB822r, GS.619f -Eub1492r)

Aquestes parelles alternatives d'encebadors han estat expressament utilitzades per a la seqüenciació de la totalitat del gen del 16S rRNA, per mitjà de la combinació de les seqüències obtingudes d'ambdós fragments amplificats, de les soques aïllades en cultiu pur. Els paràmetres del programa d'amplificació utilitzats han estat els mateixos que els descrits pels seus encebadors específics respectius.

2.3.4.2. Amplificació del gen de Lisina-2,3-aminomutasa

Per a l'adequació i optimització d'aquest mètode d'amplificació va ésser necessari avaluar diferents combinacions de paràmetres susceptibles de modificar l'eficiència de la reacció, entre els quals cal destacar la variació del contingut de sals ($MgCl_2$) i la temperatura d'aparellament utilitzada en el programa dels cicles. La concentració en solució de l'ió Mg^{2+} pot ésser decisiva tant en el rendiment de la reacció, ja que incideix en el nivell d'activació de l'enzim (Kramer and Coen, 2001), com en l'especificitat d'aquesta, en tant que els ions de Mg^{2+} poden formar complexos amb dNTPs, encebadors i el DNA motlle que afectin en l'aparellament dels oligonucleòtids amb les seves zones complementàries respectives. En general, concentracions massa baixes de l'ió Mg^{2+} pot resultar en un rendiment baix de la reacció (poca quantitat de producte d'amplificació), per contra una concentració massa elevada pot afavorir l'aparellament inespecífic dels encebadors i la incorporació errònia de nucleòtids (Kramer and Coen, 2001; Devereux and Wilkinson, 2004). D'aquesta manera es van avaluar diferents concentracions de $MgCl_2$ en la barreja: 1 / 1,5 / 2 / 2,5 / 3,5 mM de concentració final. Alhora, es va considerar la utilització d'un mètode de *touch down* en el programa de temperatura d'aparellament de la reacció. L'objectiu d'aquesta aplicació és generar unes condicions que afavoreixin una major especificitat durant els cicles inicials (temperatura d'aparellament per sobre de la T_a del encebador) i alhora un rendiment global de la reacció elevat, per mitjà de la disminució progressiva de la temperatura d'aparellament en el transcurs de la reacció.

El fragments d'amplificació que presentaven una longitud de seqüència dins el rang esperat van ésser purificats (QIAquick Gel Extraction Kit) i posteriorment clonats per mitjà de pGEM-T vector (Promega); la seqüència dels fragments inserits es va obtenir per mitjà de la parella d'encebadors M13 seguint el procediment de seqüenciació de DNA habitual (veure apartat 2.7.).

Programa d'amplificació del gen presumptiu de la Lisina-2,3-aminomutasa amb parelles d'encebadors degenerats (AM-for / AM-rev)

1. 95 °C 3' Desnaturalització inicial
2. 94 °C 45'' Desnaturalització
3. 58-48 °C * 30'' Aparellament
4. 72 °C 1.5' Extensió
5. 72 °C 10' Extensió final
6. 4 °C (pausa) Conservació

(*) La temperatura d'aparellament ha estat 58°C en el primer cicle. En el transcurs dels següents 15 cicles, la temperatura d'aparellament ha estat reduïda 0,5°C a cada cicle fins arribar a 48°C. En els 14 cicles restants la temperatura d'aparellament s'ha mantingut a 48°C.

2.3.5. Nested PCR

La *nested* PCR és un mètode basat en l'amplificació d'un fragment de DNA mitjançant la utilització d'encebadors específics, però a través de dues PCR consecutives, de manera que el DNA motlle és el producte d'una altra PCR realitzada prèviament amb encebadors universals. Aquesta tècnica permet un notable increment en el rendiment de la reacció de PCR (Amann et al., 1995), sobretot quan el DNA motlle és poc abundant en l'extracte original. Aquesta major eficiència és probablement deguda a la presència d'un major nombre de dianes en el DNA emprat com a motlle en la segona reacció de PCR.

En l'estudi s'ha utilitzat aquesta tècnica per amplificar selectivament els bacteris pertanyents al grup de BVS, mitjançant l'aplicació de la parella d'encebadors específics GC341f-GSB822r / GS.619f-GS.1144r-GC (veure apartat 2.3.3.). La reacció d'amplificació per a 50 µL i el programa de temperatures utilitzat en aquesta segona amplificació ha estat el mateix que en el cas de l'amplificació específica del gen del 16S rRNA.

2.3.6. Validació dels extractes de DNA

Tots els extractes de DNA s'han quantificat per les dues metodologies de quantificació descrites i s'han al·lototat a una concentració de treball adequada (veure apartat 2.2.2.). Amb la intenció de validar l'extracte de DNA, s'ha realitzat una reacció d'amplificació del gen 16S rRNA amb encebadors universals (Eub 27f-Eub1492r) per a la totalitat de les mostres analitzades. Amb aquest pas previ s'ha

volgut demostrar que l'extracte conté DNA i que alhora és amplificable per PCR. D'aquesta manera l'amplificació negativa pel grup de BVS, en algunes mostres, no es podia atribuir a un possible mal estat de l'extracte de DNA. Posteriorment s'ha realitzat una reacció d'amplificació específica per a la tècnica de PCR regular per a totes les mostres, dels diferents orígens (ambient, enriquiment, cultiu). En els resultats d'amplificació negativa pels extractes de les mostres naturals (aigua i sediment) s'ha procedit a la realització d'una *nested* PCR (Figura A2-1). D'aquesta manera, s'ha obtingut un producte d'amplificació específic a partir de mostres que, tot i que presentaven una baixa densitat de BVS, i en molts casos inapreciable, han servit per obtenir enriquiments i cultius. En el cas de no obtenir amplificació per la tècnica de la *nested* PCR s'ha descartat la mostra de l'anàlisi. Per contra, les mostres d'enriquiment no amplificades per PCR regular s'han eliminat directament de l'anàlisi.

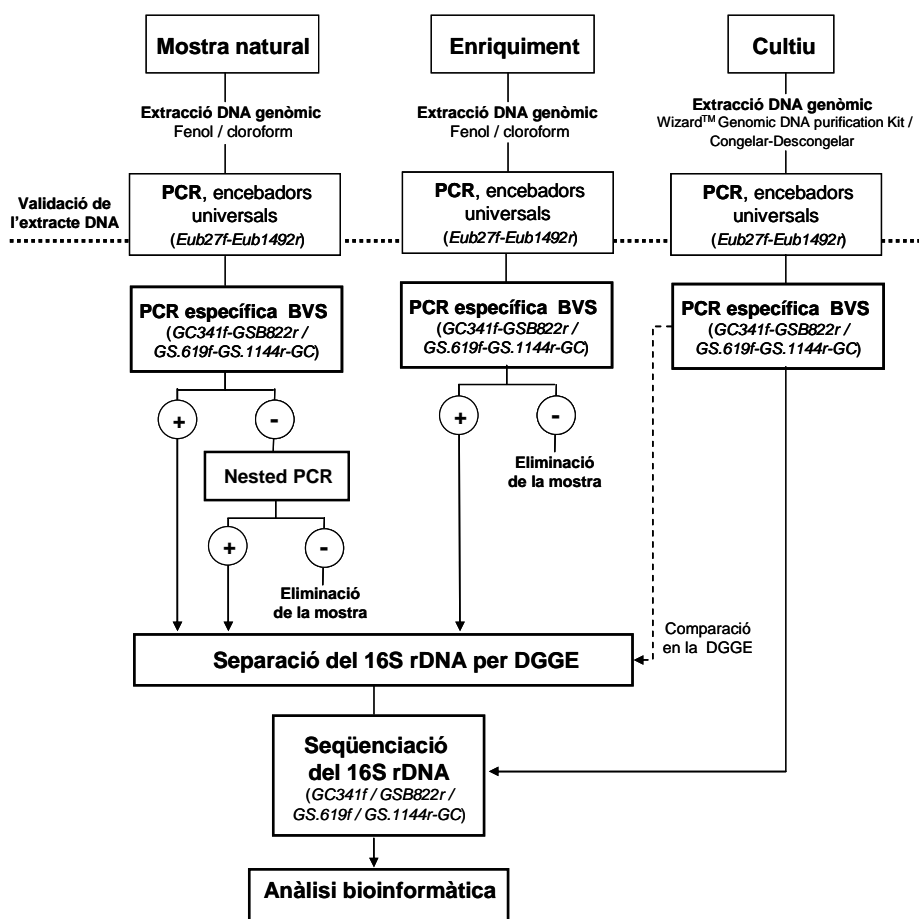


Figura A2-1. Esquema del procés experimental seguit en el tractament de les mostres naturals, enriquiments i cultius per a l'estudi de la riquesa específica del grup de BVS.

2.3. Electroforesi en gel d'agarosa

Per a la comprovació i avaluació del resultat de les reaccions de PCR i la determinació de la qualitat d'aquests productes després d'ésser sotmesos a diferents processos de neteja i purificació s'ha realitzat l'electroforesi horitzontal en gels d'agarosa. S'han preparat els gels amb agarosa d'elevada capacitat de gelificació (Pronadisa). Les cubetes d'electroforesi utilitzades han estat del model *MINI-SUB® CELL GT (Bio-RAD)*. La font d'electroforesi utilitzada ha estat una *Power-PAC300 (Bio-RAD)*. La concentració d'agarosa utilitzada ha variat en funció de les necessitats experimentals; així s'han preparat gels a l'1,5% o al 2% d'agarosa en amortidor TBE amb un volum final de 27-35 mL.

Preparació del gel

1. Peser la quantitat d'agarosa necessària d'acord al percentatge i volum final desitjat (generalment s'ha treballat a una concentració de 1,5%). Barrejar l'agarosa amb el volum corresponent de tampó TBE (0,5 x) o TAE (1x) i resuspendre l'agarosa.
2. Fondre l'agarosa en un cremador *Bunsen*. Cal assegurar-se que tota l'agarosa està fosa i no queden partícules en suspensió. Alternativament es pot fondre l'agarosa en un microones.
3. Abocar l'agarosa fosa a la cubeta d'electroforesi, on prèviament s'ha col·locat la pinta per a la formació de butxaques.
4. Deixar refredar fins que el gel estigui completament sòlid.

Càrrega del gel i condicions d'electroforesi

5. Cobrir el gel amb amortidor TBE (0,5 x) o TAE (1x).
6. Afegir a les mostres que es volen carregar $\frac{1}{4}$ (v/v) d'amortidor de càrrega.
7. Retirar la pinta del gel. Carregar les mostres a les butxaques. Juntament amb les mostres carregar el marcadors de pes molecular amb un volum equivalent a uns 100-200 ng totals. Generalment quan només es vol tenir idea del resultat i rendiment de la reacció és suficient carregar 4 μ L de mostra i 2 μ L de marcador en el gel.
8. Aplicar al gel un voltatge d'entre 2 i 10 Volts cm^{-1} que equival a uns 60-70 Volts en la cubeta d'electroforesi. El pol negatiu ha de coincidir amb la banda del gel on hi ha les butxaques. Es deixa córrer les mostres fins que el primer colorant (blau de bromofenol) assoleix $\frac{3}{4}$ parts del recorregut del gel.

Lectura del gel

9. La tinció dels àcids nucleics es porta a terme un cop s'ha aturat l'electroforesi. El gel es diposita en un contenidor protegit de la llum que conté bromur d'etidi a una concentració de $0,5\mu\text{g mL}^{-1}$ i es deixa tenyir durant 10 minuts.
10. Les bandes són visualitzades situant els gels sobre un transil·luminador UV a 321 nm (Herolab UVT-20M). Per mitjà d'un sistema de captació d'imatges per ordinador (Seicon image, TDI) es poden guardar i editar les imatges.

2.4. Mètodes de neteja i purificació de productes de PCR

Per a la neteja dels fragments curts (400-600 pb) de DNA de doble cadena obtinguts per amplificació per PCR s'han utilitzat les columnes QIAquick (QUIAGEN). Aquestes columnes han permès una purificació eficient i ràpida dels fragments amplificats per tal d'eliminar les sals, encebadors i dNTPs sobrants de la reacció. Aquestes columnes són especialment indicades per netejar productes de PCR abans de les reaccions de seqüenciació. Les columnes QIAquick es serveixen de la capacitat d'absorció del DNA de les membranes de sílica-gel en presència d'elevades concentracions de sals caotrópiques (Vogelstein and Gillespie, 1979). El protocol d'utilització està especificat en el manual del Kit. Alternativament s'ha utilitzat QIAEX II Gel Extraction Kit (QUIAGEN) amb resultats igualment satisfactoris.

Els productes de PCR que han presentat més bandes no específiques en el gel d'agarosa han estat processats amb el mètode de *UltraClean™ GelSpin Agarose Gel DNA Purification Kit* (MO BIO Laboratories, Inc.), alternativament i amb un resultats igualment satisfactoris s'ha utilitzat el mètode de *QIAquick GEL Extraction Kit*. En una electroforesi en gel d'agarosa, les bandes de diferent pes molecular han estat separades, de manera que s'ha pogut seleccionar la banda d'interès, de pes molecular conegut, en el fragment de gel que el contenia. L'estructura de carbohidrats de l'agarosa ha estat digerida pel perclorat sòdic present en el tampó de solubilització, els fragments de DNA han estat adsorbits en una reïna de sílica-gel i s'han el·luït amb tampó Tris (Vogelstein and Gillespie, 1979). El protocol d'utilització està especificat en els manuals del Kit.

El resultat del procés de neteja del producte de PCR es pot avaluar per mitjà de la realització d'una electroforesi horitzontal en gel d'agarosa (veure apartat 2.4.)

2.6. DGGE: Separació de productes de PCR

2.6.1. Introducció

La tècnica de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) permet la separació en un gel de poliacrilamida de seqüències de DNA de la mateixa longitud, però de diferent composició de bases nitrogenades (Muyzer et al., 1993). És a dir, permet la separació electroforètica de barreges heterogènies de productes amplificats mitjançant PCR. Aquest mètode es basa en la disminució de la mobilitat electroforètica de les dobles cadenes de DNA quan són parcialment desnaturalitzades en gels de poliacrilamida que continguin un gradient desnaturalitzant lineal. Molècules del mateix tamany (en pb), però de seqüències diferents, i per tant diferents comportaments davant la desnaturalització, poden presentar una migració diferencial i aturaran el seu recorregut a diferents posicions en el gradient del gel, en funció de la concentració d'agent desnaturalitzant necessària per provocar la separació de les cadenes de DNA. Aquest mètode ha estat àmpliament utilitzat per a l'anàlisi de la composició i diversitat microbiana en ambients molt diversos (Muyzer et al., 1993; Ferris et al., 1996; Teske et al., 1996; Ferris and Ward, 1997; Overmann et al., 1999a; Casamayor et al., 2000).

Per a la separació de productes de PCR en la DGGE és necessari que un dels dos encebadors utilitzats contingui a l'extrem 5' de la seqüència un fragment de citosines i guanines (*GC clamp*) (veure apartat 2.3.3.). Aquest fragment (*GC clamp*) mantindrà l'estructura de doble cadena al llarg de tota l'electroforesi i evitarà que les cadenes se separin totalment i avancin fins a sortir del gel de poliacrilamida per efecte del voltatge aplicat.

Un cop finalitzada la separació electroforètica, es poden retallar les bandes del gel, reamplificar el DNA que contenen i seqüenciar-lo (Ferris et al., 1996) (veure apartats 2.6.3.-2.7.2.) o bé hibridar-lo amb una bateria de sondes que indicaran quina és la composició i diversitat de la comunitat microbiana que s'està estudiant. Durant l'estudi s'han utilitzat dos equips de DGGE: un aparell *DCode™ System* (BioRAD), alternativament un aparell *phorU® DGGE system* (Ingeny).

Tots els productes d'amplificació específica obtinguts durant l'estudi s'han comparat, en relació a l'ambient de procedència, per mitjà de la separació dels fragments en un gel de gradient desnaturalitzant (DGGE). Les diferents bandes recuperades del gel, corresponents a mostres naturals i enriquiments, s'han seqüenciat i posteriorment

comparat amb les seqüències descrites del grup de BVS i d'altres obtingudes a partir dels cultius d'aïllats segons el procediment d'anàlisi explicat en l'apartat 2.8.4.. Per un resum esquemàtic del procés veure figura A2-1.

2.6.2. Preparació del gel

S'ha netejat la cara interna dels dos vidres d'electroforesi amb etanol 96%. Un cop secs, s'han muntat amb els separadors i s'han ajustat tots els components per tal d'evitar les pèrdues. S'han preparat 25 mL de les solucions (A i B) a partir de les quals s'ha realitzat el gel (taula A2-2):

Taula A2-2. Composició de les solucions desnaturalitzants utilitzades per a la preparació del gel de poliacrilamida (DGGE).

Components	Solució A (20 % desnaturalitzant)	Solució B (60% desnaturalitzant)
Urea (g)	2.1	6,3
Formamida (mL)	2	6
Tampó TAE 50x pH 7,4 (mL)	0,5	0,5
Acilamida 40% (mL)	3,75	3,75
H ₂ O destil·lada	fins a 25 mL	fins a 25 mL
Persulfat amònic 10% (µL)	125	125
TEMED (µL)	6	6

La solució de persulfat amònic al 10% juntament amb el TEMED s'ha afegit just abans d'introduir les solucions entre els dos vidres, ja que aquest dos reactius són els responsables de la polimerització del gel, que es produeix en poc temps.

S'ha carregat un volum (14 mL quan s'utilitza l'equip de BioRAD; 24 mL quan s'utilitza l'equip Ingeny) de cada solució, A i B, en un sistema formador de gradients (sistema de vasos comunicants columnar). Aquests volums es determinen en funció de la mida dels gels (capacitat de l'espai disponible entre vidres). Amb l'ajuda d'una bomba peristàtica, un tub de goma i l'agulla d'una xeringa, s'ha introduït la mescla de les dues solucions d'acrilamida entre els dos vidres. Es forma un gradient desnaturalitzant que varia del 60% a la part inferior del gel fins al 20% a la part superior. Un cop fet el gradient, s'ha col·locat la pinta (o motlle) per formar les butxaques on es carregarà la mostra. El gel es deixa polimeritzar durant un mínim de 90 minuts. Prèviament a la col·locació de les pintes es pot procedir a completar el gel amb una solució de poliacrilamida al 0% d'agent desnaturalitzant (pas opcional). Aquesta franja del gel (coneguda com a gel apilador) pot representar una millora pel

procés de migració dels fragments amplificats, ahora que permet treballar amb la totalitat del gradient d'agent desnaturalitzant fixat en l'experiment.

2.6.3. Càrrega de les mostres i condicions d'electroforesi

1. Un cop ha polimeritzat el gel, aquest s'ha posat dins la cubeta d'electroforesi plena d'amortidor TAE 1x; el tampó s'ha escalfat prèviament fins assolir una temperatura de 60°C.
2. S'ha afegit a les mostres que es vol carregar 1/3 (v/v) d'amortidor de càrrega.
3. Just abans de carregar les mostres s'han netejat les butxaques del gel de restes de poliacrilamida i urea (si no hi ha gel apilador) aplicant un flux amb una xeringa de 10 mL. Les mostres s'han carregat a les butxaques amb micropipeta (de punta molt fina). És important carregar un mínim de 800 ng de DNA si posteriorment es pretén recuperar les bandes obtingudes en el gel.
4. En el transcurs de l'electroforesi s'ha aplicat un voltatge al gel de 100 V durant 14-16 hores (en essència *overnight*).
5. La tinció dels àcids nucleics s'ha realitzat un cop ha acabat el temps d'electroforesi de les mostres. S'han separat els dos vidres amb cura per tal de no trencar el gel; aquest s'ha submergit durant 45 minuts en solució de tinció (tampó TAE 1x amb bromur d'etidi a una concentració final de 0,5 µg mL⁻¹). Durant la incubació s'ha aplicat una agitació suau.

A fi i efecte de millorar la tinció s'ha optat per la utilització de *Sybr Gold®* (Molecular Probes). Aquest permet una millora en la sensibilitat, resolució i ahora implica un menor risc en la manipulació, ja que és un mutagènic menys potent que el bromur d'etidi. La solució de tinció es prepara diluint 50 µL de la solució comercial en 500 mL de TAE 1x pH 7,5 (Biorad).

Les bandes han estat visualitzades col·locant el gel sobre un transil·luminador UV a 312 nm (Herolab, UVT-20M). Per mitjà d'un sistema de captació d'imatges per ordinador (Seicon image, TDI) es poden guardar i editar les imatges.

6. Les bandes de DNA han estat retallades amb un bisturí estèril i s'han dipositat individualment en un tub tipus *eppendorf*. És interessant destacar que el pas de retallar les bandes s'ha de dur a terme el més ràpidament possible per evitar la formació de dímers de timina en la mostra degut a la prolongada exposició a la llum ultraviolada, especialment quan són moltes les bandes que es pretén recuperar. No obstant, es poden utilitzar diferents filtres, disponibles comercialment, que minimitzen o eliminen aquest efecte; ahora que possibiliten unes condicions de menor risc per a l'usuari.

2.6.4. Elució del DNA contingut en les bandes dels gels

Aquest procés (l'elució del DNA) constitueix, en sí mateix, un pas de neteja i purificació del DNA contingut en les bandes dels gels de poliacrilamida i esdevé necessari per a la continuació amb posteriors passos metodològics (reamplificació i seqüenciació dels fragments).

Per a l'elució del DNA, les bandes retallades dels gels s'han guardat de manera individual en tubs tipus *ependorf*; seguidament s'ha afegit un volum adequat de Tris-HCl (pH 8,5), generalment 25-50 µL són suficients per submergir la banda en el diluent (mantenir les mostres a 4°C fins al moment de l'elució). Per afavorir l'elució de bona part del DNA contingut en els fragments de gel retallats s'ha procedit a incubar els tubs a 65°C durant 45 minuts (homogeneïtzar la solució periòdicament).

Un altre mètode alternatiu utilitzat també amb èxit ha estat l'electroelució. El mètode es basa en la capacitat que tenen les molècules de DNA de migrar quan són sotmeses a un camp elèctric. Per a l'electroelució de les bandes s'han utilitzat columnes *CENTRICON YM-50* (Millipore), les quals contenen un filtre al seu interior on queda retingut el DNA (que alhora permet el pas del corrent elèctric). El protocol i l'instrumental específic està descrit en el manual d'utilització del kit.

2.7. Seqüenciació de DNA

2.7.1. Introducció

La seqüenciació dels productes d'amplificació s'ha realitzat en base al procés de seqüenciació desenvolupat per Sanger (Sanger, 1997) utilitzant el mètode de ddNTPs marcats amb tintes *ABI PRISM* en els sistemes *ABI PRISM*TM de la casa *PE Applied Biosystems*.

El producte d'amplificació, que s'utilitza com a DNA motlle de la reacció de seqüenciació, s'ha netejat i purificat amb les columnes *QIAquick*, alternativament *QIAEX II Gel Extraction Kit* (*QIAGEN*). En el cas de l'obtenció de productes inespecífics s'ha utilitzat el mètode de recuperació i purificació de DNA a partir de bandes de gel d'agarosa, *UltraClean*TM *GelSpin* (veure apartat 2.5.).

Per a la reacció de seqüenciació s'ha utilitzat la mateixa configuració d'encebadors utilitzada per a l'obtenció de productes d'amplificació (veure apartat 2.3.3.). Cal tenir en compte que la reacció de seqüenciació és una reacció de síntesi lineal en la qual

només s'utilitza un encebador per a cada reacció. L'aplicació de la parella d'encebadors en una mateixa mostra ha permès obtenir dues seqüències complementàries d'un mateix fragment: *forward* i *reverse*. D'aquesta manera, s'ha disposat d'un element de comparació quan la pauta de lectura de la seqüència ha estat dubtosa en algun dels casos (*forward* o *reverse*).

Els fragments de DNA recuperats de les bandes de DGGE s'han reamplificat per PCR prèviament a la realització de la reacció de seqüenciació utilitzant la mateixa configuració d'encebadors originals. Aquest pas addicional d'amplificació permet obtenir un producte adequat (amb un nombre elevat de còpies del gen d'interès) per ésser utilitzat com a motlle en la reacció de seqüenciació (veure apartat 2.7.2.). Una visió esquemàtica del conjunt de metodologies encadenades per obtenir aquestes seqüències es detalla a la figura A2-2.

2.7.2. Seqüenciació amb ddNTP ABI PRISM

Per a la seqüenciació s'ha utilitzat el kit *ABI PRISM™ BigDye Terminator v 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems).

1. Per a cada reacció s'ha preparat un tub *ependorf* de 200 µL amb:

DNA motlle.....	1-2 µL (*)
Barreja de reacció (<i>Ready Reaction Premix</i>)..	2 µL
Encebador(10-25 µM).....	1 µL
Aigua Milli-Q estèril.....	fins a 10 µL

La composició de la barreja de reacció (*Ready Reaction Premix*) és:, dNTPs, ddATP terminal tintat, ddCTP terminal tintat, ddGTP terminal tintat, ddTTP terminal tintat, Tris (pH 9), MgCl₂, pirofosfatasa, i AmpliTaq DNA polimerasa, FS.

(*):La quantitat de DNA motlle utilitzat en la reacció s'ha decidit a partir de la quantificació subjectiva comparant en un gel d'electroforesi la intensitat de la seva banda amb la d'un estàndard conegut (del marcador de pes molecular utilitzat en el gel). Aquesta quantitat és variable també en funció de la longitud del fragment.

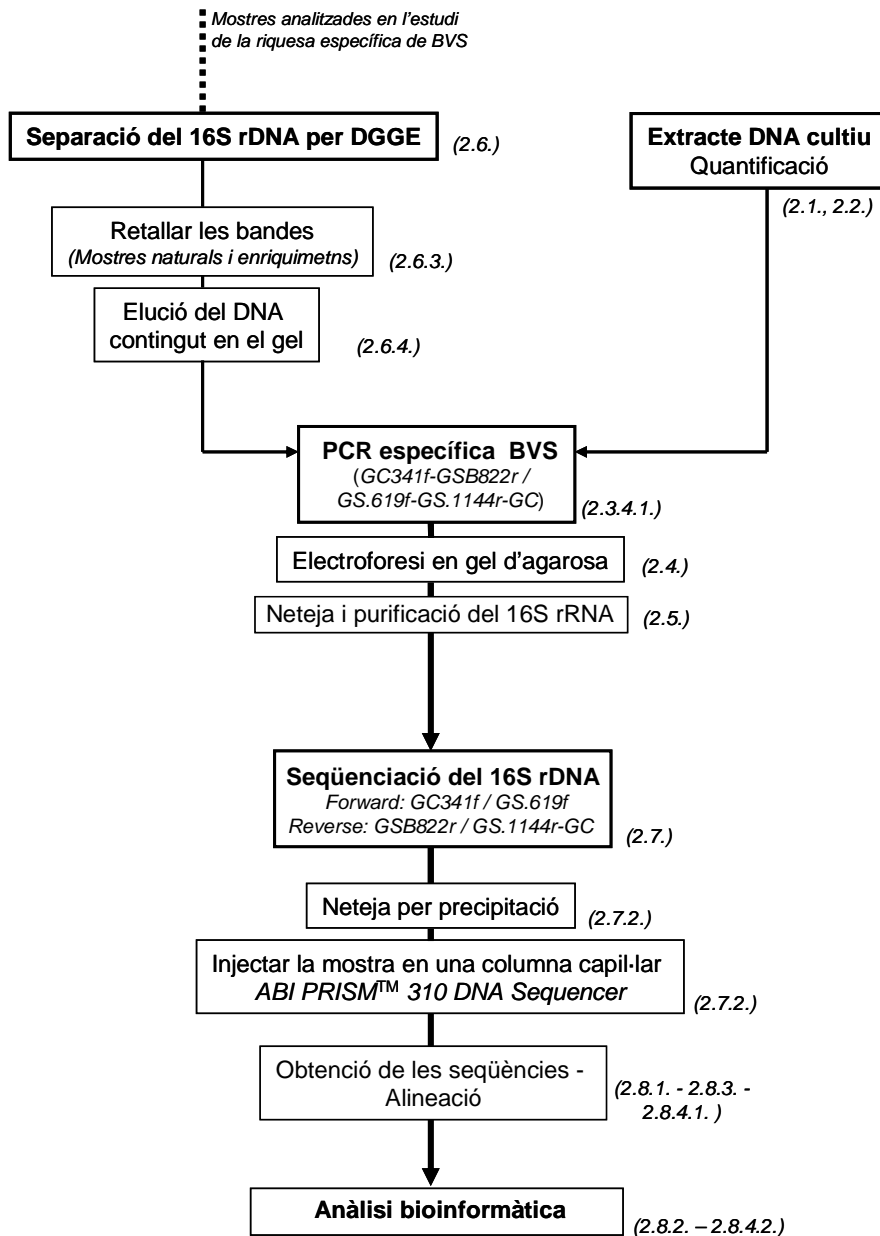


Figura A2-2. Resum dels diferents passos metodològics realitzats per a la seqüenciació dels fragments de 16S rDNA recuperats de la DGGE, en mostres naturals i enriquiments, i els cultius aïllats en l'estudi de la riquesa específica de BVS.

2. En la reacció de PCR de seqüenciació s'ha utilitzat el següent programa de temperatures:

1. 94 °C 3' Desnaturalització
2. 96 °C 10'' Desnaturalització
3. 50 °C 5'' Aparellament
4. 60 °C 4' Extensió
5. 4 °C (pausa) Conservació

Els tres passos cíclics (del 2 al 4) es repeteixen 25 vegades.

3. Seguidament s'ha realitzat un procediment de precipitació. Per tal d'obtenir una bona senyal des de les primeres bases de la seqüència s'ha optat per seguir el següents passos:

- 3.1. Afegir el reactius següents en l'ordre donat: 2 µL EDTA (125 mM), 2 µL d'acetat de sodi (3M, pH 5,2) i 50 µL d'etanol (100%).
- 3.2. Invertir el tub i donar un pols de centrifuga.
- 3.3. Incubar 15' a temperatura ambient.
- 3.4. Centrifugar 20' a 12000 rpm a 4°C (vigilar l'orientació dels tubs).
- 3.5. Seguidament aspirar el sobrenedant amb un sistema de trompa de buit.
- 3.6. Afegir 70 µL d'etanol al 70% (v/v). Homogeneïtzar suaument.
- 3.7. Centrifugar 15' a 12000 rpm a 4°C (vigilar l'orientació dels tubs).
- 3.8. Seguidament aspirar el sobrenedant amb un sistema de trompa de buit.
- 3.9. Assecar les mostres (al *Speed Vac*, 15'; alternativament a l'estufa a 30°C).
Compte, no sobreassecar.
- 3.10. Guardar els tubs de mostres (*pel·lets* invisibles) a 4°C i preservats de la llum.

4. Resuspendre el pellet de DNA marcat (una o dues hores abans de seqüenciar).

- 4.1. Afegir 30 µL de tampó TSR a cada tub *ependorf* procurant no fer bombolles.
- 4.2. Deixar rehidratar la mostra durant 20' a temperatura ambient.
- 4.3. Agitar al vòrtex (breument) i donar un pols de centrifuga (nanofuga).
- 4.4. Incubar 3' a 94 °C en un bany, per tal de provocar la desnaturalització de les cadenes.

- 4.5. Refredar en gel (temps mínim orientatiu: 3').
- 4.6. Agitar al vòrtex (breument) i donar un pols de centrífuga.
- 4.7. Transferir les mostres a vials de seqüenciació i guardar-les a 4 °C i preservades de la llum.

Finalment les mostres s'han injectat a la columna capil·lar del seqüenciador *ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer* (PE Applied Biosystems). La seqüència s'ha obtingut en forma de cromatogrames superposats de les quatre tintes dels diferents ddNTP terminals.

2.8. Anàlisi de les seqüències

2.8.1. Construcció d'una seqüència unitària consens a partir dels fragments forward i reverse

Les seqüències de DNA *forward* i *reverse* (aquesta última en la seva variant complementària i inversa) obtingudes per a cada mostra s'han alineat utilitzant el programa *Multalin* (Corpet, 1988) disponible a la pàgina web <http://prote.inra.fr/multalin/multalin.html>. Posteriorment, les zones de les seqüències amb pauta de lectura dubtosa s'han corregit manualment per mitjà de la comparació dels cromatogrames *forward* i *reverse* per a cada mostra.

2.8.2. Comparació de les seqüències en les bases de dades

Les seqüències consens obtingudes per a cadascuna de les mostres s'han comparat en la base de dades EMBL (European Molecular Biology Laboratory) i NCBI (National Center for Biotechnology Information) per a una primera identificació, per mitjà de l'opció BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Madden et al., 1996; Altschul et al., 1997), del programari *on-line* de recursos moleculars de què disposa la pàgina web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

2.8.3. Avaluació de la qualitat de les seqüències obtingudes

Per a la detecció de possibles quimeres (seqüències artefactes de DNA que es construeixen a partir de dos o més fragments de seqüència distints) s'han utilitzat dos programaris accessibles a la xarxa: Bellerophon program (Hugenholtz and Huber, 2003; Huber et al., 2004) utilitzant les correccions de Jukes-Cantor (Jukes and Cantor, 1969) i Huber-Hugenholtz, i també el programa CHIMERA_CHECK versió 2.7 que es troba a la pàgina web de Ribosomal Database Project (RDP-II release 8.1) (Cole et

al., 2003). La interpretació dels resultats obtinguts s'ha realitzat en base a les especificacions donades a la mateixa pàgina.

2.8.4. Anàlisi comparativa de les seqüències del 16S rDNA

L'anàlisi comparativa de les seqüències de la subunitat petita del rRNA constitueix un dels mètodes més importants per a l'elucidació de la filogènia (reconstrucció del procés de diferenciació dels diferents grups d'organismes en l'aspecte específic i llurs relacions evolutives) i alhora per a la identificació d'un microorganisme en particular (Ludwig et al., 1998). En aquestes anàlisis, el resultat final es visualitza generalment amb representacions d'estructura d'arbre, en les quals les branques indiquen els diferents successos evolutius estimats en l'anàlisi i la longitud de les branques (additiva) indica la distància filogenètica entre els elements a comparar. Aquestes representacions es poden trobar en forma radial o de dendrograma.

2.8.4.1. Alineament de les seqüències

L'alineament de les seqüències és un dels passos crítics en l'anàlisi filogenètica, en tant que pot arribar a condicionar d'una manera notable el resultat final d'aquesta (es pot esbiaixar una tendència pel fet de tenir un nombre elevat de falses diferències). D'aquesta manera, cal identificar i alinear amb precisió les posicions homòlogues del conjunt de seqüències analitzat per poder identificar les posicions que pertanyen a un ancestre comú, i així resoldre amb una inferència filogenètica versemblant. En aquest context, és important assignar adequadament, i amb el menor grau d'incertesa possible, les posicions homòlogues de les regions variables de la seqüència, especialment quan han succeït diferents delecions o insercions al llarg de l'evolució. Per aquesta tasca, tot i ésser complicada, es pot recórrer a l'anàlisi de l'estructura secundària. Tot i així, en la majoria dels casos sempre hi ha algunes incerteses que s'han de resoldre subjectivament (en funció del criteri de l'analista).

Quan s'utilitza el programari ARB (Ludwig et al., 2004), en el cas del rRNA, no és necessari alinear totes les seqüències de nou, ja que existeixen diferents bases de dades que contenen alineaments prèviament establerts per grups d'experts, els quals han tingut en compte la informació derivada de l'anàlisi de l'estructura secundària. Pel treball s'han utilitzat com a punt d'inici les seqüències dels representants dels BVS incloses en la base de dades pública de *ARB project* (www.arb-home.de); (concretament la base de dades *ssu_jan04_corr_opt.arb*). Aquests alineaments poden servir de guia per a l'addició de les seqüències pròpies. Alhora, el programari també

permet una anàlisi *in situ* de l'estructura secundària de les seqüències afegides, facilitant-ne la presa de decisions. En les anàlisis s'ha utilitzat l'aplicació *ARB_EDIT4 tool* que permet obtenir alineaments de forma automàtica. Posteriorment, s'ha procedit al refinament manual de l'alineament utilitzant la informació d'estructura secundària integrada en els alineaments i comparant aquesta informació amb el diagrama de la soca *Prosthecochloris vibrioformis* DSM260^T disponible a *CRW* (*Comparative RNA Web*; www.rna.icmb.utexas.edu) (Cannone et al., 2002).

2.8.4.2. Construcció d'arbres filogenètics

Existeixen tres tipus principals de mètodes de reconstrucció d'arbres filogenètics: mètodes de distància o de matrius de distàncies, mètodes de màxima parsimònia (MP) i mètodes de màxima versemblança (ML, de l'anglès *Maximum Likelihood*). La contextualització teòrica d'aquests mètodes, els diferents avantatges i limitacions, i altres aspectes importants relacionats amb la reconstrucció filogenètica bacteriana es poden trobar resumits en un treball de Ludwig i col·laboradors (Ludwig et al., 1998). A tall d'introducció, els mètodes de distància calculen matrius a partir de les diferències entre les seqüències tractades dos a dos de l'alineament inicial. Generalment les distàncies calculades són transformades a distància evolutiva per mitjà de models evolutius específics (prèviament a la realització de l'arbre). En la confecció de l'arbre es connecten entre si les seqüències i/o, grups de seqüències que comparteixen el valor de distància més petit. Es poden utilitzar diferents algoritmes de correcció per a l'estimació del nombre de canvis evolutius, com a exemples d'alguns més utilitzats: Jukes-Cantor (Jukes and Cantor, 1969) i Kimura-2 (Kimura, 1980). Existeix, però, un desavantatge intrínsec al tipus de mètode: la informació filogenètica és utilitzada indirectament ja que es treballa a partir del valor de distància.

La reconstrucció filogenètica a partir del criteri de màxima parsimònia (MP) es basa en el principi pel qual la millor hipòtesi per explicar un procés és la que requereix el menor nombre de canvis de bases per correlacionar la topologia d'arbre i les dades de seqüències. Així, és busca quin és l'arbre que comprèn una menor longitud total (anomenat més parsimoniós). Observi's que aquest mètode, a diferència dels de distància, utilitza la seqüència real en els càlculs. El nombre mínim de canvis necessaris és calculat per a una topologia determinada i posició particular de l'alineament per mitjà de la transició des dels nodes terminals (corresponents a les seqüències actuals) cap als nodes més interns. S'estima l'ancestre més probable de cada node intern proper i es calcula el nombre de canvis necessaris; per aquest fet,

aquest mètode permet evitar en una major mesura el problema de la plesiomorfia (quan múltiples canvis durant l'evolució resulten en seqüències contemporànies aparentment idèntiques, -identitats falses) en comparació als mètodes de distàncies. El mètode és susceptible d'errors en l'anàlisi de regions hipervariables i sensible a les diferències de taxa de canvi que es poden donar entre els diferents llinatges. En un principi, només es poden obtenir topologies quan s'utilitza aquest mètode.

Els mètodes de màxima versemblança (ML) són els més elaborats de tots els mètodes de reconstrucció filogenètica. En aquests, la millor topologia indica un dels esdeveniments evolutius possibles que condueix, de la manera més probable, a les seqüències actuals utilitzant el criteri d'un model d'evolució determinat. Dit d'una altra manera, els mètodes busquen la hipòtesi que maximitza la probabilitat d'observar les dades que hem obtingut (Cortey, 2005). Els mètodes poden incloure diferents paràmetres (taxa transició/transversió –substitució, la variabilitat de cada posició i la probabilitat de conservació *versus* canvi), que permeten obtenir bona part del contingut d'informació de les seqüències; per contra, el mètode requereix més temps en la seva realització i càlcul.

Tots aquests mètodes descrits, amb les seves respectives limitacions, permeten una reconstrucció parcial de la història evolutiva real, i de retruc, de les relacions de parentesc existents; per tant, la combinació de diferents mètodes i la realització d'un arbre consens pot ésser un bon recurs a l'hora d'inferir una filogènia. Com que el càlcul es realitza de manera diferent en cadascun dels mètodes, és obvi que no es pot esperar un resultat idèntic a partir de les diferents aproximacions, sinó que generalment s'observen diferències en l'ordre relatiu de les branques veïnes més o menys properes, o en subgrups de l'arbre. Aquestes variacions indiquen una baixa significació de la topologia local (incertesa o inconsistència de l'anàlisi en aquest punt) que es pot evitar si s'opta per assignar-hi una multifurcació. Cal tenir present que aquesta solució (multifurcació) indica una pèrdua d'informació (encara que intencionada) en l'establiment de l'afiliació dels filotips involucrats, i no es pot interpretar com el resultat de l'esdeveniment d'un procés de radiació evolutiva.

Cal tenir en compte que per a la inferència filogenètica és necessari utilitzar seqüències completes o de longituds grans de seqüència (quasi completes, generalment >1200 pb en el cas del 16S rDNA), ja que la informació continguda en el marcador és limitada i alhora diferents regions poden contenir informació útil a diferents nivells taxonòmics. Per altra banda, només es pot contemplar la possibilitat

d'incorporar seqüències parcials quan l'objectiu és la identificació o assignació d'aquestes dins d'un grup filogenètic establert, tal i com és possible per mitjà del programari ARB.

L'anàlisi de l'afiliació dels filotips i cultius obtinguts durant el treball s'ha realitzat per mitjà del paquet informàtic ARB (Ludwig et al., 2004) (veure comentaris de l'apartat 2.8.4.1.). Per a la presentació dels resultats s'ha utilitzat el mètode de màxima versemblança (calculat amb el programari integrat Fast DNA_ML v1.2.2) com a mètode de referència. El càlcul de les reconstruccions filogenètiques en base als mètodes de màxima parsimònia i *neighbor joining* (mètode de distàncies) s'ha realitzat per mitjà dels algorismes implementats de DNAPARS, PHILIP package v3.2 i DNADIST amb la correcció de Jukes-Cantor respectivament. Les seqüències parcials (generalment les recuperades de la DGGE) han estat incloses en l'arbre, respectant-ne la seva topologia general per mitjà de l'opció *Parsimony Interactive tool*. Ja que el tipus d'anàlisi filogenètica ha estat contextualitzada en el marc de la (micro-) filogènia del grup de BVS, no s'ha considerat l'aplicació de cap filtre o màscara en les dades de les seqüències. Així, per l'elevada similitud que presenten els filotips inclosos en el grup, ha estat necessari mantenir qualsevol de les diferències existents entre les seves seqüències.

Per comprovar la fiabilitat i robustesa de la inferència filogenètica s'ha realitzat una anàlisi de confiança (realitzada separatament) pel mètode de *bootstrapping* mitjançant el programa SEQBOOT i CONSENS (Felsenstein, 1989). El mètode es basa en la comparació dels arbres que resulten en treballar amb un nombre determinat de pseudoreplicats de les dades (100 en el present treball), on les seqüències (o matrius de distàncies) són mostrejades a l'atzar. L'arbre consens de les 100 rèpliques realitzades ha estat dibuixat amb l'editor TREEVIEW (Page, 1996). El valor de *bootstrap* indica el nombre de vegades, en relació al nombre total de replicats, que una branca apareix en una determinada posició.

2.8.5. Mètodes d'anàlisi comparativa de seqüències peptídiques

L'anàlisi comparativa de les seqüències de proteïna (seqüència primària o seqüència d'aminoàcids) s'ha realitzat essencialment de manera similar al procediment descrit per a les seqüències del 16S rDNA, utilitzant com a mètode de referència la màxima versemblança; ha variat però el programari utilitzat pels càlculs. Els alineaments de les seqüències s'han realitzat amb el programari d'anàlisi *on-line* MAFFT v5.8 (Kazutaka et al., 2005) utilitzant diferents mètodes de refinament en funció del tipus

d'alineament (simples o de gens concatenats) i nombre de seqüències. Posteriorment, s'ha procedit al refinament manual de l'alineament per mitjà de l'editor de seqüències *JalView* (Clamp et al., 2004). Per a la construcció de l'arbre filogenètic s'ha utilitzat el programari *on-line* PHYML (interfície en xarxa que infereix filogènies basades en el mètode de màxima versemblança). Aquesta aplicació és senzilla en el seu ús, ja que permet l'estimació automatitzada de diferents paràmetres: distribució del paràmetre gamma (un tipus de distribució contínua de probabilitat que descriu la manera en què varia la taxa de substitució al llarg de la seqüència) i la proporció de lloc invariables; alhora permet computar les dades en un temps raonable. El model de substitució nucleotídica utilitzat ha estat l'establert per defecte quan s'analitzen seqüències d'aminoàcids, *JTT amino-acid* model (Jones et al., 1992). S'han emprat 5 categories de taxa de substitució. Aquest valor el determina l'usuari i comprèn la utilització d'una distribució gamma discreta, en la qual es considera la variabilitat de la taxa de substitució entre diferents parts de la seqüència de manera discreta. Com més gran és el valor, millor és la qualitat de l'encaix del model discret teòric amb la realitat (de distribució contínua), però la càrrega computacional elevada pot comportar temps molt grans d'anàlisi que, alhora, no es tradueixen sempre en una millora apreciable. En utilitzar un nombre discret de categories, el valor de versemblança d'una determinada posició s'obté a partir de la mitjana dels valor de versemblança condicionals corresponent a cada taxa, així la computació és més lenta, proporcionalment al nombre de taxes considerades.

2.9. Solucions estoc i reactius utilitzats en l'anàlisi molecular

2.9.1. Extracció de DNA genòmic (veure apartat 2.1.)

- *Amortidor de lisi (LB)*

S'ha preparat una solució de 250 mL amb 40 mM EDTA (2,9 g), 50 mM Tris pH 8,3 (1,5 g) i 0,75 M Sucrosa (64,1 g). La solució s'ha esterilitzat per filtració (0,22 µm) i s'ha distribuït en tubs *falcon* de 50 mL estèrils. La solució s'ha conservat a -20 °C.

- *Lisozim (35 mg·mL⁻¹)*

S'han dissolt 35 mg de lisozim liofilitzat (conservat a 4 °C) en 1mL de tampó de lisi (LB). La solució s'ha preparat just abans de la realització de l'extracció de DNA genòmic.

- *Proteïnasa K* ($8 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)
S'han preparat una solució del volum desitjat a partir d'una solució mare de proteïnasa K a 15.6 mg mL^{-1} . La solució s'ha preparat amb tampó LB com a dissolvent.
- *SDS* (sodium dodecyl sulfate) al 10%
S'ha dissolt 10 g de SDS en 90 mL d'aigua Milli-Q a 65°C . El pH s'ha ajustat a 7,2 amb unes gotes de HCl concentrat. Finalment s'ha ajustat el volum a 100 mL. S'ha esterilitzat a l'autoclau.
- *PCI* (Phenol-Chloroform-isoamyl alcohol)
En una ampolla estèril s'han barrejat 25 volums de fenol, Biophenol (Labgen), amb 24 volums de cloroform i 1 volum d'alcohol isoamílic. Agitar intensament la solució abans de cada ús, per tal d'emulsionar la barreja.
- *CI* (Chloroform-isoamyl alcohol)
En una ampolla estèril s'han barrejat 24 volums de cloroform amb 1 volum d'alcohol isoamílic.
- *Acetat sòdic 3 M* (pH 5,2)
S'han dissolt 40,81 g d'acetat sòdic 3-hidratat en 80 mL d'aigua Milli-Q. S'ha ajustat el pH amb àcid acètic glacial i s'ha ajustat el volum a 100mL. S'ha esterilitzat a l'autoclau.

2.9.2. Quantificació de DNA per Picogreen® (veure apartat 2.2.2.)

- *Amortidor TE*
S'ha preparat una solució de Tris-HCl pH8 10 mM i EDTA 1 mM a partir de les solucions mare d'aquests reactius. S'ha esterilitzat a l'autoclau.
- *Amortidor Tris-HCl 1M* (pH 8)
S'han dissolt 121,1 g de base Tris en 800 mL d'aigua Milli-Q. S'ha ajustat el pH afegint HCl concentrat. S'ha ajustat el volum a 1000 mL. S'ha esterilitzat a l'autoclau.
- *EDTA 0,5 M* (pH 8)
S'han dissolt 186,1 g d'etilendiamino-tetraacetat sòdic 2-hidratat en 800 mL d'aigua Milli-Q. S'ha ajustat el pH afegint grànuls de NaOH. S'ha esterilitzat a l'autoclau.

2.9.3. *Electroforesi en gel d'agarosa* (veure apartat 2.4.)

- *Amortidor TBE 0,5 x*

A partir d'una solució mare (10 x) de la casa comercial BioRAD, s'ha preparat una dissolució 1/20 en aigua Milli-Q. La composició de la solució a 1x és de 89 mM de base Tris, 89 mM d'àcid Bòric i 2mM d'EDTA, a pH 8,4.

- *Amortidor de càrrega*

A la mostra s'hi ha afegit un amortidor de càrrega per incrementar la seva densitat i facilitar la càrrega a les butxaques del gel. Alhora, aquest amortidor permet tenir una idea de la migració de les mostres durant l'electroforesi. La proporció de la mostra:amortidor de càrrega ha estat de 2:1 en el moment de carregar el gel. La composició de l'amortidor és (en aigua Milli-Q):

Blau de bromfenol al 0,25 %
Xilèn cianol FF al 0,25 %
Glicerol al 30 %

Aquest amortidor també s'ha utilitzat per a la càrrega de les mostres en el gel de poliacrilamida (DGGE) (veure apartat 2.6.3.).

- *Marcadors Moleculars*

- 100 pb DNA ladder (Promega)

Consisteix en 15 fragments de longitud creixent en 100 pb, partint de 100 pb fins a 1500 pb, més un fragment addicional de 2.072 pb. La concentració del fragment de 500 pb és major. D'aquesta manera, aquesta banda és més intensa que la resta per tal de facilitar la identificació. Es treballa a una concentració de 50 ng μL^{-1} .

- *Bromur d'etidi (10 mg·mL⁻¹)*

S'han dissolt 0,1 g de bromur d'etidi en 10 mL d'aigua Milli-Q amb agitació durant tota la nit. S'ha guardat la solució a 4 °C i protegida de la llum. Aquesta solució també pot ésser utilitzada per a la tinció dels gels de poliacrilamida. Generalment, per a la tinció s'utilitza una dissolució a una concentració final de 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (5 μL de la solució estoc de bromur d'etidi per cada 100 mL de la solució de tampó utilitzada en l'electroforesi).

Metodologia III. Extracció, determinació i quantificació de soluts compatibles.

Índex	
3.1. Extracció de soluts compatibles.....	305
3.1.1. Introducció.....	305
3.1.2. Obtenció de la biomassa i preparació dels extractes.....	305
3.2. Determinació dels soluts compatibles presents en els extractes cel·lulars.....	306
3.2.1. Anàlisi espectroscòpica: ressonància magnètica nuclear.....	306
3.2.2. Determinació estructural de compostos rars.....	307
3.3. Quantificació de soluts compatibles.....	308
3.3.1. Anàlisi de cromatografia líquida d'elevada resolució (HPLC).....	308
3.3.2. Quantificació de proteïna.....	310

3.1. Extracció de soluts compatibles

3.1.1. Introducció

Per a l'extracció de soluts compatibles s'ha seguit un procediment modificat de la tècnica d'extracció i purificació de lípids desenvolupada per Bligh & Dyer (Bligh and Dyer, 1959; Galinski and Herzog, 1990). El mètode és ràpid, eficient, reproducible i lliure de manipulacions crítiques. Es basa en un principi que permet obtenir un sistema de dues fases separades (una hidrofòbica i l'altre hidrofílica). En un primer pas es crea una barreja de solvent miscible amb la mostra o teixit (Cloroform-Metanol-Aigua); la dilució de l'extracte resultant amb unes proporcions indicades de cloroform i aigua permet separar l'homogenat en 2 fases: la fase inferior de cloroform que conté tots els lípids i la fase superior metanòlica (metanol-aigua) que conté tots els materials no lipídics.

3.1.2. Obtenció de la biomassa bacteriana i preparació dels extractes de soluts

S'ha treballat amb diferents volums de cultiu en funció de l'objectiu de l'anàlisi, en tant que les diferents tècniques utilitzades poden presentar un lliniar de detecció diferent i això en pot condicionar la quantitat de biomassa necessària. En general per a la determinació estructural de les molècules presents en el còctel de soluts (per mitjà de diferents experiments de ressonància magnètica nuclear) és necessari treballar amb volums de cultiu elevats (per exemple: ≥ 4 L en el cas de BVS i 1 L en cultius de *Bacillus cereus*), mentre que per a la quantificació de soluts (a l'HPLC) la biomassa de 100 ml de cultiu és suficient. Per a la monitorització dels cultius s'han realitzat diferents mesures turbidomètriques a 650 nm. Els cultius en fase estacionària han estat concentrats per centrifugació a 10500 x g durant 20' a una temperatura ≤ 10 °C. Alternativament, en el cas de volums de cultiu elevats s'ha

procedit a concentrar-los en un *Westfalia separator*. El concentrat cel·lular obtingut s'ha rentat amb una solució isotònica i s'ha tornat a centrifugar a 10500 x g durant 15' a una temperatura ≤ 10 °C. En les mostres d'experiments de *uptake* (mesura d'incorporació de soluts del medi) s'han realitzat dos passos de rentat addicionals per eliminar qualsevol traça dels suplementes de soluts compatibles afegits en el medi. El concentrat cel·lular obtingut ha estat liofilitzat abans de continuar endavant amb el protocol, per així poder referenciar les mesures de quantificació de soluts acumulats o proteïna respecte al contingut inicial de biomassa en pes sec. Una visió general del procés d'extracció es detalla a continuació:

1. A partir de la quantitat especificada de biomassa liofilitzada, afegir 16,7 volums (w/v) de la solució modificada de Bligh & Dyer (metanol-cloroform-aigua en les proporcions de volums 10:5:4).
2. Agitar vigorosament (en un agitador rotatori o magnètic pels volums més grans) durant el temps especificat.
3. Afegir 4,3 volums de cloroform i 4,3 volums d'aigua a la suspensió.
4. Agitar vigorosament durant el temps especificat.
5. Centrifugar la suspensió a 5000 x g durant 10' per afavorir la separació de fases.
6. Transferir l'epifase a un nou tub. Aquesta fase (hidrofílica) serà la utilitzada per a la determinació del contingut de soluts compatibles.
7. Congelar els extractes (-20 °C) fins al moment de la realització de l'anàlisi.

El resum esquemàtic del procés i les variacions de la quantitat de biomassa processada, temps d'agitació i reactius necessaris en relació a l'objectiu final de l'anàlisi (determinació estructural o quantificació) es detallen en la figura A3-1.

3.2. Determinació dels soluts compatibles presents en els extractes cel·lulars

3.2.1. Anàlisi espectroscòpica: ressonància magnètica nuclear

En un primer nivell d'aproximació, la determinació dels soluts compatibles presents en els extractes cel·lulars es realitza habitualment per mitjà d'experiments de ressonància magnètica nuclear (RMN) basats en l'estudi dels espectres de carboni (1D-¹³C, DEPT-135). Aquesta tècnica permet obtenir un recompte dels carbonis de la molècula i determinar-ne la seva multiplicitat (C, CH, CH₂, CH₃), alhora permet disposar d'un espectre relativament simplificat quan es treballa a partir dels extractes

cel·lulars, que generalment presenten una barreja de diferents soluts compatibles (còctel de soluts). La confirmació dels soluts tentativament identificats es pot realitzar per mitjà de l'addició d'estàndards en l'extracte, per contra alguns compostos rars (no identificats) requereixen diverses anàlisis complementàries a fi de determinar i confirmar la seva estructura (veure apartat 3.2.2.).

Per a la realització dels experiments de $1D-^{13}C$ és necessari disposar d'un mínim de 1 g de pes sec de cultiu. Després de l'extracció (segons el procés descrit anteriorment) es concentra l'epifase al rotovapor fins a sequedat (evaporació del solvent en condicions de baixa pressió); la temperatura del bany es mantindrà a valors compresos entre 40 i 45 °C. El residu sòlid obtingut es dissol en 1 ml de D_2O per donar la senyal de *lock* de freqüència interna i evitar possibles interferències de l'aigua, i es filtra per eliminar les impureses no solubles o particulades. Els experiments de RMN s'han realitzat amb un espectròmetre de transformada de Fourier Bruker Avance DPX 200. El paràmetres de treball han estat els següents: 300 K, 50,32 MHz en el canal de ^{13}C o 200 MHz en el canal 1H . Com a referència interna s'ha utilitzat una alíquota de 'TSP- $d_4(3-(trimethylsilyl)-2,2,3,3,d_4$ propionic acid sodium salt (TMSP)', alternativament s'han utilitzat referències externes (sobreposició d'espectres).

3.2.2. Determinació estructural de compostos rars

Per a la determinació estructural dels compostos no identificats a partir dels experiments de $1D-^{13}C$ o $1D-^1H$ ha estat necessari realitzar diferents anàlisis complementàries. Per a la caracterització preliminar (pas previ a la preparació cromatogràfica del compost), com també en l'estudi posterior, ha estat útil estudiar les connectivitats entre els àtoms de la molècula a partir dels experiments de RMN en 2 dimensions (2D-NMR). D'entre les diferents variants tècniques disponibles s'han utilitzat els experiments de COSY (*CORrelation Spectroscopy*), HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation spectroscopy*) i HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation spectroscopy*). A tall d'introducció, l'experiment COSY permet identificar els acoblaments (correlació entre àtoms) dels protons via 2 o 3 enllaços (J^2 o J^3); l'experiment HMQC permet establir correlacions entre els carbonis i protons amb els quals estan directament units (acoblament a un enllaç); l'experiment HMBC permet també establir correlacions entre els carbonis i protons, però que es troben a una distància més gran d'un enllaç, generalment per sobre de 2 o 3 enllaços quan l'heteroàtom analitzat és el ^{13}C - d'aquesta manera, es

poden identificar les correlacions ^{13}C - ^1H a través d'heteroàtoms com ara N o O -. Ambdues tècniques (HMQC i HMBC) presenten una bona sensibilitat en relació a altres disponibles, ja que es realitza una detecció inversa, és a dir, el nucli observat és el protó.

Altres anàlisis requereixen un pas previ de preparació cromatogràfica del compost per tal de poder obtenir resultats versemblants. El tipus de tècnica cromatogràfica (generalment s'utilitzen reïnes de bescanvi iònic) i els paràmetres de treball cal ajustar-los en cada cas (veure capítol III de resultats i discussió per conèixer els detalls del mètode desenvolupat en el cas de N^ε-acetil-β-lisina). Tot i així, alhora de desenvolupar un procediment de cromatografia preparativa cal prioritzar la simplicitat del mètode (realització del nombre mínim de passos i facilitat operacional) i l'eficiència de recuperació durant el procés.

Amb el compost purificat es pot procedir a la seva caracterització per mitjà de la combinació de diferents tècniques espectroscòpiques i espectromètriques. D'entre el ventall de possibles tècniques es podria considerar la repetició dels experiments de 2D-NMR anteriorment citats (a més a més d'altres basats en l'estudi d'altres heteroàtoms), la determinació de la massa molecular per mitjà d'espectrometria de masses (LC-MS: *Electrospray mass spectrometry*) i l'estudi dels grups funcionals de la molècula per mitjà de l'espectroscopia d'infraroig (IR spectroscopy).

3.3. Quantificació de soluts compatibles

3.3.1. Anàlisis de cromatografia líquida d'elevada resolució (HPLC)

La concentració dels derivats d'aminoàcids zwitteriònics i sacàrids s'ha determinat en base al mètode de Galinski i Herzog (Galinski and Herzog, 1990). Després de l'extracció (veure figura A3-1 per una visió esquemàtica del procediment), una alíquota de la fase aquosa es dilueix amb un volum conegut d'acetonitril 70% (v/v) i es procedeix a l'anàlisi cromatogràfica en mode isocràtic. En el procés s'ha utilitzat una columna de fase reversa Nucleosil 100 NH₂, 5 μm, 25 x 0,46 cm (Teknokroma) acoblada a un equip Waters 600E HPLC equipat amb un detector d'ultraviolat Jasco UV-1570 (mesurant l'absorció a 210 nm) i un detector d'índex de refracció Waters 2414. La fase mòbil ha estat acetonitril 70% (v/v) amb un flux de 1 ml·min⁻¹.

Per a l'anàlisi de RMN

1 g de material cel·lular liofilitzat

Per a l'anàlisi d'HPLC

30 mg de material cel·lular liofilitzat

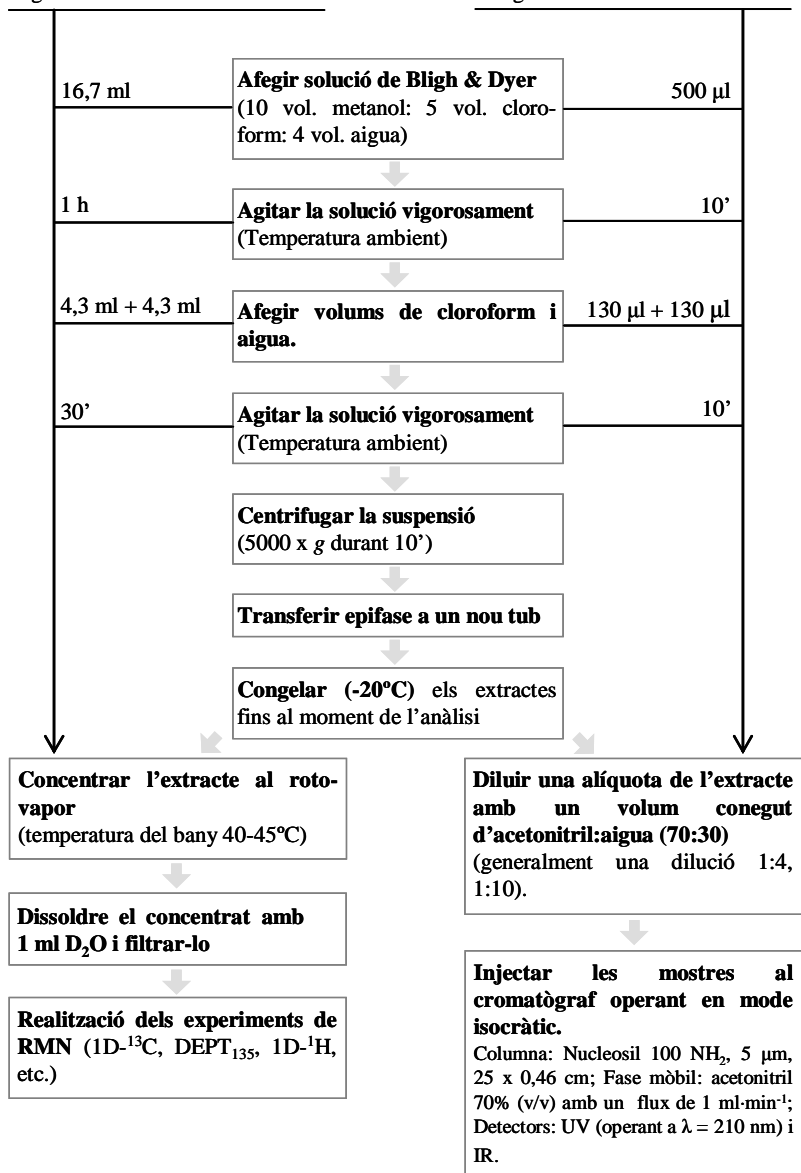


Figura A3-1. Resum esquemàtic del processat de les mostres on es s'especifiquen les variacions de la quantitat de biomassa utilitzada, temps d'agitació i reactius necessaris en relació a l'objectiu final de l'anàlisi (determinació estructural per mitjà de RMN o quantificació a l'HPLC).

Si la quantificació es realitza únicament a partir d'un detector d'índex de refracció cal aplicar un pas previ de desalinització de les mostres (fase aquosa de l'extracte), per tal d'eliminar el senyal d'interferència que es dona en presència de sals (principalment quan els medis presenten salinitats elevades). Per a la quantificació s'han utilitzat diferents estàndards dels compostos d'interès: ectoïna i hidroxiectoïna subministrats per E. A. Galinski; N^e-acetil-β-lisina preparada cromatogràficament a partir d'extractes cel·lulars de *Bacillus cereus* CECT 148^T; betaïna i trehalosa disponibles comercialment. Les dades de quantificació s'han expressat en relació al contingut de proteïna per eliminar el biaix degut a les diferents concentracions de sals testades en els medis (veure apartat següent).

3.3.2. Quantificació de proteïna

El mètode utilitzat per a la determinació de la concentració de proteïnes fou descrit per Lowry *et al.* (Lowry *et al.*, 1951). El mètode es basa en el principi químic pel qual el Cu²⁺, en condicions alcalines, té la capacitat d'acomplexar-se amb l'enllaç peptídic de les proteïnes i reduir-se a Cu⁺; posteriorment, el coure reduït i dels radicals aromàtics de les proteïnes reaccionen amb el reactiu de fenol Folin-Ciocalteu i formen un complex inestable que es va reduint a blau de tungstè/molibdè, reacció que es pot quantificar per a l'absorció característica que produeix aquest compost al pas de la llum (per a la mesura: λ fixada a 663 nm). Anteriorment a la realització del procés d'extracció de proteïna es fa un procés d'extracció de pigments i sofre amb solvents orgànics (acetona:metanol), ja que aquests compostos interferirien en la mesura d'absorbància. El protocol adaptat a tubs tipus *ependorf* (2 ml) es descriu a continuació (M. Ros, comunicació personal):

1. Centrifugar un volum de mostra (1 ml si el cultiu és dens) (1-2 ml) a 4000 rpm durant 20' a 4 °C. En el cas de treballar a partir del cultiu liofilitzat (pes sec), són suficients 15 mg de pes sec per a l'anàlisi.
2. Resuspendre el sediment obtingut amb 1,5 ml d'acetona:metanol (7:2).
3. Sonicar les mostres a 33 Hz durant 10 segons.
4. Guardar al congelador
5. Centrifugar a 4000 rpm durant 20' a 4 °C.
6. Descartar el sobrenedant (extracte de pigments i sofre).
7. Resuspendre el sediment cel·lular amb 1 ml NaOH 1M.
8. Digerir la mostra a 100 °C durant 30'.

9. Agafar una alíquota de 200 μl de mostra i afegir 1 ml reactiu A (100 ml Na_2CO_3 al 2 % + 1 ml $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% + 1ml de tartrat de sodi-potassi al 1%). Agitar bé.
10. Incubar 10'.
11. Afegir 100 μl de reactiu de fenol *Folin-Ciocalteu*. Agitar bé.
12. Incubar 30'.
13. Llegir l'absorbància a 663 nm.
14. Determinar el valor concentració proteïna ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en una patró realitzada amb BSA. Referir el valor obtingut a la mesura de pes sec.

Per a la confecció del patró s'utilitza BSA (albúmina de sèrum boví). Cal preparar diferents solucions (7 o 8 són suficients) que cobreixin un rang de concentració ample (de 0 a 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), realitzar els passos del 9 al 13 del protocol descrit per a les mostres.

Summary tables. Nomenclature conversion table of GSB species. Phenotypic and genetic features of GSB species included in the phylogenetic-taxonomical analysis.

Index of tables

Table A4-1. Species nomenclature conversion table considering current and previous classification criteria applied to GSB.

Table A4-2. DNA G+C content and major fatty acids composition of some of the species listed in the phylogenetic-taxonomical analysis.

Table A4-3. Salt behavior and origin/habitat-related information of the GSB included in the phylogenetic-taxonomical analysis.

Table A4-4. Other phenotypic features used for GSB strain characterization.

Table A4-1. List of all GSB species and strains included in the analysis of the phylogenetic-taxonomical characters. Species and strain designation has been done according to the current nomenclature (emended by Imhoff, 2003), but previous names are also referred. *EPC* epibiont bacterium of phototrophic consortia, (+) genome sequence is available in the databases, (-) genome sequence is not available, *u* unfinished genome sequence is available in the databases, *n.a.* unfinished genome sequence is not available.

Group *	Strain code		Species name	Previous name	GenBank accession number 16S rDNA	Genomic data
	DSMZ	Others				
1	DSM271 ^T	SK 413	<i>Prosthecochloris aestuarii</i>	<i>Prosthecochloris aestuarii</i>	Y07837	u
1	DSM 260 ^T	6030	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i>	<i>Chlorobium vibrioforme</i>	M62791= M27804	-
1	DSM 1678	B1-Zenit	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i>	<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	AJ290833	-
1		2K	<i>Prosthecochloris</i> sp.	<i>Prosthecochloris aestuarii</i>	AJ290835	-
1		CIB 2401	<i>Prosthecochloris</i> sp.	<i>Pelodictyon phaeum</i>	AJ291828	-
1		CHP 3401	<i>Prosthecochloris aestuarii</i>	<i>Prosthecochloris aestuarii</i>	AJ291826	-
1		CHP 3402	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i>	<i>Chlorobium vibrioforme</i>	AJ291827	-
1		Vk	<i>Prosthecochloris</i> sp. Vk		AJ888467	-
1		4Vi	<i>Prosthecochloris</i> sp. 4Vi		AJ888468	-
1		SKGSB	' <i>Prosthecochloris indicum</i> ' ^a		AJ887996	-
1		BS-1	' <i>Chlorobium phaeobacteroides</i> ' BS1		AJ972456	u
1		GSB1	' <i>Chlorobium bathyomarinum</i> ' ^a		AY627756	-
1		UdG7004Chp	<i>Prosthecochloris aestuarii</i>		EF064309	-
1		UdG7005Chp	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i>		EF064310	-
1		UdG7006Lms	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i>		EF064312	-
1		UdG7009Lms	<i>Prosthecochloris</i> sp.		EF064313	-
1		UdG7010Lms	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i>		EF064314	-
1		UdG7007Lpa	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i>		EF064311	-
1		UdG7008Cib	<i>Prosthecochloris</i> sp.		EF064315	-

* Phylogenetic group classification within GSB according to Alexander *et al.* (2002).

^(a) Unpublished name; this taxonomic name was not validly published at the time of submission of the corresponding sequence entry.

^(b) Further studies are necessary to determine their relationship to *Chl.limicola* (Imhoff, 2003).

Table A4-1. (Continued).

Group *	Strain code		Species name	Previous name	GenBank accession number 16S rDNA	Genomic data
	DSMZ	Others				
2a	DSM 273 ^T	2530	<i>Chlorobium luteolum</i>	<i>Pelodictyon luteolum</i>	Y08107	+
2a	DSM 262	6132	<i>Chlorobium luteolum</i>	<i>Chlorobium vibrioforme</i>	Y08103	-
2b	DSM 269 ^T	2631	<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	Y08105	-
2b	DSM 265	1930	<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	<i>Chlorobium vibrioforme</i> subsp. <i>thiosulfatophilum</i>	AJ290829	u
2b	DSM 270	2531	<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	AJ290834	-
2b	DSM 261	2630	<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	<i>Chlorobium vibrioforme</i>	AJ290828	-
3a	DSM 266 ^T	2430	<i>Chlorobium phaeobacteriodes</i>	<i>Chlorobium phaeobacteriodes</i>	Y08104	u
3a	DSM 13031 ^T	KoFox	' <i>Chlorobium ferroxidans</i> '	' <i>Chlorobium ferroxidans</i> '	Y18253	u
3a	DSM 5477 ^T	Bu 1	<i>Chlorobium clathratiforme</i>	<i>Pelodictyon phaeoclathratiforme</i>	Y08108	u
3a		PG	<i>Chlorobium clathratiforme</i>	<i>Peodictyon clathratiforme</i>	Y08106	-
3b	DSM 245 ^T	6330	<i>Chlorobium limicola</i>	<i>Chlorobium limicola</i>	Y10113	u
3b	DSM 246	1230	<i>Chlorobium limicola</i>	<i>Chlorobium limicola</i>	AJ290824	-
3b	DSM 1855	5230	<i>Chlorobium limicola</i>	<i>Chlorobium phaeobacterioides</i>	AJ290832	-
3b		1630	<i>Chlorobium limicola</i>	<i>Chlorobium limicola</i> subsp. <i>thiosulfatophilum</i>	AJ290826	-
3b		9330	<i>Chlorobium limicola</i>	<i>Chlorobium limicola</i> subsp. <i>thiosulfatophilum</i>	AJ290827	-
3b		UdG 6046	' <i>Chlorobium limicola</i> ' ^b	<i>Chlorobium phaeobacterioides</i>	Y10650	-
3b		UdG 6047	' <i>Chlorobium limicola</i> ' ^b	<i>Chlorobium phaeobacterioides</i>	Y10651	-
3b		UdG 6051	' <i>Chlorobium limicola</i> ' ^b	<i>Chlorobium phaeobacterioides</i>	Y10652	-

Table A4-1. (Continued).

Group *	Strain code		Species name	Previous name	GenBank accession number 16S rDNA	Genomic data
	DSMZ	Others				
4a	DSM 263 ^T	NCIB 8327	<i>Chlorobaculum parvum</i>	<i>Chlorobium vibrioforme</i> subsp. <i>thiosulfatophilum</i>	Y10647	-
4a		NCIB 8346	<i>Chlorobaculum parvum</i>	<i>Chlorobium vibrioforme</i> subsp. <i>thiosulfatophilum</i>	AJ290830	-
4a		UdG6501Lms	<i>Chlorobaculum parvum</i>		EF064316	-
4a		UdG 6026	<i>Chlorobaculum chlorovibrioides</i>	<i>Chlorobium chlorovibrioides</i>	Y10649	-
4a		UdG6043	<i>Chlorobaculum chlorovibrioides</i>	<i>Chlorobium vibrioforme</i>	Y10648	-
4a		4GSBT	' <i>Chlorobium gokarna</i> ' ^a		AJ888464	-
4b	DSM 249 ^T	6230	<i>Chlorobaculum thiosulfatophilum</i>	<i>Chlorobium limicola</i> subsp. <i>thiosulfatophilum</i>	Y08102	-
4b		1430	<i>Chlorobaculum thiosulfatophilum</i>	<i>Chlorobium limicola</i> subsp. <i>thiosulfatophilum</i>	AJ290825	-
4b		ATCC 49652 ^T / NCZ / TLS	<i>Chlorobaculum tepidum</i>	<i>Chlorobium tepidum</i>	M58468	+
4b	DSM 1677 ^T	4930	<i>Chlorobaculum limnaeum</i>	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	AJ290831	-
4b		1549	<i>Chlorobaculum limnaeum</i>	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	AJ299413	-
4b		UdG 6038	<i>Chlorobaculum limnaeum</i>	<i>Chlorobium limicola</i>	Y10641	-
4b		UdG 6040	<i>Chlorobaculum limnaeum</i>	<i>Chlorobium limicola</i>	Y10642	-
4b		UdG 6042	<i>Chlorobaculum limnaeum</i>	<i>Chlorobium limicola</i>	Y10644	-
4b		UdG 6045	<i>Chlorobaculum limnaeum</i>	<i>Chlorobium limicola</i>	Y10646	-
4b		1	' <i>Clathrochloris sulfurica</i> '	' <i>Clathrochloris sulfurica</i> '	X53184	-
5		ATCC 35110 ^T	<i>Chloroherpeton thalassium</i>	<i>Chloroherpeton thalassium</i>	AF170103 // GB-78	u (n.a)
EPC		CaD	<i>Chlorobium chlorochromatii</i>		AJ578461	+

Table A4-2. DNA G+C content and major fatty acids composition of some of the species and strains listed in the phylogenetic-taxonomical analysis. Besides 16S rRNA and *fmo* gene sequences, DNA G+C content, salt requirements and the composition of lipids and fatty acids have been used to support a new phylogenetic-based taxonomy (Imhoff, 2003). Note that data from many of the strains are still lacking. The phylogenetic group classification within GSB is based on Alexander *et al.* (2002).

Group	Species name	Strain code	DNA G + C content (mol%)	Major fatty acids (%total)		
				C _{14:0}	C _{16:0}	C _{16:1}
1	<i>Prosthecochloris aestuarii</i>	DSM271 ^T	52-56.1 (56.4)	-	-	-
1	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i>	DSM 260 ^T	53.5	-	-	-
2a	<i>Chlorobium luteolum</i>	DSM 273 ^T	58.1	14	21	47
2a	<i>Chlorobium luteolum</i>	DSM 262	57.1			
2b	<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	DSM 269 ^T	53.0	10	29	51
2b	<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	DSM 265	53.5	12	23	52
2b	<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	DSM 270	52.0	-	-	-
2b	<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	DSM 261	52.0	-	-	-
3a	<i>Chlorobium phaeobacteriodes</i>	DSM 266 ^T	49.0	16	15	64
3a	' <i>Chlorobium ferroxidans</i> '	DSM 13031 ^T	-	-	-	-
3a	<i>Chlorobium clathratiforme</i>	DSM 5477 ^T	47.9	-	-	-
3a	<i>Chlorobium clathratiforme</i>	PG	48.5	-	-	-
3b	<i>Chlorobium limicola</i>	DSM 245 ^T	51.0	13	17	57
3b	<i>Chlorobium limicola</i>	DSM 246	52.0	-	-	-
3b	<i>Chlorobium limicola</i>	1630	52.5	-	-	-
3b	<i>Chlorobium limicola</i>	9330	52.0	-	-	-
4a	<i>Chlorobaculum parvum</i>	DSM 263 ^T	56.6	24	23	43
4a	<i>Chlorobaculum parvum</i>	NCIB 8346	56.1	-	-	-
4a	<i>Chlorobaculum chlorovibrioides</i>	UdG 6026	54.0	-	-	-
4b	<i>Chlorobaculum thiosulfatophilum</i>	DSM 249 ^T	58.1	21	10	43
4b	<i>Chlorobaculum thiosulfatophilum</i>	1430	58.1	-	-	-
4b	<i>Chlorobaculum tepidum</i>	ATCC 49652 ^T	56.5	-	-	-
4b	<i>Chlorobaculum limnaeum</i>	DSM 1677 ^T	-	-	-	-
4b	' <i>Clathrochloris sulfurica</i> '	1	-	-	-	-
5	<i>Chloroherpeton thalassium</i>	ATCC 35110 ^T	45.0-48.2	-	-	-
epibiont consortia	<i>Chlorobium chlorochromatii</i>	CaD	46.7	-	-	-

Table A4-3. Salt behavior and origin/habitat-related information of the GSB included in the phylogenetic-taxonomical analysis. *B* brackish water, *F* freshwater, *M* marine water, *SHF* slightly halotolerant freshwater bacteria, *EPC* epibiont of a phototrophic consortia, * data obtained in the present work. The phylogenetic group classification within GSB is based on Alexander *et al.* (2002).

Group	Species name ¹	Strain code	Salt required	Salt optimum	Range of salts tolerated	Salt response ²	Origin / habitat description	References
1	<i>Prosthecochloris aestuarii</i>	DSM271 ^T	+	2-5%	1-8%	M	Shallow saline waters up to 21% NaCl	(Gorlenko, 1970; Puchkova, 1984)
1	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i>	DSM 260 ^T	>1%	1-3%	1-3% / (5%)*	B/M	Moss Landing, California; Estuary / Mud and stagnant water	(Pelsh, 1936)
1	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i>	DSM 1678	>1%				Japan; Seaside	
1	<i>Prosthecochloris</i> sp.	2K	+		1-7% *			
1	<i>Prosthecochloris</i> sp.	CIB 2401	ND	3%			Cibollar lake, Mallorca island (Spain); Coastal brackish lagoon	(Vila et al., 2002)
1	<i>Prosthecochloris aestuarii</i>	CHP 3401	ND		> 5.3%		"La Salada de Chiprana" (Chiprana Lagoon) semi-arid region of Ebro depression (Aragon, Spain); hypersaline, endorheic lagoon	(Vila et al., 2002)
1	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i>	CHP 3402	ND		> 5.3%		Chiprana Lagoon	(Vila et al., 2002)
1	<i>Prosthecochloris</i> sp. Vk	Vk			at least marine		Visakhapatnam (India); fishing harbor	(Anil Kumar et al., 2005b)
1	<i>Prosthecochloris</i> sp. 4Vi	4Vi			at least marine		Visakhapatnam; Rama Krishna Beach (India); fishing harbor, beach	(Anil Kumar et al., 2005b)
1	' <i>Prosthecochloris indicum</i> ' ^a	SKGSB			at least marine		Kakinada, Andhra Pradesh (India); aquaculture pond	(Anil Kumar et al., 2005c)
1	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	BS-1			≥1.4%		Black Sea; chemocline (depth of 100m)	(Manske et al., 2005)
1	' <i>Chlorobium bathyomarinum</i> ' ^a	GSB1			(-)		deep-sea hydrothermal vent of East Pacific Rise; TY black smoker (2.391 m depth)	(Beatty et al., 2005)
1	<i>Prosthecochloris aestuarii</i>	UdG7004Chp	≥1%	1-3%	1-7%	B/M	Chiprana Lagoon	
1	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i>	UdG7005Chp	-	1-5%	0-10%	M	Chiprana Lagoon	
1	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i>	UdG7006Lms	-/+ ³	2-5%	0 ³ -7%	M	La Massona Lagoon, Empordà marshes (NE Catalonia, Spain); Coastal meromictic lagoon	
1	<i>Prosthecochloris</i> sp.	UdG7009Lms	-	1-3%	0-7%	B/M	Massona Lagoon	
1	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i>	UdG7010Lms	≥1%	1-3%	1-6%	M	Massona Lagoon	
1	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i>	UdG7007Lpa	-	[0] ⁴ ;1-7%	0-9%	M	La Playa Lagoon, semi-arid region of Ebro depression (Aragon, Spain); hypersaline pond	
1	<i>Prosthecochloris</i> sp.	UdG7008Cib	ND	ND	ND	ND	Cibollar Lagoon	

1- Species designation according to nomenclature and descriptions emended by Imhoff (2003).

2- Classification of bacteria according to their salt optima applied by Imhoff (2001)

3- Slight growth observed in the absence of significant concentrations of salt (≤0.15% NaCl).

4- Almost optimal growth under this condition.

(^a) Unpublished name; this taxonomic name was not validly published at the time of submission of the corresponding sequence entry.

(*) Determined in the present work.

Table A4-3. (Continued).

Group	Species name ¹	Strain code	Salt required	Salt optimum	Range of salts tolerated	Salt response	Origin / habitat description	References
2a	<i>Chlorobium luteolum</i>	DSM 273 ^T	≥1%	2-5%	7% *	M	Lake Polden, Norway; meromictic lake	(Pfennig and Trüper, 1971)
2a	<i>Chlorobium luteolum</i>	DSM 262					Brackish pond	
2b	<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	DSM 269 ^T	≥1%	1-2%	5%*	B	meromictic Lake Langvikvann, Norway; mud and stagnant water	(Pfennig, 1968)
2b	<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	DSM 265	>1%	1-2%		B	Sehestedt, Northern Germany; intertidal flat	(Pfennig and Trüper, 1971)
2b	<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	DSM 270	>1%				Lake Polden, Norway	
2b	<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	DSM 261	≥1%	1%		B	meromictic Lake Langvikvann, Norway	
3a	<i>Chlorobium phaeobacterioides</i>	DSM 266 ^T	-			F	Blankvann, Oslo, Norway	(Pfennig, 1968)
3a	' <i>Chlorobium ferroxidans</i> '	DSM 13031 ^T	-				Konstanz and Oldenburg, Germany; anoxic sediments of shallow freshwater ditches	Heising S <i>et al.</i> 1999 (Ludwig W.)
3a	<i>Chlorobium clathratiforme</i>	DSM 5477 ^T	-		≤0.5%	F	Buchensee, South Germany	(Overmann and Pfennig, 1989)
3a	<i>Chlorobium clathratiforme</i>	PG	-		ND	F		
3b	<i>Chlorobium limicola</i>	DSM 245 ^T	-		ND	F	Gilroy Hot Spring, Santa Clara, CA, USA; mud and water of ditches, ponds and lakes	(Nadson, 1906)
3b	<i>Chlorobium limicola</i>	DSM 246	-			F		
3b	<i>Chlorobium limicola</i>	DSM 1855	-			F		
3b	<i>Chlorobium limicola</i>	1630	-			F		
3b	<i>Chlorobium limicola</i>	9330	-			F		
3b	' <i>Chlorobium limicola</i> '	UdG 6046	-			F	Banyoles Lake (Spain); meromictic basin	(Figueras <i>et al.</i> , 1997)
3b	' <i>Chlorobium limicola</i> '	UdG 6047	-			F	Banyoles Lake (Spain); meromictic basin	(Figueras <i>et al.</i> , 1997)
3b	' <i>Chlorobium limicola</i> '	UdG 6051	-			F	Siso Lake (Spain)	(Figueras <i>et al.</i> , 1997)

Table A4-3. (Continued).

Group	Species name ¹	Strain code	Salt required	Salt optimum	Range of salts tolerated	Salt response	Origin / habitat description	References
4a	<i>Chlorobaculum parvum</i>	DSM 263 ^T	>1%	1-2% (2%)		B		
4a	<i>Chlorobaculum parvum</i>	NCIB 8346	>1%	1%		B		
4a	<i>Chlorobaculum parvum</i>	UdG6501Lms	-	0-5%	0-7%	SHF	Massona Lagoon	
4a	<i>Chlorobaculum chlorovibrioides</i>	UdG 6026	2 %			B/M	Massona Lagoon	(Figueras et al., 1997)
4a	<i>Chlorobaculum chlorovibrioides</i>	UdG6043	5%			M	Florida Everglades (USA)	(Figueras et al., 1997)
4a	' <i>Chlorobium gokarna</i> ' ^a	4GSBT			at least marine		Salt pans of Gokarna, India; salt pan	(Anil Kumar et al., 2005a)
4b	<i>Chlorobaculum thiosulfatophilum</i>	DSM 249 ^T	-		up to 3%	F	Tassajara Springs, CA, USA	(Pfennig and Trüper, 1971)
4b	<i>Chlorobaculum thiosulfatophilum</i>	1430	-			F		
4b	<i>Chlorobaculum tepidum</i>	ATCC 49652 ^T	-			F	"Travelodge Stream" Rotorua, New Zealand; high-sulfide acidic (pH 4.5-6) thermal springs at 55 °C	(Wahlund et al., 1991)
4b	<i>Chlorobaculum limnaeum</i>	DSM 1677 ^T	-			F		(Alexander, 2002)
4b	<i>Chlorobaculum limnaeum</i>	1549	-			F		
4b	<i>Chlorobaculum limnaeum</i>	UdG 6038	-			F	Wintergreen Lake (USA)	(Figueras et al., 1997)
4b	<i>Chlorobaculum limnaeum</i>	UdG 6040	-			F	Puda Spring Mat (Spain); spring with a sulfide containing effluent	(Figueras et al., 1997)
4b	<i>Chlorobaculum limnaeum</i>	UdG 6042	-			F	Vilar Lake (Spain); meromictic basin	(Figueras et al., 1997)
4b	<i>Chlorobaculum limnaeum</i>	UdG 6045	-			F	Wintergreen Lake (USA)	(Figueras et al., 1997)
4b	' <i>Clathrochloris sulfurica</i> '	1	-			F		(Geitler and Pascher, 1925)
5	<i>Chloroherpeton thalassium</i>	ATCC 35110 ^T	+	1-2%		B	Woods Hole, MA, USA / Marine littoral sediments from Cape Cod, USA	(Gibson et al., 1984)
EPC	<i>Chlorobium chlorochromatii</i>	CaD	-		0.4-0.7%	F	Lake Dagow (Brandenburg, Germany)	(Vogl et al., 2006)

Table A4-4. Other phenotypic features used on GSB strain characterization. *BChl* bacteriochlorophyll, *car* carotene, *Cbt* chlorobactene, *Iso* isorenieratene, *rho* rhodopin, *lyc* lycopene, *OH der.* Hydroxyl derivatives.

Group ¹	Species name ²	Strain code	Shape, size (µm)	Major photosynthetic pigments	Cell suspension color	Gas vesicles	Use of thiosulfate
1	<i>Prosthecochloris aestuarii</i>	DSM271 ^T	spherical ; 10-20 prosthecae/cell ; 0.5-0.7 x 1.0-1.2	BChl <i>c</i> , Cbt (rho, lyc and OH_der.)	intensive green to grayish green	-	-
1	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i>	DSM 260 ^T	curved rod, C or vibrioid ; 0.5-0.7 x 1.0-2.0	BChl <i>d</i> and <i>c</i> , <i>e</i> ; Cbt, Iso	green/brown	+/-	-
1	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i>	DSM 1678		BChl <i>e</i>		-	-
1	<i>Prosthecochloris</i> sp.	2K			intensive green	-	-
1	<i>Prosthecochloris</i> sp.	CIB 2401	straight or curved rods ; 0.6-0.9 x 1.0-2.0	BChl <i>e</i> , Iso	chocolate brown	+	-
1	<i>Prosthecochloris aestuarii</i>	CHP 3401	small, star			-	-
1	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i>	CHP 3402	small, curved, vibrioid	BChl <i>d</i> and <i>c</i> , Cbt		-	-
1	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	BS-1	rod ; 0.65 ± 0.1 x 2.8 ± 1.2 (1.8 ± 0.5 at low light intensities)	BChl <i>e</i> , Iso, β-Iso		-	-
1	' <i>Chlorobium bathyomarinum</i> ' ^a	GSB1	rod ; 0.3 x 1.0	BChl <i>c</i> , Cbt		-	-
1	<i>Prosthecochloris aestuarii</i>	UdG7004Chp	spherical with prosthecae ; 1.1 ± 0.09	BChl <i>c</i> ↑ and <i>d</i> , Cbt (<i>trans</i> , <i>9-15cis</i>), β ψ-car (<i>trans</i> , <i>15cis</i>)	yellowish green	-	-
1	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i>	UdG7005Chp	vibrioid ; 0.7 ± 0.09 x 1.5 ± 0.24	BChl <i>c</i> and <i>d</i> , Cbt (<i>trans</i> , <i>9-15cis</i>), β ψ-car (<i>trans</i> , <i>15cis</i>)	intensive green	-	-
1	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i>	UdG7006Lms	curved rod, vibrioid ; 0.6 ± 0.04 x 1.5 ± 0.28	BChl <i>e</i> , Iso (<i>trans</i> , <i>15cis</i>)	chocolate brown (reddish)	-	-
1	<i>Prosthecochloris</i> sp.	UdG7009Lms	curved rod, vibrioid ; 0.6 ± 0.10 x 1.6 ± 0.30. Cells are united in irregular oval colonies	BChl <i>c</i> and <i>d</i> , Cbt (<i>trans</i> , <i>9-15cis</i>) and OH der.	intensive green	-	-
1	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i>	UdG7010Lms	curved rod, vibrioid ; 0.6 x 1.5	BChl <i>e</i> , Iso (<i>trans</i> , <i>15cis</i>), β-Iso	chocolate brown (reddish)	-	-
1	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i>	UdG7007Lpa	vibrioid and C shaped ; 0.6 ± 0.08 x 1.4 ± 0.15	BChl <i>c</i> and <i>d</i> , Cbt (<i>trans</i> , <i>9-15cis</i>)	intensive green	-	-
1	<i>Prosthecochloris</i> sp.	UdG7008Cib		BChl <i>e</i> , Iso (<i>trans</i> , <i>15cis</i>), β-Iso (<i>9,15cis</i>) and β-car		-/+	-

1- Phylogenetic group classification within GSB according to Alexander *et al.* (2002).

2- Species designation according to nomenclature and descriptions emended by Imhoff (2003).

(^a) Unpublished name; this taxonomic name was not validly published at the time of submission of the corresponding sequence entry.

Table A4-4. (Continued).

Group ¹	Species name ²	Strain code	Shape, size (µm)	Major photosynthetic pigments	Cell suspension color	Gas vesicles	Use of thiosulfate
2a	<i>Chlorobium luteolum</i>	DSM 273 ^T	curved short rod ; 0.6-0.9 x 1.2-2.0 (and larger) ; spherical or irregular round colonies may be formed	BChl <i>c</i> or <i>d</i> , Cbt	green	+	-
2a	<i>Chlorobium luteolum</i>	DSM 262	0.5-0.7 wide	BChl <i>d</i> , Cbt		-	-
2b	<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	DSM 269 ^T	curved rod to vibrioid ; 0.3-0.4 x 0.7-1.4	BChl <i>e</i> , Iso	yellowish to reddish brown	-	-
2b	<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	DSM 265	curved rod, C-shaped or vibrioid ; 0.5-0.7 x 1.0-2.0	BChl <i>d</i> and <i>c</i> , Cbt	green	-	+
2b	<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	DSM 270		BChl <i>e</i>		-	-
2b	<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	DSM 261		BChl <i>d</i>		-	-
3a	<i>Chlorobium phaeobacteriodes</i>	DSM 266 ^T	straight or slightly curved rods ; 0.6-0.8 x 1.3-2.7	BChl <i>e</i> , Iso	yellowish to reddish brown	-	-
3a	' <i>Chlorobium ferroxidans</i> '	DSM 13031 ^T	short rod ; 0.5 x 1.0-1.5 (single or in pairs)	BChl <i>c</i> , Cbt		-	
3a	<i>Chlorobium clathratiforme</i>	DSM 5477 ^T	rod ; 0.8-1.1 x 1.5-3.0 (6.0 at 5-10 °C). Large three-dimensional net-like microcolonies may be formed	BChl <i>e</i> , Iso, β-Iso	dark brown (rose-red shine)	+	+
3a	<i>Chlorobium clathratiforme</i>	PG	rod ; 0.7-1.2 x 1.5-2.5 (7.0). Three-dimensional nets	BChl <i>c</i> , carotenoids	green	+	-
3b	<i>Chlorobium limicola</i>	DSM 245 ^T	Slightly-curved rod ; 0.7-1.1 x 0.9-1.5. Often chains like streptococci	BChl <i>c</i> (<i>d</i>), Cbt	green	-	-
3b	<i>Chlorobium limicola</i>	DSM 246	rod ; 0.7-1.0 x 0.9-1.5	BChl <i>c</i> , Cbt	green	-	
3b	<i>Chlorobium limicola</i>	DSM 1855		BChl <i>e</i> , Iso		-	-
3b	<i>Chlorobium limicola</i>	1630		BChl <i>c</i> , Cbt		-	+
3b	<i>Chlorobium limicola</i>	9330		BChl <i>c</i>		-	+
3b	' <i>Chlorobium limicola</i> '	UdG 6046	rod ; 0.7-1.0 x 1.2-4.0	BChl <i>e</i> , Iso	brown		
3b	' <i>Chlorobium limicola</i> '	UdG 6047	rod ; 0.7-1.0 x 1.2-4.0	BChl <i>e</i> , Iso	brown		
3b	' <i>Chlorobium limicola</i> '	UdG 6051	rod ; 0.7-1.0 x 1.2-4.0	BChl <i>e</i> , Iso	brown		

Table A4-4. (Continued).

Group ¹	Species name ²	Strain code	Shape, size (µm)	Major photosynthetic pigments	Cell suspension color	Gas vesicles	Use of thiosulfate
4a	<i>Chlorobaculum parvum</i>	DSM 263 ^T	vibrioid 0.7-0.8 x 0.8-1.2	BChl <i>c</i> , <i>d</i> , Cbt	green	-	+
4a	<i>Chlorobaculum parvum</i>	NCIB 8346		BChl <i>d</i>		-	+
4a	<i>Chlorobaculum parvum</i>	UdG6501Lms	vibrioid ; 0.8 ± 0.13 x 1.4 ± 0.18	BChl <i>c</i> and <i>d</i> , Cbt (<i>trans</i> , ₉₋₁₅ <i>cis</i>)	intensive to dark green	-	+
4a	<i>Chlorobaculum chlorovibrioides</i>	UdG 6026	vibrioid ; 0.4-0.7 x 1.0-1.2	BChl <i>c</i> , <i>d</i> , Cbt	green	-	-
4a	<i>Chlorobaculum chlorovibrioides</i>	UdG6043	vibrioid ; 0.7-0.8 x 0.8-1.0	BChl <i>c</i> , Cbt	green	-	
4a	' <i>Chlorobium gokarna</i> ' ^a	4GSBT					
4b	<i>Chlorobaculum thiosulfatophilum</i>	DSM 249 ^T	0.7-1.0 wide.	BChl <i>c</i> , Cbt	intensive green	-	+
4b	<i>Chlorobaculum thiosulfatophilum</i>	1430		BChl <i>c</i>			+
4b	<i>Chlorobaculum tepidum</i>	ATCC 49652 ^T	straight or slightly curved rods ; 0.6-0.8 x 1.3-2.6	BChl <i>c</i> , Cbt	dark green	-	+
4b	<i>Chlorobaculum limnaeum</i>	DSM 1677 ^T	rod ; 0.6-0.8 wide	BChl <i>e</i> , Iso (also BChl <i>c</i> , Cbt)	green	-	-
4b	<i>Chlorobaculum limnaeum</i>	1549				-	-
4b	<i>Chlorobaculum limnaeum</i>	UdG 6038	rod ; 0.7-1.0 x 0.9-1.5	BChl <i>c</i> , Cbt	green	-	
4b	<i>Chlorobaculum limnaeum</i>	UdG 6040	rod ; 0.8-1.0 x 1.5-2.0	BChl <i>c</i> , Cbt	green	-	
4b	<i>Chlorobaculum limnaeum</i>	UdG 6042	rod ; 0.8-1.0 x 1.5-2.0	BChl <i>c</i> , Cbt	green	-	
4b	<i>Chlorobaculum limnaeum</i>	UdG 6045	rod ; 0.7-1.0 x 1.0-1.5	BChl <i>c</i> , Cbt	green	-	
4b	' <i>Clathrochloris sulfurica</i> '	1	trellis-shaped cell aggregates	BChl <i>d</i>	yellowish green	+	
5	<i>Chloroherpeton thalassium</i>	ATCC 35110 ^T	long rods ; 1.0 x 8.0-30.0 (flexing and gliding motility)	BChl <i>c</i> , γ-car	deep green (yellow-orange without vit B ₁₂)	+	-
EPC	<i>Chlorobium chlorochromatii</i>	CaD	rod ; 0.5 ± 0.1 x 2.7 ± 0.6	BChl <i>c</i> , γ-car and their derivatives			-

Referències - References

- Abella, C. A. and L. J. Garcia-Gil, 1988. Diel Migration as a Mechanism for Enrichment of Natural Populations of Branching Species of *Pelodictyon*. J. M. Olson, Ormerod, J.G., Amez, J., Stackebrandt, E., Trüper, H.G. Green Photosynthetic bacteria Plenum Press. New York, 269-286.
- Achenbach, L. A., J. Carey and M. T. Madigan, 2001. Photosynthetic and phylogenetic primers for detection of anoxygenic phototrophs in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(7): 2922-2926.
- Alcorlo, P., 1999a. Redes Tróficas en Lagunas Salinas Temporales de la comarca de Los Monegros (Zaragoza). Departamento de Ecología. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de ciencias, Madrid: 301.
- Alcorlo, P. and A. Baltanás, 1999b. [Limnología de la lagunas salinas de Los Monegros y caracterización de sus comunidades animales]. A. Melic, and Blasco-Zumeta, J. Manifiesto científico por Los Monegros Bol. SEA., 113-120.
- Alexander, B., J. H. Andersen, R. P. Cox, and J. F. Imhoff, 2002. Phylogeny of green sulfur bacteria on the basis of gene sequences of 16S rRNA and of the Fenna-Matthews-Olson protein. *Arch. Microbiol.* **178**(2): 131-40.
- Alexander, B. and J. F. Imhoff, 2006. Communities of green sulfur bacteria in marine and saline habitats analyzed by gene sequences of 16S rRNA and Fenna-Matthews-Olson protein. *Int. Microbiol.* **9**(4): 259-266.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**(17): 3389-402.
- Amann, R., W. Ludwig and K. H. Schleifer, 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.
- Anderson, G. C., 1958. Some limnological features of a shallow saline meromictic lake. *Limnol. Oceanogr.* **3**(3): 259-270.
- Anil Kumar, P., T. N. R. Srinivas, C. Sasikala, C. V. Ramana, J. F. Imhoff and J. Suling, 2005a. *Chlorobium gokarna* sp. nov., a new green sulfur bacterium isolated from salt pans of Gokarna, India. Unpublished.
- Anil Kumar, P., T. N. R. Srinivas, C. Sasikala, C. V. Ramana, J. F. Imhoff and J. Suling, 2005b. *Prosthecochloris* sp. Vk, a new green sulfur bacterium is an isolate from fishing harbor of Viskhatpatnam, India. Unpublished.

- Anil Kumar, P., T. N. R. Srinivas, C. Sasikala, C. Venkataramana, J. F. Imhoff and J. Suiling, 2005c. *Prosthecochloris indicum* sp. nov., a novel green sulfur bacteria from aquaculture pond of kakinada, India. Unpublished.
- Armengol, J., F. A. Comin and P. López, 1983. [Balance térmico anual de la laguna de La Massona (Alt Empordà, Girona)]. Congreso Español de Limnología, 7-16.
- Barceló, J., G. Nicolás, B. Sabater and R. Sánchez, 1980. Fisiología vegetal. Pirámide, Madrid, 662
- Barker, H. A., J. M. Kahn and L. Hedrick, 1982. Pathway of lysine degradation in *Fusobacterium nucleatum*. *J. Bacteriol.* **152**(1): 201-207.
- Beatty, J. T., J. Overmann, M. T. Lince, A. K. Manske, A. S. Lang, R. E. Blankenship, C. L. Van Dover, T. A. Martinson and F. G. Plumley, 2005. An obligately photosynthetic bacterial anaerobe from a deep-sea hydrothermal vent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **102**(26): 9306-9310.
- Benaroudj, N., D. H. Lee and A. L. Goldberg, 2001. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* **276**(26): 24261-24267.
- Biebl, H. and N. Pfennig, 1978. Growth yields of green sulfur bacteria in mixed cultures with sulfur and sulfate reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* **117**: 9-16.
- Bligh, E. G. and W. J. Dyer, 1959. A rapid method of lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911-917.
- Bolen, D. W. and I. V. Baskakov, 2001. The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *J. Mol. Biol.* **310**(5): 955-963.
- Bonaterra, A., J. Cabrefiga, J. Camps and E. Montesinos, 2007. Increasing survival and efficacy of a bacterial biocontrol agent of fire blight of rosaceous plants by means of osmoadaptation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **in press**.
- Bonaterra, A., J. Camps and E. Montesinos, 2005. Osmotically induced trehalose and glycine betaine accumulation improves tolerance to desiccation, survival and efficacy of the postharvest biocontrol agent *Pantoea agglomerans* EPS125. *FEMS Microbiol. Lett.* **250**(1): 1-8.
- Boné Pueyo, A., 2006. [Decreto 85/2006 de 4 de abril, del Gobierno de Aragón, por el que se aprueba definitivamente el Plan de Ordenación de los Recursos Naturales del Complejo Lagunar de la Saladas de Chiprana]. *M. Ambiente. Gobierno de Aragón.* **BOA 45**: 4895-4918.
- Borrego, C. and L. J. Garcia-Gil, 1994. Separation of bacteriochlorophyll homologues from green photosynthetic sulfur bacteria by reversed-phase HPLC. *Photosynth. Res.* **41**: 157-163.

- Borrego, C. M., J. B. Arellano, C. A. Abellà, T. Gillbro and L. J. Garcia-Gil, 1999. The molar extinction coefficient of bacteriochlorophyll *e* and the pigment stoichiometry in *Chlorobium phaeobacterioides*. *Photosynth. Res.* **60**: 257-264.
- Borrego, C. M., L. J. Garcia-Gil, L. Bañeras and R. C. Brunet, 1993. Changes in the composition of phototrophic sulphur bacterial communities in three basins of Lake Banyoles (Spain). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **25**: 720-725.
- Brent, C. E. and N. Kolm, 2005. Species diversity can drive speciation. *Nature* **434**: 1015-1017.
- Brock, T. D., 1979. Ecology of saline lakes. M. Shilo. Strategies of microbial life in extreme environments Verlag Chemie Weinheim, 29-47.
- Brosius, J., J. P. Palmer, J. P. Kennedy and H. F. Naler, 1978. Complete nucleotide sequence of 16S ribosomal DNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 4801-4805.
- Brown, A. D., 1976. Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* **40**(4): 803-846.
- Brown, A. D., K. F. Mackenzie and K. K. Singh, 1986. Selected aspects of microbial osmoregulation. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**: 31-36.
- Brown, A. D. and J. R. Simpson, 1972. Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J. Gen. Microbiol.* **72**: 589-591.
- Brune, D. C., 1989. Sulfur oxidation by phototrophic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* **975**(2): 189-221.
- Bryant, D. A. and N. U. Frigaard, 2006. Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated. *Trends Microbiol.* **in press**.
- Bryant, M. P., E. A. Wolin, M. J. Wolin and R. S. Wolfe, 1967. *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. *Arch. Mikrobiol.* **59**(1): 20-31.
- Buenger, J. and H. Driller, 2004. Ectoin: an effective natural substance to prevent UVA-induced premature photoaging. *Skin Pharmacol. Physiol.* **17**(5): 232-7.
- Bursy, J., A. J. Pierik, N. Pica and E. Bremer, 2007. Osmotically induced synthesis of the compatible solute hydroxyectoine is mediated by an evolutionarily conserved ectoine hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **in press**.
- Camacho, A. and R. de Wit, 2003. Effect of nitrogen and phosphorus additions on a benthic microbial mat from a hypersaline lake. *Aquat. Microb. Ecol.* **32**: 261-273.

- Cannone, J. J., S. Subramanian, M. N. Schnare, J. R. Collett, L. M. D'Souza, Y. Du, B. Feng, N. Lin, L. V. Madabusi, K. M. Muller, N. Pande, Z. Shang, N. Yu and R. R. Gutell, 2002. The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs. *BMC Bioinformatics* **3**: 2 [Correction: *BMC Bioinformatics* 3:15].
- Caraco, N., J. Cole and G. E. Likens, 1989. Evidence of sulphate-controlled phosphorus release from sediments of aquatic systems. *Nature (Lond.)* **341**: 316-318.
- Casamayor, E. O., 1997. Diversidad y composición taxonómica de comunidades de bacterias fototróficas del azufre. Departament de Genètica i de Microbiologia. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona. **Thesis**: 173.
- Casamayor, E. O., H. Schafer, L. Baneras, C. Pedros-Alio and G. Muyzer, 2000. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(2): 499-508.
- Caumette, P., 1993. Ecology and physiology of phototrophic bacteria and sulfate-reducing bacteria in marine salterns. *Experientia* **49**: 473-481.
- Caumette, P., R. Baulaigue and R. Matheron, 1991. *Thiocapsa halophila* sp. nov., a new halophilic phototrophic purple sulfur bacterium. *Arch. Microbiol.* **155**: 170-176.
- Chen, D. and P. A. Frey, 2001. Identification of lysine 346 as a functionally important residue for pyridoxal 5'-phosphate binding and catalysis in lysine 2, 3-aminomutase from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **40**(2): 596-602.
- Chen, D., F. J. Ruzicka and P. A. Frey, 2000. A novel lysine 2,3-aminomutase encoded by the *yodO* gene of *Bacillus subtilis*: characterization and the observation of organic radical intermediates. *Biochem. J.* **348 Pt 3**: 539-549.
- Clamp, M., J. Cuff, S.M. Searle and G.J. Barton, 2004. The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics* **20**(3): 426-427.
- Clegg, J. S., P. Seitz, W. Seitz and C. F. Hazlewood, 1982. Cellular responses to extreme water loss: the water-replacement hypothesis. *Cryobiology* **19**(3): 306-16.
- Cleland, D., P. Krader, C. McCree, J. Tang and D. Emerson, 2004. Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. *J. Microbiol. Methods.* **58**(1): 31-38.
- Cohen-Bazire, G., 1963. Some observations on the organization of the photosynthetic apparatus in the purple and green bacteria. H. Gest, A. San Pietro and L. P. Vernon. *Bacterial photosynthesis* The Antioch Press, 89-110.

- Cohen, Y., W. E. Krumbein and M. Shilo, 1977. Solar Lake (Sinai) II: distribution of photosynthetic microorganisms and primary production. *Limnol. Oceanogr.* **22**: 609-620.
- Cole, J. R., B. Chai, T. L. Marsh, R. J. Farris, Q. Wang, S. A. Kulam, S. Chandra, D. M. McGarrell, T. M. Schmidt, G. M. Garrity and J. M. Tiedje, 2003. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res.* **31**(1): 442-443.
- Compton, T., 1990. Degenerate primers for DNA amplification. M. A. Innis, J. J. Sninsky and T. J. White. *PCR Protocols, a guide to methods and applications* Academic Press. London, 39-45.
- Coolen, M. J. and J. Overmann, 2007. 217 000-year-old DNA sequences of green sulfur bacteria in Mediterranean sapropels and their implications for the reconstruction of the paleoenvironment. *Environ. Microbiol.* **9**(1): 238-249.
- Cork, D. J., 1982. Acid waste gas bioconversion an alternative to the Claus desulfurization process. *Dev. Ind. Microbiol.* **23**: 379-387.
- Corpet, F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.*, **16**(22): 10881-10890.
- Cortey, M., 2005. Filogeografia de la truita comuna (*Salmo trutta*) basada en la diversitat molecular del DNA mitocondrial. *Laboratori d'Ictiologia Genètica*. University of Girona, Girona. **Thesis**: 222.
- Cruz, P. E., A. C. Silva, A. Roldao, M. Carmo, M. J. Carrondo and P. M. Alves, 2006. Screening of novel excipients for improving the stability of retroviral and adenoviral vectors. *Biotechnol Prog* **22**(2): 568-576.
- D'Souza-Ault, M. R., L. T. Smith and G. M. Smith, 1993. Roles of N-acetylglutaminylglutamine amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(2): 473-478.
- DasSarma, S. and P. Arora, 2002. Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences* **8**: 458-466.
- del Moral, A., J. Severin, A. Ramos-Cormenzana, H.G. Trüper and E.A. Galinski, 1994. Compatible solutes in new moderately halophilic isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* **122**: 165-172.
- Dennis, P. P. and L. C. Shimmin, 1997. Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 90-104.

- Deschavanne, P. J., A. Giron, J. Vilain, G. Fagot and B. Fertil, 1999. Genomic signature: characterization and classification of species assessed by chaos game representation of sequences. *Mol. Biol. Evol.* **16**(10): 1391-1399.
- Devereux, R. and S. S. Wilkinson, 2004. Amplification of ribosomal RNA sequences. *Molecular Microbial Ecology Manual*, Second Edition 3.01 Kluwer Academic Publishers. Netherlands, 509–522.
- Díaz, P., M. C. Guerrero, P. Alcorlo, A. Baltanás, M. Florín and C. Montes, 1998. Anthropogenic perturbations to the trophic structure in a permanent hypersaline shallow lake: La Salada de Chiprana (north-eastern Spain). *International Journal of Salt Lake Research* **7**: 187-210.
- Domínguez-Planella, A., 1987. [Fitoplàncton de les llacunes dels Aiguamolls de l'Alt Empordà]. Autonomus University of Barcelona, Bellaterra. **Master-Thesis**.
- Dufraigne, C., B. Fertil, S. Lespinats, A. Giron and P. Deschavanne, 2005. Detection and characterization of horizontal transfers in prokaryotes using genomic signature. *Nucleic Acids Res.* **33**(1): e6.
- Edgerton, M. E. and P. Brimblecombe, 1981. Thermodynamics of halobacterial environments. *Can. J. Microbiol.* **27**: 899-909.
- Eichler, B. and N. Pfennig, 1988. A new green sulfur bacterium from a freshwater pond. J. M. Olson, J.G. Ormerod, J. Amez, E. Stackebrandt and H.G. Trüper, *Green Photosynthetic bacteria* Plenum Press. New York, 233-236.
- Empadinhas, N. and M. S. da Costa, 2006. Diversity and biosynthesis of compatible solutes in hyper/thermophiles. *Int. Microbiol.* **9**(3): 199-206.
- Felsenstein, J., 1989. PHYLIP, phylogeny inference package version 3.6. *Cladistics* **5**: 164-166.
- Fenna, R. E., B. W. Matthews, J. M. Olson and E. K. Shaw, 1974. Structure of a Bacteriochlorophyll-protein from the green photosynthetic bacterium *Chlorobium limicola*: crystallographic evidence for a trimer. *J. Mol. Biol.* **84**: 231-240.
- Ferris, M. J., G. Muyzer and D. M. Ward, 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *App. Environ. Microbiol.* **62**: 340-346.
- Ferris, M. J. and D. M. Ward, 1997. Seasonal distribution of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *App. Environ. Microbiol.* **63**(4): 1375-1381.
- Figueras, J. B., R. P. Cox, P. Hojrup, H. P. Permentier and M. Miller, 2002. Phylogeny of the PscB reaction center protein from green sulfur bacteria. *Photosynth. Res.* **71**(1-2): 155-164.

- Figueras, J. B., L. J. Garcia-Gil and C. A. Abella, 1997a. Phylogeny of the genus *Chlorobium* based on 16S rDNA sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**(1): 31-36.
- Flock, S., R. Labarbe and C. Houssier, 1996a. ²³Na NMR study of the effect of organic osmolytes on DNA counterion atmosphere. *Biophys. J.* **71**(3): 1519-1529.
- Flock, S., R. Labarbe and C. Houssier, 1996b. Dielectric constant and ionic strength effects on DNA precipitation. *Biophys. J.* **70**(3): 1456-1465.
- Fofonoff, P. and R. C. J. Millard, 1983. Algorithms for computation of fundamental properties of seawater. *Unesco Technical Papers in Marine Science* **44**: 53 pp.
- Font, J., 2006. Role of the main hydrophobic core of RNase A on the folding and unfolding processes induced by pressure and temperature. *Biochemistry*. University of Girona, Girona. **Thesis**: 203.
- Frey, P. A., 1993. Lysine 2,3-aminomutase: is adenosylmethionine a poor man's adenosylcobalamin? *Faseb. J.* **7**(8): 662-670.
- Frostl, J. M. and J. Overmann, 2000. Phylogenetic affiliation of the bacteria that constitute phototrophic consortia. *Arch. Microbiol.* **174**(1-2): 50-58.
- Gadagkar, S. R., M. S. Rosenberg and S. Kumar, 2005. Inferring species phylogenies from multiple genes: concatenated sequence tree versus consensus gene tree. *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* **304**(1): 64-74.
- Galinski, E. A., 1993. Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Experientia* **49**: 487-496.
- Galinski, E. A., 1995a. Osmoadaptation in Bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **37**: 272-328.
- Galinski, E. A. and R. M. Herzog, 1990. The role of trehalose as a substitute for nitrogen-containing compatible solutes (*Ectothiorhodospira halochloris*). *Arch. Microbiol.* **153**: 607-613.
- Galinski, E. A. and P. Louis, 1999. Compatible solutes: ectoine production and gene expression. *A. Oren. Microbiology and biogeochemistry of hypersaline environments* CRC Press. Boca Raton, 187-2002.
- Galinski, E. A. and A. Oren, 1991. Isolation and structure determination of a novel compatible solute from the moderately halophilic purple sulfur bacterium *Ectothiorhodospira marismortui*. *Eur J Biochem* **198**(3): 593-598.

- Galinski, E. A., M. Stein, B. Amendt and M. Kinder, 1997. The kosmotropic (structure-forming) effect of compensatory solutes. *Comp. Biochem. Physiol.* **117A**(3): 357-365.
- Galinski, E. A. and H. G. Trüper, 1994. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**: 95-108.
- Gallagher, S. R., 1989. Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. F. M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl, *Current protocols in Molecular Biology* John Wiley & Sons, Inc.
- Garcia-Gil, L. J., F. B. Gich and X. Fuentes-Garcia, 2003. A comparative study of bchG from green photosynthetic bacteria. *Arch. Microbiol.* **179**(2): 108-115.
- Garcia-Pichel, F., U. Nubel and G. Muyzer, 1998. The phylogeny of unicellular, extremely halotolerant cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* **169**(6): 469-82.
- Garcia-Pichel, F., L. Prufert-Bebout and G. Muyzer, 1996. Phenotypic and phylogenetic analyses show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(9): 3284-3291.
- Garrity, G. M. and J. G. Holt, 2001. Phylum BVI. *Chloroflexi phy. nov.* D. R. Boone and R. W. Castenholz. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Springer-Verlag. New York, 427-446.
- Geitler, L. and A. Pascher, 1925. Cyanochloridinae-Chlorobacteriaceae. *Die Süßwasserflora Deutschlands, Österreichs und der Schweiz.*: 451-463.
- Gibson, J., N. Pfennig and J. B. Waterbury, 1984. *Chloroherpeton thalassium* gen. nov. et spec. nov., a non-filamentous, flexing and gliding green sulfur bacterium. *Arch. Microbiol.* **138**(2): 96-101.
- Gich, F., 2001. *Ecologia i caracterització pigmentària de bacteris fotosintètics amb nou tipus de BCI d. Microbiology.* University of Girona, Institute of Aquatic Ecology, Girona. **Thesis**.
- Giovannoni, S., 1991. The polymerase chain reaction. E. Stachebrandt, Goodfellow, M. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* John Wiley & sons. Chichester.
- Glaeser, J. and J. Overmann, 2004. Biogeography, evolution, and diversity of epibionts in phototrophic consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(8): 4821-4830.
- Gorlenko, V. M., 1970. A new phototrophic green sulphur bacterium. *Prosthecochloris aestuarii* nov. gen. nov. spec. *Z. Allg. Mikrobiol.* **10**(2): 147-149.

- Gorlenko, V. M., 1988. Ecological Niches of Green Sulfur and Gliding Bacteria. J. M. Olson, J. G. Ormerod, J. Amez, E. Stackebrandt and H.G. Trüper, Green Photosynthetic bacteria Plenum Press. New York, 257-268.
- Grasshoff, K., M. Ehrhardt and K. Kremling, 1983. Methods of Seawater Analysis, Weinheim.
- Guerrero, M. C., J. Balsa, M. Pascual, B. Martínez and C. Montes, 1991. Caracterización limnológica de la laguna Salada de Chiprana (Zaragoza, España) y sus comunidades de bacterias fototróficas. *Limnetica* **7**: 83-96.
- Guerrero, R., C. Pedrós-Alió, I. Esteve and J. Mas, 1987. Communities of phototrophic sulfur bacteria in lakes of the Spanish Mediterranean region. *Acta Academiae Aboensis* **47**(2): 125-151.
- Guindon, S. and O. Gascuel, 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* **52**(5): 696-704.
- Hall, T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**: 95-98.
- Henke, W., K. Herdel, K. Jung, D. Schnorr and S. A. Loening, 1997. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **25**(19): 3957-3958.
- Henrichs, S. M., Cuhel, R., 1985. Occurrence of beta-Aminoglutaric Acid in Marine Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**(2): 543-545.
- Hohmann-Marriott, M. F. and R. E. Blankenship, 2007. Hypothesis on chlorosome biogenesis in green photosynthetic bacteria. *FEBS Lett.* **581**(5): 800-803.
- Huber, T., G. Faulkner and P. Hugenholtz, 2004. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* **20**(14): 2317-2319.
- Hugenholtz, P. and T. Huber, 2003. Chimeric 16S rDNA sequences of diverse origin are accumulating in the public databases. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**(Pt 1): 289-293.
- Imhoff, J. F., 1992. The family *Ectothiorhodospiraceae*. A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer. *The prokaryotes* Springer-Verlag. New York, 3222-3229.
- Imhoff, J. F., 1993. Osmotic adaptation in halophilic and halotolerant microorganisms. R. H. Vreeland and L. J. Hochstein. *The biology of halophilic bacteria* CRC. Boca Raton Florida, 211-253.

- Imhoff, J. F., 1995. Taxonomy and physiology of phototrophic purple bacteria and green sulfur bacteria. R. E. Blankenship, M.T. Madigan and C.E. Bauer. Anoxic photosynthetic bacteria, advances in photosynthesis Kluwer Academic Publishers. Dordrecht Boston London, 1-15.
- Imhoff, J. F., 2001a. The Anoxygenic Phototrophic Purple Bacteria. D. R. Boone and C. R. W. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Springer-Verlag. New York, 631-637.
- Imhoff, J. F., 2001b. True marine and halophilic anoxygenic phototrophic bacteria. Arch. Microbiol. **176**: 243-254.
- Imhoff, J. F., 2003. Phylogenetic taxonomy of the family Chlorobiaceae on the basis of 16S rRNA and fmo (Fenna-Matthews-Olson protein) gene sequences. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **53**(Pt 4): 941-951.
- Imhoff, J. F., 2006. The Chromatiaceae. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer and E. Stakebrandt. The Prokaryotes - A Handbook on the Biology of Bacteria.
- Imhoff, J. F. and U. Bias-Imhoff, 1995. Lipids, quinones and fatty acids of anoxygenic phototrophic bacteria. R. E. Blankenship, M.T. Madigan and C.E. Bauer. Anoxic photosynthetic bacteria, advances in photosynthesis Kluwer Academic Publishers. Dordrecht Boston London, 179-205.
- Imhoff, J. F. and F. Rodriguez-Valera, 1984. Betaine is the main compatible solute of halophilic eubacteria. J. Bacteriol. **160**(1): 478-479.
- Imhoff, J. F., J. Suling and R. Petri, 1998. Phylogenetic relationships among the Chromatiaceae, their taxonomic reclassification and description of the new genera Allochromatium, Halochromatium, Isochromatium, Marichromatium, Thiococcus, Thiohalocapsa and Thermochromatium. Int. J. Syst. Bacteriol. **48 Pt 4**: 1129-1143.
- Imhoff, J. F. and H. G. Trüper, 1976. Marine sponges as habitats of anaerobic phototrophic bacteria. Microbiol. Ecol. **3**: 1-9.
- Imhoff, J. F. and H.G. Trüper, 1977. Ectothiorhodospira halochloris sp. nov., a new extremely halophilic phototrophic bacterium containing bacteriochlorophyll b. Arch. Microbiol. **114**: 115-121.
- Innis, M. A. and D. H. Gelfand, 1990. Optimization of PCRs. M. A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T. White. PCR protocols: A guide to methods and applications Academic Press. San Diego, 3-12.
- Jackson, B. E., V. K. Bhupathiraju, R. S. Tanner, C. R. Woese and M. J. McInerney, 1999. Syntrophus aciditrophicus sp. nov., a new anaerobic bacterium that degrades fatty acids and benzoate in syntrophic association with hydrogen-using microorganisms. Arch. Microbiol. **171**(2): 107-114.

- Jeffrey, S. W., R. F. C. Mantoura and S. W. Wright, 1997. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. UNESCO, Paris, 668
- Jones, D. T., W. R. Taylor and J. M. Thornton, 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.* **8**(3): 275-282.
- Jonkers, H. M., R. Ludwig, R. De Wit, O. Pringault, G. Muyzer, H. Niemann, N. Finke and D. De Beer, 2003. Structural and functional analysis of a microbial mat ecosystem from a unique permanent hypersaline inland lake: 'La Salada de Chiprana' (NE Spain). *FEMS Microbiol. Ecol.* **44**: 175-189.
- Jorgensen, B. B., K. J.G. and Y. Cohen, 1979. Microbial transformation of sulfur compounds in a stratified lake (Solar Lake, Sinai). *Limnol. Oceanogr.* **24**: 799-822.
- Jukes, T. H. and C. R. Cantor, 1969. Evolution of protein molecules. H. Munro. *Mammalian protein metabolism* Academic Press. New York, 21-132.
- Kanzler, B. E., K. R. Pfannes, K. Vogl and J. Overmann, 2005. Molecular characterization of the nonphotosynthetic partner bacterium in the consortium "Chlorochromatium aggregatum". *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(11): 7434-7441.
- Kazutaka, K., K. Kuma, H. Toh and T. Miyata, 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res.* **33**(2): 511-518.
- Kempf, B. and E. Bremer, 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* **170**(5): 319-330.
- Kets, E. P. W., E. A. Galinski, d. W. Martin, J. A. M. de Bont and H. J. Heipieper, 1996. Mannitol, a novel bacterial compatible solute in *Pseudomonas putida* S12. *J. Bacteriol.* **178**(23): 6665-6670.
- Kimura, M., 1980. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**: 111-120.
- Kiriby, K. S., 1957. A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids: Evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acid and protein. *Biochem. J.* **66**: 495-504.
- Kirk, J. T. O., 1980. Spectral absorption properties of natural waters: contribution of the soluble and particulate fraction to light absorption in some inland waters of south-eastern Australia. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* **31**: 287-296.
- Kirk, J. T. O., 1983. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. University Press, Cambridge, 509

- Kleppe, K., E. Ohtsua, R. Kleppe, I. Molineux and H.G. Khorana, 1971. Studies on polynucleotides. XCVI repair replications of short synthetic DNA's catalyzed by DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* **56**: 341-361.
- Kobayashi, M. and M. Kobayashi, 1995. Waste Remediation and Treatment Using Anoxygenic Phototrophic Bacteria. R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer. *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* Kluwer Academic Publishers. Netherlands, 1269-1282.
- Kolp, S., M. Pietsch, E. A. Galinski and M. Gutschow, 2006. Compatible solutes as protectants for zymogens against proteolysis. *Biochim. Biophys. Acta* **1764**(7): 1234-1242.
- Kramer, M. F. and D. M. Coen, 2001. Enzymatic amplification of DNA by PCR: standard procedures and optimization. *Curr. Protocols Mol. Biol.* 15.1.1-15.1.14.
- Kuhlmann, A. U. and E. Bremer, 2002. Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(2): 772-783.
- Kushner, D. J., 1978. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. D. J. Kushner. *Microbial life in extreme environments* Academic Press. London, 317-368.
- Kushner, D. J., 1985. The Halobacteriaceae. C. R. Woese and R. S. Wolfe. *The Bacteria. A treatise on structure and function* Academic Press. Orlando, FL, 171-214.
- Lai, M. C., K. R. Sowers, D. E. Robertson, M. F. Roberts and R. P. Gunsalus, 1991. Distribution of compatible solutes in the halophilic methanogenic archaeobacteria. *J. Bacteriol.* **173**(17): 5352-5358.
- Larsen, H., 1962. Halophilism. I. C. Gunsalus and R. Y. Stanier. *The Bacteria* Academic Press, Inc. New York.
- Liaan-Jensen, S., 1965. Bacterial Carotenoids: XVIII. Aryl carotenes from phaeobium. *Acta. Chem. Scand.* **19**: 1025-1030.
- Louis, P., H. G. Trüper and E. A. Galinski, 1994. Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes. *Journal Applied Microbiology and Biotechnology* **41**(6): 684-688.
- Lowry, O. H., N. H. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, 1951. Protein measurements with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Ludwig, R., O. Pringault, R. de Wit, D. de Beer and H. M. Jonkers, 2006. Limitation of oxygenic photosynthesis and oxygen consumption by phosphate and organic nitrogen in a hypersaline microbial mat: a microsensor study. *FEMS Microbiol. Ecol.* **57**(1): 9-17.

- Ludwig, W., O. Strunk, S. Klugbauer, N. Klugbauer, M. Weizenegger, J. Neumaier, M. Bachleitner and K. H. Schleifer, 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**(4): 554-568.
- Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Forster, I. Brettske, S. Gerber, A. W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. König, T. Liss, R. Lussmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode and K. H. Schleifer, 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* **32**(4): 1363-1371.
- Mackey, M. D., D. J. Mackey, H. W. Higgins and S. W. Wright, 1997. CHEMTAX User's Manual: a program for estimating class abundances from chemical markers - application to HPLC measurements of phytoplankton pigments. CSIRO Marine Laboratories Report 229, Hobart, Australia, 47
- Madden, T. L., R. L. Tatusov and J. Zhang, 1996. Applications of network BLAST server. *Methods Enzimol.* **266**: 131-141.
- Madigan, M. T., 1995. Microbiology of Nitrogen Fixation by Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer. *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* Kluwer Academic Publishers. Netherlands, 915-928.
- Madigan, M. T., 2001. Phylum BXIII. Firmicutes. D. R. Boone and C. R. W. Bergey's *Manual of Systematic Bacteriology* Springer-Verlag. New York, 625-630.
- Madigan, M. T., 2003. Anoxygenic phototrophic bacteria from extreme environments. *Photosynth Res.* **76**: 157-171.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko and J. Parker, 1997. *Brock. Biologia de los Microorganismos.* Prentice Hall Iberia, Madrid, 1064
- Malik, K. A., 1991. Maintenance of phototrophic bacteria. B. E. Kirsop and A. Doyle. *Maintenance of microorganisms and cultured cells. A manual of laboratory methods.* Academic Press. London.
- Malik, K. A., 1992. A new method for preservation of microorganisms by liquid-drying under anaerobic conditions. *J. Microbiol. Methods* **14**: 239-245.
- Malin, G., R. Iakobashvili and A. Lapidot, 1999. Effect of tetrahydropyrimidine derivatives on protein-nucleic acids interaction. Type II restriction endonucleases as a model system. *J. Biol. Chem.* **274**(11): 6920-6929.
- Manning, G. S., 1978. The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides. *Q. Rev. Biophys.* **11**(2): 179-246.

- Manske, A. K., J. Glaeser, M. M. Kuypers and J. Overmann, 2005. Physiology and phylogeny of green sulfur bacteria forming a monospecific phototrophic assemblage at a depth of 100 meters in the Black Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(12): 8049-8060.
- Margalef, R., 1983. *Limnología*. Omega, Barcelona, 1010
- Marmur, J., 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acids from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**: 208-218.
- Marthi, B. and B. Lighthart, 1990. Effects of betaine on enumeration of airborne bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(5): 1286-1289.
- Martin, D. D., R. A. Ciulla and M. F. Roberts, 1999. Osmoadaptation in archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1815-1825.
- Martin, D. D., R. A. Ciulla, M. Robinson and M. F. Roberts, 2000. Switching osmolyte strategies: response of *Methanococcus thermolithotrophicus* to changes in external NaCl. *Biochim. Biophys. Acta* **1524**: 1-10.
- Martinez-Alonso, M., J. Van Bleijswijk, N. Gaju and G. Muyzer, 2005. Diversity of anoxygenic phototrophic sulfur bacteria in the microbial mats of the Ebro Delta: a combined morphological and molecular approach. *FEMS Microbiol. Ecol.* **52**(3): 339-350.
- Mendez-Alvarez, S., V. Pavon, I. Esteve, R. Guerrero and N. Gaju, 1994. Transformation of *Chlorobium limicola* by a plasmid that confers the ability to utilize thiosulfate. *J. Bacteriol.* **176**(23): 7395-7397.
- Mendez-Alvarez, S., S. Ramirez-Moreno and N. Gaju, 2001. Molecular taxonomy of the genus *Chlorobium*. *Crit. Rev. Microbiol.* **27**: 9-24.
- Montes, C. and P. Martino, 1987. *Bases Científicas Para La Protección De Los Humedales En España*. F. y. N. Real Academia de Ciencias Exactas. Las lagunas salinas españolas. Madrid, 95-146.
- Montesinos, E., 1982. *Ecofisiología de la Fotosíntesis Bacteriana*. Universitat Autònoma de Barcelona. **Thesis**.
- Montesinos, E., R. Guerrero, C. Abellà and I. Esteve, 1983. Ecology and physiology of the competition for light between *Chlorobium limicola* and *Chlorobium phaeobacterioides* in natural habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 1007-1016.
- Moore, D. D., 1996. Purification and concentration of DNA from aqueous solutions. F. M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl. *Current Protocol in Molecular Biology* John Wiley & Sons, Inc.

- Motta, A., I. Romano and A. Gambacorta, 2004. Rapid and sensitive NMR method for osmolyte determination. *J. Microbiol. Methods* **58**(2): 289-294.
- Müller, V., R. Spanheimer and H. Santos, 2005. Stress response by solute accumulation in archaea. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**: 729-736.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona, 1987. Specific synthesis of DNA in vitro: a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymol.* **155**: 335-350.
- Muyzer, G., E. C. Waal and A. G. Uitterlinden, 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *App. Environ. Microbiol.* **59**: 695-700.
- Nadson, G. A., 1906. The morphology of inferior algae. III. Chlorobium limicola Nads., the green chlorophyll bearing microbe. *Bull. Jard. Bot.* **6**: 190.
- Nocker, A. and A. K. Camper, 2006. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(3): 1997-2004.
- Nübel, U., F. Garcia-Pichel and G. Muyzer, 2000. The halotolerance and phylogeny of cyanobacteria with tightly coiled trichomes (*Spirulina* Turpin) and the description of *Halospirulina tapeticola* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 1265-1277.
- Oelze, J., 1985. Analysis of bacteriochlorophylls. *Meth. Microbiol.* **18**: 257-284.
- Ollivier, B., P. Caumette, J.-L. Garcia and R. A. Mah, 1994. Anaerobic Bacteria from Hypersaline Environments. *American Soc. Microbiol.* **58**: 27-38.
- Oren, A., 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**(2): 334-348.
- Oren, A., 2000. Life at high salt concentrations. M. Dworkin. *The Prokaryotes. An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community* Springer-Verlag, New York, LLC.
- Oren, A., 2002a. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **28**: 56-63.
- Oren, A., 2002b. *Halophilic microorganisms and their environments.* Kluwer Academic, Dordrecht, 575
- Oren, A., M. Heldal, S. Norland and E. A. Galinski, 2002. Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Extremophiles* **6**(6): 491-498.

- Overmann, J., 1992. An extremely low-light-adapted green sulfur bacterium from the Black Sea. *Limnol. Oceanogr.* **37**: 150-155.
- Overmann, J., 2000. The family Chlorobiaceae. M. Dworkin. *The Prokaryotes. An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community* Springer-Verlag, New York, LLC.
- Overmann, J., 2001. Green Sulfur Bacteria. G. M. Garrity and J. G. Holt. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Williams and Wilkins*. Baltimore, 601-623.
- Overmann, J., M. J. L. Coolen and C. Tuschak, 1999a. Specific detection of different phylogenetic groups of chemocline bacteria based on PCR and denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA gene fragments. *Arch. Microbiol.* **172**: 83-96.
- Overmann, J., K. J. Hall, T. G. Northcote and J. T. Beatty, 1999b. Grazing of the copepod *Diaptomus connexus* on purple sulphur bacteria in a meromictic salt lake. *Environ. Microbiol.* **1**(3): 213-221.
- Overmann, J., S. Lehmann and N. Pfennig, 1991. Gas vesicle formation and buoyancy regulation in *Pelodictyon phaeoclathratiforme* (Green Sulfur Bacteria). *Arch. Microbiol.* **157**: 29-37.
- Overmann, J. and N. Pfennig, 1989. *Pelodictyon phaeoclathratiforme* sp. nov., a new brown-colored member of the Chlorobiaceae forming net-like colonies. *Arch. Microbiol.* **152**: 401-406.
- Overmann, J. and K. Schubert, 2002. Phototrophic consortia: model systems for symbiotic interrelations between prokaryotes. *Arch. Microbiol.* **177**(3): 201-208.
- Overmann, J. and C. Tuschak, 1997. Phylogeny and molecular fingerprinting of green sulfur bacteria. *Arch. Microbiol.* **167**(5): 302-309.
- Page, R. D. M., 1996. Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**: 357-358.
- Parkin, T. B. and T. D. Brock, 1980. The effects of light quality on the growth of phototrophic bacteria in lakes. *Arch. Microbiol.* **125**: 19-27, 31-36.
- Pelsh, A. D., 1936. Hydrobiology of Karabugaz Bay of the Caspian Sea. *Tr. Vses Nauchno-Issled Inst Gallurgii Leningrad* **5**: 49-126.
- Pfennig, N., 1965. Anreicherungskulturen für rote und grüne schwefelbakterien. *Zentr. Bakteriol. Parasitenkd Infektionskr. Hyg. Abt I, Suppl* **1**: 179-189.
- Pfennig, N., 1967. Photosynthetic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **21**: 285-324.

- Pfennig, N., 1968. [*Chlorobium phaeobacteroides* nov. spec. and *C. phaeovibrioides* nov. spec., two new species of green sulfur bacteria]. *Arch. Mikrobiol.* **63**(3): 224-226.
- Pfennig, N., 1989a. Ecology of phototrophic purple and green sulfur bacteria. H. G. Schlegel, Bowien, B. Autotrophic bacteria Springer Verlag, Berlin.
- Pfennig, N. and Trüper, H.G., 1989b. Green Bacteria. J. T. Stanley, M.P. Bryant, N. Pfennig and J.G. Holt. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Williams & Wilkins, Baltimore, 1682-1707.
- Pfennig, N. and Trüper, H.G., 1989c. Family I: Chromatiaceae. J. T. Stanley, M.P. Bryant, N. Pfennig and J.G. Holt. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology* Williams & Wilkins, Baltimore, 1637-1653.
- Pfennig, N. and Trüper, H.G., 1992. Isolation of members of the families Chromatiaceae and Chlorobiaceae. A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer. *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, application* Springer Verlag.
- Pfennig, N. and H. G. Trüper, 1971. New nomenclatural combinations in the phototrophic sulfur bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **21**: 11-14.
- Pfennig, N. and H. G. Trüper, 1981. Isolation of members of the families Chromatiaceae and Chlorobiaceae. S. Starr, Trüper, Balows and Schlegel. *The Prokaryotes: a Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria* Springer-Verlag, Berlin, 279-289.
- Pflüger, K., S. Baumann, G. Gottschalk, W. Lin, H. Santos and V. Müller, 2003. Lysine-2,3-aminomutase and beta-lysine acetyltransferase genes of methanogenic archaea are salt induced and are essential for the biosynthesis of N-epsilon-acetyl-beta-lysine and growth at high salinity. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(10): 6047-6055.
- Pflüger, K. and V. Müller, 2004. Transport of compatible solutes in extremophiles. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **36**(1): 17-24.
- Poolman, B. and E. Glaesker, 1998. Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol.* **29**(2): 397-407.
- Por, F. D., 1972. Hydrobiological notes on the high-salinity waters of the Sinai Peninsula. *Mar. Biol.* **14**(2): 111-119.
- Pšencik, J., J. B. Arellano, T. P. Ikonen, C. M. Borrego, P. A. Laurinmaki, S. J. Butcher, R. E. Serimaa and R. Tuma, 2006. Internal structure of chlorosomes from brown-colored chlorobium species and the role of carotenoids in their assembly. *Biophys. J.* **91**(4): 1433-1440.

- Psencik, J., T. P. Ikonen, P. Laurinmaki, M. C. Merckel, S. J. Butcher, R. E. Serimaa and R. Tuma, 2004. Lamellar organization of pigments in chlorosomes, the light harvesting complexes of green photosynthetic bacteria. *Biophys. J.* **87**(2): 1165-1172.
- Puchkova, N. N., 1984. Green sulfur bacteria as a component of the sulfureta of shallow saline waters of the Crimea and northern Caucasus. *Mikrobiologiya* **53**: 324-328.
- Reed, R. H., 1984. Use and abuse of osmo-terminology. *Plant, Cell and Environment* **7**: 165-170.
- Reed, R. H., L. J. Borowitzka, M. A. Mackay, J. A. Chudck, R. Foster, S. R. C. Warr, D. J. Moore and W. D. P. Stewart, 1986. Organic solute accumulation in osmotically stressed cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**: 51-56.
- Rees, W. A., T. D. Yager, J. Korte and P. H. von Hippel, 1993. Betaine can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting. *Biochemistry* **32**(1): 137-144.
- Riera, X., A. Domínguez-Planella, L. Polo, R. Moreno-Amich and C. A. Abella, 1987. [Dinámica de la meromixis en la laguna costera de la Massona (Alt Empordà, Girona). Ciclo anual e intrusiones marinas]. *Congreso Español de Limnología*, 55-64.
- Riera, X. G. and C. A. Abella, 1986. [Dinàmica anual de les poblacions de Bacteris Fototròfics de la Llacuna de costanera de la Massona (Alt Empordà, Girona)]. *Scientia gerundensis* **12**: 35-48.
- Riera, X. G. and C. A. Abella, 1991. Limnological cycle of the coastal lagoon La Massona (Girona, NE Spain). Origin, dynamics and influence of the sporadic seawater infalls on the meromixis. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **24**: 1029-1031.
- Roberts, M. F., 2005. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems* **1**: 5.
- Robertson, D. E., D. Noll and M. F. Roberts. 1992. Free amino acid dynamics in marine methanogens. beta-Amino acids as compatible solutes. *J. Biol. Chem.* **267**(21): 14893-14901.
- Robertson, D. E., M. F. Roberts, N. Belay, K. O. Stetter, D. R. Boone. 1990. Occurrence of beta-glutamate, a novel osmolyte, in marine methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(5): 1504-1508.
- Rodriguez-Valera, F., 1993. Introduction to saline environments. R. H. Vreeland and L. J. Hochstein. *The biology of halophilic bacteria* CRC. Boca Raton Florida, 1-25.

- Roebler, M. and V. Müller, 2001. Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences. *Environ. Microbiol.* **3**(12): 743-754.
- Rosselló-Mora, R. and R. Amann, 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 39-67.
- Ruiz, J., L. Montoya, V. Lopez and R. Amils, 2007. Thermal diapirism and the habitability of the icy shell of Europa. *Orig. Life Evol. Biosph.* **37**(3): 287-295.
- Ruzicka, F. J., K. W. Lieder and P. A. Frey, 2000. Lysine 2,3-aminomutase from *Clostridium subterminale* SB4: mass spectral characterization of cyanogen bromide-treated peptides and cloning, sequencing, and expression of the gene *kamA* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**(2): 469-476.
- Saiki, R. K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.H. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis and H.A. Ehrlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbour Laboratory Press,
- Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Santos, H. and M. S. da Costa, 2002. Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. *Environ. Microbiol.* **4**(9): 501-509.
- Sauer, T. and E. A. Galinski, 1998. Bacterial milking: a novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnology and bioengineering* **57**(3): 306-313.
- Schiraldi, C., C. Maresca, A. Catapano, E. A. Galinski and M. De Rosa, 2006. High-yield cultivation of *Marinococcus M52* for production and recovery of hydroxyectoine. *Res. Microbiol.* **157**(7): 693-699.
- Schmidt, K., 1978. *Biosynthesis of carotenoids.* R. K. Clayton, and Sistrun, W.R. The photosynthetic bacteria Plenum Publishing Corp. New York, 279-750.
- Schnoor, M., P. Voss, P. Cullen, T. Boking, H. J. Galla, E. A. Galinski and S. Lorkowski, 2004. Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**(3): 867-872.
- Severin, J., A. Wohlfarth and E. A. Galinski, 1992. The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1629-1638.
- Shapiro, D. J., 1981. Quantitative ethanol precipitation of nanogram quantities of DNA and RNA. *Anal. Biochem.* **110**: 229-232.

- Siefert, E. and N. Pfennig, 1984. Convenient method to prepare neutral sulfide solution for cultivation of phototrophic sulfur bacteria. *Arch. Microbiol.* **139**: 100-101.
- Sirevag, R. E., B. B. Buchanan, J. A. Berry and J. H. Troughton, 1977. Mechanisms of CO₂ fixation in bacterial photosynthesis studied by carbon isotope technique. *Arch. Microbiol.* **112**: 35-38.
- Sleator, R. D. and C. Hill, 2001. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 49-71.
- Smalla, K., N. Cresswell, L.C. Mendonca-Hagler, A. Wolters and J.D. van Elsas. 1993. Rapid DNA extraction from soil for PCR-mediated amplification. *J. Appl. Bacteriol.* **74**: 78-85.
- Smith, L. T. and G. M. Smith, 1989. An osmoregulated dipeptide in stressed *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **171**: 4714-4717.
- Soria-Carrasco, V., M. Valens-Vadell, A. Pena, J. Anton, R. Amann, J. Castresana and R. Rossello-Mora, 2007. Phylogenetic position of *Salinibacter ruber* based on concatenated protein alignments. *Syst. Appl. Microbiol.* **30**(3): 171-179.
- Sowers, K. R. and R. P. Gunsalus, 1995. Halotolerance in *Methanosarcina* spp.: Role of N(sup(epsilon))-Acetyl-(beta)-Lysine, (alpha)-Glutamate, Glycine Betaine, and K(sup+) as Compatible Solutes for Osmotic Adaptation. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(12): 4382-4388.
- Sowers, K. R., D. E. Robertson, D. Noll, R. P. Gunsalus and M. F. Roberts. 1990. N epsilon-acetyl-beta-lysine: an osmolyte synthesized by methanogenic archaeobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**(23): 9083-9087.
- Stakebrandt, E. and B. M. Goebel, 1994. Taxonomic 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.
- Suggs, S. V., T. Hirose, T. Miyake, E. H. Kawashima, J. M. Johnson, K. Itakura and R. B. Wallace, 1981. Use of synthetic oligonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences. D. Brown and C.F. Fox. *Developmental biology using purified genes* Academic Press. New York, 683-693.
- Teske, A., C. Wawer, G. Muyzer and N. B. Ramsing, 1996. Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariage Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *App. Environ. Microbiol.* **62**(4): 1405-1415.
- Thiruvengadam, T. K., S. J. Gould, D. J. Aberhart and H.J. Lin. 1983. Biosynthesis of Streptothricin F. 5. Formation of beta-Lysine by *Streptomyces* L- 1689-23. *J. Am. Chem. Soc.* **105**: 5470-5476.

- Thomas, M. G., Y. A. Chan and S. G. Ozanick, 2003. Deciphering tuberactinomycin biosynthesis: isolation, sequencing, and annotation of the viomycin biosynthetic gene cluster. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**(9): 2823-2830.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson, 1994. CLUSTAL W:improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Timasheff, S. N., 1998. Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. *Adv. Protein. Chem.* **51**: 355-432.
- Truper, H. G., 1970. Culture and isolation of phototrophic sulfur bacteria from the marine environment. *Helgoländer wiss. Meeresunters* **20**: 6-16.
- Truper, H. G., 1987. Phototrophic bacteria (an incoherent group of prokaryotes). A taxonomic versus phylogenetic survey. *Microbiologia* **3**(2): 71-89.
- Trüper, H. G. and Pfennig, N., 1992. The family Chlorobiaceae. A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer. *The Prokaryotes. A handbook on the Biology of bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications* Springer-Verlag, 3582-3592.
- Truper, H. G. and E. A. Galinski, 1989. Compatible solutes in halophilic phototrophic prokaryotes. Y. Cohen and E. Rosenberg. *Microbial mats American Soc. Microbiol. Washington*, 342-348.
- Trüper, H. G. and N. Pfennig, 1971. Family of phototrophic Green Sulfur Bacteria: *Chlorobiaceae* Copeland, the correct family name; rejection of *Chlorobacterium* Lauterborn; and the taxonomic situation of the consortium-forming species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **21**: 8-10.
- Trüper, H. G. and H. G. Schlegel, 1964. Sulphur metabolism in Thiorhodaceae I. Quantitative measurements on growing cells of *Chromatium okenii*. *Antonie van Leeuwenhoek* **30**: 225-238.
- Valero-Garcés, B. L., A. Navas, J. Machin, T. Stevenson and B. Davis, 2000. Responses of a saline lake ecosystem in a semiarid region to irrigation and climate variability. The history of Salada Chirrana, central Ebro Basin, Spain. *Ambio* **29**: 344-350.
- Van Gernerden, H. and J. Mas, 1995. Ecology of Phototrophic Sulfur Bacteria. R. E. Blankenship, Madigan, M.T., Bauer, C.E. *Anoxicogenic Photosynthetic Bacteria* Kluwer Academic Publishers. The Netherlands, 49-85.
- Van Niel, C. B., 1971. Techniques for the enrichment, isolation and maintenance of the photosynthetic bacteria. A: San Pietro (ed). *Methods Enzimol.* **23**: 3-28.

- Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. de Vos, K. Kersters and J. Swings, 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**(2): 407-438.
- Vargas, C., M. Jebbar, R. Carrasco, C. Blanco, M. I. Calderon, F. Iglesias-Guerra and J. J. Nieto, 2006. Ectoines as compatible solutes and carbon and energy sources for the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J. Appl. Microbiol.* **100**(1): 98-107.
- Vidondo, B., B. Martínez, C. Montes and M. C. Guerrero, 1993. Physico-chemical characteristics of a permanent Spanish hypersaline lake: la Salada de Chiprana (NE Spain). *Hydrobiologia* **267**: 115-125.
- Vila, X., 1996. [Ecologia microbiana de poblacions de bacteris fototròfics en el plàncton lacustre: la distribució espectral de la llum en la selecció entre espècies de diferent composició pigmentària]. *Microbiology*. University of Girona, Institute of Aquatic Ecology, Girona. **Thesis**: 233.
- Vila, X. and C. A. Abella, 1994. Effects of light quality on the physiology and the ecology of planktonic green sulfur bacteria in lakes. *Photosynth. Res.* **41**: 53-65.
- Vila, X., R. Guyoneaud, X. P. Cristina, J. B. Figueras and C. A. Abella, 2002. Green sulfur bacteria from hypersaline Chiprana Lake (Monegros, Spain): habitat description and phylogenetic relationship of isolated strains. *Photosynth. Res.* **71**: 165-172.
- Vogelstein, B. and D. Gillespie, 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 615-619.
- Vogl, K., J. Glaeser, K. R. Pfannes, G. Wanner and J. Overmann, 2006. *Chlorobium chlorochromatii* sp. nov., a symbiotic green sulfur bacterium isolated from the phototrophic consortium "*Chlorochromatium aggregatum*". *Arch. Microbiol.* **185**(5): 363-372.
- Wahlund, T. M., C. R. Woese, R. W. Castenholz and M. T. Madigan, 1991. A thermophilic green sulfur bacterium from New Zealand hot springs, *Chlorobium tepidum* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **156**: 81-90.
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier and D. J. Lane, 1991. SSU ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**: 697-703.
- Welsh, D. T., 2000. Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**(3): 263-290.
- Welsh, D. T. and R.A. Herbert, 1993. Identification of organic solutes accumulated by purple and green sulphur bacteria during osmotic stress using natural abundance ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *FEMS Microbiol. Ecol.* **13**: 145-150.

- Widdel, F., 1983. Methods for enrichment and pure culture isolation of filamentous gliding sulfate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* **134**: 282-285.
- Wilson, K. H., 1994. Preparation of genomic DNA from bacteria. F. M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl. *Current Protocols in Molecular Biology* John Wiley & Sons, Inc.
- Wilson, K. H., R.B. Blichington, R.C. Greene. 1990. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 1942-1946.
- Wolf, M., T. Muller, T. Dandekar and J. D. Pollack, 2004. Phylogeny of Firmicutes with special reference to Mycoplasma (Mollicutes) as inferred from phosphoglycerate kinase amino acid sequence data. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**(Pt 3): 871-875.
- World-Health-Organisation, 1993. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva,
- Yancey, P. H., E. C. Mary, S. C. Hand, R. D. Bowlus and G. N. Somero, 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte system. *Science* **217**: 1214-1222.

