



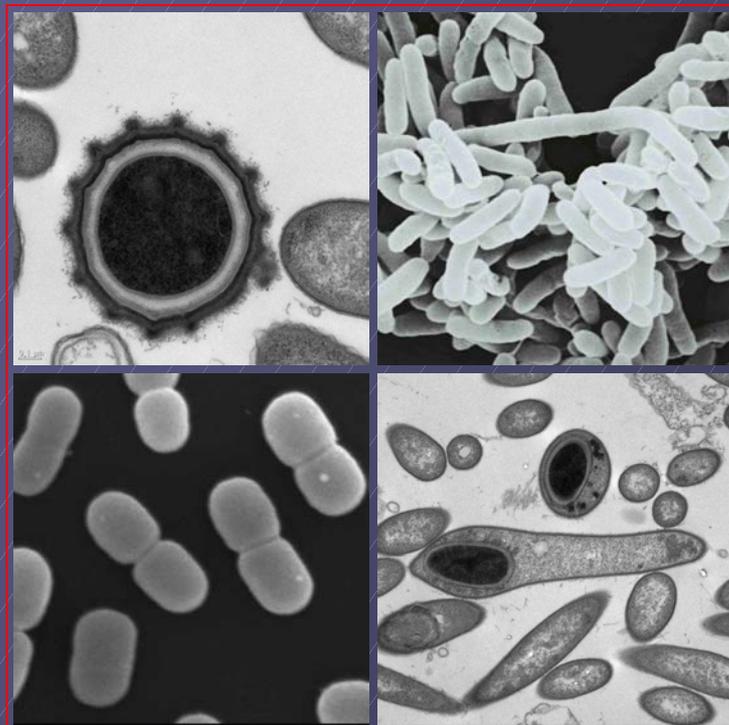
UNIVERSITAT DE BARCELONA



Universitat de Barcelona  
Facultat de Farmàcia

Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries

# Estudio taxonómico polifásico de bacterias procedentes de ambientes antárticos: descripción de cuatro nuevas especies



María Jesús Montes López

2005



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Universitat de Barcelona  
Facultat de Farmàcia  
Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries

Microbiología Aplicada, bienio 97/99

**Estudio taxonómico polifásico de bacterias  
procedentes de ambientes antárticos: descripción de  
cuatro nuevas especies.**

Memòria presentada per M<sup>a</sup> Jesús Montes López per optar  
al títol de Doctor en Biologia per la Universitat de Barcelona

Director: Dr. Jesús Guinea Sánchez  
Codirectora: Dra. Núria Bozal de Febrer

Barcelona, febrero de 2005

<b>1. PRESENTACIÓN</b> .....	5
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	11
2.1. Aspectos históricos y perspectivas de la taxonomía bacteriana. ....	13
2.2. Grandes hitos que han marcado el avance de la taxonomía bacteriana: cronómetros moleculares .....	35
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	47
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	51
4.1. Cepas bacterianas estudiadas .....	53
4.1.1. Muestras de origen antártico.....	53
4.1.2. Aislamiento de los biotipos bacterianos estudiados .....	54
4.1.3. Mantenimiento de la microbiota aislada .....	55
4.2. Morfología .....	56
4.2.1. Tinciones.....	56
4.2.1.1. Tinción de Gram.....	56
4.2.1.2. Método de Muir .....	56
4.2.1.3. Tinción de tinta china .....	57
4.2.1.4. Tinción de esporas .....	57
4.2.2. Estudio de la morfología.....	57
4.2.2.1. Cultivos bacterianos en medios líquidos .....	57
4.2.2.2. Cultivos bacterianos en medios sólidos .....	58
4.2.3. Movilidad .....	58
4.2.4. Microscopía electrónica.....	59
4.2.4.1. Microscopía electrónica de barrido (MES) .....	59
4.2.4.2. Microscopía electrónica de transmisión .....	60
4.2.4.2.1. Cortes ultrafinos .....	61
4.2.4.2.2. Criofijación por alta presión.....	64
4.2.4.2.3. Tinciones negativas.....	65
4.3. Características fisiológicas y bioquímicas .....	66
4.3.1. Rango de temperatura de crecimiento .....	66
4.3.2. Rango de tolerancia de pH.....	67
4.3.3. Tolerancia al NaCl.....	68
4.3.4. Requerimiento de ión Na <sup>+</sup> .....	68
4.3.5. Tolerancia a las sales biliares .....	69

4.3.6. Crecimiento en presencia de lisozima .....	69
4.3.7. Producción de ácido a partir de carbohidratos .....	70
4.3.7.1. Oxidación y/o fermentación de la glucosa .....	70
4.3.7.2. Oxidación y/o fermentación de carbohidratos en el medio MOF.....	70
4.3.8. Utilización de fuentes de carbono.....	72
4.3.8.1. Medio mineral según Read y Costerton (1987) .....	72
4.3.8.2. Medio mineral según Bowman y <i>col.</i> (1996).....	74
4.3.9. Crecimiento en anaerobiosis .....	76
4.3.10. Reducción anaeróbica de aceptores de electrones Fe(III) y TMAO.....	76
4.3.11. Enzimas respiratorios .....	78
4.3.11.1. Citocromo oxidasa .....	78
4.3.11.2. Catalasa.....	79
4.3.12. Voges-Proskauer .....	79
4.3.13. Rojo de Metilo.....	80
4.3.14. Metabolismo de compuestos nitrogenados .....	80
4.3.14.1. Reducción de nitratos .....	80
4.3.14.2. Indol.....	81
4.3.14.3. Ureasa .....	82
4.3.14.4. Arginina dihidrolasa .....	82
4.3.14.5. Fenilalanina desaminasa .....	82
4.3.14.6. Descarboxilación de la ornitina, arginina y lisina .....	83
4.3.14.7. Producción de dihidroxiacetona.....	84
4.3.15. Hidrólisis de macromoléculas .....	85
4.3.15.1. Hidrólisis del tween 80 .....	85
4.3.15.2. Hidrólisis del almidón .....	85
4.3.15.3. Hidrólisis de la caseína.....	85
4.3.15.4. Hidrólisis de la lecitina .....	86
4.3.15.5. Hidrólisis del DNA .....	87
4.3.15.6. Hidrólisis del agar sangre .....	87
4.3.15.7. Hidrólisis de la esculina .....	88
4.3.15.8. Hidrólisis de la gelatina.....	88
4.3.15.9. Hidrólisis de la quitina .....	89
4.3.15.10. Hidrólisis de la tirosina .....	89
4.3.16. Desarrollo en Agar Triple Azúcar Hierro y en Kligler. ....	90
4.3.17. Sistemas estandarizados para la determinación de características bioquímicas adicionales.....	90

4.4. Sensibilidad frente a los antibióticos .....	91
4.5. Técnicas alternativas a la tinción de Gram : test del KOH y L-alanina aminopeptidasa.....	92
4.6. Determinación de marcadores de membrana externa .....	94
4.6.1. Lipopolisacárido (LPS) .....	95
4.6.2. Ácido 2-ceto-3-deoxioctanoico (KDO) .....	98
4.7. Ensayo de transformación.....	100
4.8. Composición de ácidos grasos.....	106
4.9. Análisis de quinonas .....	108
4.10. Perfil de proteínas totales.....	109
4.11. Composición de bases del DNA bacteriano .....	116
4.12. Hibridación DNA-DNA .....	120
4.13. Análisis filogenéticos .....	121
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>125</b>
5.1. Caracterización taxonómica del grupo de aislamientos bacterianos antárticos pertenecientes al género <i>Shewanella</i> .....	127
5.2. Caracterización taxonómica del grupo de aislamientos bacterianos antárticos pertenecientes al género <i>Psychrobacter</i> . .....	145
5.3. Caracterización taxonómica del grupo de aislamientos bacterianos antárticos pertenecientes al género <i>Paenibacillus</i> . .....	170
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>185</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>199</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>203</b>
<b>9. PUBLICACIONES.....</b>	<b>221</b>



# **1. PRESENTACIÓN**



## 1. PRESENTACIÓN

Esta Memoria Doctoral forma parte de una línea de investigación más amplia que ha venido desarrollándose desde el año 1985 en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona. Fundamentalmente ha comprendido el estudio taxonómico de la microbiota de origen antártico, aislada a partir de muestras procedentes de distintas zonas y suministradas por científicos de las sucesivas expediciones españolas desplazadas hasta el continente antártico.

Desde el descubrimiento de América se buscó con gran interés por parte de colonizadores y aventureros la posición exacta de la denominada *Terra Australis Incognita*. Durante el siglo XVI, el estrecho de Magallanes es cruzado por varios navegantes y aventureros españoles. Es el caso de Sarmiento de Gamboa, Álvaro Mandaña de Neixa, Pedro Fernández de Quirós y el propio Juan Fernández, que al navegar de Callao a Valparaíso cree haber descubierto, según cuenta Quirós, una gran tierra por las señales que vió. Hay interés por parte de la corona española de conocer esta zona del planeta. Esta inquietud alcanza a Carlos V y a Felipe II y es el español Gabriel de Castilla el primero en aproximarse al Círculo Polar Antártico en el año 1603, alcanzando las proximidades del paralelo 64º S.

La búsqueda de este continente estaba regulada mediante la correspondiente autorización plasmada en Reales Cédulas, emitidas por Carlos V, Felipe II y Felipe III, de acuerdo al Tratado de Tordesillas. Conviene recordar que este continente imaginario se encontraba en la demarcación trazada por el Papa Alejandro VI, el famoso Borja, que divide al mundo en dos zonas de influencia a efectos de la conquista de tierras y almas de sus habitantes.

A finales del siglo XVIII, el almirante inglés Cook buscó sin éxito tierras en las proximidades del Círculo Polar alcanzando solamente la isla Georgia del Sur. Sin embargo, el descubrimiento de la Antártida no se logra hasta la segunda década del siglo XIX. Durante este período, las islas Malvinas, ocupadas por Argentina, constituyen una base logística para los loberos norteamericanos e ingleses que se desplazan hacia las islas Georgia, Sándwich y Orcadas del Sur, verdaderos espacios marinos subantárticos. En poco más de un mes, entre Septiembre y Octubre de 1819,



Los restos del *San Telmo* son hallados junto al Cabo Shirreff de la isla Livingston por varios navegantes ingleses, Smith, Fildes y Wedell. ¿Por qué no se encontraron cadáveres de los 644 ocupantes del *San Telmo*?. La versión de los navegantes ingleses indicaría que muchos se ahogaron durante el naufragio, otros intentarían alcanzar el Cabo de Hornos en botes, a 500 millas al noroeste, y probablemente otros se alimentarían con carne de foca y se confundirían con las poblaciones de loberos que llegarían en el verano de 1820-1821. De acuerdo al historiador Brian Roberts, en 1822, en las Shetland del Sur ya se encontraban amarrados 91 veleros cuyo personal agotó la rica fauna productora de piel por más de medio siglo. Eran sobre todo aventureros de Valparaíso y Buenos Aires (Oscar Pinochet de la Barra, 1993).

Tras este período inicial cabe distinguir una segunda etapa que se caracteriza por la llegada de exploradores y los primeros hombres de ciencia, sobre todo geógrafos, procedentes de varios países. Es un período en el que se sigue dudando sobre la situación del Polo Sur geográfico. Muchos científicos creían que se encontraba en un mar central. Es el período de la llegada de figuras como Amundsen y Scott.

En la actualidad se puede hablar de una tercera etapa caracterizada por el reconocimiento casi perfecto del continente antártico. Las publicaciones de Richard E. Byrd completaron perfectamente el trazado del continente antártico. Aunque no es hasta 1961, con el establecimiento del Tratado Antártico, cuando surge una corriente de interés científico internacional. En las propuestas de este compromiso se consideran indispensables la convivencia internacional, la prohibición de maniobras militares y las explosiones nucleares. Tras las reuniones extraordinarias de 1991, celebradas en Viña del Mar y en Madrid, se aprobó la prohibición de la explotación minera. En la actualidad, el continente antártico puede considerarse como un inmenso laboratorio que alberga 52 bases científicas administradas por 26 países.

Nuestro grupo de investigación concentró sus primeras aportaciones científicas en el estudio de la adaptación de la microbiota a un ambiente tan extremo como el de un sedimento tomado a 41 m de profundidad y a una distancia de 0.4 millas de la costa, frente a la base argentina de Marambio, en el mar de Wedell. Las bacterias aisladas por J. Guinea y M. Moros, pertenecientes en su mayoría a los géneros *Planococcus* y *Micrococcus* presentaban unas interesantes adaptaciones desarrolladas por seres

vivos. En efecto, las bacterias aisladas se localizaban en el interior de los microconductos de los granos de sedimento, permaneciendo en estas condiciones perfectamente estabilizadas durante mucho tiempo. Es un modelo criptoendolítico de supervivencia que permite el establecimiento de biocenosis que albergan bacterias, esporas fúngicas y diatomeas en lugares tan extremos como los áridos desiertos y los sedimentos marinos (J. Castellví y col.,1992).

Formando parte de la misma línea de Taxonomía bacteriana deben señalarse los trabajos de la Dra. Núria Bozal (1993, Tesis Doctoral) y Encarna Tudela (1996, Tesis Doctoral) que han permitido las descripciones de nuevos representantes del género *Pseudoalteromonas* procedentes de Inlet Admiralty Bay (isla del Rey Jorge) y Johnson's Dock (isla de Livingston). Así mismo estos trabajos permitieron la ubicación taxonómica inicial de la microbiota en varios géneros: *Moraxella*, *Psychrobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Rahnella*, *Marinomonas* y otros, abriendo así muchas posibilidades hacia un estudio más exhaustivo de la microbiota antártica y de algunas características singulares de algunos microorganismos como el exopolímero secretado por *Pseudoalteromonas antarctica* de naturaleza glicoproteica.

Una segunda línea de investigación ha comprendido el estudio taxonómico de bacterias procedentes de distintas zonas antárticas. En este sentido, cabe señalar el aislamiento y clasificación de seis cepas de distintas bacterias termófilas procedentes de zonas geotérmicas de la isla Decepción. Dos de ellas son nuevas descripciones y las restantes son interesantes aislamientos de *Bacillus sp.* descritos hasta ahora como termófilos (A. Llarch,1995.Tesis Doctoral).

Finalmente, en el estudio taxonómico de la microbiota antártica se ha conseguido aislar una nueva especie de *Streptomyces* con la capacidad de producir un antibiótico eficaz frente a bacterias Gram positivas, (Francisco Jiménez, 2003. Tesis Doctoral).