

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE *Tistlia consotensis* EN RESPUESTA A CAMBIOS EN LA SALINIDAD EXTERNA

CAROLINA RUBIANO LABRADOR

TESIS

**Presentada como requisito parcial
para optar por el título de**

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Bogotá D.C., Colombia

Junio 09 de 2014

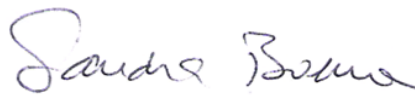
NOTA DE ADVERTENCIA

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".
Artículo 23 de la Resolución No13 de Julio de 1946.

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE *Tistlia consotensis* EN RESPUESTA A CAMBIOS EN LA SALINIDAD EXTERNA

CAROLINA RUBIANO LABRADOR

APROBADO:



Sandra Baena, Ph.D
Directora



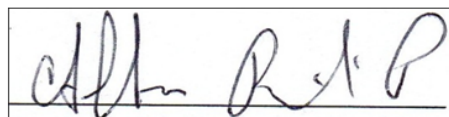
Joseph A. Christie Oleza, Ph. D
Jurado 1



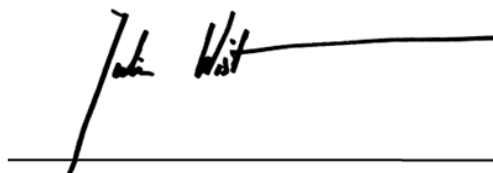
Michael Seeger Pfeiffer, Ph. D
Jurado 2



Ricardo Acuña Zornosa, Ph. D
Jurado 3



Alfonso Barreto Prieto, Ph. D
Jurado 4



Jullien Wist, Ph. D
Jurado 5

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE *Tistlia consotensis* EN RESPUESTA A CAMBIOS EN LA SALINIDAD EXTERNA

CAROLINA RUBIANO LABRADOR

Concepción Judith Puerta Bula, Ph.D

Decana

Facultad de Ciencias

Alba Alicia Trespalacios Rangel, Ph.D

Director de Posgrado

Facultad de Ciencias



*El mundo no es perfecto, y la ley está incompleta.
El intercambio equivalente no abarca todo lo que ocurre aquí,
pero todavía quiero creer en su principio:
Que todas las cosas llegan a un precio,
que hay un flujo, un ciclo.
Que el dolor que hemos pasado tendrá una recompensa
y que cualquiera que sea perseverante obtendrá algo hermoso a cambio,
aunque no sea lo esperado*

AGRADECIMIENTOS

A la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) de la Pontificia Universidad Javeriana que permitió el desarrollo de este proyecto.

A mi directora de tesis Sandra Baena por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por la confianza que depositó en mí, por su apoyo incondicional, así como por sus sabios y prudentes consejos durante todo este proceso.

A la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana y al Centro de Genómica de Ambientes Extremos - GeBiX por su apoyo para la financiación, planeación, y ejecución de este proyecto.

A el *Laboratoire de Biochimie des Systèmes Perturbés (LBSP)* del CEA (*Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives*) que permitió el desarrollo de mi pasantía.

A Ricardo Acuña y David Rubio de Cenicafe por sus valiosas orientaciones en el aprendizaje de las técnicas de 2-DE.

A Colciencias por su apoyo financiero mediante el programa de créditos condonables para el desarrollo de doctorados nacionales.

A mi asesor externo Jean Armengaud por su confianza, motivación y valiosos aportes a este trabajo.

A Erica Hartmann, Celine Bland, Damien Joulié, Guylaine Miotello, Jean-Charles Gaillard, y François Allain por su apoyo en los análisis proteómicos y su constante interés en el desarrollo del estudio.

A Luisa "La Peluquita" Bernal por su valiosa amistad, por su apoyo, por cada palabra de aliento y por ser la hermanita menor mas paciente e incondicional.

A Carito Díaz, Karitol Rodríguez, Javier Gómez, Gina Lopez y Fredy Sánchez por su apoyo en todo momento y por hacer que todos los días fueran más amenos.

A Daniel Borda, Johan Saez, Diana Garzón, José Salvador Montana, Andrés Vela, Yady Tovar y Habib Yanine, por su ayuda y colaboración incondicional.

A mi hermano Juan Sebastián por su amor, gran ejemplo y apoyo invaluable.

A mis padres, María Doris y Alfredo, porque sus esfuerzos y sacrificios permitieron que yo lograré mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentí que el camino se terminaba.

A Demián Felipe por ser la razón de mi vida.

RESUMEN

En este estudio se evaluó el perfil de expresión de proteínas de *Tistlia consotensis* bajo condiciones variables de salinidad (0 y 40 g·l⁻¹ NaCl) empleando dos estrategias proteómicas. En la primera estrategia, se utilizó la técnica de electroforesis bidimensional para realizar un análisis cualitativo de la expresión de proteínas de *T. consotensis* bajo las salinidades evaluadas y posteriormente se realizó un estudio detallado utilizando una estrategia proteogenómica, que consistió en una anotación rápida de los genes cuyos productos se detectaron mediante espectrometría de masas. El análisis cualitativo de la expresión de proteínas de *T. consotensis* en respuesta a cambios en la salinidad del medio permitió determinar que esta bacteria halotolerante responde al estrés osmótico con cambios en los niveles de expresión de sus proteínas. Asimismo, el análisis del exoproteoma y del proteoma celular de *T. consotensis*, utilizando el enfoque proteogenómico, permitió la detección de proteínas específicas a 0 y 40 g·l⁻¹ NaCl involucradas en los mecanismos de adaptación de *T. consotensis* bajo estrés hipo e hiper-osmótico a través de la comparación con el perfil de expresión en la condición de crecimiento a la salinidad óptima, 5 g·l⁻¹ NaCl.

En ausencia de sal, *T. consotensis* aumenta la producción de proteínas de estrés general y proteínas implicadas en la modulación de la composición de membrana celular. En respuesta a un incremento de la salinidad, *T. consotensis* aumenta la abundancia de proteínas involucradas con procesos de señalización, responsables de detectar eficientemente cambios en la concentración de Cl⁻, y proteínas relacionadas con diferentes tipo de sistemas de transporte encargados de acumular solutos compatibles y mantener el exceso de Na⁺ fuera de la célula. Este estudio proporcionó una visión detallada de la adaptación celular, en términos de perfiles proteómicos, a cambios en la salinidad externa en *T. consotensis*, sugiriendo que esta bacteria halotolerante combina diferentes estrategias novedosas para contrarrestar los cambios de salinidad en su hábitat.

ABSTRACT

In this study the protein expression profile of *Tistlia consotensis* under different salinities (0 to 40 g·l⁻¹ NaCl) were evaluated using two proteomic strategies. In the first strategy, two-dimensional electrophoresis technique was used to perform a qualitative analysis of protein expression of *T. consotensis* under salinities evaluated and subsequently a detailed study was performed using proteogenomics strategy, which consisted of a quick annotation of genes whose products were detected by mass spectrometry. Qualitative analysis of protein expression of *T. consotensis* in response to changes in the salinity allowed determining that this halotolerant bacterium respond to osmotic stress with changes in the expression levels of proteins. Moreover, analysis of exoproteome and proteome cellular of *T. consotensis*, using the proteogenómico approach, allowed the detection of specific proteins to 0 and 40 g·l⁻¹ NaCl involved in adaptation mechanisms of *T. consotensis* under hypo and hyperosmotic stress by comparison with the expression profile in the condition of the optimal growth salinity, 5 g·l⁻¹ NaCl.

In the absence of salt, *T. consotensis* increases the production of proteins of general stress and proteins involved in the modulation of cell membrane composition. In response to an increase of salinity, *T. consotensis* increases the abundance of proteins involved in signaling processes, responsible for efficiently detect changes in the concentration of Cl⁻, and proteins related to different types of transport systems responsible for accumulating compatible solutes and maintaining excess Na⁺ out of the cell. This study provided a detailed overview of cell adaptation, in terms of proteomic profiles, to changes in the external salinity in *T. consotensis*, suggesting that this halotolerant bacterium combines different innovative strategies to counteract changes in salinity in their habitat.

Tabla de contenido

ÍNDICE DE FIGURAS.....	2
ÍNDICE DE ANEXOS.....	4
1. INTRODUCCIÓN	5
2. MARCO TEÓRICO	8
2.1. AMBIENTES SALINOS COMO HÁBITATS DE COMUNIDADES MICROBIANAS... 8	
2.1.2. Ambientes salinos de origen terrestre.....	10
2.2. DIVERSIDAD MICROBIANA DE AMBIENTES SALINOS	11
2.2.1. Dominio Archaea	13
2.2.2. Dominio Bacteria	14
2.2.3. Dominio Eucaria	18
2.3. DIVERSIDAD MICROBIANA DE AMBIENTES SALINOS COLOMBIANOS	18
2.4. <i>Tistlia consotensis</i>	20
2.5. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES RELACIONADAS CON LA ADAPTACIÓN A AMBIENTES SALINOS	21
2.5.1. Características moleculares a nivel de ADN.....	21
2.5.2. Características moleculares a nivel de proteínas.....	25
2.5.3. Proteínas relacionadas con adaptación marina	28
2.6. MECANISMOS DE OSMOADAPTACIÓN DE ORGANISMOS HALÓFILOS Y HALOTOLERANTES	30
2.6.1. Mecanismos de osmoadaptación en respuesta a una disminución de la osmolalidad externa	32
2.6.1.1. Salida de agua.....	32
2.6.1.2. Salida de solutos	32
2.6.2. Mecanismos de osmoadaptación en respuesta a un aumento de la osmolalidad externa	35
2.6.2.1. Acumulación de solutos inorgánicos – Estrategia <i>Salt-in</i>	35
2.6.2.2. Acumulación de solutos compatibles – <i>Salt-out</i>	37
2.7. PERCEPCIÓN Y TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN RESPUESTA A CAMBIOS DE LA OSMOLALIDAD DEL MEDIO	51
2.8. ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS MICROBIANOS DE OSMOADAPTACIÓN A PARTIR DE ESTUDIOS PROTEÓMICOS.....	53

3. OBJETIVOS.....	58
4. METODOLOGÍA.....	59
4.1. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO.....	59
4.2. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE FUENTES DE NITRÓGENO ORGÁNICO EN EL CRECIMIENTO DE <i>T. consotensis</i>	59
4.3. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINAR EL PESO SECO DE <i>T. consotensis</i>	60
4.4. PATRÓN DE CRECIMIENTO DE <i>T. consotensis</i> EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NaCl.....	61
4.5. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE <i>T. consotensis</i> BAJO LAS CONDICIONES VARIABLES DE SALINIDAD	62
4.5.1. Análisis cualitativo del perfil de expresión de proteínas de <i>T. consotensis</i> en respuesta a cambios de salinidad empleando la técnica de electroforesis bidimensional	62
4.5.1.1. Extracción de proteínas extra e intracelulares de <i>T. consotensis</i>	62
4.5.1.2. Limpieza de proteínas	65
4.5.1.3. Cuantificación de proteínas	66
4.5.1.4. Electroforesis unidimensional	66
4.5.1.5. Separación de las proteínas mediante electroforesis bidimensional.....	67
4.5.2. Análisis cuantitativo de la expresión de proteínas de <i>T. consotensis</i> en respuesta a cambios de salinidad empleando una estrategia proteogenómica.....	70
4.5.2.1. Secuenciación del genoma de <i>Tistlia consotensis</i>	70
4.5.2.2. Análisis proteómico de <i>T. consotensis</i> en respuesta a cambios en la salinidad externa	73
4.5.2.2.1. Extracción de proteínas extra e intracelulares de <i>T. consotensis</i>	73
4.5.2.2.2. Electroforesis unidimensional (1D SDS-PAGE) y proteólisis con tripsina...	74
4.5.2.2.3. Análisis por cromatografía líquida de nanoescala acoplada a espectrometría de masas en tándem (nanoLC-MS/MS).....	77
4.5.2.2.4. Identificación de la secuencia de las proteínas de <i>T. consotensis</i> a partir de los espectros de masa obtenidos	79
4.5.2.2.5. Análisis comparativo de la abundancia de las proteínas y análisis estadístico.....	81
4.5.2.2.6. Análisis de proteínas y anotación funcional	81

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
5.1. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE FUENTES DE NITRÓGENO ORGÁNICO EN EL CRECIMIENTO DE <i>T. consotensis</i>	85
5.2. PATRÓN DE CRECIMIENTO DE <i>T. consotensis</i> EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NaCl.....	86
5.3. ANÁLISIS CUALITATIVO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE <i>T. consotensis</i> EN RESPUESTA A CAMBIOS DE SALINIDAD EMPLEANDO LA TÉCNICA DE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL	88
5.3.1. Extracción de proteínas extracelulares.....	88
5.3.2. Extracción de proteínas intracelulares.....	89
5.3.3. Optimización del protocolo de electroforesis bidimensional.....	90
5.3.4. Electroforesis bidimensional de las proteínas intracelulares de <i>T. consotensis</i>	94
5.3.5. Análisis del perfil de expresión de proteínas de <i>T. consotensis</i> a partir de los mapas proteómicos obtenidos en cada salinidad	96
5.4. ANÁLISIS PROTEOGENÓMICO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE <i>T. consotensis</i> EN RESPUESTA A CAMBIOS DE LA SALINIDAD EXTERNA.....	102
5.4.1. Secuenciación del genoma de <i>T. consotensis</i>	103
5.4.1.1. Principales características del genoma de <i>T. consotensis</i>	104
5.4.1.2. Genes candidatos involucrados en la respuesta celular de <i>T. consotensis</i> frente a cambios de la salinidad externa	107
5.4.2. Análisis proteómico de <i>T. consotensis</i> en las tres salinidades evaluadas.....	111
5.4.2.1. Exoproteoma de <i>T. consotensis</i>	117
5.4.2.2. Proteoma celular de <i>T. consotensis</i>	122
5.4.3. Respuesta celular de <i>T. consotensis</i> frente a cambios en la salinidad externa	123
5.4.3.1. Respuesta celular de <i>T. consotensis</i> frente a una disminución de la salinidad externa	124
5.4.3.2. Respuesta celular de <i>T. consotensis</i> frente a un aumento de la salinidad externa	133
6. CONCLUSIONES	152
7. PERSPECTIVAS.....	153
8. REFERENCIAS.....	154

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Hábitats y rangos de tolerancia de salinidad de los géneros de la familia <i>Rhodospirillaceae</i>	22
Tabla 2. Solutos compatibles zwitterionicos.....	40
Tabla 3. Solutos compatibles no cargados.....	42
Tabla 4. Solutos compatibles aniónicos.....	43
Tabla 5. Diluciones de la suspensión de trabajo (ST).....	61
Tabla 6. Programas de la cámara de isoelectroenfoco evaluados para separar las proteínas de <i>T. consotensis</i>	69
Tabla 7. Distribución de las manchas proteicas que presentaron cambios significativos de expresión en las diferentes salinidades evaluadas.....	97
Tabla 8. Punto isoeléctrico y contenido de aminoácidos ácidos del componente periplasmático del sistema de transporte de azúcares tipo ABC de <i>T. consotensis</i> en comparación con proteínas homólogas de organismos halófilos así como de organismos no halófilos de la clase α - <i>Proteobacteria</i>	113
Tabla 9. Predicción de la localización celular y de la presencia de péptido señal de las proteínas más abundantes detectadas en el exoproteoma de <i>T. consotensis</i>	118
Tabla 10. Proteínas con los cambios más significativos en términos de abundancia detectadas en respuesta a una disminución de la salinidad externa.....	124
Tabla 11. Proteínas con los cambios más significativos en términos de abundancia detectadas en respuesta a un aumento de la salinidad externa.....	134

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético de la vida basado en secuencias del gen 16S RNAr y la distribución de los organismos halófilos y halotolerantes dentro del árbol.....	12
Figura 2. Movimiento de iones en las Arqueas aerobias halófilas de la familia <i>Halobacteriaceae</i>	36
Figura 3. División de los geles SDS-PAGE de las proteínas extra e intracelulares de <i>T. consotensis</i> para obtener piezas de gel de 4 mm ³	76
Figura 4. Gradiente usado para la cromatografía líquida de nanoescala.....	79
Figura 5. Evaluación de la influencia de fuentes de nitrógeno orgánico, extracto de levadura y peptona, en el crecimiento de <i>T. consotensis</i>	85
Figura 6. Velocidad específica de crecimiento (μ_{esp}) de <i>T. consotensis</i> cultivada en diferentes salinidades: 0, 5, 20, 30 y 40 g·l ⁻¹ NaCl.....	86
Figura 7. Cuantificación de las proteínas ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) extracelulares de <i>T. consotensis</i> utilizando diferentes métodos de precipitación.....	88
Figura 8. Concentración de proteínas ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) intracelulares utilizando diferentes tampones de lisis.....	90
Figura 9. Electroforesis unidimensional (SDS, Gel 10 % a 100 voltios) de las proteínas intracelulares de <i>T. consotensis</i> con y sin proceso de limpieza.....	91
Figura 10. Mapas proteómicos de las proteínas intracelulares extraídas a partir del cultivo de <i>T. consotensis</i> a 5 g·l ⁻¹ NaCl, con y sin proceso de limpieza.....	92
Figura 11. Mapas proteómicos de las proteínas intracelulares extraídas a partir del cultivo de <i>T. consotensis</i> a 5 g·l ⁻¹ NaCl, empleando tiras IPG con diferentes rangos de pH.....	93
Figura 12. Mapas proteómicos de las proteínas intracelulares de <i>T. consotensis</i> obtenidas por electroforesis bidimensional.....	94
Figura 13. Diagrama de Venn mostrando el número de manchas proteicas detectadas en <i>T. consotensis</i> en las tres salinidades evaluadas.....	96
Figura 14. Perfil proteómico de <i>T. consotensis</i> , cultivada en presencia de 0 g·l ⁻¹ NaCl....	98
Figura 15. Perfil proteómico de <i>T. consotensis</i> , cultivada en presencia de 40 g·l ⁻¹ NaCl.....	100

Figura 16. Anotación funcional del genoma de <i>T. consotensis</i>	105
Figura 17. Diagrama de Venn mostrando el número de proteínas de <i>T. consotensis</i> identificadas en su exoproteoma y proteoma celular.....	111
Figura 18. Mapa proteogenómico de los ORFs detectados a lo largo de la secuencia del genoma de <i>T. consotensis</i>	112
Figura 19. Asignación funcional de las proteínas detectadas en el exoproteoma y proteoma celular de <i>T. consotensis</i>	114
Figura 20. Afiliación taxonómica de las proteínas homologas detectadas en el exoproteoma y proteoma celular de <i>T. consotensis</i>	115
Figura 21. Diagrama de Venn para comparar el número de proteínas detectadas en el exoproteoma de <i>T. consotensis</i> , bajo las concentraciones de NaCl evaluadas.....	117
Figura 22. Diagrama de Venn para comparar el número de proteínas detectadas en el proteoma celular de <i>T. consotensis</i> , bajo las concentraciones de NaCl evaluadas.....	122
Figura 23. Modelo de los procesos celulares involucrado en la adaptación de <i>T. consotensis</i> a una disminución de la salinidad externa.....	133
Figura 24. Modelo de los procesos celulares involucrado en la adaptación de <i>T. consotensis</i> a un aumento de la salinidad externa.....	149

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Cuantificación de proteínas utilizando la técnica de Bradford.

Anexo 2. Preparación de geles SDS-PAGE

Anexo 3. Resultados de la curva de peso de *T. consotensis*

Anexo 4. Masa molecular y punto isoeléctrico de las manchas proteicas que presentaron cambios significativos en su expresión a 0 y 40 g·l⁻¹ de salinidad.

Anexo 5. Lista de proteínas no redundantes detectadas en el exoproteoma de *T. consotensis*.

Anexo 6. Lista de proteínas no redundantes detectadas en el proteoma celular de *T. consotensis*.

Anexo 7. Lista de proteínas que presentaron cambios significativos en términos de abundancia en el exoproteoma de *T. consotensis*.

Anexo 8. Lista de proteínas que presentaron cambios significativos en términos de abundancia en el proteoma celular de *T. consotensis*.

Anexo 9. Publicaciones y presentaciones en congresos

1. INTRODUCCIÓN

La mayor parte de la biosfera es salina. El agua de los océanos y mares cubre un alto porcentaje de la superficie terrestre, y contiene aproximadamente de 35 a 40 gramos de sales disueltas por litro. En las zonas continentales se encuentran manantiales o brotes de aguas salinas con contenido de sales entre 20 y 35 g·l⁻¹ (Andrei et al. 2012). En Colombia abundan los manantiales salinos y están caracterizados por aflorar sobre o cerca de trazos de fallas geológicas, a pocos metros de drenajes mayores y a lo largo de las tres cordilleras, situados a grandes distancias de las costas (Cortes and Cardona 2006).

Dentro de los manantiales salinos de la cordillera Central se destaca el manantial denominado *Salado de Consotá*, considerado fuente de recursos minerales en concentraciones explotables y de recursos hídricos, por su estrecha relación con las aguas subterráneas (Cortes and Cardona 2006). Este manantial ubicado en el departamento de Risaralda, presenta una temperatura promedio de 21°C, pH entre 6,1 y 7,4, y alta concentración de Cl⁻ (14500 mg·l⁻¹), Na⁺ (6500 mg·l⁻¹), Ca²⁺ (3000 mg·l⁻¹) y conductividad eléctrica de ~35000 μS·cm⁻¹ (Tistl 2004). Previos estudios de diversidad microbiana en el *Salado de Consotá* revelaron una diversidad taxonómica bacteriana no antes descrita, evidenciada por el alto número de secuencias del gen 16S rRNA con menos de 97% de similitud con secuencias de organismos previamente cultivados y por el aislamiento e identificación de nuevas especies (Díaz-Cárdenas 2011). Entre estas, aparece la cepa USBA 355, identificada como un nuevo género bacteriano halotolerante de la clase α-proteobacteria, familia *Rhodospirillaceae*, denominado *Tistlia*, con una única especie identificada hasta el momento, *T. consotensis* (Díaz-Cárdenas et al. 2010). Este organismo crece en un rango de salinidad entre 0 y 40 g·l⁻¹ NaCl, y alcanza un crecimiento óptimo en presencia de 5 g·l⁻¹ NaCl, y es capaz de acumular 3-polihidroxialcanoatos (PHAs) y metabolitos secundarios con actividad biológica potencial (Díaz-Cárdenas 2011). La mayoría de los géneros de esta familia como *Thalassobaculum* (Zhang et al. 2008), *Nisaea* (Urios et al. 2008), *Thalassospira* (Kodama et al. 2008), *Rhodospira*, *Roseospira*, *Rhodovibrio*, *Rhodospirillum* (Imhoff et al. 1998), *Marispirillum*

(Lai et al. 2009a), *Oceanibaculum* (Lai et al. 2009b), *Tistrella* (Shi et al. 2002) y *Pelagibius* (Choi et al. 2009), habitan en ambientes marinos, indicando que la adaptación a condiciones salinas es una característica común de los miembros de esta familia.

Durante monitoreos sucesivos del contenido de sales en el *Salado de Consotá* entre 2005 y 2009 se observaron valores oscilantes de cloruros (10646 a 15100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), conductividad eléctrica (29300 a 35150 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) y sólidos disueltos totales (24185 a 41859 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) relacionados posiblemente con el régimen de lluvias y de sequía como lo reporta Díaz-Cárdenas (2011). Si bien *T. consotensis* presenta un rango amplio de tolerancia a la salinidad, las características particulares de su hábitat hacen suponer que esta bacteria halotolerante está expuesta a cambios continuos en la concentración de sales. Este hecho sugiere la presencia de mecanismos de adaptación y/o tolerancia a estas condiciones cambiantes.

Los mecanismos de adaptación a condiciones de estrés osmótico han sido extensivamente estudiados en organismos halófilos como *Halobacterium salinarum* (Leuko et al. 2009), *Chromobacter salexigens* (Oren et al. 2005) y *Halobacillus halophilus* (Saum and Müller 2007). Sin embargo, los estudios enfocados en la respuesta adaptativa de microorganismos halotolerantes, como es el caso de *T. consotensis*, son limitados, a pesar de que estos presentan un mayor rango de tolerancia a la salinidad en comparación con los halófilos extremos, sólo, existen algunos reportes en bacterias halotolerantes patógenas como *E. coli* (Weber and Jung 2002), *B. cereus* (den Besten et al. 2009) y *Listeria monocytogenes* (Duché et al. 2002).

Teniendo en cuenta la importancia de estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la adaptación de microorganismos halotolerantes mi tesis de doctorado plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuáles son los mecanismos moleculares involucrados en la adaptación de *T. consotensis* a condiciones variables de salinidad?. Con el fin de responder a esta pregunta de investigación se realizó un análisis cualitativo y cuantitativo del perfil de expresión de proteínas de esta bacteria bajo condiciones variables de salinidad, empleando las dos estrategias proteómicas: electroforesis bidimensional y proteogenómica. El enfoque proteómico se escogió porque el proteoma es altamente dinámico y flexible, y permite evaluar la expresión de proteínas involucradas

con la respuesta biológica relacionadas con sus mecanismos de adaptación a condiciones cambiantes de salinidad. En este trabajo, se identificaron los mecanismos moleculares implicados en la adaptación de *T. consotensis* a condiciones cambiantes de la salinidad externa.

2. MARCO TEÓRICO

La presencia y abundancia de organismos en un ambiente está determinada por factores bióticos y factores abióticos como temperatura, salinidad, potencial redox, pH, presión, entre otras. Por lo tanto, la distribución de los organismos en la Tierra está relacionada con su capacidad para adaptarse, soportar y permanecer estables dentro de sus ambientes, bajo unas condiciones determinadas (Harrison et al. 2013). Particularmente, la salinidad del agua y la composición iónica se encuentran entre las principales variables ambientales que limitan el crecimiento de los organismos que habitan en ambientes salinos, y en consecuencia, la tolerancia fisiológica a estos factores constituye una parte crucial de la evolución, ecología y biogeografía de estos organismos (Céspedes et al. 2013).

2.1. AMBIENTES SALINOS COMO HÁBITATS DE COMUNIDADES MICROBIANAS

Los ambientes salinos usualmente contienen una concentración de sal entre 40 a 300 g·l⁻¹, y pueden ser de origen marino o terrestre. Los ambientes salinos de origen marino incluyen océanos, mares, marismas, sedimentos marinos, fuentes hidrotermales, entre otros, mientras que los ambientes salinos de origen terrestre incluyen suelos, rocas y manantiales (Battistuzzi and Hedges 2009).

2.1.1. Ambientes salinos de origen marino

Los océanos y mares ocupan el 71% de la superficie terrestre, con un volumen de 1.46 x 10⁹ km³, una profundidad media de 4000 m y máxima de aproximadamente 11000 m. De las aguas de los océanos, el 50% tiene un rango de temperatura entre 1.3 y 3.8°C y una salinidad entre 34.6 a 34.8 g·l⁻¹. La salinidad del agua de mar puede incrementar como resultado de la evaporación o congelamiento, o puede disminuir como resultado de precipitaciones, escorrentías de los ríos o derretimiento del hielo. El agua de mar es una solución que contiene la mayoría de los elementos conocidos, y algunos de los componentes más abundantes son Cl⁻ (55%), Na⁺ (30.7%), SO₄⁻ (7.7%), Mg²⁺ (3.6%), Ca²⁺

(1.2%) y K^+ (1.1%). Mientras la concentración total de la materia disuelta varía de un sitio a otro, las proporciones de los componentes más importantes, como carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, permanecen casi constantes (Talley et al. 2011). Aunque las condiciones ambientales en el mar son muy uniformes se pueden identificar cinco zonas. La zona litoral cubre la región entre la marea baja y alta y representa el área de transición entre condiciones marinas y terrestres. La zona sublitoral se extiende desde el límite de la marea baja hasta el borde de la plataforma continental, esta zona se conoce también como zona nerítica o costera. La zona pelágica incluye todo el océano abierto y comprende algunas partes de la zona nerítica y la totalidad de las regiones oceánicas. La zona béntica es afótica y corresponde a las tres zonas más profundas de la alta mar (Millero 2013).

En ambientes cercanos a la costa como marismas, sabkhas (depósitos sedimentarios que ocupan la parte inferior de una depresión de alta salinidad) y lagunas, que son originados por la evaporación del agua de mar, es posible encontrar altas concentraciones de sal. Estos ambientes denominados ambientes thalasoalinos, tienen una composición de sal similar a la del agua de mar, donde el Cl^- y el Na^+ son los iones dominantes y el pH es cercano a la neutralidad o ligeramente alcalino. Durante la evaporación, ocurre una precipitación secuencial de sulfato de calcio ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$) y otros minerales hasta que finalmente la saturación de $NaCl$ se consigue a concentraciones de sal por encima de $300 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ y la sal precipita en forma de halita. El Gran Lago Salado (*Great Salt Lake*) en Utah, es un típico ejemplo de un ambiente thalasoalino (Oren 2011b). De otra parte, en los ambientes hipersalinos denominados athalasoalinos la composición iónica varía significativamente con respecto al agua de mar y están marcadamente influenciados por la geología de la zona donde se desarrollan. Un ejemplo de este tipo de ambientes es el Mar Muerto, en cual la concentración de iones divalentes (aproximadamente Mg^{2+} 1.9 M y Ca^{2+} 0.4 M) excede la concentración de iones monovalentes (Na^+ 1.6 M y K^+ 0.14 M), y en el cual el pH es relativamente bajo (aproximadamente 6.0) (Kerker 2004). Además de los lagos salinos, las piscinas de evaporación hechas por el hombre también representan ambientes salinos de origen marino. Estas piscinas funcionan como una serie de estanques en los que la salinidad aumenta gradualmente hasta que la halita se precipita en los estanques cristalizadores, y por lo tanto, hay un gradiente de salinidad del agua de

mar que va desde $35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, la salinidad del agua de mar, hasta la saturación de halita, $>300 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Oren 2011b).

2.1.2. Ambientes salinos de origen terrestre

Los ecosistemas terrestres son aquellos que se encuentran sobre la capa de la tierra superficial de la biosfera, y ocupan, proporcionalmente, menos superficie que los ecosistemas marinos (21%). Los ambientes terrestres salinos comprenden diferentes tipos de ambientes que van desde masas de tierras constituidos por suelos y rocas, hasta ambientes de agua dulce como estuarios y manantiales (Chapin et al. 2012). Los suelos salinos incluyen desiertos salinos y suelos afectados por la salinidad debido a actividades humanas. Los desiertos salinos representan aproximadamente el 15% de los suelos áridos y semiáridos del mundo, mientras que los suelos afectados por la salinidad representan alrededor del 40% de las tierras irrigadas del mundo.

La salinidad normalmente existe en el suelo ya sea por el agua subterránea que sube por capilaridad o por el agua lluvia que se acumula en lugares bajos y sin drenaje. Las altas temperaturas aumentan la velocidad de evaporación del agua, dejando costras de sales por encima de la superficie del suelo o cristales de sal que se pueden encontrar en las capas superiores mezclados con los componentes minerales del suelo (Zahran 1997). De otra parte, los estuarios son, por razones topográficas, cuerpos semicerrados de agua de mar que se diluyen con agua de cuencas terrestres. Los estuarios presentan zonas de gran variabilidad de factores ambientales como la temperatura, la salinidad, el pH y la materia orgánica, debido a que están sujetos al flujo de las mareas. En un estuario típico, hay un gradiente de salinidad que va desde menos de $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, en el extremo superior, hasta más de $25 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ en la desembocadura (Sigee 2005). Finalmente, los manantiales salinos son fuentes naturales de agua, donde el agua fluye a la superficie de la tierra a partir de aguas subterráneas. Las aguas subterráneas pueden tener diferentes orígenes: (1) origen meteórico, producto de la filtración del agua lluvia hacia los estratos porosos del subsuelo, (2) origen marino, por la infiltración de agua de mar, u (3) origen connato, que se refiere al agua presente en los poros de los sedimentos cuando se depositan y que se van perdiendo en el proceso de compactación (Younger 2007).

La variedad de características que presentan los ambientes salinos, descritos anteriormente, se refleja en la diversidad de organismos que son encontrados en estos ambientes, los cuales están adaptados a vivir bajo estas condiciones particulares.

2.2. DIVERSIDAD MICROBIANA DE AMBIENTES SALINOS

Los estudios de diversidad microbiana en ambientes salinos han mostrado que estos ambientes presentan un patrón similar con respecto a los cambios de abundancia, donde se observa que un incremento de la salinidad conduce a una disminución la diversidad microbiana, y permite la dominancia de grupos especializados de organismos. Este patrón demuestra que la salinidad crea una barrera ambiental para los organismos que habitan en ambientes salinos (Benlloch et al. 2002; Casamayor et al. 2002).

En ambientes hipersalinos, que tiene una salinidad mayor a $300 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, diferentes estudios de diversidad microbiana han revelado que frecuentemente estos ambientes mantienen una alta densidad celular (10^6 - $10^8 \text{ células}\cdot\text{ml}^{-1}$), son ecosistemas altamente productivos y presentan una gran uniformidad entre las comunidades microbianas (Burns et al. 2004; Clementino et al. 2008; Demergasso et al. 2004). Por el contrario, en ambientes salinos con concentraciones de sal inferiores a $250 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, se ha reportado que presentan una densidad celular de $10^7 \text{ células}\cdot\text{ml}^{-1}$, gran diversidad y heterogeneidad microbiana (Clementino et al. 2008). A partir de las evidencias anteriores es posible inferir que la composición de la comunidad microbiana varía entre ambientes salinos, lo cual podría estar relacionado con el efecto tanto de la discontinuidad entre hábitats como de los factores ambientales locales.

Los organismos encontrados en estos ambientes pueden ser clasificados con respecto a su concentración de NaCl óptima de crecimiento, y pueden ser **halófilos extremos**, capaces de crecer óptimamente en un medio con una concentración de NaCl entre 150 y $300 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (2.5 – 5.2 M), **halófilos moderados**, que crecen óptimamente en un medio con una concentración de NaCl entre 100 y $150 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (0.2 – 2.5 M), y **halotolerantes**, que crecen óptimamente en un medio con una concentración de NaCl menor a $100 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (0.2M) pero son capaces de tolerar altas concentraciones de sal (Kerker 2004).

Los organismos halófilos se encuentran en los tres dominios de la vida: Archaea, Bacteria y Eucarya (Figura 1). En cada uno de estos dominios se encuentran representantes que presentan diferentes rangos de salinidad. Existen solo tres grupos monofiléticos que están compuestos en su totalidad por organismos halófilos: la familia *Halobacteriaceae* del filo *Euryarchaeota* en el dominio Archaea, y la familia *Halomonadaceae* de la clase α -*Proteobacteria* y el orden *Halanaerobiales* de la clase *Clostridia* en el dominio Bacteria. En la mayoría de los casos, los organismos halófilos y no halófilos se encuentran cercanamente localizados en el árbol filogenético, y muchos géneros, familias y órdenes tienen representantes con grandes diferencias en cuanto a sus requerimientos de sal y tolerancia a esta (Oren 2008).

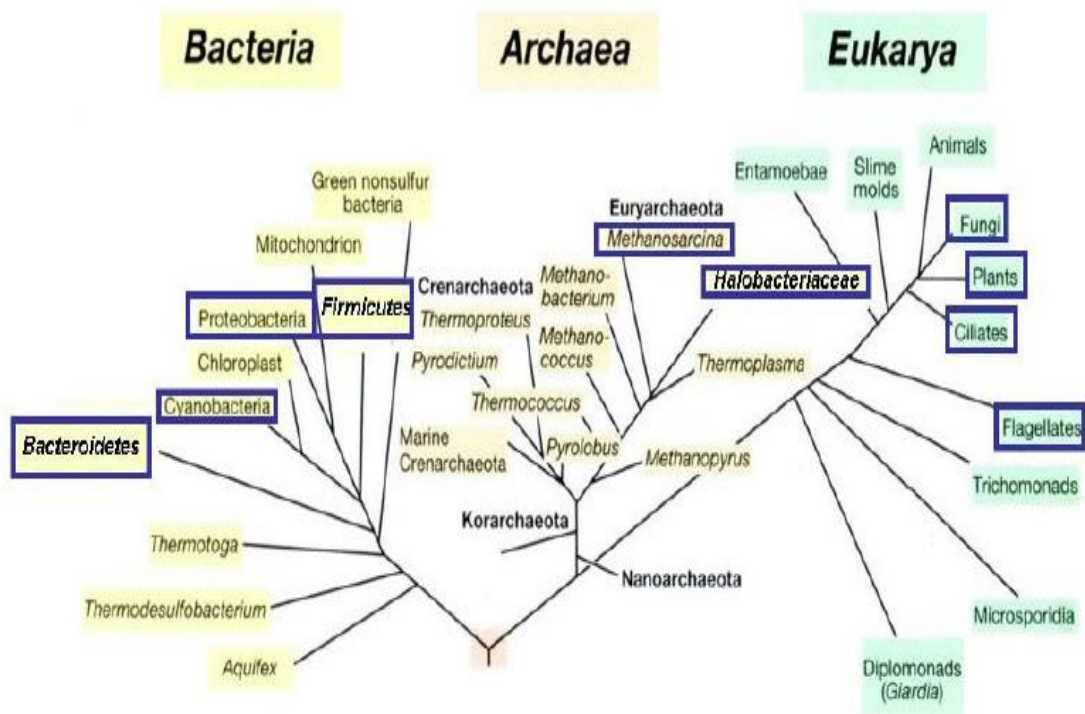


Figura 1. Árbol filogenético de la vida basado en secuencias del gen 16S RNAr y la distribución de los organismos halófilos y halotolerantes dentro del árbol. Los grupos marcados dentro de cajas azules contiene por lo menos un representante halófilo o halotolerante (Fuente: Oren 2008)

2.2.1. Dominio Archaea

Dentro del dominio Archaea se encuentra el principal grupo de halófilos extremos en el orden *Halobacteriales*, el cual contiene una única familia, *Halobacteriaceae*. Los organismos de esta familia son considerados halófilos por excelencia, porque todos ellos son estrictamente dependientes de altas concentraciones de sal para su crecimiento e integridad celular. Esta familia contiene, hasta la fecha 148 especies clasificadas dentro de 45 géneros (<http://www.bacterio.net/>). La mayoría de las especies de esta familia crece óptimamente por encima de una concentración de $150 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ y sus células se lisan a una concentración de sal inferior a $100 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Oren 2011a). Además de su requerimiento de altas concentraciones de sal para su crecimiento, las especies de esta familia se caracterizan por presentar pigmentos retinales unidos a la membrana celular, las bacteriorodopsinas y halorodopsinas, que les permiten a estos organismos el uso directo de la luz solar para generar energía química mediante la generación de gradientes de protones y iones cloro, respectivamente. Estas proteínas, están compuestas de siete hélices alfa transmembranales y una molécula retinal. Cuando estas proteínas absorben la luz solar, en la región verde del espectro a 570 nm, la molécula retiniana se excita y conduce la transferencia de protones o iones cloro a la superficie externa de la membrana. La molécula retinal se relaja y retorna a su forma isomérica más estable después de la incorporación de un protón o ión cloro desde el citoplasma, con lo cual se completa el ciclo (Grote et al. 2014). Las especies de la familia *Halobacteriaceae* se encuentran en ambientes hipersalinos como salmueras naturales, lagos salinos alcalinos y salinas solares marinas. Ellos representan la mayor parte de la microbiota de lagos alcalinos hipersalinos como el Lago Magadi en Kenia, piscinas de cristalización salina y el Mar Muerto (Andrei et al. 2012).

El dominio Archaea también incluye metanógenos tanto halófilos extremos como halófilos moderados dentro del orden *Methanosarcinales*, dentro de los géneros *Methanohalophilus*, *Methanohalobium*, *Methanosalsum*, *Methanocalculus* y *Methanosarcina* (Andrei et al. 2012). Además el género *Methanobacterium* del orden *Methanobacteriales* incluye especies halotolerantes (Kotelnikova et al. 1998; Mori and Harayama 2011). Estos géneros se caracterizan por utilizar metanol, trimetilamina y

sulfuro de dimetilo como sustratos para la metanogénesis y han sido aislados de lagos alcalinos, aguas subterráneas y tanques de almacenamiento de petróleo (Grant 2004).

Los estudios metagenómicos de la comunidad microbiana del lago hipersalino (290 g·l⁻¹) Tyrrell en Australia, reveló la presencia de un nuevo linaje relacionado con el filo *Nanohaloarchaea* (Narasingarao et al. 2012). Hallazgos similares han sido reportados en una piscina de cristalización en España (Ghai et al. 2011) y en un lago salino en Mongolia (Casanueva et al. 2008). Estos estudios han demostrado que los miembros de este nuevo linaje presentan una alta abundancia y una amplia distribución en hábitats hipersalinos.

2.2.2. Dominio Bacteria

En el dominio Bacteria los organismos halófilos extremos, halófilos moderados y halotolerantes están distribuidos dentro de los filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Spirochaetes* y *Cyanobacteria* principalmente (Oren 2011a). En el filo *Proteobacteria*, la mayoría de especies halófilas o halotolerantes pertenecen a la clase γ -*Proteobacteria*, donde se encuentra la familia *Halomonadaceae* que está constituida en su totalidad por halófilos moderados. Hasta la fecha, en la familia *Halomonadaceae* se han validado 118 especies distribuidas en 11 géneros. Esta familia comprende bacterias Gram-positivas, quimioorganotróficas y la mayoría crece en un rango de concentración de sal entre 5 y 100 g·l⁻¹, a una temperatura entre 25 y 35°C y valores de pH entre 7.0 y 8.0. Con excepción de estas características comunes, la familia *Halomonadaceae* es fenotípicamente y genotípicamente heterogénea, incluyendo cocos y bacilos, aerobios y anaerobios facultativos, halófilos moderados, haloalcalófilos y halotolerantes. Los miembros de la familia *Halomonadaceae* han sido aislados de una amplia variedad de hábitats como lagos hipersalinos, aguas marinas, suelos salinos, alimentos, plantas, animales y campos de petróleo (de la Haba et al. 2012).

Adicionalmente, dentro de la clase γ -*Proteobacteria* se ha reportado una halófila extrema, *Ectothiorhodospira halochloris*, que tiene una salinidad óptima de crecimiento superior a 100 g·l⁻¹ (Kerker 2004), así como especies halófilas moderadas de los géneros *Pseudomonas*, *Salinivibrio*, *Arhodomonas*, *Chromatium*, y *Alteromonas* (Kerker 2004; Ventosa et al. 1998). Además, se han reportado microorganismos halotolerantes en los

géneros *Alcanivorax* (Yakimov et al. 1998), *Marinobacter* (Liu et al. 2012a), *Microbulbifer* (Jeong et al. 2013c), *Marinimicrobium* (Lim et al. 2006), *Alcalilimnicola* (Yakimov et al. 2001), *Pseudoateromonas* (Bowman 1998), *Salinisphaera* (Crespo-Medina et al. 2009), *Rheinheimera* (Romanenko et al. 2003), *Photobacterium* (Rivas et al. 2006), *Psychrobacter* (Shivaji et al. 2005) y *Oceanimonas* (Parsa Yeganeh et al. 2012). Estos microorganismos han sido aislados de diferentes tipos de ambientes salinos como lagos salinos, ecosistemas marinos de la Antártica, suelos salinos, sedimentos marinos, lagos alcalinos, fosas hidrotermales, manantiales y plantas de tratamiento de aguas residuales.

Igualmente, la clase α -*Proteobacteria* contiene tanto halotolerantes como halófilos extremos y moderados. Los microorganismos halotolerantes aislados de ambientes marinos, minas salinas, suelos y lagos salinos, han sido reportados en los géneros *Pelagibacterium* (Xu et al. 2011), *Hoeflea* (Jung et al. 2013), *Salinarimonas* (Liu et al. 2010a), *Marteella* (Rivas et al. 2005), *Rosevivax* (Zhang et al. 2014), *Methyloceanibacter* (Takeuchi et al. 2014), *Thalassoccus* (Lee et al. 2007) y *Sneathiella* (Jordan et al. 2007). Particularmente, en la familia *Rhodospirillaceae* los microorganismos halotolerantes y halófilos constituyen el grupo fisiológico predominante. Hasta la fecha, solo una especie halófila extrema ha sido reportada, *Limimonas halophila*, que se aisló del lago salino Aran-Bidgol en Irán y crece en una rango de salinidad entre 2.5 y 5.2 M, con un óptimo de 3.4 M (Amoozegar et al. 2013). Los halófilos moderados se encuentran distribuidos en los géneros *Fordinicurvata*, *Marinispirillum*, *Pelagibius*, *Rhodospirillum*, *Rhodovibrio*, *Rhoseospira*, *Thalassobaculum* y *Thalassospira*, los cuales han sido aislados principalmente de ambientes marinos; mientras que los halotolerantes se han reportado en los géneros *Azospirillum*, *Caenispirillum*, *Conglomerans*, *Constribacter*, *Desertibacter*, *Dongia*, *Inquilinus*, *Nisaea*, *Oceanibaculum*, *Phaeovibrio*, *Rhodocista*, *Rhodospira*, *Skermanella*, *Telmatospirillum*, *Tristella* y *Tistlia*. Las especies de esta familia se encuentran en una gran variedad de hábitats, que incluyen tanto hábitats acuáticos (lagos hipersalinos, marismas, manantiales salinos, minas salinas y lagunas) como hábitats terrestres (suelos salinos, suelos desérticos, sedimentos y lodos activados) (de la Haba et al. 2011).

Finalmente, en la clase δ -*Proteobacteria* todos los halófilos y halotolerantes reportados son bacterias sulfato reductoras quimiorganotróficas, quimiolitoheterotróficas o

quimiolitooautotróficas. Las especies que crecen en salinidades moderadas se han reportado en los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfocella*, *Desulfonema* y *Desulfococcus* (de la Haba et al. 2011). Por otro lado, la especie *Desulfohalophilus alkaliarsenatis* es una bacteria halófila extrema reductora de azufre aislada del lago Searles (California) que crece en un rango de salinidad entre 125-330 g·l⁻¹ (Blum et al. 2012), mientras que *Desulfovibrio tunisiensis* (Ben Ali Gam et al. 2009), aislada de una refinería de petróleo en Túnez, son bacterias sulfato reductoras halotolerantes que presentan un rango de salinidad entre 0 a 70 g·l⁻¹.

Dentro del filo *Firmicutes*, el orden *Halanaerobiales* contiene en su totalidad microorganismos halófilos moderados que incluye dos familias *Halanaerobiaceae* y *Halobacteroidaceae* (Oren 2008). El estudio de este grupo ha sido hasta cierto punto olvidado en comparación con los otros grupos monofiléticos que contienen en su totalidad microorganismos halófilos, lo cual se refleja en el poco número de especies descritas hasta el momento, 14 géneros y 30 especies (Blum et al. 2009; Hedi et al. 2009; Oren 2008; Zhilina et al. 2012). El orden *Halanaerobiales* está formado por anaerobios obligados con metabolismo fermentativo u homoacetogénico, y la mayoría ha sido aislada de tanques de fermentación de azúcares o aminoácidos. Adicionalmente, en los órdenes *Bacillales* y *Clostridiales* se han reportado especies halófilas moderadas y halotolerantes. En el orden *Bacillales*, los halófilos moderados se encuentran en los género *Halobacillus*, *Bacillus*, *Marinococcus*, *Thalassobacillus*, *Salinococcus* y *Tertragenococcus* (Ventosa et al. 1998), mientras que los microorganismos halotolerantes se han reportado en los géneros *Terribacillus* (An et al. 2007), *Staphylococcus* (Sung et al. 2012), *Bacillus* (Lee et al. 2006; Liu et al. 2009; Zhu et al. 2014), *Jeotgalococcus* (Guo et al. 2010), *Gracibacillus* (Huo et al. 2010), *Oceanobacillus* (Kim et al. 2007), *Salirhabdus* (Albuquerque et al. 2007), *Marinococcus* (Wang et al. 2009b), *Amphibacillus* (Wu et al. 2010) y *Alkalibacillus* (Romano et al. 2005). En el orden *Clostridiales*, los géneros *Anaerosalibacter* (Rezgui et al. 2012) y *Fusibacter* (Ben Hania et al. 2012) tienen algunas especies halotolerantes. Las especies reportadas para los órdenes *Bacillales* y *Clostridiales* han sido aisladas de suelos salinos, sedimentos marinos, plantas de tratamiento de aguas residuales, lagos salinos y estanques de evaporación de sal marina.

Dentro del filo *Bacteroidetes* se encuentran principalmente microorganismos halotolerantes de los géneros *Mongotiitalea* (Yang et al. 2012), *Litoribacter* (Tian et al. 2010), *Anditalea* (Shi et al. 2012), *Mongolicoccus* (Liu et al. 2012b), *Chryseobacterium* (Benmalek et al. 2010), *Aestuariibaculum* (Jeong et al. 2013b), *Gramella* (Jeong et al. 2013a) y *Echinicola* (Nedashkovskaya et al. 2007), que han sido aislados principalmente de lagos alcalinos y suelos salinos. Además, dentro de este filo se encuentra la halófila extrema *Salinibacter ruber* que coexiste con especies de familia *Halobacteriaceae* (Archaea) en piscinas de cristalización y otros ambientes hipersalinos, y presenta una salinidad óptima de crecimiento entre 200 a 300 g·l⁻¹. Esta bacteria particularmente presenta mecanismos de osmoadaptación similares a los reportados para archaeas de la familia *Halobacteriaceae* (Oren 2013b).

En el filo Actinobacteria, los microorganismos halotolerantes reportados se encuentran distribuidos en los géneros *Nocardopsis*, *Prauserella*, *Nocardioides*, *Brevibacterium*, *Gedermatophilus*, *Arthrobacter*, *Brachybacterium*, *Microbacterium*, *Corynebacterium*, *Kocuria* y *Myceligenans*, que han sido aislados de agua de mar, suelos salinos, lagos salados, salmueras y lagos salino-alcalinos. Las especies *Actinopolyspora halophila* y *Nocardopsis halophila* son hasta el momento, las únicas halófilas moderadas asignadas a este filo y se aislaron de suelos salinos (Hamedi et al. 2013). De otra parte, en el filo *Spirochaetes* cuatro especies halófilas moderadas han sido descritas hasta el momento, las cuales pertenecen al género *Spirochaeta*: *Spirochaeta halophila*, *Spirochaeta africana*, *Spirochaeta alkalica* y *Spirochaeta asiatica*. Este género contiene un grupo de bacterias de vida libre, sacarólíticas y bastante comunes en sedimentos, lodos marinos y agua dulce. Finalmente, en el filo *Cyanobacteria* se encuentran algunas especies halotolerantes aisladas de diferentes hábitats incluyendo ambientes marinos, ambientes de agua dulce, lagos hipersalinos y manantiales termales. Las especies halotolerantes de este filo se encuentran distribuidas en los géneros *Aphanocapsa*, *Aphanothece*, *Geitlerinema*, *Halomicronema*, *Komvophoron*, *Lyngbya*, *Nodularia*, *Phormidium*, *Pseudanabaena*, *Spirulina* y *Tychonema* (de la Haba et al. 2011).

2.2.3. Dominio Eucaria

En el dominio Eucarya, el organismo halotolerante más estudiado es el alga verde *Dunaliella* sp. que pueden crecer en un rango de concentración de sal entre 0.05 y 5.5 M. Este alga es el principal productor primario del Mar Muerto y en muchos lagos y piscinas hipersalinas (Kerker 2004). Por otro lado, los crustáceos como *Artemia salina* y *Artemia franciscana* se han encontrado en lagos salinos que presentan concentraciones de sal entre 150 a 200 g·l⁻¹. Adicionalmente, los estudios independientes de cultivo basados en el análisis de la secuencia del gen 18S RNAr revelaron la presencia de 40 filotipos de protistas encontrados en el lago hipersalino L'Atalante en el mar Mediterráneo. Los hongos halotolerantes, especialmente levaduras de los géneros *Hortaea*, *Trimmatostroma*, *Candida*, *Pichia*, *Yarrowia* y *Debaryomyces* son parte integral de ecosistemas salinos como lagos salinos y el Mar Muerto (Oren 2011a).

Los estudios sistemáticos y filogenéticos han definido un gran número de especies halófilas y halotolerantes distribuidas en las principales ramas filogenéticas de los dominios Archaea, Bacteria y Eucarya. Adicionalmente, estos estudios han permitido determinar la distribución ecológica de estos organismos, demostrando que los ambientes salinos, ampliamente distribuidos en el mundo, pueden albergar una gran diversidad de organismos halófilos y halotolerantes.

2.3. DIVERSIDAD MICROBIANA DE AMBIENTES SALINOS COLOMBIANOS

Los manantiales salinos en Colombia se encuentran distribuidos en las Cordilleras Occidental, Central y Oriental, y son considerados fuente de recursos minerales en concentraciones explotables y de recursos hídricos, por su estrecha relación con las aguas subterráneas (Cortes and Cardona 2006). Estos difieren en su composición química según la interacción del agua con la roca y la composición de la misma; y algunos pueden tener altos contenidos de bicarbonatos, cloruros, o sulfatos (Díaz-Cárdenas 2011). En la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) se han realizado estudios de diversidad microbiana y bioprospección de los manantiales salinos “Salado Consotá” y “La Cristalina” ubicados en el departamento de Risaralda y el manantial “Salpa” localizado en el departamento de Boyacá (Díaz-Cárdenas 2011). Estos

manantiales presentan características fisicoquímicas particulares que les permiten albergar una gran diversidad microbiana que representa un reservorio de diversidad genética inexplorado.

La caracterización de la composición microbiana de los manantiales salinos Salpa, y La Cristalina permitió determinar que estos manantiales están dominados por organismos del dominio *Bacteria* del filo *Proteobacteria*, de las clases γ y α -*Proteobacteria*, los cuales estuvieron en su mayoría relacionados con microorganismos halotolerantes y halófilos de sedimentos de lagunas de cristalización, manantiales sulfurosos marinos y estuarios, ambientes de agua dulce y suelo (Díaz-Cárdenas 2011). En el caso del manantial Salpa se reportó el aislamiento de cepas relacionadas con los géneros *Desulfovibrio* y *Dethiosulfovibrio*, previamente reportadas en ambientes salinos, y cepas relacionadas con organismos de distribución cosmopolita de los géneros *Nitratireductor*, *Shewanella*, *Lysobacter* y *Clostridium* (Díaz-Cárdenas 2011). Además, en este manantial se aisló una nueva especie del género *Dethiosulfovibrio* (Díaz-Cárdenas et al. 2010a). Por su parte del manantial La Cristalina, se aislaron cepas que han sido típicamente reportadas en ambientes marinos y se relacionan con los géneros *Oceanibaculum*, *Dethiosulfovibrio* y *Vibrio*, y cepas que presentan una distribución cosmopolita y están relacionadas con los géneros *Caenispirillum*, *Lysobacter* y *Bacillus* (Díaz-Cárdenas 2011).

De otra parte, el manantial “Salado Contotá”, que se caracteriza por presentar una temperatura promedio de 21°C y un pH entre 6.1 a 7.4, respectivamente, una conductividad de 33.00 a 40.000 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ y un alto contenido de Cl^- , Na^+ y Ca^{2+} (Tistl 2004), presentó una composición microbiana que en su mayoría está dominada por organismos halófilos reportados principalmente en ambientes marinos. En este manantial se aislaron cepas que han sido típicamente reportadas en ambientes salinos, principalmente marinos, y están relacionadas con los géneros *Roseovarius*, *Thalassospira*, *Thalassobaculum*, *Labrenzia*, *Stappia*, *Thioclava*, *Dethiosulfovibrio*, *Vibrio* y *Prolixibacter*, además se aislaron cepas relacionadas con los géneros *Gluconacetobacter*, *Caenispirillum*, *Pleomorphomonas*, *Lysobacter*, *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Clostridium* y *Celullomonas*, los cuales presentan una distribución cosmopolita (Díaz-Cárdenas 2011).

El estudio de la composición microbiana de los manantiales salinos mencionados anteriormente reveló además una diversidad taxonómica bacteriana no antes descrita, evidenciada por el alto número de secuencias del gen 16S rRNA con menos de 97% de similitud con secuencias de organismos previamente cultivados y por el aislamiento e identificación de nuevas especies. Dentro de estos microorganismos se destaca la cepa USBA 355, aislada del manantial salino Salado Consotá, identificada como un nuevo género bacteriano halotolerante de la clase α -*Proteobacteria*, familia *Rhodospirillaceae*, denominado *Tistlia*, con una única especie identificada hasta el momento, *T. consotensis*.

2.4. *Tistlia consotensis*

T. consotensis pertenece a la familia *Rhodospirillaceae*, donde los microorganismos halófilos y halotolerantes representan el principal grupo fisiológico, en la Tabla 1 se encuentran los 33 géneros validados para esta familia y su comparación con *T. consotensis* en cuanto a hábitat y rango de salinidad tolerada. Las células de *T. consotensis* son bacilos ligeramente curvos, no esporoformadores y presentan una ultraestructura de pared celular típica de organismos Gram positivos. Esta bacteria presenta un crecimiento quimioheterotrófico en presencia de glucosa o peptona como únicas fuentes de carbono, y el extracto de levadura no es requerido para su crecimiento pero incrementa la producción de biomasa. Además, *T. consotensis* presentó una alta actividad de reducción de acetileno y se detectó la presencia del gen *nifH*, lo cual confirma su capacidad de fijar nitrógeno. Adicionalmente, la urea, el nitrato y el glutamato pueden ser usados por esta bacteria como única fuente de nitrógeno. *T. consotensis* presenta su crecimiento óptimo a 30°C, pH 6.5-6.7 y salinidad de 5 g·l⁻¹. Aunque no requiere NaCl para su crecimiento tolera hasta 40 g·l⁻¹ de salinidad (Díaz-Cárdenas et al. 2010b). En estudios previos se determinó que esta bacteria tiene la capacidad de acumular 3-polihidroxialcanoato (PHAs) y producir metabolitos secundarios de baja y mediana polaridad con potencial actividad biológica (Díaz-Cárdenas 2011).

Teniendo en cuenta que *T. consotensis* es una bacteria halotolerante y que se aisló de un manantial salino que presenta un contenido de sal promedio de 45 g·l⁻¹, es de suponer que esta bacteria tiene mecanismos de tolerancia específicos frente a cambios de la salinidad externa. Adicionalmente, es importante resaltar que *T. consotensis* está

relacionada con un grupo filogenético que en su mayoría contiene organismos halófilos y halotolerante aislados de ambientes marinos, lo cual también abriría la posibilidad de que esta bacteria halotolerante presentara mecanismos de adaptación reportados para organismos marinos. A continuación se describen las características moleculares relacionadas con la adaptación a ambientes salinos así como los mecanismos de osmoadaptación descritos para organismos halófilos y halotolerantes.

2.5. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES RELACIONADAS CON LA ADAPTACIÓN A AMBIENTES SALINOS

El estudio de las relaciones entre las características funcionales y la filogenia microbiana es uno de los principales objetivos de la ecología microbiana, la información de estos estudios es fundamental para entender los mecanismos que permiten a los microorganismos interactuar entre sí y adaptarse a condiciones ambientales cambiantes (Penn et al. 2009).

Los organismos halófilos presentan características o firmas moleculares que están directamente relacionadas con su adaptación a ambientes salinos. Estas características moleculares están relacionadas con principios físicos que gobiernan la estabilidad del ADN o con las proteínas en respuesta a las condiciones extremas de salinidad. A nivel de proteínas las características moleculares están relacionadas con la composición de aminoácidos mientras que a nivel de ADN están relacionadas con la abundancia de ciertos nucleótidos y con el contenido de Guanina-Citosina (GC). La presencia de estas características moleculares en organismos halófilos soporta la idea de una evolución convergente no solo a nivel de la composición del proteoma, sino también a nivel de la organización del genoma de los organismos adaptados a vivir en ambientes con altas concentraciones de sal (Paul et al. 2008).

2.5.1. Características moleculares a nivel de ADN

Los microorganismos halófilos extremos como *Haloarcula marismortui*, *H.salinarum* *Natronomonas pharaonis* y *Salinibacter ruber* contienen genomas con alto contenido

Tabla 1. Hábitats y rangos de tolerancia de salinidad de los géneros de la familia *Rhodospirillaceae*

Género	Fuentes de aislamiento	Categoría de halotolerancia	Rango de salinidad	Referencia
<i>Azospirillum</i>	Suelo	Halotolerante	0-2.0% (p/v) NaCl	(Chowdhury et al. 2007)
<i>Caenispirillum</i>	Lodo activado	Halotolerante	0-5.0% (p/v) NaCl	(Yoon et al. 2007b)
<i>Conglomeromonas</i>	Agua dulce	Halotolerante	0-2.0% (p/v) NaCl	(Skerman et al. 1983)
<i>Constrictibacter</i>	Suelo	Halotolerante	0-2.0% (p/v) NaCl	(Yamada et al. 2011)
<i>Defluviicoccus</i>	Lodo activado	n.d.	n.d.	(Maszenan et al. 2005)
<i>Desertibacter</i>	Suelo	Halotolerante	0-1.5% (p/v) NaCl	(Liu et al. 2011)
<i>Dongia</i>	Reactor discontinuo	Halotolerante	0-2.5% (p/v) NaCl	(Liu et al. 2010b)
<i>Elstera</i>	Biofilm de zona litoral	n.d.	n.d.	(Rahalkar et al. 2012)
<i>Ferrovibrio</i>	Zona redox de un manantial	n.d.	n.d.	(Sorokina et al. 2012)
<i>Fodinicurvata</i>	Mina salina (China)	Halófilo moderado	1.5-20% (p/v) NaCl	(Wang et al. 2009a)
<i>Inquilinus</i>	Tracto respiratorio humano	Halotolerante	0-2.0% (p/v) NaCl	(Jung et al. 2011)
<i>Insolitispirillum</i>	Laguna de oxidación primaria	n.d.	n.d.	(Yoon et al. 2007a)
<i>Limimonas</i>	Lago hipersalino	Halófilo extremo	14-30% (p/v) NaCl	(Amoozegar et al. 2013)
<i>Magnetospirillum</i>	Sedimentos de agua dulce	n.d.	n.d.	(Schleifer et al. 1991)
<i>Magnetovibrio</i>	Marisma salina	n.d.	n.d.	(Bazylnski et al. 2013)

Tabla 1. (continuación). Hábitats y rangos de tolerancia de salinidad de los géneros de la familia *Rhodospirillaceae*

Género	Fuentes de aislamiento	Categoría de halotolerancia	Rango de salinidad	Referencia
<i>Magnetospira</i>	Agua de marisma salina	n.d.	n.d.	(Williams et al. 2012)
<i>Marispirillum</i>	Ambientes marinos	Halófilo moderado	0.5-12% (p/v) NaCl	(Lai et al. 2009a)
<i>Nisaea</i>	Aguas superficiales costeras	Halotolerante	0-6.0% (p/v) NaCl	(Urios et al. 2008)
<i>Oceanibaculum</i>	Agua de mar	Halotolerante	0-9.0% (p/v) NaCl	(Lai et al. 2009b)
<i>Pelagibius</i>	Agua marina costera	Halófilo moderado	2-6.0% (p/v) NaCl	(Choi et al. 2009)
<i>Phaeovibrio</i>	Estanque de camarones salobre	Halotolerante	0-0.5% (p/v) NaCl	(Lakshmi et al. 2011)
<i>Phaeospirillum</i>	Agua dulce y sedimentos	n.d.	n.d.	(Raj et al. 2012)
<i>Rhodocista</i>	Planta de tratamiento de aguas residuales	Halotolerante	0-3.0% (p/v) NaCl	(Zhang et al. 2003)
<i>Rhodospira</i>	Ambientes marinos	Halotolerante	0-2.0% (p/v) NaCl	(Pfennig et al. 1997)
<i>Rhodospirillum</i>	Ambientes marinos	Halófilo	n.d	(Nissen and Dundas 1984)

Tabla 1. (continuación). Hábitats y rangos de tolerancia de salinidad de los géneros de la familia *Rhodospirillaceae*

Género	Fuentes de aislamiento	Categoría de halotolerancia	Rango de salinidad	Referencia
<i>Rhodovibrio</i>	Ambientes marinos	Halófilo	n.d.	(Imhoff et al. 1998)
<i>Roseospira</i>	Ambientes marinos	Halófilo moderado	0.5-15% (p/v) NaCl	(Guyoneaud et al. 2002)
<i>Skermanella</i>	Muestras de aire y suelo del desértico	Halotolerante	0-10% (p/v) NaCl	(An et al. 2009; Weon et al. 2007)
<i>Telmatospirillum</i>	Lago mestrófico	Halotolerante	0-.6% (p/v) NaCl	(Sizova et al. 2007)
<i>Thalassobaculum</i>	Agua marina costera	Halófilo moderado	1.0-10% (p/v) NaCl	(Urios et al. 2010; Zhang et al. 2008)
<i>Thalassospira</i>	Ambientes marinos	Halófilo moderado	1-12% (p/v) NaCl	(Kodama et al. 2008; López-López et al. 2002; Tsubouchi et al. 2014; Zhao et al. 2010)
<i>Tistrella</i>	Suelo	Halotolerante	0-5.0% (p/v) NaCl	(Zhang et al. 2011)
<i>Tistlia</i>	Manantial salino	Halotolerante	0-4.0% (p/v) NaCl	(Díaz-Cárdenas et al. 2010b)

contenido de GC (superior al 60%) que probablemente es útil para prevenir la formación de dímeros de timidina generados por la intensa radiación ultravioleta a menudo asociado con ambientes hipersalinos (Rhodes et al. 2011). Sin embargo, recientemente se han reportado halófilos que presentan un contenido de GC inferior a 46% como es el caso de *Haloquadratum walsby*, *Halothermothrix oreni* y *Salinicoccus kunmingensis*, indicando que el contenido de GC no es una característica universal de adaptación distribuida en todos los organismos halófilos (Graziano and Merlino 2014).

Por otro lado, diferentes estudios han demostrado que el genoma de los organismos halófilos presenta generalmente una tendencia a una alta abundancia de los dinucleótidos CG, GA/TC y AC/GT y una preferencia para codones específicos para los aminoácidos arginina, treonina y valina, posiblemente para mantener la estabilidad de las estructuras secundarias y terciarias durante el plegamiento de las proteínas (Rhodes et al. 2011). En relación a esta característica molecular, Paul et al. (2008) demostraron que en los genomas de organismos halófilos existe una alta frecuencia de la ocurrencia de los dinucleótidos GA, CA y CT en la primera y segunda posición del codón que refleja un requerimiento para los aminoácidos aspartato, glutamato, treonina y valina, en comparación con los genomas de organismos no halófilos. Estos hallazgos indican que los organismos halófilos tienen una característica genómica específica a nivel de dinucleótidos que está conectada con la composición de aminoácidos específica de las proteínas para la adaptación a ambientes salinos.

Adicionalmente, se ha reportado que los organismos halófilos presentan un patrón de favorece el uso de codones que codifican para arginina (CGA y CGG), valina (GUC), treonina (ACG), leucina (CUC) y cisteína (UGU). Estos resultados indican que a pesar de la larga historia evolutiva, los genes de los organismos halófilos, en general, han convergido en patrones similares del uso de codones (Kennedy et al. 2001).

2.5.2. Características moleculares a nivel de proteínas

La composición de aminoácidos está determinada principalmente por requerimientos funcionales y estructurales de una determinada proteína, y puede estar relacionada con una variedad de factores. Condiciones como la temperatura, la concentración de sal, el

pH o la presión dentro del hábitat de un organismo son posiblemente los factores más importantes que causan una presión selectiva sobre las proteínas de los organismos que habitan en diferentes ambientes (Smole et al. 2011). En el caso de las proteínas de organismos halófilos, estas tienen mecanismos específicos que les permiten ser solubles y estables en presencia de altas concentraciones de NaCl y KCl.

La principal característica molecular a nivel de las proteínas es una tendencia en el incremento de residuos cargados negativamente como aspartato y glutamato, y la disminución de residuos cargados positivamente como lisina y de residuos hidrofóbicos como leucina, isoleucina y metionina, en los proteomas de organismos halófilos (Sinha and Khare 2014). Este patrón en la composición de los aminoácidos indica que las proteínas de los organismos halófilos se caracterizan por una baja hidrofobicidad y un alto uso de aminoácidos cargados negativamente en comparación con las proteínas de organismos no halófilos. En el estudio reportado por Paul et al. (2008) se realizó un análisis de la frecuencia de sustituciones de aminoácidos de proteínas de microorganismos halófilos en comparación con las de no halófilos y se determinó una clara tendencia de sustitución de residuos de lisina por residuos ácidos, especialmente aspartato, en proteínas halofílicas. Otra tendencia observada fue el reemplazo de isoleucina o leucina por valina. Estos resultados sugieren que hay una prevalencia global de ganancia de aspartato, glutamato, valina y treonina, y una prominente pérdida de lisina, isoleucina, metionina, leucina y cisteína en las proteínas de microorganismos halófilos (Paul et al. 2008).

El alto uso de residuos ácidos conduce a la organización de una red de iones de sal hidratados en la superficie de las proteínas y a la formación de puentes de sal con residuos básicos estratégicamente posicionados, evitando de esta manera la agregación de las proteínas en presencia de altas concentraciones de sal y previniendo su desnaturalización. Por otro lado, en ambientes salinos los residuos hidrofóbicos de las proteínas sintetizadas están expuestos a altas concentraciones de sal, conduciendo a interacciones inter- o intra- moleculares no específicas de sus cadenas laterales, las cuales pueden competir con sus propias interacciones intramoleculares, que podría afectar el correcto plegamiento de la proteína. Probablemente para minimizar esta

posibilidad, todas las proteínas citosólicas y membranales halófilas solubles tienen un bajo número de residuos hidrofóbicos (Sinha and Khare 2014).

Esta tendencia general también ha sido confirmada mediante la comparación de secuencias realizada a nivel de familias de proteínas. Por ejemplo, el análisis comparativo de secuencias de la enzima glutamato deshidrogenasa de microorganismos mesófilos, halófilos e hipertermófilos, demostró que la glutamato deshidrogenasa halófila presentaba un mayor contenido de residuos ácidos, con un 64% del número total de residuos ácidos comparado con valores del 50% en estos residuos en sus homólogas mesófilas e hipertermófilas. Además, también se observó una disminución significativa de residuos de lisina. Resultados similares han sido encontrados analizando la composición de aminoácidos del factor de elongación EF-Tu de la archaeas halófilas extremas *Halobacterium marismortui* y *Methanococcus vannielii*, aisladas de ambientes marinos (Graziano and Merlino 2014).

Para los microorganismos halófilos moderados también se ha reportado una tendencia al aumento de residuos ácidos de sus proteínas. Oren et al. (2005) realizaron un análisis de la composición de aminoácidos de diferentes categorías de proteínas (enzimas del metabolismo central, proteínas ribosomales estructurales y proteínas involucradas con sistemas de transporte tipo ABC, *ATP binding cassette*) de la bacteria halófila moderada *Chromohalobacter salexigens* y compararon su composición con proteínas equivalentes de bacterias no-halófilas de la clase α -*Proteobacteria*. Esta comparación mostró una diferencia significativa con respecto al valor de punto isoelectrico de las proteínas periplasmáticas involucradas con sistemas de transporte tipo ABC, mientras que en las proteínas citoplasmáticas solo fue observado un ligero exceso de residuos ácidos. (Oren et al. 2005).

A partir de los estudios reportados sobre la composición de aminoácidos de las proteínas de organismos halófilos se puede concluir que el alto contenido de residuos ácidos es una característica específica de estos organismos y que es independiente de su posición taxonómica.

Otra característica común entre las proteínas de los organismos halófilos es la alta preferencia a la formación de regiones superenrolladas y la baja tendencia a la formación de α hélices en su estructura secundaria de sus proteínas. Se ha demostrado que aminoácidos hidrofóbicos (Leu y Met) y cargados positivamente (Lys), que tienen una alta preferencia por la formación de α hélices están sub-representados, mientras que residuos ácidos (Asp), con una alta tendencia a la formación de regiones superenrolladas, están sobre-representadas en proteínas de microorganismos halófilos (Paul et al. 2008).

En las proteínas con un alto porcentaje de estructuras α hélices hay un incremento general del empaquetamiento que genera una mayor rigidez. Una disminución en las regiones con tendencia a formación de α hélices en las proteínas halófilas probablemente las hace más flexibles. Debido a que la flexibilidad y la función de las proteínas están fuertemente conectadas, una reducción en las regiones que forman α hélices puede ser una estrategia de las proteínas halófilas para la adaptación de ambientes salinos (Fleming and Richards 2000). Las proteínas con una estructura flexible se caracterizan por tener una alta ocurrencia de residuos cargados negativamente, especialmente aspartato. Desde el punto de vista estructural, el aspartato es reconocido como un aminoácido que genera la ruptura de α hélices, lo cual explica también el alto contenido de este aminoácido en las proteínas de microorganismos halófilos (Paul et al. 2008). Las evidencias anteriormente explicadas indican que las proteínas halófilas han desarrollado una estructura secundaria más flexible y ordenada que contribuye a evitar su agregación y pérdida de función en ambientes que presentan altas concentraciones de sal.

2.5.3. Proteínas relacionadas con adaptación marina

En organismos marinos se ha reportado la presencia de ciertos genes implicados en su adaptación a ambientes marinos que están relacionados con el requerimiento de Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} para su crecimiento. Este requerimiento está a su vez conectado con el bombeo de Na^+ y con la presencia de la enzima NADH deshidrogenasa (Nqr) involucrada en el transporte de electrones en la cadena respiratoria (Penn and Jensen 2012). Existen dos tipos de NADH deshidrogenasas que están asociadas con la adaptación marina: (i) la NADH deshidrogenasa *sodium-pumping* (conocida como Nqr) y (iii) la NADH deshidrogenasa *proton-pumping* (conocida como complejo I o NDH-1). Las enzimas Nqr y

NDH-1 están implicadas en transferencia de electrones del NADH a la ubiquinona, donde la transferencia de electrones está acoplada a la salida de iones Na^+ y protones, respectivamente (Kerscher et al. 2008). La salida de iones Na^+ y protones permite a los organismos de ambientes marinos mantener fuera del citoplasma el exceso de Na^+ y permite mantener el gradiente de protones.

La enzima Nqr es principalmente encontrada en bacterias marinas Gram negativas de los géneros *Vibrio*, *Halovibrio* y *Alteromonas* así como en la archaea *H. salinarum* (Unemoto and Hayashi 1993), mientras que la enzima NDH-1 se ha reportado en actinobacterias marinas del género *Salinispora* y en otras bacterias como *Fulvimarina pelagi*, *Oceanibulbus indolifex* y *Nitrosococcus watsonii* (Penn and Jensen 2012).

En este mismo estudio se reportó que en las actinobacterias marinas *Salinispora tropica* y *Salinispora arenicola* el sistema de antiporte de protones Mrp y el sistema de simporte Na^+ /ácidos biliares están involucrados también en el mantenimiento del exceso de Na^+ fuera del interior de la célula. Además, el sistema de simporte Na^+ /ácidos biliares proporciona un mecanismo para aprovechar el gradiente Na^+ para importar sales biliares, que pueden ser convertidas a solutos compatibles como glicina o taurina. El sistema de antiporte de protones Mrp también se ha reportado en representantes marinos de los géneros *Vibrio*, *Roseobacter* y *Thioalkalivibrio*, y en las especies marinas *Halomonas elongata*, *Marinobacter aquaeoli*, *Alkalilimnicola ehrlichel*, *Halorhodospira halophila* y *Bacillus halodurans*. El sistema de simporte Na^+ /ácidos biliares se ha reportado en *Aeromicrobium marinum* y en especies marinas de los géneros *Janibacter*, *Marinobacter* y *Alcarivorax* (Penn and Jensen 2012). Estos hallazgos permiten sugerir que la presencia de diferentes sistemas de transporte involucrados en la salida de Na^+ asegura a los organismos que habitan en ambientes marinos mantener el exceso de estos iones fuera de la célula para evitar el daño celular.

Otros mecanismos de adaptación marina están relacionados con la presencia de transportadores ABC de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA por sus siglas en inglés branched chain aminoacids) (Penn and Jensen 2012). Los aminoácidos de cadena ramificada como leucina, isoleucina y valina son convertidos a L-glutamato en presencia de 2-oxoglutarato y 5-fosfato piridoxal por una aminotransferasa de aminoácidos de

cadena ramificada (Ziegler et al. 2010). La presencia de transportadores de aminoácidos de cadena ramificada se ha reportado en especies de los géneros *Salinispora* (Penn and Jensen 2012), *Oceanibacillus* (Ziegler et al. 2010), *Roseobacter* (Moran et al. 2007) y *Bacillus* (Takami et al. 2002) adaptadas a vivir en ambientes marinos. Estos transportadores también representan una proporción significativa de los genes observados en metagenomas marinos (Morris et al. 2010). Los sistemas de transporte de aminoácidos de cadena ramificada tienen una función clave en la adaptación a ambientes salinos, ya que el L-glutamato que es formado a partir de los aminoácidos transportados, ayuda a favorecer la naturaleza ácida de las proteínas y mantiene el equilibrio eléctrico al interior de la célula.

2.6. MECANISMOS DE OSMOADAPTACIÓN DE ORGANISMOS HALÓFILOS Y HALOTOLERANTES

Los organismos que habitan en ambientes salinos están sometidos a constantes cambios de la actividad del agua de sus hábitats, y por ende un constante monitoreo y adaptación a los cambios en la actividad del agua son un pre-requisito para sobrevivir en dichos ambientes. El principal desafío frente a estas condiciones es ajustar la presión de turgencia, para lo cual los organismos han desarrollado dos estrategias para mantener el balance osmótico de su citoplasma, las cuales tienen como objetivo la exclusión de Na^+ del interior de la célula (Averhoff and Müller 2010). La primera estrategia involucra la acumulación de solutos inorgánicos, como potasio y cloro, denominada *Salt-in*, mientras que la segunda estrategia, denominada *Salt-out*, se basa en la síntesis o captura de solutos orgánicos compatibles (Oren 2008). Es importante aclarar que en el caso de los microorganismos halófilos, que requieren de altas concentraciones de sal para su crecimiento, estas estrategias hacen parte de los mecanismos de adaptación adquiridos para sobrevivir en ambientes salinos. Por el contrario, los organismos halotolerantes, que no requieren la presencia de sal para su crecimiento pero toleran altas concentraciones, emplean estas estrategias como mecanismos de tolerancia utilizados en respuesta a una condición de estrés por el incremento de sal en el medio.

Aunque los ambientes salinos se caracterizan por presentar altas concentraciones de sal, en algunos casos, como los manantiales salinos, la salinidad puede variar en función de

periodos prolongados de sequia o lluvia, lo cual conduce a cambios constantes de la osmolalidad del medio. Por lo tanto, los organismos que habitan estos ambientes salinos deben tener la habilidad de adaptarse a cambios en la salinidad de medio para contrarrestar el efecto causado por el aumento o disminución en la osmolalidad externa (Ceylan et al. 2012).

Los cambios repentinos de la concentración de sal externa generan una condición de estrés osmótico. El parámetro básico que es relevante para la célula y que varía bajo estrés osmótico es, en términos fisicoquímicos, la actividad del agua, o, en términos fisiológicos, la disponibilidad de agua para las funciones celulares. La actividad del agua está relacionada con la presión osmótica de una solución acuosa y es normalmente expresada en términos de osmolalidad (unidades de osmoles.kg⁻¹ de agua). El agua fluye de regiones con una alta actividad de agua (baja presión osmótica) a áreas con una baja actividad de agua (alta presión osmótica). Por lo tanto, la consecuencia inmediata para los organismos frente a un cambio en la osmolalidad externa es un flujo de agua a través de la envoltura celular. En el caso de un **estrés hiper-osmótico** (incremento de la osmolalidad externa) el agua fluye fuera de la célula mientras que en el **estrés hipo-osmótico** (disminución de la osmolalidad externa) el agua fluye al interior de la célula. La membrana citoplasmática, que es la barrera citoplasmática de la célula, tiene una permeabilidad relativamente alta al agua, lo que resulta en un rápido flujo de agua transmembranal en respuesta a los cambios de osmolalidad y en un cambio inmediato en la estructura celular y el concentración de componentes celulares (Krämer 2010). Por lo tanto, para evitar los efectos negativos causados en la célula bajo condiciones de alta o baja osmolalidad, los organismos halófilos y halotolerantes ha desarrollado diferentes estrategias de osmoadaptación que permiten una respuesta oportuna y efectiva a cambios en la osmolalidad del ambiente (Leuko et al. 2009).

El término de osmoadaptación describe las manifestaciones genéticas y fisiológicas de adaptación a ambientes con alta o baja osmolalidad. Como se mencionó anteriormente existen dos estrategias de osmoadaptación para contrarrestar un aumento en osmolalidad externa: (i) acumulación de iones inorgánicos (K⁺ y Cl⁻) y (ii) acumulación de solutos compatibles. Por otro lado, la adaptación a una disminución de osmolalidad involucra una combinación de mecanismos de eflujo de solutos específicos (transporte secundario) y no

específicos (canales mecanosensibles) junto con eflujo de agua mediado por acuaporinas (Sleator and Hill 2002).

2.6.1. Mecanismos de osmoadaptación en respuesta a una disminución de la osmolalidad externa

La disminución de la osmolalidad externa en ambientes salinos se da como consecuencia de periodos prolongados de lluvia generando una dilución del contenido de sal en el ambiente. Estas condiciones llevan a un rápido incremento en la actividad del agua del ambiente externo conduciendo a una masiva entrada de agua dentro de la célula, lo que requiere que el organismo reaccione rápidamente para evitar la lisis celular. Los organismos han desarrollado una serie de mecanismos para contrarrestar los efectos potencialmente perjudiciales del estrés hipo-osmótico, los cuales consisten básicamente en la salida de agua y solutos de la célula (Sleator and Hill 2002).

2.6.1.1. Salida de agua

Por muchos años se ha asumido que la permeabilidad selectiva de la bicapa lipídica era suficiente para permitir el rápido equilibrio de agua durante cambios en la osmolalidad del medio, pero se ha reportado que los organismos poseen acuaporinas (Sleator and Hill 2002). Las acuaporinas son una familia de proteínas pequeñas integrales de membrana que están involucradas en el transporte de agua a través de los compartimientos celulares. La estructura de estas proteínas consta de seis hélices transmembranales que dejan una estrecha abertura en su interior por la que pueden pasar moléculas de agua (Verkman 2013). El control de la entrada y salida de agua mediado por las acuaporinas tiene el objetivo de aliviar el estrés causado por el incremento de la actividad del agua sin disipar el potencial transmembranal (Sleator and Hill 2002).

2.6.1.2. Salida de solutos

La principal ruta de la liberación de solutos del citoplasma para una rápida reducción de la presión de turgencia durante la transición de un medio de alta a baja osmolalidad son los canales mecanosensitivos. Los canales mecanosensitivos son proteínas de membrana

encontradas en las membranas celulares procariotas y eucariotas que detectan los cambios en tensión lateral en la bicapa de la membrana citoplasmática generado por el flujo rápido de agua dentro la célula (Reuter et al. 2014). Cuando los organismos están expuestos a una disminución repentina de la osmolalidad ocurre una rápida y masiva entrada de agua a la célula, que obliga al organismo a liberar sus solutos intracelulares como glicina, prolina y betaína, para evitar la lisis celular. La liberación de estos solutos está mediada por los canales mecanosensitivos que actúan como válvulas de emergencia osmóticamente activadas (Petrov et al. 2013).

Los canales mecanosensitivos se clasifican de acuerdo a su conductividad como pequeños (**MscS** por sus siglas en ingles *mechanosensitive channel of small conductance*) o grande (**MscL** por sus siglas en ingles *mechanosensitive channel of large conductance*). El canal MscS es una proteína pequeña compuesta de 286 residuos de aminoácidos, que es activada por tensión en la bicapa lipídica o por voltaje. En cuanto a la estructura tridimensional este canal es un heptámero formando un canal con 80 Å de diámetro y 120 Å de longitud, cada subunidad contiene tres dominios transmembranales (TM1, TM2, TM3) y con el N-terminal orientado hacia el periplasma y el C-terminal incrustado en el citoplasma. El dominio transmembranal TM3 es altamente conservado en este tipo de canales y tiene una función importante en la apertura del canal. El canal MscL es un pentámero cuya subunidades tienen dos dominios trasmembranales α hélice, dominios citoplasmáticos N- y C- terminal y un dominio central periplasmático (Perozo and Rees 2003).

El uso de canales mecanosensitivos en respuesta a una disminución de la osmolalidad del medio ha sido reportado en bacterias halotolerantes como *B. subtilis* (Hoffmann et al. 2008) y *E. coli* (Levina et al. 1999), en halófilos moderados como *C. glutamicum* (Nottebrock et al. 2003) y en la archaea halófila extrema *H. volcanii* (Le Dain et al. 1998). En el caso de organismos marinos como *S. tropica*, *S. arenicola* y *V. alginolyticus* se ha reportado la ausencia de estos canales indicando posiblemente su inhabilidad para sobrevivir cuando estos son transferidos a un medio de baja osmolalidad (Penn and Jensen 2012). Sin embargo, en un estudio realizado por Petrov et al. (2013) se identificó una canal mecanosensitivo homólogo al canal MscS de *E. coli* en la bacteria marina

Siliciabacter pomeroyi, el cual representa el primer canal mecanosensitivo identificado en bacterias marinas.

La expansión ocasionada por la entrada de agua a la célula genera un aumento de la tensión de la membrana que conduce a cambios conformacionales drásticos en la estructura de los canales mecanosensitivos. La apertura de estos canales mecanosensitivos involucra rearrreglos de las hélices implicada en la formación del poro, que son ocasionados por cambios en la tensión en la membrana (Booth 2014). Adicionalmente, estudios de mutagénesis dirigida en los canales MscS y MscL indican que la distribución particular de residuos hidrofóbicos en el extremo de los segmentos transmembranales de estos canales influye fuertemente en la probabilidad de apertura y por lo tanto la sensibilidad de MscS y MscL a la tensión de la membrana (Krämer 2010).

Los genes involucrados en la síntesis de los canales MscL y MscS son expresados constitutivamente, y se ha demostrado que su expresión no es osmoregulada. En el caso del canal MscL, su expresión es controlada por un único gen, *mscL*, mientras que en el canal MscS se ha demostrado que los genes *yggB* y *kefA* son requeridos para su actividad, ya que la delección de alguno de estos dos genes altera la respuesta del canal MscS durante una disminución repentina de la osmolalidad del medio (Haswell et al. 2011). En el estudio reportado por Stokes et al. (2003) se demostró que la síntesis del factor sigma Rpos (Rpos por sus siglas en inglés RNA polymerase, sigma S) es requerida para inducir la síntesis de los canales MscL y MscS.

El número de canales mecanosensitivos presentes en la membrana celular puede variar entre los organismos, algunos tienen un número limitado de canales mecanosensitivos, mientras que otros, como por ejemplo las especies de la clase α -*Proteobacteria*, tienen más de seis copias de canales MscS. Además, las múltiples copias de canales mecanosensitivos que se encuentran en la membrana tienen diferentes umbrales de tensión y conductividad con el fin de proporcionar un gradiente de respuestas. Por lo tanto, los canales mecanosensitivos más sensibles a la tensión, con menor conductividad (MscS), son la primera línea de defensa en respuesta a una disminución de la osmolalidad del medio, y amortiguan la apertura del canal MscL sólo hasta que sea

completamente necesario. Esta estrategia tendría la ventaja de la apertura de un poro sólo tan grande como sea necesario para proteger la célula de la ruptura, preservando al mismo tiempo tanto como sea posible los metabolitos celulares y los gradientes de membrana (Haswell et al. 2011).

2.6.2. Mecanismos de osmoadaptación en respuesta a un aumento de la osmolalidad externa

Cuando los organismos halófilos y halotolerantes experimentan en su hábitat un incremento de la osmolalidad, estos responden en tres fases: (i) deshidratación (pérdida de agua celular), (ii) ajuste de la composición de solventes citoplasmáticos y (iii) rehidratación y re-modelamiento celular. La rehidratación del citoplasma en respuesta a un aumento de la osmolalidad externa se logra mediante el incremento de la concentración interna de solutos (Wood 1999).

2.6.2.1. Acumulación de solutos inorgánicos – Estrategia *Salt-in*

El mecanismo *Salt-in*, inicialmente descubierto en miembros de la familia *Halobacteriaceae*, es considerado la típica estrategia de osmoadaptación de las archaeas halófilas extremas que habitan en ambientes hipersalinos, aunque también ha sido reportado en bacterias anaerobias fermentativas y homoacetogénicas del orden *Halanaerobiales* y en la bacteria halófila extrema *Salinibacter ruber* (Oren 2013a). Esta estrategia se basa en la acumulación de iones inorgánicos, principalmente K^+ y Cl^- , en el citoplasma hasta que la concentración de sal interna sea similar a la concentración de sal externa (Averhoff and Müller 2010). El mantenimiento de este balance osmótico a través de la membrana celular es el resultado de la acción cooperativa de diferentes bombas de iones y sistemas de transporte, los cuales incluyen extrusión de protones a través del transporte de electrones en la cadena respiratoria o extrusión mediada por la bacteriorodopsina o la halorodopsina con formación de ATP por la ATPasa que conduce a un flujo de entrada de H^+ , sistemas de antiporte sodio/protones, transporte de aminoácidos acoplada con entrada de sodio, sistemas uniporte de potasio conducido por el potencial de membrana y sistemas de transporte de Cl^- (independientes de luz) acoplados con la entrada de Na^+ (Figura 2) (Oren 1999).

La estrategia *Salt-in* tiene un costo energético relativamente bajo para los organismos halófilos que la usan, pero debido a la presencia de concentraciones molares altas de sal en el citoplasma, se requiere de una mayor adaptación de su maquinaria enzimática intracelular para asegurar la apropiada conformación y actividad de sus proteínas a altas salinidades. Esta adaptación de la maquinaria enzimática intracelular está relacionada con el exceso de residuos ácidos y el bajo contenido de residuos hidrofóbicos de las proteínas halófilas explicado anteriormente (Siglioccolo et al. 2011).

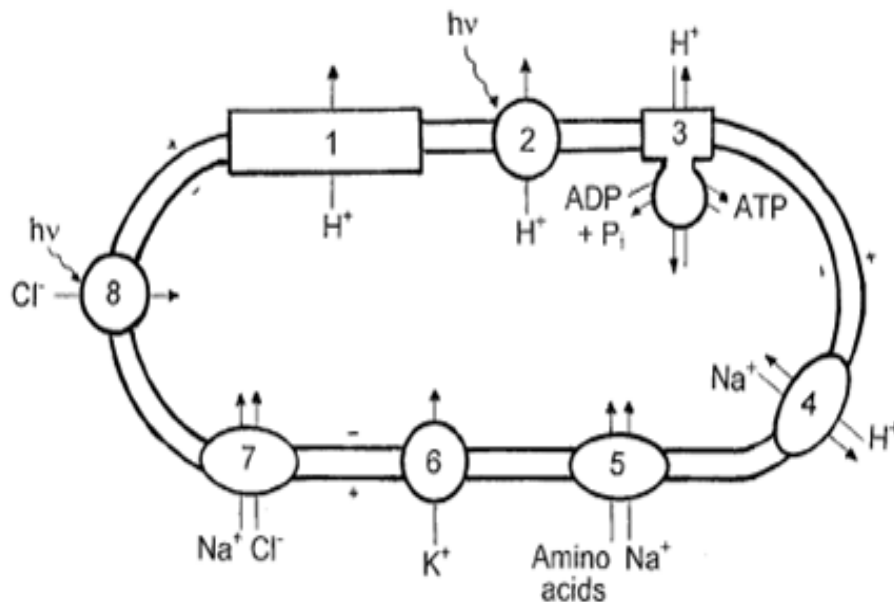


Figura 2. Movimiento de iones en las archaeas aerobias halófilas de la familia *Halobacteriaceae*. **1.** Eliminación de protones por la cadena respiratoria de transporte de electrones; **2.** Expulsión de protones mediada por la bacteriorodospina; **3.** Formación de ATP por la ATP sintasa; **4.** Bomba antiporter Na^+/H^+ ; **5.** Gradiente asociado al transporte de aminoácidos; **6.** Transporte de potasio generado por el potencial de membrana; **7.** Transporte de cloruro independiente de la luz, probablemente asociado al transporte de sodio; **8.** Halorodospina, una bomba que incorpora Cl^- a la célula gracias a luz. (Fuente: Oren 1999).

Debido a que la maquinaria enzimática de los organismos halófilos que emplean la estrategia *Salt-in* está adaptada para funcionar óptimamente en presencia de concentraciones altas intracelulares de sal, esta estrategia permite poca flexibilidad y

adaptabilidad a cambios en las condiciones ambientales. Además, lo explicado anteriormente refleja el uso restringido de esta estrategia solo para ciertos grupos de organismos halófilos que habitan en ambientes extremos con poca variabilidad en su concentración de sal.

2.6.2.2. Acumulación de solutos compatibles – *Salt-out*

▪ **Características y función de los solutos compatibles**

La mayoría de organismos halófilos y halotolerantes contrarresta el aumento de la osmolalidad mediante la acumulación de solutos compatibles. El uso de la estrategia *Salt-out* está ampliamente distribuido entre organismos halófilos y halotolerantes del dominio Bacteria y Eucarya, y también es utilizado por algunas arqueas metanogénicas. Este mecanismo está basado en la biosíntesis y/o acumulación de solutos osmóticos orgánicos y consiste en la exclusión de sales del citoplasma tanto como sea posible mediante la acumulación de solutos orgánicos para proporcionar el balance osmótico. Estos solutos orgánicos se denominan **solutos compatibles** y son pequeñas moléculas polares sintetizadas por el microorganismo o capturadas del medio exterior que actúan aumentando la fuerza iónica intracelular estabilizando macromoléculas celulares. Los solutos compatibles son moléculas de bajo peso molecular altamente solubles y no llevan una carga neta a pH fisiológico (7.0); además pueden alcanzar altas concentraciones intracelulares sin afectar las funciones celulares (replicación de DNA, interacciones DNA-proteínas) ni la maquinaria metabólica celular (Empadinhas and Da Costa 2008).

El uso de solutos orgánicos compatibles, cuya concentración interior puede ser regulada de acuerdo con la concentración de sal externa, requiere menos adaptaciones de la maquinaria enzimática intracelular en comparación con la acumulación de solutos inorgánicos. Por lo tanto, la estrategia *Salt-out* proporciona a los organismos que están sometidos a oscilaciones de la concentración de sal un alto grado de flexibilidad y la posibilidad de adaptarse a una amplia gama de concentraciones de sal, lo cual permite que los organismos que emplean esta estrategia estén presentes en diferentes tipos de ambientes salinos. Aunque el uso de esta estrategia requiere una menor adaptación de la

maquinaria enzimática intracelular, la acumulación de solutos compatibles en altas concentraciones es costosa energéticamente (Oren 2008).

Además de su función de mantener un equilibrio osmótico a través de la membrana celular, los solutos compatibles son efectivos estabilizadores de proteínas y otras moléculas citoplasmáticas. Ellos pueden actuar como protectores contra calor, desecación, congelación, descongelación y desnaturalizantes como la urea y la sal. La razón por la cual estos compuestos orgánicos son compatibles con el metabolismo y pueden actuar como estabilizadores, es explicado a nivel molecular por el modelo de exclusión preferencial (Oren 2008). Este modelo postula que los solutos compatibles tienen menos probabilidad de encontrarse en la superficie de las proteínas, lo que conduce a un aumento (preferencial) de la hidratación de las proteínas. Los solutos compatibles aumentan la tensión superficial del agua favoreciendo las interacciones agua-agua y agua-proteínas, las cuales generan una capa de hidratación alrededor de las proteínas. Esta capa de hidratación excluye a los solutos compatibles de la superficie de las proteínas y conduce a una estructura terciaria de las proteínas más compacta con un área superficial reducida. Por lo tanto, los solutos compatibles no interactúan directamente con la proteína, y los efectos estabilizadores son ocasionados por las modificaciones de las propiedades del agua (Lentzen and Schwarz 2006).

- **Distribución de los solutos compatibles**

La naturaleza de los solutos compatibles es diversa, pueden ser polioles (glicerol y arabitol), azúcares y derivados (sacarosa, trehalosa, glucosiglicerol), aminoácidos (prolina y glutamina), derivados de aminoácidos (N-acetilisina, N-acetilornitina), entre otros. Los solutos compatibles se clasifican en tres categorías químicas: (i) solutos zwitterionicos, (ii) solutos no cargados y (iii) solutos aniónicos (Roberts 2005). La estructura de estos solutos y su ocurrencia en organismos halófilos y halotolerantes se encuentra en las Tablas 2, 3 y 4.

✦ Solutos zwitterionicos

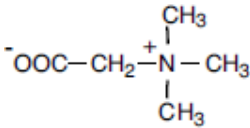
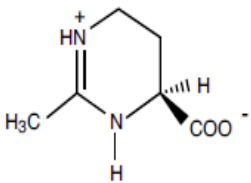
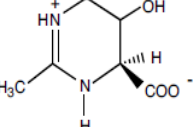
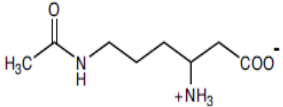
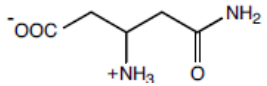
Los solutos zwitterionicos son compuestos polares derivados de aminoácidos que son eléctricamente neutros. Dentro de este tipo de solutos se encuentra la glicina betaina, la ectoína, hidroxiectoína, Nε-acetil-β-lisina y la β-glutamina (Tabla 2) (Roberts 2005).

La glicina betaína es una amina cuaternaria, encontrada en organismos halófilos y halotolerantes de diversas afiliaciones filogenéticas y con diversas características fisiológicas. En la mayoría de las células donde este soluto es acumulado, la glicina betaína o su precursor, la colina, es activamente transportada a partir de un medio complejo. En contraste con el gran número de organismos que transportan glicina betaína al interior de la célula para su uso como soluto compatible solo hay pocas bacterias (por ejemplo, *Actinopolyspora halophila* y *Halomonas elongata*) y metanógenos (por ejemplo, *Methanohalophilus portucalensis*) que son capaces de sintetizar la betaína (Empadinhas and Da Costa 2008).

La ectoína es una tetrahidropirimidina cíclica principalmente producida en presencia de altas concentraciones de sal y sintetizada por una amplia variedad de bacterias tanto halófilas como halotolerantes. Diferentes estudios han demostrado que la ectoína es el principal soluto compatible de bacterias quimioheterótrofas aerobias, e igualmente este es el principal soluto de bacterias aisladas de lagos hipersalinos alcalinos. Adicionalmente, la acumulación de este soluto compatible se ha encontrado en bacterias metilotróficas halófilas como *Methylophaga marina*, *M. terricola*, y *Methylophaga* sp. En el caso de la hidroxiectoína, una variación de la ectoína, se ha detectado en la bacteria halotolerante *Sporosarcina pasteurii* cuando ésta crece en un medio con una alta osmolalidad (Roberts 2005).

La acumulación de los solutos Nε-acetil-β-lisina y la β-glutamina se ha reportado principalmente en metanógenos. Estos compuestos proporcionan una excelente estrategia para producir solutos compatibles, ya que los β-aminoácidos no son incorporados dentro de otras proteínas o macromoléculas (Roberts 2005).

Tabla 2. Solutos compatibles zwitterionicos

Solutos zwitterionicos	Ocurrencia
<p>Betaína</p> 	<p><u>Halotolerantes:</u> <i>Thioalkalivibrio versutus</i>; <i>Actinopolyspora</i> sp. <u>Halófilos:</u> <i>Actinopolyspora halophila</i>; <i>Halorhodospira halochloris</i> <i>Methanohalophilus portucalensis</i> FDF1; <i>Methanosarcina thermophila</i>; <i>Synechococcus</i> sp. DUN 52</p>
<p>Ectoína</p> 	<p><u>Halotolerante:</u> <i>Sporosarcina pasteurii</i>; <i>Brevibacterium epidermidis</i>; <i>Thioalkalimicrobium aerophilum</i>; <i>Vibrio cholerae</i> y <i>V. costociola</i> <u>Halófilos:</u> <i>Chromohalobacter israelensis</i>; <i>Chromohalobacter salexigens</i>; <i>Halorhodospira halochloris</i>; <i>Halomonas elongata</i>, <i>H. variabilis</i> y otros organismos relacionados filogeneticamente; <i>Methylarcula marina</i> y <i>M. terricola</i>; <i>Methylophaga alcalica</i> and <i>Methylophaga natronic</i>.</p>
<p>Hidroxiectoína</p> 	<p><u>Halófilos:</u> <i>Halomonas elongata</i>; <i>Nocardiopsis halophila</i></p>
<p>Nε-acetil-β-lisina</p> 	<p><u>Halotolerante:</u> <i>Methanosarcina thermophila</i>; <i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i>; <i>Methanosarcina mazei</i> Gö1 <u>Halófilo:</u> <i>Methanohalophilus portucalensis</i> FDF1; <i>Methanohalophilus</i> Z7302</p>
<p>β-glutamina</p> 	<p><u>Halófilo:</u> <i>Methanohalophilus portucalensis</i> FDF1</p>

Fuente: Roberts 2005

✦ Solutos no cargados

Pocas moléculas que son polares pero que carecen de una carga formal han sido identificadas como solutos compatibles en bacterias halófilas. Este tipo de solutos, está principalmente presente en eucariotas. Por ejemplo, el glicerol es un soluto compatible frecuente en algas marinas como *Dunalliella*. La acumulación de glicerol es también

característica de levaduras halotolerantes como *Debaryomyces hansenii* y *Hortea werneckii*. De otra parte, el *Myo*-inositol, otro poliol, es usado como un soluto compatible en varios eucariotes. Ninguno de estos solutos polares no cargados ha sido identificado como un soluto compatible en bacterias o archaeas halófilas (Roberts 2005).

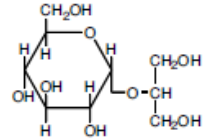
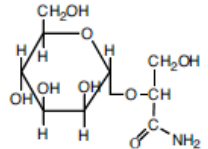
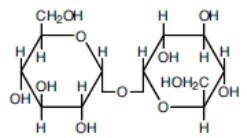
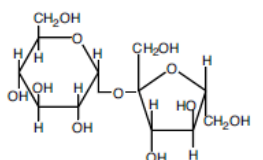
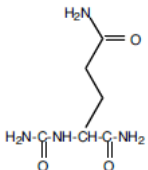
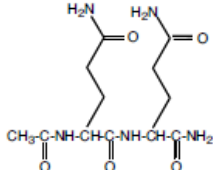
Los pocos solutos compatibles no cargados que son usados por bacterias y archaeas halotolerantes incluyen varios carbohidratos y algunos aminoácidos o dipéptidos modificados para neutralizar todos los grupos cargados (Tabla 3). Los azúcares derivados (azúcares que forman un enlace glicosídico con moléculas neutras pequeñas, como glicerol o gliceramida) como α -glucosilglicerol y α -manosilgliceramida han sido detectados en cianobacterias marinas y de agua dulce y en bacterias fototróficas. El α -Glucosilglicerol es acumulado por especies del género *Stenotrophomonas*. La trehalosa, un disacárido formado por dos moléculas de glucosa, está distribuida en una amplia variedad de organismos de los tres dominios. La acumulación de este soluto compatible es preferida en concentraciones de NaCl externa menores a 0.6 M. De otra parte, la sacarosa que es sintetizada en cianobacterias y proteobacterias, puede ser acumulada por algunos organismos halófilos y halotolerantes, y este soluto puede mejorar el crecimiento en presencia de altas concentraciones de NaCl (Empadinhas and Da Costa 2008).

En cuanto a péptidos y aminoácidos no cargados se han identificado dos solutos compatibles: N- α -carbamoil-L-glutamina 1-amida y N-acetilglutaminilglutamina amida. El - α -carbamoil-L-glutamina 1-amida es acumulado por la bacteria fototrófica halófila *Ectothiorhodospira marismortui* y el N-acetilglutaminilglutamina amida es sintetizado por varias bacterias halófilas purpuras del azufre (Roberts 2005).

✦ Solutos aniónicos

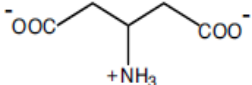
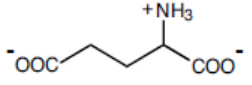
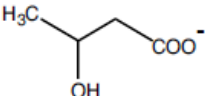
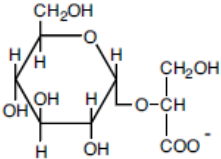
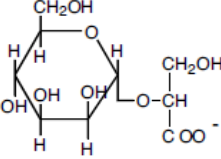
Los solutos cargados negativamente pueden contribuir a equilibrar la alta concentración intracelular de K^+ . Dentro de este tipo de solutos se encuentra el β -glutamato, β -hidroxibutirato y carbohidratos aniónicos (Tabla 4).

Tabla 3. Solutos compatibles no cargados

Solutos no cargados	Ocurrencia
<p>α-Glucosilglicerol</p> 	<p><u>Halotolerante:</u> cianobacterias marinas y de agua dulce como <i>Synechocystis</i> sp y <i>Microcystis firma</i>. Bacterias fototróficas como <i>Rhodovulum sulfidophilum</i>; <i>Pseudomonas mendocina</i> y <i>P. pseudoalcaligenes</i>; <i>Stenotrophomonas</i></p>
<p>α-manosilgliceramida</p> 	<p><u>Halotolerante:</u> <i>Rhodothermus marinus</i></p>
<p>Trehalosa</p> 	<p><u>Halotolerante:</u> <i>Pyrobaculum aerophilum</i>; <i>Sulfolobus solfataricus</i> y <i>S. ambivalens</i>; <i>Thermoproteus tenax</i>; <i>Thermoplasma acidophilum</i></p>
<p>Sucrosa</p> 	<p><u>Halotolerante:</u> Cianobacterias como <i>Synechocystis</i> spp. y <i>Anabaena</i> spp. y algunas proteobacterias</p>
<p>N-α-carbamoil-L-glutamina 1-amida</p> 	<p><u>Halófilo:</u> <i>Ectothiorhodospira mobilis</i></p>
<p>N-acetilglutaminilglutamina amida</p> 	<p><u>Halotolerante:</u> <i>Sinorhizobium meliloti</i>; <i>Rhizobium leguminosarum</i>; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <u>Halófilo:</u> Bacterias purpuras del azufre</p>

Fuente: Roberts 2005

Tabla 4. Solutos compatibles aniónicos

Soluto aniónico	Ocurrencia
<p>β-glutamato</p> 	<p><u>Halotolerante:</u> <i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i>; <i>Methanocaldococcus jannaschii</i>; <i>Methanotorris igneus</i> <u>Halófilo:</u> <i>Nocardiopsis halophila</i></p>
<p>α-glutamato</p> 	<p>Muchas bacterias halotolerantes y metanógenos <u>Halófilo:</u> <i>Halomonas elongata</i>; <i>Methanohalophilus portucalensis</i>; <i>Halobacterium</i> sp. NRC-1 y <i>H. salinarum</i></p>
<p>Hidroxi-butilirato</p> 	<p><u>Halotolerante:</u> <i>Photobacterium profundum</i></p>
<p>α-glucosilglicerato</p> 	<p><u>Halotolerante:</u> <i>Agmenellum quadruplicatum</i>; <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <u>Halófilo:</u> <i>Methanohalophilus portucalensis</i></p>
<p>α-manosilglicerato</p> 	<p><u>Halotolerante:</u> <i>Methanothermus fervidus</i>; <i>Pyrococcus furiosus</i>; <i>Rhodothermus marinus</i></p>

Fuente: Roberts 2005

Los metanógenos tienden a acumular β -glutamato así como α -glutamato para mantener el balance osmótico. En *Methanothermococcus thermolithotrophicus*, los niveles tanto de β - como α -glutamato incrementan con el incremento de la concentración externa de NaCl. Sin embargo, la acumulación de glutamato tiene un umbral, ya que estos solutos compatibles se acumulan solo cuando la concentración de NaCl es menor a 1 M. En cuanto a los poli- β -hidroxi-butiliratos, normalmente usados como reservorios de carbono en la célula, han sido detectados en concentraciones moderadas de NaCl (100-150 g·l⁻¹) en organismos como *Methylococcus marina* y *Methylococcus terricola* y en la bacteria marina *Photobacterium profundum* (Roberts 2005).

En bacterias, altas concentraciones intracelulares de carbohidratos cargados negativamente son poco comunes, solo dos solutos de este tipo han sido detectados: α -glucosilglicerato y α -manosilglicerato. El α -manosilglicerato es acumulado por varias especies del género *Rhodothermus* en altas concentraciones durante la fase exponencial y disminuye abruptamente cuando las células entran en fase estacionaria. El α -glucosilglicerato ha sido encontrado en *Methanohalophilus portucalensis* y en bacterias halotolerantes como *Agmenellum quadruplicatum* y *Stenotrophomonas maltophilia* (Roberts 2005).

Existen diferentes tipos de solutos compatibles usados para mantener el balance osmótico en organismos halófilos y halotolerantes, y cada organismo tiene solutos compatibles característicos y rutas de osmoadaptación específicas (Oren 2008). El uso de solutos compatibles como aminoácidos, azúcares y sus derivados, es una estrategia ampliamente usada por organismos halófilos y halotolerantes mientras que otros solutos compatibles como N ϵ -acetil- β -lisina, β -glutamina, glicerol, entre otros, presentan una distribución más restringida (Empadinhas and Da Costa 2008).

- Síntesis de solutos compatibles

Los solutos orgánicos compatibles sintetizados predominantes son los derivados de aminoácidos, glicina betaína y ectoína. Los organismos halófilos presentan dos rutas de síntesis de glicina betaína: (i) la ruta oxidativa de la colina que esta mediada por las enzimas colina monooxigenasa y betaína aldehído dehidrogenasa y (ii) la metilación sucesiva de la glicina donde las enzimas glicina sarcosina metiltransferasa y sarcosina dimetilglicina metiltransferasa transfieren el grupo metilo del S-adenosilmetionina a dos diferentes aminas (Roberts 2005). Aunque la acumulación de glicina betaína se da principalmente por su captura del medio exterior, su síntesis ha sido reportada en el halófilo extremo *Actinopolyspora halophila* (Nyyssölä and Leisola 2001), en halófilos moderados como *H. elongata* (Cánovas et al. 2000), *H. dabanensis* (Gu et al. 2008), en la archaea metanogénica *Methanohalophilus portucalensis* (Lai and Lai 2011) y en las bacterias halotolerantes *B. subtilis* (Boch et al. 1996) y *P. aeruginosa* (Diab et al. 2006).

En cuanto a la biosíntesis de ectoína, esta procede en tres pasos enzimáticos donde actúan las enzimas ácido diaminobutírico acetiltransferasa (DABA), DABA aminotransferasa y la ectoína sintasa, y el diaminobutirato y N-γ-acetildiaminobutirato como intermediarios (Roberts 2005). La síntesis de este soluto compatible ha sido estudiada en *H. elongata*, *Chromohalobacter salexigens* y *Methylomicrobium alcaliphilum* (Calderón et al. 2004; Reshetnikov et al. 2011). La síntesis de este soluto compatible es llevada a cabo por las proteínas codificadas por los genes *ectABC*. El gen *ectA* codifica para el ácido diaminobutirico acetiltransferasa, *ectB* codifica para la ácido diaminobutirico aminotransferasa y *ectC* codifica para la ectoína sintasa. Estudios realizados para determinar la regulación de la síntesis de ectoína han demostrado que hay una correlación entre los niveles de mRNA del gen *ectABC* y la concentración de ectoína encontrada. Mientras la concentración de transcritos de ectoína fueron bajas en presencia de bajas salinidades (0.4-1.5 M), estos incrementaron en presencia de altas salinidades (2.0-3.0 M), indicando que la síntesis de ectoína es osmoregulada (Saum and Muller 2008).

Otros solutos compatibles como trehalosa, glutamina y glutamato también son sintetizados *de novo* por algunos organismos. En algunos organismos halotolerantes la trehalosa es acumulada vía síntesis *de novo* como su soluto compatible predominante en un medio mínimo de nutrientes y en ausencia de solutos compatibles exógenos como glicina betaína o prolina (Kempf and Bremer 1998). La ruta más común para la síntesis de la trehalosa es la ruta TPS (trehalosa-6-fosfato sintasa)/TPP (trehalosa-6-fosfato fosfatasa). Esta ruta involucra la enzima trehalosa-6-fosfato sintasa, que cataliza la transferencia de glucosa a partir de la UDP-glucosa a la glucosa-6-fosfato, conduciendo a la formación de la trehalosa-6-fosfato. En el segundo paso la trehalosa-6-fosfato fosfatasa cataliza la hidrólisis de un grupo fosfato del intermediario disacárido para generar la trehalosa (Reina-Bueno et al. 2012). El uso de esta ruta ha sido reportado en las bacterias halófilas moderadas *C. glutamicum* (Empadinhas and Da Costa 2008) y *C. salexigens* (Reina-Bueno et al. 2012) así como en las bacterias halotolerantes *E. coli* y *S. typhimurium* (Kempf and Bremer 1998).

Para la biosíntesis de glutamina y glutamato se conocen tres reacciones enzimáticas. La biosíntesis de la glutamina es sintetizada por acción de la glutamina sintasa mientras que

biosíntesis de glutamato puede estar acompañada por la acción de la glutamato sintasa o por la acción de la glutamato deshidrogenasa (Saum and Muller 2008). Las enzimas involucradas en la síntesis de β -glutamina han sido detectadas en la archaea metanógena *Methanohalophilus portucalensis* (Roberts 2005), mientras que la síntesis de glutamato ha sido reportada en la bacteria halófila moderada *Halobacillus halophilus* en concentraciones cercanas a 1 M NaCl (Saum et al. 2006).

A pesar del costo energético que representa la síntesis *de novo* de solutos compatibles, algunos organismos halófilos y halotolerantes sintetizan solutos como glicina betaína, ectoína, trehalosa, glutamina y glutamato, cuando estos no están libremente disponibles en el ambiente o si los que están presentes no cumplen con los requisitos bioquímicos del organismo.

- Captura y transporte de solutos compatibles

La captura de solutos compatibles del ambiente es energéticamente más favorable en comparación con la síntesis *de novo* y produce una respuesta mucho más rápida. Muchos organismos tienen sistemas de captura para solutos compatibles que ellos son incapaces de sintetizar, lo cual proporciona una ventaja selectiva para enfrentar oscilaciones osmóticas. Los sistemas de transporte de solutos compatibles están ampliamente distribuidos en el dominio Bacteria. Particularmente, se ha observado que las bacterias heterotróficas prefieren la captura de solutos compatibles sobre su biosíntesis (Kunte et al. 2002). El nivel de actividad de los sistemas de transporte de solutos compatibles es controlado osmóticamente, y la expresión de los genes que codifican para estos sistemas de transporte es a menudo sobre-regulada en respuesta a la osmolalidad del medio. Generalmente, la expresión de los genes es rápidamente inducida después de que las células experimentan un aumento repentino de la salinidad donde su actividad es ajustada al nivel de estrés osmótico prevalente (Ziegler et al. 2010).

En ecosistemas naturales, los solutos compatibles son encontrados en muy bajas concentraciones, generalmente en rangos de μM a nM . Por lo tanto, los transportadores de solutos compatibles generalmente presentan una alta afinidad para sus sustratos con valores de K_m (constante de Michaelis-Menten) en el rango micro o nanomolar y su

capacidad se orienta a permitir la acumulación de solutos compatibles en un alto nivel (Ziegler et al. 2010). Los parámetros cinéticos para la captura de un soluto compatible en particular determinan en gran medida su eficacia, ya que una alta velocidad de reacción máxima (V_{max}) y una alta afinidad, es decir valores bajos de K_m , conducen a una rápida y eficiente captura de solutos compatibles y representa para los organismos halófilos y halotolerantes una ventaja competitiva para la captura de estos solutos en sus hábitats naturales (Forrest et al. 2011). Los organismos poseen con frecuencia varios sistemas de transporte de solutos compatibles, y algunos de estos transportadores presentan una amplia especificidad de sustrato para que las células puedan tomar ventaja de un espectro de solutos compatibles que pueden estar presentes en sus hábitats (Kempf and Bremer 1998).

Hay cuatro sistemas de transporte de solutos compatibles que han sido estudiados en detalle utilizando aproximaciones bioquímicas, biofísicas y genéticas con el propósito de comprender los mecanismos y la interacción de sus funciones transportadoras y osmoregulatorias. Estos sistemas son: los sistemas ProP y ProU de *E. coli*, el sistema OpuA de *Lactobacillus lactis* y el sistema BetP de *C. glutamicum*. Estos transportadores no solo representan diferentes familias de transportadores, ellos son también energizados mediante diferentes mecanismos (Krämer 2010). El sistema ProP pertenece a la familia de transportadores MFS (MFS por sus siglas en inglés *major facilitator superfamily*); esta familia es uno de los grupos más grandes de transportadores activos secundarios que incluye sistemas uniporte, simporte y antiporte, que comprende proteínas de transporte membranales que facilitan el movimiento de pequeños solutos a través de la membrana celular en respuesta a gradientes iónicos quimiosmóticos. Los compuestos transportados por las permeasas MFS incluyen azúcares simples, oligosacáridos, aminoácidos, nucleósidos, y una gran variedad de cationes y aniones orgánicos e inorgánicos (Yan 2014). De otra parte, los sistemas OpuA y ProU son miembros de la superfamilia de transportadores ABC (ABC por sus siglas en inglés *ATP-binding cassette transporters*), los transportadores ABC son proteínas transmembranales que utilizan la energía del ATP para transportar un sustrato específico o grupos de sustratos a través de la membrana celular. Los sustratos transportados por este transportador pueden ser iones, azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, péptidos, polisacáridos o proteínas (Kos and Ford 2009). Finalmente, el sistema BetP que hace parte de la familia de transportadores BCCT (BCCT

por sus siglas en ingles *Betaine/Carnitine/Choline Transporters*), comprende una familia de proteínas de transporte que son específicas para compuestos que contienen un átomo de nitrógeno cuaternario. Los sistemas de transporte BCCT contienen 12 regiones transmembranales que son energizadas por simporte de sodio o protones (Ziegler et al. 2010).

El sistema ProP es un sistema de transporte conducido por simporte de H⁺, que media el transporte de una amplia variedad de solutos compatibles estructuralmente relacionados como prolina, ectoína y glicina betaína. Este sistema de transporte contiene 12 dominios transmembranales, una característica común en sistemas de transporte secundarios, y además se caracteriza por la presencia de un bucle o *loop* central hidrofílico y una extensión C-terminal que forman una α -hélice superenrollada, y que tiene una función importante en la activación osmótica del sistema ProP (Kempf and Bremer 1998). La captura de solutos compatibles mediada por el sistema ProP es mejorada en un medio que contiene una alta osmolalidad como resultado del incremento de la expresión del gen *proP*. La transcripción de *proP* está dirigida por dos promotores P1 y P2, los cuales son activados por un incremento de la salinidad del medio. El transporte de solutos compatibles mediado por este sistema de transporte, el cual presenta valores de K_m y V_{max} para la captura de glicina betaína de 44 μM y 37 $nmol\ min^{-1}\ (mg\ de\ prote\acute{i}na)^{-1}$, respectivamente, es mejorado por una combinación de la inducción transcripcional de *proP* y la estimulación de la actividad del transportador ProP en respuesta a un incremento de la salinidad (Sleator and Hill 2002).

El sistema ProU es un sistema de transporte dependiente de una proteína de unión a sustrato, la cual reconoce, une y libera el sustrato a los componentes de la membrana interna del transportador ABC. Este sistema presenta una amplia especificidad de sustrato para solutos compatibles pero presenta una clara preferencia para ciertos compuestos, principalmente glicina betaína y prolina betaína. El transporte de estos solutos compatibles presenta una V_{max} de 12 $nmol\ min^{-1}\ (mg\ de\ prote\acute{i}na)^{-1}$ y una K_m de 1.4 μM para la glicina betaína y de 5.2 μM para la prolina betaína (Sleator and Hill 2002). Los componentes del sistema ProU son codificados por un operón que contiene tres genes: *proV*, *proW* y *proX*, los cuales codifican para dos proteínas de unión a membrana citoplasmáticas, ProV y ProW, y la proteína de unión periplasmática ProX. La expresión

de los genes estructurales *proV*, *proW* y *proX* aumenta significativamente en condiciones hiperosmóticas, permitiendo de este modo el aumento de la captura de solutos compatibles en ambientes de alta osmolalidad (Breed et al. 2001). Un repentino aumento de la osmolalidad del medio conduce a un rápido incremento de la transcripción de los genes *proV*, *proW* y *proX*. Este tipo de regulación de genes refleja la función fisiológica de ProU ya que permite ajustar el número de transportadores ProU con el grado de estrés osmótico para asegurar niveles adecuados de adquisición del soluto compatible. En consecuencia la expresión del sistema ProU se mantiene a niveles elevados durante el tiempo que el estímulo osmótico persista (Kempf and Bremer 1998).

OpuA es un transportador activado por un cambio en la fuerza iónica del citoplasma como consecuencia del incremento de la osmolalidad en medio circundante. Además de la estructura general de un transportador ABC, cada una de las subunidades de este transportador lleva un dominio CBS (CBS por sus siglas en inglés, *cystathionine-beta-synthase*). Los dominios CBS están compuestos del patrón de estructura secundaria beta-alfa-beta-beta-alfa que está plegado dentro de una estructura globular terciaria que contiene tres β -laminas antiparalelas y dos α -hélice en un lado. Estos dominios regulan la actividad de un transportador en respuesta a la unión de moléculas con grupos adenosil como AMP o ATP. Teniendo en cuenta que estos dominios son frecuentemente encontrados en proteínas que tienen una función regulatoria se sugirió que su presencia en el transportador OpuA puede tener una función importante en su osmoregulación (Krämer 2010). El sistema OpuA comprende tres componentes: OpuAA, una ATPasa; OpuAB, una proteína integral de membrana; y OpuAC, una proteína de unión a sustrato extracelular. Este sistema de transporte es inducido en una condición de crecimiento de alta osmolalidad, donde la transcripción del gen *opuA* es controlada por dos promotores, el promotor *opuA* P-1 el cual es omoregulado y el promotor *opuA* P-2 que no responde a estímulos osmóticos. Con valores de K_m y V_{max} para la captura de glicina betaína de 2.4 μM y 282 $\text{nmol min}^{-1} (\text{mg de proteína})^{-1}$, respectivamente, este representa el transportador de glicina betaína con mayor afinidad en *B. subtilis* (Sleator and Hill 2002).

El sistema BetP es un transportador específico para glicina betaína que acopla su captura al potencial electroquímico del Na^+ mediante el co-transporte de dos iones Na^+ , que conduce a una acumulación de glicina betaína superior a 4×10^6 (in/ex) (Poolman et al.

2004). Este sistema es una proteína integral de membrana de 594 residuos de aminoácidos, se puede dividir en una parte central de 12 segmentos transmembranales así como dos dominios N- y C- terminal hidrofílicos de aproximadamente 50 a 55 aminoácidos que están expuestos en el citoplasma y que tiene una función importante como osmosensores (Krämer 2009). La expresión del gen *betP* depende de la osmolalidad del medio, donde un incremento de la tasa máxima de captura de glicina betaína se ha observado cuando las células de *C. glutamicum* son cultivadas en un medio de alta osmolalidad (Wood et al. 2001).

Además de su actividad catalítica (captura de glicina betaína acoplada al transporte de Na⁺), el sistema BetP funciona como osmosensor y como osmoregulador. Existen dos argumentos que demuestran que el sistema BetP es un osmosensor para detectar las señales relacionadas con estrés osmótico y un osmoregulador que adapta su actividad catalítica de captura de glicina betaína en la medida del estrés osmótico generado. Primero, se ha demostrado que el sistema de BetP de *C. glutamicum* retiene completamente sus propiedades regulatorias cuando es expresado heterológicamente en células de *E. coli*. Segundo, después de la expresión en membranas de *E. coli*, la solubilización, purificación y reconstitución en proteoliposomas, el sistema BetP es funcionalmente activo en términos cinéticos y es totalmente competente en su respuesta regulatoria a estrés osmótico (Krämer 2009).

La activación de BetP es probablemente regulada a través de transiciones entre diferentes estados conformacionales y funcionales: inactivo o activo. Un incremento de la osmolalidad del medio podría cambiar el balance hacia un estado activo, mientras que una disminución de la osmolalidad favorece la conformación inactiva de BetP. Por lo tanto, la función catalítica de BetP puede ser descrita mediante un esquema cinético que comprende dos ciclos funcionales: (i) el ciclo catalítico del transporte de glicina betaína que corresponde al de un transportador secundario. Este incluye un cambio conformacional entre la cara exterior e interior de las moléculas transportadoras y un ciclo entre unión y liberación de sustrato. El recambio en este ciclo depende de la disponibilidad de glicina betaína y de la fuerza conductora energética. (ii) El balance entre los ciclos de regulación de los dos estados de BetP depende de ciertos estímulos, algunos de ellos están relacionados con el estrés osmótico (Ziegler et al. 2010).

Los organismos halófilos y halotolerantes que acumulan solutos compatibles a partir de la captura del medio, utilizan sistemas de transporte de alta especificidad y afinidad, que son expresados en respuesta a un incremento de la osmolalidad. Adicionalmente, estos sistemas de transporte pueden actuar como osmosensores que les permiten censar rápidamente los cambios de osmolalidad de medio. Estas características particulares que presentan los sistemas de transporte de solutos compatibles, genera una respuesta fisiológica instantánea, que permite a los organismos halófilos y halotolerantes acumular diferentes tipos de solutos compatibles para evitar la pérdida de agua como consecuencia del incremento de la salinidad (Ziegler et al. 2010). El mecanismo de percepción y transducción de señales en respuesta a cambios de osmolalidad es explicado a continuación.

2.7. PERCEPCIÓN Y TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN RESPUESTA A CAMBIOS DE LA OSMOLALIDAD DEL MEDIO

Los organismos responden a cambios de osmolalidad en dos diferentes niveles de regulación: a nivel de actividad de proteína, como una respuesta inmediata, y a nivel de transcripción de genes en una escala de tiempo más amplia. Los organismos han desarrollado una serie de mecanismos con el fin de transducir la información procedente de estímulos físicos externos en el interior de la célula, conduciendo finalmente a dos tipos de respuesta. Los mecanismos más importantes y mejor estudiados responsables de la transferencia de información transmembranal son la histidina quinasa unidas a membrana, los sistemas reguladores de dos componentes y los quimiorreceptores unidos a membrana (Krämer 2010).

Los sistemas de transducción de señales de dos componentes están compuestos de una histidina quinasa unida a membrana, que es el sensor responsable de la percepción de estímulos, y un regulador soluble, localizado en el citoplasma, el cual transmite la señal a las moléculas blanco. El estímulo físico es percibido por un dominio de entrada de la histidina quinasa, que es representado con mayor frecuencia por una región de bucles hidrofílicos que conectan los dos dominios transmembranales, el dominio emisor y el dominio receptor. La percepción de estímulos conduce a un cambio conformacional del sensor quinasa y causa que el dominio emisor se autofosforile en un residuo de histidina.

El siguiente paso es una fosfotransferencia intermolecular a un residuo de aspartato del dominio receptor, el segundo componente del sistema, resultando en un cambio conformacional en el dominio de salida. Al cambiar su conformación, este dominio finalmente es capaz de interactuar con moléculas diana, lo cual significa la unión directa a un sitio de unión regulatorio en el ADN, alterando de este modo la transcripción de los genes blanco (Capra and Laub 2012).

En el caso del estrés osmótico, los sistemas de transducción de señales que han sido elucidados en detalle son los sistemas reguladores de respuesta histidina quinasa KdpD/KdpE y EnvZ/OmpR en *E. coli* y MtrA/MtrB en *C. glutamicum*. La regulación osmótica del sistema KdpD (histidina quinasa)/KdpE (regulador de la respuesta) ocurre tanto a nivel transcripcional como a nivel de actividad; sin embargo, más se conoce sobre la regulación transcripcional de los genes *kdp*. El sistema KdpD/KdpE responde a limitación de K⁺ y a estrés osmótico. La inducción del operón *kdpFABCDE*, que codifica para el sistema KdpD/KdpE, puede ser desencadenada por un incremento de la presión osmótica (> 0.2 mPa). La turgencia celular es la principal causa de la activación del sistema KdpD/KdpE. Una disminución de la presión de turgencia induce la autofosforilación de la quinasa KdpD, la cual transfiere el grupo fosforilo a un residuo de aspartato de KdpE. El KdpE fosforilado activa la expresión del operón *kdpFABCDE*. La transcripción de este operón es solo inducida después de un aumento repentino de osmolalidad (Sleator and Hill 2002).

El sistema EnvZ/OmpR regula la expresión de los genes que codifican las dos porinas de la membrana externa, ompC y ompF, en dependencia de la osmolalidad externa. No se ha elucidado hasta ahora el estímulo físico que regula la expresión del sistema EnvZ/OmpR. Sin embargo, el truncamiento del dominio hidrofílico periplasmático de EnvZ no afecta el osmo-detección, indicando que el estímulo se origina en la membrana o en el espacio periplasmático (Krämer 2010).

El sistema MtrA/MtrB regula la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de pared celular y los genes de tres transportadores responsables de la acumulación de solutos compatibles *betP*, *proP*, y *lcoP*. A partir del análisis de los estímulos de este sistema de transducción de señales en un sistema reconstituido en proteoliposomas se determinó

que la activación de la regulación de este sistema está relacionada con estrés osmótico (concentración citoplasmática de K⁺) (Krämer 2009).

La respuesta de los organismos halófilos y halotolerantes a cambios en la osmolalidad incluye rutas complejas de transducción de señales mediadas por interacciones proteína-proteína, procesos a nivel de membrana y cambios conformacionales de los sistemas involucrados en la percepción de señales. Estos sistemas de percepción y transducción de señales permite a estos organismos censar cambios en la salinidad de su hábitat y coordinar la respuesta más apropiada.

La respuesta celular a una condición de estrés osmótico depende de la expresión coordinada de genes que alteran diferentes procesos celulares (como división celular, metabolismo celular, composición de la membrana, transporte, entre otros) y actúan en conjunto para mejorar la tolerancia a las condiciones impuestas por los cambios de osmolalidad del medio. Por lo tanto, la identificación de los genes involucrados en la respuesta celular a estrés osmótico y sus redes regulatorias es esencial para determinar el comportamiento de los organismos halófilos y halotolerantes en sus hábitats naturales (Joo and Kim 2005).

2.8. ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS MICROBIANOS DE OSMOADAPTACIÓN A PARTIR DE ESTUDIOS PROTEÓMICOS

Las diferentes aproximaciones Omicas han proporcionado información valiosa para la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta al estrés osmótico. Dentro de estas aproximaciones se encuentra la **proteómica** que hace referencia al estudio a gran escala de las proteínas de un organismo o un tejido. El proteoma representa el conjunto de proteínas que son expresadas en un organismo o un tejido bajo condiciones determinadas, y por lo tanto representa el complemento funcional del genoma. La proteómica se extiende más allá de los análisis genómicos, los cuales describen la capacidad teórica de un organismo, al proporcionar una medida directa de qué proteínas son sintetizadas, cuando son sintetizadas y cuál es su abundancia celular (Burg et al. 2011). Por estas razones, la proteómica es una herramienta apropiada para detectar los cambios en los patrones de expresión de proteínas de los organismos

halófilos y halotolerantes bajo condiciones cambiantes de osmolalidad (Joo and Kim 2005).

Teniendo en cuenta que la respuesta celular de los organismos frente a cambios de la salinidad externa implica una reprogramación de su metabolismo y estructura celular, el primer paso para comprender la complejidad de la regulación de los mecanismos de osmoadaptación podría ser el análisis de los perfiles de expresión. Por lo tanto, los mecanismos de osmoadaptación han sido mejor estudiado a nivel de proteínas que a nivel de genoma. Estos mecanismos han sido estudiados principalmente en los halófilos extremos *H. salinarum* (Leuko et al. 2009) y *H. volcanii* (Bidle et al. 2008), y en los halófilos moderados *H. dabanensis* (Feng et al. 2007), *H. elongata* (Ceylan et al. 2012) y *C. glutamicum* (Fränzel et al. 2010), donde se ha evaluado su respuesta molecular a cambios de la salinidad externa.

H. salinarum es una archaea halófila extrema aislada de ambientes marinos que requiere una concentración de NaCl superior a 3.0 M para su óptimo crecimiento. En *H. salinarum*, Choi et al. (2005) analizaron la expresión diferencial de sus proteínas bajo diferentes concentraciones de NaCl empleando la técnica de electroforesis bidimensional. Se identificaron 29 proteínas diferenciales, las cuales presentaron un punto isoeléctrico entre 4.2 y 4.5, involucradas con regulación transcripcional. De otra parte, en un estudio realizado por Leuko et al (2008), empleando la misma técnica, se evaluó el perfil de expresión de proteínas de *H. salinarum* en respuesta a cambios de la salinidad externa (2.6 y 5.4 M), y la respuesta más drástica se observó cuando las células de *H. salinarum* se cultivaron a 2.6 M (disminución de la salinidad con respecto a su salinidad óptima de crecimiento), con una sub-expresión de proteínas involucradas con procesos de traducción, y una sobre-expresión de chaperonas y proteasas así como proteínas involucradas en la oxidación de ácidos grasos. Los estudios proteómicos realizados en esta archaea halófila extrema permitieron determinar que posiblemente las proteínas de estrés general tienen una función clave en la respuesta celular frente a una disminución de la osmolalidad.

H. volcanii es una archaea halófila extrema aislada de un ambiente hipersalino que presenta un rango de salinidad de crecimiento entre 1.5 y 4.0 M. Se realizó un estudio proteómico para determinar los efectos moleculares del estrés osmótico sobre este

microorganismo, donde las células de *H. volcanii* se cultivaron en las concentraciones de NaCl óptima (2.1 M) y máxima (3.5 M) y el análisis de los cambios de expresión de proteínas se realizó empleando la técnica de electroforesis bidimensional. A partir de este análisis 44 manchas proteicas presentaron cambios de expresión bajo las condiciones evaluadas, que estuvieron involucradas principalmente en procesos de traducción, metabolismo central y transporte. Particularmente, se identificó la sobre-expresión de la proteína PspA en respuesta a un aumento de salinidad. Esta proteína es un activador transcripcional implicado en la detección de diferentes factores de estrés, como por ejemplo, estrés osmótico, indicando que la proteína PspA tiene una función importante en la adaptación a condiciones hipo- e hiper-osmóticas en la archaea halófila extrema *H. volcanii* (Bidle et al. 2008). Estos resultados coinciden con lo reportado para *H. salinarum*, demostrando la importancia de los reguladores transcripcionales en la respuesta celular a estrés hiper-osmótico

H. dabanensis D-8^T es una bacteria halófila moderada que presenta un rango de salinidad entre 0.1 y 32.5%. El análisis del proteoma de *H. dabanensis* D-8^T, bajo diferentes concentraciones de salinidad (concentraciones óptimas y altas de salinidad) mostró la sobre-expresión de dos grupos de proteínas, el primer grupo implicado en la biosíntesis de glicina betaína, y el segundo relacionado con chaperonas y proteasas. Estos resultados sugieren que en presencia de altas concentraciones de NaCl, un grupo de proteínas probablemente confiere a *H. dabanensis* la habilidad de osmoadaptación y el segundo grupo de proteínas protege a las células del daño causado por el estrés osmótico (Feng et al. 2007). La sobre-expresión de proteínas de estrés general, como chaperonas y proteasas, en condiciones hipo-osmóticas, en el caso de la archaea *H. salinarum*, y en condiciones hiper-osmóticas en el caso de la bacteria *H. dabanensis* sugiere que este tipo de respuesta representa una respuesta celular universal a condiciones de estrés osmótico.

H. elongata es una bacteria halófila moderada que presenta un rango de salinidad entre 5 y 25% de NaCl. Los mecanismos osmoadaptativos de *H. elongata* fueron estudiados a través del análisis de los cambios en sus mapas proteómicos usando la técnica de electroforesis bidimensional. En respuesta a condiciones de estrés osmótico, se observaron variaciones significativas en la expresión de proteínas involucradas en

osmoregulación, respuesta a estrés general, generación de energía, transporte, y modulación de la estructura y función de la membrana celular (Ceylan et al. 2012).

C. glutamicum es una bacteria halófila moderada aislada de suelo que frecuentemente está sometida a condiciones de estrés hipo e hiper-osmótico en su hábitat natural. Fränzel et al. (2010) reportaron un estudio proteómico, empleando el enfoque *shotgun proteomics*, para investigar el perfil de expresión de esta bacteria bajo condiciones de estrés hiper-osmótico. Este estudio permitió determinar que el transportador de solutos compatibles ProP tiene una función clave en la defensa de *C. glutamicum* contra estrés hiper-osmótico. Un grupo de proteínas notablemente regulado en respuesta a un incremento de la salinidad del medio comprende proteínas involucradas en la biosíntesis de lípidos de la membrana celular. Adicionalmente, se observó que la sub-expresión de diferentes transportadores, sumado a la adaptación de la membrana celular representan la principal estrategia de adaptación de *C. glutamicum* contra estrés hiper-osmótico. A diferencia de los estudios mencionados anteriormente este estudio empleó una técnica proteómica más resolutiva que permitió la identificación de un mayor número de proteínas implicadas en la respuesta adaptativa de esta bacteria en presencia de altas concentraciones de sal.

En cuanto a los mecanismos de osmoadaptación usados por organismos halotolerante se han realizado algunos estudios en *Dunaliella salina* (Katz et al. 2007), *Bacillus subtilis* (Höper et al. 2006b) y *Listeria monocytogenes* (Duché et al. 2002) que han permitido identificar proteínas implicadas en su respuesta celular frente a cambios en la concentración de NaCl, las cuales estuvieron principalmente implicadas en transporte de solutos compatibles y en la modulación de la membrana celular.

El alga halotolerante *Dunaliella salina* es un organismo fotosintético modelo para el estudio de la adaptación a estrés osmótico en plantas. Katz et al. (2007) reportaron un estudio proteómico de las proteínas de membrana de esta alga, que permitió la identificación de 55 proteínas sobre-expresadas en presencia de altas concentraciones de sal que estuvieron relacionadas con estabilización de la estructura de la membrana celular y con diferentes rutas de transducción de señales. La caracterización de los cambios de expresión de las proteínas de membrana inducidos por estrés osmótico demostró que *Dunaliella salina* responde a incrementos de la concentración de sal mediante la sobre-

regulación de rutas metabólicas centrales y rutas de transducción de señales que alteran la composición de lípidos y proteínas de membrana, la actividad de los sistemas de transporte y el metabolismo energético.

B. subtilis es una bacteria halotolerante encontrada en el suelo que se adapta eficientemente a cambios en la osmolalidad del medio. El análisis de geles bidimensionales se usó para determinar los cambios en la síntesis de proteínas en respuesta a estrés osmótico (6% NaCl). Este estudio mostró que las enzimas que catalizan la formación de 2-oxoglutarato presentaron una sobre-expresión en presencia de una alta concentración de sal, lo cual indica probablemente una mayor necesidad de la síntesis de prolina como soluto compatible (Höper et al. 2006b).

L. monocytogenes es una bacteria halotolerante que puede sobrevivir en ambientes que presentan una concentración de NaCl de 100 g·l⁻¹. El análisis proteómico de *L. monocytogenes* en respuesta a un aumento de la salinidad permitió la detección de 12 proteínas inducidas bajo estas condiciones. Estas proteínas pertenecían a dos grupos: un grupo de proteínas que fueron rápidamente sobre-expresadas en respuesta de un incremento de la salinidad y que están relacionadas con la chaperona DnaK, y otro grupo de proteínas implicadas con metabolismo central (Duché et al. 2002).

Los datos generados a partir de estudios proteómicos proporcionan información útil para comprender la respuesta celular que presentan los organismos halófilos y halotolerantes frente a fluctuaciones de la osmolalidad en su hábitat, y además permiten entender las bases moleculares para la adaptación a ambientes salinos así como la identificación de proteínas esenciales en la respuesta a estrés osmótico. Los estudios de los mecanismos de osmoadaptación se han enfocado principalmente en organismos modelo como *H. salinarum*, *H. volcanii*, *Halomonas elongata*, *C. salexigens*, *Dunaliella salina* y *B. subtilis*, donde se ha demostrado que estos organismos presentan una respuesta celular a estrés osmótico diferente que está relacionada probablemente con sus características fisiológicas y con las características particulares de sus hábitats.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar los mecanismos moleculares involucrados en la adaptación de *Tistlia consotensis* a condiciones variables de salinidad.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Analizar cualitativa y cuantitativamente el perfil de expresión de proteínas de *Tistlia consotensis* bajo condiciones variables de salinidad.

3.2.2. Identificar proteínas expresadas diferencialmente en el exoproteoma y el proteoma celular de *Tistlia consotensis* bajo condiciones variables de salinidad.

3.2.3. Identificar los posibles mecanismos de adaptación de *Tistlia consotensis* bajo condiciones variables de salinidad.

4. METODOLOGÍA

4.1. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

La bacteria halotolerante *T. consotensis* (USBA 355) se encuentra depositada en la colección de microorganismos de la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA). Para todos los experimentos realizados en este estudio *T. consotensis* se cultivó en medio básico (MB). El medio MB contenía (l^{-1}) 1 g NH_4Cl , 0.3 g K_2HPO_4 , 0.3 g KH_2PO_4 , 3 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.1 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.1 g KCl , 5 g $NaCl$ (Díaz-Cárdenas et al. 2010b) y 10 ml solución de elementos traza SL-10 (Widdel et al. 1983). El pH del medio se ajustó a pH 6.7 con $NaOH$ 1M (Díaz-Cárdenas et al. 2010b). El medio de cultivo se esterilizó a 15 psi durante 20 minutos. Los cultivos se incubaron a $30^\circ C$ con agitación constante a 200 r.p.m. Todos los reactivos usados en este estudio fueron de alta pureza.

4.2. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE FUENTES DE NITRÓGENO ORGÁNICO EN EL CRECIMIENTO DE *T. consotensis*

Para determinar la fuente de nitrógeno orgánico que incrementaba la producción de biomasa de *T. consotensis* se evaluaron diferentes concentraciones de peptona (1 y 2 $g \cdot l^{-1}$) y extracto de levadura (1 y 2 $g \cdot l^{-1}$). *T. consotensis* se sub-cultivó dos veces sucesivas por duplicado bajo las mismas condiciones experimentales y se incubó a $30^\circ C$ con agitación constante a 200 r.p.m. El seguimiento de su crecimiento se realizó a partir de la medición de la densidad óptica a 580 nm (HACH DR 5000) en las horas 0, 8, 16, 18, 20 y 24. Los datos de D.O. se transformaron a logaritmo natural (LN) para realizar una gráfica LN vs. tiempo, a partir de esta gráfica se realizó una regresión lineal y se calculó la pendiente que corresponde a la velocidad específica de crecimiento (μ_{esp}). La determinación de la fuente de nitrógeno que permitió una mayor producción de biomasa se realizó con el fin de asegurar una alta recuperación de proteínas bajo las condiciones de salinidad evaluadas.

4.3. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINAR EL PESO SECO DE *T. consotensis*

Con el fin de establecer la concentración celular de los inóculos de *T. consotensis* usados durante este estudio, se realizó una curva de peso seco para relacionar los valores de densidad óptica con el peso seco de la biomasa ($\mu\text{g células}\cdot\text{ml}^{-1}$). *T. consotensis* se cultivó en 700 ml de medio MB suplementado con D-glucosa 20 mM y extracto de levadura $2\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (concentración seleccionada a partir de la evaluación de la influencia de diferentes fuentes de nitrógeno). El porcentaje de inóculo utilizado fue de 10% (v/v). El cultivo se incubó a 30°C con agitación constante a 200 r.p.m. Las células se recolectaron en la hora 24 de crecimiento mediante centrifugación a $4000 \times g$ durante 30 minutos a 4°C . El precipitado obtenido se lavó dos veces con agua fisiológica estéril 0.9% (p/v) y se resuspendió en 200 ml de agua fisiológica 0.9% (p/v), se centrifugó nuevamente a $4000 \times g$ durante 10 min a 4°C . El precipitado finalmente obtenido se resuspendió en 100 ml de agua destilada y se colocó inmediatamente en hielo. Esta suspensión homogénea obtenida se denominó suspensión madre (SM). La suspensión madre se dividió en dos fracciones: una fracción se utilizó para realizar el secado de las células (SM1) y la otra fracción se utilizó para realizar las diluciones de la suspensión de trabajo (SM2).

Para el secado de las células, de la fracción SM1 se tomaron 10 ml y 20 ml (con sus respectivas replicas) y se dispusieron en cápsulas de porcelana previamente secadas al horno y pesadas. Las cápsulas se llevaron al horno a 105°C durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, se pesaron las cápsulas cada media hora hasta que se obtuvo un peso constante y se calculó el peso seco de las bacterias en las cápsulas, el cual se utilizó posteriormente para calcular el peso seco de bacterias/ml de SM.

Por otra parte, para las diluciones de la suspensión madre se tomó 1 ml de la fracción SM2 y se realizó una dilución 1/100 ($10\ \mu\text{l SM} + 990\ \mu\text{l H}_2\text{O}$) y se leyó su densidad óptica a 580 nm. Esta DO correspondió al valor teórico de la DO de la solución madre. Adicionalmente, se realizaron las diferentes diluciones a partir de la fracción SM2 (Tabla 5), por triplicado, y se leyó su densidad óptica a 580 nm.

Tabla 5. Diluciones de la suspensión de trabajo (ST)

Dilución	1/10	2/10	3/10	4/10	5/10	6/10	7/10	8/10	9/10
ST	100	200	300	400	500	600	700	800	900
H ₂ O Δ	900	800	700	600	500	400	300	200	100
V _f	1000μl	1000μl	1000μl	1000μl	1000μl	1000μl	1000μl	1000μl	1000μl

Los datos de D.O. obtenidos para cada dilución se graficaron, y a partir de esta gráfica se realizó una regresión lineal y se calculó la pendiente. Posteriormente, se calculó el peso seco de cada dilución con el fin de convertir las diluciones en concentraciones (μg de bacterias peso seco/ml) y se graficó el peso seco ($\mu\text{g}/\text{ml}$) vs. DO_{580} . A partir de la ecuación de la recta se calculó la pendiente la cual se utilizó para convertir los valores de absorbancias, de los diferentes ensayos para *T. consotensis*, en $\mu\text{g célula}\cdot\text{ml}^{-1}$.

4.4. PATRÓN DE CRECIMIENTO DE *T. consotensis* EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NaCl

Para determinar el efecto del NaCl sobre el crecimiento de *T. consotensis*, esta bacteria se cultivo en diferentes concentraciones de NaCl: 0, 5, 20, 30 y 40 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Las concentraciones de NaCl se seleccionaron con base a los estudios previos donde se reportó que esta bacteria no crece en concentraciones de NaCl superiores a 40 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Díaz-Cárdenas et al. 2010). Las pruebas se realizaron en medio MB suplementado con glucosa 20 mM y extracto de levadura 2 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. *T. consotensis* se sub-cultivó dos veces sucesivas por duplicado bajo las mismas condiciones experimentales y se incubó a 30°C con agitación constante a 200 r.p.m. El seguimiento de su crecimiento se realizó a partir de la medición de la densidad óptica a 580 nm (HACH DR 5000) durante 24 horas. Los datos de D.O. se transformaron a logaritmo natural (LN) para realizar una gráfica LN vs. tiempo, a partir de esta gráfica se realizó una regresión lineal y se calculó la pendiente que corresponde a la velocidad específica de crecimiento (μ_{esp}).

4.5. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE *T. consotensis* BAJO LAS CONDICIONES VARIABLES DE SALINIDAD

En este estudio se emplearon dos estrategias proteómicas para analizar el perfil de expresión de proteínas de *T. consotensis* en respuesta a cambios de la salinidad externa. En la primera estrategia, se utilizó la técnica de electroforesis bidimensional para obtener mapas proteómicos de *T. consotensis* bajo su salinidad mínima, óptima y máxima tolerada, y realizar un análisis cualitativo del perfil de expresión de sus proteínas bajo las salinidades evaluadas, y partir de estos resultados se realizó un análisis cuantitativo, utilizando una estrategia proteogenómica que consistió en una anotación rápida de los genes cuyas proteínas se detectaron mediante espectrometría de masas.

4.5.1. Análisis cualitativo del perfil de expresión de proteínas de *T. consotensis* en respuesta a cambios de salinidad empleando la técnica de electroforesis bidimensional

Para realizar el análisis cualitativo del perfil de expresión de *T. consotensis* en respuesta a cambios de la salinidad externa se utilizó la técnica de electroforesis bidimensional (2-DE), que permitió la visualización y separación de proteínas en función de sus propiedades eléctricas (punto isoelectrónico, pI), seguida de una separación electroforética en función de su tamaño o peso molecular.

4.5.1.1. Extracción de proteínas extra e intracelulares de *T. consotensis*

Para la extracción de proteínas extra e intracelulares, *T. consotensis* se cultivó dos veces sucesivas en las tres salinidades evaluadas (mínima, óptima y máxima). El volumen de cultivo a partir de cual se realizó la extracción de proteínas varió dependiendo de la estrategia empleada. En el caso de la estrategia empleando la técnica de electroforesis bidimensional, para cada concentración de NaCl, 70 ml de células de *T. consotensis* se inocularon en 630 ml de medio MB (V_T : 700 ml) suplementado con glucosa 20 mM y extracto de levadura 2 g·l⁻¹. En esta estrategia todos los experimentos se realizaron por duplicado. Todos los cultivos se incubaron a 30°C con una agitación constante de 200

rpm y las células se recolectaron mediante centrifugación a 2000 x g por 30 minutos a 20°C cuando se alcanzó la mitad de la fase exponencial ($DO_{580} = 0.4-0.5$). A partir de la centrifugación se obtuvieron dos fracciones: sobrenadante que correspondía a las proteínas extracelulares o exoproteoma, y precipitado que correspondía a las proteínas intracelulares o proteoma celular.

Extracción de proteínas extracelulares – Exoproteoma

Para la extracción de las proteínas extracelulares los sobrenadantes obtenidos se recolectaron y pasaron a través de un filtro de 0.22 μm de tamaño de poro y 47 μm de diámetro (*Durapore polyvinylidene fluoride hydrophilic*). Para la extracción de proteínas extracelulares se evaluaron diferentes métodos de precipitación de proteínas con el fin de determinar que método permitía una mayor recuperación de proteínas extracelulares.

▪ Precipitación con ácido tricloroacético

Para la extracción de proteínas extracelulares, 40 ml de sobrenadante se trataron con ácido tricloroacético (TCA) 50% (p/v) y se incubaron en hielo durante 10 min. Posteriormente, el precipitado se recolectó por centrifugación a 4000 x g por 30 minutos a 4°C y se resuspendió en 250 μl de tampón de solubilización que contenía urea 7 M, tiourea 2 M, ditiotreitól (DTT) 50mM y 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propano sulfonato (CHAPS) 4% (p/v). El material insoluble se removió por centrifugación a 4000 x g durante 10 minutos a 4°C (Nandakumar et al. 2006).

▪ Precipitación con acetona

Las proteínas extracelulares se precipitaron adicionando 10 ml de acetona fría 90% (v/v) a 40 ml de sobrenadante y las muestras se incubaron en hielo toda la noche. Posteriormente, las proteínas precipitadas se recolectaron mediante centrifugación a 4000 x g por 30 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se descartó y las trazas de acetona se removieron mediante secado al vacío. Las proteínas precipitadas se resuspendieron en

250 µl de tampón de solubilización. El material insoluble se removió por centrifugación a 4000 x g durante 10 minutos a 4°C (Jiang et al. 2004).

- **Precipitación con sulfato de amonio**

Para la precipitación de proteínas extracelulares, 5.71 ml de sulfato de amonio 70% (v/v) (concentración final 10%) se adicionaron a 40 ml de sobrenadante, se mezclaron en vortex durante 1 minuto y se incubaron en hielo toda la noche. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 4000 x g por 30 minutos a 4°C para recolectar el precipitado de la proteína. Las proteínas precipitadas se lavaron con 200 µl de acetona 90% (v/v) y se incubaron en hielo durante 15 minutos. Finalizado este tiempo, las muestras se centrifugaron a 4000 x g por 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y las trazas de acetona se removieron mediante secado al vacío. Las proteínas precipitadas se resuspendieron en 250 µl de tampón de solubilización, el material insoluble se removió por centrifugación a 4000 x g durante 10 minutos a 4°C (Jiang et al. 2004).

Extracción de proteínas intracelulares – Proteoma celular

Para la extracción de proteínas intracelulares se evaluaron cuatro diferentes tampones de lisis con el fin de seleccionar el tampón que permitiera una mayor recuperación de proteínas intracelulares. Los tampones de lisis evaluados fueron:

- **Tampón de lisis A**

El tampón de lisis A contenía urea 9 M, Tris-HCl (pH 7.4) 10mM, MgCl₂ 1.5 mM y DTT 100 mM (Sambrook et al. 1987).

- **Tampón de lisis B**

El tampón de lisis B contenía urea 8 M, CHAPS 4% (p/v) y DTT 100 mM (Görg 2004).

- **Tampón de lisis C**

El tampón de lisis C contenía urea 9.5 M, tiourea 2 M, triton X-100, 1% (v/v), CHAPS 4% (p/v), DTT 100 mM y lisozima 200 µg·ml⁻¹ (Feng et al. 2007).

▪ **Tampón de lisis D**

El tampón de lisis D contenía ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Sigma) 10 mM, Tris-HCl (pH 8.0) 20 mM, DTT 0.5 mM y CHAPS 0.1% (p/v) (Choi et al. 2005).

Los precipitados obtenidos de *T. consotensis* se lavaron dos veces con tampón Tris-HCl (pH 7.4) 50 mM que contenía PeFabloc 5 mM para inhibir el efecto de las proteasas. Una vez realizados los lavados de los precipitados éstos se resuspendieron en 500 µl tampón de lisis y se incubaron en hielo durante 30 min. Posteriormente, se realizó la ruptura celular mediante sonicación (15 ciclos, amplitud: 19%, tiempo total: 1 minuto, pulsos *on*: 4 segundos y pulsos *off*: 56 de descanso) en hielo y luego los restos celulares se removieron mediante centrifugación a 6000 x *g* por 15 min. Los sobrenadantes obtenidos se almacenaron a -80°C hasta su evaluación (máximo 24 horas).

4.5.1.2. Limpieza de proteínas

La limpieza de proteínas se realizó utilizando el *kit* ReadyPrep 2-D Cleanup (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Este procedimiento permite eliminar contaminantes como sales, detergentes iónicos, lípidos y ácidos nucleicos que pudieran interferir en el proceso de isoelectroenfoque (IEF por sus siglas en inglés *First-Dimension Isoelectric Focusing*). De cada muestra se tomaron 200 µl y se transfirieron a un tubo de microcentrifuga nuevo. Luego, se adicionaron 600 µl de agente precipitante 1, se mezcló por agitación mecánica y se incubó en hielo durante 15 minutos. Finalizado este tiempo, se adicionaron 600 µl del agente precipitante 2, las muestras se mezclaron por agitación mecánica y se centrifugaron a 6000 x *g* durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se descartó, se adicionaron 80 µl del agente de lavado 1 y las muestras se centrifugaron a 6000 x *g* durante 5 min a 4°C para descartar el sobrenadante. Después, se adicionaron 50 µl de agua ultrapura al precipitado formado y se mezclaron por agitación mecánica durante 20 segundos. Luego se adicionaron 2 ml del agente de lavado 2 (enfriado previamente a -20°C) y simultáneamente se adicionaron 5 µl del aditivo de lavado 2. Las muestras se incubaron por 1 hora a -20°C y se realizó agitación mecánica de 30 segundos cada 10 minutos durante el tiempo de incubación. Finalizado el periodo de incubación las muestras se centrifugaron a 6000 x *g* durante 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y el precipitado obtenido se resuspendió en 250 µl de tampón de solubilización y se incubó a 4°C toda la noche. Finalmente, las muestras se

centrifugaron a 6000 x g durante 5 min a 4°C y el sobrenadante obtenido se transfirió a un nuevo tubo. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su evaluación (máximo 24 horas).

4.5.1.3. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de la concentración de proteínas extra e intracelulares (μg de proteína/ μl de muestra), se realizó usando la técnica de Bradford (Anexo1). El reactivo de Bradford contiene Coomassie G-250 un colorante que se une a los grupos básicos y aromáticos de los aminoácidos y cambia la coloración de la solución de acuerdo a la concentración de las proteínas. La máxima absorbancia de la solución de Coomassie se presenta entre 465nm y 595nm cuando ocurre la unión entre el colorante y las proteínas (Bradford 1976).

Todas las muestras se cuantificaron por duplicado, las mediciones de las variaciones de absorbancia se realizaron en el espectrómetro HACH DR 5000 a una longitud de onda de 595 nm. La curva de calibración se construyó utilizando soluciones de albúmina de suero bovino (BSA), en un rango de concentración entre 100-1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, como proteína estándar. La concentración de la muestra a cuantificar se determinó mediante interpolación de los valores en la curva patrón.

4.5.1.4. Electroforesis unidimensional

La evaluación de la efectividad de los métodos de extracción de proteínas extracelulares y de los tampones de lisis para extracción de proteínas intracelulares así como el protocolo de limpieza de proteínas se realizó por medio de electroforesis unidimensional, ya que esta permitía visualizar el patrón de bandas y la integridad de las proteínas para cada muestra. La electroforesis se realizó siguiendo el protocolo descrito por Sambrook (1989) (Anexo 2). La electroforesis unidimensional se realizó usando geles del poliacrilamida 12% (v/v) (12% acrilamida y 4% Bis-acrilamida, 2 mm de grosor) en condiciones desnaturalizantes. La separación electroforética se efectuó en el sistema de electroforesis vertical *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* (Bio-Rad) a 50 v durante 3 horas aproximadamente. Para las corridas se utilizó el tampón TGS, el cual contenía Tris Base 25 mM, glicina 190 mM y dodecilsulfato sódico (SDS) 0.1% (p/v). La concentración de proteína cargada en

los geles fue de 100 µg/µl y se utilizó un marcador de peso molecular de 200 kDa (Bio-Rad).

Las proteínas se visualizaron utilizando la técnica de tinción *Blue Silver* (Candiano et al. 2004) que contenía Azul de Coomassie G-250 (Sigma) 0.12% (p/v), sulfato de amonio 10% (p/v), ácido fosfórico 10% (v/v) y metanol 20% (v/v). Los geles se sumergieron durante toda una noche en la solución de *Blue Silver* y posteriormente se decoloraron con agua destilada durante 6 horas hasta eliminar completamente el exceso de colorante. Las imágenes de los geles se capturaron con un sistema *LabScan* (Amersham) con una resolución de 300 dpi.

4.5.1.5. Separación de las proteínas mediante electroforesis bidimensional

- **Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF)**

Esta técnica electroforética separa las moléculas protéicas de acuerdo a su carga en presencia de un gradiente de pH. El procedimiento empleado para tal fin se basa en el uso de geles de poliacrilamida en forma de tiras que contienen gradientes de pH inmovilizados (IPG por sus siglas en ingles *Inmobilized pH gradients*); así las proteínas estimuladas por un campo eléctrico migran a lo largo del gel hasta que alcanzan valores de pH en los cuales su carga neta es nula (punto isoeléctrico) (Görg et al. 2004).

Las proteínas extra e intracelulares de *T. consotensis* (200 µg·µl⁻¹) extraídas se rehidrataron en 150 µl de tampón de rehidratación por 12 horas a 20°C (método pasivo) según el protocolo descrito por Cho et al. 2003. El tampón de rehidratación contenía urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2% (p/v), DTT 50 mM, anfolitos (Amersham Biosciences) 0.5% (v/v) y azul de bromofenol (Sigma) 0.002% (p/v). Para evitar la evaporación de la muestra y la precipitación de la urea, las tiras incorporadas en una bandeja de rehidratación se sumergieron en aceite mineral.

La separación por punto isoeléctrico se realizó en geles de gradientes inmovilizado con tiras IPG de 7 cm de longitud con un rango de pH de 3 - 10NL (*No Lineal*) y 3 - 6NL (Bio-Rad) usando el sistema *Ettan IPGphor II* (Amersham Biosciences). Los programas que se

emplearon para la separación de proteínas en la primera dimensión se encuentran en la Tabla 6.

- **Segunda dimensión. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)**

Esta técnica permite separar las proteínas obtenidas en la primera dimensión (isoelectroenfoque) de acuerdo a su masa molecular. Después del isoelectroenfoque de las proteínas, los geles IPG se equilibraron mediante dos pasos (i) urea 6 M, SDS 4% (p/v), Tris-HCl (pH 8.8) 50 mM, glicerol 30% (v/v) y DTT 2% (p/v) por 15 min en agitación. (ii) urea 6 M, SDS 4% (p/v), Tris-HCl pH 8.8 50 mM, glicerol 30% (v/v) y yodoacetamida 2.5% (p/v) por 15 min en agitación cada uno (Cho et al. 2003).

Para la migración de las proteínas de los geles IPG, se realizó una electroforesis SDS-PAGE utilizando la cámara de electroforesis vertical *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* (Bio-Rad). Los geles IPG se colocaron sobre los geles de acrilamida 12% (p/v) (12% acrilamida y 4% Bis-acrilamida, 2mm de grosor), en condiciones desnaturizantes, y se fijaron con una solución de agarosa 0.5% (p/v) que contenía azul de bromofenol 0.002% (p/v). La electroforesis de segunda dimensión se llevó a cabo a 100 voltios durante 4 horas. Se utilizó un marcador de peso molecular de 200 kDa (Bio-Rad).

- **Tinción de geles**

Para la visualización de las manchas proteicas en los geles de poliacrilamida se utilizó la técnica de tinción *Blue Silver* (Candiano et al. 2004) que contenía Azul de Coomassie G-250 (Sigma) 0.12% (p/v), sulfato de amonio 10% (p/v), ácido fosfórico 10% (v/v) y metanol 20% (v/v). Los geles se sumergieron durante toda una noche en la solución de *Blue Silver* y posteriormente se decoloraron con agua destilada durante 6 horas hasta eliminar completamente el exceso de colorante. Las imágenes de los geles se capturaron con un sistema *LabScan* (Amersham) con una resolución de 300 dpi.

4.5.1.6. Análisis de de los geles bidimensionales

El análisis comparativo del perfil de expresión de proteínas de *T. consotensis* se llevó a cabo con la ayuda del programa *PDQuest Advanced 2-D Analysis Software v.8* (Bio-Rad). Las imágenes fueron filtradas de acuerdo con el tipo de ruido encontrado, y cada mancha

Tabla 6. Programas de la cámara de isoelectroenfoque evaluados para separar las proteínas de *T. consotensis* en geles IPG de 7 cm, pH 3-10NL y en geles IPG de 7 cm, pH 3-6L. (Rehidratación: Pasiva, Temperatura de enfoque: 20°C).

Intervalo de pH	Modo de voltaje	Voltaje (V)	Tiempo (h:min)	kVh
3 - 10 NL	1 Step and Hold	300	0:30	0.2
	2 Gradient	1000	0:30	0.3
	3 Gradient	5000	1:20	4.0
	4 Step and Hold	5000	0:25	2.0
	Total		2:45	6.5
3 - 10 NL	1 Step and Hold	300	1:30	4.5
	2 Gradient	1000	0:30	0.3
	3 Gradient	5000	1:20	4.0
	4 Step and Hold	5000	0:25	2.0
	Total		3:05	10.8
3 - 6 NL	1 Step and Hold	300	1:30	4.5
	2 Gradient	1000	0:30	0.3
	3 Gradient	5000	1:30	4.5
	4 Step and Hold	5000	0:36	3.0
	Total		3:26	12.3

proteica se normalizó mediante el método denominado *cantidad total de manchas proteicas válidas*, el cual divide cada mancha proteica entre la cantidad total de manchas proteicas presentes en el gel. Para el análisis el programa generó un *Master Gel* a partir de los mapas proteómicos obtenidos en cada salinidad evaluada, el cual reúne las manchas proteicas de todos los geles y les asignó un código, indispensable para observar, evaluar y diferenciar las proteínas que estén diferencialmente expresadas.

Una vez se agruparon las imágenes en el programa y se generó el *Master Gel*, se procedió a determinar el número de manchas proteicas presentes en cada gel y el valor de abundancia por densidad óptica de cada mancha proteica, teniendo en cuenta los duplicados para cada condición, con el fin de realizar las diferentes comparaciones entre los mapas proteómicos de las salinidades evaluadas. La comparación de la intensidad de cada mancha proteica en las tres salinidades evaluadas se llevó a cabo usando la prueba estadística *t*-student, y solo se tuvieron en cuenta los valores de intensidad de las manchas proteicas que presentaran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). El mapa proteómico obtenido en la salinidad óptima de crecimiento de *T. consotensis* se utilizó como condición de control para realizar el análisis comparativo de la presencia de manchas diferenciales (sobreexpresadas o subexpresadas) en la salinidad mínima y máxima tolerada.

4.5.2. Análisis cuantitativo de la expresión de proteínas de *T. consotensis* en respuesta a cambios de salinidad empleando una estrategia proteogenómica

Para el estudio cuantitativo de los cambios de expresión de proteínas de *T. consotensis* en respuesta a cambios en la salinidad externa se utilizó un enfoque proteogenómico, que hace referencia a la correlación entre datos proteómicos con datos genómicos y transcriptómicos con el fin de mejorar la anotación de los genes (Renuse et al. 2011). La estrategia proteogenómica usada en este estudio consistió en: (i) la secuenciación de genoma de *T. consotensis*, (ii) la anotación rápida de los genes cuyos productos (proteínas) se detectaron por espectrometría de masas, y (iii) el análisis proteómico comparativo del *T. consotensis* en las salinidades evaluadas.

4.5.2.1. Secuenciación del genoma de *Tistlia consotensis*

La extracción del ADN genómico de *T. consotensis* se llevó a cabo usando el kit *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen) siguiendo la indicaciones del fabricante. Para la extracción, se centrifugaron 10 ml de medio de cultivo de *T. consotensis*, en fase exponencial, a 5000 x *g* durante 10 min a 4°C. La biomasa obtenida se resuspendió en 180 µl de tampón ATL, se adicionaron 20 µl de proteinasa K y se incubó a 56°C durante 2 horas. Finalizado este periodo de incubación, se adicionaron 200 µl del tampón AL y se mezcló por agitación

mecánica durante 5 s. Luego se adicionaron 200 μ l de etanol 96% (v/v) y nuevamente se realizó agitación mecánica. Todo el contenido del tubo se transfirió a una columna *DNeasy Mini spin* y se centrifugó a 6000 x *g* por un minuto. La columna se transfirió a un nuevo tubo colector, se adicionaron 500 μ l del tampón AW1 y se centrifugó a 6000 x *g* por un minuto. La columna se transfirió nuevamente a otro tubo colector, se adicionaron 500 μ l del tampón AW2 y se centrifugó a 20000 x *g* por 3 minutos. Finalmente, la columna se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml, se adicionaron 150 μ l de agua ultrapura y se incubó por un minuto a temperatura ambiente. El ADN extraído se eluyó mediante centrifugación a 6000 x *g* por un minuto y se preservó a -20°C hasta su procesamiento. La integridad del ADN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen) a una concentración de 1.2% (p/v), teñido con bromuro de etidio 0.5 μ g/ml. La corrida electroforética se realizó en tampón TAE 0.5 X (preparado a partir de TAE 50X que contiene en 500 ml, 121 g de Tris base, 28.6 ml de ácido acético y 50 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0) a 80V durante 45 minutos. Las imágenes de los geles se capturaron con el sistema *GelDoc™ EQ* (Bio-Rad).

La secuenciación del genoma de *T. consotensis* se realizó usando la tecnología de pirosecuenciación 454 basada en la “secuenciación por síntesis”. La pirosecuenciación se realizó mediante el servicio de secuenciación de la compañía GATC Biotech usando el sistema *Roche 454 GS FLX+ (Titanium XL+ sequencing chemistry)*. El ADN extraído se fragmentó empleando diferentes enzimas de restricción y se construyó una biblioteca 454 con un tamaño de inserto promedio de 8 kb.

La tecnología de pirosecuenciación consta de tres etapas: (i) obtención de bibliotecas sstADN, (ii) amplificación de las secuencias y (iii) secuenciación. Inicialmente, el ADN se fragmenta al azar mediante nebulización para obtener fragmentos de ADN de 200 a 800 pb aproximadamente. Posteriormente, se añaden los adaptadores a los fragmentos de ADN obtenidos y cada complejo (fragmento de ADN + adaptadores) se encapsula dentro de microesferas. Una vez unidos los fragmentos a las microesferas se introducen en una emulsión de agua y aceite de forma que cada esfera queda dentro de una gota con todos los reactivos y enzimas necesarios para la PCR. La amplificación de la PCR se desarrolla dentro de estas gotas para generar microesferas que contienen miles de copias de la misma secuencia templete. Para iniciar la secuenciación, las microesferas son

inmovilizadas en una placa conocida como *PicoTiterPlate*, y además se incorporan esferas que contienen las enzimas luciferasa y sulfurilasa, necesarias para detectar la incorporación de nucleótidos durante la síntesis de la cadena complementaria. La sulfurilasa genera ATP a partir de pirofosfato y la luciferasa se transforma en oxiluciferina en presencia de ATP con emisión de luz. De esta forma se construye una cascada enzimática que empieza cuando la ADN polimerasa incorpora un nucleótido a la cadena creciente complementaria del ADN a secuenciar liberando un pirofosfato y termina cuando la luciferasa emite luz. La emisión de luz es detectada por una cámara CCD y mediante programas informáticos se interpretan estos patrones de luz y se genera un pirograma con la secuencia obtenida para cada microesfera (Metzker 2010).

El ensamblaje *de novo* de las secuencias obtenidas se realizó usando el ensamblador 454 Newbler, que está diseñado específicamente para el ensamblaje de secuencias generadas a partir de la tecnología de pirosecuenciación. Este proyecto de secuenciación de genoma se depositó en el DDBJ/EMBL/GenBank con los números de acceso CBKU010000001-CBKU010002377 y están disponibles en el *European Nucleotide Archive* (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/CBKU010000001-CBKU010002377>).

Los *contigs* obtenidos se concatenaron extremo a extremo (del más largo al más corto) para crear una secuencia de genoma continua virtual. Este genoma virtual se tradujo en los seis posibles marcos de lectura (ORF por sus siglas en inglés *open reading frame*) usando el programa Bioedit versión 7.1.3. generando una lista de ORFs de las secuencias de polipéptidos. Se estimó que procedimiento generó un total de 14256 péptido quiméricos falsos, estos péptidos no fueron asignados ya que la mayoría fue el resultado de la digestión semi tripsica. Además, la base de datos de ORF obtenida se restringió a aquellos péptidos con mínimo 50 aminoácidos. La base de datos de las proteínas de *T. consotensis* generada a partir de su genoma, se utilizó para realizar la anotación de los espectros de masas identificados a partir del análisis *shotgun proteomics* de *T. consotensis* en las salinidades evaluadas.

La anotación funcional del genoma de *T. consotensis* se llevó a cabo utilizando el programa RAST (RAST por su siglas en inglés *Rapid Annotation using Subsystem Technology*). El programa RAST es un servicio que permite analizar datos genómicos y

proporciona anotaciones del genoma de alta calidad. RAST permite hacer una comparación detallada contra genomas existentes, la determinación de los genes que el genoma tiene en común o que se distinguen en comparación con otros genomas y la identificación del contexto genómico con respecto a genes específicos (Aziz et al. 2008).

4.5.2.2. Análisis proteómico de *T. consotensis* en respuesta a cambios en la salinidad externa

Una vez determinado que el perfil de expresión de proteínas de *T. consotensis* presentó cambios significativos en respuesta a la variación de la salinidad del medio, se realizó un análisis más detallado de estos perfiles de expresión empleando una estrategia proteómica denominada *shotgun proteomics*.

El término *shotgun proteomics* hace referencia al análisis directo de una mezcla compleja de proteínas, y se basa en el fraccionamiento de los péptidos y posterior análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem (LC-MS/MS). El análisis *shotgun proteomics* proporciona una medida indirecta de las proteínas a través de los péptidos derivados de la digestión proteolítica de las proteínas intactas. La identificación de péptidos se realiza a partir de la comparación de los espectros de masa derivados de la fragmentación de los péptidos con los espectros de masa generados a partir de digestión *in silico* de una base de datos de proteínas (Zhang et al. 2013).

4.5.2.2.1. Extracción de proteínas extra e intracelulares de *T. consotensis*

En esta estrategia, para cada concentración de NaCl, se cultivaron 10 ml de células de *T. consotensis* en 90 ml de medio MB suplementado con glucosa 20 mM y extracto de levadura 2 g·l⁻¹ y todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los cultivos se incubaron a 30°C con una agitación constante de 200 r.p.m. y las células se recolectaron mediante centrifugación a 4000 x g por 30 minutos a 20°C en la mitad de la fase exponencial (DO₅₈₀= 0.4-0.5). A partir de la centrifugación se obtuvieron dos fracciones: sobrenadante que correspondía a las proteínas extracelulares o exoproteoma, y precipitado que correspondía a las proteínas intracelulares o proteoma celular.

La extracción de proteínas extra e intracelulares se realizó siguiendo los protocolos ya estandarizados en el *Laboratoire de Biochimie des Systèmes Perturbés (LBSP)* del CEA (*Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives*) en Francia, que se explican a continuación.

Extracción de proteínas extracelulares – Exoproteoma

La extracción de proteínas extracelulares de *T. consotensis* se realizó con el método de precipitación con ácido tricloroacético descrito en la sección 4.5.1.1. Las proteínas precipitadas se resuspendieron en 50 µl de tampón LDS (LDS por sus siglas en inglés *lithium dodecyl sulphate-β-mercaptoethanol*) (Invitrogen) 1X. Posteriormente las muestras se incubaron por 5 min a 95°C previo a la electroforesis SDS-PAGE. Por cada réplica biológica se realizó la extracción de proteínas por triplicado, y estas correspondieron a las réplicas experimentales, para un total de 9 réplicas por cada salinidad evaluada.

Extracción de proteínas intracelulares – Proteoma celular

Los precipitados obtenidos se solubilizaron en 50 µl de tampón LDS 1X y se sometieron a un proceso de sonicación durante 10 minutos en hielo con una amplitud de 40% (780H sonicator). Transcurrido este tiempo las muestras se incubaron a 95°C durante 5 minutos. Los pasos de sonicación e incubación a 95°C se repitieron dos veces, y finalmente las proteínas intracelulares obtenidas se resuspendieron en tampón LDS 1x previo a la electroforesis SDS-PAGE.

4.5.2.2.2. Electroforesis unidimensional (1D SDS-PAGE) y proteólisis con tripsina

Las proteínas obtenidas se fraccionaron inicialmente empleado una electroforesis unidimensional y posteriormente se realizó la digestión con tripsina para obtener la mezcla que fue analizada por espectrometría de masas.

Las proteínas extra e intracelulares extraídas de *T. consotensis* (20 µl) se resolvieron en electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (1D SDS-PAGE). La electroforesis se realizó en geles NuPAGE Tris-Bis 10% (Invitrogen) que es un

sistema de geles de poliacrilamida prefabricados diseñados para obtener una óptima separación de las proteínas en condiciones desnaturalizantes. Este sistema proporciona una máxima estabilidad tanto de las proteínas como de la matriz del gel durante la electroforesis, y una mejor resolución de las bandas. La electroforesis 1D SDS-PAGE se llevó a cabo usando ácido 2-(*N*-morfolino) etano sulfónico (MES) (Invitrogen) como tampón de corrida. Para las proteínas extracelulares se realizó una migración corta de 5 min a 200 voltios mientras que para las proteínas intracelulares se realizó una migración completa durante 15 min a 200 voltios. Se utilizó SeeBlue Plus2 (Invitrogen) como marcador de peso molecular. Los geles se tiñeron con *Simply Blue*TM *Safe Stain* (Invitrogen), una tinción de azul de coomassie G-250 *ready-to-use*. Los geles se lavaron dos veces con agua ultrapura y posteriormente se sumergieron en la tinción *Simply Blue*TM *Safe Stain* durante 1 hora con agitación constante. Finalmente, los geles se dejaron en agua ultrapura toda la noche para remover los residuos de colorante.

Posteriormente, los geles se lavaron dos veces con agua ultrapura, y luego cada carril, que correspondía a una muestra, se cortó en pequeñas piezas de gel de 4 mm³ con la ayuda de una cuadrícula molde y cada pieza de gel se transfirió a una placa de 96 pozos. En el caso de la electroforesis de las proteínas extracelulares se obtuvieron dos piezas de gel mientras que para la electroforesis obtenida para las proteínas intracelulares se obtuvieron ocho piezas de gel por cada muestra (Figura 3). Todas las piezas de gel obtenidas se decoloraron con 200 µl de la solución metanol:NH₄HCO₃ 50 mM (1:1 v/v) y se agitaron durante 5 min a 600 rpm; luego el sobrenadante se eliminó y se repitió este paso nuevamente. Posteriormente, las piezas de gel se deshidrataron con 200 µl de la solución acetonitrilo (ACN): NH₄HCO₃ 50 mM (1:1 v/v) y se agitaron durante 5 min a 600 rpm. El sobrenadante se eliminó, se adicionaron 200 µl de ACN y las piezas de gel se agitaron durante 5 min a 600 rpm. El sobrenadante se eliminó y las piezas de gel se secaron al vacío durante 5 min. Transcurrido este tiempo las piezas de gel se rehidrataron con 100 µl de DTT 25 mM (disuelto en NH₄HCO₃ 50 mM) y se incubaron a 56°C durante 20 min con agitación a 500 rpm. El sobrenadante se eliminó y se adicionaron 100 µl de yodoacetamida 55 mM (disuelta en NH₄HCO₃ 50 mM) y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min. Luego se descartó el sobrenadante y las piezas de gel se lavaron con 200 µl de agua ultrapura. Las piezas de gel se agitaron a 600 rpm durante un minuto, después se descartó el sobrenadante y se repitió este paso nuevamente. Para la

deshidratación de las piezas de gel se adicionaron 200 μl de la solución ACN: NH_4HCO_3 50 mM (1:1 v/v) y se agitaron durante 5 min a 600 rpm. El sobrenadante se eliminó y se adicionaron 200 μl de ACN. Las piezas de gel se agitaron a 600 rpm durante un minuto, se descartó el sobrenadante y se secaron al vacío durante 5 min.

Para iniciar el proceso de proteólisis *in-gel* con tripsina, las piezas de gel se hidrataron con 20 μl de una solución enzimática, que contenía tripsina 10 ng/ μl disuelta en *ProteaseMaxTM Surfactant* (Roche) 0.01% (p/v) y NH_4HCO_3 50 mM. Esta solución se dejó penetrar en las piezas de gel durante 20 min en hielo. Después el sobrenadante se descartó, para eliminar el excedente de tripsina, y se adicionaron 50 μl de la solución *ProteaseMaxTM Surfactant* 0.01% (p/v): NH_4HCO_3 50 mM. Las piezas de gel se agitaron a 200 rpm y se dejaron incubando a 37°C durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, los extractos de péptidos obtenidos se transfirieron a una nueva placa de 96 pozos y se adicionaron 5 μl de ácido trifluoroacético (TFA) 5% (v/v) para inactivar la tripsina. La placa de 96 pozos se almacenó a -20°C hasta su procesamiento.

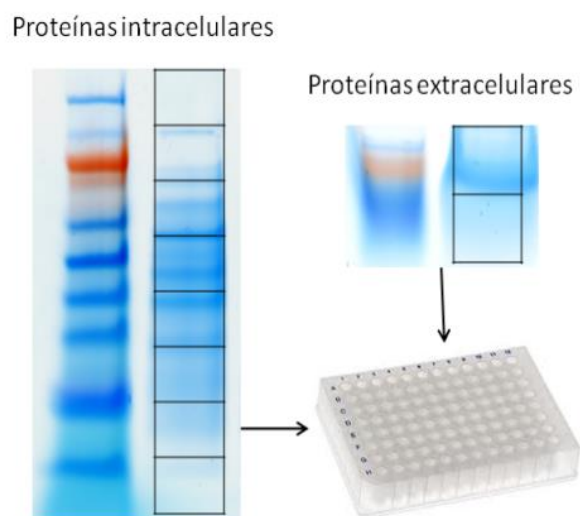


Figura 3. División de los geles SDS-PAGE de las proteínas extra e intracelulares de *T. consotensis* para obtener piezas de gel de 4 mm³.

4.5.2.2.3. Análisis por cromatografía líquida de nanoescala acoplada a espectrometría de masas en tándem (nanoLC-MS/MS)

La espectrometría de masas es una técnica de análisis fisicoquímico que determina la proporción masa/carga (m/z) de iones en fase gaseosa a través de la observación de su trayectoria a lo largo de un campo magnético o eléctrico. Mediante la espectrometría de masas es posible obtener información de la secuencia de aminoácidos de las proteínas y la masa de los péptidos y esta información puede utilizarse para identificar proteínas comparando con bases de datos. Un espectrómetro de masas acopla varios sistemas funcionando en conjunto, primero está el ionizador que como su nombre lo indica es el encargado de ionizar la muestra, una vez los iones son formados, pueden ser separados de acuerdo a su proporción m/z y finalmente detectados por sistemas de amplificación acoplados a computadores que generan imágenes de acuerdo a las señales obtenidas (Yates et al. 2009).

Para identificar las proteínas expresadas por *T. consotensis* en respuesta a cambios de la salinidad externa los extractos peptídicos obtenidos se analizaron utilizando la estrategia nanoLC-MS/MS. En esta estrategia, la mezcla de péptidos es separada inicialmente por cromatografía líquida de fase reversa de nanoescala que consiste en la separación de las moléculas en base a su polaridad y se caracteriza por emplear nanocolumnas que permiten un mayor flujo conduciendo a una separación más rápida y eficiente de los péptidos. Posteriormente, un espectrómetro de masas en tándem acoplado en línea al nanoLC, permite que los péptidos eluidos a partir del nanoLC sean fragmentados mediante un proceso denominado disociación inducido por colisión (CID, por sus siglas en inglés *collision-induced dissociation*) y se adquiere así un espectros de masa por cada péptido fragmentado (Gaspari and Cuda 2011).

En este estudio, los experimentos de nanoLC-MS/MS se realizaron en el espectrómetro de masas *LTQ-Orbitrap XL hybridmass* (ThermoFisher) acoplado a un sistema *UltiMate 3000 LC* (Dionex-LC Packings). El *LTQ-Orbitrap XL hybridmass* combina un analizador de trampa de iones lineal y un analizador de masas Orbitrap. Los iones generados por la fuente de ionización ASI son colectados por la trampa de iones LTQ (LTQ por sus siglas en inglés *Linear Trap Quadrupole*), que es un dispositivo en el que los iones gaseosos

son atrapados durante largos periodos de tiempo por acción de campos magnéticos y/o eléctricos. Los iones son luego transferidos a una trampa-C, que permite el almacenamiento de una población de iones significativa y su posterior inyección en el analizador *Orbitrap* en un pulso corto (Makarov and Scigelova 2010).

En el analizador *Orbitrap*, los iones son inyectados tangencialmente en un campo eléctrico entre los electrodos y quedan atrapados porque su atracción electrostática hacia el electrodo interior es contrarrestada por la fuerza centrífuga. Así los iones dan vueltas alrededor del electrodo central. Adicionalmente, los iones también se mueven delante y detrás a través del eje del electrodo central. Así, los iones con una relación específica masa-carga se mueven en anillos que oscilan alrededor del huso central, la frecuencia de estas oscilaciones armónicas es independiente de la velocidad del ion y es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la relación m/z . Las señales de cada electrodo externo del analizador *Orbitrap* son amplificadas y transformadas en un espectro de frecuencia mediante el algoritmo de transformación rápida de Fourier (FFT) (FFT por sus siglas en ingles *Fast Fourier Transform*) que finalmente se convierten en espectros de masas (Makarov and Scigelova 2010). El analizador *Orbitrap* se caracteriza por una alta resolución (superior a 150000), alta precisión de masa (2-5 ppm), un rango masa-carga de 6000 y un rango dinámico mayor a 10^3 . Cuando el analizador *Orbitrap* está acoplado a una trampa de iones LTQ, el instrumento híbrido tiene las ventajas tanto de alta resolución y precisión de masa del analizador *Orbitrap* como la velocidad y sensibilidad de la trampa de iones LTQ (Yates et al. 2009).

Las condiciones usadas para los experimentos de nanoLC-MS/MS se describen a continuación. La mezcla de péptidos (10 μ l) se cargó y se desaló, en línea, en una pre-columna de fase reversa (*Acclaim PepMap 100 C18*, 100 Å tamaño de poro, 5 mm \times 300 μ m) y luego se resolvió sobre una nanocolumna *C18 Pepmap TM capillary column* (LC Packings) a una velocidad de flujo de 0.3 μ l/min con un gradiente de acetonitrilo/ácido fórmico 1% (v/v) previo a la inyección en la trampa de iones del espectrómetro de masas. Las fases móviles usadas fueron: solvente A, que contenía ácido fórmico 1% (v/v)/agua 100%, y solvente B que contenía ácido fórmico 1% (v/v)/acetonitrilo 80% (v/v). Los péptidos se resolvieron usando un gradiente de 90 min de 5-60% del solvente B (Figura 4). La exploración de los espectros de masas se midió a partir de valores de m/z entre

300 a 1700 con el espectrómetro de masas *LTQ-orbitrap XL*, y la selección se basó en la estrategia TOP 7, que consistió en la selección de datos dependiente de los siete precursores de iones más abundantes. En resumen, un ciclo de escaneo se inició con una exploración completa de los valores *m/z* en el analizador *Orbitrap*, seguido por escaneos de los espectros MS/MS en la trampa de iones lineal de los siete iones precursores más abundantes con exclusión dinámica de iones seleccionados previamente.

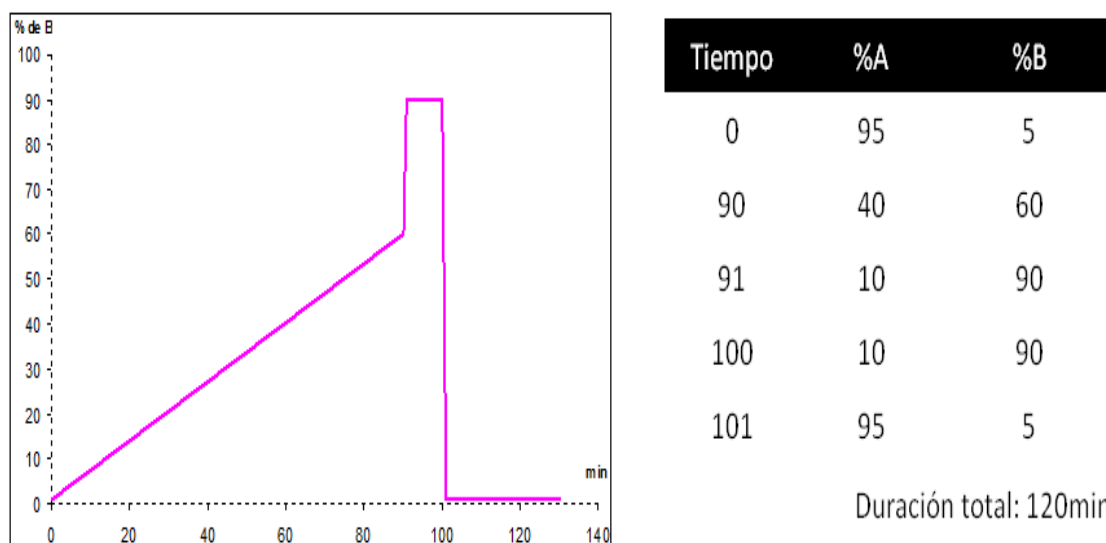


Figura 4. Gradiente usado para la cromatografía líquida de nanoescala

4.5.2.2.4. Identificación de la secuencia de las proteínas de *T. consotensis* a partir de los espectros de masa obtenidos

La identificación de la secuencia de las proteínas de *T. consotensis* se realizó utilizando el programa MASCOT versión 2.2.04 (*Matrix Science*) (www.matrixscience.com) y se utilizó también la base de datos de las secuencias de proteínas obtenidas a partir del genoma de *T. consotensis* para realizar la búsqueda de los espectros masas obtenidos.

El programa *Mascot* se basa en un algoritmo de búsqueda denominado MOWSE (MOWSE por sus siglas en inglés *Molecular Weight Search*). El modelo de MOWSE

permite calcular la probabilidad del emparejamiento de los datos experimentales y de una entrada de una base de datos aleatorios. Las coincidencias usando valores de masa son siempre manipuladas sobre bases probabilísticas. El puntaje total es la probabilidad de que la coincidencia observada sea un evento al azar. El umbral comúnmente aceptado es que un evento es significativo sí es de esperar que se produzca al azar con una frecuencia de menos de 5%, por lo tanto, la coincidencia con la probabilidad más baja es reportada como la mejor coincidencia (Perkins et al. 1999).

Para la identificación de las secuencias de las proteínas de *T. consotensis*, inicialmente se generó una lista de picos con el programa MASCOT DAEMON version 2.3.2 (*MatrixScience*) usando el filtro de importación de datos `extract_msn.exe` de *Xcalibur FT package* version 2.0.7. (*ThermoFisher*). El programa MASCOT DAEMON automatiza el envío de archivos de datos al servidor de MASCOT. Las opciones de filtro de importación de datos establecidas fueron: masa mínima, 400 *m/z*; masa máxima 5000 *m/z*; tolerancia de agrupación, 0; escaneos intermedios, 0; y umbral, 1000. Los espectros de masa se buscaron contra la base de péptido obtenida del genoma de *T. consotensis* con los siguientes parámetros: péptidos trípticos con un máximo de dos errores de clivajes durante la digestión proteolítica, una tolerancia de masa de 5 ppm sobre el ion parental y 0.5 Da sobre los espectros de masa, modificación fija para la carbamidometilación de la cisteína (Cys) (+57.0215) y modificación variable para la oxidación de metionina (Met) (+15.9949). Todos los péptidos que presentaron una coincidencia con un puntaje por encima del umbral fijado a $p < 0.05$ se filtraron usando el programa IRMa 1.28.0. Este programa proporciona una aplicación interactiva para ayudar en la validación de los resultados de búsqueda de MASCOT (Dupierris et al. 2009). Una proteína se consideró válida cuando como mínimo dos diferentes péptidos se detectaron en el mismo experimento. La tasa de falsos positivos para la identificación de péptidos se estimó usando una base de datos “señuelo” por debajo del 0.5% con estos parámetros.

Los datos proteómicos de los espectros de masa se depositaron en el ProteomeXchange Consortium (<http://proteomecentral.proteomexchange.org>) a través de PRIDE con el identificador PXD000094 y el DOI <http://dx.doi.org/10.6019/PXD000094>).

4.5.2.2.5. Análisis comparativo de la abundancia de las proteínas y análisis estadístico

La abundancia de las proteínas identificadas se estimó mediante el conteo del número de espectros de masa por proteína, y se determinó para todas las muestras analizadas por nanoLC-MS/MS. Para determinar el factor de abundancia espectral normalizada (NFSA por sus siglas en inglés *normalized spectral abundance factor*) de cada proteína, los conteos espectrales asignados a cada polipéptido se dividieron por su peso molecular. Los valores se normalizaron posteriormente, por la suma total correspondiente a todos los polipéptidos detectados con dos o más péptidos no redundantes (Christie-Oleza et al. 2012).

La abundancia de proteínas se comparó primero entre la salinidad mínima tolerada y la salinidad de referencia (salinidad óptima de crecimiento) y luego entre la salinidad máxima tolerada y la salinidad de referencia (salinidad óptima de crecimiento). Para cada una de estas dos comparaciones, se estableció la lista de las proteínas no redundantes detectadas entre los seis conjuntos de datos correspondientes y el conteo espectral de cada proteína se usó para clasificar las proteínas de la más alta a la más baja detectada. El análisis estadístico de la variación de la abundancia de las proteínas entre las replicas de las dos condiciones de salinidad comparadas se realizó empleando el programa PatternLab 2.0 (Carvalho et al. 2008). Las comparaciones se realizaron utilizando la opción T-Fold, que permite la normalización de los datos de los conteos espectrales, calculando el promedio de las veces de cambio (*fold change*) que sean estadísticamente significativos (prueba de *t-student*), y la estimación de la tasa de falsos positivos teóricos resultantes. La normalización se realizó teniendo en cuenta el número total de conteos espectrales para cada muestra, teniendo al menos dos lecturas por proteína. Los parámetros usados para este análisis fueron *fold change* mínimo de 1.5, *p-value* de 0.05, y un BH-FDR Alfa de 0.15.

4.5.2.2.6. Análisis de proteínas y anotación funcional

La identificación de las proteínas se realizó mediante el análisis de la similitud de secuencias, con un alineamiento PSI-BLAST (*Position Specific Iterative Basic Local*

Alignment Search Tool) usando la base de datos de la NCBI (NCBI por sus siglas en inglés *National Center for Biotechnology Information*) (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov). El programa PSI-BLAST se usa para encontrar parientes lejanos de una proteína o nuevos miembros de una familia de proteínas. El punto isoeléctrico de las proteínas identificadas en este estudio se determinó usando el programa ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>), este programa permite el cálculo de diversos parámetros físico-químicos para una determinada proteína. Los parámetros calculados incluyen el peso molecular, pI teórico, la composición de aminoácidos y composición atómica.

La anotación funcional de todas las proteínas identificadas en este estudio se confirmó usando la base de datos de KEEG (KEEG por sus siglas en inglés *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (www.genome.jp/kegg/). KEEG es una colección de bases de datos en línea que conecta la información conocida en redes de interacciones moleculares, como rutas enzimáticas, información de genes y proteínas generadas por proyectos de genómica e información acerca de compuestos bioquímicos y sus reacciones. Adicionalmente, se usaron las bases de datos Uniprot (<http://www.uniprot.org/>), InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) y Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), para complementar la anotación funcional de las proteínas detectadas en este estudio. Uniprot (Uniprot por sus siglas en inglés *universal protein resource*) es una base de datos accesible en línea, que se deriva de la consolidación de todos los datos generados por la comunidad científica. UniProt es una base de datos curada manualmente, donde cada secuencia se acompaña de un completo conjunto de metadatos y enlaces a muchas otras bases de datos. InterPro es una base de datos de familias de proteínas, dominios y sitios funcionales en los que las características identificables que se encuentran en las proteínas conocidas se pueden aplicar a nuevas secuencias de proteínas con el fin de caracterizarlas funcionalmente. El contenido de InterPro se basa entorno a firmas de diagnóstico y las proteínas que coincidan significativamente. Las firmas consisten en modelos (tipos simples, como las expresiones regulares o los más complejos, como los modelos ocultos de Markov) que describen las familias de proteínas, dominios o sitios. Los modelos se construyen a partir de las secuencias de aminoácidos de las familias o dominios conocidos y se utilizan posteriormente para buscar secuencias desconocidas con el fin de clasificarlos. InterPro integra información de las bases de datos PROSITE, Pfam, PRINTS, ProDom, SMART, TIGRFAMs, PIRSF, SUPERFAMILY, GENE3D y PANTHER así como Swiss-Prot y

TrEMBL. Pfam es una base de datos de familias de proteínas y consta de dos partes: Pfam-A y Pfam-B. Pfam-A es una colección de familias de proteínas de dominio anotadas, que incluye alineamientos múltiples de secuencias y modelos ocultos de Markov. Pfam-B es un complemento a Pfam-A y contiene un gran número de pequeñas familias automáticamente agrupadas dentro de la base de datos ProDom. Para cada familia en Pfam se puede ver alineamientos múltiples, revisar la arquitectura y organización de los dominios proteicos, examinar la distribución de especies y observar estructuras proteicas conocidas (Chang 2005).

El péptido señal es un péptido corto (5-30 aminoácidos de longitud) presente el extremo N-terminal de la mayoría de las proteínas recién sintetizadas que se destina hacia la vía secretora. El péptido señal decide sobre el destino, la ruta de transporte y la eficiencia de secreción de una proteína (Dalbey and Kuhn 2012). Para la predicción de péptidos señales de las proteínas detectadas en mayor abundancia en el exoproteoma de *T. consotensis* se utilizaron los programas MetaLocGramN (<http://genesilico.pl/MetaLocGramN/>), SecretomeP 2.0, donde se fijaron los parámetros para bacterias Gram-negativas (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) y PRED-TAT (<http://www.compgen.org/tools/PRED-TAT>). MetaLocGramN es un meta-predicador de la localización subcelular de las proteínas de bacterias Gram-negativas. Este meta-predicador combina métodos primarios de predicción de localización celular de bacterias Gram-negativas, como PSORTb3, PSLpred, CELLO, y SOSUI-GramN, y con base a sus resultados clasifica las secuencias de proteínas en una de las cinco principales localizaciones de la célula bacteriana Gram-negativa: citoplasma, membrana plasmática, periplasma, la membrana externa, y el espacio extracelular (Magnus et al. 2012). SecretomeP produce predicciones *ab initio* de rutas de secreción no clásicas, es decir, rutas donde la secreción nos es dirigida por un péptido señal. Este método realiza búsquedas en otros servidores de predicción para obtener información sobre diversos aspectos de modificaciones post-traduccionales y localización subcelular, y finalmente integra esta información en la predicción de secreción final (Bendtsen et al. 2005). PRED-TAT es un predictor de péptido señal para las rutas de secreción Sec y Tat y predice sus sitios de clivaje. Este método se basa en modelos ocultos de Markov y posee una arquitectura modular para péptidos señal de las rutas de secreción Sec y Tat (Bagos et al. 2008).

A partir de la identificación de las proteínas expresadas diferencialmente por *T. consotensis* en respuesta a las salinidades evaluadas se realizó un análisis conjunto de la información obtenida para determinar los posibles mecanismos moleculares implicados en la adaptación a cambios en la salinidad externa.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis comparativo de la expresión de proteínas de *T. consotensis* bajo condiciones cambiantes de salinidad externa se llevó a cabo utilizando dos estrategias proteómicas. Por un lado, se empleó la técnica de electroforesis bidimensional para evaluar los cambios en el proteoma en respuesta a los cambios de salinidad del medio, y posteriormente se usó la aproximación proteómica denominada *shotgun proteomics* la cual permitió un estudio detallado de las proteínas implicadas en la respuesta celular de *T. consotensis* bajo las condiciones de salinidad evaluadas. A continuación se reportan y discuten los resultados obtenidos, primero se mencionan los parámetros que se tuvieron en cuenta con respecto a la producción de biomasa de *T. consotensis* a partir de los cuales se colectó la biomasa necesaria para la extracción de proteínas extra e intracelulares, posteriormente se reporta la estandarización de los protocolos de extracción de proteínas extra e intracelulares, y finalmente se describe el análisis tanto de los mapas proteómicos obtenidos por electroforesis bidimensional como de las proteínas diferencialmente expresadas detectadas por espectrometría de masas.

5.1. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE FUENTES DE NITRÓGENO ORGÁNICO EN EL CRECIMIENTO DE *T. consotensis*

Con el fin de obtener una alta producción de biomasa de *T. consotensis* para asegurar una alta concentración de proteínas extraídas se evaluaron dos fuentes de nitrógeno orgánico, ya que Diaz-Cárdenas et al. (2010) reportó que la presencia de este tipo de compuestos aunque no son requeridos para el crecimiento si permiten un incremento en la producción de biomasa de esta bacteria. En este estudio se evaluaron diferentes concentraciones de peptona (1 y 2 g·l⁻¹) y extracto de levadura (1 y 2 g·l⁻¹).

El seguimiento del crecimiento de *T. consotensis* a partir de la medición de la D.O.580nm en presencia de las fuentes orgánicas de nitrógeno evaluadas se encuentra en la Figura 5. En presencia de extracto de levadura a una concentración de 1 y 2 g·l⁻¹ *T. consotensis* presentó una absorbancia de 0.5 y 0.68, respectivamente, a la hora 24 de crecimiento que

corresponde a la mitad de la fase exponencial, mientras que en presencia de peptona a una concentración de 1 y 2 g·l⁻¹ se registraron valores de absorbancia de 0.39 y 0.5, respectivamente.

Estos resultados indican que con extracto de levadura *T. consotensis* incrementa más rápido la producción de su biomasa en comparación con la peptona. Teniendo en cuenta que a una concentración de 2 g·l⁻¹ de extracto de levadura se registró la mayor D.O., esta condición se seleccionó para obtener los cultivos de *T. consotensis* a partir de los cuales fueron extraídas sus proteínas extra e intracelulares.

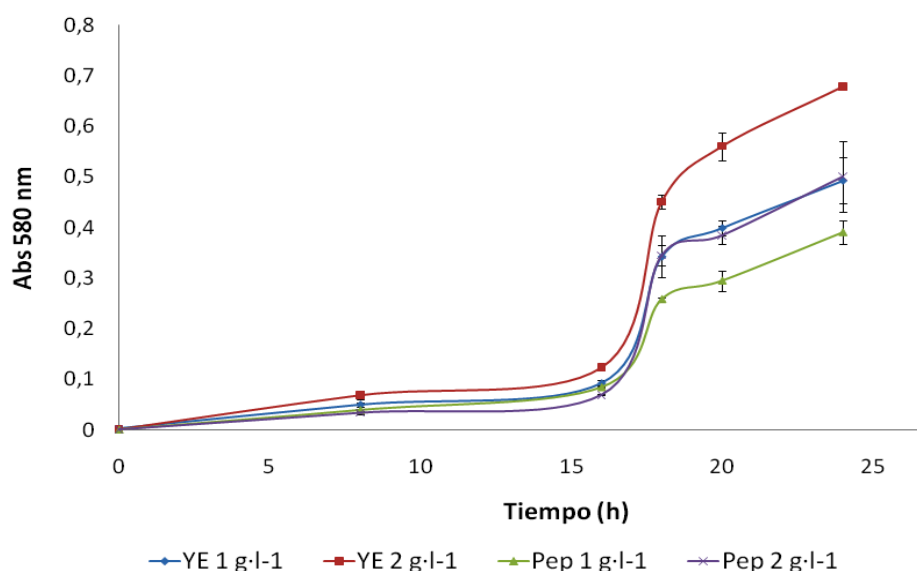


Figura 5. Evaluación de la influencia de fuentes de nitrógeno orgánico, extracto de levadura y peptona, en el crecimiento de *T. consotensis*. Cada punto en la grafica representa el valor medio de dos réplicas.

5.2. PATRÓN DE CRECIMIENTO DE *T. consotensis* EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NaCl

La curva de peso seco permitió determinar que en la concentración óptima de sal (5 g·l⁻¹ NaCl) la mitad de la fase exponencial (D.O._{580 nm} entre 0.4-0.5) corresponde a una concentración de células de *T. consotensis* de ~480 µg células.ml⁻¹ (Anexo 3). Este valor

de D.O. se tuvo en cuenta para establecer la concentración celular de los inóculos usados durante este estudio.

Para determinar los rangos de salinidad y la salinidad óptima de crecimiento de *T. consotensis*, esta bacteria se cultivó en diferentes concentraciones de NaCl. Como se observa en la Figura 6, *T. consotensis* crece en un rango de salinidad entre 0 y 40 g·l⁻¹ y presenta una concentración óptima de NaCl a 5 g·l⁻¹, donde se obtuvo la mayor velocidad de crecimiento (μ_{esp} de 0.125 h⁻¹), mientras que a 0 y 40 g·l⁻¹ se obtuvo menos de la mitad de este valor (μ_{esp} de 0.045 h⁻¹ y 0.053 h⁻¹ para 0 g·l⁻¹ y 40 g·l⁻¹ NaCl, respectivamente), a la mitad de la fase exponencial.

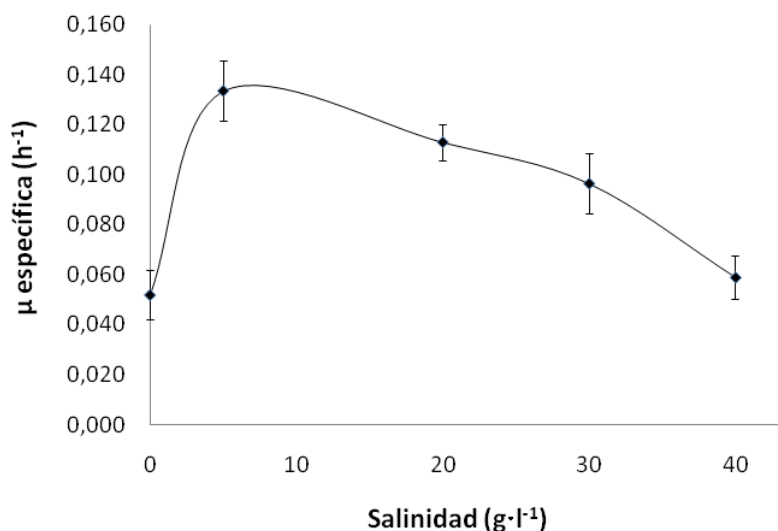


Figura 6. Velocidad específica de crecimiento (μ_{esp}) de *T. consotensis* cultivada en diferentes salinidades: 0, 5, 20, 30 y 40 g·l⁻¹ NaCl. Cada punto en la grafica representa el valor medio de dos réplicas.

La disminución significativa de la velocidad de crecimiento de *T. consotensis* a 0 y 40 g·l⁻¹ NaCl probablemente está relacionada con su respuesta frente a cambios en la salinidad en el medio. Saum & Müller (2008b) sugieren que el proceso complejo de producción de osmolitos necesarios para alcanzar el balance osmótico puede generar una disminución de la velocidad de crecimiento y un incremento de la fase de adaptación, lo cual podría explicar las diferencias encontradas en este estudio.

5.3. ANÁLISIS CUALITATIVO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE *T. consotensis* EN RESPUESTA A CAMBIOS DE SALINIDAD EMPLEANDO LA TÉCNICA DE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

En los estudios proteómicos es de suma importancia la estandarización de técnicas y métodos que aseguren la obtención de fracciones adecuadas para la realización de electroforesis bidimensional. En consecuencia, la apropiada preparación de las muestras es esencial para obtener resultados confiables y reproducibles en un análisis proteómico (Jiang et al. 2004).

Por lo tanto, en este estudio inicialmente se evaluaron diferentes métodos de precipitación de proteínas extracelulares y diferentes tampones de lisis de proteínas intracelulares con fin de determinar los métodos que permitieran una mayor recuperación de proteínas extra e intracelulares, respectivamente, en *T. consotensis*. Del mismo modo, se estableció un protocolo de limpieza de proteínas y de isoelectroenfoque que permitió una apropiada separación de las proteínas.

5.3.1. Extracción de proteínas extracelulares

Para la extracción de las proteínas extracelulares de *T. consotensis* se evaluaron tres métodos de precipitación que consistieron en el uso de ácido tricloroacético, acetona y sulfato de amonio. La cuantificación de las proteínas extracelulares de *T. consotensis* obtenidas después del proceso de precipitación y su correspondiente electroforesis unidimensional se encuentra en la Figura 7. La concentración de proteínas extracelulares obtenidas varió significativamente en cada método, donde la precipitación de proteínas empleando ácido tricloroacético permitió una mayor recuperación de proteínas extracelulares ($11.8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en comparación con los otros métodos evaluados (3.4 y $0.7 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para la acetona y el sulfato de amonio, respectivamente). Aunque el método de precipitación con ácido tricloroacético permitió la mayor recuperación de proteínas, es importante aclarar que la concentración obtenida a partir de este método es baja, teniendo en cuenta que para los geles bidimensionales se debe cargar a las tiras IPG una concentración de $200 \mu\text{g}$.

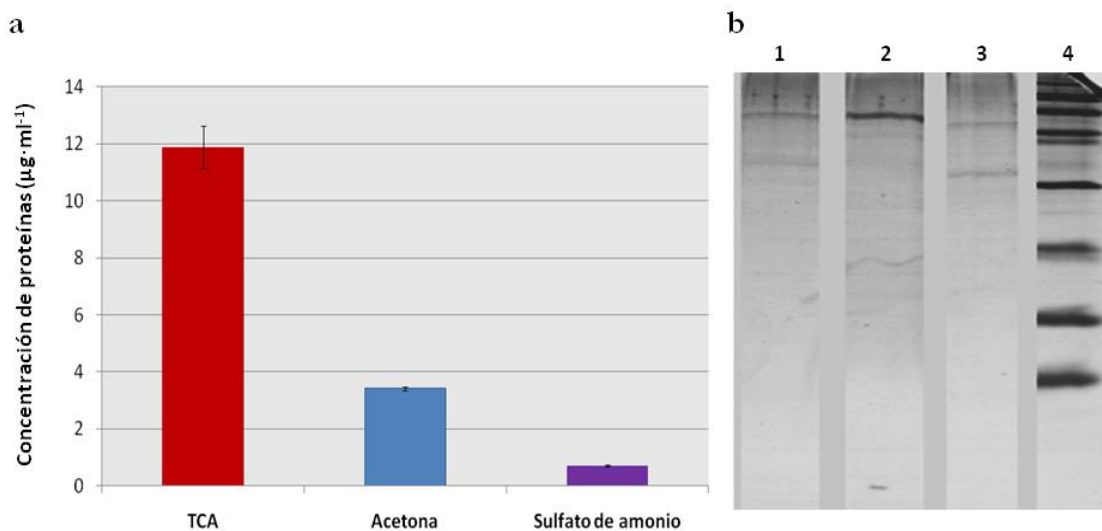


Figura 7. Evaluación de diferentes métodos de precipitación de las proteínas extracelulares obtenidas a partir del cultivo de *T. consotensis* en su salinidad óptima de crecimiento. **(a)** Cuantificación de las proteínas (µg·ml⁻¹) extracelulares. **(b)** Electroforesis unidimensional (SDS, Gel 10 % a 100 voltios) de las proteínas extracelulares obtenidas a partir de los diferentes métodos de precipitación. Carril 1, TCA; carril 2, acetona; carril 3, sulfato de amonio; carril 4, marcador de peso molecular.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Jiang et al. (2004), donde se determinó que el uso de ácido tricloroacético y acetona son los métodos que permiten una mayor recuperación de proteínas extracelulares. El uso de ácido tricloroacético es uno de los métodos de precipitación más efectivos, ya que compite por los puentes de hidrógeno que se forman entre agua y las proteínas generando la desnaturalización de las proteínas (Görg et al. 2004). Teniendo en cuenta la concentración de proteínas obtenidas, el método de precipitación con ácido tricloroacético se seleccionó para realizar la extracción de proteínas extracelulares de *T. consotensis*.

5.3.2. Extracción de proteínas intracelulares

Para la extracción de proteínas intracelulares de *T. consotensis* se evaluaron cuatro tampones, el tampón A y B, son tampones de lisis comúnmente empleados en protocolos de extracción de proteínas mientras que los tampones C y D han sido reportados para la

extracción de proteínas de los organismos halófilos *H. dabanensis* (Feng et al. 2007) y *H. salinarum*, respectivamente (Cho et al. 2003). La cuantificación de proteínas intracelulares de *T. consotensis* obtenidas con los tampones evaluados se encuentra en la Figura 8.

Los tampones de lisis que permitieron una mayor recuperación de proteínas intracelulares fueron los tampones A y C, con una concentración de proteínas de 94 y 140 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente. Estos tampones presentaban una concentración mayor de urea en comparación con los tampones B y D. La urea es un compuesto caotrópico, usado como agente denaturante ya que es bastante eficiente en la ruptura de puentes de hidrógeno conduciendo al desplegamiento y desnaturalización de las proteínas (Görg et al. 2004).

La alta concentración de proteínas intracelulares obtenidas con el uso del tampón de lisis C es también explicada por la presencia de la tiourea y la lisozima. La tiourea, es estructuralmente similar a la urea a excepción de que el átomo de oxígeno es reemplazado por un átomo de azufre, y es más adecuado para romper interacciones hidrofóbicas (Görg et al. 2004). Por lo tanto, el uso combinado de urea y tiourea en el tampón de lisis es ideal, ya que permitió una mayor recuperación de proteínas intracelulares. De otra parte, la lisozima es una enzima que daña las células bacterianas catalizando la hidrólisis de las uniones beta 1,4 entre los residuos de los ácidos N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina en el peptidoglicano de la pared celular (López 2007). El uso de la lisozima en el tampón de lisis junto con el proceso de sonicación asegura la liberación completa de las proteínas intracelulares y contribuye a su mayor recuperación. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, el tampón de lisis C se seleccionó para realizar la extracción de proteínas intracelulares de *T. consotensis*.

5.3.3. Optimización del protocolo de electroforesis bidimensional

Las muestras utilizadas para el análisis proteómico mediante geles bidimensionales deben estar libres de sal y otros factores como detergentes iónicos, ácidos nucleicos y lípidos, que pueden interferir con la electroforesis bidimensional (López 2007). Para asegurar la eliminación de interferentes en la electroforesis bidimensional las proteínas intracelulares obtenidas se limpiaron empleando el *kit ReadyPrep 2-D Clean-up*. La

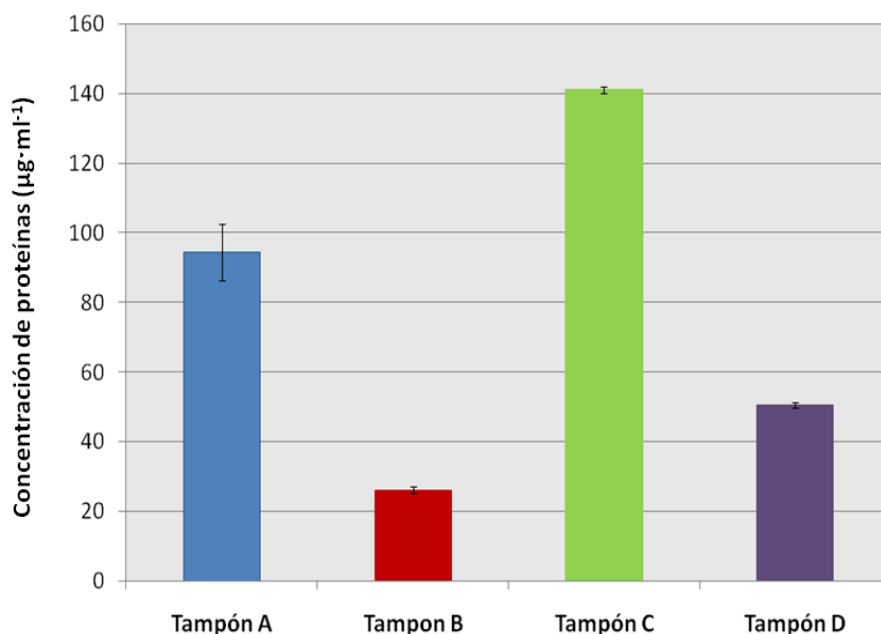


Figura 8. Concentración de las proteínas ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) intracelulares de *T. consotensis* utilizando diferentes tampones de lisis. Las proteínas intracelulares se obtuvieron a partir del cultivo de *T. consotensis* en su salinidad óptima de crecimiento.

electroforesis unidimensional de las proteínas intracelulares de *T. consotensis* extraídas a $0\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, $5\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl y $40\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl antes y después del proceso de limpieza se encuentra en la Figura 9, donde se observa una mejor integridad de las proteínas que fueron sometidas al proceso de limpieza con el *kit ReadyPrep 2-D Clean-up*.

Además, en los geles bidimensionales de las proteínas intracelulares obtenidas a partir del cultivo de *T. consotensis* a $5\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl se observa que en ausencia del protocolo de limpieza las proteínas no son correctamente isoelectrofocalizadas, lo cual no permitió una adecuada separación de las proteínas (Figura 10). Los problemas de isoelectroenfoco son probablemente ocasionados por la presencia de una alta concentración de NaCl, la cual proviene del medio de cultivo de *T. consotensis*, ya que concentraciones de sal superiores a $2.3\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ impiden que las proteínas migren correctamente hasta su punto isoelectro. El uso del *kit* de limpieza para las proteínas intracelulares de *T. consotensis* disminuyó la presencia de líneas horizontales de los geles y mejoró considerablemente la resolución de

las manchas proteicas en comparación con el gel obtenido para las proteínas que no fueron sometidas al procesos de limpieza.

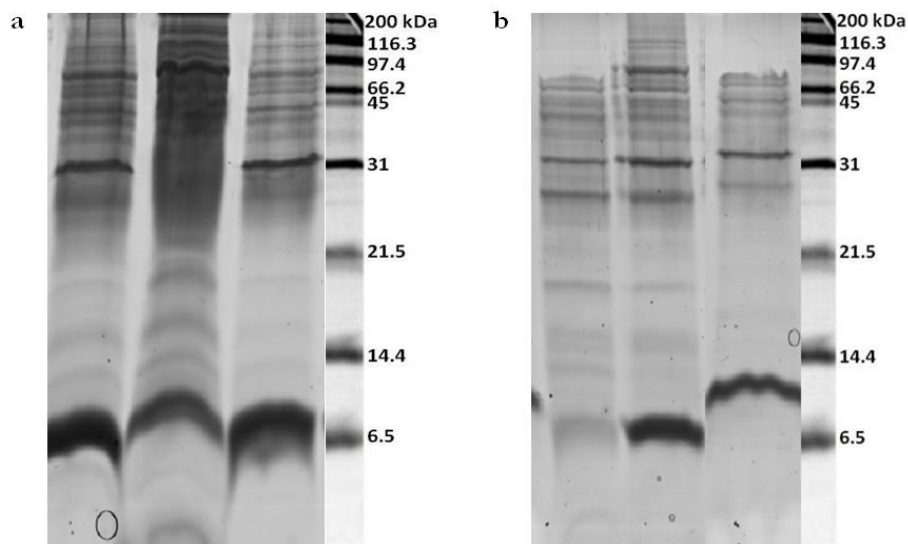


Figura 9. Electroforesis unidimensional (SDS, Gel 10 % a 100 voltios) de las proteínas intracelulares de *T. consotensis* con y sin proceso de limpieza. **(a)** Proteínas sin proceso de limpieza, **(b)** Proteínas con proceso de limpieza. Carril 1, proteínas obtenidas a partir del cultivo de *T. consotensis* a $0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; carril 2, proteínas obtenidas a partir del cultivo de *T. consotensis* a $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; carril 3, proteínas obtenidas a partir del cultivo de *T. consotensis* a $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; y carril 4, marcador de peso molecular SDS-PAGE de amplio rango (Bio-Rad). Tinción con *Blue Silver*. La concentración de la proteína adicionada a cada gel fue de $200 \mu\text{g}$

De acuerdo con los resultados obtenidos, el proceso de limpieza usando el *kit ReadyPrep 2-D Clean-up* se realizó para las proteínas intracelulares extraídas a partir de las salinidades evaluadas, ya que permitió una correcta separación de las proteínas en los geles bidimensionales.

Una vez establecidos los protocolos apropiados para la extracción de proteínas extra e intracelulares, se procedió a realizar los geles bidimensionales de las dos fracciones del proteoma de *T. consotensis*. Sin embargo, es importante aclarar que para la fracción

extracelular no se logró visualizar manchas proteicas en los geles bidimensionales, debido probablemente a la baja concentración de proteínas recuperadas después del proceso de precipitación con ácido tricloroacético. Por ende, el análisis de los cambios de expresión de proteínas de *T. consotensis* en respuesta a cambios en la salinidad se evaluó únicamente en la fracción intracelular.

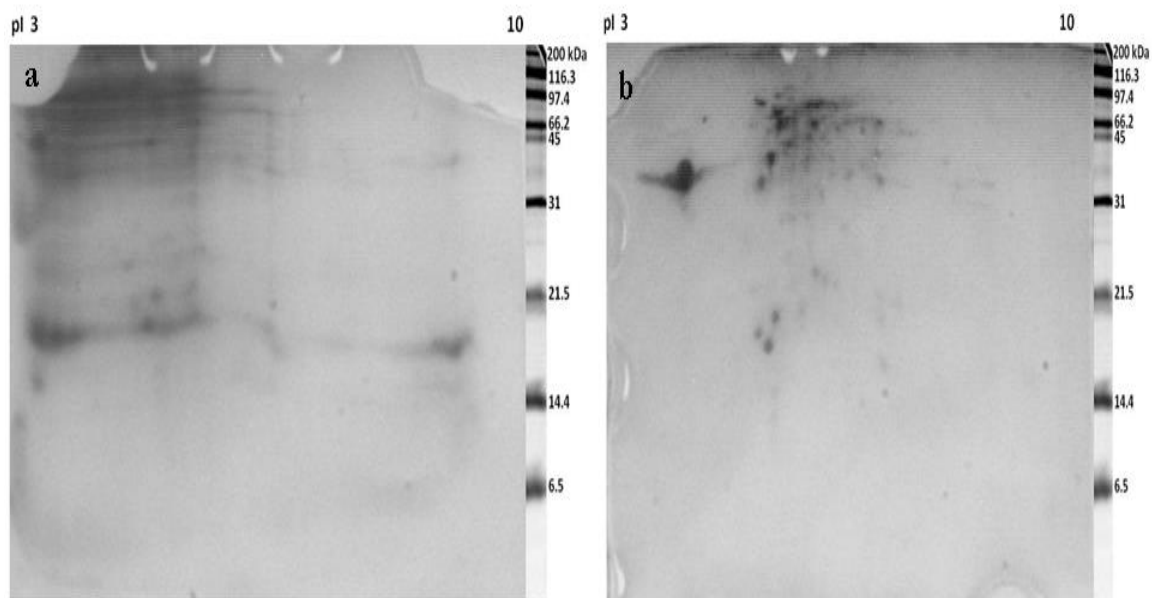


Figura 10. Mapas proteómicos de las proteínas intracelulares extraídas a partir del cultivo de *T. consotensis* a $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, con y sin proceso de limpieza. **(a)** Mapa proteómico sin limpieza de las proteínas obtenidas **(b)** Mapa proteómico con limpieza de las proteínas obtenidas. La primera dimensión se realizó en tiras IPG pH 3-10NL, 7 cm. La segunda dimensión se realizó usando el sistema Mini-PROTEAN *Tetra Cell* con geles de poliacrilamida-SDS al 12%. Tinción con *Blue Silver*. La concentración de la proteína adicionada a cada gel fue de $200 \mu\text{g}$

Las proteínas intracelulares de *T. consotensis* a $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ obtenidas inicialmente se separaron utilizando tiras IPG de amplio rango pH (3-10), donde se observó que la mayoría de las manchas proteicas se agrupó en un rango de pH entre 4.0 y 7.0 (Figura 11). Por lo tanto, los siguientes experimentos se llevaron a cabo utilizando tiras IPG con un rango de pH estrecho (3-6) para obtener una mejor visibilidad y resolución.

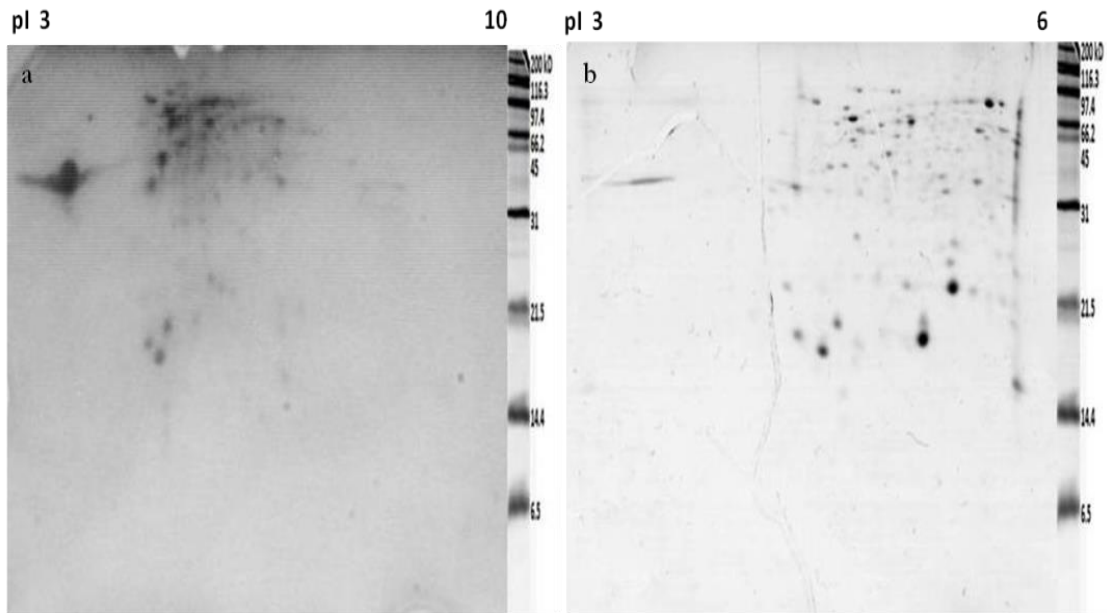


Figura 11. Mapas proteómicos de las proteínas intracelulares extraídas a partir del cultivo de *T. consotensis* a $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, empleando tiras IPG con diferentes rangos de pH. **(a)** Mapa proteómico usando tiras IPG pH 3-10NL. **(b)** Mapa proteómico usando tiras IPG pH 3-6NL. La primera dimensión se realizó en tiras IPG (pH 3-10NL y pH 3-6NL, 7 cm). La segunda dimensión se realizó usando el sistema Mini-PROTEAN *Tetra Cell* con geles de poliacrilamida-SDS al 12%. Tinción con *Blue Silver*. La concentración de la proteína adicionada a cada gel fue de $200 \mu\text{g}$

5.3.4. Electroforesis bidimensional de las proteínas intracelulares de *T. consotensis*

Para la elaboración de los geles bidimensionales que fueron utilizados en el análisis cualitativo del perfil de expresión de proteínas intracelulares de *T. consotensis*, las proteínas fueron extraídas nuevamente utilizando el protocolo de extracción previamente establecido. Los geles bidimensionales obtenidos de las proteínas intracelulares extraídas a $0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ y $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ se encuentran en la Figura 12. Los geles bidimensionales obtenidos fueron el resultado de la correcta extracción, limpieza y separación de las proteínas que permitió obtener una gran variedad de especies proteicas, bien definidas como manchas en los geles bidimensionales. El resultado fue adecuado evidenciando la correcta separación de las proteínas debido a la buena extracción, limpieza y separación de las proteínas para que puedan ser evaluadas cualitativamente.

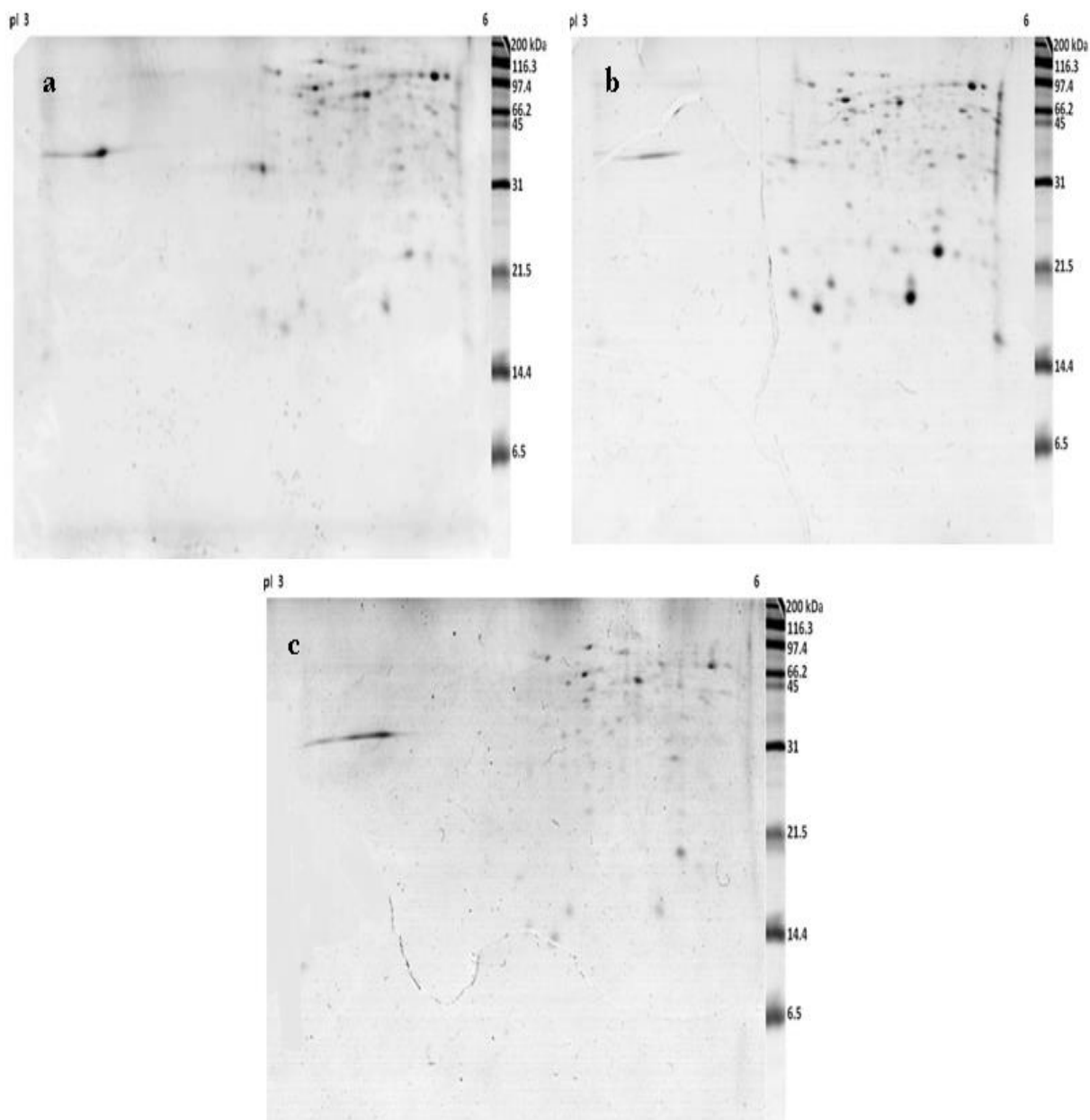


Figura 12. Mapas proteómicos de las proteínas intracelulares de *T. consotensis* obtenidas por electroforesis bidimensional. **a.** Mapa proteómico de las proteínas extraídas a $0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl. **b.** Mapa proteómico de las proteínas extraídas a $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl. **c.** Mapa proteómico de las proteínas extraídas a $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl. La primera dimensión se realizó en tiras IPG pH 3-6NL, 7 cm. La segunda dimensión se realizó usando el sistema Mini-PROTEAN *Tetra Cell* con geles de poliacrilamida-SDS al 12%. Tinción con *Blue Silver*. La concentración de la proteína adicionada a cada gel fue de $200 \mu\text{g}$.

5.3.5. Análisis del perfil de expresión de proteínas de *T. consotensis* a partir de los mapas proteómicos obtenidos en cada salinidad

A partir de los mapas proteómicos de *T. consotensis* obtenidos en las tres salinidades evaluadas se identificaron 100 manchas proteicas, las cuales se distribuyeron en un rango de masa atómica de 16 a 150 kDa y un punto isoeléctrico (pI) entre 3.5 y 5.8, y sólo una mancha proteica, detectada en las tres condiciones, presentó un pI de 3.5 (Anexo 4). Este patrón de distribución de proteínas a pH por debajo de 7.0 podría indicar una tendencia ácida del proteoma de *T. consotensis*. Estos resultados coinciden con lo reportado para microorganismos halófilos como *Halobacterium* NRC-1 (Shukla 2006), *Halomonas* sp. AAD12 (Ceylan et al. 2012), *C. salexigens* (Oren et al. 2005) y *Salinibacter ruber* (Oren 2013), donde predominan proteínas de naturaleza ácida. Este carácter ácido puede estar relacionado con un aumento de residuos de carga negativa (Asp y Glu) en la superficie de las proteínas, que conduce a la organización de una capa de hidratación de los iones de sal en la superficie de las mismas y a la formación de puentes de sal con residuos básicos estratégicamente posicionados, lo cual proporciona mayor estabilidad a las proteínas en presencia de altas concentraciones de sal (Capes et al. 2012).

La Figura 13 muestra una representación de un diagrama de Venn para comparar el número de manchas proteicas identificadas en cada salinidad. Se identificaron 69, 77 y 18 manchas proteicas a 0, 5 y 40 g·l⁻¹ de salinidad, respectivamente, y 17 manchas proteicas fueron comunes en las tres salinidades, las cuales representan ~17% de las proteínas identificadas.

La distribución de las manchas proteicas con cambios significativos en su nivel de expresión en las diferentes salinidades evaluadas se encuentra en la Tabla 7. En total se identificaron 56 manchas proteicas con cambios significativos en su expresión ($p < 0,05$), las cuales presentaron un pI entre 4.5 y 5.8 (Anexo 4). El perfil de expresión de proteínas de *T. consotensis* observado en las diferentes salinidades evaluadas demostró que la concentración de NaCl del medio conduce a una reprogramación substancial de su proteoma. Previos estudios han demostrado una variación de la expresión de proteínas del 10-30% en *H. dabanensis* (Feng et al. 2007), *Halomonas* sp. AAD12 (Ceylan et al.

2012) y *L. monocytogenes* (Duché et al. 2002), en respuesta a cambios en la concentración de NaCl. Estos resultados contrastan con nuestros resultados sugiriendo que cada salinidad requiere un gran número de proteínas especializadas.

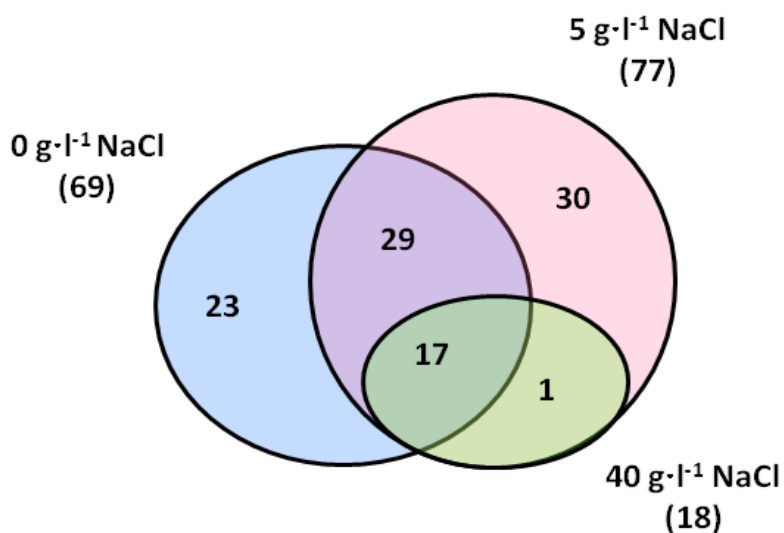


Figura 13. Diagrama de Venn mostrando el número de manchas proteicas detectadas en *T. consotensis* en las tres salinidades evaluadas.

Adicionalmente, se observó que la mayoría de las manchas proteicas con cambios significativos en su expresión presentó una disminución de su expresión con el aumento de la salinidad en el medio, indicando que la expresión de proteínas en *T. consotensis* es afectada por la presencia de altas concentraciones de NaCl. Este resultado coincide con los estudios proteómicos reportados para *B. subtilis* (Höper et al. 2006a) y la cianobacteria *Eubhalothece* sp. BAA001 (Pandhal et al. 2008), donde se observó que la síntesis de proteínas del metabolismo central disminuyó en respuesta al aumento de la concentración externa de sal, lo cual se debe probablemente a que en respuesta a estrés hiper-osmótico ocurre una sub-regulación de genes *housekeeping* que no son necesarios para la supervivencia, mientras se activan otros cuya función podría estar relacionada con la protección de la célula (Leuko et al. 2009).

Tabla 7. Distribución de las manchas proteicas que presentaron cambios significativos de expresión en las diferentes salinidades evaluadas

Distribución	No. manchas proteicas	Código de manchas proteicas
Aumento de la expresión a 0 g·l ⁻¹ NaCl	22	7, 10, 16, 17, 25, 26, 31, 33, 43, 44, 50, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 80, 82, 88, 98, 99
Disminución de la expresión a 0 g·l ⁻¹ NaCl	5	4, 5, 13, 64, 90
Solo expresados a 0 g·l ⁻¹ NaCl	23	2, 3, 9, 14, 18, 22, 30, 32, 34, 46, 49, 51, 52, 59, 60, 63, 73, 75, 77, 78, 89, 93, 95
Aumento de la expresión a 40 g·l ⁻¹ NaCl	0	
Disminución de la expresión a 40 g·l ⁻¹ NaCl	6	5, 8, 13, 15, 19, 29
Total	56	

En ausencia de NaCl, 50 manchas presentaron cambios significativos en su nivel de expresión ($p < 0,05$) en comparación con la salinidad óptima de crecimiento de *T. consotensis* (5 g·l⁻¹ NaCl). El perfil de proteínas que presentaron cambios en su nivel de expresión a 0 g·l⁻¹ NaCl se muestra en la Figura 14a. Asimismo, en la Figura 14b se observa el valor de intensidad óptica promedio de las manchas proteicas que presentaron cambios significativos de expresión a 0 g·l⁻¹ NaCl. A partir del análisis de los geles bidimensionales se detectaron 22 manchas proteicas sobre-expresadas que podrían tener una función importante en la respuesta adaptativa de *T. consotensis* frente a una disminución de salinidad del medio.

La adaptación a estrés hipo-osmótico requiere de una rápida respuesta y una efectiva protección, en la cual generalmente están involucradas proteínas contra estrés general, ya que la mayoría de las proteínas puede ser parcialmente desnaturizada bajo una dilución de iones en el medio exterior debido a la entrada de agua a la célula (Ambily Nath and Loka Bharathi 2011). Algunas de las proteínas contra estrés general involucradas en la respuesta celular frente a una disminución repentina de la salinidad presentan

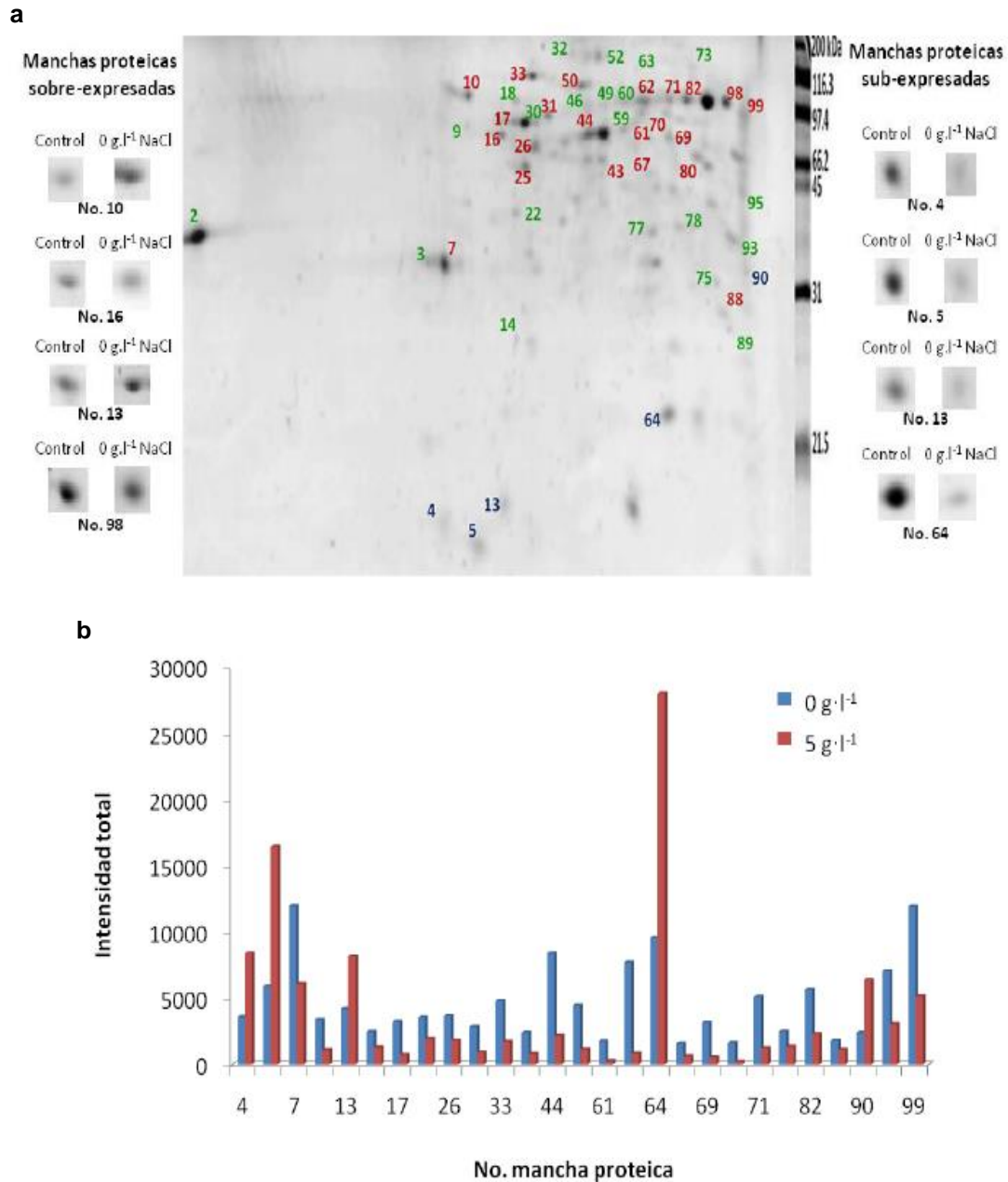


Figura 14. Perfil proteómico de *T. consotensis*, cultivada en presencia de $0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl. 50 manchas proteicas presentaron cambios significativos de expresión en ausencia de NaCl ($p < 0,05$). Imágenes ampliadas de algunas manchas proteicas sobre- y sub- expresadas son mostradas, en comparación con la salinidad control ($5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl). En la parte inferior se encuentra el grafico de la intensidad total de las manchas proteicas sobre- y sub-expresadas a $0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Cada barra representa el valor medio de dos replicas (geles).

pesos moleculares de 98, 85, 79, 70, 60, 46 y 21 kDa (Mojica et al. 1997). La sobre-expresión, en respuesta a choque hipo-osmótico, de proteínas contra estrés general con masa molecular entre 90 y 40 kDa ha sido reportada en *H. elongata* (42, 60 y 72 kDa) (Mojica et al. 1997), *H. volcanii* (45, 85, 70 y 79 kDa) (Daniels et al. 1984) y *Haloarcula marismortui* (Gupta and Singh 1992) (70 kDa). En este estudio se identificó la sobre-expresión de manchas proteicas de 60 kDa (mancha No. 67), 70kDa (manchas No. 63 y 80) y 85 kDa (mancha No. 16) cuando *T. consotensis* se cultivó en ausencia de NaCl, las cuales podrían estar relacionadas con proteínas contra estrés general.

De otra parte, cinco manchas proteicas disminuyeron su expresión significativamente en ausencia de sal mientras que 31 manchas proteicas desaparecieron en esta salinidad. Estas manchas proteicas probablemente no son requeridas para la supervivencia de *T. consotensis* en respuesta a una disminución de la salinidad en el medio.

En la máxima salinidad tolerada por *T. consotensis*, 40 g·l⁻¹ NaCl, no se detectó la sobre-expresión o inducción de ninguna mancha proteica ($p > 0,05$), mientras que seis manchas proteicas (5, 8, 13, 15, 19 y 29) (Figura 15) presentaron una disminución significativa ($p < 0,05$) en su nivel de expresión y 82 manchas proteicas desaparecieron a 40 g·l⁻¹ NaCl.

El estudio de la alteración transcripcional de *E. coli* en respuesta a estrés hiper-osmótico realizado por Weber & Jung (2002) reportó que la sub-expresión de genes que codifican para componentes de las subunidades ribosomales 50S y 30S, y para proteínas involucradas en rutas del metabolismo central y biosíntesis de aminoácidos podría estar asociada con la disminución de la tasa de crecimiento bajo condiciones de estrés hiper-osmótico. Este argumento podría explicar el patrón de expresión de *T. consotensis* a 40 g·l⁻¹ NaCl de salinidad, donde se observó un mayor número de manchas proteicas sub-expresadas en comparación con las sobre-expresadas (6 vs. 0).

Por otro lado, la expresión de cuatro manchas proteicas (5, 13, 15 y 29) disminuyó significativamente ($p < 0,05$) a 0 y 40 g·l⁻¹ NaCl, en comparación con la salinidad óptima, mientras que 30 manchas proteicas no se detectaron en la salinidad mínima y máxima

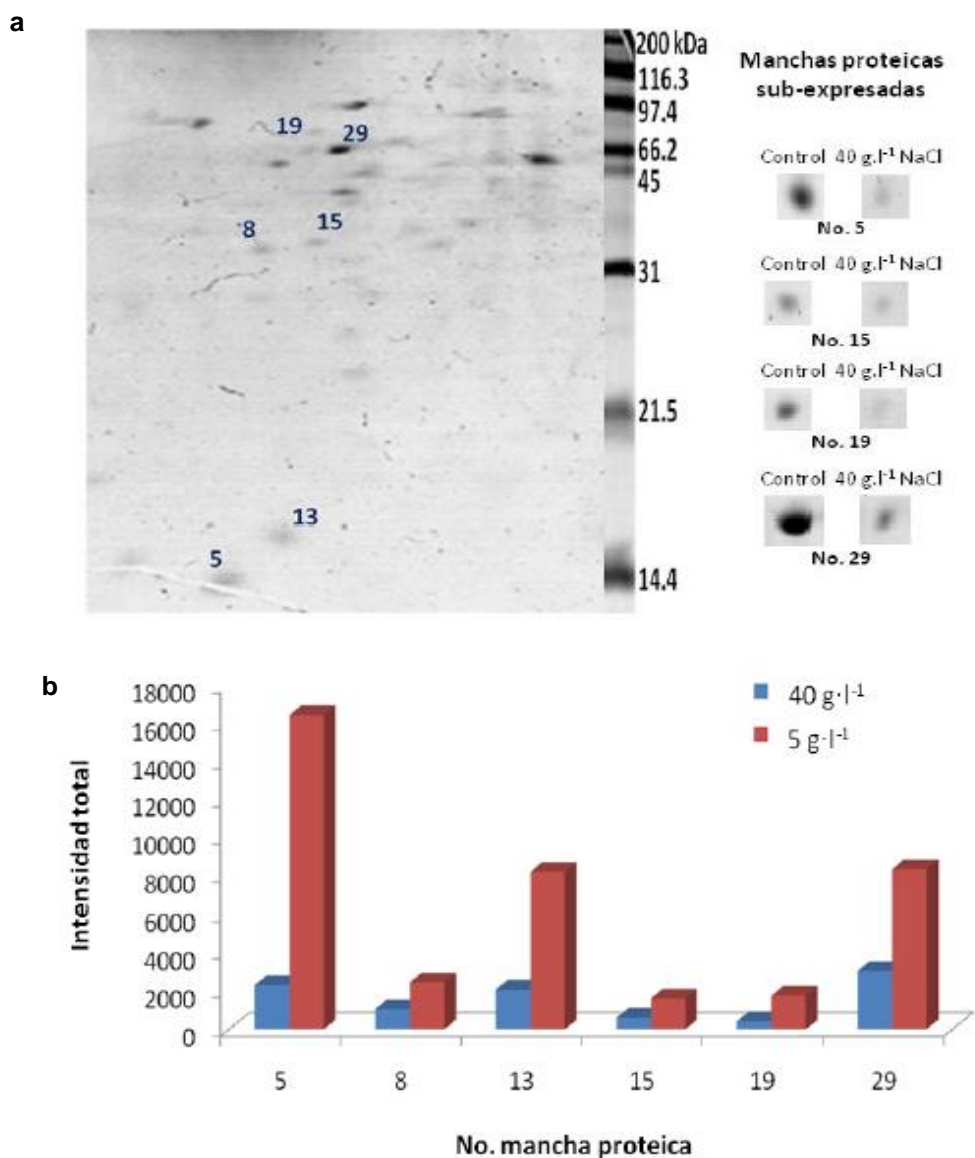


Figura 15. Perfil proteómico de *T. consotensis*, cultivada en presencia de 40 g·l⁻¹ NaCl. 6 manchas proteicas presentaron cambios significativos de expresión en presencia de 40 g·l⁻¹ NaCl ($p < 0,05$). Imágenes ampliadas de algunas manchas proteicas sub-expresadas son mostradas, en comparación con la salinidad control (5 g·l⁻¹ NaCl). En la parte inferior se encuentra el gráfico de la intensidad total de las manchas proteicas sub-expresadas a 40 g·l⁻¹. Cada barra representa el valor medio de dos replicas (geles)

evaluada. Las manchas proteicas que presentaron esta tendencia probablemente son expresadas por *T. consotensis* en condiciones óptimas de salinidad pero su expresión es afectada bajo estrés osmótico, indicando posiblemente que la expresión de estas manchas proteicas no constituyen un mecanismo de osmoadaptación.

El análisis de cualitativo de la expresión de proteínas de *T. consotensis* en respuesta a cambios en la concentración de sal en el medio, usando la técnica de electroforesis bidimensional, permitió determinar que bajo condiciones extremas de salinidad (0 y 40 g·l⁻¹ NaCl) para su crecimiento esta bacteria halotolerante presenta cambios significativos en el nivel de expresión de sus proteínas, siendo 40 g·l⁻¹ NaCl la salinidad que conduce a un cambio más drástico en el perfil de expresión, donde las manchas proteicas detectadas disminuyeron su expresión significativamente, mientras que en ausencia de sal la mayoría de manchas detectadas aumentó su expresión en comparación con las otras dos salinidades.

Una vez determinado que las salinidades de 0 y 40 g·l⁻¹ NaCl generaban cambios significativos en proteoma de *T. consotensis*, se procedió a realizar el estudio detallado del perfil de expresión de proteínas en respuesta a estas condiciones empleando la estrategia proteogenómica.

5.4. ANÁLISIS PROTEOGENÓMICO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE *T. consotensis* EN RESPUESTA A CAMBIOS DE LA SALINIDAD EXTERNA

Teniendo en cuenta que el análisis cualitativo del proteoma de *T. consotensis* permitió determinar que esta bacteria presenta una variación en su perfil de expresión de proteínas en respuesta a cambios de la salinidad, se realizó posteriormente un análisis cuantitativo basado en un enfoque proteogenómico con el objetivo de identificar las proteínas involucradas en la respuesta celular de *T. consotensis* a estrés osmótico y determinar sus mecanismos de osmoadaptación bajo las salinidades evaluadas (0 y 40 g·l⁻¹ NaCl). La estrategia proteogenómica usada en este estudio consistió en la secuenciación y rápida anotación del genoma de *T. consotensis* para obtener una base de datos de sus posibles ORF, la cual posteriormente se empleó para la identificación de los espectros de masa obtenidos para las proteínas detectadas en las salinidades evaluadas.

Teniendo en cuenta que la disminución de los *gaps* de un genoma es un proceso costoso que consume tiempo y es contraproducente para estudios proteómicos (Greub et al. 2009), la estrategia proteogenómica utilizada en este estudio se inspiró en estudios previos llevados a cabo con genomas inconclusos (Greub et al. 2009; Nanduri et al. 2005; Sun et al. 2006), pero aquí la estrategia empleada se enfocó en las proteínas más abundantes detectadas por espectrometría de masas sin la intención de anotar detalladamente las secuencias. Los datos incompletos del genoma obtenidos usando métodos de secuenciación de alta eficiencia pueden ser muy informativos para obtener la información de interés buscada en un genoma (Greub et al. 2009), como se ha mostrado por ejemplo para *Francisella tularensis* (La Scola et al. 2008) y *Helicobacter pylori* (Oh et al. 2006), donde un rápido análisis de genómica comparativa se aplicó sobre los *contigs* inconclusos de estas bacterias y permitió la detección de los genes involucrados en su virulencia y resistencia. Adicionalmente, la aproximación proteogenómica empleada en este estudio dio lugar a un enfoque más completo en comparación con la aproximación proteómica clásica *homology-driven*, donde las proteínas pobremente conservadas no pueden ser identificadas (Junqueira et al. 2008), y es mucho más simple que el análisis de las secuencias *de novo* (Samyn et al. 2006).

5.4.1. Secuenciación del genoma de *T. consotensis*

El genoma de *T. consotensis* se secuenció usando el sistema Roche GS FLX + System. A partir de la secuenciación del genoma de *T. consotensis* se obtuvo un total de 171.055 lecturas generándose 59'754.518 nucleótidos por secuenciación. El ensamblaje *de novo* con el ensamblador 454 Newbler permitió obtener 2377 *contigs* para el genoma de *T. consotensis*. El tamaño de *contig* más grande fue de 42.883 bp y el tamaño promedio fue de 2398 bp. La alta cobertura de secuencia (10.4x) indica que el tamaño del genoma de *T. consotensis* debe ser aproximadamente de 5.7 Mpb. El valor estimado del parámetro N50 fue 3610. El parámetro N50 es utilizado para evaluar la contigüidad de un genoma ensamblado y es una medida de la longitud media de un conjunto de secuencias nucleotídicas, con mayor peso dado a secuencias más largas (Nagarajan and Pop 2013).

A partir de los 2377 *contigs* obtenidos se creó una secuencia de genoma continua virtual y posteriormente se tradujo en los seis posibles marcos de lectura para generar una lista de

ORF de las secuencias de polipéptidos, la cual se restringió a aquellos péptidos con mínimo 50 aminoácidos. Finalmente se obtuvo una base de datos de los ORF de *T. consotensis* que contenía 52.246 secuencias de polipéptidos putativas. Esta base de datos se utilizó para anotar los espectros de masas identificados obtenidos a partir del análisis *shotgun proteomics* de *T. consotensis* en las salinidades evaluadas.

5.4.1.1. Principales características del genoma de *T. consotensis*

Basados en la secuencia de nucleótidos de *T. consotensis*, el porcentaje G+C fue de 70.4 mol%, valor cercano al reportado por Díaz-Cárdenas et al. (2010), 71 mol%. Cabe destacar que este valor es uno de los más altos reportados en la familia *Rhodospirillaceae*. Previos estudios han mostrado que un alto contenido de GC (por encima de 60 mol%), como el encontrado en *T. consotensis*, puede ser una característica molecular relacionada con la adaptación a ambientes salinos, generalmente encontrada en organismos halófilos, como por ejemplo, *H. salinarum* (68 mol%), *Haloarcula marimortui* (62 mol%) y *Salinibacter ruber* (66 mol%) (Paul et al. 2008). Sin embargo, se ha reportado que algunos microorganismos halófilos como *Haloquadratum walsbyi* presentan un contenido de GC menor a 60 mol% (Graziano and Merlino 2014), lo que confirma que el %GC no es una característica molecular universal en todos los organismos halófilos.

Por otra parte, la revisión de la naturaleza de los *contigs* que presentaban mayor número de lecturas permitió determinar la presencia de varias transposasas en el genoma de *T. consotensis*. Dentro de las transposasas encontradas en *T. consotensis* se encuentran la transposasa de la familia IS3/IS911 y la transposasa de la familia IS66 de *Xanthobacter autotrophicus*, la transposasa de la familia IS3/IS911 de *Nitrobacter hamburgensis*, dos transposasas de los plásmidos pAB510c y pAB510f encontrados en *Azospirillum* sp. B150, la transposasa de la familia IS66 de *Polymorphum gilvum*, las transposasas IS116/IS110/IS902 de *Methylobacterium nodulans* y la transposasa IS4 de *Methylobacterium extorquens*.

Las transposasas son enzimas que promueven el corte del ADN en los extremos de un elemento transponible y su unión a la molécula de ADN en la que se va a insertar. Los

elementos transponibles son definidos como elementos genéticos que pueden moverse de una posición a otra dentro del genoma y se ha sugerido que estas características de los elementos transponibles tiene un gran impacto en la aceleración de la adaptación evolutiva (Zhang and Saier 2011). La presencia de un alto número de transposasas encontrados en el genoma de *T. consotensis* indica que estas tienen probablemente una función evolutiva importante en la transferencia horizontal de genes y también en el rearrreglo interno de su genoma.

Aunque la secuenciación del genoma de *T. consotensis* se realizó con el fin de obtener la base de datos de ORF, se realizó un análisis global de su genoma para obtener información de los posibles genes que estuvieran involucrados en la adaptación de *T. consotensis* a ambientes salinos. A partir de la anotación funcional del genoma de *T. consotensis* se identificaron 3205 genes que codifican para proteínas, los cuales se agruparon dentro de 24 subsistemas (conjunto de proteínas que ejecutan un papel funcional relacionado) según la clasificación usando RAST (Figura 16). *T. consotensis* es una bacteria quimioheterotrófica que puede crecer sobre diferentes azúcares, ácidos orgánicos y péptidos (Díaz-Cárdenas et al. 2010b). La habilidad de *T. consotensis* para utilizar fuentes orgánicas de carbono para su crecimiento se confirmó con la identificación en su genoma de genes implicados en la ruta de la glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la ruta de las pentosas fosfato así como genes involucrados en la utilización de piruvato, glicerol, maltosa, maltodextrina y xilosa. Con respecto al metabolismo del nitrógeno se identificaron genes que codifican para sistemas de transporte de amonio indicando que probablemente la captura en nitrógeno en *T. consotensis* ocurre en su forma más reducida, amonio, lo cual es confirmado con la detección de genes involucrados en la asimilación de amonio y en el metabolismo de aminoácidos, glutamina sintetasa y gluamato sintasa.

En el genoma de *T. consotensis* se encontró un alto número de genes implicados en procesos de transporte a través de membrana (353). Estos genes en su mayoría estuvieron relacionados con sistemas de transporte tipo ABC y sistemas de transporte TRAP (TRAP por sus siglas en ingles *Tripartite ATP-independent periplasmic transporters*). Los transportadores ABC detectados en *T. consotensis* se podrían clasificar en tres grupos basados en la especificidad de sustrato: (i) transportadores ABC de

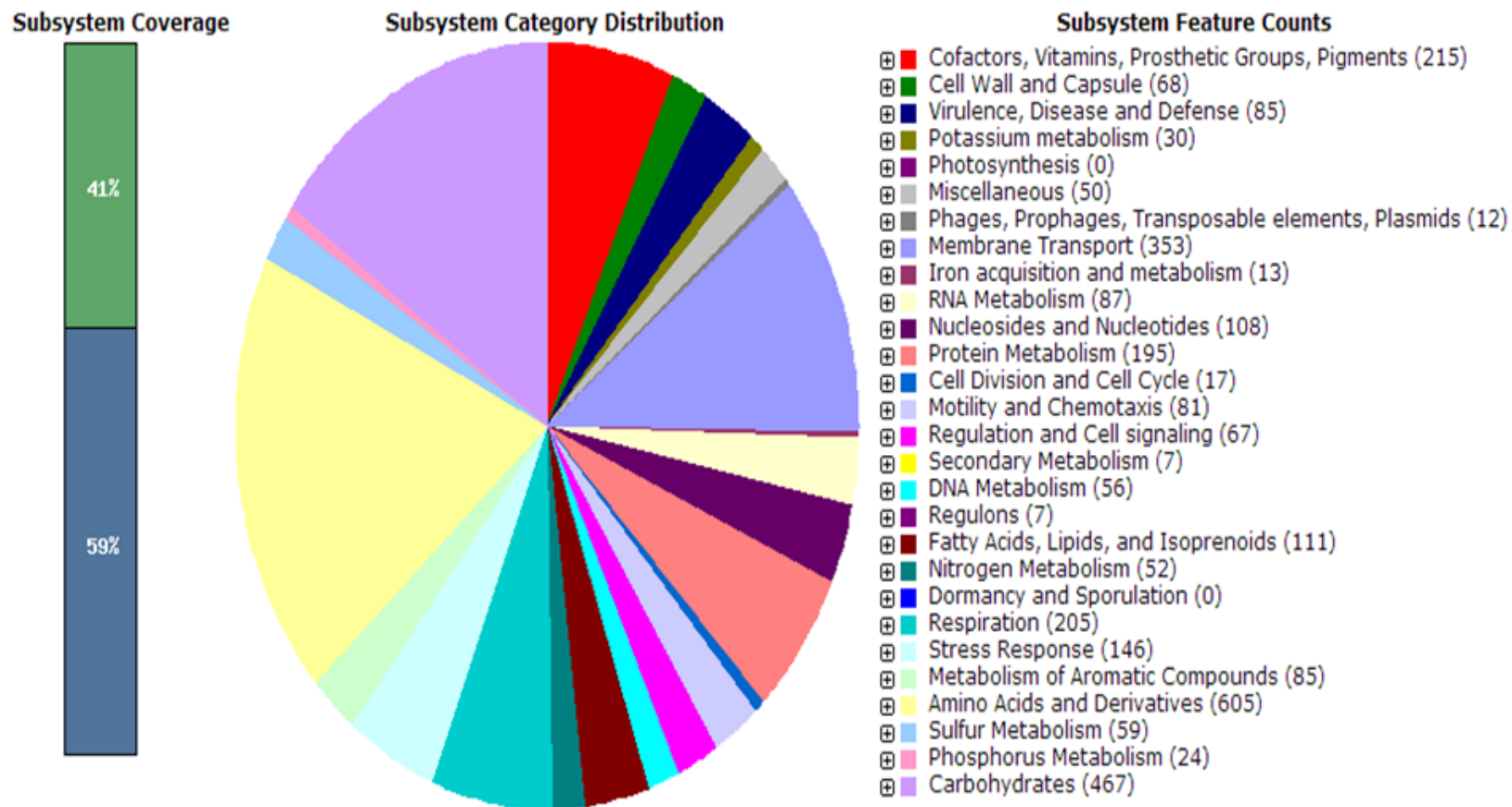


Figura 16. Distribución de las categorías funcionales de los genes que codifican para proteínas detectados en el genoma de *T. consotensis*

oligopéptidos, (ii) transportadores ABC de aminoácidos de cadena ramificada y (iii) transportadores ABC de dipéptidos. Con respecto a los sistemas de transporte TRAP estos están implicados en transporte de C₄-dicarboxilato. Otros genes que codifican para sistemas de transporte, identificados en *T. consotensis*, incluyen transportadores de cationes como magnesio, cobalto y cobre, y transportadores de fosfato dependientes de sodio como el sistema antiporte Na⁺/H⁺ tipo NhaA. También se identificaron genes relacionados con los sistemas de secreción tipo II y IV, los cuales están implicados en la biogénesis del pili.

Con respecto a la movilidad y respuesta quimiotáctica de *T. consotensis* se identificaron en su genoma los genes *fla*, *fli* y *flg*. Estos genes tienen varias funciones como son la codificación de proteínas estructurales del aparato flagelar, la exportación al exterior celular de componentes flagelares a través de la membrana y la regulación de los eventos bioquímicos necesarios para la síntesis de nuevos flagelos (Pallen et al. 2005). Además, *T. consotensis* presentó genes implicados en transducción de señales quimiotácticas, como por ejemplo genes que codifican para los receptores MCP (MCP por sus siglas en inglés *methyl-accepting chemotaxis proteins*) o genes que codifican para las proteínas reguladoras de la respuesta quimiotáctica CheA y CheW. La presencia de genes involucrados con la quimiotaxis sumado al alto número de genes relacionados con sistemas de transporte que fueron detectados en el genoma de *T. consotensis* indica que esta bacteria halotolerante tiene la habilidad de censar y adquirir diversos componentes a partir de su hábitat natural.

5.4.1.2. Genes candidatos involucrados en la respuesta celular de *T. consotensis* frente a cambios de la salinidad externa

Los microorganismos que están sometidos a cambios repentinos en la osmolalidad externa responden con una respuesta adaptativa que se caracteriza por la acumulación de solutos inorgánicos u orgánicos cuando hay un aumento de la concentración de sal o por la rápida salida de solutos cuando ocurre una disminución de la salinidad externa (Penn and Jensen 2012). El análisis del genoma de *T. consotensis* permitió identificar un grupo de genes que probablemente están involucrados en su respuesta adaptativa frente a cambios de osmolalidad en su hábitat natural. Se identificaron cuatro categorías de

genes funcionales relacionados con la respuesta celular de *T. consotensis* a cambios en la salinidad externa: (i) genes relacionados con canales mecanosensitivos, (ii) genes involucrados en el transporte de Na⁺ o con la utilización de gradientes de sodio, (iii) genes implicados en la acumulación de K⁺, y (iv) genes relacionados con la síntesis o transporte de solutos compatibles.

En el genoma de *T. consotensis* se detectó un gen implicado en la expresión de un canal mecanosensitivo de gran conductancia (MscL). Estos canales son capaces de mediar la liberación de solutos del citoplasma con el fin de lograr una rápida reducción de la presión de turgencia y de esta manera evitar la entrada de agua a la célula que es ocasionada por la disminución repentina de la osmolalidad (Reuter et al. 2014). La presencia de estos canales ha sido reportada en microorganismos halófilos como *Silicibacter pomeroyi* (Petrov et al. 2013) y *Haloferax volcanii* (Le Dain et al. 1998), así como en las bacterias halotolerantes *E. coli* (Levina et al. 1999) y *B. subtilis* (Hoffmann et al. 2008). Además, se ha reportado que en el caso de bacterias marinas como *Vibrio alginolyticus* (Nakamaru et al. 1999) y *Salinispora tropica* (Bucarey et al. 2012), las cuales son incapaces de crecer en un medio con baja osmolalidad, la introducción del gen *mscL* evita la lisis celular ocasionada por una disminución repentina de la osmolalidad, por consiguiente el producto de este gen representa un importante mecanismo para tolerar la rápida transición de condiciones de alta a baja osmolalidad. Por lo tanto, la presencia de genes que codifican para canales MscL en *T. consotensis* explicaría su capacidad para crecer en ausencia de sal y representaría uno de los mecanismos usados por esta bacteria para tolerar la disminución repentina de la salinidad.

El objetivo de los mecanismos de adaptación de los organismos halófilos y halotolerantes en respuesta a un incremento de osmolalidad externa es la exclusión de los iones sodio del interior de la célula con el fin de evitar la salida de agua de la célula. Por ende, la presencia de sistemas de transporte implicados en la salida de Na⁺ es clave para mantener el balance osmótico en presencia de altas concentraciones de sal. En el genoma de *T. consotensis* se identificaron dos genes relacionados con el sistema antiporte Na⁺/H⁺ tipo NhaA. El antiporte Na⁺/H⁺ tipo NhaA es un sistema de transporte involucrado en la circulación de Na⁺ y H⁺, el cual es esencial para la adaptación a alta salinidad y pH alcalino (Dover et al. 1996). La presencia de los genes relacionados con

este sistema de antiporte ha sido reportada en bacterias marinas halófilas como *Oceanobacillus iheyensis* (Takami et al. 2002), *Vibrio parahaemolyticus* (Ganoth et al. 2011), *Salinispora tropica* y *Salinispora arenicola* (Penn and Jensen 2012), y en bacterias halotolerantes como *E. coli* (Dover et al. 1996) y *B. firmus* (Ivey et al. 1991).

Adicionalmente, se identificó en *T. consotensis* genes relacionados con las enzimas NADH deshidrogenasa y NADH-ubiquinona oxidoreductasa involucradas en el transporte de electrones en la cadena respiratoria, donde la transferencia de electrones esta acoplada a la salida de iones Na^+ (Kerscher et al. 2008). Diferentes estudios genómicos han reportado la presencia de estos genes en bacterias marinas como *Oceanobacillus iheyensis* (Takami et al. 2002), *Salinispora tropica* y *Salinispora arenicola* (Penn and Jensen 2012), *Roseobacter* sp. (Moran et al. 2007), *Vibrio alginolyticus* (Hayashi et al. 2001) y *Vibrio harveyi* (Zhou et al. 1999), demostrando, por lo tanto, que estas enzimas tienen una función clave en la adaptación de organismos que habitan en ambientes marinos ya que permite mantener el exceso de Na^+ fuera del citoplasma y el gradiente de protones. La identificación de los genes relacionados con las enzimas anteriormente mencionadas en el genoma de *T. consotensis* indican que, al igual que los organismos que habitan en ambientes marinos, estas enzimas cumplen una función clave en la respuesta celular de *T. consotensis* frente a un aumento en la salinidad.

Otra vía para controlar la concentración de iones Na^+ a interior de la célula es la presencia de transportadores secundarios que catalizan la translocación de solutos a través de la membrana usando un gradiente electroquímico de iones. En *T. consotensis*, se identificaron nueve genes relacionados con los transportadores TRAP C_4 -dicarboxilato, los cuales están agrupados dentro de la familia DctA. Estos transportadores catalizan la captura de C_4 -dicarboxilatos acoplada a la salida de Na^+ y son comúnmente encontrados en organismos que habitan en ambientes salinos (López-Pérez et al. 2013). También se encontraron en el genoma de *T. consotensis* cinco genes relacionados con transportadores ABC de oligopéptidos. Estos sistemas de transporte probablemente están relacionados con la captura de oligopéptidos durante el crecimiento de *T. consotensis* bajo condiciones de estrés hiper-osmótico, dado que pueden contribuir a la acidificación del citoplasma, a partir de la liberación de glutamato y aspartato (Takami et al. 2002).

Estos aminoácidos ácidos podrían contribuir al mantenimiento de la naturaleza ácida de algunas proteínas de *T. consotensis*.

Adicionalmente, se identificaron en el genoma de *T. consotensis* seis genes relacionados con el sistema de transporte ABC de aminoácidos de cadena ramificada (BCCT). Estos transportadores pueden ser importantes para organismos halófilos, ya que aminoácidos de cadena ramificada son convertidos a L-glutamato (Ziegler et al. 2010). La presencia de estos sistemas de transporte en *T. consotensis* también contribuiría a mantener un alto contenido de residuos ácidos en la superficie de algunas de sus proteínas, lo cual probablemente permite su apropiado funcionamiento en presencia de altas concentraciones de sal.

En respuesta a condiciones de estrés hiper-osmótico, los organismos halófilos y halotolerantes pueden también acumular K^+ como un soluto osmoregulador, y su captura es catalizada por múltiples sistemas (Kraegeloh and Kunte 2002). Particularmente en *T. consotensis* se detectaron genes relacionados con dos sistemas de transporte de K^+ de baja afinidad, Trk y Kup, y un sistema de transporte de K^+ de alta afinidad, Kdp. En un medio que contiene $> 1\text{mM } K^+$, el sistema de captura predominante es el transportador Trk, el cual está constituido por dos proteínas, TrkH y TrkA, donde TrkH es una proteína de unión a membrana responsable de la translocación de K^+ desde el exterior de la célula y TrkA es una proteína citoplasmática que se une al NAD^+ (Mongodin et al. 2005). El sistema Kup presenta una K_m entre 0.3-0.4 mM y una V_{max} de 30 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}$ (mg de proteína) para la captura de K^+ . Por su parte el sistema Kdp, tiene una alta especificidad por el K^+ , presentando una K_m de 2 μmol y una V_{max} de 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ (mg de proteína) (Sleator and Hill 2002). La presencia de estos sistemas de captura de K^+ en *T. consotensis* indica que probablemente éstos tienen una función importante en su osmoadaptación.

En los organismos halófilos moderados y halotolerantes la principal estrategia de adaptación en respuesta a un incremento de la concentración de sal es la acumulación de solutos compatibles para evitar la entrada de iones Na^+ (Averhoff and Müller 2010). En el caso de *T. consotensis*, se identificaron tres genes relacionados con el sistema de captura de ProP, que está involucrado en el transporte de glicina o prolina betaína (Kempf and

Bremer 1998). Asimismo, se detectaron dos genes relacionados con la síntesis de glicina betaína a partir de la oxidación de la colina. La presencia de genes implicados tanto en la biosíntesis como en la captura de glicina betaína indica que probablemente este soluto compatible tiene una función clave en la respuesta adaptativa de *T. consotensis* frente a un aumento de la salinidad externa.

El análisis a nivel del genoma de *T. consotensis* permitió determinar que esta bacteria halotolerante presenta características moleculares, descritas en previos estudios para microorganismos halófilos, que están relacionadas con su adaptación a ambientes salinos y/o marinos, y proporcionó además información importante con respecto a los posibles mecanismos de adaptación que emplea esta bacteria en condiciones de estrés osmótico.

5.4.2. Análisis proteómico de *T. consotensis* en las tres salinidades evaluadas

El análisis *shotgun proteomics* de *T. consotensis* en respuesta a cambios en la salinidad del medio se realizó tanto en el exoproteoma como en el proteoma celular. Para el análisis *shotgun proteomics* se usaron las secuencias los *contigs*, que se concatenaron de extremo a extremo, para crear una secuencia genómica continua y virtual que se tradujo a los seis posibles marcos de lectura para crear una base de datos de los ORF, y una aproximación proteogenómica se empleó para interpretar los datos obtenidos a partir de la espectrometría de masas en tándem. El exoproteoma y proteoma celular se fraccionaron por medio de electroforesis unidimensional previo a la digestión con tripsina, seguido por la identificación por espectrometría de masas y por la cuantificación del número de espectros de masa por proteínas.

Los datos de los espectros de masas obtenidos se confrontaron con la base de datos de ORF de *T. consotensis*. Esto permitió la detección de 30.130 y 80.542 espectros de masa únicos en el exoproteoma y el proteoma celular, respectivamente. Estos espectros de masa correspondieron a 2.321 péptidos para el exoproteoma y 4686 péptidos para el proteoma celular. La asignación de péptidos en las dos fracciones permitió la detección de 892 proteínas no redundantes, de las cuales 315 proteínas se detectaron en el exoproteoma y 872 proteínas se detectaron en el proteoma celular (Figura 17). En los

Anexos 5 y 6 se encuentra la lista de las proteínas identificadas en las dos fracciones, bajo las tres salinidades evaluadas.

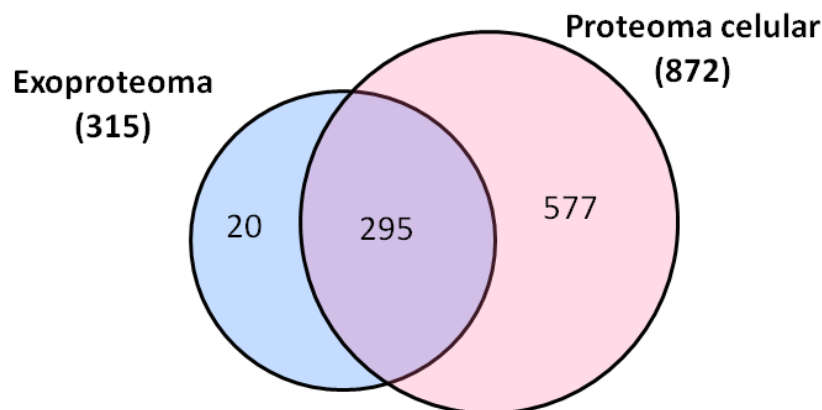


Figura 17. Diagrama de Venn mostrando el número de proteínas de *T. consotensis* identificadas en su exoproteoma y proteoma celular.

La Figura 18 muestra el mapa proteogenómico de los genes cuyos productos se detectaron por espectrometría de masas a lo largo del genoma de *T. consotensis*. Como se observa en esta figura, las proteínas detectadas a 0, 5 y 40 g·l⁻¹ por espectrometrías de masas estuvieron distribuidas a lo largo de la secuencia del genoma de *T. consotensis*, confirmando la validez del enfoque experimental usado en este estudio.

Una característica molecular común de los organismos halófilos es el alto contenido de residuos ácidos (aspartato y glutamato) en la superficie de sus proteínas. La naturaleza ácida de las proteínas halofílicas contribuye a la adaptación a las altas concentraciones de sal presentes en ambientes salinos (Graziano and Merlino 2014). El punto isoeléctrico promedio del proteoma de *T. consotensis* fue 8.3. Sin embargo, se observó que algunas proteínas como el componente periplasmático del sistema de transporte de azúcares tipo ABC (pI 4.4), detectado abundantemente por espectrometría de masas, presentó un mayor contenido de residuos ácidos en comparación con proteínas homólogas de organismos no halófilos de la clase α -*Proteobacteria* como *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Polymorphum gilvum* y *Microvirga* sp. WSM3557, la cuales presentaron un pI en un rango entre 7.6–9.5. (Tabla 8).

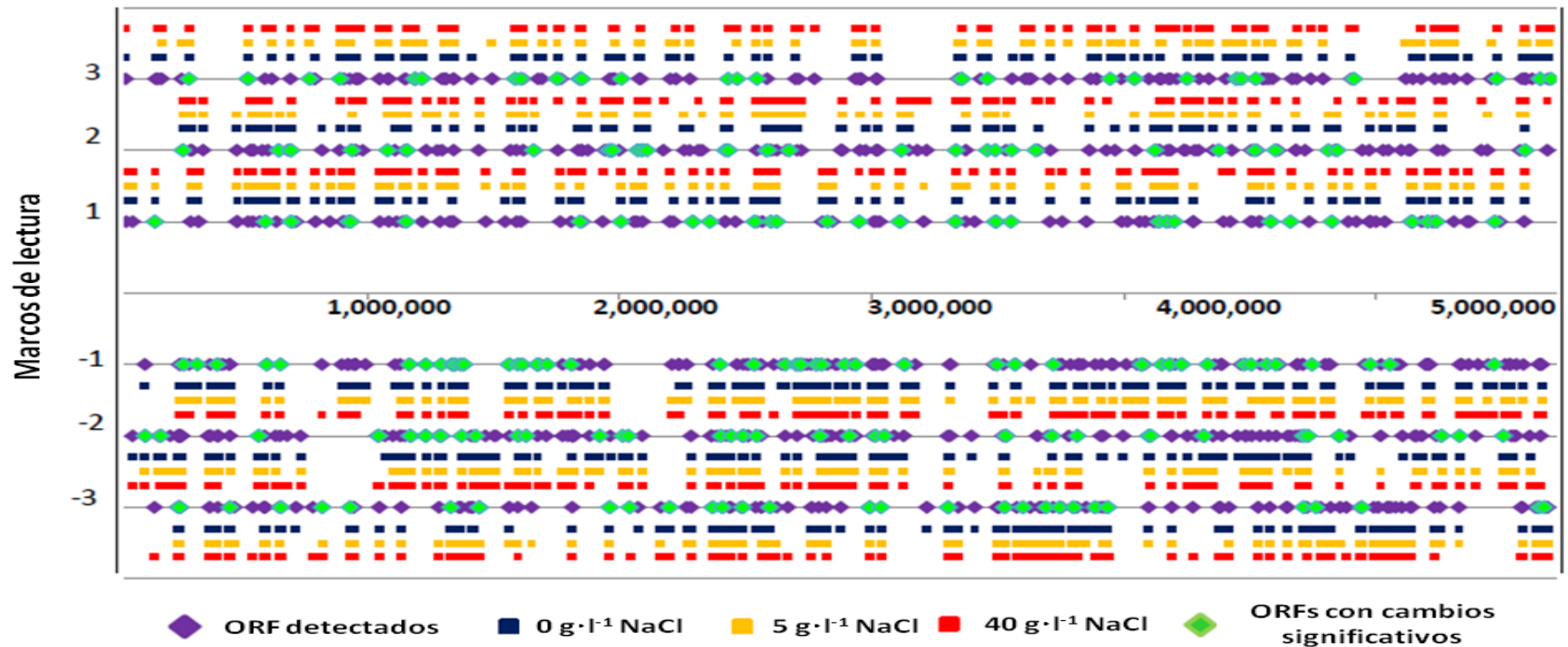


Figura 18. Mapa proteogenómico de los ORF detectados a lo largo de la secuencia del genoma de *T. consotensis*. La numeración en la abscisa se refiere a la numeración de nucleótidos a lo largo de la secuencia del genoma. Los ORF se indican con los diamantes de color púrpura o verde. Por encima (*forward*) o por debajo (*reverse*) de cada ORF detectado, si la proteína correspondiente se detectó a 0 g·l⁻¹ NaCl, 5 g·l⁻¹ NaCl y/o 40 g·l⁻¹ NaCl, se indica con cuadrados azules, naranja, y rojo, respectivamente. Los diamantes verdes corresponden a los ORFs que presentaron cambios significativos de expresión

Estos resultados coinciden con lo reportado para la bacteria Gram-negativa halófila moderada *Chromohalobacter salexigens* (Oren et al. 2005), que presenta un exceso de residuos ácidos en proteínas de unión periplasmática de sistemas de transporte tipo ABC comparado con proteínas homólogas de organismos no-halófilos. Debido a que la membrana externa de las bacterias Gram-negativas no presenta una barrera para los iones, las proteínas de unión periplasmática están expuestas a la salinidad externa, de manera que el alto contenido de residuos ácidos presente en estas proteínas permite su adaptación a concentraciones altas de sal (Oren et al. 2005). Por lo tanto, la presencia de proteínas periplasmáticas con un alto contenido de aminoácidos ácidos, principalmente glutamato, en *T. consotensis* indicaría que esta bacteria halotolerante ha adaptado la composición de aminoácidos de algunas de sus proteínas como respuesta a la presencia de altas concentraciones de sal en su hábitat natural.

Tabla 8. Punto isoeléctrico y contenido de aminoácidos ácidos del componente periplasmático del sistema de transporte de azúcares tipo ABC de *T. consotensis* en comparación con proteínas homólogas de organismos halófilos así como de organismos no halófilos de la clase α -*Proteobacteria*

Microorganismo	Número de acceso	pI	Glu	Asp
<i>Tistlia consotensis</i>	Tistlia\$2804059\$2805855\$1	4.4	13.4	5.4
<i>Bradyrhizobium oligotrophicum</i>	M4Z3Z9_9BRAD	8.34	4.9	5.5
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	ZP_12507935.1	5.95	4.7	2.8
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	ABP72518.1	9.54	3.8	2.2
<i>Polymorphum gilvum</i>	YP_004304149.1	7.91	2.2	2.9
<i>Microvirga</i> sp.	ZP_10181554.1	8.46	3.5	7.9

Las proteínas, detectadas en el exoproteoma y el proteoma celular de *T. consotensis*, se distribuyeron en categorías funcionales usando la base de datos KEGG (Figura 19). Se asignó un total de 807 proteínas a 106 rutas metabólicas involucradas en el metabolismo de *T. consotensis*. Las rutas metabólicas fueron: metabolismo general (40%, metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, nucleótidos, lípidos, glicanos, cofactores y vitaminas, biosíntesis de metabolitos secundarios y metabolismo y degradación de xenobióticos),

procesamiento de información genética y biosíntesis de proteínas (18%), proteínas hipotéticas (15%), transporte a través de membrana (11%) y señalización y procesos celulares (6%).

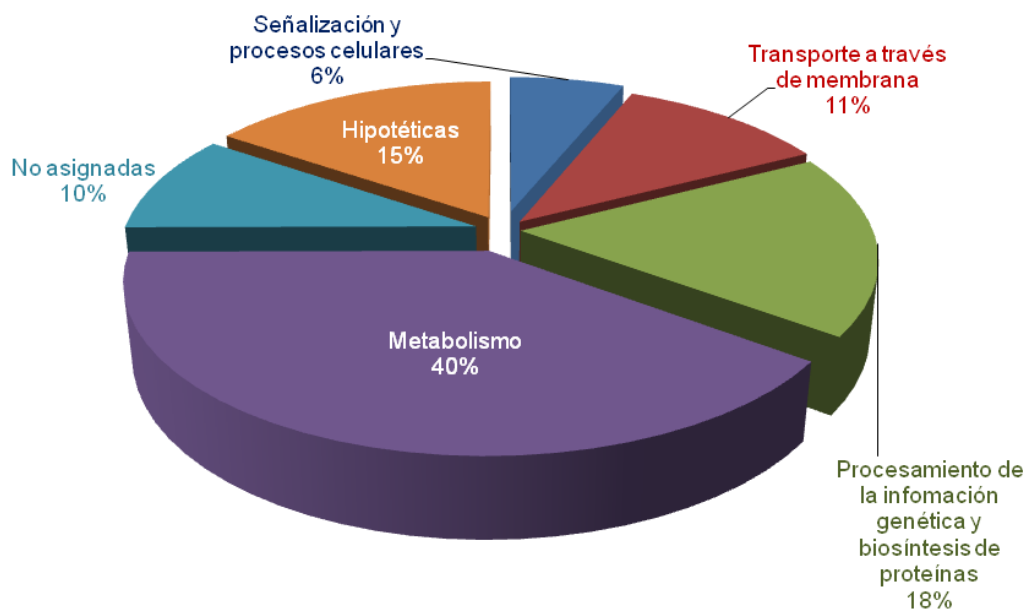


Figura 19. Asignación funcional de las proteínas detectadas en el exoproteoma y proteoma celular de *T. consotensis*.

Con el fin de explorar la posible función de las proteínas anotadas como hipotéticas, se utilizó la herramienta Bioinformática BLASTp (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) para asignar una posible función putativa basada en proteínas homólogas. La mayoría de estas proteínas se relacionó con proteínas de membrana o asociadas a membrana, con diversas funciones que incluían plegamiento de proteínas, modificaciones post-traduccionales, transducción de señales, biogénesis de la pared celular, transporte y metabolismo de metabolitos secundarios, transporte de iones inorgánicos, carbohidratos y aminoácidos a través de la membrana. Estas proteínas son probablemente características de *T. consotensis* y pueden tener una función importante aún no definida.

Como era de esperar, la mayoría de las proteínas detectadas en el exoproteoma y proteoma celular de *T. consotensis* compartió una alta similitud con proteínas encontradas en especies de la clase α -*Proteobacteria* (767 proteínas), con una gran representación de proteínas homólogas de la familia *Rhodospirillaceae* (349 proteínas) (Figura 20a). La

mayoría de las proteínas homologas relacionadas fue encontrada en la familia *Rhodospirillaceae* en los géneros *Azospirillum* (123), *Rhodospirillum* (92), *Fodinicurvata*

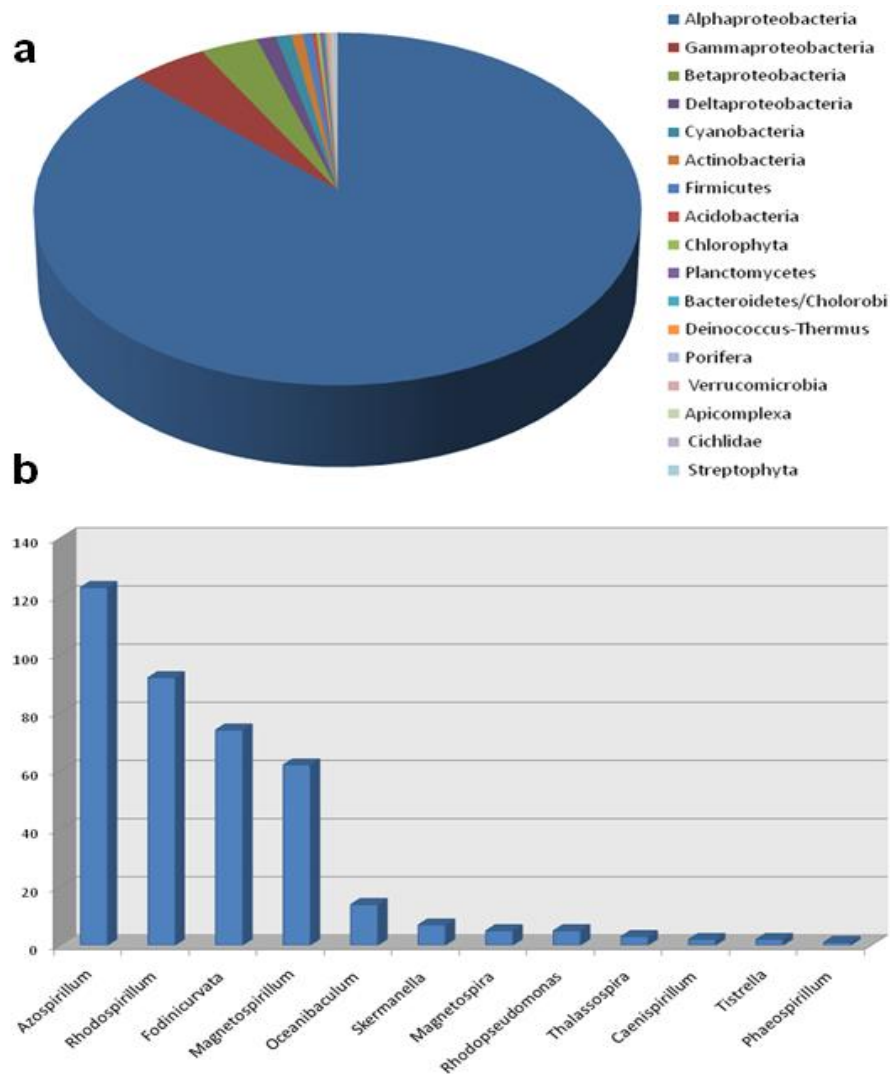


Figura 20. Afiliación taxonómica de las proteínas homologas detectadas en el exoproteoma y proteoma celular de *T. consotensis*. **(a)** Afiliación taxonómica a nivel de filo de las proteínas homologas detectadas. **(b)** Distribución de las proteínas homologas detectadas dentro de los géneros de la familia *Rhodospirillaceae*.

(74), *Magnetospirillum* (62) y *Oceanibaculum* (14) (Figura 20b). A excepción del género *Azospirillum*, que está constituido por bacterias halotolerantes aisladas de suelo, los

demás géneros de la familia *Rhodospirillaceae* contienen en su mayoría microorganismos halófilos aislados de ambientes marinos.

De otra parte, se encontraron algunas proteínas homólogas de especies de las clases γ -*Proteobacteria* (40), β -*Proteobacteria* (30) y δ -*Proteobacteria* (10). Asimismo, se detectó la presencia de ocho proteínas homólogas del filo *Cyanobacteria* (una péptido sintetasa no ribosomal y una L-treonina aldolasa de *Oscillatoria* sp. PCC 6506, una Dps de *Acaryochloris marina*, una carbohidrato quinasa de *Synechococcus* sp. CB0101, una glutamil transferasa de *Microcoleus* sp. PCC 7113, una epimerasa dependiente de NAD de *Crocospaera watsonii* WH 8501, una O-metiltransferasa de *Anaebaena* sp. 90, y una β -ketoacil sintasa de *Raphidiopsis brookii* D9), dos enzimas de la esponja *Amphimedon queenslandica* (una lactato deshidrogenasa y una creatinina amidohidrolasa), y una proteína del alga verde *Volvox carteri* f. *nagariensis* anotada como hipotética.

5.4.2.1. Exoproteoma de *T. consotensis*

El término exoproteoma hace referencia al grupo de proteínas que son secretadas, incluye proteínas extracelulares y proteínas de membrana, así como las proteínas exportadas al periplasma en el caso de las bacterias Gram negativas. La expresión de proteínas extracelulares puede ser vista como una respuesta fisiológica de las células a una condición de crecimiento específica y también como un indicador de cómo los organismos interactúan con su medio ambiente (Armengaud et al. 2012). Las proteínas extracelulares tienen una función clave en la supervivencia de los organismos, ya que generalmente las proteínas traslocadas están involucradas en la detección de factores de estrés ambientales, unión a sustratos, comunicación celular, interacción huésped-microorganismo, adhesión, y otros procesos esenciales relevantes para el estilo de vida de los organismos (Muddiman et al. 2010).

En el exoproteoma de *T. consotensis* se identificó un total de 219, 182 y 237 proteínas a 0, 5 y 40 g·l⁻¹ NaCl, respectivamente. De estas, 132 fueron comunes en las tres salinidades (Figura 21).

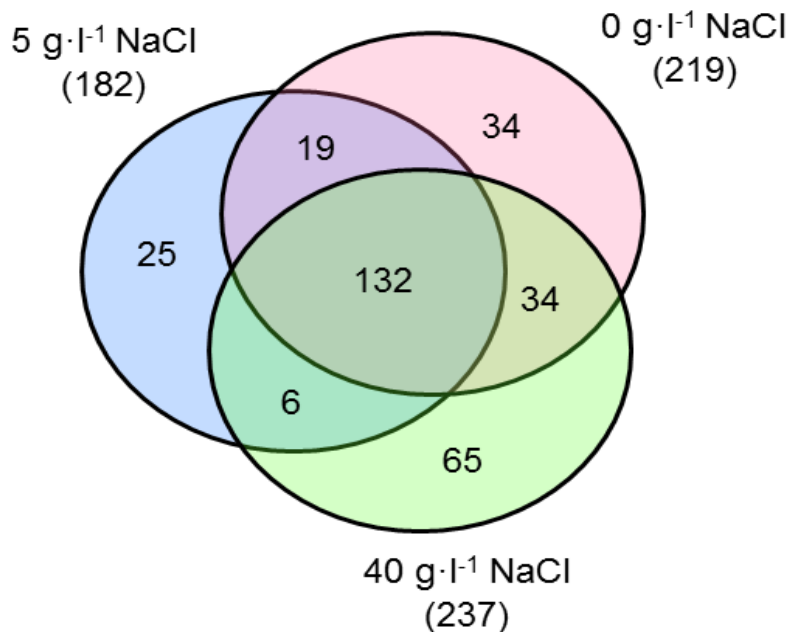


Figura 21. Diagrama de Venn para comparar el número de proteínas detectadas en el exoproteoma de *T. consotensis*, bajo las concentraciones de NaCl evaluadas

En las bacterias Gram negativas los sistemas de secreción translocan las proteínas a diferentes destinos: al espacio periplasmático, a la membrana externa y al medio extracelular y frecuentemente involucran la presencia de un péptido señal N-terminal (Dalbey and Kuhn 2012). El péptido señal N-terminal consiste de un dominio tripartita universalmente conservado con un n-dominio amino-terminal positivamente cargado, un h-dominio central hidrofóbico, y un c-dominio polar. El péptido señal es clivado por una peptidasa señal tipo I que permite la liberación de la proteína madura (Ellen et al. 2010). Las principales rutas dependientes de un péptido señal son las rutas secretorias Sec y Tat (Tat, por sus siglas en inglés *twin-arginine translocation*).

En este estudio, se utilizó el predictor MetaLocGramN para predecir la localización subcelular y la presencia de péptidos señal de las 52 proteínas encontradas en mayor abundancia en el exoproteoma de *T. consotensis* (Tabla 9). Este análisis permitió detectar diez proteínas extracelulares, 17 proteínas periplasmáticas y 25 proteínas citoplasmáticas.

Tabla 9. Predicción de la localización celular y de la presencia de péptido señal de las proteínas más abundantes detectadas en el exoproteoma de *T. consotensis*.

Proteína ID ¹	Anotación funcional	gi de proteína cercana	MetaLoGramN	PRED-TAT
1	Chaperona GroEL	163793752	Citoplasmática	Ninguna
2	O-acetil homoserina sulfhidrilo	222106262	Citoplasmática	Ninguna
3	Chaperona DnaK	209966125	Citoplasmática	Ninguna
4	Receptor de soluto (familia TAXI) del transportador TRAP Sistema de transporte tipo ABC de aminoácidos de cadena ramificada	153011418	Periplasmática	Señal Sec
5	Polinucleótido fosforilasa/poliadenilasa	83310577	Periplasmática	Señal Tat
6	Componente periplasmático del transportador de azúcar tipo ABC	347735476	Citoplasmática	Ninguna
7	Flagelina	90420899	Periplasmática	Señal Sec
8	Aminotransferasa putativa	328542112	Extracelular	Ninguna
9	Proteína OmpA	163857408	Citoplasmática	Ninguna
10	Alquilo hidroxidroxidasa	347757725	Periplasmática	Señal Sec
11	Cadena Beta de la F1-ATP sintasa	296532891	Citoplasmática	Ninguna
12	Adenosil homocisteína	163792320	Citoplasmática	Ninguna
13	Acetyl-CoA acetiltransferasa	163797144	Citoplasmática	Ninguna
14	Factor de elongación Tu	357424716	Citoplasmática	Ninguna
15	Proteína de unión a sustrato del transportado de ribosa tipo ABC	90424939	Citoplasmática	Ninguna
16	Chaperona GroEL	357029011	Periplasmática	Señal Sec
17	Isocitrato deshidrogenasa	163793752	Citoplasmática	Ninguna
18	Glutamina sintetasa	347735537	Citoplasmática	Ninguna
19	Malato deshidrogenasa	83593421	Periplasmática	Ninguna
20	Proteína de unión a soluto extracelular, familia 5	340027738	Citoplasmática	Ninguna
21	Succinato-semialdehído deshidrogenasa	91787986	Periplasmática	Señal Sec
22		189424750	Citoplasmática	Ninguna

¹ Proteína ID se refiere a los datos del Anexo 5

Tabla 9. (continuación) Predicción de la localización celular y de la presencia de péptido señal de las proteínas más abundantes detectadas en el exoproteoma de *T. consotensis*.

Proteína ID ¹	Anotación funcional	gi de proteína cercana	MetaLoGramN	PRED-TAT
23	Proteína de unión a ATP	118588795	Citoplasmática	Ninguna
24	Rubreritrina	154254069	Citoplasmática	Ninguna
25	3-isopropil malato deshidrogenasa	357423215	Citoplasmática	Ninguna
26	Componente periplasmático de la proteína de unión a sustrato del sistema de transporte tipo ABC de aminoácidos de cadena ramificada	357428205	Periplasmática	Señal Sec
27	Metil malonato-semialdehído deshidrogenasa	148260786	Citoplasmática	Ninguna
28	Succinil-CoA sintetasa, subunidad beta	23014368	Citoplasmática	Ninguna
29	Proteína de unión a ADN HupA	83311888	Periplasmática	Ninguna
30	Proteína de unión a sustrato del sistema de transporte tipo ABC de aminoácidos de cadena ramificada	163796041	Periplasmática	Señal Tat
31	Parvulin peptidil-prolil isomerasa	288959403	Periplasmática	Señal Sec
32	Factor <i>Trigger</i>	209964557	Citoplasmática	Ninguna
62	Proteína de unión a sustrato del transportador de fosfato tipo ABC	27376202	Periplasmática	Señal Sec
98	Proteína HpnM	338740576	Extracelular	Señal Sec
141	Oxidoreductasa DsbA	288961585	Citoplasmática	Ninguna
151	Receptor de unión a ligando extracelular	118588169	Periplasmática	Señal Sec
152	Proteína de unión periplasmática	328542112	Extracelular	Ninguna
164	Proteína de unión a sustrato del transportador de aminoácidos tipo ABC	33600536	Citoplasmática	Ninguna

¹ Proteína ID se refiere a los datos del Anexo 5

Tabla 9. (continuación) Predicción de la localización celular y de la presencia de péptido señal de las proteínas más abundantes detectadas en el exoproteoma de *T. consotensis*.

Proteína ID ¹	Anotación funcional	gi de proteína cercana	MetaLoGramN	PRED-TAT
203	Profago Mu	218671251	Extracelular	Señal Sec
228	Proteína hipotética SIAM614_01986	118592953	Extracelular	Señal Sec
234	Proteína hipotética ACMV_29200	326405067	Periplasmática	Señal Tat
236	Proteína de unión a sustrato del transportador de espermidina/putreescina tipo ABC	328544731	Extracelular	Señal Tat
246	Proteína hipotética Rru_A2600	83593932	Periplasmática	Señal Sec
250	Acyl-CoA tioesterasa putativa (tesA-like)	338741384	Citoplasmática	Ninguna
256	Dominio NMT1/THI5	338740779	Extracelular	Señal Tat
273	Proteína de la membrana externa hipotética	89070324	Citoplasmática	Ninguna
281	RNA polimerasa - Factor δ 70	254488172	Extracelular	Señal Sec
284	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa	288958015	Extracelular	Señal Sec
285	Proteína D, biosíntesis de glicano	53802574	Periplasmática	Señal Sec
302	Proteína de unión a soluto, Familia 1	298290510	Periplasmática	Señal Sec
307	Proteína de unión a sustrato periplasmática del transportador de sulfato/tungstato tipo ABC	149928414	Extracelular	Señal Sec
311	Maltasa-glucoamilasa	348535059	Citoplasmática	Ninguna

¹ Proteína ID se refiere a los datos del Anexo 5

Adicionalmente, se utilizó el programa PRED-TAT para la predicción de péptidos señal, donde se determinó que la mayoría de proteínas en *T. consotensis* es secretada por el sistema de secreción Sec. La ruta Sec es el principal sistema de secreción en bacterias Gram negativas y es usada para la translocación de proteínas no plegadas al espacio periplasmático (Dalbey and Kuhn 2012).

Dentro de las proteínas que presentaron péptido señal Sec, 12 proteínas fueron expresadas en el periplasma. Estas proteínas fueron probablemente translocadas al espacio periplasmático por el sistema de secreción tipo II, ya que las proteínas secretadas por este sistema son sintetizadas con una secuencia señal N-terminal que permite su translocación, mediada por el sistema Sec, al espacio periplasmático donde son plegadas a su conformación nativa. Estos resultados indican que probablemente el sistema de secreción Sec tiene una función importante en los procesos de exportación y secreción de proteínas en *T. consotensis*.

5.4.2.2. Proteoma celular de *T. consotensis*

En el proteoma celular de *T. consotensis* se detectaron 668, 646 y 654 proteínas a 0, 5 y 40 g·l⁻¹ NaCl, respectivamente, donde 466 proteínas fueron comunes en las tres salinidades evaluadas (Figura 22). Con base en el factor de abundancia espectral normalizada (NSAF) de las proteínas detectadas en el proteoma celular de *T. consotensis*, las proteínas más abundantes correspondían a más del 15% del proteoma total detectado en este análisis. Estas proteínas fueron: la subunidad GroEL (3.7%), la proteína de unión a ADN, HU (3.7%), la O-acetil homoserina/O-acetil serina sulfhidrilo (2.6%), la rubreritrina (2.6%), la subunidad GroES (1.7%) y la peroxiredoxina (1.3%). Las chaperonas GroEL y GroES son esenciales para el plegamiento de las proteínas bajo condiciones normales y de estrés (Kim et al. 2013). La proteína de unión a ADN HU contribuye al control de la expresión de genes, recombinación, y replicación de ADN (Dorman and Deighan 2003). La rubreritrina contiene un sitio activo di ferroso que reacciona rápidamente con el peróxido de hidrógeno, el cual puede generar especies reactivas del oxígeno vía la reacción de Fenton, y es un sistema de protección contra estrés oxidativo vital (Kurtz 2006). La peroxiredoxina es también una enzima implicada en la detoxificación de peróxido de hidrógeno, y es conocida por tener una función clave no

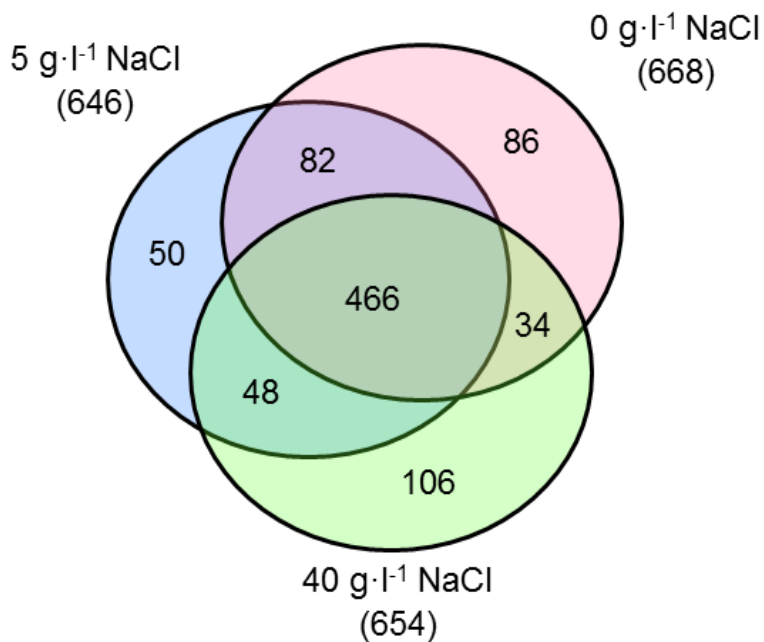


Figura 22. Diagrama de Venn para comparar el número de proteínas detectadas en el proteoma celular de *T. consotensis*, bajo las concentraciones de NaCl evaluadas

solo en la defensa contra el peróxido sino también en procesos de señalización celular regulados por peróxido de hidrógeno (Flohé 2010). Teniendo en cuenta la abundancia de chaperonas y proteínas contra estrés oxidativo detectadas es probable que estas proteínas tengan funciones indispensables para la supervivencia celular importantes en el metabolismo de *T. consotensis*. En diferentes bacterias y archaeas halófilas como *Halobacterium* NRC-1 (Shukla 2006), *Haloferax volcanii* (Kapatai et al. 2006), *Haloarcula marismortui* (Franzetti et al. 2001) y *Halobacillus dabanensis* (Feng et al. 2007) se han observado estas proteínas.

5.4.3. Respuesta celular de *T. consotensis* frente a cambios en la salinidad externa

La disminución de la salinidad conduce una masiva entrada de agua a la célula generando un incremento del volumen celular y de la turgencia mientras que un aumento de salinidad provoca una rápida salida de agua y pérdida de la turgencia, sí la célula no contrarresta la rápida entrada o salida de agua, esto podría conllevar a la muerte celular

(Spanheimer and Müller 2008). Por lo tanto, los organismos que habitan en ambientes salinos poseen diferentes estrategias de osmoadaptación para mantener la turgencia dentro de los límites de la supervivencia en condiciones de alta y baja salinidad.

En este estudio se analizó el exoproteoma y proteoma celular de *T. consotensis* bajo condiciones variables de salinidad con el objetivo de comprender los mecanismos moleculares de adaptación de esta bacteria en presencia de bajas y altas concentraciones de sal. Con el fin de identificar las proteínas potencialmente implicadas en estos mecanismos se realizó un análisis estadístico de la variación de la abundancia de las proteínas detectadas tanto en el exoproteoma como en el proteoma celular. Este análisis se llevó a cabo comparando los valores de abundancia obtenidos en salinidad óptima de crecimiento, $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, con respecto a los valores obtenidos a $0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ y $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. A continuación se discute la posible respuesta celular de *T. consotensis* frente a condiciones de estrés hipo e hiper-osmótico.

5.4.3.1. Respuesta celular de *T. consotensis* frente a una disminución de la salinidad externa

Los resultados del estudio de exoproteoma de *T. consotensis* mostraron que 23 proteínas presentaron cambios significativos en términos de abundancia, donde 10 proteínas aumentaron su producción mientras que 13 proteínas disminuyeron (Anexo 7). En el caso del proteoma celular se detectaron 93 proteínas con cambios significativos de abundancia, donde 69 proteínas aumentaron y 24 proteínas disminuyeron (Anexo 8). Las proteínas con cambios más significativos de abundancia en respuesta a una disminución de la salinidad se muestran en la Tabla 10. Las proteínas más abundantes se dividieron en cinco categorías con base en la clasificación de KEEG: (i) generación de energía, (ii) transcripción, (iii) control de calidad de las proteínas, (iv) protección contra estrés oxidativo y (vi) composición de la membrana lipídica. A continuación se discute la función de estas proteínas en la respuesta celular de *T. consotensis* frente a una disminución de la salinidad externa.

Tabla 10. Proteínas con los cambios más significativos en términos de abundancia detectadas en respuesta a una disminución de la salinidad externa

Proteína ID ¹	Anotación funcional	Clasificación funcional	Conteo espectral total	Fold change ²	pValue	gi proteína cercana
Exoproteoma						
98	Proteína HpnM, asociada con la biosíntesis de hopanoides	Biosíntesis de metabolitos secundarios	47	8,1	0,04	338740576
140	Proteína di sulfuro oxidoreductasa, DsbA	Hipotética	28	5,1	0,03	356878066
135	Subunidad principal, gpT, del Profago Mu	No clasificada	30	-5,4	0,00	167841676
Proteoma celular						
267	3-oxoacil (transportadora de acil) reductasa	Metabolismo energético	45	19,7	0,001	182678111
363	Regulador transcripcional putativo, familia LysR	Transcripción	26	12,0	0,020	356880311
418	Proteína de choque térmico Hsp20	Plegamiento de proteínas	21	9,8	0,000	83595084
342	Sistema de exportación RND, NodT	Transporte a través de membrana	30	7,7	0,000	83593387
480	3-hidroxi acil-CoA deshidrogenasa	Metabolismo de carbohidratos	15	7,4	0,000	134100401
493	3-hidroxi-3-metil glutaril-CoA liasa	Metabolismo de carbohidratos	14	6,9	0,002	209963715

¹ Proteína ID se refiere a los datos del Anexo 5 y 6

² Fold change representa la expresión a 0 o 40 g·l⁻¹ normalizada a la expresión a 5 g·l⁻¹

Tabla 10. (continuación). Proteínas con los cambios más significativos en términos de abundancia detectadas en respuesta a una disminución de la salinidad externa

Proteína ID ¹	Anotación funcional	Clasificación funcional	Conteo espectral total	Fold change ²	pValue	gi proteína cercana
Proteoma celular						
499	Proteína MdoG	Metabolismo de aminoácidos	13	6,6	0,000	312114292
369	Glutación S-transferasa	Metabolismo de aminoácidos	25	6,6	0,000	78067025
510	2,5-dicloro-2,5-ciclohexadieno-1,4-diol deshidrogenasa	Metabolismo energético	12	6,2	0,000	221635835
273	Proteasa HslUV	Plegamiento de proteínas	44	5,4	0,001	357425324
299	Proteína hipotética Mlg_1384	Hipotética	37	5,4	0,043	114320540
441	Cobaltoquelatase, subunidad CobT	Metabolismo de cofactores y vitaminas	18	-5,6	0,028	209966337
276	Ribonucleotido reductasa	Metabolismo de nucleótidos	43	-5,9	0,001	163795180
422	Proteína hipotética IMCC3088_2031	Hipotética	21	-6,4	0,000	329893805
410	Proteína de membrana externa	Procesos celulares y señalización	21	-6,6	0,032	356877094

¹ Proteína ID se refiere a los datos del Anexo 6

² Fold change representa la expresión a 0 o 40 g·l⁻¹ normalizada a la expresión a 5 g·l⁻¹

- **Generación de energía**

En el proteoma celular de *T. consotensis* se encontraron abundantemente tres proteínas involucradas en el metabolismo de ácidos grasos: (i) la proteína 3-oxoacil (transportadora de acilo) reductasa posiblemente involucrada en la reducción dependiente de NADPH de ACP (ACP por sus siglas en inglés *acyl carrier protein*) en el primer paso reductivo de la síntesis *de novo* de ácidos grasos (Hoang et al. 2002), (ii) la enzima 3-hidroxi acil-CoA deshidrogenasa y (iii) la proteína 3-hidroxi-3-metil glutaril-CoA liasa implicadas en el tercer paso de la β -oxidación de ácidos grasos (Jiang et al. 1997). Diferentes estudios han demostrado que en condiciones de estrés la degradación de ácidos grasos a través de la ruta de la β -oxidación produce Acetil-CoA que entra a la ruta de los ácidos tricarboxílicos (TCA) para generar energía necesaria para las respuestas adaptativas (Leuko et al. 2009). En consecuencia, la detección de una alta abundancia de enzimas implicadas en la β -oxidación de ácidos grasos probablemente indica que frente a una disminución de la salinidad externa *T. consotensis* requiere la generación de energía metabólica, la cual es necesaria para su respuesta adaptativa en esta condición.

- **Transcripción**

Las proteínas con una función regulatoria son necesarias y tienen un papel importante para controlar la expresión génica en la respuesta celular generada para contrarrestar cambios en el medio ambiente (Pflüger et al. 2007). La adaptación a condiciones hiposmóticas requiere una rápida respuesta y una efectiva protección, lo cual implica una regulación de los genes implicados en esta respuesta principalmente a nivel transcripcional (Juez et al. 2007).

En este estudio, se detectó un regulador transcripcional putativo CrgA relacionado con la familia LysR en alta abundancia en el proteoma celular a $0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. El análisis del contexto genómico de este regulador permitió determinar que el gen que codifica para el regulador CrgA está localizado al lado de genes que codifican para proteínas involucradas en la defensa contra estrés oxidativo, lo cual indica que posiblemente el regulador CrgA controla la expresión de estos genes. En el caso de *Rhodospirillum*

centenum, que también pertenece a la familia *Rhodospirillaceae*, se ha reportado que el regulador CrgA está localizado junto al gen que codifica para la enzima la glutatión-S-transferasa, indicando una fuerte conexión funcional entre estas dos proteínas. Particularmente, en el proteoma celular de *T. consotensis* se identificaron dos glutatión-S-transferasas en una alta abundancia a $0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Con base en el contexto genómico del regulador CrgA en *T. consotensis*, y sumado con la detección de la glutatión S-transferasa en alta abundancia en ausencia de sal, se puede inferir que este regulador podría estar directamente conectado con la regulación de la respuesta a estrés oxidativo. También se ha señalado que el regulador transcripcional codificado por el gen *yfeR* de la familia LysR, al cual también pertenece el regulador CrgA, es producido en altas cantidades bajo condiciones de estrés hipo-osmótico en *Salmonella entérica* serovar *Typhimurium* (Baños et al. 2011).

- **Control de calidad de las proteínas**

Bajo situaciones de estrés, la integridad funcional de las proteínas se asegura a través de mecanismos de control de calidad de las proteínas. Estos incluyen la acción de chaperonas moleculares, catálisis de plegamiento de proteínas y proteasas dependientes de ATP (Hahne et al. 2010). Estas proteínas son inducidas por diferentes condiciones como choque térmico, estrés osmótico, estrés oxidativo o inanición (Ambily Nath and Loka Bharathi 2011). Tanto en el exoproteoma como en el proteoma celular de *T. consotensis* se detectaron en altas cantidades de varias proteínas relacionadas con el mantenimiento e integridad de las proteínas.

En el exoproteoma se evidenció la expresión en altas cantidades de la proteína DsbA a $0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. La proteína DsbA es una oxidoreductasa que cataliza la formación de enlaces disulfuro en proteínas recién sintetizadas que son translocadas al periplasma. La mayoría de los sustratos de la proteína DsbA es eventualmente secretada, e incluye toxinas, factores de virulencia, maquinarias de adhesión y estructuras de motilidad (Heras et al. 2009). La proteína DsbA contiene una secuencia señal N-terminal que probablemente conduce la translocación fuera del citoplasma vía el sistema de secreción Sec-dependiente (Thorstenson et al. 1997). Esto probablemente indica que la proteína DsbA está involucrada en el plegamiento periplasmático de proteínas Sec-

dependientes de *T. consotensis*, que es según los resultados obtenidos en este estudio el principal sistema de secreción de esta bacteria. Esta función clave de la proteína DsbA en el proceso de translocación de proteínas a través de la membrana explica su abundancia a $0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, ya que la formación de puentes disulfuro es crucial para el funcionamiento de numerosas proteínas en condiciones extracelulares hostiles.

En cuanto al proteoma celular se evidenció un significativo aumento de expresión de proteínas implicadas en el plegamiento y reciclaje de proteínas, las cuales incluyen las chaperonas Hsp20 (9.8-*fold*) y GroES (1.8-*fold*), la proteasa HslUV (5.4-*fold*), la proteasa Zn-dependiente relacionada con PmbA (1.6-*fold*), la peptidasa U62 moduladora de la ADN girasa (2.6-*fold*) y la Clp proteasa dependiente de ATP (1.9-*fold*).

Las chaperonas son proteínas que interactúan y ayudan en el plegamiento y ensamblaje de otras proteínas (Kim et al. 2013). La chaperona Hsp20 pertenece a la familia de proteínas de choque térmico que presentan un peso molecular de 20 kDa y una estructura multimérica que contiene una región conservada COOH terminal. La chaperona Hsp20 se produce sólo bajo condiciones de estrés y se ha demostrado que tiene una función importante en la prevención de la agregación de proteínas (Garrido et al. 2012). La chaperona GroES es una proteína formada por un anillo de 7 subunidades idénticas simulando un domo, que se asocia con la chaperona GroEL. Estas chaperonas son moléculas ubicuas y esenciales que median el plegamiento de muchas proteínas dentro de su forma nativa (Kim et al. 2013). Las chaperonas GroEL y GroES se expresan bajo condiciones fisiológicas normales para desarrollar un rango de funciones indispensables para la supervivencia celular que mantienen el metabolismo celular, pero bajo condiciones de estrés, como choque osmótico o térmico, estas proteínas son rápidamente sobre-expresadas para proteger a la célula de cualquier tipo de daño (Mojica et al. 1997)

Las proteínas sufren constantes modificaciones en respuesta a los constantes cambios ambientales. Las proteínas dañadas o incorrectamente plegadas son degradadas por proteasas, contribuyendo a evitar su agregación potencial. Además, la

degradación es usada para remover proteínas perfectamente funcionales con propósitos regulatorios (Sauer and Baker 2011). La proteasa HslUV está implicada en el control de calidad de las proteínas facilitando, el plegamiento y desplegamiento de las proteínas, el ensamblaje y desensamblaje de complejos de proteínas, el transporte a través de la membrana y la degradación de proteínas (Sauer and Baker 2011). La proteasa dependiente de Zn relacionada con PmbA es una metaloproteasa que participa en el clivaje de residuos de aminoácidos C-terminal de proteínas o péptidos dependientes de metales (Makarova and Grishin 1999). La peptidasa U62 es también una peptidasa dependiente de Zn que fue originalmente descrita como un modulador de la girasa de *E. coli* (Murayama et al. 1996; Salzano et al. 2007). Finalmente, la Clp proteasa dependiente de ATP es una serina proteasa periplasmática compuesta de dos componentes ClpA y ClpP, que degradan proteínas en la presencia de ATP (Leuko et al. 2009).

Las chaperonas y proteasas son inducidas cuando la célula sufre estrés ambiental y pueden estar relacionadas con estrés hipo-osmótico (Coker et al. 2007; Mojica et al. 1997). Esto se ha demostrado en las archaeas halófilas extremas *H. salinarum* (Leuko et al. 2009) y *H. volcanii* (Kuo et al. 1997), donde se ha observado un incremento de la expresión de este tipo de proteínas en respuesta al estrés ocasionado por la disminución de la salinidad externa. Basados en los datos obtenidos en este estudio, se sugiere que la alta abundancia de chaperonas y proteasas a $0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ refleja la naturaleza crítica del plegamiento correcto de las proteínas bajo esta condición para asegurar su supervivencia.

- **Protección contra estrés oxidativo**

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS por sus siglas en inglés *reactive oxygen species*) y la capacidad del sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante (Imlay 2013). Los organismos aerobios usan oxígeno molecular (O_2) para la respiración u oxidación de nutrientes para obtener energía. Las especies reactivas de oxígeno, como el radical anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxil altamente reactivos ($\cdot\text{OH}$), son generados

continuamente en las células que crecen aeróbicamente. La mayoría de estos productos deriva de reducciones univalentes secuenciales de O₂ catalizadas por varias enzimas de la cadena respiratoria asociadas a membrana (Cabiscol et al. 2000).

En el proteoma celular de *T. consotensis* se detectó un aumento de la abundancia de cuatro enzimas involucradas en la respuesta celular a estrés oxidativo a 0.0 g·l⁻¹ NaCl, probablemente para contrarrestar el desajuste metabólico ocasionado por la disminución de la salinidad externa: la glutatión-S-transferasa (1.9-fold), la FAD/NAD(P)H tioredoxina reductasa (1.9-fold), la tioredoxina (1.7-fold) y la glutaredoxina 3 (1.7-fold). La glutatión-S-transferasa hace parte de una superfamilia de enzimas que tienen una función clave en la detoxificación celular. Esta enzima está implicada en una variedad de distintos procesos como biodegradación de xenobióticos, protección contra químicos y estrés oxidativo y resistencia a antimicrobianos. Una característica común de esta enzima es su habilidad para catalizar un ataque nucleofílico sobre grupos electrofílicos de un amplio rango de compuestos tóxicos, promoviendo de esta manera su excreción fuera de la célula (Allocati et al. 2009). La FAD/NAD(P)H tioredoxina reductasa cataliza la reducción de la tioredoxina y es un componente central de la tioredoxina. La tioredoxina reductasa tiene una función importante en muchas funciones biológicas, incluyendo síntesis de ADN, defensa contra estrés oxidativo y señalización redox (Holmgren and Lu 2010). La glutaredoxina es una enzima redox capaz de reducir puentes disulfuro usando el glutatión como donador de electrones. Esta enzima es un componente clave del sistema glutatión que reductivamente detoxifica sustancias como peróxidos (Cabiscol et al. 2000).

La alta producción de enzimas implicadas en la protección contra estrés oxidativo en condiciones de baja salinidad ha sido previamente reportada, como es el caso de la superóxido dismutasa la cual es activada en condiciones de alta y baja salinidad en *Halobacterium* sp. NRC-1; asimismo se reportó para esta archaea la sobre-regulación de la enzima glutatión-S-transferasa bajo condiciones hipo-osmóticas (Coker et al. 2007). Teniendo en cuenta la alta abundancia de proteínas implicadas en la respuesta celular a estrés oxidativo a 0 g·l⁻¹ NaCl, se sugiere que la remoción de especies

reactivas del oxígeno es de gran importancia en *T. consotensis*, ya que estas enzimas permiten proteger a esta bacteria del daño oxidativo causado durante la exposición a condiciones hipo-osmóticas.

- **Composición de la membrana lipídica**

Se han observado cambios adaptativos en la composición lipídica de la membrana celular en respuesta a variaciones de la salinidad. Estos cambios permiten mantener la fluidez de la membrana para preservar las funciones biológicas (De Carvalho and Fernandes 2010). En respuesta a una disminución de la salinidad externa se detectó una alta producción de la proteína HpnM (8.1-*fold*) en su exoproteoma. La proteína HpnM, involucrada en la biosíntesis de hopanoides, es miembro de una familia de proteínas putativas transportadoras conocidos como la proteína de tolerancia tolueno Ttg2D. Esta familia está implicada en los cambios de los ácidos grasos y de la composición de fosfolípidos de la membrana celular de *Pseudomonas putida*, que conduce a un incremento de la rigidez de la membrana celular, este puede ser considerado un mecanismo físico que previene la penetración de los solventes (Kim et al. 1998).

Los hopanoides son triterpenoides pentacíclicos que mantienen la estabilidad de la membrana mediante el incremento de su rigidez de manera similar a lo que sucede con los esteroides actúan en algunos eucariotas y contribuyen a disminuir la difusión de iones a través de la membrana (De Carvalho and Fernandes 2010; Schmerk et al. 2011). Los estudios sobre la función de los hopanoides han propuesto que su producción puede estar conectada con cambios fisiológicos. Adicionalmente, algunas investigaciones han reportado que los hopanoides son necesarios para contrarrestar factores de estrés externo, como la tolerancia a etanol en *Zymomonas mobilis* (Horbach et al. 1991), tolerancia a pH extremo en *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Poralla et al. 1984) y *Rhodospseudomonas palustris* (Welander et al. 2009), y la difusión de oxígeno en *Frankia* sp. (Berry et al. 1993). Se ha demostrado que los hopanoides inducen un alto empaquetamiento de lípidos en la membrana, conduciendo, por lo tanto, a una reducción de la difusión de pequeñas moléculas e incluso agua. Esto se ha observado en *Streptomyces coelicolor*, donde la síntesis de

hopanoides evita la difusión de agua bajo condiciones de estrés en el área micelial (Poralla et al. 2000). Basados en los resultados obtenidos en este estudio, la detección de la proteína HpnM en una alta abundancia a 0 g·l⁻¹ NaCl probablemente indica que los hopanoides pueden ayudar a minimizar la difusión de agua y proteger a la célula contra los efectos causados por su entrada masiva. Aunque, hasta ahora no existen reportes acerca del aumento de la síntesis de hopanoides en respuesta a una condición de estrés hipo-osmótico, la relativa abundancia de la proteína HpnM en *T. consotensis* podría indicar una función clave de los hopanoides frente a la disminución repentina de la salinidad externa.

En la Figura 23 se muestra un esquema que resume los posibles procesos celulares involucrados en la adaptación de *T. consotensis* a una disminución de la salinidad externa. A partir de los resultados obtenidos en el exoproteoma y proteoma celular de *T. consotensis* a 0 g·l⁻¹, se puede inferir que en respuesta a una disminución de la salinidad externa esta bacteria aumenta la expresión principalmente de proteínas involucradas en mantener la viabilidad de sus proteínas y asegurar su apropiado funcionamiento, la cuales incluyen chaperonas, proteasas y proteínas relacionadas con la defensa a estrés oxidativo. Además, *T. consotensis* secreta la proteína HpnM, en altas cantidades, la cual posiblemente está implicada en la alteración de la composición de su membrana celular para minimizar la entrada de agua ocasionada por una disminución de la salinidad.

5.4.3.2. Respuesta celular de *T. consotensis* frente a un aumento de la salinidad externa

En respuesta a un aumento de la salinidad externa se detectaron en el exoproteoma de *T. consotensis* 65 proteínas que presentaron cambios significativos en términos de abundancia (*fold change* > 1.5), donde 37 proteínas aumentaron su abundancia mientras que 28 proteínas disminuyeron (Anexo 17). En el caso del proteoma celular se detectaron 135 proteínas con cambios significativos de abundancia, donde 79 proteínas aumentaron su abundancia y 56 proteínas disminuyeron (Anexo 18). La Tabla 11 muestra las proteínas que presentaron cambios más significativo (*fold change* > 5.0) en respuesta a

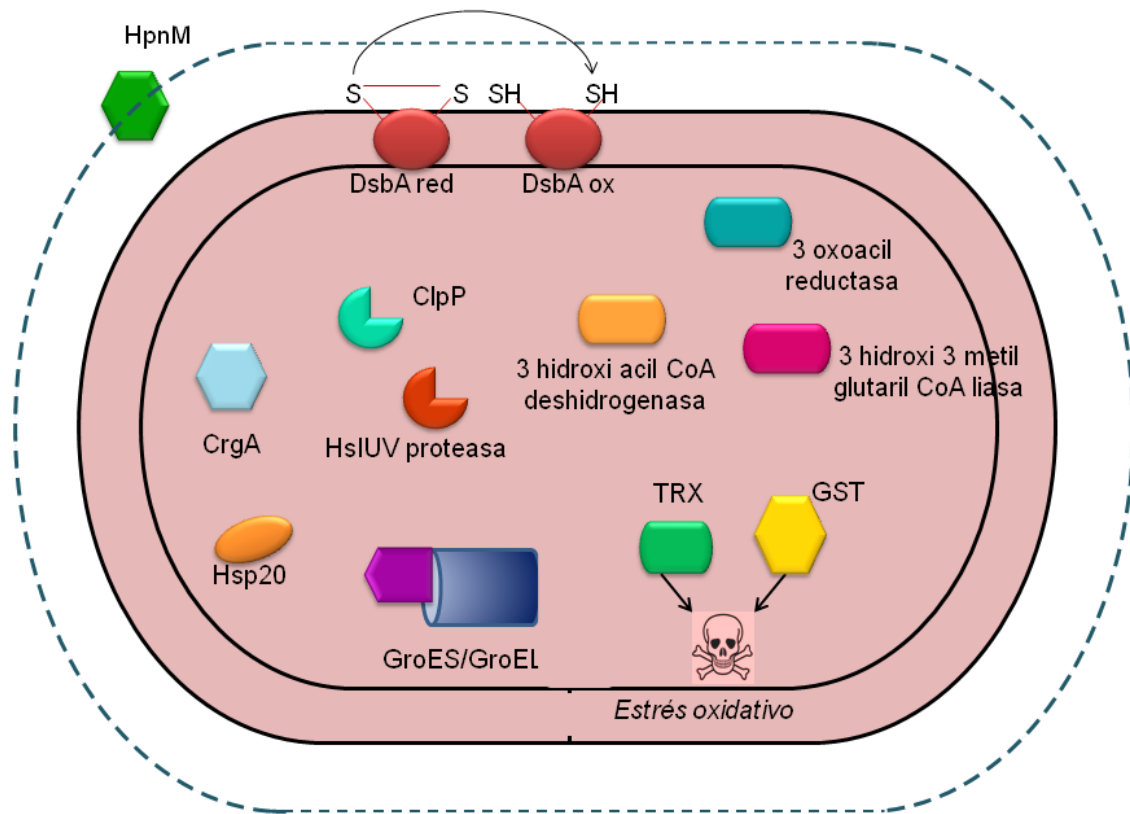


Figura 23. Modelo de los procesos celulares involucrado en la adaptación de *T. consotensis* a una disminución de la salinidad externa.

un aumento de la salinidad. En el exoproteoma y el proteoma celular de *T. consotensis* la mayoría de las proteínas que aumentaron su expresión a $40 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ estuvieron relacionadas con transducción de señales, quimiotaxis y transporte a través de membrana. Además, en el proteoma celular se detectaron algunas proteínas implicadas con metabolismo de carbohidratos, transcripción y traducción. A continuación se discute la función de estas proteínas en la respuesta celular de *T. consotensis* frente a un aumento de la salinidad externa.

Tabla 11. Proteínas con los cambios más significativos en términos de abundancia detectadas en respuesta a un aumento de la salinidad externa

Proteína ID ¹	Anotación funcional	Clasificación funcional	Conteo espectral total	<i>Fold change</i> ²	<i>p</i> Value	gi proteína cercana
Exoproteoma						
80	Proteína de quimiotaxis aceptora de metilo	Procesos celulares y señalización	61	11,6	0,010	163793401
81	Transductor sensorial putativa de la proteína de quimiotaxis aceptora de metilo	Procesos celulares y señalización	60	11,4	0,000	310825910
72	Proteína ribosomal 30S, S2	Traducción	64	10,1	0,040	209964520
103	Modulador de proteasa	Modificaciones post-traduccionales	43	8,2	0,020	357427897
124	Transductor sensorial putativo de la proteína de quimiotaxis aceptora de metilo	Procesos celulares y señalización	36	7,8	0,020	163792755
128	Proteína de quimiotaxis aceptora de metilo	Procesos celulares y señalización	35	7,4	0,020	325293901
61	Fructosa-bisfosfato aldolasa	Metabolismo de carbohidratos	60	6,5	0,000	148259397

¹ Proteína ID se refiere a los datos del Anexo 5 y 6

² *Fold change* representa la expresión a 0 o 40 g·l⁻¹ normalizada a la expresión a 5 g·l⁻¹

Tabla 11. (continuación). Proteínas con los cambios más significativos en términos de abundancia detectadas en respuesta a un aumento de la salinidad externa

Proteína ID ¹	Anotación funcional	Clasificación funcional	Conteo espectral total	Fold change ²	pValue	gi proteína cercana
Exoproteoma						
146	Componente periplasmático del sistema de transporte tipo TRAP de C ₄ -Dicarboxilatos	Transporte a través de membrana	26	6,0	0,030	304394084
68	Proteína de quimiotaxis aceptora de metilo	Procesos celulares y señalización	67	6,0	0,030	295687872
71	Subunidad beta de la ARN polimerasa	Metabolismo de nucleótidos	65	6,0	0,050	356877984
118	Proteína periplasmática del transportador tipo ABC de aminoácidos de cadena ramificada	Transporte a través de membrana	33	5,8	0,020	119899732
153	Transductor sensorial de la proteína de quimiotaxis aceptora de metilo	Procesos celulares y señalización	24	5,5	0,030	328543081
134	Sensor y regulador del sistema de dos componentes, sensor quinasa	Procesos celulares y señalización	26	5,0	0,010	288962380
60	Arildialquilfosfatasa	No clasificada	72	-7,1	0,000	163798084

¹ Proteína ID se refiere a los datos del Anexo 5 y 6

² Fold change representa la expresión a 0 o 40 g·l⁻¹ normalizada a la expresión a 5 g·l⁻¹

Tabla 11. (continuación). Proteínas con los cambios más significativos en términos de abundancia detectadas en respuesta a un aumento de la salinidad externa

Proteína ID ¹	Anotación funcional	Clasificación funcional	Conteo espectral total	<i>Fold change</i> ²	pValue	gi proteína cercana
Proteoma celular						
80	Proteína de unión a soluto extracelular	Transporte a través de membrana	142	51,6	0,019	91787986
95	Proteína de unión a glutamato/glutamina/aspartato/asparagina, bztA	Transporte a través de membrana	127	21,6	0,045	255264624
138	Subunidad DctP del transportador tipo TRAP de dicarboxilatos	Transporte a través de membrana	97	17,9	0,043	163793049
261	Transductor sensorial de quimiotáxis	Transducción de señales	46	10,4	0,003	83594106
393	Fosfomanomutasa	Metabolismo de carbohidratos	23	9,4	0,000	357427618
395	Dihidropirimidinasas	Metabolismo de nucleótidos	23	9,3	0,025	221202551
410	Permeasa ProW del sistema de transporte glicina betaína/L-prolina	Transporte a través de membrana	21	8,7	0,005	114705345

¹ Proteína ID se refiere a los datos del Anexo 5 y 6

² *Fold change* representa la expresión a 0 o 40 g·l⁻¹ normalizada a la expresión a 5 g·l⁻¹

Tabla 11. (continuación). Proteínas con los cambios más significativos en términos de abundancia detectadas en respuesta a un aumento de la salinidad externa

Proteína ID ¹	Anotación funcional	Clasificación funcional	Conteo espectral total	Fold change ²	pValue	gi proteína cercana
Proteoma celular						
422	Cadena alfa de la gluconato 2-dehidrogenasa	Metabolismo de carbohidratos	20	8,3	0,000	288961820
430	Sensor Pas/Pac de la proteína de quimiotaxis aceptora de metilo	Transducción de señales	20	8,3	0,001	283780841
417	Proteofosfoglycan ppg4	No clasificada	20	8,2	0,003	
425	Proteofosfoglicano ppg4	Hipotética	20	8,2	0,003	261217766
459	Transductor sensorial la proteína de quimiotaxis aceptora de metilo	Transducción de señales	17	7,2	0,000	86750655
466	Regulador transcripcional CarD	Transcripción	16	6,8	0,000	46201683
465	Proteína NifU	Metabolismo energético	16	6,8	0,000	163797123
499	Regulador transcripcional, familia TetR	Transcripción	13	5,8	0,014	357427940
496	Dihidrolipoamida deshidrogenasa	Metabolismo de carbohidratos	13	5,7	0,003	299134953
279	Señal de la ruta de translocación Tat	Transporte a través de membrana	42	5,6	0,036	163796041

¹ Proteína ID se refiere a los datos del Anexo 5 y 6

² Fold change representa la expresión a 0 o 40 g·l⁻¹ normalizada a la expresión a 5 g·l⁻¹

Tabla 11. (continuación). Proteínas con los cambios más significativos en términos de abundancia detectadas en respuesta a un aumento de la salinidad externa

Proteína ID ¹	Anotación funcional	Clasificación funcional	Conteo espectral total	Fold change ²	pValue	gi proteína cercana
Proteoma celular						
504	Carbohidrato quinasa	No clasificada	12	5,4	0,002	318041158
503	YbaK/prolil-tRNA sintetasa	No clasificada	12	5,4	0,000	163796437
398	Histidina quinasa CheA	Procesos celulares y señalización	23	5,2	0,001	163793343
112	Proteína hipotética ELI_0285	Transducción de señales	115	5,2	0,009	310825910
211	Fenil alanil-tRNA sintetasa	Metabolismo de aminoácidos	63	5,1	0,001	163793834
526	Adenilo succinato liasa	Metabolismo de nucleótidos	11	5,1	0,000	83312151
513	Proteína hipotética BAL199_13428	Hipotética	11	5,0	0,005	163796746
500	Componente permeasa del transportador tipo ABC de péptidos	Transporte a través de membrana	13	-5,0	0,010	260774287
128	Proteína relacionada con la arildialquilfosfatasa	Metabolismo de aminoácidos	104	-6,0	0,044	163798084
212	Oxidoreductasa	No clasificada	63	-6,0	0,002	90419964
456	Proteína hipotética Caul_2682	Hipotética	17	-6,3	0,034	167646644

¹ Proteína ID se refiere a los datos del Anexo 5 y 6

² Fold change representa la expresión a 0 o 40 g·l⁻¹ normalizada a la expresión a 5 g·l⁻¹

Tabla 11. (continuación). Proteínas con los cambios más significativos en términos de abundancia detectadas en respuesta a un aumento de la salinidad externa

Proteína ID ¹	Anotación funcional	Clasificación funcional	Conteo espectral total	Fold change ²	pValue	gi proteína cercana
Proteoma celular						
224	GTPasa de división celular	Crecimiento celular y muerte	59	-6,4	0,001	163794533
445	Cobaltoquelatasa, subunidad CobT	Metabolismo de cofactores y vitaminas	18	-6,4	0,026	209966337
278	Endoribonucleasa de la familia L-PSP	Traducción	42	-6,6	0,009	119964221
435	Proteína hipotética RSKD131_3337	Hipotética	19	-6,8	0,014	221369174
266	Proteína de unión a ATP	No clasificada	45	-6,9	0,039	325293251
108	O-succinil homoserina sulfurilasa	Metabolismo de aminoácidos	117	-6,9	0,002	354587578
254	Proteína hipotética	Hipotética	47	-7,1	0,001	260430924
240	Dihidroxi-acido deshidratasa	Metabolismo de aminoácidos	50	-7,6	0,001	338983396

¹ Proteína ID se refiere a los datos del Anexo 5 y 6

² *Fold change* representa la expresión a 0 o 40 g·l⁻¹ normalizada a la expresión a 5 g·l⁻¹

Tabla 11. (continuación). Proteínas con los cambios más significativos en términos de abundancia detectadas en respuesta a un aumento de la salinidad externa

Proteína ID ¹	Anotación funcional	Clasificación funcional	Conteo espectral total	<i>Fold change</i> ²	pValue	gi proteína cercana
Proteoma celular						
405	Factor de reparación transcricional	Replicación y reparación	22	-7,8	0,002	347737823
397	O-acetil serina sulfhidrilasa	Metabolismo de aminoácidos	23	-8,2	0,023	110680142
4	O-acetil homoserina sulfhidrilasa	Metabolismo de aminoácidos	983	-8,9	0,001	222106262
186	Hidrolasa asociada a la pared celular, proteína asociada a invasión	No clasificada	72	-23,2	0,009	257068140

¹ Proteína ID se refiere a los datos del Anexo 5 y 6

² *Fold change* representa la expresión a 0 o 40 g·l⁻¹ normalizada a la expresión a 5 g·l⁻¹

- **Transducción de señales**

Los sistemas de transducción de señales regulan los procesos celulares en todos los organismos vivos. El éxito evolutivo de los procariotas depende de su habilidad para detectar y responder rápidamente a cambios dentro y fuera de la célula (Wuichet et al. 2010). Por consiguiente, los microorganismos poseen diferentes mecanismos de percepción de estímulos, los cuales son la ruta para monitorear cambios físicos y químicos en el espacio externo, y mecanismos de transducción de señales, que transforman los estímulos físicos o químicos detectados en señales útiles dentro de la célula, las cuales regulan las respuestas adaptativas celulares, a través de la activación de proteínas en un corto plazo, y por medio de regulación genética en un largo plazo (Krämer 2010). De otra parte, algunos estudios han demostrado una conexión de la complejidad del genoma (número potencial de genes codificantes) y el estilo de vida de organismo con el número total de proteínas relacionadas con transducción de señales (Galperin et al. 2010). Los microorganismos con estilos de vida y genomas complejos generalmente codifican sistemas regulatorios más especializados y diversos indicando que un alto grado de complejidad requiere un alto nivel de control de expresión de genes y actividad celular (Ashby 2004).

En este estudio se identificó un total de 18 proteínas relacionadas con transducción de señales, que presentaron un incremento de su expresión en respuesta al aumento de la salinidad, 8 proteínas en el exoproteoma y 10 proteínas en el proteoma celular. Estas proteínas están relacionadas con la proteína de quimiotaxis aceptora de metilo, la proteína histidina quinasa CheA y la proteína reguladora trasmisora de la señal CheY.

Las proteínas de quimiotaxis aceptoras de metilo (MCPs) son una familia de receptores bacterianos que median la quimiotaxis para diversas señales, respondiendo a cambios en la concentración de atrayentes o repelentes en el ambiente mediante la alteración del comportamiento natatorio (Derr et al. 2006). La proteína histidina quinasa CheA es un sensor del sistema regulatorio de dos componentes, que censa estímulos ambientales extracelulares (Jung et al. 2012). La proteína CheY es un miembro de la familia de reguladores de respuesta en sistemas

de señalización, donde CheY recibe la señal de una proteína sensora, usualmente una proteína histidina quinasa (Bourret 2010). La sobre-expresión de estas proteínas en respuesta a un aumento de la salinidad externa ha sido reportada en la archaea halófila extrema *H. salinarum* (Coker et al. 2007) y en las bacterias halófilas moderadas *H. dabanensis* (Feng et al. 2007) y *C. glutamicum* (Bott and Brocker 2012), demostrando la importancia de estas proteínas para censar los cambios de la osmolalidad externa.

La abundancia de proteínas involucradas en procesos de transducción de señales ha sido reportada en especies que están ampliamente distribuidas en ambientes marinos y de agua dulce, y en sedimentos y suelos, lo cual puede estar relacionado con su habilidad para adaptarse a múltiples y constantes cambios ambientales (Lacal et al. 2010). Por lo tanto, el alto número de proteínas relacionadas con procesos de transducción de señales detectadas a 40 g·l⁻¹ NaCl podría estar relacionado con el estilo de vida de *T. consotensis*, indicando su habilidad para censar eficientemente cambios químicos o físicos en el espacio externo que posiblemente permite su rápida adaptación a condiciones cambiantes de salinidad en su hábitat natural.

Las proteínas MCP y CheA, las cuales aumentaron su producción a 40 g·l⁻¹ NaCl, son los dos principales mecanismos que permiten a los microorganismos censar las señales ambientales y adoptar una respuesta quimiotáctica a estos estímulos. El reconocimiento de las señales por parte de la proteína aceptora de metilo produce un estímulo molecular que modula la autofosforilación de la proteína CheA y esta proteína a su vez transfiere un grupo fosforilo a la proteína reguladora de la respuesta CheY. Cuando la proteína CheY se fosforila sufre un cambio conformacional que le permite una interacción con el motor flagelar. Como resultado de esta interacción, la célula modifica la rotación flagelar conduciendo a la migración hacia ambientes favorables (Krell et al. 2011).

En el caso de *T. consotensis*, Díaz-Cárdenas et al. (2010) reportaron que la presencia de flagelos o filamentos axiales no fueron evidentes por microscopía electrónica, bajo condiciones óptima de crecimiento (30°C y 5 g·l⁻¹ NaCl). Sin embargo, en este estudio

la flagelina fue identificada como una de las proteínas más abundantes a $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, tanto el exoproteoma como en el proteoma celular de *T. consotensis*. La flagelina es una proteína polimérica y representa el principal componente de flagelo bacteriano que forma cadenas helicoidales alrededor del centro hueco del filamento flagelar, que constituye el componente propulsor del flagelo (Zhang et al. 2012). La posibilidad de presencia de flagelos en *T. consotensis* es reforzada por la detección en su genoma de todos los genes implicados en la biogénesis del flagelo. En algunos organismos halófilos, como es el caso de la bacteria *H. halophilus*, se ha demostrado que procesos fisiológicos como la germinación de endosporas, la activación del transporte de solutos compatibles y la motilidad y producción del flagelo son procesos dependientes de Cl^- , indicando la función de este anión en la activación de genes o proteínas (Averhoff and Müller 2010). Saum & Muller (2002) analizaron el efecto de Cl^- en la transcripción del gen *fliC*, el gen que codifica uno de los componentes del flagelo, y determinaron que la expresión de este gen es estimulada en presencia de Cl^- (Roeßler and Müller 2002). Estas evidencias permiten sugerir que posiblemente presencia de flagelos y el comportamiento quimiotáctico de *T. consotensis* son activados en respuesta al aumento de la concentración de Cl^- en el ambiente, y esto explicaría la ausencia de flagelos en su salinidad óptima de crecimiento.

- **Transporte a través de membrana**

La respuesta primaria de los microorganismos para contrarrestar un aumento de la concentración de sal del medio ambiente involucra la activación de una amplia variedad de sistemas de transporte, específicos e inespecíficos, los cuales están relacionados con el transporte de solutos compatibles, la acumulación de iones K^+ y la exclusión de iones Na^+ (Krämer 2010).

En respuesta a un aumento de la salinidad externa ($40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) se observó que tanto en el exoproteoma como en el proteoma celular *T. consotensis* aumenta significativamente la producción de proteínas relacionadas con sistemas de transporte involucrados en la salida de iones Na^+ y con proteínas implicadas en la captura y transporte de solutos compatibles. En términos de sistemas de transporte involucrados en la exclusión de iones Na^+ del citoplasma, se identificaron la subunidad DctP y la

proteína de unión a glutamato/glutamina/ aspartato/asparagina, bztA, y el componente periplasmático del sistema de transporte tipo TRAP de C₄-dicarboxilatos, la proteína de unión a soluto relacionada con el sistema de transporte tipo ABC de dipeptidos, y la proteína periplasmática del sistema de transporte tipo ABC de aminoácidos de cadena ramificada.

El sistema de transporte TRAP son transportadores secundarios dependientes de una proteína de unión a sustrato (SBP por sus siglas en ingles *substrate-binding protein*) que es una proteína extracitoplasmática involucrada en el reconocimiento de sustratos (Fischer et al. 2010). Este sistema de transporte transporta solutos usando la energía derivada del transporte termodinámicamente favorable de otro soluto, usualmente, Na⁺ o H⁺ (Mulligan et al. 2011). El sistema de transporte tipo TRAP de C₄-dicarboxilatos está involucrado en el transporte de C₄-dicarboxilatos y azúcares usando un gradiente de Na⁺, y tienen una función importante en la regulación de la homeostasis del pH y en el ciclo del sodio en organismos que habitan en ambientes salinos como es el caso de *R. capsulatus* (Walmsley et al. 1992), '*Spiribacter salinus*' (López-Pérez et al. 2013) y *H. elongata* (Mulligan et al. 2011). El aumento de la abundancia de este tipo de transportadores en el exoproteoma y proteoma celular de *T. consotensis* en respuesta al aumento de la concentración de sal indica que posiblemente la salida de Na⁺ es principalmente conducida por un gradiente de protones.

En cuanto a la proteína de unión a soluto relacionada con el sistema de transporte tipo ABC de dipéptidos y la proteína periplasmática del sistema de transporte tipo ABC de aminoácidos de cadena ramificada, que también aumentaron su abundancia a 40 g·l⁻¹ NaCl, se tiene que estas proteínas contribuyen a la acidificación del citoplasma mediante la liberación de aminoácidos ácidos a partir de los solutos transportados. La proteína de unión a soluto relacionada con el sistema de transporte tipo ABC de dipéptidos está implicada en el transporte de dipéptidos que son convertidos a glutamato o aspartato por acción de una aminotransferasa (Takami et al. 2002). En el caso de la proteína periplasmática del sistema de transporte tipo ABC de aminoácidos de cadena ramificada está relacionada en el transporte de aminoácidos de cadena ramificada. Los aminoácidos de cadena ramificada como leucina, isoleucina y valina son convertidos a L-glutamato en presencia de 2-oxoglutarato y piridoxal fosfato por

acción de una aminotransferasa (Ziegler et al. 2010). Estos sistemas de transporte están ampliamente distribuidos en varios organismos marinos como *Oceanobacillus iheyensis* (Takami et al. 2002), *Salinispora* sp. (Penn and Jensen 2012), *Rhodopseudomonas palustris* (Larimer et al. 2004) y *Roseobacter* sp. (Moran et al. 2007), y también se ha reportado que representan una proporción significativa de los genes observados en metagenomas marinos (Morris et al. 2010). Esta distribución indica que los transportadores ABC de dipéptidos y aminoácidos ramificados representan una importante adaptación marina dado que el glutamato acumulado puede funcionar como un ión de carga opuesta para el K⁺, que permite mantener el balance del estado eléctrico del citoplasma (Penn and Jensen 2012). Previos estudios ha demostrado una acción regulatoria entre la acumulación de K⁺ y glutamato en respuesta a estrés osmótico en bacterias entéricas y en la archaea haloalcalófila *Natronococcus occultus* (Roeßler and Müller 2001). La detección de altas cantidades de estos sistemas de transporte a 40 g·l⁻¹ permite suponer que *T. consotensis* acumula glutamato para mantener el equilibrio eléctrico al interior de la célula en respuesta a altas concentraciones de sal.

En relación con los sistemas de transporte involucrados en la acumulación de solutos compatibles se detectó un aumento de la abundancia de la proteína permeasa ProW y la proteína de unión a sustrato ProX del sistema de transporte ProU, en el proteoma celular y exoproteoma, respectivamente. Igualmente se encontró en el proteoma celular, que en presencia de 40g·l⁻¹ NaCl hubo un aumento de la producción de una permeasa relacionada con el sistema de transporte OpuA (1.8-*fold*) y una proteína relacionada con el sistema de transporte de la familia MFS (3.1-*fold*).

Las proteínas ProW y ProX hacen parte del sistema de transporte de alta afinidad ProU, el cual es un eficiente transportador de glicina betaína y prolina betaína (Sleator and Hill 2002). El sistema ProU es uno de los transportadores mejor caracterizados encontrado en *E. coli* (Gul and Poolman 2013) y *S. typhimurium* (White et al. 2010), donde se ha reportado que la expresión de los genes *proVWX* es incrementada en condiciones hiper-osmóticas, permitiendo por lo tanto un aumento en la captura de solutos compatibles en ambientes de alta osmolalidad (Breed et al. 2001). El sistema OpuA es un transportador secundario tipo ABC implicado en la captura de prolina y

glicina betaína que ha sido estudiado en detalle en *B. subtilis*, y al igual que en el sistema ProU, la expresión del gen *opuA* es sobre-regulada en respuesta al aumento de la osmolalidad externa (Hoffmann et al. 2013). Por último, los sistemas de transporte relacionados con la familia MFS son transportadores secundarios que transportan un amplio espectro de sustratos a través de la membrana celular en respuesta a gradientes iónicos quimiotácticos y tiene una función importante en múltiples procesos fisiológicos solutos pequeños (Yan 2014). Dentro de esta familia de transportadores se encuentra el sistema ProP implicado en el transporte de solutos compatibles como prolina, ectoína y glicina betaína (Kempf and Bremer 1998). La presencia en altas cantidades de proteínas relacionadas con los sistemas de transporte mencionados anteriormente indica la importancia de la acumulación de solutos orgánicos compatibles en *T. consotensis* para contrarrestar el efecto causado por el aumento de la salinidad del medio.

De otra parte, previos estudios han demostrado que existe una conexión entre la acumulación de glutamato y la activación de los genes que codifican para algunos transportadores de solutos compatibles, como es el caso de *H. halophilus*, donde la acumulación de glutamato en altas concentraciones activa la expresión de los genes *pro* relacionados con la producción de prolina (Saum and Müller 2007). Basado en los resultados obtenidos en este estudio, se sugiere que probablemente *T. consotensis* acumula glutamato hasta que una concentración determinada es alcanzada dentro de la célula, la cual podría estimular la expresión de los sistemas ProU o ProP para la captura de glicina betaína o prolina.

- **Generación de energía**

Como se mencionó anteriormente los procesos implicados en la generación de energía son bastante activos en respuesta a condiciones de estrés osmótico. En el exoproteoma y el proteoma celular de *T. consotensis* se detectó un aumento significativo de la abundancia de proteínas relacionadas con la ruta de la glicolisis y con la síntesis de aminoácidos.

Dentro de las enzimas relacionadas con ruta de la glucólisis que aumentaron su producción a $40 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaCl}$ se encuentran la fructosa-bisfosfato aldolasa, encontrada en el exoproteoma, y las enzimas dihidrolipoamida deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa y enolasa encontradas en el proteoma celular. Estos resultados son consistentes con los estudios proteómicos reportados para *H. dabanensis* (Feng et al. 2006), *H. salinarum* (Leuko et al. 2009) y *C. salexigens* (Pastor et al. 2013), donde se determinó que el incremento de la expresión de enzimas relacionadas con las rutas de la glicólisis y TCA suministra más energía a las células en condiciones de estrés hiper-osmótico. Con respecto a las enzimas involucradas en la síntesis de aminoácidos que presentaron un aumento de su producción en presencia de altas concentraciones de NaCl se identificaron las enzimas arginina succinato liasa, fenil alanil-tRNA sintetasa, glicina deshidrogenasa, 3-desoxi-7-fosfoheptulonato sintasa y succinato-semialdehído deshidrogenasa en el proteoma celular. La síntesis de aminoácidos es necesaria para la síntesis de acetil-CoA, que es uno de los componentes claves del ciclo de Krebs. Esta ruta metabólica, junto con el metabolismo de azúcares, representan las principales fuentes de ATP para la célula que están sometidas a condiciones de estrés osmótico, como se ha reportado en la bacteria halotolerante *L. monocytogenes* (Duché et al. 2002). La abundancia de proteínas relacionadas con las rutas de la glicólisis y TCA en *T. consotensis* indica que el aumento de la salinidad externa conduce a un incremento de la degradación de azúcares y a la síntesis de aminoácidos para producir ATP, el cual puede ser utilizado en los diferentes mecanismos de osmoadaptación empleados por este microorganismo.

- **Transcripción y traducción**

En el proteoma celular de *T. consotensis* se detectó el aumento de la producción de dos reguladores transcripcionales. El activador transcripcional relacionado con CarD conservado en los géneros *Magnetospirillum* y *Azospirillum*, y el regulador transcripcional relacionado con RutR conservado entre los miembros de la clase β -*Proteobacteria*. La proteína CarD es un regulador transcripcional que directamente interactúa con la ARN polimerasa y que controla la transcripción de ARNr en estado estacionario y durante diversas condiciones de estrés celular que incluyen daño de

ADN, estrés oxidativo y escasez de nutrientes (Srivastava et al. 2013). La proteína RutR es un regulador de genes involucrados en la degradación de pirimidinas y purinas, el transporte de glutamato y la síntesis de glutamina y arginina (Shimada et al. 2007). Adicionalmente, se encontró a $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl el aumento de la abundancia de la proteína de modulación sigma 54, que está ampliamente distribuido en el dominio Bacteria. Este factor es requerido para la expresión de varios genes relacionados con el metabolismo energético, la esporulación, y choque osmótico y térmico (Seshasayee et al. 2011). La sobre-expresión del factor sigma 54 en presencia de altas concentraciones de sal ha sido reportada en la bacteria halófila moderada *H. dabanensis* (Feng et al. 2007) y en la archaea halófila extrema *H. volcanii* (Bidle et al. 2008). La abundancia de estos reguladores transcripcionales permite sugerir que posiblemente tienen una función importante en el control de la expresión de proteínas relacionadas con la respuesta de estrés general y con el transporte de glutamato en *T. consotensis* frente a un incremento de la salinidad externa.

En la Figura 24 se encuentra un esquema que resume los posibles procesos celulares involucrados en la adaptación de *T. consotensis* a un aumento de la salinidad externa. A partir de los resultados anteriormente expuestos se deduce que en presencia de altas concentraciones de sal ($40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl) esta bacteria halotolerante aumenta significativamente la abundancia principalmente de proteínas relacionadas con sistemas de transporte y procesos de regulación de señales. *T. consotensis* produce altas cantidades de las proteínas MCPs, CheA y CheY, que son probablemente responsables de censar eficientemente los cambios en la concentración de Cl^- y generar su respuesta quimiotáctica. La detección de cambios en la salinidad externa conduce al incremento de la producción de sistemas de transporte involucrados en el transporte de glutamato, Na^+ y solutos compatibles. De acuerdo con los resultados obtenidos es posible que *T. consotensis* presente una respuesta bifásica, en la cual ocurre un incremento de los niveles de glutamato intracelular acoplado con la salida de Na^+ , como repuesta primaria, seguido de una respuesta secundaria que implica el aumento de la captura y transporte de solutos compatibles, como glicina betaína o prolina, para evitar la salida masiva de agua como consecuencia de las altas concentraciones de sal presentes en el medio.

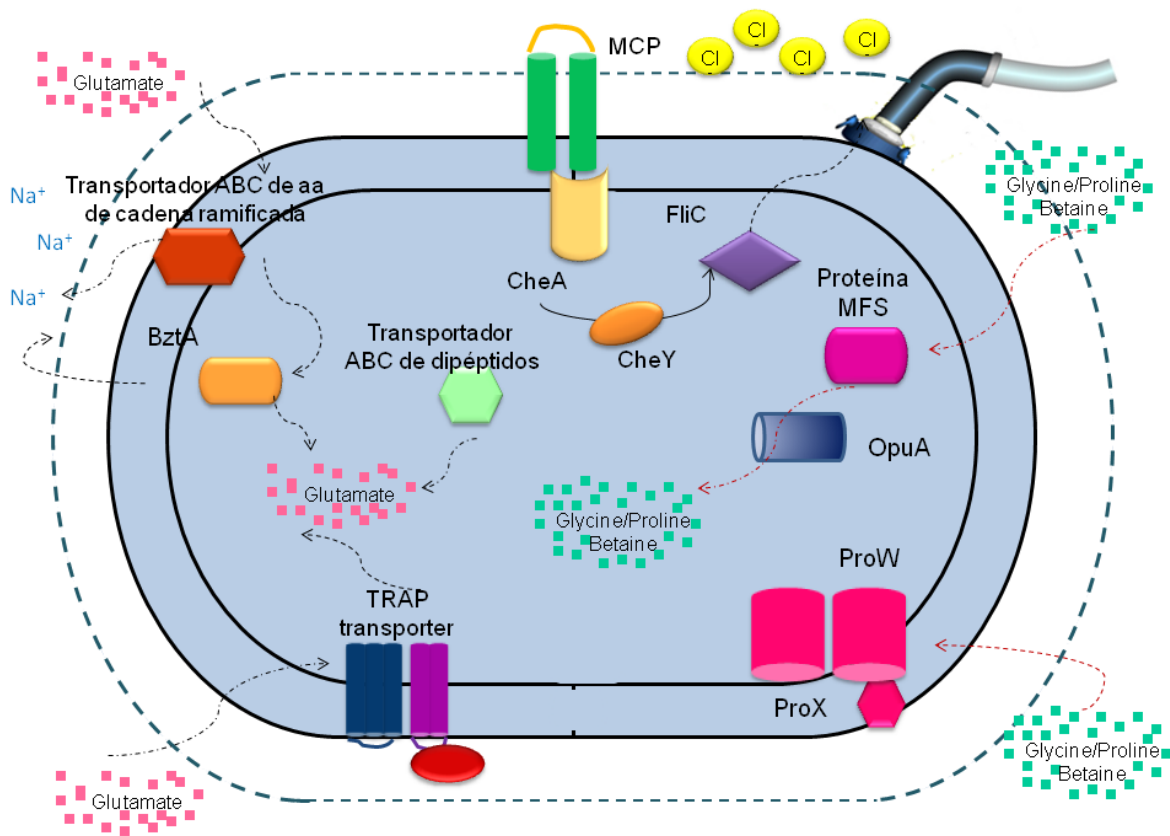


Figura 24. Modelo de los procesos celulares involucrado en la adaptación de *T. consotensis* a un aumento de la salinidad externa.

El análisis cualitativo y cuantitativo del perfil de expresión de proteínas de la bacteria halotolerante *Tistlia consotensis* en respuesta a cambios de la salinidad externa, empleando diferentes aproximaciones, permitió la elucidación de la respuesta adaptativa de esta bacteria a condiciones de estrés osmótico. La integración de los datos genómicos y proteómicos obtenidos en este estudio permitió tener una visión detallada de los mecanismos moleculares empleados por *T. consotensis* para contrarrestar las continuas fluctuaciones de la salinidad en su hábitat natural. Estos mecanismos se han reportado previamente en diferentes organismos y otros no como es el caso de hopanoides, derivado de este estudio.

Por lo tanto, este estudio representa un referente en el estudio de los mecanismos moleculares de organismos halotolerantes. También abre el camino para comprender cómo los miembros halotolerantes de la familia *Rhodospirillaceae* responden a condiciones cambiantes de salinidad, frecuentemente encontradas en sus hábitats.

6. CONCLUSIONES

El análisis comparativo de la expresión de proteínas de *T. consotensis* permitió determinar que esta bacteria responde a cambios en la salinidad externa con una expresión diferencial de sus proteínas, donde el aumento de la concentración de NaCl conduce a una mayor re-programación de su proteoma. Igualmente, se encontró que cambios en la salinidad externa (0 o 40 g·l⁻¹ NaCl) conducen a un aumento de la abundancia de proteínas que presentan una función clave dentro de la respuesta celular de *T. consotensis* a la disminución o incremento de la concentración de sal. Dentro de este grupo de proteínas se identificó que una respuesta común para las dos salinidades evaluadas es el aumento de la producción de proteínas involucradas en la generación de ATP así como reguladores transcripcionales. La abundancia de estas proteínas a 0 o 40 g·l⁻¹ NaCl indica que posiblemente son requeridas por *T. consotensis* para asegurar una efectiva respuesta frente a cambios de la salinidad externa.

A partir del análisis de los datos obtenidos en este estudio se encontró que *T. consotensis* posee una eficiente respuesta a fluctuaciones de la salinidad externa, la cual implica la combinación de diferentes estrategias que le confieren a esta bacteria a una ventaja adaptativa para sobrevivir en su hábitat natural. En respuesta a una disminución de la salinidad, *T. consotensis* aumenta la producción principalmente de proteínas contra estrés general, como chaperonas, proteasas y proteínas contra estrés oxidativo, las cuales garantizan el correcto plegamiento y funcionamiento de sus proteínas que se pueden ver afectadas por el estrés causado por la ausencia de sal. Además, esta condición conduce a una alteración de la composición de la membrana de *T. consotensis*, para minimizar la entrada de agua. Por el contrario, en respuesta a un incremento de la salinidad, *T. consotensis* requiere una alta producción de proteínas involucradas en la detección y transducción de señales para censar eficientemente los cambios en la concentración de sal y conducir a un aumento de la producción de diferentes sistemas de transporte que permiten la acumulación de glutamato para evitar la entrada de Na⁺, y la acumulación de solutos compatibles, como glicina betaína o prolina, para mantener el balance osmótico.

7. PERSPECTIVAS

Dado que la anotación automática del genoma conduce a errores en la predicción de algunos genes, los datos proteómicos obtenidos en este estudio podrían ser utilizados para validar la anotación del genoma de *T. consotensis* que permitiría corregir errores en la anotación de genoma como el descubrimiento de genes no predichos, la corrección de marcos de lectura, la predicción de genes con uso de codones inusual y la identificación de los sitios de inicio de la traducción.

Estudios futuros, también podrían incluir un análisis de genómica comparativa con microorganismos de ambientes marinos que permitiera determinar la función de la transferencia horizontal de genes en la adaptación de *T. consotensis* a ambientes salinos.

De otra parte, se podrían realizar estudios que permitan, por un lado, determinar si *T. consotensis* presentan cambios en la composición lipídica de su membrana celular en respuesta a cambios de la salinidad, y por otro lado, identificar la función específica de los hopanoides en la respuesta celular de esta bacteria a una disminución de la salinidad del medio.

Teniendo en cuenta la versatilidad metabólica de *T. consotensis*, sería interesante realizar un estudio de biominería de datos a partir del genoma de esta bacteria con el fin de identificar posibles metabolitos con potencial actividad biológica.

8. REFERENCIAS

Albuquerque L, Tiago I, Rainey FA, Taborda M, Nobre MF, Veríssimo A, da Costa MS (2007) *Salirhabdus euzebyi* gen. nov., sp. nov., a Gram-positive, halotolerant bacterium isolated from a sea salt evaporation pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:1566-1571

Allocati N, Federici L, Masulli M, Di Ilio C (2009) Glutathione transferases in bacteria. *FEBS Journal* 276:58-75

Ambily Nath IV, Loka Bharathi PA (2011) Diversity in transcripts and translational pattern of stress proteins in marine extremophiles. *Extremophiles* 15:129-153

Amoozegar MA, Makhdoumi-Kakhki A, Ramezani M, Nikou MM, Fazeli SAS, Schumann P, Ventosa A (2013) *Limimonas halophila* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic bacterium in the family *Rhodospirillaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63:1562-1567

An H, Zhang L, Tang Y, Luo X, Sun T, Li Y, Wang Y, Dai J, Fang C (2009) *Skermanella xinjiangensis* sp. nov., isolated from the desert of Xinjiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59:1531-1534

An S-Y, Asahara M, Goto K, Kasai H, Yokota A (2007) *Terribacillus saccharophilus* gen. nov., sp. nov. and *Terribacillus halophilus* sp. nov., spore-forming bacteria isolated from field soil in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:51-55

Andrei A-Ş, Banciu HL, Oren A (2012) Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. *FEMS Microbiology Letters* 330:1-9

Armengaud J, Christie-Oleza JA, Clair G, Malard V, Duport C (2012) Exoproteomics: exploring the world around biological systems. *Expert Review of Proteomics* 9:561-575

Ashby MK (2004) Survey of the number of two-component response regulator genes in the complete and annotated genome sequences of prokaryotes. *FEMS Microbiology Letters* 231:277-281

Averhoff B, Müller V (2010) Exploring research frontiers in microbiology: recent advances in halophilic and thermophilic extremophiles. *Research in Microbiology* 161:506-514

Aziz R, Bartels D, Best A, DeJongh M, Disz T, Edwards R, Formsma K, Gerdes S, Glass E, Kubal M, Meyer F, Olsen G, Olson R, Osterman A, Overbeek R, McNeil L, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch G, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O (2008) The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9:75

Bagos PG, Tsirigos KD, Liakopoulos TD, Hamodrakas SJ (2008) Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-positive bacteria with a hidden markov model. *Journal of Proteome Research* 7:5082-5093

Baños RC, Martínez J, Polo C, Madrid C, Prenafeta A, Juárez A (2011) The *yfeR* gene of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* encodes an osmoregulated LysR-type transcriptional regulator. *FEMS Microbiology Letters* 315:63-71

Battistuzzi FU, Hedges SB (2009) A major clade of prokaryotes with ancient adaptations to life on land. *Molecular Biology and Evolution* 26:335-343

Bazylnski DA, Williams TJ, Lefèvre CT, Trubitsyn D, Fang J, Beveridge TJ, Moskowitz BM, Ward B, Schübbe S, Dubbels BL, Simpson B (2013) *Magnetovibrio*

blakemorei gen. nov., sp. nov., a magnetotactic bacterium (*Alphaproteobacteria*: *Rhodospirillaceae*) isolated from a salt marsh. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 63:1824-1833

Ben Ali Gam Z, Oueslati R, Abdelkafi S, Casalot L, Tholozan JL, Labat M (2009) *Desulfovibrio tunisiensis* sp. nov., a novel weakly halotolerant, sulfate-reducing bacterium isolated from exhaust water of a Tunisian oil refinery. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59:1059-1063

Ben Hania W, Fraj B, Postec A, Fadhlaoui K, Hamdi M, Ollivier B, Fardeau M-L (2012) *Fusibacter tunisiensis* sp. nov., isolated from an anaerobic reactor used to treat olive-mill wastewater. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 62:1365-1368

Bendtsen J, Kiemer L, Fausboll A, Brunak S (2005) Non-classical protein secretion in bacteria. BMC Microbiology 5:58

Benlloch S, López-López A, Casamayor EO, Øvreås L, Goddard V, Daae FL, Smerdon G, Massana R, Joint I, Thingstad F, Pedrós-Alió C, Rodríguez-Valera F (2002) Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. Environmental Microbiology 4:349-360

Benmalek Y, Cayol J-L, Bouanane NA, Hacene H, Fauque G, Fardeau M-L (2010) *Chryseobacterium solincola* sp. nov., isolated from soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60:1876-1880

Berry AM, Harriott OT, Moreau RA, Osman SF, Benson DR, Jones AD (1993) Hopanoid lipids compose the *Frankia* vesicle envelope, presumptive barrier of oxygen diffusion to nitrogenase. Proceedings of the National Academy of Sciences 90:6091-6094

Bidle KA, Kirkland PA, Nannen JL, Maupin-Furlow JA (2008) Proteomic analysis of *Haloferax volcanii* reveals salinity-mediated regulation of the stress response protein PspA. *Microbiology* 154:1436-1443

Blum J, Kulp T, Han S, Lanoil B, Saltikov C, Stolz J, Miller L, Oremland R (2012) *Desulfohalophilus alkaliarsenatis* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic sulfate- and arsenate-respiring bacterium from Searles Lake, California. *Extremophiles* 16:727-742

Blum JS, Han S, Lanoil B, Saltikov C, Witte B, Tabita FR, Langley S, Beveridge TJ, Jahnke L, Oremland RS (2009) Ecophysiology of *Halarsenatibacter silvermanii* strain SLAS-1T, gen. nov., sp. nov., a facultative chemoautotrophic arsenate respirer from salt-saturated Searles Lake, California. *Applied and Environmental Microbiology* 75:1950-1960

Boch J, Kempf B, Schmid R, Bremer E (1996) Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: characterization of the *gbsAB* genes. *Journal of Bacteriology* 178:5121-5129

Booth IR (2014) Bacterial mechanosensitive channels: progress towards an understanding of their roles in cell physiology. *Current Opinion in Microbiology* 18:16-22

Bott M, Brocker M (2012) Two-component signal transduction in *Corynebacterium glutamicum* and other corynebacteria: on the way towards stimuli and targets. *Applied Microbiology and Biotechnology* 94:1131-1150

Bourret RB (2010) Receiver domain structure and function in response regulator proteins. *Current Opinion in Microbiology* 13:142-149

Bowman JP (1998) *Pseudoalteromonas prydzensis* sp. nov., a psychrotrophic, halotolerant bacterium from Antarctic sea ice. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48:1037-1041

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 7:248-254

Breed J, Kneip S, Gade J, Welte W, Bremer E (2001) Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the periplasmic binding protein ProX from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57:448-450

Bucarey SA, Penn K, Paul L, Fenical W, Jensen PR (2012) Genetic complementation of the obligate marine actinobacterium *Salinispora tropica* with the large mechanosensitive channel gene *mscL* rescues cells from osmotic downshock. *Applied and Environmental Microbiology* 78:4175-4182

Burg D, Ng C, Ting L, Cavicchioli R (2011) Proteomics of extremophiles. *Environmental Microbiology* 13:1934-1955

Burns DG, Camakaris HM, Janssen PH, Dyall-Smith ML (2004) Combined use of cultivation-dependent and cultivation-independent methods indicates that members of most Haloarchaeal groups in an Australian crystallizer pond are cultivable. *Applied and Environmental Microbiology* 70:5258-5265

Cabiscol E, Tamarit J, Ros J (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology* 3:3-8

Calderón MI, Vargas C, Rojo F, Iglesias-Guerra F, Csonka LN, Ventosa A, Nieto JJ (2004) Complex regulation of the synthesis of the compatible solute ectoine in the

halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043T. Microbiology 150:3051-3063

Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG (2004) Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. Electrophoresis 25:1327-1333

Cánovas D, Vargas C, Kneip S, Morón Ma-J, Ventosa A, Bremer E, Nieto JnJ (2000) Genes for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from choline in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043. Microbiology 146:455-463

Capes M, DasSarma P, DasSarma S (2012) The core and unique proteins of haloarchaea. BMC Genomics 13:39

Capra EJ, Laub MT (2012) Evolution of two-component signal transduction systems. Annual Review of Microbiology 66:325-347

Carvalho P, Fischer J, Chen E, Yates J, Barbosa V (2008) PatternLab for proteomics: a tool for differential shotgun proteomics. BMC Bioinformatics 9:316

Casamayor EO, Massana R, Benlloch S, Øvreås L, Díez B, Goddard VJ, Gasol JM, Joint I, Rodríguez-Valera F, Pedrós-Alió C (2002) Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. Environmental Microbiology 4:338-348

Casanueva A, Galada N, Baker G, Grant W, Heaphy S, Jones B, Yanhe M, Ventosa A, Blamey J, Cowan D (2008) Nanoarchaeal 16S rRNA gene sequences are widely dispersed in hyperthermophilic and mesophilic halophilic environments. Extremophiles 12:651-656

Céspedes V, Pallarés S, Arribas P, Millán A, Velasco J (2013) Water beetle tolerance to salinity and anionic composition and its relationship to habitat occupancy. *Journal of Insect Physiology* 59:1076-1084

Ceylan S, Yilan G, Akbulut BS, Poli A, Kazan D (2012) Interplay of adaptive capabilities of *Halomonas* sp. AAD12 under salt stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 114:45-52

Clementino MM, Vieira RP, Cardoso AM, Nascimento APA, Silveira CB, Riva TC, Gonzalez ASM, Paranhos R, Albano RM, Ventosa A, Martins OB (2008) Prokaryotic diversity in one of the largest hypersaline coastal lagoons in the world. *Extremophiles* 12:595-604

Coker J, DasSarma P, Kumar J, Muller J, DasSarma S (2007) Transcriptional profiling of the model Archaeon *Halobacterium* sp. NRC-1: responses to changes in salinity and temperature. *Saline Systems* 3:6

Cortes L, Cardona JJ (2006) Cartografía geológica detallada para el Salado de Consotá y sus alrededores. In: López CC, M (ed) *Cambios Ambientales en Perspectiva Histórica Ecología Histórica y Cultura Ambiental*, Pereira, Colombia, pp 93-109

Crespo-Medina M, Chatziefthimiou A, Cruz-Matos R, Pérez-Rodríguez I, Barkay T, Lutz RA, Starovoytov V, Vetriani C (2009) *Salinisphaera hydrothermalis* sp. nov., a mesophilic, halotolerant, facultatively autotrophic, thiosulfate-oxidizing gammaproteobacterium from deep-sea hydrothermal vents, and emended description of the genus *Salinisphaera*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59:1497-1503

Chang JM (2005) Public protein database and interfaces. In: Srivastava S (ed) *Informatics in proteomics*. CRC Press Taylor & Francis group, pp 53-72

Chapin FS, III, Matson P, Vitousek P (2012) *Geology, Soils, and Sediments. Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology*. Springer New York, pp 63-90

Cho C-W, Lee S-H, Choi J, Park S-J, Ha D-J, Kim H-J, Kim C-W (2003) Improvement of the two-dimensional gel electrophoresis analysis for the proteome study of *Halobacterium salinarum*. *Proteomics* 3:2325-2329

Choi DH, Hwang CY, Cho BC (2009) *Pelagibius litoralis* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium in the family *Rhodospirillaceae* isolated from coastal seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59:818-823

Choi J, Joo W-A, Park S-J, Lee S-H, Kim C-W (2005) An efficient proteomics based strategy for the functional characterization of a novel halophilic enzyme from *Halobacterium salinarum*. *Proteomics* 5:907-917

Chowdhury SP, Nagarajan T, Tripathi R, Mishra MN, Le Rudulier D, Tripathi AK (2007) Strain-specific salt tolerance and osmoregulatory mechanisms in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters* 267:72-79

Christie-Oleza JA, Fernandez B, Nogales B, Bosch R, Armengaud J (2012) Proteomic insights into the lifestyle of an environmentally relevant marine bacterium. *ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology* 6:124-135

Dalbey RE, Kuhn A (2012) Protein traffic in Gram-negative bacteria – how exported and secreted proteins find their way. *FEMS Microbiology Reviews* 36:1023-1045

Daniels CJ, McKee AH, Doolittle WF (1984) Archaeobacterial heat-shock proteins. *EMBO J* 3:745-749

De Carvalho CCCR, Fernandes P (2010) Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment. *Marine Drugs* 8:705-727

de la Haba R, Sánchez-Porro C, Marquez MC, Ventosa A (2011) Taxonomy of Halophiles. In: Horikoshi K (ed) *Extremophiles Handbook*. Springer Japan, pp 255-308

de la Haba RR, Márquez MC, Papke RT, Ventosa A (2012) Multilocus sequence analysis of the family *Halomonadaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62:520-538

Demergasso C, Casamayor EO, Chong G, Galleguillos P, Escudero L, Pedrós-Alió C (2004) Distribution of prokaryotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, Northern Chile. *FEMS Microbiology Ecology* 48:57-69

den Besten HMW, Mols M, Moezelaar R, Zwietering MH, Abee T (2009) Phenotypic and transcriptomic analyses of mildly and severely salt-stressed *Bacillus cereus* ATCC 14579 cells. *Applied and Environmental Microbiology* 75:4111-4119

Derr P, Boder E, Goulian M (2006) Changing the specificity of a bacterial chemoreceptor. *Journal of Molecular Biology* 355:923-932

Diab F, Bernard T, Bazire A, Haras D, Blanco C, Jebbar M (2006) Succinate-mediated catabolite repression control on the production of glycine betaine catabolic enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under low and elevated salinities. *Microbiology* 152:1395-1406

Díaz-Cárdenas C (2011) Estudio de la composición de la comunidad bacteriana en manantiales salinos de los departamentos de Risaralda y Boyaca. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, p 289

Díaz-Cárdenas C, López G, Patel BKC, Baena S (2010a) *Dethiosulfovibrio salsuginis* sp. nov., an anaerobic, slightly halophilic bacterium isolated from a saline spring. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60:850-853

Díaz-Cárdenas C, Patel BKC, Baena S (2010b) *Tistlia consotensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic, chemoheterotrophic, free-living, nitrogen-fixing alphaproteobacterium, isolated from a Colombian saline spring. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60:1437-1443

Dorman CJ, Deighan P (2003) Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. Current Opinion in Genetics & Development 13:179-184

Dover N, Higgins CF, Carmel O, Rimon A, Pinner E, Padan E (1996) Na⁺-induced transcription of *nhaA*, which encodes an Na⁺/H⁺ antiporter in *Escherichia coli*, is positively regulated by *nhaR* and affected by *hns*. Journal of Bacteriology 178:6508-6517

Duché O, Trémoulet F, Glaser P, Labadie J (2002) Salt stress proteins induced in *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology 68:1491-1498

Dupierris V, Masselon C, Court M, Kieffer-Jaquinod S, Bruley C (2009) A toolbox for validation of mass spectrometry peptides identification and generation of database: IRMa. Bioinformatics 25:1980-1981

Ellen A, Albers S-V, Driessen AM (2010) Comparative study of the extracellular proteome of *Sulfolobus* species reveals limited secretion. Extremophiles 14:87-98

Empadinhas N, Da Costa MS (2008) Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: Distribution of compatible solutes. International Microbiology 11:151-161

Feng D, Yang L, Lu W, Yang S (2007) Analysis of protein expression profiles of *Halobacillus dabanensis* D-8 Under optimal and high salinity conditions. *Current Microbiology* 54:20-26

Feng D, Zhang B, Lu W, Yang S (2006) Protein expression analysis of *Halobacillus dabanensis* D-8^T subjected to salt shock. *J Microbiol* 44:369-374

Fischer M, Zhang QY, Hubbard RE, Thomas GH (2010) Caught in a TRAP: substrate-binding proteins in secondary transport. *Trends in Microbiology* 18:471-478

Fleming PJ, Richards FM (2000) Protein packing: dependence on protein size, secondary structure and amino acid composition. *Journal of Molecular Biology* 299:487-498

Flohé L (2010) Chapter 1 - Changing Paradigms in Thiology: From Antioxidant Defense Toward Redox Regulation. In: Enrique C, Lester P (eds) *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 1-39

Forrest LR, Krämer R, Ziegler C (2011) The structural basis of secondary active transport mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1807:167-188

Fränzel B, Trötschel C, Rückert C, Kalinowski J, Poetsch A, Wolters DA (2010) Adaptation of *Corynebacterium glutamicum* to salt-stress conditions. *Proteomics* 10:445-457

Franzetti B, Schoehn G, Ebel C, Gagnon J, Ruigrok RWH, Zaccari G (2001) Characterization of a novel complex from halophilic archaeobacteria, which displays chaperone-like activities in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 276:29906-29914

Galperin MY, Higdon R, Kolker E (2010) Interplay of heritage and habitat in the distribution of bacterial signal transduction systems. *Molecular BioSystems* 6:721-728

Ganoth A, Alhadeff R, Arkin I (2011) Computational study of the Na⁺/H⁺ antiporter from *Vibrio parahaemolyticus*. *J Mol Model* 17:1877-1890

Garrido C, Paul C, Seigneuric R, Kampinga HH (2012) The small heat shock proteins family: The long forgotten chaperones. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44:1588-1592

Gaspari M, Cuda G (2011) Nano LC–MS/MS: a robust setup for proteomic analysis. In: Toms SA, Weil RJ (eds) *Nanoproteomics*. Humana Press, pp 115-126

Ghai R, Pašić L, Fernández AB, Martín-Cuadrado A-B, Mizuno CM, McMahon KD, Papke RT, Stepanauskas R, Rodríguez-Brito B, Rohwer F, Sánchez-Porro C, Ventosa A, Rodríguez-Valera F (2011) New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments. *Scientific Reports*

Görg A (2004) 2-D Electrophoresis: Principles and Methods. In: Amersham B (ed). *Amersham Biosciences UK Ltd*

Görg A, Weiss W, Dunn MJ (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4:3665-3685

Grant WD (2004) Life at low water activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 359:1249-1267

Graziano G, Merlino A (2014) Molecular bases of protein halotolerance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1844:850-858

Greub G, Kebbi-Beghdadi C, Bertelli C, Collyn F, Riederer BM, Yersin C, Croxatto A, Raoult D (2009) High throughput sequencing and proteomics to identify immunogenic proteins of a new pathogen: the dirty genome approach. PLoS ONE 4:e8423

Grote M, Engelhard M, Hegemann P (2014) Of ion pumps, sensors and channels — Perspectives on microbial rhodopsins between science and history. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1837:533-545

Gu Z, Wang L, Rudulier D, Zhang B, Yang S (2008) Characterization of the glycine betaine biosynthetic genes in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus dabanensis* D-8T. Current Microbiology 57:306-311

Gul N, Poolman B (2013) Functional reconstitution and osmoregulatory properties of the ProU ABC transporter from *Escherichia coli*. Molecular Membrane Biology 30:138-148

Guo X-Q, Li R, Zheng L-Q, Lin D-Q, Sun J-Q, Li S-P, Li W-J, Jiang J-D (2010) *Jeotgalicoccus huakuii* sp. nov., a halotolerant bacterium isolated from seaside soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60:1307-1310

Gupta RS, Singh B (1992) Cloning of the HSP70 gene from *Halobacterium marismortui*: relatedness of archaeobacterial HSP70 to its eubacterial homologs and a model for the evolution of the HSP70 gene. Journal of Bacteriology 174:4594-4605

Guyoneaud R, Mouné S, Eatock C, Bothorel V, Hirschler-Réa A, Willison J, Duran R, Liesack W, Herbert R, Matheron R, Caumette P (2002) Characterization of three spiral-shaped purple nonsulfur bacteria isolated from coastal lagoon sediments, saline sulfur springs, and microbial mats: emended description of the genus

Roseospira and description of *Roseospira marina* sp. nov., *Roseospira navarrensis* sp. nov., and *Roseospira thiosulfatophila* sp. nov. Archives of Microbiology 178:315-324

Hahne H, Mäder U, Otto A, Bonn F, Steil L, Bremer E, Hecker M, Becher D (2010) A comprehensive proteomics and transcriptomics analysis of *Bacillus subtilis* salt stress adaptation. Journal of Bacteriology 192:870-882

Hamedi J, Mohammadipanah F, Ventosa A (2013) Systematic and biotechnological aspects of halophilic and halotolerant actinomycetes. Extremophiles 17:1-13

Harrison JP, Gheeraert N, Tsigelnitskiy D, Cockell CS (2013) The limits for life under multiple extremes. Trends in Microbiology 21:204-212

Haswell Elizabeth S, Phillips R, Rees Douglas C (2011) Mechanosensitive channels: What can they do and how do they do it? Structure 19:1356-1369

Hayashi M, Nakayama Y, Unemoto T (2001) Recent progress in the Na⁺-translocating NADH-quinone reductase from the marine *Vibrio alginolyticus*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1505:37-44

Hedi A, Fardeau M-L, Sadfi N, Boudabous A, Ollivier B, Cayol J-L (2009) Characterization of *Halanaerobaculum tunisiense* gen. nov., sp. nov., a new halophilic fermentative, strictly anaerobic bacterium isolated from a hypersaline lake in Tunisia. Extremophiles 13:313-319

Heras B, Shouldice SR, Totsika M, Scanlon MJ, Schembri MA, L MJ (2009) DSB proteins and bacterial pathogenicity. Nat Rev Microbiol 7:215-225

Hoang TT, Sullivan SA, Cusick JK, Schweizer HP (2002) β -Ketoacyl acyl carrier protein reductase (FabG) activity of the fatty acid biosynthetic pathway is a determining factor of 3-oxo-homoserine lactone acyl chain lengths. *Microbiology* 148:3849-3856

Hoffmann T, Boiangiu C, Moses S, Bremer E (2008) Responses of *Bacillus subtilis* to hypotonic challenges: physiological contributions of mechanosensitive channels to cellular survival. *Applied and Environmental Microbiology* 74:2454-2460

Hoffmann T, Wensing A, Brosius M, Steil L, Völker U, Bremer E (2013) Osmotic control of *opuA* expression in *Bacillus subtilis* and its modulation in response to intracellular glycine betaine and proline pools. *Journal of Bacteriology* 195:510-522

Holmgren A, Lu J (2010) Thioredoxin and thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 396:120-124

Höper D, Bernhardt J, Hecker M (2006a) Salt stress adaptation of *Bacillus subtilis*: A physiological proteomics approach. *Proteomics* 6:1550-1562

Höper D, Bernhardt J, Hecker M (2006b) Salt stress adaptation of *Bacillus subtilis*: A physiological proteomics approach. *Proteomics* 6:1550-1562

Horbach S, Neuss B, Sahm H (1991) Effect of azasqualene on hopanoid biosynthesis and ethanol tolerance of *Zymomonas mobilis*. *FEMS Microbiology Letters* 79:347-350

Huo Y-Y, Xu X-W, Cui H-L, Wu M (2010) *Gracilibacillus ureilyticus* sp. nov., a halotolerant bacterium from a saline–alkaline soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60:1383-1386

Imhoff JF, Petri R, Süling J (1998) Reclassification of species of the spiral-shaped phototrophic purple non-sulfur bacteria of the α -Proteobacteria: description of the new genera *Phaeospirillum* gen. nov., *Rhodovibrio* gen. nov., *Rhodotalassium* gen. nov. and *Roseospira* gen. nov. as well as transfer of *Rhodospirillum fulvum* to *Phaeospirillum fulvum* comb. nov., of *Rhodospirillum molischianum* to *Phaeospirillum molischianum* comb. nov., of *Rhodospirillum salinarum* to *Rhodovibrio salinarum* comb. nov., of *Rhodospirillum sodomense* to *Rhodovibrio sodomensis* comb. nov., of *Rhodospirillum salexigens* to *Rhodotalassium salexigens* comb. nov. and of *Rhodospirillum mediosalinum* to *Roseospira mediosalina* comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 48:793-798

Imlay JA (2013) The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. Nature Reviews Microbiology 11:443-454

Ivey DM, Guffanti AA, Bossewitch JS, Padan E, Krulwich TA (1991) Molecular cloning and sequencing of a gene from alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 that functionally complements an *Escherichia coli* strain carrying a deletion in the *nhaA* Na⁺/H⁺ antiporter gene. Journal of Biological Chemistry 266:23483-23489

Jeong SH, Jin HM, Jeon CO (2013a) *Gramella aestuarii* sp. nov., isolated from a tidal flat, and emended description of *Gramella echinicola*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 63:2872-2878

Jeong SH, Park MS, Jin HM, Lee K, Park W, Jeon CO (2013b) *Aestuariibaculum suncheonense* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from a tidal flat and emended descriptions of the genera Gaetbulibacter and Tamlana. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 63:332-338

Jeong SH, Yang S-H, Jin HM, Kim JM, Kwon KK, Jeon CO (2013c) *Microbulbifer gwangyangensis* sp. nov. and *Microbulbifer pacificus* sp. nov., isolated from marine environments. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 63:1335-1341

Jiang L, He L, Fountoulakis M (2004) Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. Journal of Chromatography A 1023:317-320

Jiang LL, Kurosawa T, Sato M, Suzuki Y, Hashimoto T (1997) Physiological role of D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase/D-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional protein. Journal of Biochemistry 121:506-513

Joo W-A, Kim C-W (2005) Proteomics of halophilic archaea. Journal of Chromatography B 815:237-250

Jordan EM, Thompson FL, Zhang X-H, Li Y, Vancanneyt M, Kroppenstedt RM, Priest FG, Austin B (2007) *Sneathiella chinensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine alphaproteobacterium isolated from coastal sediment in Qingdao, China. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57:114-121

Juez G, Fenosa D, Gonzaga A, Soria E, Mojica FJM (2007) Response to osmotic stress in Haloarchaeal genome: a role for general stress proteins and global regulatory mechanisms In: Gerday C, Glansdorff N (eds) Physiology and biochemistry of extremophiles. ASM Press, Washington, D.C., pp 232-239

Jung H-M, Lee J-S, Bae H-M, Yi T-H, Kim S-Y, Lee S-T, Im W-T (2011) *Inquilinus ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 61:201-204

Jung K, Fried L, Behr S, Heermann R (2012) Histidine kinases and response regulators in networks. *Current Opinion in Microbiology* 15:118-124

Jung M-Y, Shin K-S, Kim S, Kim S-J, Park S-J, Kim J-G, Cha I-T, Kim M-N, Rhee S-K (2013) *Hoeflea halophila* sp. nov., a novel bacterium isolated from marine sediment of the East Sea, Korea. *Antonie van Leeuwenhoek* 103:971-978

Junqueira M, Spirin V, Balbuena TS, Thomas H, Adzhubei I, Sunyaev S, Shevchenko A (2008) Protein identification pipeline for the homology-driven proteomics. *Journal of Proteomics* 71:346-356

Kapatai G, Large A, Benesch JLP, Robinson CV, Carrascosa JL, Valpuesta JM, Gowrinathan P, Lund PA (2006) All three chaperonin genes in the archaeon *Haloferax volcanii* are individually dispensable. *Molecular Microbiology* 61:1583-1597

Katz A, Waridel P, Shevchenko A, Pick U (2007) Salt-induced changes in the plasma membrane proteome of the halotolerant alga *Dunaliella salina* as revealed by blue native gel electrophoresis and Nano-LC-MS/MS analysis. *Molecular & Cellular Proteomics* 6:1459-1472

Kempf B, Bremer E (1998) Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of Microbiology* 170:319-330

Kennedy SP, Ng WV, Salzberg SL, Hood L, DasSarma S (2001) Understanding the adaptation of *Halobacterium* species NRC-1 to its extreme environment through computational analysis of its genome sequence. *Genome Research* 11:1641-1650

Kerker S (2004) Ecology of Hypersaline Microorganisms. In: Ramaiah N (ed) Marine Microbiology: Facets & Opportunities, pp 37-47

Kerscher S, Dröse S, Zickermann V, Brandt U (2008) The three families of respiratory NADH dehydrogenases. In: Schäfer G, Penefsky H (eds) Bioenergetics. Springer Berlin Heidelberg, pp 185-222

Kim K, Lee S, Lee K, Lim D (1998) Isolation and characterization of toluene-sensitive mutants from the toluene-resistant bacterium *Pseudomonas putida* GM73. Journal of Bacteriology 180:3692-3696

Kim Y-G, Choi DH, Hyun S, Cho BC (2007) *Oceanobacillus profundus* sp. nov., isolated from a deep-sea sediment core. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57:409-413

Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, Ulrich Hartl F (2013) Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. Annual Review of Biochemistry 82:323-355

Kodama Y, Stiknowati LI, Ueki A, Ueki K, Watanabe K (2008) *Thalassospira tepidiphila* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from seawater. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58:711-715

Kos V, Ford R (2009) The ATP-binding cassette family: a structural perspective. Cellular and Molecular Life Sciences 66:3111-3126

Kotelnikova S, Macario AJL, Pedersen K (1998) *Methanobacterium subterraneum* sp. nov., a new alkaliphilic, eurythermic and halotolerant methanogen isolated from deep granitic groundwater. International Journal of Systematic Bacteriology 48:357-367

Kraegeloh A, Kunte H (2002) Novel insights into the role of potassium for osmoregulation in *Halomonas elongata*. *Extremophiles* 6:453-462

Krämer R (2009) Osmosensing and osmosignaling in *Corynebacterium glutamicum*. *Amino Acids* 37:487-497

Krämer R (2010) Bacterial stimulus perception and signal transduction: Response to osmotic stress. *The Chemical Record* 10:217-229

Krell T, Lacal J, Muñoz-Martínez F, Reyes-Darias JA, Cadirci BH, García-Fontana C, Ramos JL (2011) Diversity at its best: bacterial taxis. *Environmental Microbiology* 13:1115-1124

Kunte H, Trüper HG, Stan-Lotter H (2002) Halophilic Microorganisms. In: Horneck G, Baumstark-Khan C (eds) *Astrobiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp 185-200

Kuo YP, Thompson DK, St Jean A, Charlebois RL, Daniels CJ (1997) Characterization of two heat shock genes from *Haloferax volcanii*: a model system for transcription regulation in the Archaea. *Journal of Bacteriology* 179:6318-6324

Kurtz DM (2006) Avoiding high-valent iron intermediates: Superoxide reductase and rubrerythrin. *Journal of Inorganic Biochemistry* 100:679-693

La Scola B, Elkarkouri K, Li W, Wahab T, Fournous G, Rolain J-M, Biswas S, Drancourt M, Robert C, Audic S, Löfdahl S, Raoult D (2008) Rapid comparative genomic analysis for clinical microbiology: The *Francisella tularensis* paradigm. *Genome Research* 18:742-750

Lacal J, García-Fontana C, Muñoz-Martínez F, Ramos J-L, Krell T (2010) Sensing of environmental signals: classification of chemoreceptors according to the size of their ligand binding regions. *Environmental Microbiology* 12:2873-2884

Lai Q, Yuan J, Gu L, Shao Z (2009a) *Marispirillum indicum* gen. nov., sp. nov., isolated from a deep-sea environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59:1278-1281

Lai Q, Yuan J, Wu C, Shao Z (2009b) *Oceanibaculum indicum* gen. nov., sp. nov., isolated from deep seawater of the Indian Ocean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59:1733-1737

Lai S-J, Lai M-C (2011) Characterization and regulation of the osmolyte betaine synthesizing enzymes GSMT and SDMT from halophilic methanogen *Methanohalophilus portucalensis*. *PLoS ONE* 6:e25090

Lakshmi KVNS, Sasikala C, Ashok Kumar GV, Chandrasekaran R, Ramana CV (2011) *Phaeovibrio sulfidiphilus* gen. nov., sp. nov., phototrophic alphaproteobacteria isolated from brackish water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61:828-833

Larimer FW, Chain P, Hauser L, Lamerdin J, Malfatti S, Do L, Land ML, Pelletier DA, Beatty JT, Lang AS, Tabita FR, Gibson JL, Hanson TE, Bobst C, Torres J, Peres C, Harrison FH, Gibson J, Harwood CS (2004) Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Nature Biotechnology* 22:55-61

Le Dain AC, Saint N, Kloda A, Ghazi A, Martinac B (1998) Mechanosensitive ion channels of the archaeon *Haloferax volcanii*. *Journal of Biological Chemistry* 273:12116-12119

Lee J-C, Lim J-M, Park D-J, Jeon CO, Li W-J, Kim C-J (2006) *Bacillus seohaeanensis* sp. nov., a halotolerant bacterium that contains L-lysine in its cell wall. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56:1893-1898

Lee OO, Tsoi MMY, Li X, Wong P-K, Qian P-Y (2007) *Thalassococcus halodurans* gen. nov., sp. nov., a novel halotolerant member of the Roseobacter clade isolated from the marine sponge *Halichondria panicea* at Friday Harbor, USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:1919-1924

Lentzen G, Schwarz T (2006) Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72:623-634

Leuko S, Raftery MJ, Burns BP, Walter MR, Neilan BA (2009) Global protein-level responses of *Halobacterium salinarum* NRC-1 to prolonged changes in external sodium chloride concentrations. *Journal of Proteome Research* 8:2218-2225

Levina N, Töttemeyer S, Stokes NR, Louis P, Jones MA, Booth IR (1999) Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. *The EMBO Journal* 18:1730-1737

Lim J-M, Jeon CO, Lee J-C, Song S-M, Kim K-Y, Kim C-J (2006) *Marinimicrobium koreense* gen. nov., sp. nov. and *Marinimicrobium agarilyticum* sp. nov., novel moderately halotolerant bacteria isolated from tidal flat sediment in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56:653-657

Liu C, Chen C-X, Zhang X-Y, Yu Y, Liu A, Li G-W, Chen X-L, Chen B, Zhou B-C, Zhang Y-Z (2012a) *Marinobacter antarcticus* sp. nov., a halotolerant bacterium isolated from Antarctic intertidal sandy sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62:1838-1844

Liu H, Zhou Y, Liu R, Zhang K-Y, Lai R (2009) *Bacillus solisalsi* sp. nov., a halotolerant, alkaliphilic bacterium isolated from soil around a salt lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59:1460-1464

Liu J-H, Wang Y-X, Zhang X-X, Wang Z-G, Chen Y-G, Wen M-L, Xu L-H, Peng Q, Cui X-L (2010a) *Salinarimonas rosea* gen. nov., sp. nov., a new member of the α -2 subgroup of the Proteobacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60:55-60

Liu M, Dai J, Liu Y, Cai F, Wang Y, Rahman E, Fang C (2011) *Desertibacter roseus* gen. nov., sp. nov., a gamma radiation-resistant bacterium in the family *Rhodospirillaceae*, isolated from desert sand. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 61:1109-1113

Liu Y, Jin J-H, Liu Y-H, Zhou Y-G, Liu Z-P (2010b) *Dongia mobilis* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Rhodospirillaceae* isolated from a sequencing batch reactor for treatment of malachite green effluent. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60:2780-2785

Liu YP, Wang YX, Li YX, Feng FY, Liu HR, Wang J (2012b) *Mongoliococcus roseus* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic bacterium isolated from a haloalkaline lake. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 62:2206-2212

López-López A, Pujalte MJ, Benlloch S, Mata-Roig M, Rosselló-Mora R, Garay E, Rodríguez-Valera F (2002) *Thalassospira lucentensis* gen. nov., sp. nov., a new marine member of the alpha-Proteobacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52:1277-1283

López-Pérez M, Ghai R, Leon M, Rodríguez-Olmos Á, Copa-Patiño J, Soliveri J, Sanchez-Porro C, Ventosa A, Rodríguez-Valera F (2013) Genomes of “*Spiribacter*”, a streamlined, successful halophilic bacterium. BMC Genomics 14:1-12

López JL (2007) Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. Journal of Chromatography B 849:190-202

Magnus M, Pawlowski M, Bujnicki JM (2012) MetaLocGramN: A meta-predictor of protein subcellular localization for Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1824:1425-1433

Makarov A, Scigelova M (2010) Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217:3938-3945

Makarova KS, Grishin NV (1999) The Zn-peptidase superfamily: functional convergence after evolutionary divergence. *Journal of Molecular Biology* 292:11-17

Maszenan AM, Seviour RJ, Patel BKC, Janssen PH, Wanner J (2005) *Defluvicoccus vanus* gen. nov., sp. nov., a novel Gram-negative coccus/coccobacillus in the 'Alphaproteobacteria' from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:2105-2111

Metzker ML (2010) Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews Genetics* 11:31-46

Millero FJ (2013) *Chemical Oceanography*, 4th edn. CRC Press Taylor & Francis Group

Mojica FJ, Cisneros E, Ferrer C, Rodríguez-Valera F, Juez G (1997) Osmotically induced response in representatives of halophilic prokaryotes: the bacterium *Halomonas elongata* and the archaeon *Haloferax volcanii*. *Journal of Bacteriology* 179:5471-5481

Mongodin EF, Nelson KE, Daugherty S, DeBoy RT, Wister J, Khouri H, Weidman J, Walsh DA, Papke RT, Sanchez Perez G, Sharma AK, Nesbø CL, MacLeod D, Baptiste E, Doolittle WF, Charlebois RL, Legault B, Rodriguez-Valera F (2005) The genome of *Salinibacter ruber*. Convergence and gene exchange among

hyperhalophilic bacteria and archaea. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102:18147-18152

Moran MA, Belas R, Schell MA, González JM, Sun F, Sun S, Binder BJ, Edmonds J, Ye W, Orcutt B, Howard EC, Meile C, Palefsky W, Goesmann A, Ren Q, Paulsen I, Ulrich LE, Thompson LS, Saunders E, Buchan A (2007) Ecological genomics of marine *Roseobacters*. Applied and Environmental Microbiology 73:4559-4569

Mori K, Harayama S (2011) *Methanobacterium petrolearium* sp. nov. and *Methanobacterium ferruginis* sp. nov., mesophilic methanogens isolated from salty environments. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 61:138-143

Morris RM, Nunn BL, Frazar C, Goodlett DR, Ting YS, Rocap G (2010) Comparative metaproteomics reveals ocean-scale shifts in microbial nutrient utilization and energy transduction. ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology 4:673-685

Muddiman D, Andrews G, Lewis D, Notey J, Kelly R (2010) Part I: characterization of the extracellular proteome of the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* by GeLC-MS2. Anal Bioanal Chem 398:377-389

Mulligan C, Fischer M, Thomas GH (2011) Tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters in bacteria and archaea. FEMS Microbiology Reviews 35:68-86

Murayama N, Shimizu H, Takiguchi S, Baba Y, Amino H, Horiuchi T, Sekimizu K, Miki T (1996) Evidence for involvement of *Escherichia coli* genes *pmbA*, *csrA* and a previously unrecognized gene *tlpD*, in the control of DNA gyrase by *letD(ccdB)* of sex factor F. Journal of Molecular Biology 256:483-502

Nagarajan N, Pop M (2013) Sequence assembly demystified. *Nature Reviews Genetics* 14:157-167

Nakamaru Y, Takahashi Y, Unemoto T, Nakamura T (1999) Mechanosensitive channel functions to alleviate the cell lysis of marine bacterium, *Vibrio alginolyticus*, by osmotic downshock. *FEBS Letters* 444:170-172

Nandakumar MP, Cheung A, Marten MR (2006) Proteomic analysis of extracellular proteins from *Escherichia coli* W3110. *Journal of Proteome Research* 5:1155-1161

Nanduri B, Lawrence ML, Vanguri S, Burgess SC (2005) Proteomic analysis using an unfinished bacterial genome: The effects of subminimum inhibitory concentrations of antibiotics on *Mannheimia haemolytica* virulence factor expression. *Proteomics* 5:4852-4863

Narasingarao P, Podell S, Ugalde JA, Brochier-Armanet C, Emerson JB, Brocks JJ, Heidelberg KB, Banfield JF, Allen EE (2012) De novo metagenomic assembly reveals abundant novel major lineage of Archaea in hypersaline microbial communities. *The ISME Journal* 6:81-93

Nedashkovskaya OI, Kim SB, Hoste B, Shin DS, Beleneva IA, Vancanneyt M, Mikhailov VV (2007) *Echinicola vietnamensis* sp. nov., a member of the phylum Bacteroidetes isolated from seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:761-763

Nissen H, Dundas I (1984) *Rhodospirillum salinarum* sp. nov., a halophilic photosynthetic bacterium isolated from a Portuguese saltern. *Archives of Microbiology* 138:251-256

Nottebrock D, Meyer U, Krämer R, Morbach S (2003) Molecular and biochemical characterization of mechanosensitive channels in *Corynebacterium glutamicum*. FEMS Microbiology Letters 218:305-309

Nyysölä A, Leisola M (2001) *Actinopolyspora halophila* has two separate pathways for betaine synthesis. Archives of Microbiology 176:294-300

Oh JD, Kling-Bäckhed H, Giannakis M, Xu J, Fulton RS, Fulton LA, Cordum HS, Wang C, Elliott G, Edwards J, Mardis ER, Engstrand LG, Gordon JI (2006) The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: Evolution during disease progression. Proceedings of the National Academy of Sciences 103:9999-10004

Oren A (1999) Bioenergetic Aspects of Halophilism. Microbiology and Molecular Biology Reviews 63:334-348

Oren A (2008) Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. Saline Systems 4:2

Oren A (2011a) Diversity of Halophiles. In: Horikoshi K (ed) Extremophiles Handbook. Springer Japan, pp 309-325

Oren A (2011b) Ecology of Halophiles. In: Horikoshi K (ed) Extremophiles Handbook. Springer Japan, pp 343-361

Oren A (2013a) Life at high salt concentrations, intracellular KCl concentrations, and acidic proteomes. Frontiers in Microbiology 4

Oren A (2013b) *Salinibacter*: an extremely halophilic bacterium with archaeal properties. FEMS Microbiology Letters 342:1-9

Oren A, Larimer F, Richardson P, Lapidus A, Csonka LN (2005) How to be moderately halophilic with broad salt tolerance: clues from the genome of *Chromohalobacter salexigens*. *Extremophiles* 9:275-279

Pallen MJ, Penn CW, Chaudhuri RR (2005) Bacterial flagellar diversity in the post-genomic era. *Trends in Microbiology* 13:143-149

Pandhal J, Snijders APL, Wright PC, Biggs CA (2008) A cross-species quantitative proteomic study of salt adaptation in a halotolerant environmental isolate using ¹⁵N metabolic labelling. *Proteomics* 8:2266-2284

Parsa Yeganeh L, Azarbaijani R, Sarikhan S, Mousavi H, Ramezani M, Amoozegar MA, Shahzadeh Fazeli A, Hosseini Salekdeh G (2012) Complete genome sequence of *Oceanimonas* sp. GK1, a halotolerant bacterium from Gavkhouni Wetland in Iran. *Journal of Bacteriology* 194:2123-2124

Pastor JM, Bernal V, Salvador M, Argandoña M, Vargas C, Csonka L, Sevilla Á, Iborra JL, Nieto JJ, Cánovas M (2013) Role of central metabolism in the osmoadaptation of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *Journal of Biological Chemistry* 288:17769-17781

Paul S, Bag S, Das S, Harvill E, Dutta C (2008) Molecular signature of hypersaline adaptation: insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes. *Genome Biology* 9:R70

Penn K, Jenkins C, Nett M, Udwy DW, Gontang EA, McGlinchey RP, Foster B, Lapidus A, Podell S, Allen EE, Moore BS, Jensen PR (2009) Genomic islands link secondary metabolism to functional adaptation in marine Actinobacteria. *The ISME Journal* 3:1193-1203

Penn K, Jensen P (2012) Comparative genomics reveals evidence of marine adaptation in *Salinispora* species. *BMC Genomics* 13:86

Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, Cottrell JS (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20:3551-3567

Perozo E, Rees DC (2003) Structure and mechanism in prokaryotic mechanosensitive channels. *Current Opinion in Structural Biology* 13:432-442

Petrov E, Palanivelu D, Constantine M, Rohde Paul R, Cox Charles D, Nomura T, Minor Daniel L, Jr., Martinac B (2013) Patch-clamp characterization of the MscS-like mechanosensitive channel from *Silicibacter pomeroyi*. *Biophysical Journal* 104:1426-1434

Pfennig N, Lünsdorf H, Süling J, Imhoff JF (1997) *Rhodospira trueperi* gen. nov., spec. nov., a new phototrophic Proteobacterium of the alpha group. *Archives of Microbiology* 168:39-45

Pflüger K, Ehrenreich A, Salmon K, Gunsalus RP, Deppenmeier U, Gottschalk G, Müller V (2007) Identification of genes involved in salt adaptation in the archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1 using genome-wide gene expression profiling. *FEMS Microbiology Letters* 277:79-89

Poolman B, Spitzer JJ, Wood JM (2004) Bacterial osmosensing: roles of membrane structure and electrostatics in lipid–protein and protein–protein interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1666:88-104

Poralla K, Härtner T, Kannenberg E (1984) Effect of temperature and pH on the hopanoid content of *Bacillus acidocaldarius*. *FEMS Microbiology Letters* 23:253-256

Poralla K, Muth G, Härtner T (2000) Hopanoids are formed during transition from substrate to aerial hyphae in *Streptomyces coelicolor* A3(2). FEMS Microbiol Lett 189:93-95

Rahalkar M, Bahulikar RA, Deutzmann JS, Kroth PG, Schink B (2012) *Elstera litoralis* gen. nov., sp. nov., isolated from stone biofilms of Lake Constance, Germany. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 62:1750-1754

Raj PS, Chakravarthy SK, Ramaprasad EVV, Sasikala C, Ramana CV (2012) *Phaeospirillum tilakii* sp. nov., a phototrophic alphaproteobacterium isolated from aquatic sediments. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 62:1069-1074

Reina-Bueno M, Argandoña M, Salvador M, Rodríguez-Moya J, Iglesias-Guerra F, Csonka LN, Nieto JJ, Vargas C (2012) Role of trehalose in salinity and temperature tolerance in the model halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. PLoS ONE 7:e33587

Renuse S, Chaerkady R, Pandey A (2011) Proteogenomics. Proteomics 11:620-630

Reshetnikov A, Khmelenina V, Mustakhimov I, Kalyuzhnaya M, Lidstrom M, Trotsenko Y (2011) Diversity and phylogeny of the ectoine biosynthesis genes in aerobic, moderately halophilic methylotrophic bacteria. Extremophiles 15:653-663

Reuter M, Hayward NJ, Black SS, Miller S, Dryden DTF, Booth IR (2014) Mechanosensitive channels and bacterial cell wall integrity: does life end with a bang or a whimper? Journal of The Royal Society Interface 11

Rezgui R, Maaroufi A, Fardeau M-L, Ben Ali Gam Z, Cayol J-L, Ben Hamed S, Labat M (2012) *Anaerosalibacter bizertensis* gen. nov., sp. nov., a halotolerant bacterium isolated from sludge. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 62:2469-2474

Rhodes M, Spear J, Oren A, House C (2011) Differences in lateral gene transfer in hypersaline versus thermal environments. BMC Evolutionary Biology 11:199

Rivas R, García-Fraile P, Mateos PF, Martínez-Molina E, Velázquez E (2006) *Photobacterium halotolerans* sp. nov., isolated from Lake Martel in Spain. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56:1067-1071

Rivas R, Sánchez-Márquez S, Mateos PF, Martínez-Molina E, Velázquez E (2005) *Marteella mediterranea* gen. nov., sp. nov., a novel α -proteobacterium isolated from a subterranean saline lake. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55:955-959

Roberts M (2005) Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. Saline Systems 1:5

Roeßler M, Müller V (2001) Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences. Environmental Microbiology 3:743-754

Roeßler M, Müller V (2002) Chloride, a new environmental signal molecule involved in gene regulation in a moderately halophilic bacterium, *Halobacillus halophilus*. Journal of Bacteriology 184:6207-6215

Romanenko LA, Uchino M, Falsen E, Zhukova NV, Mikhailov VV, Uchimura T (2003) *Rheinheimera pacifica* sp. nov., a novel halotolerant bacterium isolated from deep sea water of the Pacific. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53:1973-1977

Romano I, Lama L, Nicolaus B, Gambacorta A, Giordano A (2005) *Alkalibacillus filiformis* sp. nov., isolated from a mineral pool in Campania, Italy. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55:2395-2399

Salzano A, Febbraio F, Farias T, Cetrangolo G, Nucci R, Scaloni A, Manco G (2007) Redox stress proteins are involved in adaptation response of the hyperthermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* to nickel challenge. Microbial Cell Factories 6:25

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1987) Molecular cloning : a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y

Samyn B, Sergeant K, Memmi S, Debyser G, Devreese B, Van Beeumen J (2006) MALDI-TOF/TOF de novo sequence analysis of 2-D PAGE-separated proteins from *Halorhodospira halophila*, a bacterium with unsequenced genome. Electrophoresis 27:2702-2711

Sauer RT, Baker TA (2011) AAA+ Proteases: ATP-fueled machines of protein destruction. Annual Review of Biochemistry 80:587-612

Saum S, Muller V (2008) Regulation of osmoadaptation in the moderate halophile *Halobacillus halophilus*: chloride, glutamate and switching osmolyte strategies. Saline Systems 4:4

Saum SH, Müller V (2007) Salinity-dependent switching of osmolyte strategies in a moderately halophilic bacterium: glutamate induces proline biosynthesis in *Halobacillus halophilus*. Journal of Bacteriology 189:6968-6975

Saum SH, Sydow JF, Palm P, Pfeiffer F, Oesterhelt D, Müller V (2006) Biochemical and molecular characterization of the biosynthesis of glutamine and

glutamate, two major compatible solutes in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*. *Journal of Bacteriology* 188:6808-6815

Schleifer KH, Schüler D, Spring S, Weizenegger M, Amann R, Ludwig W, Köhler M (1991) The Genus *Magnetospirillum* gen. nov. Description of *Magnetospirillum gryphiswaldense* sp. nov. and Transfer of *Aquaspirillum magnetotacticum* to *Magnetospirillum magnetotacticum* comb. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 14:379-385

Schmerk CL, Bernards MA, Valvano MA (2011) Hopanoid production is required for low-pH tolerance, antimicrobial resistance, and motility in *Burkholderia cenocepacia*. *Journal of Bacteriology* 193:6712-6723

Seshasayee A, Sivaraman K, Luscombe N (2011) An overview of prokaryotic transcription factors. In: Hughes TR (ed) *A Handbook of Transcription Factors*. Springer Netherlands, pp 7-23

Shi W, Takano T, Liu S (2012) *Anditalea andensis* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, halotolerant bacterium isolated from extreme alkali–saline soil. *Antonie van Leeuwenhoek* 102:703-710

Shimada T, Hirao K, Kori A, Yamamoto K, Ishihama A (2007) RutR is the uracil/thymine-sensing master regulator of a set of genes for synthesis and degradation of pyrimidines. *Molecular Microbiology* 66:744-757

Shivaji S, Reddy GSN, Suresh K, Gupta P, Chintalapati S, Schumann P, Stackebrandt E, Matsumoto GI (2005) *Psychrobacter vallis* sp. nov. and *Psychrobacter aquaticus* sp. nov., from Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:757-762

Shukla H (2006) Proteomic analysis of acidic chaperones, and stress proteins in extreme halophile *Halobacterium* NRC-1: a comparative proteomic approach to study heat shock response. *Proteome Science* 4:6

Sigee DC (2005) Freshwater environments: the influence of physico-chemical conditions on microbial communities. *Freshwater Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, pp i-xix

Siglioccolo A, Paiardini A, Piscitelli M, Pascarella S (2011) Structural adaptation of extreme halophilic proteins through decrease of conserved hydrophobic contact surface. *BMC Structural Biology* 11:50

Sinha R, Khare SK (2014) Protective role of salt in catalysis and maintaining structure of halophilic proteins against denaturation. *Frontiers in Microbiology* 5

Sizova MV, Panikov NS, Spiridonova EM, Slobodova NV, Tourova TP (2007) Novel facultative anaerobic acidotolerant *Telmatospirillum siberiense* gen. nov. sp. nov. isolated from mesotrophic fen. *Systematic and Applied Microbiology* 30:213-220

Skerman VBD, Sly LI, Williamson M-L (1983) *Conglomeromonas largomobilis* gen. nov., sp. nov., a sodium-sensitive, mixed-flagellated organism from fresh waters. *International Journal of Systematic Bacteriology* 33:300-308

Sleator RD, Hill C (2002) Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiology Reviews* 26:49-71

Smole Z, Nikolic N, Supek F, Smuc T, Sbalzarini I, Krisko A (2011) Proteome sequence features carry signatures of the environmental niche of prokaryotes. *BMC Evolutionary Biology* 11:26

Sorokina AY, Chernousova EY, Dubinina GA (2012) *Ferrovibrio denitrificans* gen. nov., sp. nov., a novel neutrophilic facultative anaerobic Fe(II)-oxidizing bacterium. FEMS Microbiology Letters 335:19-25

Spanheimer R, Müller V (2008) The molecular basis of salt adaptation in *Methanosarcina mazei* Gö1. Archives of Microbiology 190:271-279

Srivastava DB, Leon K, Osmundson J, Garner AL, Weiss LA, Westblade LF, Glickman MS, Landick R, Darst SA, Stallings CL, Campbell EA (2013) Structure and function of CarD, an essential mycobacterial transcription factor. Proceedings of the National Academy of Sciences 110:12619-12624

Sun J, Wang W, Hundertmark C, Zeng A-P, Jahn D, Deckwer W-D (2006) A protein database constructed from low-coverage genomic sequence of *Bacillus megaterium* and its use for accelerated proteomic analysis. Journal of Biotechnology 124:486-495

Sung J-S, Chun J, Choi S, Park W (2012) Genome sequence of the halotolerant *Staphylococcus* sp. strain OJ82, isolated from Korean traditional salt-fermented seafood. Journal of Bacteriology 194:6353-6354

Takami H, Takaki Y, Uchiyama I (2002) Genome sequence of *Oceanobacillus iheyensis* isolated from the Iheya Ridge and its unexpected adaptive capabilities to extreme environments. Nucleic Acids Research 30:3927-3935

Takeuchi M, Katayama T, Yamagishi T, Hanada S, Tamaki H, Kamagata Y, Oshima K, Hattori M, Marumo K, Nedachi M, Maeda H, Suwa Y, Sakata S (2014) *Methyloceanibacter caenitepidi* gen. nov., sp. nov., a facultatively methylotrophic bacterium isolated from marine sediments near a hydrothermal vent. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 64:462-468

Talley LD, Pickard GL, Emery WJ, Swift JH (2011) Chapter 3 - Physical Properties of Seawater. In: Talley LD, Pickard GL, Emery WJ, Swift JH (eds) Descriptive Physical Oceanography (Sixth Edition). Academic Press, Boston, pp 29-65

Thorstenson YR, Zhang Y, Olson PS, Mascarenhas D (1997) Leaderless polypeptides efficiently extracted from whole cells by osmotic shock. *Journal of Bacteriology* 179:5333-5339

Tian S-P, Wang Y-X, Hu B, Zhang X-X, Xiao W, Chen Y, Lai Y-H, Wen M-L, Cui X-L (2010) *Litoribacter ruber* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, halotolerant bacterium isolated from a soda lake sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60:2996-3001

Tistl M (2004) Sal, Cobre y Oro en el Consotá. In: López CC, M (ed) Cambios Ambientales en Perspectiva Histórica Ecorregión del Eje Cafetero, Universidad Tecnológica de Pereira, Programa Ambiental GTZ. Pereira, pp 41-53

Tsubouchi T, Ohta Y, Haga T, Usui K, Shimane Y, Mori K, Tanizaki A, Adachi A, Kobayashi K, Yukawa K, Takagi E, Tame A, Uematsu K, Maruyama T, Hatada Y (2014) *Thalassospira alkalitolerans* sp. nov. and *Thalassospira mesophila* sp. nov., isolated from a decaying bamboo sunken in the marine environment, and emended description of the genus *Thalassospira*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64:107-115

Unemoto T, Hayashi M (1993) Na⁺-translocating NADH-quinone reductase of marine and halophilic bacteria. *J Bioenerg Biomembr* 25:385-391

Urios L, Michotey V, Intertaglia L, Lesongeur F, Lebaron P (2008) *Nisaea denitrificans* gen. nov., sp. nov. and *Nisaea nitritireducens* sp. nov., two novel members of the class Alphaproteobacteria from the Mediterranean Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58:2336-2341

Urios L, Michotey V, Intertaglia L, Lesongeur F, Lebaron P (2010) *Thalassobaculum salexigens* sp. nov., a new member of the family *Rhodospirillaceae* from the NW Mediterranean Sea, and emended description of the genus *Thalassobaculum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60:209-213

Ventosa A, Nieto JJ, Oren A (1998) Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:504-544

Verkman AS (2013) Aquaporins. *Current Biology* 23:R52-R55

Walmsley AR, Shaw JG, Kelly DJ (1992) The mechanism of ligand binding to the periplasmic C4-dicarboxylate binding protein (DctP) from *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Biological Chemistry* 267:8064-8072

Wang Y-X, Liu J-H, Zhang X-X, Chen Y-G, Wang Z-G, Chen Y, Li Q-Y, Peng Q, Cui X-L (2009a) *Fodinicurvata sediminis* gen. nov., sp. nov. and *Fodinicurvata fenggangensis* sp. nov., poly- β -hydroxybutyrate-producing bacteria in the family *Rhodospirillaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59:2575-2581

Wang Y, Cao L-L, Tang S-K, Lou K, Mao P-H, Jin X, Jiang C-L, Xu L-H, Li W-J (2009b) *Marinococcus luteus* sp. nov., a halotolerant bacterium isolated from a salt lake, and emended description of the genus *Marinococcus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59:2875-2879

Weber A, Jung K (2002) Profiling early osmostress-dependent gene expression in *Escherichia coli* using DNA macroarrays. *Journal of Bacteriology* 184:5502-5507

Welander PV, Hunter RC, Zhang L, Sessions AL, Summons RE, Newman DK (2009) Hopanoids play a role in membrane integrity and pH homeostasis in *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1. *Journal of Bacteriology* 191:6145-6156

Weon H-Y, Kim B-Y, Hong S-B, Joa J-H, Nam S-S, Lee KH, Kwon S-W (2007) *Skermanella aerolata* sp. nov., isolated from air, and emended description of the genus *Skermanella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:1539-1542

White AP, Weljie AM, Apel D, Zhang P, Shaykhutdinov R, Vogel HJ, Surette MG (2010) A global metabolic shift is linked to *Salmonella* multicellular development. *PLoS ONE* 5:e11814

Widdel F, Kohring G-W, Mayer F (1983) Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. *Archives of Microbiology* 134:286-294

Williams TJ, Lefèvre CT, Zhao W, Beveridge TJ, Bazylinski DA (2012) *Magnetospira thiophila* gen. nov., sp. nov., a marine magnetotactic bacterium that represents a novel lineage within the *Rhodospirillaceae* (*Alphaproteobacteria*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62:2443-2450

Wood JM (1999) Osmosensing by Bacteria: Signals and Membrane-Based Sensors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63:230-262

Wood JM, Bremer E, Csonka LN, Kraemer R, Poolman B, van der Heide T, Smith LT (2001) Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 130:437-460

Wu X-Y, Zheng G, Zhang W-W, Xu X-W, Wu M, Zhu X-F (2010) *Amphibacillus jilinensis* sp. nov., a facultatively anaerobic, alkaliphilic bacillus from a soda lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60:2540-2543

Wuichet K, Cantwell BJ, Zhulin IB (2010) Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems. *Current Opinion in Microbiology* 13:219-225

Xu X-W, Huo Y-Y, Wang C-S, Oren A, Cui H-L, Vedler E, Wu M (2011) *Pelagibacterium halotolerans* gen. nov., sp. nov. and *Pelagibacterium luteolum* sp. nov., novel members of the family Hyphomicrobiaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61:1817-1822

Yakimov MM, Giuliano L, Chernikova TN, Gentile G, Abraham WR, Lünsdorf H, Timmis KN, Golyshin PN (2001) *Alcalilimnicola halodurans* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, moderately halophilic and extremely halotolerant bacterium, isolated from sediments of soda-depositing Lake Natron, East Africa Rift Valley. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51:2133-2143

Yakimov MM, Golyshin PN, Lang S, Moore ERB, Abraham W-R, Lünsdorf H, Timmis KN (1998) *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48:339-348

Yamada K, Fukuda W, Kondo Y, Miyoshi Y, Atomi H, Imanaka T (2011) *Constrictibacter antarcticus* gen. nov., sp. nov., a cryptoendolithic micro-organism from Antarctic white rock. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61:1973-1980

Yan N (2014) Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends in Biochemical Sciences* 38:151-159

Yang CX, Liu YP, Bao QH, Feng FY, Liu HR, Zhang XJ, Zhao YL (2012) *Mongoliitalea lutea* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, halotolerant bacterium isolated from a haloalkaline lake. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 62:647-653

Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A (2009) Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. Annual Review of Biomedical Engineering 11:49-79

Yoon J-H, Kang S-J, Park S, Lee S-Y, Oh T-K (2007a) Reclassification of *Aquaspirillum itersonii* and *Aquaspirillum peregrinum* as *Novispirillum itersonii* gen. nov., comb. nov. and *Insolitospirillum peregrinum* gen. nov., comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57:2830-2835

Yoon J-H, Kang S-J, Park S, Oh T-K (2007b) *Caenispirillum bisanense* gen. nov., sp. nov., isolated from sludge of a dye works. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57:1217-1221

Younger P (2007) Groundwater in the Environment: An Introduction. Blackwell Publishing, USA, p 318

Zahran HH (1997) Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. Biol Fertil Soils 25:211-223

Zhang D-C, Liu H-C, Zhou Y-G, Schinner F, Margesin R (2011) *Tistrella bauzanensis* sp. nov., isolated from soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 61:2227-2230

Zhang D, Yang H, Zhang W, Huang Z, Liu S-J (2003) *Rhodocista pekingensis* sp. nov., a cyst-forming phototrophic bacterium from a municipal wastewater treatment

plant. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53:1111-1114

Zhang GI, Hwang CY, Cho BC (2008) *Thalassobaculum litoreum* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Rhodospirillaceae* isolated from coastal seawater. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58:479-485

Zhang W-J, Santini C-L, Bernadac A, Ruan J, Zhang S-D, Kato T, Li Y, Namba K, Wu L-F (2012) Complex spatial organization and flagellin composition of flagellar propeller from marine magnetotactic ovoid strain MO-1. Journal of Molecular Biology 416:558-570

Zhang Y-Q, Lee J-C, Park D-J, Lu X-X, Mou X-Z, Kim C-J (2014) *Roseivivax roseus* sp. nov., a novel alphaproteobacterium isolated from a solar saltern soil sample in South Korea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Zhang Y, Fonslow BR, Shan B, Baek M-C, Yates JR (2013) Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. Chemical Reviews 113:2343-2394

Zhang Z, Saier MH (2011) Transposon-mediated adaptive and directed mutations and their potential evolutionary benefits. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 21:59-70

Zhao B, Wang H, Li R, Mao X (2010) *Thalassospira xianhensis* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading marine bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60:1125-1129

Zhilina TN, Zavarzina DG, Panteleeva AN, Osipov GA, Kostrikin NA, Tourova TP, Zavarzin GA (2012) *Fuchsiella alkaliacetigena* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic,

lithoautotrophic homoacetogen from a soda lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62:1666-1673

Zhou W, Bertsova YV, Feng B, Tsatsos P, Verkhovskaya ML, Gennis RB, Bogachev AV, Barquera B (1999) Sequencing and preliminary characterization of the Na⁺ translocating NADH:Ubiquinone Oxidoreductase from *Vibrio harveyi*. *Biochemistry* 38:16246-16252

Zhu D, Hosoi-Tanabe S, Xie C, Honda D, Sun J, Ai L (2014) *Bacillus ligniniphilus* sp. nov., an alkaliphilic and halotolerant bacterium isolated from sediments of South China Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*

Ziegler C, Bremer E, Krämer R (2010) The BCCT family of carriers: from physiology to crystal structure. *Molecular Microbiology* 78:13-34

ANEXO 1. Cuantificación de proteínas utilizando la técnica de Bradford

1. Tomar 100 μl de la muestra y agregar 5 ml del Reactivo de Bradford (proteger los tubos de la luz con papel aluminio), y esperar 5 minutos.
2. Realizar las determinaciones en el espectrofotómetro utilizando una longitud de onda de 595 nm. Utilizar como blanco 0.1 ml de NaCl 0.15 M + 5 ml de Reactivo de Bradford.

Curva patrón de BSA

Preparación de solución stock de albumina de suero bovino (BSA) $1200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

1. Pesar 120 mg de BSA.
2. Disolver en 100 ml de NaCl 0.15 M.
3. Homogenizar en plancha magnética hasta obtener una solución homogénea.
4. Alícuotar solución de BSA preparada en un tubo Falcon de 50 ml.
5. Almacenar en nevera a -20°C .

Preparación de soluciones de concentración conocida de BSA (100 – 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

1. Empleando la fórmula $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ preparar 8 soluciones que tengan un volumen final de 1ml.

Albúmina de suero bovino (BSA) a diferentes concentraciones		
Concentración	Solución concentrada	NaCl 0.15 M
$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	de BSA (ml)	(ml)
100	0.1	0.9
200	0.2	0.8
400	0.4	0.6
500	0.5	0.5
600	0.6	0.4
700	0.7	0.3
800	0.8	0.2
1000	1	0

Determinación de la Curva patrón de BSA

1. Tomar 0.1 ml de cada concentración de BSA y agregar 5 ml de reactivo de Bradford

Metodología para la curva patrón de Bradford							
Reactivo	Blanco	Conc 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	Conc 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	Conc 600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	Conc 800 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	Conc 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	Conc 1200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
BSA (ml)	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
NaCl 0.15 M	0.1	-	-	-	-	-	-
Reactivo de Bradford (ml)	5	5	5	5	5	5	5

2. Proteger los tubos de la luz con papel aluminio y esperar 5 minutos.
 3. Realizar las determinaciones en el espectrofotómetro utilizando una longitud de onda de 595 nm.
 4. Utilizar como blanco 0.1 ml de NaCl 0.15 M + 5 ml de reactivo de Bradford.
- NOTA:** Las lecturas se deben realizar en un tiempo inferior a una hora.
5. Elaborar la curva patrón Absorbancia vs. Concentración y por regresión lineal obtener la ecuación de la recta y determinar la pendiente (m), el intercepto (b) y R^2 .

Preparación reactivo de Bradford (1000 ml)

1. Pesar 100 mg de Azul de Coomassie G-250 y adicionar en un balón aforado de 1000ml.
2. Adicionar 50 ml de etanol al 95% (v/v) y homogenizar.
3. Adicionar 100 ml de ácido fosfórico al 85% (v/v) y homogenizar.
4. Completar a un litro con agua desionizada y homogenizar.
5. Filtrar con papel filtro Whatman y depositar el Reactivo de Bradford filtrado en un balón aforado
6. Almacenar en nevera a 4°C.

ANEXO 2. Preparación de geles SDS-PAGE

Preparación de geles de separación de acrilamida al 12% para SDS-PAGE. Sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell. Compatible con tiras de 7cm

1. Pesar las cantidades indicadas de cada reactivo indicado en la tabla y disolver en 10 ml de agua Milli Q.

		Volumen			
No. geles		5 ml	10 ml	15 ml	20 ml
Reactivo	Conc. final	1 gel	2 geles	3 geles	4 geles
Agua MilliQ	-	1.7 ml	3.3 ml	5.0 ml	6.6 ml
Acrilamida/Bis 30%	12% (v/v)	2.0 ml	4.0 ml	6.0 ml	8.0 ml
Tris-HCl pH 8.8 1.5 M	0.39 M	1.3 ml	2.5 ml	3.8 ml	5.0 ml
SDS 10%	0.1%	50 µl	100 µl	150 µl	200 µl
APS 10 %	0.1%	50 µl	100 µl	150 µl	200 µl
TEMED 100%	0.04%	2 µl	4 µl	6 µl	8 µl

2. Homogenizar y servir en los vidrios.

ANEXO 3. Resultados de la curva de peso de *T. consotensis*

DO teórica de la SM

DO_{SM} : 0.065

$DO_{SM\ 1/100}$: 0.006

Al multiplicar la $DO_{SM\ 1/100}$ por el factor de dilución (0.006 x 100) se obtuvo un valor de 0.6 el cual es menor valor de DO teórico de esta dilución en cual debe estar entre 1 y 2. Debido a esto se decidió realizar todas las diluciones a partir de la solución madre (SM2).

Peso seco de las células en las cápsulas y calculó el peso seco de bact/ml de SM

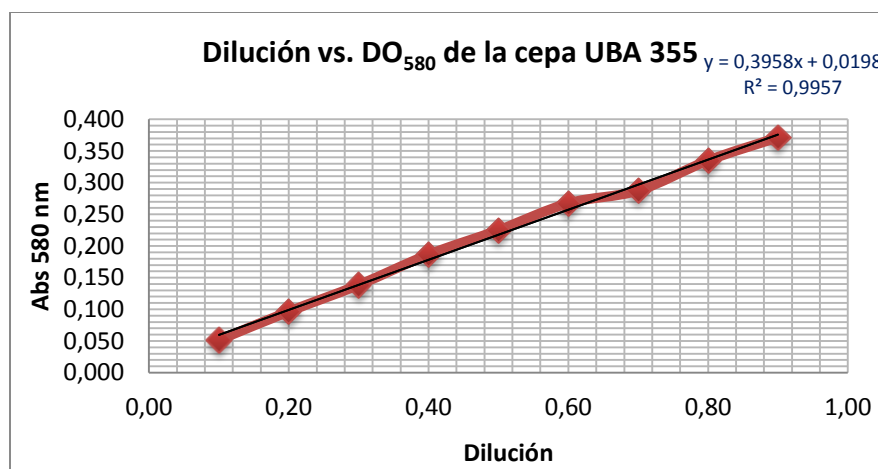
ml cultivo	Peso Capsulas (mg)			Peso células (mg)	Peso seco ($mg \cdot ml^{-1}$)
	Peso inicial	Peso 1	Peso final		
20,00	38791,70	38796,90	38798,80	7,100	0,355
10,00	30018,20	30018,50	30021,60	3,400	0,340
20,00	36060,90	36062,50	36068,70	7,800	0,390
10,00	33464,00	33464,60	33467,20	3,200	0,320

Peso seco de la suspensión de trabajo

Peso seco ($\mu l \cdot ml^{-1}$)	Promedio ($\mu l \cdot ml^{-1}$)	Dil ST	Peso Seco ST
355,000	372,500	0,000	372,500
340,000			(20 ml)
390,000	330,000		330,000
320,000			(10 ml)

Gráfica Dilución vs. DO₅₈₀ de *T. consotensis*

Abs diluciones ST de la cepa <i>T. consotensis</i>				
Dilución	Fd	R1	R2	Promedio Abs
1/10	0,10	0,053	0,050	0,052
2/10	0,20	0,095	0,098	0,097
3/10	0,30	0,135	0,142	0,139
4/10	0,40	0,183	0,190	0,187
5/10	0,50	0,226	0,224	0,225
6/10	0,60	0,267	0,268	0,268
7/10	0,70	0,275	0,300	0,288
8/10	0,80	0,340	0,330	0,335
9/10	0,90	0,373	0,370	0,372

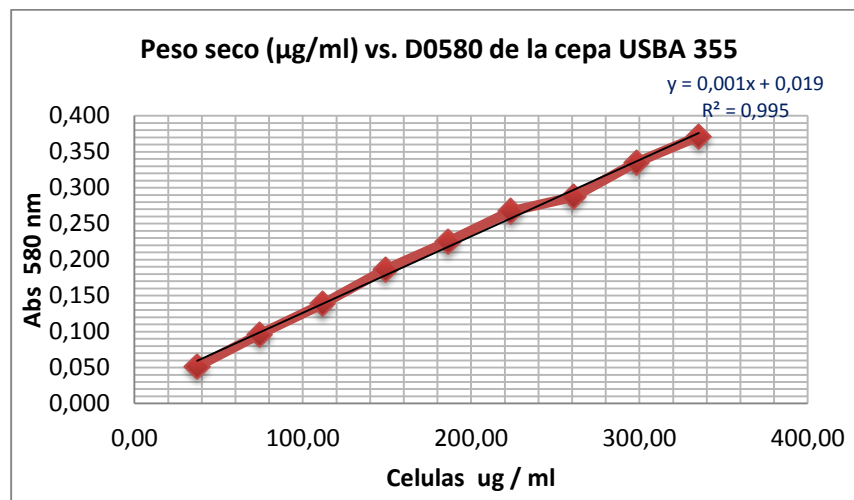


Peso seco de cada dilución

Para el cálculo del peso seco de cada dilución se utilizó el peso seco ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) de la suspensión correspondiente a 200 ml de volumen secado.

Peso seco de cada dilución			
Dilución	Fd	Peso seco ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Promedio Abs
1/10	0,10	37,25	0,051
2/10	0,20	74,50	0,096
3/10	0,30	111,75	0,138
4/10	0,40	149,00	0,186
5/10	0,50	186,25	0,225
6/10	0,60	223,50	0,267
7/10	0,70	260,75	0,287
8/10	0,80	298,00	0,335
9/10	0,90	335,25	0,371

Gráfica de peso seco ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) vs. DO_{580} de *T. consotensis*



La ecuación de la recta de la curva de peso seco para *T. consotensis* es $y = 0.001 + 0.019$, la cual es utilizada para convertir los valores de absorbancia, de los diferentes ensayos para esta cepa, en μg célula/ml.

ANEXO 4. Masa molecular y punto isoeléctrico de las manchas proteicas que presentaron cambios significativos en su expresión a 0 y 40 g·l⁻¹ de salinidad.

Código mancha proteica	MW (kDa)	pI
4	20	4,5
5	19	4,6
7	38	4,5
8	42	4,7
10	110	4,6
13	21	4,7
15	42	4,7
16	85	4,6
17	97	4,7
19	107	4,7
25	67	4,8
26	80	4,9
29	80	4,7
31	97	4,9
33	120	4,8
43	70	5,2
44	90	5,1
50	120	5,1
58	90	5,2
61	97	5,32
62	107	5,32
64	24	5,5
67	60	5,4
69	90	5,43
70	90	5,43
71	107	5,43
80	70	5,64
82	107	5,5
83	107	5,64
88	31	5,7
90	35	5,8
98	107	5,7
99	97	5,82

ANEXO 5. Lista de proteínas no redundantes detectadas en el exoproteoma de *T. consotensis*

La lista de proteínas no redundantes detectadas en el exoproteoma de *T. consotensis* se encuentra en el archivo adjunto de Excel.

ANEXO 6. Lista de proteínas no redundantes detectadas en el proteoma celular de *T. consotensis*

La lista de proteínas no redundantes detectadas en el proteoma celular de *T. consotensis* se encuentra en el archivo adjunto de Excel.

ANEXO 7. Lista de proteínas que presentaron cambios significativos en términos de abundancia en el exoproteoma de *T. consotensis*.

La lista de proteínas que presentaron cambios significativos en términos de abundancia en el exoproteoma de *T. consotensis* se encuentra en el archivo adjunto de Excel.

ANEXO 8. Lista de proteínas que presentaron cambios significativos en términos de abundancia en el proteoma celular de *T. consotensis*.

La lista de proteínas que presentaron cambios significativos en términos de abundancia en el proteoma celular de *T. consotensis* se encuentra en el archivo adjunto de Excel.

ANEXO 9. Publicaciones y presentaciones en congresos

Publicaciones

Carolina Rubiano-Labrador, Céline Bland, Guylaine Miotello, Jean Armengaud, Sandra Baena. 2015. Salt stress induced changes in the exoproteome of the halotolerant bacterium *Tistlia consotensis* deciphered by proteogenomics. *Plos One*. In Press.

Carolina Rubiano-Labrador, Céline Bland, Guylaine Miotello, Philippe Guérin, Olivier Pible, Sandra Baena, Jean Armengaud. 2014. Proteogenomic insights into salt tolerance by a halotolerant alpha-proteobacterium isolated from an Andean saline spring. *Journal of Proteomics*. 97: 36-47.

Presentaciones en congresos

Living on both ends: analysis of adaptation to osmotic stress in the halotolerant bacterium *Tistlia consotensis* by an innovative proteogenomics approach. V Symposium of Mexican Proteomics Society. Cancún, México. Agosto 16 -16, 2013.

Strategies to cope extreme conditions deciphered by an innovative proteogenomics approach applied on microorganisms isolated from Colombia. 5th Congress of European Microbiologists. Leipzig, Alemania. Julio 21 – 25, 2013.

Proteogenomic insights into salt tolerance. Congrès SFEAP Rouen 2012. Rouen (Francia). Octubre 15 – 17, 2012.

Comparative analyses of protein expression of *Tistlia consotensis*, strain USBA 355, a new species isolated from a terrestrial saline spring. SMAP 2011, Spectrométrie de Masse & Analyse Protéomique. Avignon (France). Septiembre 19 – 22, 2011.