

Caracterización microbiológica de la cepa *Shewanella* sp. T2.3D-1.1, aislada del subsuelo de la Faja Pirítica Ibérica

Sofía de Francisco de Polanco

Máster en Microbiología



MÁSTERES
DE LA UAM
2018 – 2019

Facultad de Ciencias

Máster en Microbiología

Caracterización microbiológica de la cepa
Shewanella sp. T2.3D-1.1, aislada del
subsuelo de la Faja Pirítica Ibérica

Sofía de Francisco de Polanco

Caracterización microbiológica de la cepa *Shewanella* sp. T2.3D-1.1, aislada del subsuelo de la Faja Pirítica Ibérica

Trabajo de Fin de Máster

Máster en Microbiología
Universidad Autónoma de Madrid

Sofía De Francisco De Polanco

Septiembre 2019

Tutor: Ricardo Amils Pibernat
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM)

Índice

Lista de figuras.....	iii
Lista de tablas.....	v
Abreviaciones.....	vii
Abstract.....	ix
Resumen.....	xi
Capítulo 1. Introducción y Objetivos.....	1
1.1 El subsuelo.....	1
1.2 La Faja Pirítica Ibérica.....	2
1.3 El género <i>Shewanella</i> y <i>Shewanella putrefaciens</i>	3
1.4 Objetivos.....	5
Capítulo 2. Materiales y Métodos.....	6
2.1 Métodos microbiológicos.....	6
2.2 Genómica.....	7
2.2.1. Extracción de ADN.....	7
2.2.2. Análisis genómico.....	7
2.3 Resistencia a metales pesados.....	8
2.4 Reducción de nitrato.....	8
2.5. Oxidación anaerobia del hierro dependiente de reducción de nitrato.....	8
2.5.1. Oxidación del hierro.....	8
2.6. FISH y CARD-FISH.....	9
2.6.1. Optimización de las condiciones de hibridación de la sonda seleccionada.....	9
2.6.2 CARD-FISH.....	9
2.6.3 Microscopía de fluorescencia y procesamiento de imágenes.....	10
Capítulo 3. Resultados y discusión.....	11
3.1 Genómica.....	11
3.1.1. Identificación del genoma y ensamblaje.....	11

3.1.2. Anotación del genoma.....	12
3.2. Propiedades Metabólicas.....	16
3.2.1. Resistencia a metales pesados.....	16
3.2.2. Reducción de nitrato.....	18
3.2.3 Oxidación de hierro dependiente de reducción de nitrato.....	19
3.3. FISH y CARD-FISH.....	21
3.3.1. Optimización de las condiciones de hibridación.....	21
3.3.2. CARD-FISH.....	22
3.4. Perspectivas futuras.....	23
Capítulo 4. Conclusiones.....	24
Capítulo 5. Bibliografía.....	25

Lista de figuras

Figura 1. Representación gráfica del genoma circular de <i>Shewanella</i> sp. T2.3D-1.1.....	12
Figura 2. Transformaciones de compuestos nitrogenados identificados en distintos microorganismos.....	14
Figura 3. Rutas asimilativa y desasimilativa en la reducción de sulfato en organismos procariotas.....	15
Figura 4. Concentración de los iones ferroso y férrico a lo largo del experimento de oxidación de hierro dependiente de reducción de nitrato.....	20
Figura 5. Detección de <i>Shewanella</i> sp. T2.3D-1.1 mediante FISH.....	21

Lista de tablas

Tabla 1. Lista parcial de los aceptores de electrones que pueden ser empleados por los aislados de <i>Shewanella</i>	4
Tabla 2. Lista de los medios empleados en este estudio	6
Tabla 3. Lista de las cepas bacterianas empleadas en este estudio y sus condiciones estándar de cultivo.....	7
Tabla 4. Lista de las sondas utilizadas en este estudio y su especificidad.....	9
Tabla 5. Lista de los <i>helpers</i> que se emplearon en el experimento de CARD-FISH.....	10
Tabla 6. Resultados de la secuenciación del genoma de <i>Shewanella</i> sp. T2.3D-1.1.....	11
Tabla 7. Características del genoma de <i>Shewanella</i> sp. T2.3D-1.1 tras la identificación de posibles plásmidos y su ensamblaje.....	11
Tabla 8. Distribución de las PEGs de la anotación de <i>Shewanella</i> sp. T2.3D-1.1 que pudieron ser clasificadas en distintas categorías funcionales relacionadas con distintos procesos metabólicos celulares por el servidor RAST.....	13
Tabla 9. Tolerancia de <i>Shewanella</i> sp. T2.3D-1.1 a diferentes metales pesados y diferentes concentraciones a lo largo del tiempo.....	17

Abreviaciones

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ARNtm	Ácido ribonucleico de transferencia-mensajero
CARD	Catalysed Reporter Deposition
CDS	Coding Sequence
CTAB	Cetyl Trimethylammonium Bromide
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DO	Densidad Óptica
FA	Formamida
FISH	Fluorescence <i>In Situ</i> Hibridation
FITC	Fluorescein Isotiocyanate
FPI	Faja Pirítica Ibérica
IPBSL	Iberian Pyrite Belt Subsurface Life Detection
LB	Luria Bertani (medio)
LSM	Laser Scanning Microscope
MARTE	Mars Astrobiology Research and Technology Experiment
NB	Nitrate Broth (medio)
NDFO	Nitrate Dependant Fe ²⁺ Oxidation
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEG	Protein Encoding Gene
SLiMEs	Subsurface Litoautotrophic Microbial Ecosystems
TBE	Tris Borate EDTA
TSA	Tryptic Soy Agar (medio)
TSB	Tryptic Soy Broth (medio)
TMAO	Trimetilamina N-óxido

Abstract

Shewanella sp. T2.3D-1.1 was isolated from an enrichment culture of a rock core sample from 121,8 m deep in the borehole BH10 of the IPBSL drilling project. The main purpose of this work was to carry out its microbiological characterization and to elucidate its role in the origin of Río Tinto.

Firstly, its genome was sequenced, and the reads were assembled and annotated. The metabolic routes that are related to the most important biogeochemical cycles in the Iberian Pyrite Belt subsurface were analysed, besides its respiratory diversity and its ability to tolerate toxic compounds. Results indicate that this bacterium plays an important role in nitrogen and iron cycles. Moreover, it exhibits a wide variety of electron acceptors that can be used and shows several heavy metal resistance genes. This feature was tested experimentally by determining the concentration ranges of different metals that can be tolerated by *Shewanella* sp. T2.3D-1.1.

Secondly, nitrate and nitrite reduction were studied in two different media (LB and NB), concluding that this bacterium is able to carry out both reactions, and that this process is faster in LB medium. Furthermore, nitrate dependant Fe^{2+} oxidation was also examined when *Shewanella* sp. T2.3D-1.1 was cultured in a medium containing these compounds, and it was concluded that this process happened in those conditions, which has important implications in the possible origin of Río Tinto.

Finally, we tried to analyse the spacial distribution of *Shewanella* sp. T2.3D-1.1 all along the BH10 drilling column, but CARD-FISH experiments failed.

Resumen

Shewanella sp. T2.3D-1.1 es una bacteria que se aisló en un cultivo de enriquecimiento a partir de la muestra de roca de 121,8 metros de profundidad del pozo BH10 del proyecto de perforación IPBSL. Este trabajo ha consistido en su caracterización microbiológica y el estudio de su papel en el origen del Río Tinto.

En primer lugar, se secuenció su genoma, y las lecturas fueron ensambladas y anotadas. Se analizaron las rutas metabólicas que guardan relación con los ciclos biogeoquímicos relevantes en el subsuelo de la FPI, además de las propiedades respiratorias del aislado y su tolerancia a compuestos tóxicos. Los resultados indicaron que esta bacteria tiene un papel relevante en los ciclos de nitrógeno y del hierro, así como una gran variedad de aceptores de electrones que puede utilizar y varios genes de resistencia a metales pesados. Esta última característica fue testada experimentalmente determinando los rangos de concentraciones que tolera *Shewanella* sp. T2.3D-1.1 en presencia de distintos metales.

Por otra parte, se estudió la reducción de nitrato y nitrito en esta bacteria en dos medios distintos (LB y NB), concluyendo que la bacteria es capaz de llevar a cabo ambas reacciones y que el tiempo en el que se lleva a cabo este proceso es menor en el medio LB. Además, se investigó si el proceso de oxidación de hierro dependiente de reducción de nitrato tenía lugar cuando el microorganismo se encontraba en un medio con estos compuestos, lo cual dio un resultado positivo. Esto tiene importantes implicaciones en el posible origen del Río Tinto.

Por último, se trató de analizar la distribución de la bacteria a lo largo de la columna del pozo BH10, pero los experimentos de CARD-FISH no se pudieron desarrollar por problemas dependientes de la sonda utilizada.

Capítulo 1. Introducción y objetivos

1.1. El subsuelo

El subsuelo profundo está considerado como un ambiente extremo caracterizado por oscuridad y anaerobiosis, en donde la temperatura y la presión aumentan a medida que lo hace la profundidad (Kieft, 2016). No obstante, la porción de biosfera que se encuentra comprendida en los ambientes subterráneos, tanto continentales como marinos, está reconocida como una proporción significativa de las células microbianas de nuestro planeta hoy en día (Røy *et al.*, 2012).

La principal característica diferencial de este tipo de ecosistemas frente a aquellos que se pueden encontrar en la superficie terrestre es la ausencia de luz. A medida que aumenta la profundidad, la cantidad y la calidad del carbono orgánico derivado de la fotosíntesis disminuye, con las excepciones de las reservas de petróleo y de los sedimentos y rocas sedimentarias, ricos en materia orgánica (Fredrickson y Balkwill, 2006). A su vez, la abundancia de las bacterias heterotróficas, que suelen ser dominantes en las zonas menos profundas del subsuelo, también se ve reducida (Kieft, 2016). Conforme esto ocurre, y la disponibilidad de fotosintatos disminuye, se piensa que el H₂ que se genera en procesos abióticos a partir de la interacción de agua y roca, denominado geogás, pasa a ser la fuente de energía dominante (Kieft, 2016). De esta forma, a pesar de que muchos de los ecosistemas subterráneos que se han estudiado podrían utilizar el carbono orgánico derivado de procesos fotosintéticos superficiales (Kieft, 2016), se ha propuesto la existencia de ecosistemas subterráneos quimiosintéticos denominados SLiMEs (Subsurface Litoautotrophic Microbial Ecosystems), término acuñado por Stevens y McKinley en 1995, los cuales obtienen energía de fuentes generadas geoquímicamente (Nealson *et al.*, 2005). Dado que este tipo de sistemas suelen ser de carácter anaerobio, son totalmente independientes de los productos de la fotosíntesis: el O₂ y el carbono orgánico (Kieft, 2016).

La disponibilidad de agua y nutrientes en los ambientes subterráneos y, por lo tanto, el número y la actividad de los microorganismos presentes en los mismos, están fuertemente controlados por la geoquímica y la geohidrología. En estos emplazamientos, los minerales suponen la principal fuente de sustrato, debido a la escasa presencia de materia orgánica. La existencia de distintos aceptores y donadores de electrones depende de la composición geológica del lugar (Jones y Bennett, 2017; Rempfert *et al.*, 2017). A diferencia de los ecosistemas basados en los procesos fotosintéticos, en los cuales la luz solar supone una importante fuente de energía, en el subsuelo, el espectro de posibles estrategias de obtención de energía disminuye drásticamente. Además, los metabolismos anaerobios predominan frente a los procesos aerobios, por lo que la cantidad de energía que se obtiene es considerablemente menor que en estos. Los requerimientos mínimos energéticos constituyen una gran limitación en este tipo de ambientes (Hoehler, 2004).

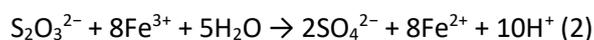
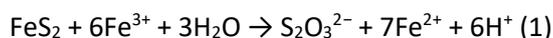
Estas premisas han llevado a cuestionar el estado metabólico de los microorganismos colonizadores del subsuelo profundo. Cuando las fuentes de energía son escasas o no existen, los microorganismos son capaces de adoptar un estado metabólico latente, por lo que se piensa que la mayoría de los que habitan en las profundidades subterráneas se encuentran en un estado de anabiosis (D'Hondt *et al.*, 2002). No obstante, la recuperación de microorganismos viables de una formación geológica que data de hace 250 millones de años (Vreeland *et al.*,

1998) y el hecho de que la supervivencia del ADN en un estado metabólico latente sea de aproximadamente 100 años (Morita, 1999) se contradicen. En este último trabajo, se propone que los microorganismos podrían sobrevivir durante largos períodos de tiempo en condiciones de inanición si son capaces al menos de alcanzar un mínimo de energía, denominada energía de supervivencia. Este umbral cubriría las necesidades básicas para compensar la racemización de los aminoácidos y la depurinación del ADN. Esta hipótesis indicaría que los microorganismos se encontrarían metabólicamente activos en el subsuelo, aunque su tiempo de duplicación sería extremadamente largo, hablando incluso de tiempos de duplicación geológicos (Phelps *et al.*, 1994).

1.2. La Faja Pirítica Ibérica

El Río Tinto (Huelva, España), de casi 100 km de longitud, es un río con un pH extremadamente ácido (pH=2,3) y una gran cantidad de metales disueltos. Presenta un característico color rojo debido a la alta concentración de ion férrico que se mantiene en solución precisamente por la acción de dicho pH. El río nace en Peña de Hierro, que se encuentra en el corazón de la Faja Pirítica Ibérica (FPI) (Amils *et al.*, 2002). Esta entidad geológica está comprendida en el área geotectónica Sur-Portuguesa de la Península Ibérica, y constituye uno de los mayores depósitos de sulfuros metálicos del mundo (Tornos, 2006). La geología de la zona está compuesta principalmente por pirita y calcopirita, entre otros minerales (Tornos, 2006).

El pH se mantiene de forma constante a lo largo del río gracias a su fuerte capacidad tampón, de tal manera que, a valores elevados de pH, el Fe^{3+} disuelto precipita en forma de hidróxido férrico y libera protones, mientras que cuando el pH es bajo, el hidróxido férrico se disuelve, consumiendo protones y compensando la acidez (Amils *et al.*, 2002). El ion férrico se produce principalmente por la acción de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*, dos microorganismos oxidantes de hierro que son muy numerosos y activos en la parte aerobia del río. El Fe^{3+} resultante entra en contacto con los abundantes sulfuros metálicos de la FPI, oxidándolos. En el caso de la pirita, debido a su insolubilidad en condiciones ácidas, se oxida por la vía del tiosulfato (Vera *et al.*, 2013):



Tradicionalmente, se ha considerado que estas características peculiares del río se debían principalmente a la actividad minera, resultante de la explotación de los enormes depósitos de sulfuros (Davis Jr *et al.*, 2000). Sin embargo, se han encontrado terrazas fluviales que datan del final del Mioceno y que fueron originadas bajo condiciones similares a las que existen hoy en día (Fernández-Remolar *et al.*, 2003; Fernández-Remolar *et al.*, 2005), de forma que se ha estimado que el sistema ácido del río se originó hace unos 7 millones de años, tres órdenes de magnitud antes que la primera actividad minera conocida (Essalhi *et al.*, 2011). El Río Tinto mana de fuentes localizadas en la zona sur de Peña de Hierro, en donde las altas cargas iónicas y el pH bajo ya se encuentran presentes en el agua (Fernández-Remolar *et al.*, 2005).

Cuando en 2003 se llevó a cabo el proyecto Mars Astrobiology Research and Technology Experiment (MARTE), se encontraron distintas poblaciones microbianas en el subsuelo, cuyos metabolismos indicaban una participación de estas en los ciclos biogeoquímicos del hierro y del azufre, entre otros. Se llegó a la conclusión de que las condiciones del sistema del río podrían deberse a la existencia de un “biorreactor subterráneo”, de forma que los microorganismos allí presentes participarían en la disolución de los depósitos de pirita a través de la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} , gracias a su metabolismo oxidante de hierro (Fernández Remolar *et al.*, 2008a; Fernández-Remolar *et al.*, 2008b). Este biorreactor sería el causante de las propiedades extremas que caracterizan el río.

Posteriormente, se llevó a cabo el proyecto Iberian Pyrite Belt Subsurface Life Detection (IPBSL, 2011-2015), el cual fue un proyecto interdisciplinar de perforación que se realizó con el objetivo de estudiar más en detalle la geomicrobiología del subsuelo profundo de la FPI. Gracias a este proyecto, se perforaron dos pozos en el área de Peña de Hierro, denominados BH10 y BH11, con el propósito de caracterizar el biorreactor subterráneo de la FPI. Muestras de distintas profundidades de ambos pozos, de 613 y 320 metros de profundidad respectivamente, se sometieron a análisis fisicoquímicos, geológicos, mineralógicos y microbiológicos (Amils *et al.*, 2013). Testigos de distintas profundidades del pozo BH10 se almacenaron en condiciones anaerobias y fueron sometidos a los distintos análisis. Entre ellos, se realizaron estudios de metagenómica por secuenciación *shotgun* y cultivos de enriquecimiento para detectar distintos metabolismos a distintas profundidades del subsuelo. Además, se llevaron a cabo análisis metagenómicos del 16S para elucidar la diversidad microbiológica de algunos cultivos de interés. Por otra parte, fueron aislados varios microorganismos a partir de muestras de distintas profundidades mediante cultivos de enriquecimiento, los cuales fueron identificados llevando a cabo la secuenciación del gen ribosomal 16S.

1.3. El género *Shewanella* y *Shewanella putrefaciens*

A partir del cultivo de enriquecimiento para el aislamiento de microorganismos desnitrificantes de la muestra obtenida a 121,8 metros de profundidad en el pozo BH10 del proyecto IPBSL, se aisló una cepa del género *Shewanella*, cuyo análisis del gen ribosomal 16S concluyó que la cepa tipo más cercana era *Shewanella hafniensis* P010(T), con un 99,43% de similitud. A la cepa aislada se la denominó *Shewanella* sp. T2.3D-1.1 (Leandro, 2018). No obstante, dado que el genoma completo disponible más cercano al aislado es el de *Shewanella putrefaciens*, se tomó a esta como referencia.

La familia *Shewanellaceae*, perteneciente al orden *Alteromonadales*, dentro de la clase Gammaproteobacteria, comprende un único género: *Shewanella*. Todas las especies de este género son gramnegativas, presentando forma bacilar y motilidad gracias a un flagelo polar único. Este género comprende más de 50 especies reconocidas hoy en día (Satomi, 2014).

Como género, *Shewanella* presenta una de las mayores diversidades respiratorias descritas hasta el momento. La lista de aproximadamente 20 compuestos orgánicos e inorgánicos que pueden ser utilizados por estos microorganismos como aceptores de electrones incluye un número significativo de elementos tóxicos y metales insolubles (Nealson y Scott, 2005). Algunos de ellos se muestran en la Tabla 1. Esto le concede una gran versatilidad a la hora de adaptarse al ambiente. Aparentemente, todos los aislados del género parecen tener

carácter anaerobio facultativo. Este hecho, junto a la enorme variedad de aceptores de electrones que son capaces de utilizar, sugiere que estos organismos suelen encontrarse en ambientes que son a la vez aerobios y anaerobios (Hau y Gralnick, 2007).

Tabla 1. Lista parcial de los aceptores de electrones que pueden ser empleados por los aislados de *Shewanella*. Adaptada de Nealson y Scott, 2005.

Aceptor de electrones	Productos
Oxígeno	H ₂ O
Nitrato	NO ²⁻ , NO, N ₂ O, N ₂ , and NH ₄ ⁺
Nitrito	NO, N ₂ O, N ₂ , and NH ₄ ⁺
Mn(VI) sólido y quelato de Mn(III)	Mn(II) soluble
Quelatos de Fe(III)	Fe(II) soluble
S ₂ O ₃ ²⁻	H ₂ S
Selenito	Se ⁰ sólido
Arsenato	Arsenito, As ⁰
U(VI) soluble	U(IV) sólido

De acuerdo con las características anteriormente mencionadas, entre los tipos de ambientes en los que se esperaría encontrar miembros del género *Shewanella*, se encuentran aquellos en donde las condiciones redox pueden cambiar rápidamente y haya variaciones en la dominancia del aceptor de electrones mayoritario, incluyendo cambios entre condiciones aerobias y anaerobias (Nealson y Scott, 2005). Estos microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, habiéndose identificado en ambientes marinos y en simbiosis con organismos que habitan en estos ambientes, en alimentos de naturaleza proteica, en muestras clínicas o en el subsuelo (Satomi, 2014).

En relación con las propiedades que se han mencionado, *Shewanella putrefaciens* es una bacteria gramnegativa que está ampliamente distribuida en entornos marinos y de agua dulce (Nealson y Saffarini, 1994). Se trata de un microorganismo no fermentativo que puede crecer tanto en condiciones aerobias como anaerobias. En ausencia de oxígeno, *S. putrefaciens* puede emplear una gran variedad de aceptores de electrones, tales como N-óxido de trimetilamina (TMAO), dimetil sulfóxido (DMSO), nitrato, nitrito, tiosulfato, sulfito y óxidos de metales (Moser y Nealson, 1996).

El hecho de que esta bacteria sea capaz de utilizar tantos y tan diversos compuestos como aceptores de electrones da lugar a que surja un especial interés en el estudio del papel del aislado *Shewanella* sp. T2.3D-1.1 en los ciclos biogeoquímicos que tienen lugar en el subsuelo de la FPI. La caracterización de los aislados del subsuelo permite ampliar el conocimiento que se tiene sobre los ecosistemas que se pueden encontrar en este tipo de ambientes, prestando especial atención a la geomicrobiología. Las características del área de Peña de Hierro hacen interesantes el estudio de las capacidades metabólicas del aislado en relación con la resistencia a metales pesados, el ciclo del nitrógeno y el ciclo del hierro. Dicha información podría ayudar a entender el funcionamiento del biorreactor subterráneo, tal y como se pretende en el proyecto IPBSL.

1.4. Objetivos

El objetivo principal de este estudio ha sido la caracterización microbiológica de la cepa *Shewanella* sp. T2.3D-1.1, aislada en estudios previos pertenecientes al proyecto IPBSL a partir de cultivos de enriquecimiento en condiciones de anaerobiosis estricta de la muestra de 121,8 metros bajo el suelo.

Para lograr el fin marcado, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Secuenciación, anotación y análisis del genoma del aislado.
- Optimización de las condiciones de hibridación de una sonda para detectar mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) el género *Shewanella*.
- Análisis de la distribución del género *Shewanella* en la columna del pozo BH10 de la FPI mediante FISH.
- Estudio de algunas de sus características metabólicas y su posible implicación en el origen del Río Tinto.

Capítulo 2. Materiales y métodos

2.1. Métodos microbiológicos

Todos los medios de cultivo y cepas microbianas que se utilizaron en este trabajo, así como su uso específico, se detallan en la Tabla 2 y Tabla 3, respectivamente.

Tabla 2. Lista de los medios empleados en este estudio. Todos ellos fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 minutos, con excepción de los componentes termolábiles, los cuales se esterilizaron por filtración con membranas de 0,22µm y fueron añadidos posteriormente.

Medio	Componentes	Concentración	Uso
Caldo marino (Difco™ BD)	Peptona Extracto de levadura Citrato férrico NaCl MgCl ₂ MgSO ₄ CaCl ₂ KCl NaHCO ₃ KBr	5 g/L 1 g/L 0,1 g/L 19,45 g/L 5,9 g/L 3,24 g/L 1,8 g/L 0,55 g/L 0,16 g/L 0,08 g/L	Crecimiento de <i>Spongiibacter marinus</i> 5IX en condiciones óptimas
LB	Peptona Extracto de levadura NaCl	10 g/L 5 g/L 5 g/L	Experimentos de reducción de nitrato y de oxidación de hierro dependiente de reducción de nitrato (NDFO)
NB (Sigma-Aldrich)	KNO ₃ Extracto de carne Peptona	1 g/L 3 g/L 5 g/L	Experimento de reducción de nitrato
TSA (Difco™ BD)	Peptona de caseína Peptona de semilla de soja Glucosa NaCl K ₂ HPO ₄ Agar	17 g/L 3 g/L 2,5 g/L 5 g/L 2,5 g/L 15 g/L	Experimentos de resistencia a metales pesados
TSB (Difco™ BD)	Peptona de caseína Peptona de semilla de soja Glucosa NaCl K ₂ HPO ₄	17 g/L 3 g/L 2,5 g/L 5 g/L 2,5 g/L	Crecimiento de <i>Shewanella</i> sp. T2.3D-1.1 en condiciones óptimas

Tabla 3. Lista de las cepas bacterianas empleadas en este estudio y sus condiciones estándar de cultivo.

Cepa bacteriana	Condiciones estándar de cultivo	Referencia	Uso
<i>Shewanella</i> sp. T2.3D-1.1	Medio TSB a 30°C	(Leandro, 2018)	Cepa de estudio
<i>Songiibacter marinus</i> 51X	Medio de caldo marino a 28°C	(Jang <i>et al.</i> , 2011)	Control negativo para el ensayo de FISH

El crecimiento microbiano se monitorizó midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 600nm (DO₆₀₀) mediante espectrofotometría.

2.2. Genómica

2.2.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo mediante el método de bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) (Wilson, 2001) a partir de un cultivo líquido en medio TSB de *Shewanella* sp. T2.3D-1.1. La cantidad de ADN extraído se determinó por fluorimetría, con Qubit versión 2.0 (Invitrogen, EE.UU.), y su calidad se analizó por electroforesis en gel de agarosa (Conda; 1% (p/v) en TBE 0,5X).

2.2.2. Análisis genómico

El DNA genómico fue secuenciado mediante Illumina MiSeq, con una cobertura de 73X, por MicrobesNG (Universidad de Birmingham, Reino Unido).

Respecto al análisis bioinformático de las lecturas, se comprobó la calidad de estas utilizando el software FastQC 0.11.8 (Andrews, 2010) y se filtraron las mismas por calidad utilizando Trimmomatic 0.30 (Bolger *et al.*, 2014). Se utilizó el software Kraken (Wood y Salzberg, 2014) para identificar el genoma de referencia disponible más cercano. Posteriormente, se procedió al ensamblaje del genoma y de los plásmidos putativos de la cepa mediante SPAdes 3.13.0 (Bankevich *et al.*, 2012), utilizando el parámetro específico de plásmidos en el segundo caso, separando los posibles plásmidos del genoma. Además, se llevó a cabo el proceso de *scaffolding* para el genoma y los plásmidos obtenidos con SSPACE (Boetzer *et al.*, 2011) y se utilizó GapFiller para cerrar los huecos entre los *scaffolds* ensamblados (Nadalin *et al.*, 2012). El genoma se anotó utilizando los programas Prokka 1.12 (Seemanm, 2014) y RAST (Aziz *et al.*, 2008), tomando como genoma de referencia el de *Shewanella putrefaciens* ATCC:8071. Por último, se llevó a cabo una representación gráfica del mismo utilizando el software dnalplotter v-18.0.2 (Carver *et al.*, 2008).

2.3. Resistencia a metales pesados

Para determinar la tolerancia de *Shewanella* sp. T2.3D-1.1 a diferentes concentraciones de metales pesados, se preparó medio TSA esterilizado en autoclave y suplementado con iones metálicos. Las sales de los metales pesados seleccionados, FeSO_4 , CuSO_4 , CoSO_4 , CrCl_3 , ZnSO_4 , CdSO_4 y NiCl_2 , se prepararon a concentraciones de 0,1mM, 0,5mM, 1mM, 5mM y 10mM, esterilizando las soluciones por filtración. El experimento se llevó a cabo por triplicado.

En cada placa, se inoculó cultivo líquido fresco de la cepa *Shewanella* sp. T2.3D-1.1 crecida en TSB aeróbicamente. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente durante cuatro semanas y se observaron diariamente para estudiar la evolución del crecimiento bacteriano. Se llevaron controles de TSA sin metal y de cada concentración de cada metal sin inocular.

2.4. Reducción de nitrato

Para comprobar si *Shewanella* sp. T2.3D-1.1 puede utilizar el NO_3^- como aceptor final de electrones, se creció el microorganismo en medio NB (Nitrate Broth) y en LB suplementado con NaNO_3 10mM y se llevó a cabo un Test de Reducción de Nitrato (Sigma-Aldrich, EE.UU.) tal y como indica el fabricante. Este experimento se realizó por triplicado y se usó como control negativo el medio sin inocular.

2.5. Oxidación anaerobia del hierro dependiente de reducción de nitrato

Para llevar a cabo este experimento, se utilizó medio LB suplementado con 10mM NaNO_3 . El stock de NaNO_3 se preparó previamente en condiciones anaerobias y se esterilizó en autoclave. Como fuente de ion ferroso, se añadió FeCl_2 disuelto en agua miliQ anóxica (hervida y gaseada con N_2) a una concentración de 4mM. Pasadas 48 horas, el medio se filtró con filtros de 0,2 μm con el objetivo de eliminar los precipitados de vivianita y siderita (Escudero, 2018), de forma que se consiguió una solución transparente con Fe^{2+} disuelto a aproximadamente 3-3,5mM.

Se transfirieron 20 ml de medio con ion ferroso disuelto a botellas anaerobias estériles, que fueron gaseadas con N_2 . Se llevó a cabo el mismo procedimiento en otras botellas sin añadir hierro. Se inocularon con 1ml de *Shewanella* sp. T2.3D-1.1 en crecimiento exponencial crecida en ausencia de hierro. El experimento se llevó a cabo por triplicado y con controles negativos sin microorganismo. Las botellas se mantuvieron a 30°C, y la oxidación del hierro se midió a lo largo de 39 días.

2.5.1. Oxidación del hierro

La concentración total de hierro se monitorizó en duplicados siguiendo el método del α,α -bipiridilo (Escudero, 2018). Se mezclaron 10 μl de cultivo con 40 μl de hidrocloreto de hidroxilamina (10% en HCl 1M), el cual es un agente reductor, y con 100 μl de ácido sulfámico 40mM (en HCl 1M), que elimina el NO_2^- de la disolución (Schaedler *et al.*, 2017). Tras media hora, se añadieron 150 μl de acetato de amonio (28%) para neutralizar el pH y, transcurridos

5 minutos, 200µl de α,α-bipiridilo (0,5% en etanol absoluto). Se añadió agua miliQ estéril hasta alcanzar un volumen final de 2ml. Se midió la absorbancia a 520nm empleando un espectrofotómetro U-2000 (Hitachi, Japón). La concentración de ion ferroso se determinó sin añadir la solución de hidrocloreuro de hidroxilamina. La concentración de ion férrico se calculó como la diferencia entre el hierro total y el ion ferroso.

2.6. FISH y CARD-FISH

2.6.1. Optimización de las condiciones de hibridación de la sonda seleccionada

Para este trabajo, se seleccionó la sonda SPN3, específica para *Shewanella putrefaciens* (Tabla 4).

Para determinar la concentración óptima de formamida (FA) para los experimentos de FISH y CARD-FISH (Catalysed Reporter Deposition), se utilizó *Spongiibacter marinus* 5IX como microorganismo control, cuya secuencia presentaba un único *mismatch* respecto a la sonda en el lugar de hibridación. Se adquirió en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares del Instituto de Leibniz (Alemania) y se creció en las condiciones que se indican en la Tabla 3.

Los microorganismos se fijaron al 4% de formaldehído en PBS durante 2 horas a 4°C. Posteriormente se filtraron en membranas de 0,22µm (Millipore, Alemania). Los filtros se lavaron con PBS, etanol absoluto, y se dejaron secar al aire.

Las sondas se sintetizaron y se marcaron con el fluoróforo CY3 (Biomers, Alemania). La especificidad y las condiciones óptimas de restricción de la sonda se determinaron por FISH tal y como se describe en (Hugenholtz *et al.*, 2002), variando los valores de FA entre 0 y 70%, en experimentos por triplicado utilizando la sonda EUB338-I (ver Tabla 4) marcada con el fluoróforo FITC como control positivo.

Tabla 4. Lista de las sondas utilizadas en este estudio y su especificidad. Se indican el porcentaje de formamida (FA) y la concentración de NaCl óptimos para su uso.

Sonda	Secuencia (5'-3')	Especificidad	FA (%) / NaCl (mM)	Referencia
SPN3	CCGGTCCTTCTTCTGTAGGTAACGTACAG	<i>Shewanella putrefaciens</i>	60/14	(DiChristina y DeLong, 1993)
EUB338-I	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Bacterias	35/80	(Amann <i>et al.</i> , 1990)

2.6.2. CARD-FISH

Los experimentos se llevaron a cabo tal y como se describe detalladamente en (Pernthaler *et al.*, 2004) con pequeñas modificaciones, tales como la adición de los *helpers* indicados en la Tabla 5 a una concentración final de 2,5ng/µl. Estos fueron diseñados en base a la posición que se describe en el trabajo de (Fuchs *et al.*, 2000).

Tabla 5. Lista de los helpers que se emplearon en el experimento de CARD-FISH.

<i>Helper</i>	<i>Secuencia (5'-3')</i>
H455	GTAAGGTTTAATACGCCTT
H492	TAACTCCGTGCCAGCAGCC
H422	GGGTTGTAAAGCACTTTC
H440	AGTAGGGAGGAAAGG

Se inactivaron las peroxidasas endógenas siguiendo el procedimiento descrito en (Ishii *et al.*, 2004). Para la permeabilización de la pared celular de los microorganismos, las muestras se trataron con lisozima y acromopeptidasa. Las hibridaciones se llevaron a cabo con la sonda SNP3 marcada con HRP en el extremo 5' (Biomers, Ulm, Alemania) durante 2h a 46°C y después los filtros se lavaron a 48°C durante 10 minutos. La restricción se reguló ajustando el porcentaje de FA y la concentración de NaCl, indicados en la Tabla 4, en los buffers de hibridación y lavado, respectivamente. La reacción de amplificación se realizó a 46°C durante 45 minutos.

Finalmente, los filtros se tiñeron con Syto9 (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) tal y como recomienda el fabricante. Los filtros se cubrieron con una mezcla de proporción 1:4 de Vectashield (Vector Laboratories, EE.UU.): Citifluor (Citifluor, Reino Unido), y se montaron en portaobjetos.

2.6.3. Microscopía de fluorescencia y procesamiento de imágenes

Para comparar las intensidades de señal en la determinación de las condiciones óptimas de hibridación y para la toma de imágenes de CARD-FISH, se empleó un microscopio láser confocal LSM510 acoplado a un microscopio invertido AxioObserver (Carl Zeiss, Alemania) equipado con láseres de argón (488/514nm) y helio y neón (543 y 633nm). Las imágenes se tomaron empleando un objetivo de aceite de inmersión 63x/1,4.

Los ajustes de toma de imagen no variaron para el experimento de determinación de las condiciones óptimas de hibridación de la sonda SPN3, de forma que la comparación de las intensidades de señal fuera adecuada.

El procesamiento de las imágenes se llevó a cabo utilizando el software ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012).

Capítulo 3. Resultados y discusión

3.1. Genómica

3.1.1. Identificación del genoma y ensamblaje

El genoma de *Shewanella* sp. T2.3D-1.1 (Figura 1) fue secuenciado con una cobertura media de 73,37X. Esto indica que cada nucleótido del genoma fue leído aproximadamente 73 veces. Los datos de la secuenciación se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados de la secuenciación del genoma de *Shewanella* sp. T2.3D-1.1.

Característica	Datos de la secuenciación
Cobertura media	73,37X
Tamaño medio del inserto (pb)	537
Número de lecturas	763338

El ensamblaje del material genético perteneciente al cromosoma bacteriano tuvo como resultado un total de 49 *contigs*, alcanzando un tamaño total de 4,66 Mpb, con un N50 de 183411 pb y un contenido en G+C del 44,42%. Por otro lado, se identificó un plásmido putativo en el genoma, que se ensambló en 3 *contigs* y resultó tener una longitud de 23806 pb, un N50 de 18700 pb y 46,68% de contenido en G+C (Tabla 7).

Tabla 7. Características del genoma de *Shewanella* sp. T2.3D-1.1 tras la identificación de posibles plásmidos y su ensamblaje.

Característica	Cromosoma	Plásmido
Tamaño total (pb)	4660397	23806
Número de <i>contigs</i>	49	3
N50 (pb)	183411	18700
Contenido en G+C (%)	44,42	46,68
N's por 100kpb en <i>scaffolding</i>	0,09	0,00

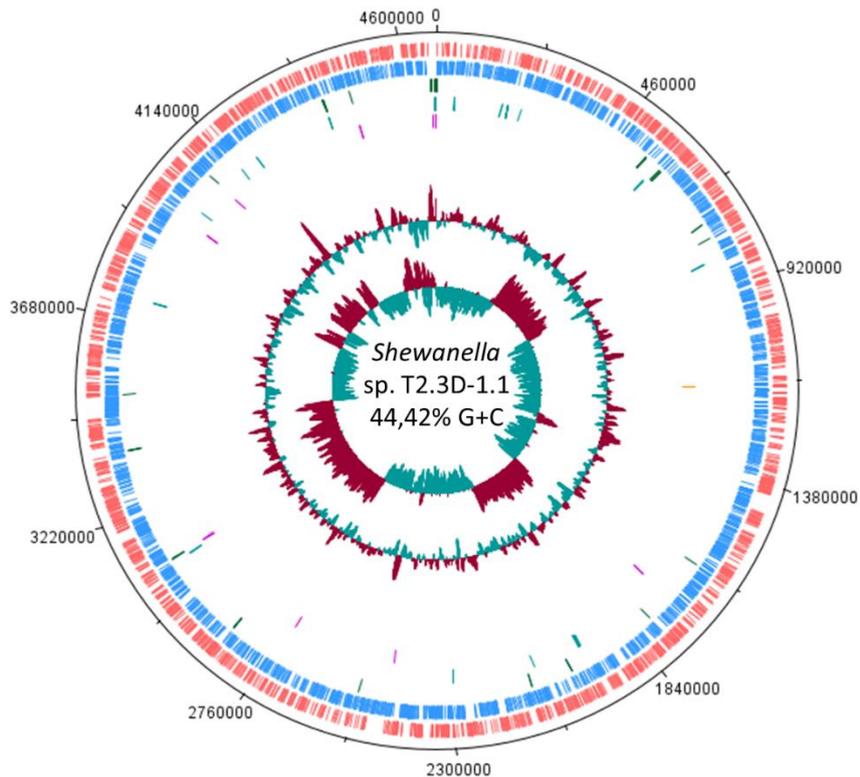


Figura 1. Representación gráfica del genoma circular de *Shewanella* sp. T2.3D-1.1. Los círculos desde fuera hacia dentro indican: 1. Regiones codificantes de proteínas en la secuencia sentido; 2. Regiones codificantes de proteínas en la secuencia antisentido; 3. Genes de ARNt en la secuencia sentido; 4. Genes de ARNt en la secuencia antisentido; 5. Genes de ARNr; 6. Genes de ARNm; 7. Contenido GC; 8. Desviación GC ((G-C)/(G+C)).

Los resultados del análisis taxonómico revelaron que la familia *Shewanellaceae* era la más frecuente para este genoma, con un 94,23% de lecturas coincidentes, el género más frecuente fue *Shewanella*, con un 94,23%, y la especie más frecuente, *Shewanella putrefaciens*, con un 53,17%. Este resultado sirvió para comprobar que el genoma secuenciado era el de *Shewanella* sp. T2.3D-1.1 y no hubo contaminaciones.

3.1.2. Anotación del genoma

La anotación del cromosoma realizada por el servidor RAST tuvo como resultado 4475 elementos, de los cuales 4355 eran genes codificantes de proteínas (PEGs), equivalentes a secuencias codificantes (CDS), y 120 ARNs. Además, el servidor ofrece una clasificación de las PEGs en distintas categorías en función del proceso metabólico en el que participan (Tabla 8). No obstante, solo un 34% de las PEGs pudieron ser clasificadas según este método. Cuando se analizó la anotación cromosómica utilizando Prokka, se identificaron 4068 CDS, un operón de ARNr (5S, 16S y 23S), 108 ARNt y un ARNm. Además, se encontraron regiones CRISPR.

En el caso del plásmido, se identificaron 22 elementos en RAST, siendo todos ellos CDS. De ellos, tan solo el 28% pudieron ser clasificados en categorías funcionales (Tabla 8). Prokka

detectó únicamente 20 CDS en este caso, pero ambas anotaciones coincidieron en la ausencia de ARNs.

Tabla 8. Distribución de las PEGs de la anotación de *Shewanella* sp. T2.3D-1.1 que pudieron ser clasificadas en distintas categorías funcionales relacionadas con distintos procesos metabólicos celulares por el servidor RAST. Se observan los datos de las anotaciones del cromosoma y del plásmido putativo encontrado.

Distribución de elementos en categorías				
Categorías funcionales	Genoma		Plásmido	
	Número de elementos	Porcentaje	Número de elementos	Porcentaje
Cofactores, vitaminas, grupos prostéticos, pigmentos	172	8,59%	-	-
Pared celular y cápsula	31	1,55%	-	-
Virulencia, enfermedad y defensa	128	6,39%	6	85,71%
Metabolismo del potasio	12	0,60%	-	-
Otros	9	0,45%	-	-
Fagos, profagos, elementos transponibles, plásmidos	6	0,30%	-	-
Transporte de membrana	140	6,99%	-	-
Adquisición y metabolismo de hierro	22	1,10%	-	-
Metabolismo de ARN	59	2,95%	-	-
Nucleósidos y nucleótidos	73	3,64%	-	-
Metabolismo proteico	202	10,08%	1	14,29%
Motilidad y quimiotaxis	115	5,74%	-	-
Regulación y señalización celular	40	2,00%	-	-
Metabolismo secundario	8	0,40%	-	-
Metabolismo de ADN	104	5,19%	-	-
Ácidos grasos, lípidos e isoprenoides	76	3,79%	-	-
Metabolismo del nitrógeno	25	1,25%	-	-
Dormancia y esporulación	3	0,15%	-	-
Respiración	113	5,64%	-	-
Respuesta a estrés	77	3,84%	-	-
Metabolismo de compuestos aromáticos	21	1,05%	-	-
Aminoácidos y derivados	312	15,58%	-	-
Metabolismo del azufre	25	1,25%	-	-
Metabolismo del fósforo	35	1,75%	-	-
Carbohidratos	195	9,74%	-	-
Total	2003	100%	7	100%

Los resultados obtenidos a partir de los dos sistemas de anotación se utilizaron para estudiar principalmente los procesos metabólicos de *Shewanella* sp. T2.3D-1.1 relacionados con los ciclos biogeoquímicos del nitrógeno, del hierro y del azufre, así como la existencia de genes

que codifican proteínas involucradas en procesos de respiración aerobia y anaerobia y en resistencia a metales pesados.

En relación con las rutas metabólicas involucradas en el ciclo del nitrógeno, se encontraron genes pertenecientes a diversos procesos. Los genes de la reacción de reducción de nitrato a nitrito fueron hallados en la anotación. El genoma contiene los genes codificantes del transportador de nitrato y nitrito NarK y el complejo NAR nitratorreductasa (Kuypers *et al.*, 2018). También fueron encontrados los genes que codifican las enzimas de la ruta completa de asimilación de amonio, incluyendo el transportador de este compuesto, la glutamina sintasa GS, la glutamato sintasa GOGAT y todos los genes necesarios para su correcta regulación (GlnD, GlnE, NRI, NRII, NtcA, IF7 e IF17) (Van Heeswijk *et al.*, 2013). En cuanto al proceso de desnitrificación, *Shewanella* T2.3D-1.1 parece presentar todos los genes que permitirían llevar a cabo una desnitrificación total hasta N₂, ya que encontramos los genes codificantes de la nitratorreductasa previamente mencionada, las nitritoreductasas Cu-NIR y cd₁-NIR, las reductasas de óxido nítrico cNOR y qNOR, así como el complejo HCP y la reductasa de óxido nitroso NOS (Kuypers *et al.*, 2018) (Figura 2). Todo ello parece indicar que este microorganismo tendría un papel relevante en el ciclo de este elemento en el subsuelo. Igualmente, se ha demostrado que *Shewanella putrefaciens* puede emplear el nitrato como aceptor de electrones, siendo el primer compuesto que reduce cuando se encuentra en condiciones anaerobias en presencia de otros posibles aceptores, como Mn(IV), tiosulfato o Fe(III) (DiChristina, 1992; Myers y Nealson, 1990). Esta bacteria es capaz de reducir el nitrato a nitrito y después este a óxido nítrico y nitroso (Krause y Nealson, 1997).

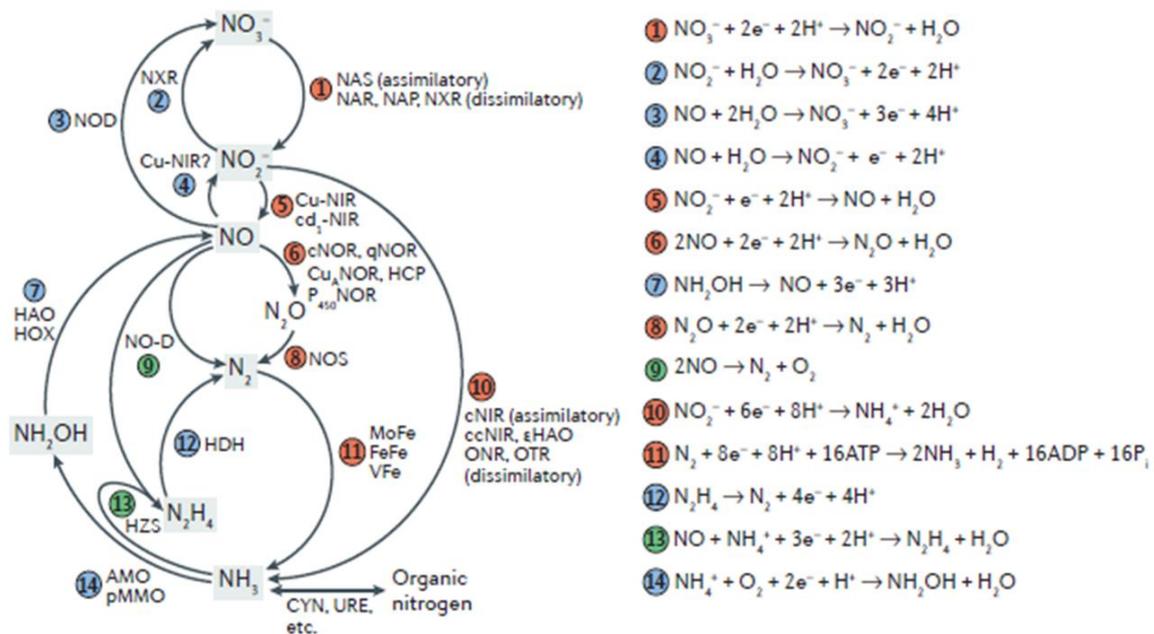


Figura 2. Transformaciones de compuestos nitrogenados identificados en distintos microorganismos. Kuypers *et al.*, 2018. Los microorganismos presentan enzimas capaces de llevar a cabo 14 reacciones redox que implican 8 especies de nitrógeno inorgánico con distinto estado de oxidación. Las reacciones en rojo implican reducción, las reacciones en azul implican oxidación y las reacciones en verde aquellas que implican conmutación o dismutación.

Con respecto al metabolismo del hierro, se han identificado en el genoma de la bacteria los genes codificantes de distintos transportadores de hierro y de proteínas implicadas en su regulación, como TonB, ExbB y ExbD y el regulador transcripcional Fur. Además, también se encontraron distintos genes involucrados en la biosíntesis de sideróforos, los cuales estarían regulados negativamente por la proteína Fur, que detecta Fe^{2+} en el interior celular (Visca *et al.*, 2002). El gen de una reductasa de ion férrico también se anotó en el genoma. Este dato es consistente con el hecho de que varias especies del género *Shewanella*, entre las que se encuentra *Shewanella putrefaciens*, tienen la capacidad de utilizar el Fe^{3+} como aceptor de electrones y reducirlo a Fe^{2+} en procesos de respiración anaerobia (Nealson y Scott, 2005; Nealson y Saffarini, 1994). Cabe destacar que no se encontraron genes relacionados con la oxidación de hierro. Hoy en día, aún no se han identificado si existen sistemas enzimáticos que sean capaces de oxidar hierro en condiciones anaerobias en organismos quimiotrofos (Carlson *et al.*, 2013)

Por último, se examinó su relación con el metabolismo de compuestos con azufre, donde es necesario hacer una distinción entre la ruta de reducción de sulfato asimilativa y desasimilativa (Figura 3). En el primer caso, el sulfato que se internaliza desde el exterior se reduce a sulfito, que después se transforma en sulfuro y se incorpora a la materia orgánica en forma de cisteína. En la ruta desasimilativa, el sulfato se utiliza en calidad de aceptor final de electrones para llevar a cabo una respiración anaerobia (Grein *et al.*, 2013). El genoma del aislado a estudiar en este trabajo contiene los genes que codifican las enzimas para llevar a cabo ambas rutas al completo. Sería interesante llevar a cabo un experimento de sulfatorreducción para comprobar esta hipótesis y confirmar que las enzimas mencionadas llevan a cabo su función. Además, se han encontrado reductasas de otros compuestos azufrados, como tetratiónato, tiosulfato y polisulfuros, los cuales tienen como resultado final la producción de H_2S , una característica del género *Shewanella* (Satomi, 2014).

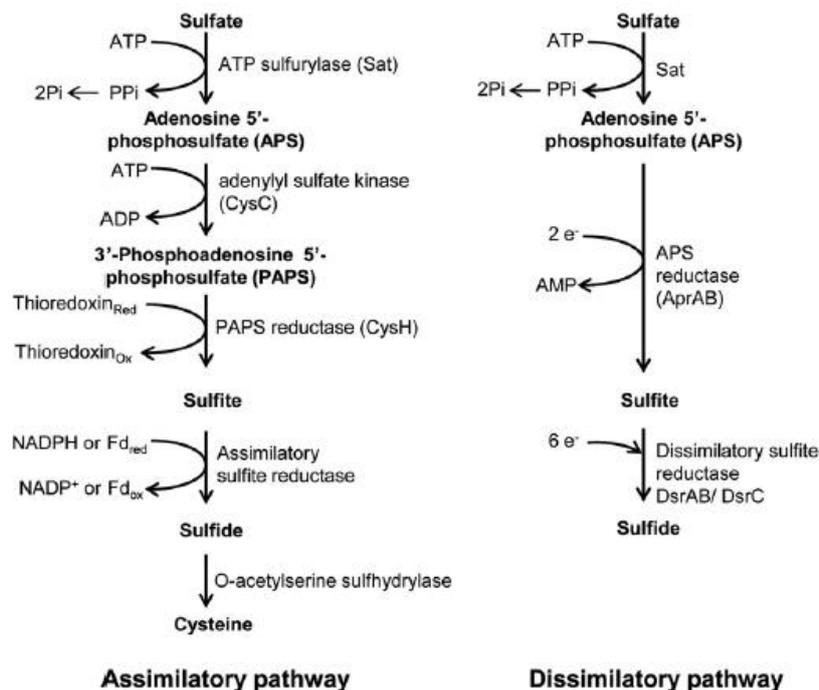


Figura 3. Rutas asimilativa y desasimilativa en la reducción de sulfato en organismos procariontas. Grein *et al.*, 2013.

Shewanella T2.3D-1.1 presenta también en su genoma genes que codifican otras reductasas distintas a las que se han mencionado previamente, las cuales sirven para utilizar como aceptor de electrones compuestos como DMSO o sulfito. Este resultado concuerda con el hecho de que este género bacteriano se caracteriza por su amplia diversidad respiratoria y su capacidad de adaptarse al ambiente en función de los distintos aceptores de electrones que encuentre (Nealson y Scott, 2005). Además, se encontraron los genes que codifican el sistema de dos componentes ArcA/ArcB (Anoxic Respiratory Control). Este sistema permite a bacterias anaerobias facultativas percibir distintas condiciones de aceptores de electrones y modificar su expresión génica acorde con ello, gracias a la detección del balance de oxidación de las quinonas de la cadena transportadora de electrones. De esta forma, se puede alternar entre respiraciones aerobias y anaerobias (Malpica *et al.*, 2004).

Por otro lado, se prestó atención a los genes que podrían estar involucrados en resistencia a compuestos tóxicos, y en concreto a metales pesados. Los mecanismos de defensa más habituales en microorganismos para tolerar este tipo de compuestos consisten en expulsarlos al exterior celular mediante transportadores de tipo RND, CDF y ATPasas de tipo P, secuestrarlos en el citosol o periplasma, y reducirlos (Nies, 1999; Haferburg y Kothe, 2007). En la anotación del genoma de esta bacteria se han encontrado genes codificantes de proteínas que actúan a esos niveles para generar resistencia a distintos metales. Para la homeostasis del cobre, *Shewanella* T2.3D-1.1 presenta genes de ATPasas tipo P, así como de proteínas de tolerancia CopC y CopD que efectúan un secuestro periplásmico del mismo y CopB que lleva a cabo un bombeo al exterior. Para el zinc, cadmio, níquel y cobalto, la tolerancia parece estar basada principalmente en proteínas de resistencia, como CzcA, CzcC o NccA, que transportan estos cationes fuera de la célula. En el caso del mercurio, este microorganismo presenta en su genoma el operón *mer* de resistencia a este metal, cuyas proteínas ejercen su detoxificación mediante la reducción del mismo (Nies, 1999). Por último, presenta un operón de resistencia a arsenato basado en su reducción por una arsenato reductasa y genes de proteínas de resistencia a cromato como ChrA y ChrB que lo bombean al exterior. Todas estas propiedades son muy interesantes debido a que el entorno del Río Tinto y la FPI presentan altas concentraciones de metales pesados, por lo que es un hecho remarcable en la caracterización del microorganismo aislado en este ambiente. La resistencia a algunos de estos compuestos se analiza más adelante con un ensayo específico.

3.2. Propiedades metabólicas

3.2.1. Resistencia a metales pesados

Tal y como se comentó en el apartado 1.2, el Río Tinto y la FPI son ambientes que presentan una gran concentración de metales pesados (Tornos, 2006; Amils *et al.*, 2014). Por este motivo, se consideró que determinar la tolerancia de *Shewanella* sp. T2.3D-1.1 a algunos de estos compuestos tenía relevancia en su caracterización microbiológica. Para seleccionar los metales a estudiar, se llevó a cabo una revisión bibliográfica (Nies, 1999; Kang y So, 2016) y se examinó el crecimiento en placa del aislado a distintas concentraciones de los iones. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Tolerancia de *Shewanella sp.* T2.3D-1.1 a diferentes metales pesados y diferentes concentraciones a lo largo del tiempo. El crecimiento se observó de forma cualitativa durante 4 semanas, anotando las variaciones de un día a otro. Escala: +++, como el control positivo; ++, buen crecimiento; +, crecimiento débil; +/-, crecimiento mínimo; -, sin crecimiento.

Metal pesado	Concentración (mM)	Días después de inocular			
		1	2	3	10+
Cd ²⁺	0,1	+++	+++	+++	+++
	0,5	+++	+++	+++	+++
	1	+	+	+	+
	5	-	-	-	-
	10	-	-	-	-
Cr ³⁺	0,1	+++	+++	+++	+++
	0,5	+++	+++	+++	+++
	1	+++	+++	+++	+++
	5	+	++	+++	+++
	10	-	-	-	-
Co ²⁺	0,1	+++	+++	+++	+++
	0,5	+++	+++	+++	+++
	1	+/-	+	++	++
	5	-	-	-	-
	10	-	-	-	-
Cu ²⁺	0,1	+++	+++	+++	+++
	0,5	+++	+++	+++	+++
	1	+++	+++	+++	+++
	5	+/-	+/-	+/-	+/-
	10	-	-	-	-
Fe ²⁺	0,1	+++	+++	+++	+++
	0,5	+++	+++	+++	+++
	1	+++	+++	+++	+++
	5	+++	+++	+++	+++
	10	++	++	++	++
Ni ²⁺	0,1	+++	+++	+++	+++
	0,5	+++	+++	+++	+++
	1	+++	+++	+++	+++
	5	-	-	-	-
	10	-	-	-	-
Zn ²⁺	0,1	+++	+++	+++	+++
	0,5	+++	+++	+++	+++
	1	+++	+++	+++	+++
	5	-	-	-	-
	10	-	-	-	-

En general, los resultados obtenidos no presentan grandes diferencias de aquellos observados en el trabajo de Nies en 1999 en *Escherichia coli*, los cuales se determinaron mediante un método similar. *Shewanella* sp. T2.3D-1.1 creció hasta una concentración máxima de 1mM en el caso del Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} , de la misma forma que lo hacía *E. coli* en el trabajo mencionado, con excepción del cadmio, en el cual lo hacía a 0,5mM. Cuando se creció en presencia de Cr^{3+} y Cu^{2+} , el aislado presentó tolerancia hasta valores de 5mM, superando en el caso del cobre a *E. coli*, que solo crece a 1mM. El ion ferroso no pareció presentar toxicidad para la cepa T2.3D-1.1 en las concentraciones que se analizaron, lo cual es consistente con el hecho de que el hierro tiene funciones biológicas muy relevantes y los microorganismos desarrollan formas de captarlo, ya que suelen tener avidez por él (Nies, 1999). Teóricamente, el cadmio y el cobre son los metales más tóxicos de todos los seleccionados, mientras que el cromo, cobalto, níquel y zinc presentan una toxicidad media y el hierro, baja. La toxicidad de los metales se debe principalmente a la unión a grupos sulfhidrilo, interfiriendo con la actividad de algunas enzimas, a la interferencia en la función de iones fisiológicos y oxoaniones no metálicos que son similares estructuralmente a los metales pesados y a la unión a glutatión que desencadena un aumento de estrés oxidativo en la célula (Nies, 1999; Haferburg y Kothe, 2007).

Por otra parte, en el trabajo realizado por Kang y So en 2016, se testó el rango de concentraciones de algunos de estos compuestos que toleraban distintas cepas de *Shewanella putrefaciens*. Todas ellas toleraban concentraciones que estaban en el rango de 0,3mM a 31mM. Esto concuerda con los datos obtenidos en este experimento y parece indicar que el aislado se encuentra en un término medio de tolerancia, habiendo cepas más y menos resistentes a altas concentraciones de metales que esta.

Todos estos resultados son coherentes con la anotación comentada previamente, demostrando de forma experimental que la bacteria es capaz de crecer en presencia de estos metales que pueden llegar a resultar tóxicos en algunos casos.

3.2.2. Reducción de nitrato

El proceso de desnitrificación por parte de microorganismos se ha descrito en estudios anteriores en el subsuelo profundo de la FPI. La ausencia de oxígeno en este tipo de ambientes obliga a los organismos allí presentes a utilizar un aceptor de electrones alternativo. La presencia de nitrato y de bacterias con la actividad microbiológica que lo reduce a lo largo de la columna del pozo BH10 indica que este compuesto podría ser de gran relevancia en la obtención de energía en este ecosistema (Escudero, 2018). Además, la reducción de nitrato y nitrito y la generación de especies reactivas de nitrógeno son de especial interés, ya que guardan relación con el proceso de oxidación de hierro dependiente de reducción de nitrato (NDFO), que se baraja como una de las posibles hipótesis del origen del Río Tinto, tal y como se comenta más adelante (Escudero, 2018).

Para comprobar de manera experimental que *Shewanella* sp. T2.3D-1.1 era capaz de llevar a cabo la reducción de nitrato y en qué medio era más eficiente, se utilizó un kit comercial (Sigma-Aldrich. EE.UU.) que determina de forma cualitativa la presencia de nitrato y nitrito en el medio de cultivo. La comparación de la eficiencia del microorganismo en ambos medios es de interés para conocer qué medio es más adecuado para determinar la NDFO

posteriormente. Esta prueba se basa en un ensayo colorimétrico que consiste en la adición de ácido sulfanílico y N,N-dimetil-1-naftilamina al medio de cultivo con nitrato en donde crece la cepa a estudiar. El ácido se une al nitrito en caso de que este se encuentre presente, y la naftilamina reacciona con este complejo formando un precipitado de color rojo. La ausencia de color indica que no hay nitritos presentes en la muestra, lo cual puede deberse a que no hay nitratorreducción o a que el nitrito se ha reducido completamente, siguiendo la ruta de la desnitrificación. Para poder distinguir entre ambas situaciones, se añade zinc a la muestra, que obliga el paso de nitrato a nitrito. Al volver a emplear los reactivos previamente mencionados, si aparece el tono rojizo, indica que la bacteria no había sido capaz de reducir el nitrato; mientras que, si la muestra permanece incolora, es un indicio de reducción de nitrito.

Se llevó a cabo este ensayo un día después de la inoculación del aislado en medio NB, que ya contiene nitrato, y LB, al que se le añadió a una concentración 10mM de este. El test indicó que en NB había presencia de nitrito, mientras que en LB la bacteria había reducido tanto el nitrato como el nitrito. Pasados 4 días, se volvió a realizar el ensayo y los resultados determinaron que se había producido la reducción de nitrato y nitrito en ambos medios. Además, el crecimiento bacteriano fue monitorizado y *Shewanella* sp. T2.3D-1.1 creció hasta alcanzar densidades ópticas más altas en el medio LB suplementado con nitrato. Que hubiera un mayor número de microorganismos en este medio podría ser la causa de que la reducción de nitrato y nitrito se realizasen en un período de tiempo más corto.

En relación con la anotación que se había realizado del genoma, parece que los genes codificantes de las enzimas de la ruta completa de la desnitrificación que se habían encontrado se traducen y las enzimas llevan a cabo su actividad. No obstante, con este test solo se puede observar de forma cualitativa la reducción de nitrato y nitrito, por lo que sería interesante llevar a cabo ensayos adicionales para estudiar cual es el producto final mayoritario de esta ruta en el caso de *Shewanella* sp. T2.3D-1.1.

3.2.3 Oxidación de hierro dependiente de reducción de nitrato

La oxidación de hierro dependiente de la reducción de nitrato (NDFO) es un proceso cuyo mecanismo bioquímico aún no se conoce en su totalidad. La teoría más aceptada es que la reducción de nitrato genera especies reactivas de nitrógeno, las cuales son fuertemente oxidantes, y son capaces de oxidar Fe^{2+} a Fe^{3+} (Weber *et al.*, 2006). Dado que resultados anteriormente discutidos en este trabajo indicaban que *Shewanella* sp. T2.3D-1.1 era una bacteria con capacidad de generar estas especies reactivas, se consideró de gran interés estudiar si era capaz de oxidar hierro cuando estaba en presencia de nitrato. Para ello, se eligió el medio LB, ya que, tal y como se comenta en el apartado 3.2.2, este fue el medio en el cual mostró una mayor velocidad de reducción de nitrato y nitrito.

Este proceso de oxidación de hierro fue descrito en 1996. Hasta entonces, la oxidación del hierro había quedado limitada a metabolismos aerobios o anaerobios fotosintéticos (Straub *et al.*, 1996; Weber *et al.*, 2006). A pesar de que este proceso ha sido conocido durante más de dos décadas, y aunque se ha demostrado su importancia en el ciclo del hierro a nivel global, se desconocen los mecanismos genéticos y bioquímicos que lo hacen posible, en caso de existir (Weber *et al.*, 2006; Carlson *et al.*, 2013). Los hechos de que este proceso no

siempre genere crecimiento bacteriano y de que no se hayan encontrado aún genes o proteínas relacionados con la oxidación enzimática del hierro en la NDFO, llevaron a pensar que tal vez no existía un beneficio energético de su oxidación (Carlson *et al.*, 2013). Esto supondría que este proceso se lleva a cabo de forma indirecta, mediante las especies reactivas de nitrógeno que se generan a partir de la reducción del nitrato y del nitrito, que son potentes oxidantes, y que la NDFO sería una capacidad innata de todas las bacterias nitratorreductoras. A pesar de todo, hoy en día aún no se sabe si este proceso podría producirse también de forma enzimática y, aunque aún no se han encontrado las enzimas que serían responsables, está en estudio (Klueglein *et al.*, 2015).

Los resultados se muestran en la Figura 4. Tras llevarse a cabo las mediciones de la concentración de los dos iones de hierro a lo largo de casi 40 días, se pudo demostrar que la presencia de esta bacteria en el medio con nitrato y Fe^{2+} es capaz de transformar este en Fe^{3+} . A pesar de que en el control sin inocular parece haber algo de oxidación, esta podría deberse a la introducción de oxígeno en las botellas anaerobias en las que se realizó el experimento durante su manipulación. Aun así, la diferencia entre el control sin inocular y el cultivo con microorganismos es significativa.

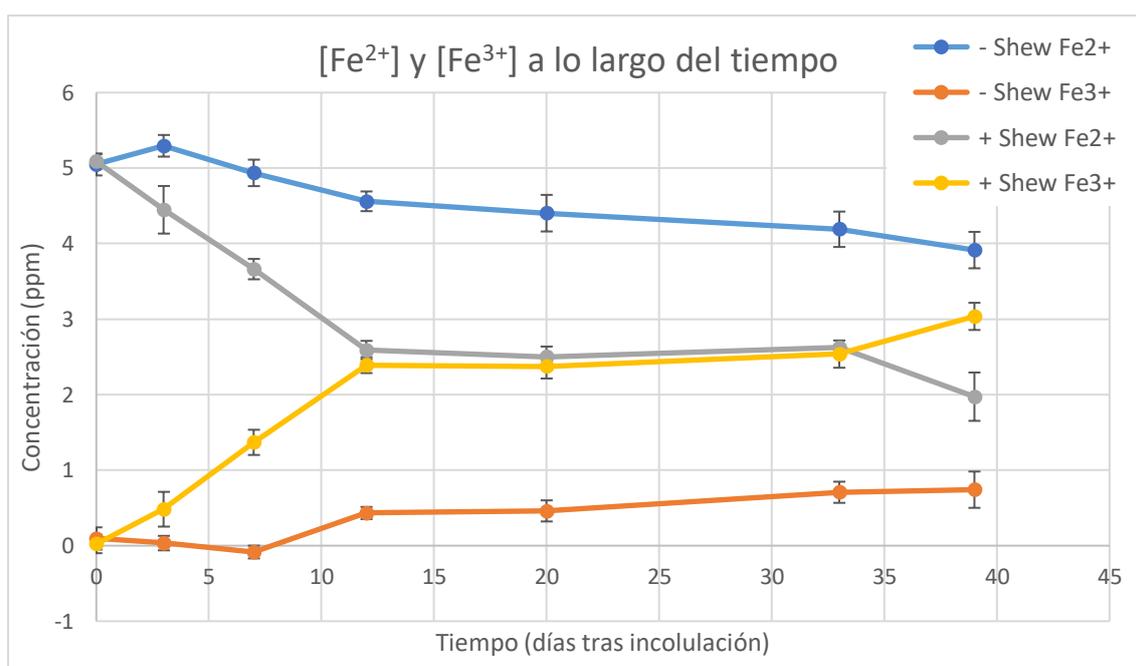


Figura 4. Concentración de los iones ferroso y férrico a lo largo del experimento de oxidación de hierro dependiente de reducción de nitrato. Se representan las concentraciones de ambos iones en los cultivos en ausencia y presencia del microorganismo a estudiar, *Shewanella* sp. T2.3D-1.1. Las barras de error representan el SEM (Standard Error Mean).

El origen subterráneo del Río Tinto implica la acción de microorganismos anaerobios oxidantes de hierro en el subsuelo de la FPI. La demostración de que distintos aislados del subsuelo que presentan características desnitrificantes son capaces de oxidar hierro de forma anaerobia abre una puerta de posibilidades para explicar el origen del río, tal y como se defiende en el trabajo de (Escudero, 2018). Todos los microorganismos reductores de

nitrito podrían estar involucrados en la disolución de sulfuros metálicos en el subsuelo de la FPI y, por lo tanto, en el origen del río y sus peculiares propiedades que lo caracterizan.

3.3. FISH y CARD-FISH

Para analizar la distribución del género *Shewanella* en el subsuelo de la FPI, se recurrió a la hibridación *in situ* fluorescente. Para confirmar la presencia de distintos microorganismos en el subsuelo, se utilizan distintas técnicas para que aumente la fiabilidad de los resultados al contrastar unos con otros. Por ello, se decidió llevar a cabo una hibridación *in situ* utilizando el método CARD-FISH, basado en la TSA (Tyramide Signal Amplification), que aumenta la señal y la sensibilidad de la técnica (Kubota, 2013). No obstante, el experimento no se pudo llevar a cabo en su totalidad por los problemas que se comentan a continuación.

3.3.1. Optimización de las condiciones de hibridación

La sonda que había sido seleccionada para emplearse en los ensayos de CARD-FISH (SPN3) había sido diseñada para un array con especificidad de *Shewanella putrefaciens* (DiChristina y DeLong, 1993). Dado que la sonda no fue diseñada para ser utilizada en ensayos de hibridación *in situ* fluorescente, se calcularon experimentalmente su porcentaje óptimo de FA y concentración de NaCl. La concentración de estos compuestos determina las condiciones de estringencia de la hibridación, es decir, la especificidad de la sonda. Para ello, se empleó el microorganismo *Spongiibacter marinus* 5IX como control. Este microorganismo presenta un único *mismatch* en la secuencia para la cual se diseñó la sonda (474-491 en el ARNr 16S de *E. coli*).

Se realizaron ensayos de FISH a diferentes concentraciones de FA, y se cuantificó la fluorescencia resultante de las muestras con el microorganismo control y con el aislado del IPBSL para determinar aquel en el cual se observase hibridación únicamente de *Shewanella* sp. T2.3D-1.1. Dicho porcentaje fue del 60%, y la concentración de NaCl correspondiente 14mM (Figura 5).

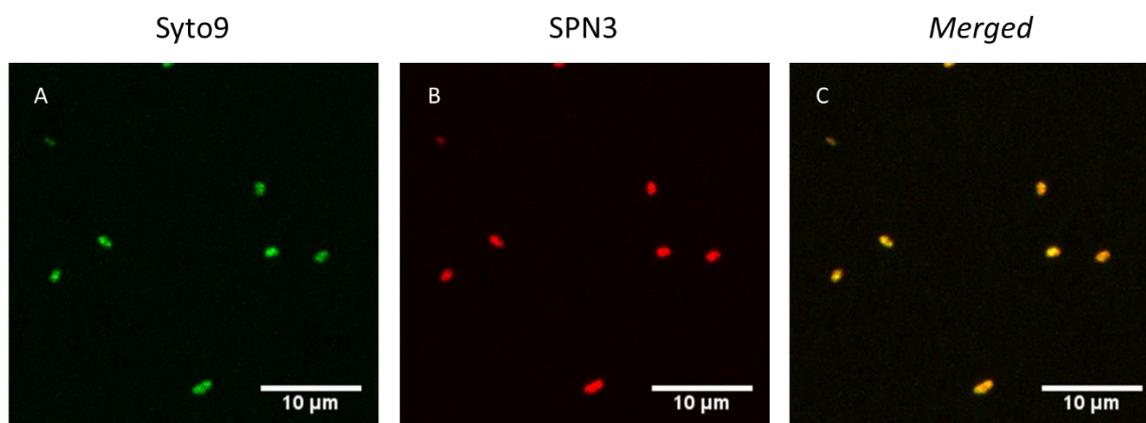


Figura 5. Detección de *Shewanella* sp. T2.3D-1.1 mediante FISH. A) En verde, la tinción de ADN Syto9. B) En rojo, la bacteria detectada con la sonda SPN3. C) Ambas imágenes superpuestas. Las barras de escala representan 10 μm.

3.3.2. CARD-FISH

El ensayo de CARD-FISH se lleva a cabo para poder detectar los microorganismos que hay en el subsuelo a pesar de que su contenido ribosómico sea inferior a aquellos que se encuentran en otro tipo de ambientes y cuyo estado metabólico es más activo. Esta técnica utiliza un sistema de amplificación que permite detectar células con un número mínimo de secuencias de ARNr 16S comprendido entre 30 y 60 aproximadamente (Hoshino *et al.*, 2008). La finalidad del estudio es detectar en qué profundidades del pozo BH10 se encuentra el microorganismo de interés. Se decidió verificar si la hibridación de la sonda SPN3 mediante CARD-FISH era viable, realizando un ensayo en cultivo puro de *Shewanella* sp. T2.3D-1.1 previo a su uso en muestras del subsuelo. Sin embargo, no se observó hibridación de la sonda, por lo que no se pudo llevar a cabo el estudio de la distribución de esta bacteria a lo largo de la columna del pozo BH10.

La técnica de hibridación *in situ* puede presentar limitaciones debido a la permeabilidad de la pared celular y a las diferencias de accesibilidad a la secuencia diana en el ARN ribosomal (Fuchs *et al.*, 2000). Para aumentar la permeabilidad celular en CARD-FISH, se utilizan lisozima, en el caso de la mayoría de las bacterias, y acromopeptidasa en el caso de las grampositivas (Kubota, 2013). Sin embargo, aunque se probó a permeabilizar el microorganismo con ambas enzimas, tampoco se observó hibridación. No obstante, el hecho de que el CARD-FISH con la sonda EUB338I sea positivo, indica que la falta de señal al emplear la sonda SPN3 no está relacionada con una baja permeabilidad de la pared celular del microorganismo.

La sonda SPN3 hibrida en la hélice 18 del ARNr 16S, una zona de baja accesibilidad del ribosoma (Fuchs *et al.*, 1998). Estos problemas de accesibilidad suelen estar ocasionados por interacciones que se producen entre las proteínas ribosomales y el ARN o el propio plegamiento del mismo, lo cual ocasiona una limitación en la hibridación de la sonda (Fuchs *et al.*, 2000). No obstante, Fuchs y colaboradores (2000) describieron el uso de *helpers*, oligonucleótidos que hibridan con secuencias del ARNr adyacentes a la diana, facilitando así la apertura de las hélices que se forman en el ARN y, por tanto, aumentando la accesibilidad de la sonda. Se diseñaron 4 *helpers* específicos para *Shewanella* sp. T2.3D-1.1 para aumentar la accesibilidad de la sonda a la hélice 18 del ARNr 16S, tal y como describen Fuchs y colaboradores (Tabla 5). A pesar de todo, no fue posible obtener un resultado positivo para este experimento, por lo que estamos considerando la posibilidad de que la falta de hibridación de la sonda de CARD-FISH se deba a algún error en su síntesis por parte de la casa comercial y actualmente nos estamos poniendo en contacto con ella para considerar el problema. El hecho de que la hibridación en el ensayo de FISH se realizase con éxito y que en CARD-FISH no llegase a funcionar también puede deberse a que las sondas son de tamaño distinto. En el CARD-FISH, el oligonucleótido se encuentra unido a la peroxidasa HRP (horseradish peroxidase), la cual tiene un tamaño de 5-6 nm y un peso molecular de 40kDa (Kubota, 2013). La presencia de esta gran molécula podría dificultar aún más la accesibilidad al ribosoma.

3.4. Perspectivas futuras

Todos los ensayos llevados a cabo en este trabajo conforman únicamente un estudio preliminar en lo relativo a la caracterización de *Shewanella* sp. T2.3D-1.1 y su posible implicación en el origen del Río Tinto.

En relación con el análisis y anotación del genoma, se debería llevar a cabo un estudio exhaustivo de los genes que presenta esta bacteria para poder aumentar el conocimiento sobre sus características metabólicas y fisiológicas que resulten de interés, que podrían esclarecer el papel ecológico de este aislado en el subsuelo de la FPI. También podrían llevarse a cabo estudios complementarios sobre los compuestos que puede emplear realmente esta bacteria como aceptores de electrones y la preferencia de esta por unos u otros, para así determinar su diversidad respiratoria.

Con respecto a la oxidación de hierro dependiente de la reducción de nitrato, sería conveniente realizar medidas de la concentración de Fe^{2+} y Fe^{3+} durante el tiempo necesario para que estas se estabilicen. Relacionándolas con el número de microorganismos, se podría obtener la tasa de oxidación. Además, se podría llevar a cabo un experimento en el que se midiese la oxidación de la pirita en presencia de la bacteria, el cual podría indicarnos si esta bacteria es capaz de disolver este mineral de forma indirecta mediante la generación de ion férrico a partir de la reducción de nitrato. Un dato que sería interesante de obtener sería el de la concentración de nitrato, nitrito y el resto de especies reactivas de nitrógeno a lo largo de los experimentos, que además esclarecería cual es el compuesto mayoritario que se genera en la desnitrificación que lleva a cabo *Shewanella* sp. T2.3D-1.1. Además, para poder indagar en si esta bacteria lleva a cabo la oxidación del ion ferroso de forma indirecta únicamente, o si también lo puede hacer de forma directa mediante un proceso enzimático, ensayos diferenciales de transcriptómica y proteómica podrían realizarse comparando la expresión cuando la bacteria se encuentra en las condiciones para llevar a cabo la NDFO frente a cuando esto no sucede.

Por último, en relación con el estudio de la distribución de este microorganismo en el subsuelo de la FPI, sería conveniente solucionar los problemas para llevar a cabo los experimentos de CARD-FISH, volviendo a sintetizar la sonda SPN3 o diseñando una nueva sonda en una zona del ARNr 16S que no presente tantos problemas de accesibilidad.

Capítulo 4. Conclusiones

El principal objetivo de este trabajo ha sido la caracterización microbiológica de *Shewanella* sp. T2.3D-1.1, aislada del subsuelo de la FPI, y el estudio de su posible papel en el origen del Río Tinto. Para ampliar el conocimiento en estos temas, se llevaron a cabo estudios bioinformáticos, experimentos de caracterización fisiológica y ensayos de hibridación *in situ* fluorescente. Las conclusiones que se obtuvieron fueron las siguientes:

1. El análisis genómico, junto con el ensayo de resistencia a metales, indican que *Shewanella* sp. T2.3D-1.1 presenta las características necesarias para sobrevivir en las condiciones del subsuelo de la FPI. Su enorme diversidad respiratoria y su tolerancia a metales pesados son propiedades que le confieren ventaja respecto a otros microorganismos para competir en ese ambiente. Además, parece presentar un importante papel en los ciclos biogeoquímicos del nitrógeno y del hierro que tienen lugar en el subsuelo.
2. Esta bacteria es capaz de reducir nitrato y nitrito en condiciones anaerobias. Además, cuando se encuentra en condiciones anaerobias en presencia de nitrato y de ion ferroso, es capaz de llevar a cabo una oxidación de hierro dependiente de reducción de nitrato. Este hecho apoya la teoría de que todos los microorganismos reductores de nitrato podrían estar involucrados en la disolución de sulfuros metálicos en el subsuelo de la FPI y, por lo tanto, en el origen del Río Tinto y de sus características (Escudero, 2018).
3. A pesar de todos los intentos, no se ha conseguido determinar la distribución del género *Shewanella* a lo largo de la columna del pozo BH10 del proyecto IPBSL. Esto se debe probablemente a problemas de accesibilidad al ribosoma o a una síntesis incorrecta de la sonda, lo cual se está tratando de solucionar actualmente.

Capítulo 5. Bibliografía

Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R. y Stahl, D.A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and environmental microbiology* **56**: pp. 1919-1925.

Amils, R., González-Toril, E., Fernández-Remolar, D., Gómez, F., Rodríguez, N. y Durán, C. (2002). Interaction of the sulfur and iron cycles in the Tinto River ecosystem. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **1**: pp. 299-309.

Amils, R., Fernández-Remolar, D., Parro, V., Rodríguez-Manfredi, J.A., Timmis, K., Oggerin, M. et al. (2013). Iberian Pyrite Belt Subsurface Life (IPBSL), a drilling project of biohydrometallurgical interest. *In Advanced Materials Research: Trans Tech Publ*: pp. 15-18.

Amils, R., Fernández-Remolar, D., y Equipo IPBSL (2014). Río Tinto: a geochemical and mineralogical terrestrial analogue of Mars. *Life*, **4(3)**: pp. 511-534.

Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>

Aziz, R.K., Bartels, D, Best, AA. et al. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* **9**: p. 75.

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V., Nikolenko, S., Pham, S., Prjibelski, A., Pyshkin, A., Sirotkin, A., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A. y Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*.

Boetzer, M., Henkel, C.V., Jansen, H.J., Butler, D. y Pirovano, W. (2011). Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. *Bioinformatics* **27 (4)**: pp. 578–579. Published online 2010 Dec 12.

Bolger, A. M., Lohse, M. y Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, **30 (15)**: pp. 2114-2120.

Carlson, H.K., Clark, I.C., Blazewicz, S.J., Iavarone, A.T. y Coates, J.D. (2013). Fe (II) oxidation is an innate capability of nitrate-reducing bacteria that involves abiotic and biotic reactions. *Journal of bacteriology* **195**: pp. 3260-3268.

Carver, T., Thomson, N., Bleasby, A., Berriman, M. y Parkhill, J. (2009). DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics* **25(1)**: pp. 119-120.

D'Hondt, S., Rutherford, S. y Spivack, A.J. (2002). Metabolic activity of subsurface life in deep-sea sediments. *Science* **295**: pp. 2067–2070.

Davis Jr, R., Welty, A., Borrego, J., Morales, J., Pendon, J. y Ryan, J.G. (2000), Rio Tinto estuary (Spain): 5000 years of pollution. *Environmental Geology* **39**: pp. 1107-1116.

DiChristina, T. J. (1992). Effects of nitrate and nitrite on dissimilatory iron reduction in *Shewanella putrefaciens* 200. *J. Bacteriol.* **174**: pp. 1891-1896.

DiChristina, T.J. y DeLong, E.F. (1993). Design and application of rRNA-targeted oligonucleotide probes for the dissimilatory iron- and manganese-reducing bacterium *Shewanella putrefaciens*. *Applied and environmental microbiology* **59(12)**: pp. 4152–4160.

Escudero, C. (2018). Fluorescence microscopy for the *in situ* study of the Iberian Pyrite Belt subsurface geomicrobiology. *Dissertation Thesis*, UAM.

Essalhi, M., Sizaret, S., Barbanson, L., Chen, Y., Lagroix, F., Demory, F. et al. (2011). A case study of the internal structures of gossans and weathering processes in the Iberian Pyrite Belt using magnetic fabrics and paleomagnetic dating. *Mineralium Deposita* **46**: pp. 981-999.

Fernández-Remolar, D.C., Rodríguez, N., Gómez, F. y Amils, R. (2003). Geological record of an acidic environment driven by iron hydrochemistry: The Tinto River system. *Journal of Geophysical Research: Planets* **108**.

Fernández-Remolar, D.C., Morris, R.V., Gruener, J.E., Amils, R. y Knoll, A.H. (2005). The Río Tinto Basin, Spain: mineralogy, sedimentary geobiology, and implications for interpretation of outcrop rocks at Meridiani Planum, Mars. *Earth and Planetary Science Letters* **240**: pp. 149-167.

Fernández-Remolar, D.C., Gómez, F., Prieto-Ballesteros, O., Schelble, R.T., Rodríguez, N., y Amils, R. (2008a). Some ecological mechanisms to generate habitability in planetary subsurface areas

by chemolithotrophic communities: The Río Tinto subsurface ecosystem as a model system. *Astrobiology* **8**: pp. 157-173.

Fernández-Remolar, D.C., Prieto-Ballesteros, O., Rodríguez, N., Gómez, F., Amils, R., Gómez-Elvira, J. y Stoker, C.R. (2008b) Underground habitats in the Río Tinto basin: a model for subsurface life habitats on Mars. *Astrobiology* **8**: pp. 1023-1047.

Fredrickson, J.K. y Balkwill, D.L. (2006) Geomicrobial processes and biodiversity in the deep terrestrial subsurface. *Geomicrobiology Journal* **23**: pp. 345-356.

Fuchs, B. M., G. Wallner, W. Beisker, I. Schwippl, W. Ludwig y R. Amann. (1998). Flow cytometric analysis of the *in situ* accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol* **64**: pp. 4973–4982.

Fuchs, B.M., Glöckner, F.O., Wulf, J. y Amann, R. (2000). Unlabeled helper oligonucleotides increase the *in situ* accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol.* **66(8)**: pp. 3603–3607.

Grein, F., Ramos, A. R., Venceslau, S. y Pereira, I. A. C. (2013). Unifying concepts in anaerobic respiration: Insights from dissimilatory sulfur metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* **1827**: pp. 145–160.

Haferburg, G. y Kothe, E. (2007). Microbes and metals: Interactions in the environment. *Journal of Basic Microbiology* **47(6)**: pp. 453–467.

Hau, H. H. y Gralnick, J. A. (2007). Ecology and Biotechnology of the Genus *Shewanella*. *Annual Review of Microbiology* **61(1)**:pp. 237–258.

Hoehler, T.M. (2004). Biological energy requirements as quantitative boundary conditions for life in the subsurface. *Geobiology* **2**: pp. 205–215.

Hoshino, T., Yilmaz, L. S., Noguera, D. R., Daims, H. y Wagner, M. (2008). Quantification of target molecules needed to detect microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition-FISH. *Applied and environmental microbiology*, **74(16)**: pp. 5068–5077.

Hugenholtz, P., Tyson, G.W. y Blackall, L.L. (2002). Design and evaluation of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for fluorescence *in situ* hybridization. *Gene Probes: Principles and Protocols*: pp. 29-42.

Ishii, K., Musmann, M., MacGregor, B.J. y Amann, R. (2004). An improved fluorescence *in situ* hybridization protocol for the identification of bacteria and archaea in marine sediments. *FEMS Microbiol Ecol* **50**: pp. 203-213.

Jang, G. I., Hwang, C. Y., Choi, H. G., Kang, S. H. y Cho, B. C. (2011). Description of *Spongiibacter borealis* sp. nov., isolated from Arctic seawater, and reclassification of *Melitea salexigens* as a later heterotypic synonym of *Spongiibacter marinus* emended descriptions of the genus *Spongiibacter* and *Spongiibacter marinus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **61(12)**: pp. 2895-2900.

Jones, A.A. y Bennett, P.C. (2017). Mineral ecology: surface specific colonization and geochemical drivers of biofilm accumulation, composition, and phylogeny. *Front Microbiol* **8**.

Kang, C. H. y So, J. S. (2016). Antibiotic and heavy metal resistance in *Shewanella putrefaciens* strains isolated from shellfishes collected from West Sea, Korea. *Marine Pollution Bulletin* **112(1-2)**: pp. 111-116.

Kieft, T.L. (2016). Microbiology of the Deep Continental Biosphere. *In Their World: A Diversity of Microbial Environments: Springer*, pp. 225-249.

Klueglein, N., Picardal, F., Zedda, M., Zwiener, C. y Kappler, A. (2015). Oxidation of Fe (II)-EDTA by nitrite and by two nitrate-reducing Fe (II)-oxidizing *Acidovorax* strains. *Geobiology* **13**: pp. 198-207.

Krause, B. y Nealson, K. H. (1997). Physiology and Enzymology involved in denitrification by *Shewanella putrefaciens*. *Applied and Environmental Microbiology* **63(7)**: pp. 2613-2618.

Kubota, K. (2013) CARD-FISH for environmental microorganisms: technical advancement and future applications. *Microbes and environments* **28**: pp. 3-12.

Kuypers, M. M., Marchant, H. K. y Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology* **16**: p. 263.

Leandro, T. (2018). Microbial diversity and anaerobic metabolisms in the subsurface of the Iberian Pyritic Belt. *Dissertation Thesis*, Universidade de Coimbra.

Malpica, R., Franco, B., Rodriguez, C., Kwon, O. y Georgellis, D. (2004). Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101(36)**: pp. 13318–13323.

Morita RY (1999) Is H₂ the universal energy source for long-term survival? *Microb Ecol* **38**: pp. 307–320.

Moser, D. y K. Nealson. (1996). Growth of the facultative anaerobe *Shewanella putrefaciens* by elemental sulfur reduction. *Appl. Environ. Microbiol* **62**: pp. 2100–2105.

Myers, C. R. y K. H. Nealson. (1990). Respiration-linked proton translocation coupled to anaerobic reduction of manganese(IV) and iron(III) in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J. Bacteriol* **172**: pp. 6232–6238.

Nadalin, F., Vezzi, F. y Policriti, A. (2012). GapFiller: a de novo assembly approach to fill the gap within paired reads. *BMC Bioinformatics* 13 Suppl 14 (Suppl 14): S8.

Nealson, K. y Saffarini, D. (1994). Iron and manganese in anaerobic respiration: environmental significance, physiology, and regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: pp. 311–343.

Nealson, K.H., Inagaki, F. y Takai, K. (2005). Hydrogen-driven subsurface lithoautotrophic microbial ecosystems (SLIMES): do they exist and why should we care? *Trends Microbiol* **13**: pp. 405–410

Nealson, K.H. y Scott, J. (2005). Ecophysiology of the genus *Shewanella*. In *The Prokaryotes*, ed. M Dworkin. New York: *Springer-Verlag*.

Nies, D.H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol, Springer-Verlag* **51**: pp. 730-750.

Pernthaler, A., Pernthaler, J. y Amann, R. (2004). Sensitive multi-color fluorescence *in situ* hybridization for the identification of environmental microorganisms. In *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kowalchuk, G.e.a. (ed). Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 711–726.

Phelps, T., Murphy, E., Pfiffner, S. y White, D. (1994). Comparison between geochemical and biological estimates of subsurface microbial activities. *Microb Ecol* **28**: pp. 335–349.

Rempfert, K.R., Miller, H.M., Bompard, N., Nothaft, D., Matter, J.M., Kelemen, P., Fierer, N. y Templeton, A.S. (2017). Geological and geochemical controls on subsurface microbial life in the Samail Ophiolite, Oman. *Front Microbiol* **8**.

Røy, H., Kallmeyer, J., Adhikari, R.R., Pockalny, R., Jørgensen, B.B. y D'Hondt, S. (2012). Aerobic microbial respiration in 86-million-year-old deep-sea red clay. *Science* **336**: pp. 922–925

Satomi, M. (2014). The Family *Shewanellaceae*. *The Prokaryotes – Gammaproteobacteria*, Springer-Verlag **31**: pp. 597-625

Schaedler, F., Kappler, A. y Schmidt, C. (2017) A revised iron extraction protocol for environmental samples rich in nitrite and carbonate. *Geomicrobiology Journal* pp. 1-8.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ..., Tinevez, J.Y. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, **9(7)**: p. 676.

Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* **30(14)**: pp. 2068–2069.

Stevens, T.O. y McKinley, J.P. (1995). Lithoautotrophic microbial ecosystems in deep basalt aquifers. *Science* **270**: p. 450.

Straub, K. L., Benz, M., Schink, B. y Widdel, F. (1996). Anaerobic, nitrate-dependent microbial oxidation of ferrous iron **62(4)**: pp. 1458–1460.

Tornos, F. (2006). Environment of formation and styles of volcanogenic massive sulfides: the Iberian Pyrite Belt. *Ore Geology Reviews* **28**: pp. 259-307.

Van Heeswijk W.C., Westerhoff H.V. y Boogerd F.C. (2013). Nitrogen assimilation in *Escherichia coli*: putting molecular data into a systems perspective. *Microbiology and molecular biology reviews* **77**: pp. 628-695.

Vera, M., Schippers, A. y Sand, W. (2013). Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation - part A. *Applied microbiology and biotechnology* **97**: pp. 7529-7541.

Visca, P., Leoni, L., Wilson, M. J. y Lamont, I. L. (2002). Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Molecular Microbiology* **45**: pp. 1177-1190.

Vreeland, R.H., Piselli Jr., A.F., McDonnough, S. y Meyers, S. (1998). Distribution and diversity of halophilic bacteria in a subsurface salt formation. *Extremophiles* **2**: pp. 321-331.

Weber, K.A., Achenbach, L.A. y Coates, J.D. (2006). Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology* **4**: pp. 752.

Wilson, K. (2001). Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current protocols in molecular biology* **56(1)**: pp. 2-4.

Wood, D. y Salzberg, S. (2014). Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome biology* **15(3)**: R46.

