

ARTÍCULO ORIGINAL

La biodiversidad microbiana como fuente de productos de interés biotecnológico**Origin of pharmaceutical care in Spain: The Congress of Pharmaceutical Sciences de Alcalá de Henares, 1995****Nahid Oueriaghli, Fernando Martínez-Checa, Emilia Quesada y Victoria Béjar.**

Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Campus Universitario de Cartuja s/n. 18071. Granada.

España

Nihal_nourchams@hotmail.com

RESUMEN

Introducción

La diversidad microbiana es una fuente importante de productos de interés biotecnológico, tales como antibióticos, enzimas o Polímeros^{11,12}. Actualmente la biodiversidad está viéndose seriamente afectada por la contaminación y por la intervención del hombre en la naturaleza. La pérdida de microorganismos no solo alterará los ecosistemas sino que supondrá la desaparición de productos de interés biotecnológico. La biodiversidad microbiana permanece aún inexplorada porque con los métodos clásicos de cultivo microbiano sólo aislamos en el laboratorio entre el 0,1 y el 10% de los microorganismos presentes en determinado ecosistema. En cambio la aplicación de herramientas moleculares permite estudiar la diversidad, estructura y la dinámica de comunidades microbianas de diferentes y complejos ambientes, así como detectar la presencia de microorganismos con interés para la industria farmacéutica y la agricultura, entre otras áreas.

Objetivo

Analizar y estudiar la diversidad microbiana mediante técnicas moleculares, tanto en ambientes libres de contaminación como es el Parque natural Rambla Salada (Murcia), como en otros hábitats contaminados por las actividades humanas (suelos agrícolas de Motril, Granada).

Metodología

El estudio de la diversidad microbiana requirió la puesta a punto de una estrategia molecular basada en la amplificación por PCR del gen ribosomal 16S rRNA, a partir del DNA total extraído directamente de las muestras. Posteriormente, se desarrolló la electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE)¹ para la separación de los fragmentos del gen ribosomal 16S ya amplificados, y finalmente se procedió a la secuenciación y comparación de las secuencias obtenidas a partir de los patrones del DGGE con las existentes en las bases de datos.

Por otro lado se desarrolló la técnica de hibridación *in situ*⁷ empleando sondas fluorescentes; estas últimas fueron diseñadas para detectar la presencia de microorganismos pertenecientes a los dominios de procariontes *Bacteria* y *Arquea*.

Discusión y conclusión

Mediante las herramientas moleculares hemos detectado la presencia de arqueas y bacterias no halófilas, halófilas y halotolerantes tanto en todas las zonas analizadas de Rambla Salada como algunas muestras de los suelos agrícolas de Motril. La diversidad microbiana de los suelos agrícolas de Motril es inferior a la de Rambla Salada. Se ha puesto de manifiesto la existencia de una gran diversidad microbiana en Rambla Salada compuesta fundamentalmente por procariontes pertenecientes a los phyla *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteria* cuyos miembros no se aíslan en el laboratorio mediante las técnicas de cultivo empleadas hasta el momento. La presencia de una mayor diversidad microbiana en Rambla Salada indica que los hábitats hipersalinos son una fuente potencial de productos de interés farmacéutico.

PALABRAS CLAVE: Biodiversidad microbiana.

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

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

Ars Pharm 2010; 51.Suplemento 3: 525-539.

ABSTRACT

Microbial diversity is an important source of products that have potential biotechnological applications, such as antibiotics, enzymes or polymers [1, 2]. The biodiversity is seriously affected by pollution and human impact on natural environments. In this sense, reduction of biodiversity not only alters the ecosystems but also will entail the disappearance of products having biotechnological interest. Microbial biodiversity is not enough known because we have only been able so far to culture between 0.1 and 10% of the microorganisms that exist in nature. Nevertheless, molecular ecology techniques represent an opportunity to study the diversity, structure and dynamics of these uncultured microorganisms, both in diverse and complex environments. They also are useful tools to detect microorganisms that are of interest to pharmaceutical industry and agriculture, among other areas. Therefore, the main objective of this work has been to analyse the microbial diversity in different environments using molecular methods. The habitats studied were an hypersaline soil located at Rambla Salada (Murcia), and some agricultural soils from Motril (Granada). We used PCR/DGGE to investigate the microbial diversity; this method is based on the amplification of partial 16S rRNA gene using the total DNA extracted directly from the sample. Subsequently denaturant gradient gel electrophoresis (DGGE) [3] is developed to separate the amplified fragments of the 16S rRNA gene. Finally the sequences obtained from the DGGE patterns are compared to those available at the database. On the other hand, we used fluorescence in situ hybridization or FISH [4] to detect and quantify microorganisms belonging to the Domain Bacteria and Archaea. According to our results, non halophilic, halophilic, and halotolerant Archaea and Bacteria were present in all the areas analyzed at Rambla Salada, as well as in some samples of the agricultural soils in Motril. Microbial diversity found in the agricultural soils in Motril was lower than in Rambla Salada. Microbial community at Rambla Salada was composed of Prokaryotes belonging to the phyla Bacteroidetes, Cyanobacteria, Proteobacteria, Firmicutes and Actinobacteria, which cannot not so far isolated using methods based on traditional culture techniques.

KEYWORDS: Microbial Biodiversity

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la diversidad microbiana es fundamental para comprender el papel de los microorganismos en los diferentes procesos que se llevan a cabo en nuestro planeta. Asimismo es también importante para el desarrollo de la biotecnología. Los diferentes nichos microbianos han sido fuente de moléculas y organismos cultivables con aplicaciones industriales en diversos campos. Entre las moléculas de mayor interés biotecnológico tenemos que mencionar los antibióticos, las enzimas y los polímeros.

Los conocimientos de la diversidad microbiana y su papel en el mundo vivo son muy limitados. Se ha demostrado que con técnicas microbiológicas clásicas sólo se aísla en el laboratorio entre el 0,1 y el 10% de los microorganismos presentes en un ecosistema^{1,2}. Esto se debe, en gran parte, a la falta de conocimientos sobre las condiciones bajo las cuales los microorganismos prosperan en su ambiente natural.

Existe, por tanto, una gran cantidad de información que pertenece a la porción no cultivable de microorganismos y que posiblemente tiene un gran potencial de aplicaciones biotecnológicas. La diversidad microbiana conocida es sólo la punta del iceberg. En las últimas dos décadas se ha introducido nuevas técnicas³ como complemento a los métodos microbiológicos tradicionales con la finalidad de obtener un mejor conocimiento sobre la diversidad microbiana y el funcionamiento de los ecosistemas.

Los suelos salinos son un ecosistema prácticamente inexplorado con un máximo

interés biotecnológico. Se ha demostrado que las diferentes prácticas agrícolas, la fertilización y los tratamientos con plaguicidas y herbicidas condicionan la diversidad de las comunidades microbianas en suelos agrícolas. (Actualmente la biodiversidad está viéndose seriamente afectada por la contaminación y por la intervención del hombre en la naturaleza. La pérdida de microorganismos no sólo alterará los ecosistemas sino que supondrá la desaparición de productos de interés biotecnológico. El presente trabajo de investigación estudia, a partir de la aplicación de técnicas moleculares, la comunidad microbiana existente tanto en suelos hipersalinos libres de contaminación como en otros hábitats modificados por la actividad humana.

OBJETIVO

Analizar y estudiar la diversidad microbiana existente en suelos del Parque Natural de Rambla Salada (Murcia) y en suelos agrícolas de Motril (Granada). Para alcanzar este objetivo general, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- 1) Estudiar la población procariota total mediante el empleo de la técnica de electroforesis en gel con gradiente químico desnaturalizante o DGGE⁴.
- 2) Analizar *in situ* la presencia de microorganismos en los suelos seleccionados utilizando una técnica hibridación *in situ* (CARD-FISH).
- 3) Cuantificar mediante técnicas de cultivo clásicas la población microbiana cultivable.

METODOLOGÍA

1. Muestras.

Se estudiaron 19 muestras, 7 correspondientes al Parque Natural de Rambla Salada y 12 correspondientes a suelos de plantaciones agrícolas situadas en el término municipal de Motril (Granada).

2. Extracción del DNA genómico.

La extracción del DNA genómico tuvo lugar usando el kit PowerMax™ Soil (MOBIO LABORATORIES) a partir de 10g de muestras de suelo.

3. Amplificación del DNA mediante PCR.

Las muestras de DNA se sometieron a una reacción de PCR para amplificar fragmentos de aproximadamente unos 500pb del gen ribosomal RNA 16S, concretamente la región hipervariable V1-V3 de dicho gen. Para ello, se ha empleado la pareja de cebadores

Bact8F y Bact518R para las bacterias y los cebadores Arq915R y Arq344F para las arqueas. Para llevar a cabo la amplificación del gen ribosomal RNA 16S se utilizó el programa conocido como “touch-down”⁵.

4. Separación de las muestras mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE).

La electroforesis en gel con gradiente de desnaturización se realizó empleando el sistema DCode™ Universal Mutation Detection System de BioRad. Para la separación de los distintos fragmentos, se emplearon geles desnaturizantes de poliacrilamida al 8% (p/v), urea y formamida. El gradiente utilizado fue del 45% al 60%⁶.

5. Secuenciación de los fragmentos de DNA y análisis informático de las secuencias.

La secuenciación de ADN se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación Automática del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra de Granada, utilizando el secuenciador Applied Biosystems (modelo 373 STRECHT). Las secuencias obtenidas fueron analizadas y comparadas con las secuencias disponibles en las bases de datos GenBank y EMBL, usando el programa BLAST. Finalmente se analizaron mediante el programa informático FpQuest aplicando el coeficiente de correlación de Dice y el algoritmo UPGMA.

6. Hibridación *in situ*.

La técnica de hibridación *in situ*^{7,8,9} se desarrolló empleando sondas fluorescentes; éstas fueron diseñadas para detectar la presencia de microorganismos pertenecientes a los dominios *Bacteria* y *Archaea*.

7. Recuento de microorganismos cultivables.

El recuento de los microorganismos cultivables se llevó a cabo realizando diluciones de cada muestra en solución salina, y sembrando dichas diluciones en placas de medio de cultivo MY¹⁰ sólido a diferentes concentraciones de sales, del 0.5 al 10% (p/v).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Diversidad de la comunidad de Arqueas.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de las muestras correspondientes a los suelos de Motril (**Figura 1**) y Rambla Salada (**Figura 2**).

Figura. 1. Análisis de la biodiversidad de arqueas en las muestras procedentes de los suelos de Motril mediante la técnica DGGE. M = Marcador.

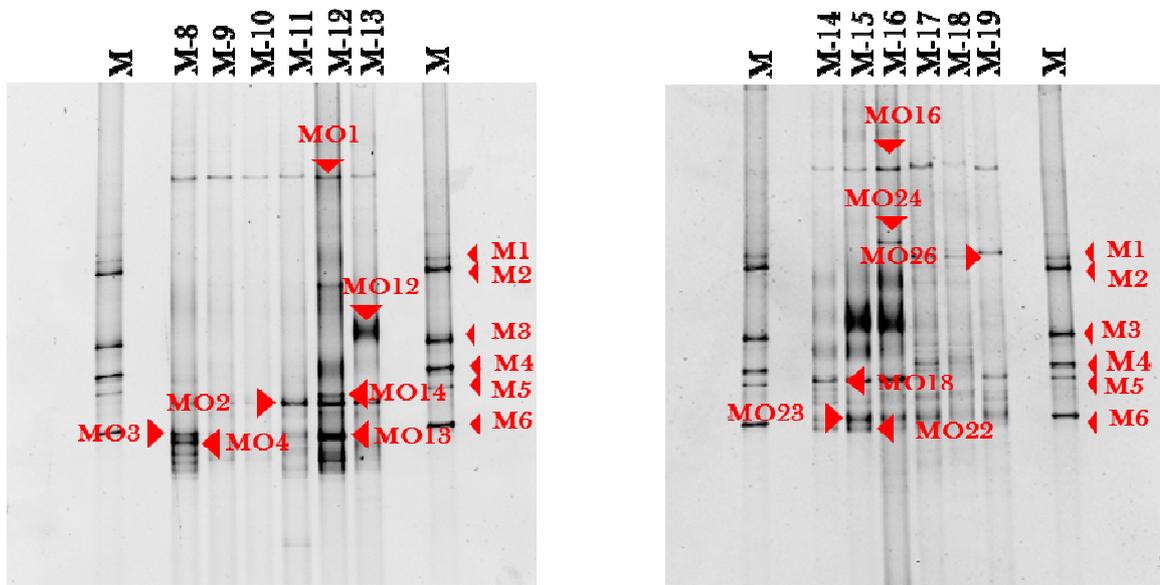
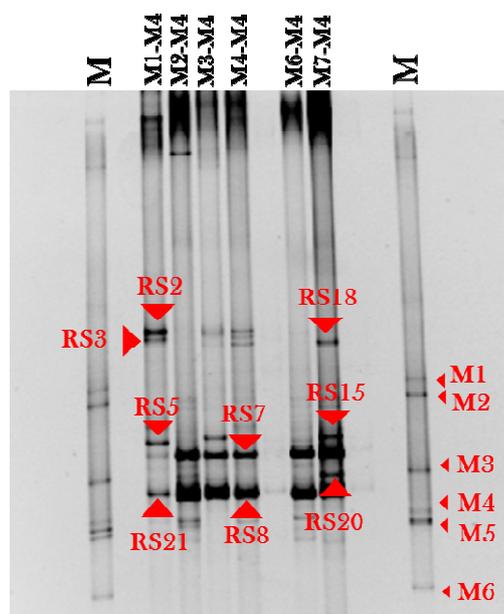


Figura. 2. Análisis de la biodiversidad de arqueas en las muestras procedentes de los suelos de Rambla Salada mediante la técnica DGGE. M = Marcador.



Una vez obtenidos los perfiles de bandas, se llevó a cabo la extracción, reamplificación y secuenciación de un total de 66 bandas, 22 bandas correspondientes a cada

perfil.

A continuación se muestran los resultados de la secuenciación de las bandas correspondientes a los microorganismos predominantes en los suelos agrícolas de Motril (**Tabla 1**) y en Rambla Salada (**Tabla 2**).

| Tabla 1. Resultados de la secuenciación e identificación de las bandas de DGGE obtenidas de las muestras de Motril | | |
|---|---|--------------------|
| Muestra | Microorganismos predominantes (% de identidad) | Nº de banda |
| M-8 | <i>Thermoplasma</i> sp. (84%) | MO3 |
| | <i>Candidatus Aciduliprofundum boonei</i> (80%) | MO2 |
| | <i>Candidatus Nitrososphaera gargensis</i> (85%) | MO1 |
| | <i>Candidatus Aciduliprofundum boonei</i> (85%) | MO4 |
| M-9 | <i>Candidatus Aciduliprofundum boonei</i> (80%) | MO2 |
| | <i>Candidatus Nitrososphaera gargensis</i> (85%) | MO1 |
| M-10 | <i>Candidatus Aciduliprofundum boonei</i> (80%) | MO2 |
| | <i>Candidatus Nitrososphaera gargensis</i> (85%) | MO1 |
| M-11 | <i>Candidatus Aciduliprofundum boonei</i> (80%) | MO2 |
| | <i>Candidatus Nitrososphaera gargensis</i> (85%) | MO1 |
| M-12 | <i>Candidatus Aciduliprofundum boonei</i> (80%) | MO2 |
| | <i>Candidatus Nitrososphaera gargensis</i> (85%) | MO1 |
| | <i>Thermoplasma</i> sp. (83%) | MO13 |
| | <i>Haloterrigena</i> sp. (98%) | MO15 |
| M-13 | <i>Candidatus Aciduliprofundum boonei</i> (80%) | MO2 |
| | <i>Sulfolobus</i> sp. (79%) | MO12 |
| M-14 | <i>Candidatus Nitrososphaera gargensis</i> (92%) | MO16 |
| | <i>Picrophilus torridus</i> (82%) | MO18 |
| M-15 | <i>Candidatus Nitrososphaera gargensis</i> (92%) | MO16 |
| | <i>Picrophilus torridus</i> (82%) | MO18 |
| M-16 | <i>Candidatus Nitrososphaera gargensis</i> (92%) | MO16 |
| | <i>Picrophilus torridus</i> (82%) | MO18 |
| | <i>Methanobrevibacter</i> sp. (74%) | MO24 |
| | <i>Pyrobaculum</i> sp. (81%) | MO22 |
| | <i>Pyrobaculum</i> sp. (80%) | MO23 |
| M-17 | <i>Candidatus Nitrososphaera gargensis</i> (92%) | MO16 |
| | <i>Methanobrevibacter</i> sp. (75%) | MO26 |
| M-18 | <i>Methanobrevibacter</i> sp. (75%) | MO26 |
| M-19 | <i>Candidatus Nitrososphaera gargensis</i> (92%) | MO16 |
| | <i>Picrophilus torridus</i> (82%) | MO18 |

Tabla 2. Resultados de la secuenciación e identificación de las bandas de DGGE obtenidas de las muestras de Rambla Salada.

| Muestra | Microorganismos predominantes (% de identidad) | Nº de banda |
|---------|--|-------------|
| M-1 | <i>Methanobrevibacter</i> sp. (81%) | RS2 |
| | <i>Methanobrevibacter</i> sp. (81%) | RS3 |
| | <i>Nitrosopumilus maritimus</i> (83%) | RS5 |
| | <i>Halorhabdus utahensis</i> (94%) | RS8 |
| M-2 | <i>Halorhabdus tiamatea</i> (96%) | RS7 |
| | <i>Halorhabdus utahensis</i> (94%) | RS8 |
| | <i>Haloarcula</i> sp. (99%) | RS21 |
| | <i>Methanobrevibacter</i> sp. (81%) | RS1 |
| M-3 | <i>Halorhabdus tiamatea</i> (96%) | RS7 |
| | <i>Halorhabdus utahensis</i> (94%) | RS8 |
| | <i>Haloarcula</i> sp. (99%) | RS21 |
| | <i>Methanobrevibacter</i> sp. (81%) | RS15 |
| M-4 | <i>Halorhabdus tiamatea</i> (96%) | RS7 |
| | <i>Halorhabdus utahensis</i> (94%) | RS8 |
| M-6 | <i>Halorhabdus tiamatea</i> (96%) | RS7 |
| | <i>Halorhabdus utahensis</i> (94%) | RS8 |
| | <i>Haloarcula</i> sp. (99%) | RS21 |
| M-7 | <i>Halorhabdus tiamatea</i> (96%) | RS7 |
| | <i>Halorhabdus utahensis</i> (94%) | RS8 |
| | <i>Haloarcula</i> sp. (99%) | RS21 |
| | <i>Halobacterium</i> sp. (91%) | RS15 |
| | <i>Methanococcus</i> sp. (80%) | RS18 |
| | <i>Methanothermococcus</i> sp. (81%) | RS20 |

2. Diversidad de la comunidad de Bacterias.

A continuación se muestran los perfiles de la biodiversidad de bacterias correspondientes a las muestras de Motril (**Figura 3**) y Rambla Salada (**Figura 2**).

Figura 3. Análisis de la biodiversidad de bacterias en las muestras procedentes de los suelos de Motril mediante la técnica DGGE. M = Marcador.

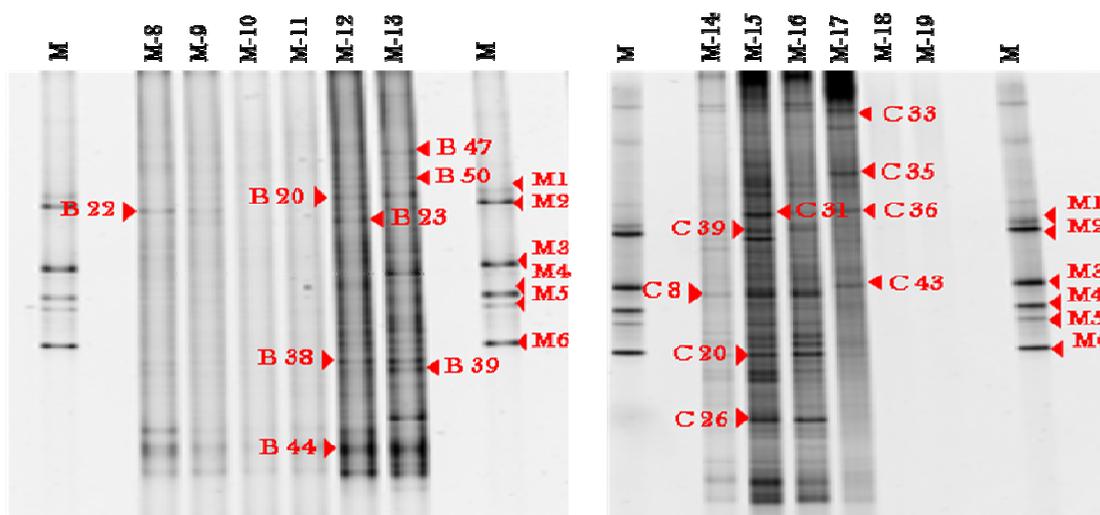
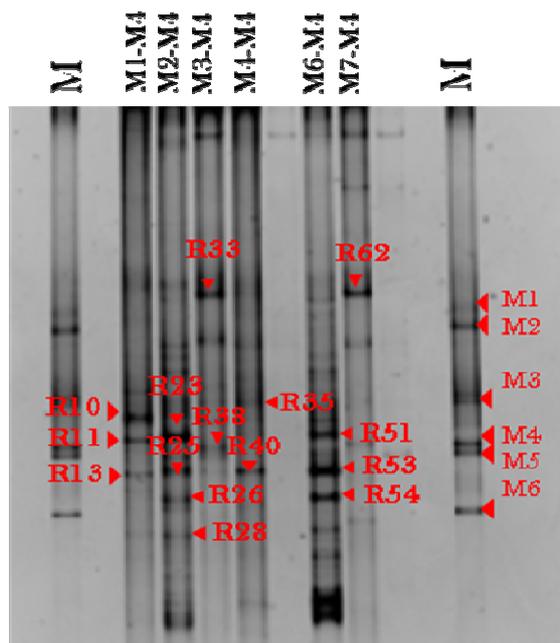


Figura 4. Análisis de la biodiversidad de bacterias en las muestras procedentes de los suelos de Rambla Salada mediante la técnica DGGE. M = Marcador.



A partir de los perfiles de bandas obtenidos se llevó a cabo la extracción, reamplificación y secuenciación de un total de 201 bandas, 70 bandas correspondientes a cada perfil, de las cuales sólo se muestran en las **Tabla 3 y 4** los resultados correspondientes a los microorganismos predominantes en Rambla Salada y Motril, respectivamente.

Tabla 3. Resultados de la secuenciación e identificación de las bandas de DGGE obtenidas de las muestras de Rambla Salada.

| Muestra | Microorganismos predominantes (% de identidad) | Nº de banda |
|---------|--|-------------|
| M-1 | <i>Ferrimicrobium acidiphilum</i> (82%) | R10 |
| | <i>Halochromatium</i> sp. (92%) | R11 |
| | <i>Desulfosarcina</i> sp. (89%) | R13 |
| M-2 | <i>Sphingobacterium shayense</i> (50%) | R23 |
| | <i>Balneola</i> sp. (92%) | R25 |
| | <i>Rhodovulum</i> sp. (83%) | R26 |
| | <i>Balneola</i> sp. (85%) | R28 |
| M-3 | <i>Halothiobacillus</i> sp. (98%) | R33 |
| | <i>Desulfuromonas thiophila</i> (94%) | R38 |
| M-4 | <i>Balneola</i> sp. (89%) | R40 |
| | <i>Roseovarius</i> sp. (99%) | R35 |
| M-6 | <i>Balneola</i> sp. (89%) | R51 |
| | <i>Balneola</i> sp. (89%) | R53 |
| | <i>Balneola</i> sp. (87%) | R54 |
| M-7 | <i>Halothiobacillus</i> sp. (99%) | R62 |

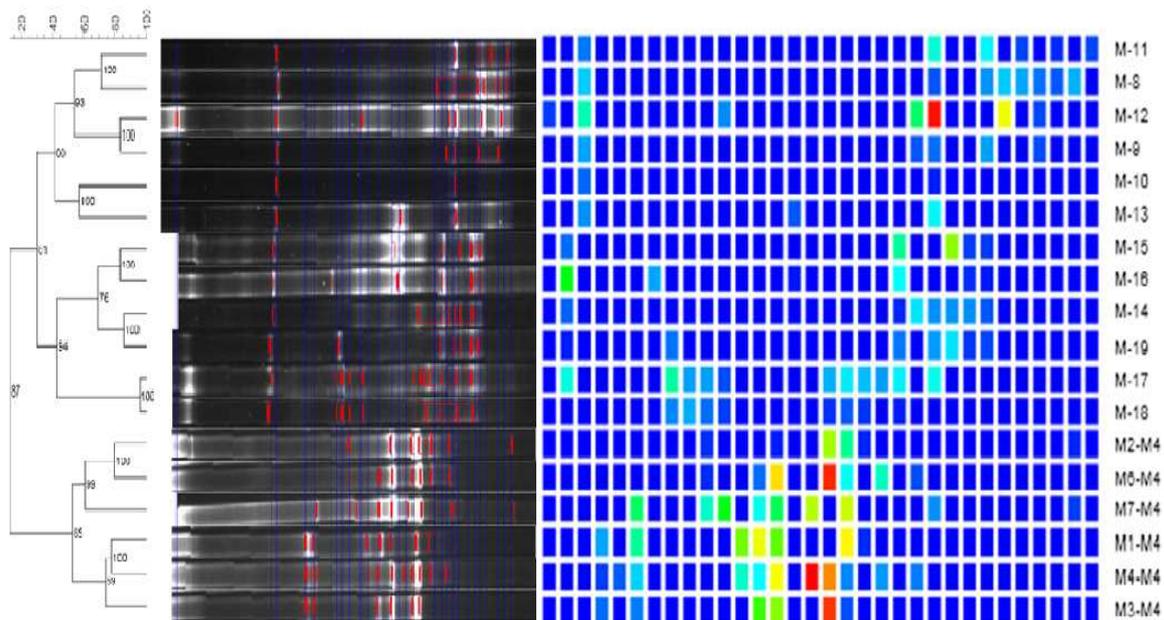
Tabla 4. Resultados de la secuenciación e identificación de las bandas de DGGE obtenidas de las muestras de Motril.

| Muestra | Microorganismos predominantes (% de identidad) | Nº de banda |
|---------|--|-------------|
| M-8 | <i>Dactylosporangium aurantiacum</i> (50%) | B22 |
| M-9 | <i>Dactylosporangium aurantiacum</i> (50%) | B22 |
| M-12 | <i>Dactylosporangium aurantiacum</i> (50%) | B22 |
| | <i>Xylella fastidiosa</i> (49%) | B23 |
| | <i>Chitinimonas koreensis</i> (50%) | B38 |
| | <i>Acidobacterium capsulatum</i> (50%) | B44 |
| M-13 | <i>Marinobacter excellens</i> (49%) | B50 |
| | <i>Salinivibrio siamensis</i> (49%) | B47 |
| | <i>Chitinimonas koreensis</i> (50%) | B38 |
| | <i>Sulfobacillus sibiricus</i> (49%) | B39 |
| | <i>Acidobacterium capsulatum</i> (50%) | B44 |
| M-14 | <i>Legionella londiniensis</i> (48%) | C8 |
| | <i>Streptomyces tacrolimicus</i> (48%) | C20 |
| | <i>Nitrosomonas halophila</i> (48%) | C26 |
| M-15 | <i>Legionella londiniensis</i> (48%) | C8 |
| | <i>Streptomyces tacrolimicus</i> (48%) | C20 |
| | <i>Nitrosomonas halophila</i> (48%) | C26 |
| | <i>Sphingomonas sanxanigenens</i> (50%) | C39 |
| | <i>Clostridium thermoalcaliphilum</i> (51%) | C31 |
| M-16 | <i>Legionella londiniensis</i> (48%) | C8 |
| | <i>Streptomyces tacrolimicus</i> (48%) | C20 |
| | <i>Nitrosomonas halophila</i> (48%) | C26 |
| M-17 | <i>Marinobacter pelagius</i> (49%) | C33 |
| | <i>Naxibacter varians</i> (50%) | C35 |
| | <i>Pedobacter lentus</i> (51%) | C36 |
| | <i>Thiobacillus denitrificans</i> (51%) | C43 |

3. Análisis informático FpQuest.

A continuación se muestra el análisis informático de los perfiles de la biodiversidad de arqueas (**Figura 5**) y bacterias (**Figura 6**) mediante el programa FpQuest.

Figura. 5. Dendograma obtenido al analizar los perfiles generados mediante DGGE de las comunidades de arqueas presentes en los suelos de Rambla Salada y de Motril, utilizando el programa FpQuest. La barra superior muestra el porcentaje de similitud entre los perfiles de banda, y los números de las ramas representan el coeficiente de correlación genética.



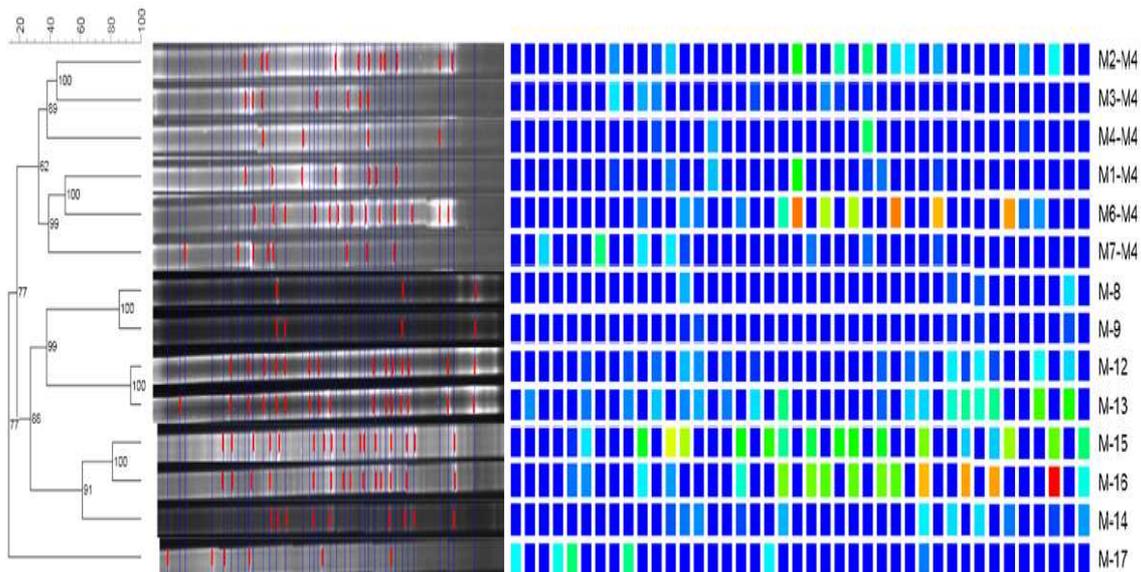
El dendograma generado en la Figura 5 muestra que los perfiles obtenidos se segregaron en tres clústers. Los dos primeros, con una similitud del 30%, agrupan todas aquellas muestras que han sido tomadas a partir de los suelos agrícolas de Motril, mientras que el tercer clúster agrupa las muestras correspondientes al suelo salino de Rambla Salada con un 52% de similitud. La composición de la comunidad de arqueas difiere notablemente entre los suelos de Motril y de Rambla Salada.

Los géneros más predominantes y ubicuos en los suelos de Motril son *Candidatus Nitrososphaera* y *Candidatus Aciduliprofundum boonei*, *Thermoplasma*, *Picrophilus* y *Pyrobaculum*. Los géneros *Halorhabdus* y *Haloarcula* son los más abundantes y ubicuos en los suelos de Rambla Salada.

El dendograma de la Figura 6 muestra una evidente segregación de las muestras en dos clúster de bacterias. Al igual que en el caso de las arqueas, el primer clúster agrupa las muestras correspondientes al suelo salino de Rambla Salada con un 28% de similitud., mientras que el segundo clúster agrupa las muestras pertenecientes al suelo agrícola de Motril con un 32% de similitud entre ellas.

Este resultado indica, por tanto, que la composición de la comunidad de bacterias difiere notablemente entre las muestras de Motril y de Rambla Salada.

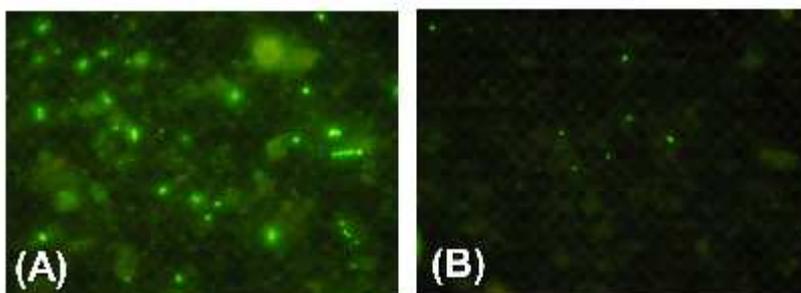
Figura. 6. Dendograma obtenido al analizar los perfiles generados mediante DGGE de las comunidades de bacterias presentes en los suelos de Rambla Salada y de Motril, utilizando el programa FpQuest. La barra superior muestra el porcentaje de similitud entre los perfiles de banda, y los números de las ramas representan el coeficiente de correlación genética.



Los géneros más abundantes en los suelos de Motril son *Dactylosporangium*, *Acidobacterium*, *Marinobacter*, *Salinivibrio*, *Sulfobacillus*, *Legionella* y *Thiobacillus*. Las bacterias *Balneloa*, *rhodovulum*, *Desulforomonas*, *Roseovarius*, *Halothiobacillus* y *Halochromatium* son las más abundantes en los suelos de Rambla Salada. Asimismo *Balneloa* representa el género más frecuente y ubicuo en Rambla Salada.

4. Hibridación *in situ*.

Figura. 7. Análisis de las poblaciones de bacterias (A) y arqueas (B) mediante hibridación *in situ* (CARD-FISH).



Los resultados obtenidos demuestran que en la comunidad procariota existente en Rambla Salada predominan las bacterias, aunque también se ha detectado la presencia de arqueas en gran parte de las zonas analizadas. Por otro lado hemos detectado la presencia de bacterias y arqueas en los suelos agrícolas de Motril.

5. Recuentos de microorganismos cultivables.

El número de microorganismos cultivables en Motril oscila entre 4×10^5 y 4×10^6 , y en Rambla Salada entre 3×10^3 y $9,3 \times 10^6$.

CONCLUSION

La presencia de una mayor diversidad microbiana en los suelos de Rambla Salada indica que los hábitats hipersalinos poseen una elevada biodiversidad procariota y por lo tanto un elevado potencial biotecnológico, y que por lo tanto deben ser protegidos y explotados en la búsqueda de nuevos microorganismos de interés industrial y ecológico.

BIBLIOGRAFIA

1. Muyzer, G. and Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *A. van Leeuwenhoek*. 73: 127-141.
2. Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbial Review*. 51: 221-271.
3. Muyzer, (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems *Current Opinion in Microbiology*. 2: 317-322.
4. Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993). Profile of complex microbial populations by denaturing gradient gel electroforesis analysis of polimerase chain reaction-amplified genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-7000.
5. Martínez-García, M., Díaz-Valdés, M., Wanner, G., Ramos-Esplá, A., Antón, J. (2007). Microbial community associated with the colonial ascidian *Cystodytes dellechiajei*. *Environ. Microbiol.* 2: 521-534.
6. Fisher, S. G. and Lerman, L. S. (1979). Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell*. 16:191-200.
7. Anton, J., Llobet-Brossa, E., Rodriguez-Valera, F., and Amann, R. (1999). Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environ. Microbiol* 1:517-523.
8. Pernthaler, A., Pernthaler, J., Amann, R. (2002). Fluorescence in Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3094-310.
9. Amann, R. Krumholz, L. Stahl, D. (1990). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* February. 172: 762-770.
10. Moraine, RA., and Rogovin P. (1971). Growth of *Xanthomonas campestris* is not simply nutrient-limited. *Can J Microbiol.* Nov; 17(11):1473-4.
11. Béjar, y col., 1998. *Journal of Biotechnology* **61**, 135-141.
12. Quesada y col., 2004. *Halophilic Microorganisms* 295-314.