

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



**ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA DE
MANANTIALES SALINOS UBICADOS EN LOS DEPARTAMENTOS DE
RISARALDA Y BOYACA**

CAROLINA DIAZ CARDENAS

**TESIS
Presentada como requisito parcial
Para optar al título de**

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Bogotá D.C.
20 de Junio de 2011**

NOTA DE ADVERTENCIA

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

Artículo 23 de la Resolución No13 de Julio de 1946.

AGRADECIMIENTOS

A la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) de la Pontificia Universidad Javeriana por facilitarme sus instalaciones e infraestructura para llevar a cabo este trabajo y a todos sus integrantes por compartir estos años, siempre con una calidad sonrisa y generando un buen ambiente de trabajo.

Agradezco a mi directora Sandra Baena por sus enseñanzas, paciencia, amistad, confianza, entusiasmo y buenas ideas.

A mis compañeros y amigos Luisa Bernal, Carolina Rubiano, Gina López, Habib Yanine y Javier Gómez, por sus aportes en el desarrollo de este trabajo y por su ayuda incondicional.

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

Al Dr. Bharat Patel, por recibirme en su laboratorio y por facilitarme los recursos económicos y logísticos para llevar a cabo parte de este trabajo.

Al grupo de Genómica y Bioinformática de Ambientes Extremos – GEBIX, por su aporte en el proceso de pirosecuenciación y análisis de secuencias.

Al geólogo Michael Tistl y a Claudia Alfaro, por proporcionarme información relacionada con las características fisicoquímicas y geológicas de los manantiales salinos.

A mis padres, Marleny Cárdenas y Aberlado Díaz, por haberme dado la oportunidad de tener la educación que deseaba, por su ejemplo de perseverancia y compromiso y por su apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida.

A mi hermana Ximena Díaz y a Alejandro Reyes por su paciencia, ánimo y colaboración.

A todos mis amigos, quienes de una u otra forma me acompañaron durante este proceso, siempre con palabras de aliento y buena energía.

RESUMEN

En este estudio se determinó la composición de las comunidades bacterianas de dos manantiales salinos ubicados en el departamento de Risaralda, el Salado de Consotá y La Cristalina y uno ubicado en el departamento de Boyacá, denominado Salpa. Los tres manantiales, importantes desde una perspectiva histórica y económica, fluyen a partir de aguas subterráneas con más de 50 años antigüedad y pueden diferenciarse a partir de sus características fisicoquímicas. Aunque no se detectó diferencias significativas en la abundancia y composición de organismos del dominio *Bacteria* entre los tres manantiales a lo largo del tiempo, la composición de la comunidad bacteriana sí presentó variaciones espaciales, indicando que cada manantial alberga una comunidad bacteriana diferente, esta variación fue explicada en parte por los parámetros fisicoquímicos estudiados y principalmente por la concentración del ion calcio y de la temperatura. A pesar de las diferencias al interior de la comunidad bacteriana de cada manantial, se observó predominio de OTUs relacionadas con organismos de las clases γ y α -*Proteobacteria*, ampliamente reportadas en hábitats salinos incluyendo ambientes marinos, aunque en el manantial Salpa también se detectó predominio de OTUs relacionadas con organismos de la clase β -*Proteobacteria*. Además, se observó que estos manantiales son hábitats de nueva diversidad taxonómica como se deduce del alto número de secuencias del 16S ARNr con menos del 97% de similitud con secuencias de organismos cultivados y por las nuevas especies aisladas e identificadas en el curso de este estudio, las cuales además presentaron capacidades hidrolíticas que pueden ser exploradas más adelante.

ABSTRACT

Our study determined the composition of bacterial communities in two salt springs located in the department of Risaralda, the Salado de Consotá and La Cristalina and one located in the department of Boyacá, called Salpa. The three springs, which are important from a historical and economic perspective, flow from groundwaters that are more than 50 years old and can be recognized by their physicochemical characteristics. Although no significant differences were detected among the abundance and composition of organisms of the domain *Bacteria* from the three springs along time, the bacterial community composition did present spatial variations, indicating that each spring hosts a different microbial community; this variation was partly explained by physicochemical parameters and mainly by the calcium ion concentration and temperature. Despite the differences within the bacterial community of each spring, there was a predominance of OTUs related with organisms of the γ and α -*Proteobacteria*, widely reported in saline habitats including marine environments; in addition in Salpa spring β -*Proteobacteria* class was also detected. We also found that these springs are habitats of a new undescribed taxonomic diversity as revealed by the high number of 16S rRNA sequences with less than 97% similarity to sequences of cultured organisms, and by new species isolated and identified in the course of this study, which also showed hydrolytic properties that can be explored in further studies.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Diversidad biológica	4
2.2 Estudio de comunidades microbianas en ambientes naturales	4
2.2.1 Métodos independientes de cultivo	5
2.2.2 Métodos dependientes de cultivo	9
2.2.2.1 Identificación taxonómica de los microorganismos cultivados	10
2.2.2.1.1 Caracterización fenotípica	10
2.2.2.1.2 Características genotípicas	11
2.3 Concepto de especie procariota	13
2.4 Ambientes acuáticos salinos	15
2.5 Comunidades microbianas en sistemas acuáticos salinos	17
2.6 Factores que afectan la composición de las comunidades microbianas en ambientes salinos	21
2.7 Importancia del estudio de la composición de las comunidades microbianas en ambientes salinos	22
3 OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN	25
4 MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1 Descripción de los sitios de estudio	26
4.1.1 Descripción de los manantiales del departamento de Risaralda	26
4.1.1.1 Manantial Salado de Consotá (SC)	26
4.1.1.2 La Cristalina (LC)	30
4.1.1.3 Generalidades hidrológicas y geológicas de la zona aledaña a los Manantiales SC y LC	33

4.1.2	Descripción del manantial Salpa (SP) ubicado en el departamento de Boyacá	34
4.1.2.1	Generalidades hidrológicas y geológicas de la zona aledaña al manantial SP	35
4.2	Muestreos y mediciones	37
4.3	Caracterización de la composición química del agua de los manantiales	39
4.3.1	Análisis de las variables fisicoquímicas	39
4.4	Composición isotópica del agua	40
4.5	Caracterización de la composición de las comunidades microbianas de los manantiales salinos	41
4.5.1	Características morfológicas de las comunidades microbianas presentes en los manantiales salinos SC y SP	41
4.5.2	Determinación del número total de células microbianas y detección de grupos microbianos particulares	43
4.5.2.1	Recuento total de células	43
4.5.2.2	Detección selectiva de grupos microbianos particulares usando la técnica de FISH	44
4.5.2.3	Recuento de células	46
4.5.3	Generación de inventarios biológicos a partir del aislamiento de microorganismos halotolerantes y/o halófilos aerobios y anaerobios heterotróficos	47
4.5.3.1	Inoculación de las series de cultivo	49
4.5.3.2	Aislamiento de cepas microbianas	49
4.5.3.3	Conservación de organismos aislados	50
4.5.3.4	Estudio polifásico de las cepas aisladas	50
4.5.3.4.1	Caracterización fenotípica	51
4.5.3.4.2	Caracterización genotípica	60
4.5.3.4.3	Detección de producción de enzimas hidrolíticas y producción	

de polihidroxicanoatos (PHA)	65
4.5.4 Caracterización de la composición microbiana usando métodos independientes de cultivo	69
4.5.4.1 Extracción de ADN comunitario	69
4.5.4.1.1 Cuantificación de ácidos nucleicos	70
4.5.4.2 Clonación y secuenciación del gen que codifica para la sub-unidad pequeña del 16S ARNr de muestras del manantial SC y SP	70
4.5.4.3 Pirosecuenciación 454 de la región V5-V6 del gen codifica para el 16S ARNr del manantial LC	72
4.5.4.4 Análisis computacional de las secuencias del 16S ARNr	73
4.5.4.4.1 Alineamiento de las secuencias del 16S ARNr	74
4.5.4.4.2 Análisis filogenético de las secuencias del 16S ARNr	74
4.5.4.4.3 Agrupación de las secuencias en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs)	75
4.5.4.4.4 Comparación filogenética de los taxones obtenidos por clonación	75
4.5.4.4.5 Análisis de las secuencias obtenidas por pirosecuenciación	75
4.5.5 Determinación de variaciones espaciales y temporales de las comunidades bacterianas dominantes de los manantiales salinos	76
4.5.5.1 Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)	76
4.5.5.1.1 Identificación de los grupos taxonómicos más abundantes de la comunidad bacteriana a partir de DGGE	77
4.5.5.1.2 Análisis estadístico del patrón de bandas de DGGE	78
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	80
5.1 Caracterización de la composición fisicoquímica del agua de los manantiales salinos	80
5.1.1 Determinación de las diferencias en los parámetros fisicoquímicos entre los diferentes sitios de muestreo	82
5.1.2 Análisis de Componentes Principales (ACP)	83

5.2 Composición isotópica del agua	85
5.3 Caracterización de la composición de las comunidades microbianas	86
5.3.1 Características morfológicas de las comunidades microbianas presentes en los manantiales salinos SC y SP	86
5.4 Determinación del número total de células microbianas y detección de grupos microbianos particulares	93
5.5 Generación de inventarios biológicos a partir del aislamiento de microorganismos halófilos y/o halotolerantes aerobios y anaerobios heterotróficos	97
5.5.1 Microorganismos aislados del manantial SC	108
5.5.1.1 Descripción taxonómica de la cepa USBA 355	119
5.5.1.2 Descripción taxonómica de la cepa USBA 369	126
5.5.2 Microorganismos aislados del manantial LC	132
5.5.3 Microorganismos aislados del manantial SP	136
5.5.3.1 Descripción taxonómica de la cepa USBA 822	138
5.5.3.2 Descripción taxonómica de la cepa USBA 82	143
5.5.4 Detección de enzimas hidrolíticas y polihidroxicarboxilatos en cepas aisladas	147
5.5.4.1 Actividad amilolítica	148
5.5.4.2 Actividad proteolítica	150
5.5.4.3 Actividad lipolítica	151
5.5.4.4 Actividad β -galactosidasa	152
5.5.4.5 Detección de polihidroxicarboxilatos	153
5.5.5 Generalidades de los microorganismos aislados	155
5.6 Caracterización de la composición microbiana usando métodos independientes de cultivo	157
5.6.1 Análisis de la genoteca del 16S ARNr de muestras del manantial SC y SP	158
5.6.1.1 Asignación taxonómica de las Unidades Taxonómicas	

Operacionales (OTUs) obtenidas en la muestra del manantial SC	159
5.6.1.2 Asignación taxonómica de OTUs obtenidas en la muestra del manantial SP	169
5.6.1.3 Comparación filogenética de los taxones obtenidos por clonación	179
5.6.2 Distribución taxonómica de las secuencias obtenidas por pirosecuenciación de la región V5 y V6 del gen que codifica para el 16S ARNr en manantial LC	183
5.6.2.1 Asignación taxonómica de OTUs obtenidas en la muestra del manantial LC	183
5.6.3 Generalidades sobre la composición de las comunidades bacterianas en los tres manantiales basados en el análisis de las secuencias del 16S ARNr	188
5.6.4 Determinación de variaciones espaciales y temporales de las comunidades bacterianas dominantes de los manantiales salinos	191
5.6.4.1 Identificación de los grupos taxonómicos más abundantes de la comunidad bacteriana a partir del corte de bandas del DGGE	197
5.7 Discusión general del estudio de las comunidades microbianas en los tres manantiales salinos estudiados	203
6. CONCLUSIONES	207
7. PERSPECTIVAS	209
8. BIBLIOGRAFÍA	210
ANEXOS	

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Métodos utilizados para el análisis fisicoquímico de las aguas	39
Tabla 2. Sondas de oligonucleótidos usadas en este estudio	45
Tabla 3. <i>Buffer</i> de hibridización para las sondas de oligonucleótidos evaluadas en este estudio	45
Tabla 4. <i>Buffer</i> de lavado para eliminar las sondas de oligonucleótidos evaluadas en este estudio	46
Tabla 5. Fuentes de carbono adicionadas a los medios de cultivo MB-AER y MB-ANA	48
Tabla 6. Composición del medio sintético básico aerobio	53
Tabla 7. Composición del medio sintético básico anaerobio	53
Tabla 8. Composición del medio de cultivo Nfb	56
Tabla 9. Iniciadores usados para la amplificación del gen <i>nifH</i>	56
Tabla 10. Iniciadores usados para la amplificación del gen que codifica el 16S RNAr	62
Tabla 11. Iniciadores usados para la amplificación del gen que codifica el 16S RNAr	63
Tabla 12. Composición del medio sintético básico usado para la detección de PHAs	69
Tabla 13. Iniciadores usados para la amplificación de la región V5-V6 del 16S ARNr	72

Tabla 14. Lista de pares de iniciadores usados en la técnica de DGGE	76
Tabla 15. Componentes de las soluciones 100% y 0% usados como soluciones de trabajo para la realización de los geles de poliacrilamida	77
Tabla 16. Caracterización fisicoquímica de las aguas de los manantiales Estudiados	81
Tabla 17. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) de los parámetros fisicoquímicos evaluados y comparaciones <i>Post-Hoc</i>	82
Tabla 18. Caracterización isotópica del agua de los manantiales estudiados	85
Tabla 19. Cuantificación de células microbianas y de los organismos pertenecientes a los dominios <i>Bacteria</i> (α , β , γ - <i>Proteobacteria</i>) y <i>Archaea</i>	94
Tabla 20. Cepas aisladas de los tres manantiales	100
Tabla 21. Características fenotípicas de la cepa USBA 355 y géneros de la familia <i>Rhodospirillaceae</i>	125
Tabla 22. Características fenotípicas y quimiotaxonómicas de la cepa USBA 369 y especies del género <i>Aurantimonas</i>	129
Tabla 23. Caracterización fenotípica de la cepa USBA 822 y microorganismos del género <i>Nitratireductor</i>	142
Tabla 24. Características fisiológicas de la cepa USBA 82 y de otro organismo del género <i>Dethiosulfovibrio</i>	147
Tabla 25. Evaluación de la actividad amilolítica en 19 cepas aisladas	149
Tabla 26. Evaluación de la actividad proteolítica en 29 cepas aisladas	150
Tabla 27. Evaluación de la actividad lipolítica en nueve cepas aisladas	152
Tabla 28. Evaluación de la actividad β -galactosidasa en ocho cepas aisladas	153
Tabla 29. Detección de la producción de gránulos de PHAs en 20 cepas aisladas	154

Tabla 30. Afiliación taxonómica de las OTUs obtenidas en la biblioteca de clones de la muestra del manantial salino SC	160
Tabla 31. Afiliación taxonómica de las OTUs obtenidas en la biblioteca de clones de la muestra del manantial salino SP	170
Tabla 32. Identificación de las OTUs obtenidos por DGGE del manantial SC usando el algoritmo de BLAST del NCBI	198
Tabla 33. Identificación de las OTUs obtenidos por DGGE del manantial LC y SP usando el algoritmo de BLAST del NCBI	200
Tabla 34. Identificación de las OTUs obtenidos por DGGE del manantial SP usando el algoritmo de BLAST del NCBI	201

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ubicación geográfica de los manantiales estudiados	26
Figura 2. Vista del río Consota y del manantial Salado de Consotá	27
Figura 3. Ubicación del río Consota y de la fuente de agua salada	28
Figura 4. Acualera “Salinas del Consotá”	29
Figura 5. Manantial SC durante los muestreos realizados	30
Figura 6. Quebrada Cestillal y manantial LC	30
Figura 7. Imagen del pozo del manantial LC	32
Figura 8. Imagen del manantial LC en el cual se observa la presencia de algas	32
Figura 9. Vista del manantial salino Salpa (SP)	35
Figura 10. Medición de gases en el pozo principal de Salpa	36
Figura 11. Localización de manifestaciones superficiales del sistema geotérmico de Paipa y fallas geológicas	37
Figura 12. Representación gráfica del análisis de componentes principales	84
Figura 13. Composición de isotopos estables con respecto a la línea meteórica mundial SMOW	85
Figura 14. Microscopia electrónica de barrido del manantial SC	87
Figura 15. Colonia microbiana observada en el manantial SC	88
Figura 16. Microscopia electrónica de barrido del manantial SC	89
Figura 17. Microscopia electrónica de barrido del manantial salino SP	90
Figura 18. Microscopia electrónica de barrido del manantial salino SP	91
Figura 19. Microscopia electrónica de barrido del manantial SP	92

Figura 20. Autofluorescencia detectada por la presencia de cianobacterias	94
Figura 21. Porcentaje de células hibridadas con las sondas EUB338 y ARCH915	95
Figura 22. Porcentaje de células hibridadas con las sondas BETA42a, GAMM42a y ALF968	97
Figura 23. Morfología de cepas bacterianas aisladas	98
Figura 24. Microscopía electrónica de la cepa USBA 352	111
Figura 25. Tinción negativa y microscopia electrónica de la cepa USBA 484	116
Figura 26. Tinción negativa de la cepa USBA 355	120
Figura 27. Micrografía electrónica de la cepa USBA 355	121
Figura 28. Evaluación espectrofotométrica de pigmentos celulares en la cepa USBA 355	122
Figura 29. Dendrograma que muestra la posición filogenética de la cepa USBA 355	126
Figura 30. Micrografía electrónica cepa USBA 369	127
Figura 31. Dendrograma que muestra la posición filogenética de la cepa USBA 369	131
Figura 32. Microscopia electrónica de la cepa USBA 372	134
Figura 33. Dendrograma que muestra la posición filogenética de la cepa USBA 822	141
Figura 34. Micrografía electrónica de la cepa USBA 82	144
Figura 35. Dendrograma que muestra la posición filogenética de la cepa USBA 82	146
Figura 36. Representación gráfica que muestra la afiliación taxonómica de las cepas aisladas de cada uno los manantiales	156

Figura 37. Curva de rarefacción para los clones obtenidos en la muestra SC ySP 159	
Figura 38. Relación filogenética de las OTUs obtenidas en la biblioteca de clones del manantial SC (SC OTU) y SP (SP OTU)	182
Figura 39. Curva de rarefacción para las secuencias obtenidas de LC	183
Figura 40. Distribución de familias del Filo <i>Proteobacteria</i> del manantial LC	184
Figura 41. Distribución de familias de los Fila <i>Cyanobacteria</i> , <i>Plantomycetes</i> , <i>Deinococcu-Thermus</i> , <i>Actinobacteria</i> y <i>Bacteroidetes</i>	187
Figura 42. Patrón de bandas del dominio <i>Bacteria</i> de los manantiales salinos SC, LC y SP durante tres épocas de muestreo	192
Figura 43. Dendrograma que representa la similitud entre la composición de organismos del dominio <i>Bacteria</i> en los manantiales SC, LC y SP en tres épocas de muestreo	193
Figura 44. Análisis de correspondencia del patón de bandas obtenido por DGGE	194
Figura 45. Diagrama del análisis de correlación canónica	195
Figura 46. Representación gráfica que representa la similitud entre la composición de organismos del dominio <i>Bacteria</i> en los manantiales SC, LC y SP	205

INDICE DE ANEXOS

ANEXO A. Solución mineral de elementos traza de Balch

ANEXO B. Análisis de Componentes Principales (ACP)

ANEXO C. Presentaciones y publicaciones

1. INTRODUCCIÓN

Colombia es considerado uno de los países con más diversidad biológica, por contener en su territorio cerca del 10% de la biota total del planeta, en una extensión continental de 114'174.800 hectáreas, que representa el 0.7% de la superficie continental mundial (Romero *et al.*, 2008).

La importancia de la diversidad biológica, al igual que la adopción de medidas para su conocimiento, conservación y uso sostenible, se presentan en el convenio sobre Diversidad Biológica, ratificado por Colombia mediante la Ley 165 de 1994. La Política Nacional de Biodiversidad actual incluye un Plan de Acción Nacional referente al manejo de la diversidad biológica que consiste en tres estrategias que involucran la generación de conocimiento de los componentes de la diversidad biológica, su conservación y su uso sostenible.

A pesar de los esfuerzos que se han hecho en Colombia para generar conocimiento sobre la diversidad biológica y su relación con la estructura y función de los ecosistemas, aún falta mucho por conocer (Romero *et al.*, 2008). La falta de conocimiento es aún más notoria al tratarse de la diversidad biológica de los microorganismos en ambientes naturales, pese a que los microorganismos son indispensables en el mantenimiento de la biosfera porque regulan los ciclos biogeoquímicos de los principales elementos, participan en los procesos de descomposición de materia orgánica, favorecen el ciclaje de nutrientes y degradan compuestos contaminantes, además, de ser útiles en diversas aplicaciones biotecnológicas (Madsen, 2005).

Dada la importancia de generar conocimiento de la diversidad biológica y en particular de la diversidad microbiana de ambientes naturales en el país, que a futuro permita, no solo el desarrollo de estrategias de conservación y de utilización sostenible de los recursos biológicos, sino que también genere conocimiento básico de las características fisiológicas y patrones de distribución temporal y espacial de los microorganismos en ambientes naturales, se ha planteado esta tesis doctoral.

Esta tesis, enmarcada en el proyecto “Estudio ecofisiológico de comunidades microbianas halófilas de manantiales salinos y termales de Risaralda (Colombia)”, se enfoca en el estudio de la composición de las comunidades bacterianas de ambientes naturales poco o nada estudiados en el país, como lo son los manantiales salinos, definidos como brotes naturales de agua con un contenido de sólidos disueltos totales (SDT) de aproximadamente 10 a 35 g.L⁻¹ (Younger, 2007).

En Colombia, la presencia de manantiales salinos se ha reportado principalmente en la cordillera Central y Oriental de los Andes Colombianos y se caracterizan por aflorar sobre o cerca de un trazo de falla geológica a pocos metros de drenajes mayores (Cortés & Cardona, 2006). Existen reportes de la utilización de estos manantiales desde épocas precolombinas para la extracción de sal con diferentes fines desde consumo humano hasta orfebrería (Acevedo & Martínez, 2004; Tistl, 2004), pero no hay reportes que describan la composición y en consecuencia la distribución de las comunidades microbianas en este tipo de hábitats en Colombia. Inclusive a nivel mundial ha sido poco el estudio de este tipo de ambientes, y la mayoría de estudios en sistemas acuáticos salinos se ha centrado en sistemas lénticos como los lagos hipersalinos, en los cuales el tensor ambiental más importante es la concentración de sal, superior a 30% (p/v) de NaCl, lo cual hace que estos ambientes se caractericen por presentar baja diversidad microbiana pero alta diversidad infraespecífica (Benlloch *et al.*, 2002; Casamayor *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta que los manantiales son brotes de agua subterránea perenne salina, en este estudio se espera encontrar comunidades microbianas compuestas principalmente de organismos heterotróficos y litotróficos, tal como se ha reportado para aguas subterráneas (Griebler & Lueders, 2009), y a su vez halófilos por el efecto selectivo de la sal. Además, se espera observar variaciones espaciales de las comunidades microbianas por el efecto de la composición química del agua tal como se ha reportado en lagos salinos (Pagaling *et al.*, 2009). Por lo tanto, en el presente trabajo se plantean las siguientes preguntas de investigación:

¿Cuál es la composición de las comunidades bacterianas de manantiales salinos ubicados en el sistema montañoso de los Andes Colombianos?

¿Hay variaciones espaciales y estacionales en la composición de la comunidad bacteriana entre manantiales que presentan una salinidad similar?

¿Cuáles son las características fisicoquímicas del agua que afectan la composición de las comunidades bacterianas de manantiales salinos?

Con el fin de resolver estas preguntas de investigación se seleccionaron tres manantiales salinos ubicados en el sistema montañoso de los Andes colombianos, que presentan un contenido de SDT de 20 a 54 g.L⁻¹. La composición de las comunidades bacterianas fue estudiada mediante la generación de inventarios de diversidad biológica utilizando técnicas tanto dependientes como independientes de cultivo, estas últimas usando como marcador molecular la subunidad pequeña del 16S ARNr. Los resultados indicaron que los tres manantiales albergan una comunidad bacteriana constituida en su mayoría por organismos Gram-negativos, móviles, heterotróficos y litotróficos, halotolerantes y halófilos reportados previamente en ambientes marinos. Los organismos predominantes hacen parte de las clases *Gamma* y *Alfa-Proteobacteria*, aunque cada manantial alberga una comunidad bacteriana diferente. Además, estos manantiales son hábitat de nueva diversidad taxonómica como se deduce de las nuevas especies bacterianas aisladas y del alto número de secuencias del 16S ARNr que presentaron menos del 97% de similitud con secuencias de organismos cultivados. Por otra parte, se evidenciaron variaciones espaciales, que en parte, fueron explicadas por las características fisicoquímicas de cada hábitat y en particular por la concentración de iones calcio (Ca²⁺) y de la temperatura.

Por tanto, este estudio aporta conocimiento sobre la composición, características fenotípicas y distribución de la comunidad microbiana en tres manantiales salinos de Colombia, lo cual no solo complementa el conocimiento de las comunidades microbianas en ambientes salinos, sino que también puede ser de utilidad en el desarrollo de programas de manejo y conservación de estos ambientes naturales y en programas de bioprospección.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 DIVERSIDAD BIOLÓGICA

El Convenio sobre Diversidad Biológica (CDB) define la biodiversidad o diversidad biológica como " la variabilidad de organismos vivos de cualquier fuente, incluidos, entre otras cosas, los ecosistemas terrestre y marinos y otros ecosistemas acuáticos y los complejos ecológicos de los que forman parte; comprende la diversidad dentro de cada especie, entre especies y de los ecosistemas..."

Para generar conocimiento sobre la diversidad biológica se requiere considerar los diferentes niveles jerárquicos de organización de la vida (genes, especies, poblaciones, comunidades y ecosistemas), junto con su composición, estructura y funcionalidad, lo cual puede abordarse a partir de tres preguntas: ¿qué elementos la componen?, ¿cómo están organizados? y ¿cómo interactúan? (Noss, 1990).

Para abordar el estudio de la diversidad biológica a partir de los elementos o entidades que la componen, los inventarios biológicos se convierten en un punto de partida. Un inventario biológico documenta la distribución espacial de especies, poblaciones, comunidades u otros elementos biológicos (Kremen *et al.*, 1993). Por tanto, son útiles para definir la distribución geográfica de las especies y cambios en su distribución a escala espacial y temporal. Así mismo, apoyan la exploración y valoración económica de posibles usos de las especies y el diseño de acciones de conservación (Chalmers, 1996).

2.2 ESTUDIO DE COMUNIDADES MICROBIANAS EN AMBIENTES NATURALES

En particular el análisis de una comunidad busca entender cuál es la estructura de los ensamblajes biológicos, cuál es su función y cómo cambian espacial y temporalmente. Según Konopka, (2009), el análisis de las comunidades microbianas involucra varios elementos relacionados con la determinación de:

- Diversidad taxonómica: referida a inventarios de diversidad (diversidad taxonómica dentro de un hábitat definido espacialmente) en una muestra

discreta, entendiendo diversidad como la riqueza de taxones o número de especies y la abundancia relativa de los diferentes taxones en la comunidad.

- Determinación de características funcionales: involucra conocer la actividad de los microorganismos en procesos biogeoquímicos específicos.
- Interacciones microbianas: busca determinar la dinámica del ecosistema y la ecología evolutiva de cada individuo. Las interacciones se pueden originar por competencia por recursos, por asociaciones simbióticas, alelopatía, producción de moléculas señal, transferencia horizontal de genes y co-evolución, entre otros.
- Redundancia funcional: que proporciona la capacidad de responder rápidamente a cambios ambientales.
- Estabilidad, resistencia y resiliencia: determinan la respuesta del ecosistema a perturbaciones.
- Potencial genómico: Hace referencia al metagenoma de la comunidad.

Por tanto, los estudios actuales de comunidades microbianas pretenden identificar tanto los microorganismos cultivables, basados en aislamientos y/o el análisis de las propiedades metabólicas de los organismos que componen una muestra, como los no cultivables, basados en el análisis del metagenoma por medio de técnicas moleculares; en ambos casos también se realizan comparaciones filogenéticas que permiten establecer relaciones de parentesco y afiliaciones taxonómicas.

A continuación se describen algunas de las herramientas tanto independientes como dependientes de cultivo, usadas para el estudio de las comunidades microbianas en ambientes naturales:

2.2.1 Métodos independientes de cultivo

El desarrollo de técnicas para la extracción directa del ADN o ARN comunitario a partir de muestras ambientales y su análisis ha hecho posible un mayor conocimiento de la diversidad microbiana. Las técnicas para la extracción de ADN usualmente son una combinación de métodos físicos y químicos para romper las células tratando de minimizar el daño causado a los ácidos nucleicos, sin embargo, estas técnicas no logran romper la pared celular de todas las células en la comunidad y la pureza de los ácidos

nucléicos pueden presentar problemas para su posterior amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*). La PCR permite la detección de fragmentos de ADN que se encuentran en poca cantidad en muestras ambientales, no obstante, esta técnica presenta sesgos relacionados con la diferencia en el acceso del iniciador a la cadena molde y la eficiencia en la extensión (Polz & Cavanaugh, 1998).

La mayoría de las técnicas moleculares usadas para estudios de diversidad microbiana están basadas en la amplificación de una secuencia blanco, la secuencia más frecuentemente usada es la del gen que codifica para el RNA ribosómico, y específicamente el gen que codifica para la subunidad menor del ribosoma bacteriano, 16S rRNA. Este marcador ha sido extensamente usado dado que: (1) está presente en todos los organismos y tiene la misma función en todos ellos; (2) debido a restricciones estructurales, diferentes regiones de la molécula presentan distinto grado de variabilidad en su secuencia, lo que permite realizar comparaciones con diferente nivel de resolución; (3) su transmisión es principalmente vertical ya que se considera que no está sujeto a transferencia génica horizontal entre microorganismos; (4) la longitud de su secuencia tiene un tamaño adecuado para proporcionar suficiente información, y (5) el análisis de la secuencia permite realizar reconstrucciones filogenéticas de los microorganismos (Tringe & Hugenholtz 2008; Amaral-Zettlera *et al.*, 2008)

Hoy día, las bases de datos que acumulan información de las secuencias del ARNr son las más grandes en comparación con otros marcadores moleculares, las cuales al mismo tiempo presentan una inmensa mayoría de secuencias relacionadas con organismos no cultivados (Peplies *et al.*, 2008).

La generación de gran cantidad de información se debe al mejoramiento y disminución de los costos en la tecnología de secuenciación, que ha favorecido la generación de una gran cantidad de datos. Por tanto, el uso del 16S ARNr y el avance tecnológico en el desarrollo de nuevos métodos moleculares ha impactado el campo de la filogenia, bioinformática, biogeografía y la ecología microbiana (Tringe & Hugenholtz 2008).

Existen herramientas tales como las técnicas de huella genética que incluyen la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE por sus siglas en inglés

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Muyzer *et al.*, 1993), análisis del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Moeseneder *et al.*, 1999), análisis automático del espacio ribosómico intergénico (ARISA por sus siglas en inglés *Automated method of Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*), análisis filogenéticos mediante clonación y secuenciación de genes del ARNr (DeLong, 1992) y PhyloChip (DeSantis *et al.*, 2007), hibridización cuantitativa del ARNr “Dot-Blot” (Stahl *et al.*, 1988), hibridización ADN/ADN (Lee & Fuhrman, 1991), medidas de re-asociación del ADN (Torsvik *et al.*, 1990), entre otras, que permiten obtener información de la composición de la comunidad microbiana en un ambiente.

Los métodos de huella genética permiten una comparación relativamente rápida entre las muestras y la detección de cambios en las comunidades a lo largo del tiempo y bajo diferentes condiciones ambientales o tratamientos (Muyzer & Smalla, 1998).

Estos métodos generan un patrón de bandas o picos que es considerado representativo de los grupos dominantes (Muyzer *et al.*, 1998) y que permite comparar comunidades microbianas con base en la presencia e intensidad relativa de bandas individuales o picos (Portillo & Gonzalez, 2008); a su vez esta información puede ser analizada usando índices de similitud (Webster *et al.*, 2007) o análisis de agrupamiento (Duineveld *et al.*, 1998). Entre los métodos más ampliamente utilizados está la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE).

La técnica de DGGE ha sido ampliamente utilizada en ecología microbiana (Niederberger *et al.*, 2009; Buesing *et al.*, 2009). Esta técnica permite separar mediante electroforesis, fragmentos de ADN del mismo tamaño pero con diferentes secuencias de nucleótidos. Este método tiene un alto grado de resolución y puede detectar diferencias en la secuencia de ADN de diez a una base, sin embargo, una única banda podría corresponder a diferentes bandas con el mismo contenido de Guanina y Citosina (G+C) pero con diferentes secuencias, y al mismo tiempo, se puede obtener más de una banda correspondiente a la misma población (Muyzer & Smalla, 1998). Diferentes estudios han combinado el método de DGGE y la secuenciación de las bandas dominantes para detectar los grupos predominantes en las muestras (Muyzer & Smalla, 1998).

- *Clonación y secuenciación de muestras ambientales*

Uno de los métodos más utilizados en estudios de la diversidad biológica de comunidades naturales es la clonación y secuenciación del gen ARN ribosómico. En términos generales, la clonación molecular se refiere al proceso de aislar una secuencia de ADN de interés, insertarlo en un plásmido y obtener múltiples copias de ella en un organismo (generalmente procarionta) por acción de la DNA polimerasa. La composición de la biblioteca de clones dependerá de la especificidad de los iniciadores y de la eficiencia con la cual los genes del ARNr sean amplificados y clonados.

Los clones obtenidos son secuenciados a partir del plásmido o vector que contiene el inserto de interés o bien a partir del producto de PCR obtenido a partir de dichos plásmidos. Las secuencias obtenidas son comparadas con secuencias depositadas en bases de datos como el GenBank del *The National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) que contiene todas las secuencias disponibles de diferentes genes y organismos, y el *Ribosomal Database Project* (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu>), que contiene exclusivamente secuencias alineadas de la subunidad pequeña del ARNr (Maidak *et al.*, 2001). A partir de las secuencias obtenidas se puede construir un árbol filogenético permitiendo una aproximación bastante robusta de las relaciones filogenéticas de las poblaciones presentes en el ambiente natural.

- *Sondas específicas para grupos microbianos*

La comparación entre las secuencias del 16S ARNr reportadas en bases de datos como GenBank, permite el diseño de oligonucleótidos o sondas complementarias a regiones variables para la detección de grupos específicos (Ovreas & Torsvik, 1998). Entre las técnicas que utilizan sondas específicas marcadas con fluorocromos y que permiten la detección de microorganismos por microscopía de epifluorescencia, está la hibridización fluorescente *in situ* (FISH por sus siglas en inglés *Fluorescent in situ hybridization*) (Amann *et al.*, 1990). Esta técnica ha sido ampliamente usada en microbiología ambiental para cuantificar grupos filogenéticos específicos (Amann *et al.*, 1995), para verificar la presencia de microorganismos cuyas secuencias de 16S ARNr hayan sido detectadas en bibliotecas de clones y para investigar su distribución y abundancia en las muestras respectivas (Olsen *et al.*, 1986).

2.2.2 Métodos dependientes de cultivo

El análisis de poblaciones microbianas dentro de comunidades naturales ha tenido ciertas limitaciones debido al uso de métodos tradicionales de cultivo. Estas limitaciones se han asociado a la dificultad de reproducir en el laboratorio las condiciones naturales en las cuales se desarrollan las comunidades microbianas, a la posible toxicidad del medio de cultivo, al efecto de la auxotrofia por pérdida de nutrientes, a la supresión de las bacterias de lento crecimiento debido al sobrecrecimiento de bacterias de rápido crecimiento y a la dificultad de reproducir en el laboratorio el desarrollo de interacciones inter e intraespecíficas que ocurre en la naturaleza (Schink, 2002; Stams *et al.*, 2006; Water & Bassler, 2005), ya que las comunidades microbianas en ambientes naturales, son complejos ensamblajes de poblaciones estructuradas y conectadas unas con otras a través de interacciones que han evolucionado a lo largo de millones de años de selección natural (Giovannoni *et al.*, 2007).

A pesar de estas limitaciones, el aislamiento de microorganismos propios de ambientes naturales sigue siendo una herramienta útil para el estudio de la fisiología, bioquímica y genética microbiana (Ben-Dov *et al.*, 2009), para confirmar observaciones de procesos ecológicos obtenidos en campo y para evaluar hipótesis originadas a partir del estudio de genomas (Giovannoni *et al.*, 2007).

Por tanto, con el fin de obtener cultivos puros de los microorganismos más abundantes en la naturaleza, se han hecho continuos esfuerzos para aumentar la probabilidad de aislamiento mediante la realización de medios con baja concentración de nutrientes y largos periodos de incubación (Eilers *et al.*, 2001; Janssen *et al.*, 2002), mediante la adición de fuentes de nutrientes no tradicionales, de moléculas señal o de compuestos inhibitorios para evitar el crecimiento de los microorganismos no deseados (Mukamolova *et al.*, 1998; Bruns *et al.*, 2002) y mediante el aislamiento por extinción de cultivo que consiste en diluir la muestra de interés hasta que muy pocos microorganismos permanezcan y posteriormente incubar la muestra diluida en presencia o ausencia de pequeñas cantidades de substratos orgánicos (Button *et al.*, 1998). Además, se han desarrollado técnicas como la micro-encapsulación que favorece el

desarrollo de células individuales sin restringir las interacciones microbianas (Zengler *et al.*, 2002).

Una vez se logra aislar y mantener los organismos en condiciones de laboratorio, se procede a su identificación, a través de una combinación de técnicas de identificación taxonómica.

2.2.2.1 Identificación taxonómica de los microorganismos cultivados

La taxonomía comprende tres actividades, la caracterización, la clasificación y la nomenclatura, las cuales están fuertemente interrelacionadas ya que la nomenclatura depende de la forma en la cual se ha clasificado un organismo y la clasificación depende de la información generada durante su caracterización (Tindall *et al.*, 2010).

El Comité Internacional de Sistemática Procariota (ICSP - *International Committee on Systematics of Prokaryotes*) a través del Código Bacteriológico rige la nomenclatura y establece los estándares mínimos para la descripción de nuevos taxones haciendo recomendaciones de caracteres y métodos para su evaluación, los cuales son revisados regularmente y publicados en el *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM) o en otras revistas microbiológicas (Tindall *et al.*, 2010).

En general, la descripción de un nuevo taxón procariota debe incluir información de su hábitat natural (ubicación geográfica y características fisicoquímicas) y de sus características fenotípicas y genotípicas, en lo que se conoce como “taxonomía polifásica” (Vandamme *et al.*, 1996).

2.2.2.1.1 Caracterización fenotípica

La caracterización fenotípica o expresión del genotipo, es útil para diferenciar entre taxones tanto a nivel de filo como de especie y subespecie. Mediante esta caracterización se describen las características de la colonia, características morfológicas, características de tinción, características fisiológicas, bioquímicas y quimiotaxonómicas, está última con el fin de obtener información de los constituyentes químicos de la pared, membrana y citoplasma.

2.2.2.1.2 Características genotípicas

La obtención de la información genómica incluye metodologías basadas en el análisis del ADN, que incluye la secuenciación del gen que codifica para la subunidad pequeña del 16S ARNr, la determinación del contenido G+C, la hibridización ADN-ADN, la detección de perfiles de agrupamiento de fragmentos de ADN que se basan generalmente en la variación característica de sitios de restricción genómica, en la presencia de inserciones y deleciones, secuencias repetidas, polimorfismo de un solo nucleótido u otras secuencias de variación distribuidas a través del genoma (Tindall *et al.*, 2010).

- Análisis del 16S ARNr

El análisis de la secuencia del 16S ARNr ha sido ampliamente usado en sistemática procariota por ser un marcador molecular que permite generar árboles genealógicos que representan líneas de descendientes. El análisis del 16S ARNr produce valores numéricos de similitud entre secuencias del 16S ARNr que puede ser usado como un límite para circunscribir taxones teniendo en cuenta que aunque la secuencia por sí sola no describe una especie, sí proporciona la primera evidencia de que una nueva especie ha sido aislada.

Se ha demostrado que la secuencia del 16S ARNr tiene un alto grado de resolución a un nivel taxonómico superior al de especie y que si dos cepas comparten menos del 97% de similitud en su secuencia de 16S ARNr se puede sugerir que no son miembros de la misma especie (Rosselló-Mora & Amann, 2001), mientras que si comparten más del 97% de similitud en su secuencia, se debe considerar utilizar métodos que proporcionen una mayor resolución taxonómica ya que el poder de resolución taxonómico a nivel de especie es muy limitado.

- Similitud ADN-ADN

La determinación de la similitud ADN-ADN de todo el genoma ha sido usada como una técnica estándar para delimitar una especie ya que se ha encontrado alto grado de correlación entre la similitud genómica de ADN y la similitud fenotípica (Stackebrandt & Goebel, 1994). La determinación se basa en la capacidad del ADN de reasociarse, en

condiciones experimentales apropiadas. El ADN de diferentes organismos puede reasociarse dependiendo de la similitud en sus secuencias de nucleótidos, permitiendo cuantificar el grado de relación, usualmente expresado como % de similitud (Stackebrandt & Goebel, 1994). Un valor de hibridización ADN-ADN igual o superior al 70% ha sido recomendado como un valor adecuado para identificar miembros de una especie (Wayne *et al.*, 1987), aunque este valor no es un límite absoluto.

- Contenido G+C del ADN

El contenido G+C del ADN, expresado generalmente como porcentaje, representa la cantidad de pares G+C en el genoma de un organismo, esta información es usada para asignar cepas a una especie determinada. Las cepas cuyas moléculas de ADN muestran menos del 5% de diferencia en su temperatura de fusión (ΔT_m) son incluidas dentro de una misma especie (Vandamme *et al.*, 1996).

- Técnicas de huella genética de ácidos nucleicos

Los métodos de huella genética pueden ser útiles para realizar identificaciones a nivel de especie y subespecie, determinando la diversidad infraespecífica. Los métodos de tipificación se basan en el análisis de fragmentos de restricción de todo el genoma o en la amplificación por PCR de fragmentos del genoma. Todas las técnicas se basan en separaciones electroforéticas y posterior visualización de los fragmentos de ADN (Roselló-Mora & Amann, 2001). Entre los métodos más usados están las técnicas de amplificación de fragmentos polimórficos (AFLP por sus siglas en inglés *Amplified Fragment Length Polymorphism*), análisis de fragmentos de restricción por electroforesis en campo pulsado (PFGE por sus siglas en inglés *Pulsed Field Gel Electrophoresis*), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD por sus siglas en inglés *Random Amplified Polymorphic DNA*), amplificación de elementos repetitivos (rep-PCR por sus siglas en inglés *Repetitive Element Primed PCR*) y ribotipificación, entre otros. El problema asociado a la mayoría de estos métodos es la dificultad de hacer comparaciones entre resultados obtenidos por distintos laboratorios, ya que a excepción de AFLPs y ribotipificación no hay metodologías estandarizadas (Tindal *et al.*, 2010).

- Secuenciación de genomas completos

El avance en las técnicas de secuenciación ha permitido el desarrollo de nuevas metodologías para inferir la relación genotípica entre microorganismos cercanamente relacionados basadas en la comparación de genomas completos. Aunque aún son pocos los genomas completos disponibles, existe una iniciativa denominada GEBA (*Genomic Encyclopedia of Bacteria and Archaea Project*-<http://www.jgi.doe.gov/programs/GEBA/index.html>) que busca estudiar la viabilidad de secuenciar el genoma completo de todas las cepas tipo disponibles.

La secuenciación de genomas completos puede ser útil para detectar nuevos marcadores filogenéticos y la reconstrucción de árboles taxonómicos más robustos basados en todos los genes del genoma central (Thompson *et al.*, 2009; Tindall *et al.*, 2010; Moore *et al.*, 2010). Esta información a su vez puede ser útil en la generación de un concepto de especie procariota.

2.3 CONCEPTO DE ESPECIE PROCARIOTA

Aunque, la especie ha sido considerada la unidad fundamental de los estudios de diversidad biológica, a la fecha no hay un concepto de especie que se ajuste a todos los grupos de organismos vivos, por lo cual, cada especialista utiliza de manera indiscriminada la palabra especie para describir unidades básicas de clasificación biológica. Actualmente, se han desarrollado más de 20 conceptos de especie para organismos eucariotas muchos de ellos basados en características de aislamiento reproductivo, similitud de caracteres y monofilia (Hull, 1997; Mayden, 1997), sin embargo, ninguno es aplicable a procariotas ya que en estos organismos no es fácil reconocer un hecho evolutivo ni tendencias históricas, debido a procesos como la transferencia horizontal de genes entre taxones distantemente relacionados, tasas variables de recombinación homóloga y ausencia de un registro fósil útil (Fraser *et al.*, 2009).

El problema en aceptar un concepto de especie generalmente radica en la dificultad de acoplar un *concepto* y una *definición práctica*, entendiendo *concepto* como las teorías de las fuerzas cohesivas (procesos ecológicos y genéticos) que generan grupos discretos de individuos genómica y fenotípicamente similares, y *definición práctica* como los

métodos que permitan reconocer y delimitar grupos de individuos tanto en la naturaleza como en el laboratorio (Doolittle & Zhaxybayeva, 2009).

En la actualidad se han propuesto diferentes conceptos de especies para organismos procariotas, siendo los más mencionados el concepto filofenético, el de ecotipo y el de linaje de metapoblaciones.

El concepto filofenético (Rosselló-Mora & Amann, 2001) define una especie como un grupo monofilético y coherente genómicamente de individuos que muestran un alto grado de similitud en muchas características independientes y es diferenciado por una propiedad discriminativa. Stackebrandt *et al.*, (2002), generaron una versión pragmática de este concepto y definieron una especie como una categoría que circunscribe un grupo coherente genómicamente de cepas individuales o aislados que comparte un alto grado de similitud en muchas de sus características independientes, evaluadas comparativamente utilizando métodos estandarizados.

El concepto de ecotipo (Cohan, 2002; 2006), define una especie como un grupo de individuos que pueden ser considerados idénticos en todas sus propiedades ecológicas. Cohan argumenta que las bacterias son especies ecológicas (ecotipos) que ocupan nichos discretos y cuya diversidad genética es sometida a procesos de selección periódica, la cual actúa como fuerza cohesiva purgando la diversidad genética dentro de cada ecotipo, pero permitiendo la divergencia entre ecotipos diferentes los cuales a su vez son capaces de coexistir dentro de una comunidad. Así mismo, cada ecotipo puede ser considerado monofilético por originarse a partir de un único individuo.

El concepto de linaje de metapoblación (Achtman & Wagner, 2008), describe que una especie es un grupo de subpoblaciones que puede presentar divergencia genética debido a procesos de microevolución, que está relacionado en un tiempo determinado y que evoluciona independientemente de otros linajes cuyos límites son establecidos por fuerzas evolutivas cohesivas. En este concepto no se tiene en cuenta características fenotípicas diagnosticables, aislamiento reproductivo, monofilia o divergencia ecológica. Mediante este concepto, libre de supuestos metodológicos, se acepta que las especies son unidades biológicas simples o complejas dependiendo del ambiente y su potencial genómico.

De los conceptos mencionados anteriormente en este estudio se adoptó la definición pragmática del concepto filofenético por facilitar la formación de grupos compactos distinguibles de acuerdo a los rasgos fenotípicos y genotípicos.

2.4 AMBIENTES ACUÁTICOS SALINOS

El agua cubre aproximadamente el 71% de la superficie terrestre y ocupa un volumen estimado de $1.38 \times 10^9 \text{ Km}^3$. El 96.1% del porcentaje de agua global se encuentra en los océanos, el 3.9% hace parte del agua continental que incluye los casquetes polares (1.74%), los depósitos subterráneos (1.72%) y los lagos, embalses, ríos, arroyos y humedad del suelo (0.04%) (Sigeo, 2005).

A su vez el agua continental se divide en agua de bajo contenido iónico o agua dulce ($< 1 \text{ g.L}^{-1}$ SDT) y en agua de alto contenido iónico o salina ($>10 \text{ g.L}^{-1}$ de SDT). La alta concentración iónica puede ser registrada en términos de conductividad eléctrica, y de acuerdo con esta, los ambientes salinos pueden ser categorizados como oligosalinos ($800\text{--}8.000 \mu\text{S.cm}^{-1}$), mesosalinos ($8.000\text{--}30.000 \mu\text{S.cm}^{-1}$), polisalinos ($30.000\text{--}45.000 \mu\text{S.cm}^{-1}$), eusalinos ($45.000\text{--}60.000 \mu\text{S.cm}^{-1}$), e hipersalinos (mayor a $60.000 \mu\text{S.cm}^{-1}$) (LaBaugh, 1989).

Las aguas salinas también pueden clasificarse de acuerdo con su composición iónica, en thalasoalinos y athalasoalinos. Los ambientes thalasoalinos como las salmueras, se originan por procesos de evaporación del agua de mar, estos ambientes reflejan la composición iónica del agua de mar, al menos durante los pasos iniciales de evaporación. La composición iónica comienza a cambiar significativamente cuando los procesos de evaporación alcanzan el límite de solubilidad del sulfato de calcio (CaSO_4) (a una concentración total de sal superior a $100\text{--}120 \text{ g.L}^{-1}$). Por tanto, las salmueras que entran en los estanques de cristalización de sal no tienen calcio (Ca^{2+}) ni sulfato (SO_4^{2-}). Durante la subsecuente precipitación de cloruro de sodio (NaCl) como halito, la composición iónica cambia nuevamente, y la concentración relativa de potasio (K^+) y magnesio (Mg^{2+}) incrementa. Las salmueras thalasoalinas se caracterizan por presentar pH neutro o ligeramente alcalino (7-8) (Oren, 2006).

Los ambientes athalasoalinos se caracterizan por presentar una composición iónica que puede variar significativamente con respecto al agua de mar. El Mar Muerto es un ejemplo de este tipo de ambientes, donde dominan los cationes divalentes, con concentraciones de magnesio (Mg^{2+}) y calcio (Ca^{2+}) que exceden las concentraciones de sodio (Na^+) y potasio (K^+). Como un resultado de la alta concentración de calcio (Ca^{2+}) la solubilidad de sulfato (SO_4^{2-}) es baja, y la suma de aniones monovalentes tales como cloro (Cl^-) y bromo (Br^-) constituye el 99.9% del total de aniones (Oren, 2006). Dentro de los ambientes athalasoalinos se encuentran ambientes con altas concentraciones de sal y elevados valores de pH (10-11), en los cuales predominan iones carbonato (CO_3^{2-}) y bicarbonato (HCO_3^-) además de cloro (Cl^-) y sulfatos (SO_4^{2-}) (Oren, 2002; Oren, 2006; Foti *et al.*, 2007).

Las aguas salinas incluyen regiones de los casquete polares, estuarios, lagos salinos y ciertos tipos de aguas subterráneas. Las aguas subterráneas pueden tener un origen meteórico, producto de la filtración del agua lluvia hacia los estratos porosos del subsuelo, origen marino, por la infiltración de agua de mar, u origen connato, que se refiere al agua presente en los poros de los sedimentos cuando se depositan y que se van perdiendo en el proceso de compactación (Younger, 2007).

Las características hidrogeoquímicas del agua subterránea permiten definir su procedencia, se ha establecido que agua con predominio de iones $Ca^{2+} - HCO_3^-$, es típica de acuíferos poco profundos que presentan recargas continuas de agua; agua con predominio de $Mg^{2+} - HCO_3^-$, es típica de acuíferos poco profundos que presentan intrusión de agua de mar; agua con predominio de $Mg^{2+} - Ca^{2+} - HCO_3^-$, es típica de acuíferos poco profundos en donde hay presencia de dolomitas ($CaMg(CO_3)_2$); agua con predominio de $Na^+ - SO_4^{2-}$, es bastante rara y resulta de la mezcla de aguas subterráneas antiguas ricas en Na^+ con aguas producidas durante la oxidación de pirita (FeS_2) o por evaporación de agua que previamente perdió el Ca^{2+} y el HCO_3^- por precipitación de calcita ($CaCO_3$); agua con alto contenido en $Ca^{2+} - Cl^-$, es generada por la disolución de evaporitas de cloruro de calcio ($CaCl_2$); agua rica en $Na^+ - Cl^-$, puede ser originada por agua de mar, por la disolución de halita ($NaCl$) o por la presencia de aguas subterráneas antiguas o connatas; y aguas con alto contenido en $Ca^{2+} - SO_4^{2-}$, provienen de acuíferos

sedimentarios con alto contenido de gypsum ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y por aguas subterráneas afectas por la oxidación de piritita y de otros minerales de azufre (Younger, 2007).

En Colombia se han reportado diferentes manantiales de agua salina a lo largo del valle medio del río Cauca, entre los departamentos del Valle del Cauca y Antioquia y en el departamento de Boyacá; estos manantiales presentan una concentración de sólidos disueltos totales que oscila entre 20 a 46 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y alto contenido en iones Ca^{2+} - SO_4^{2-} y Na^+ - Cl^- . Entre los pocos manantiales estudiados se encuentran Burila (Valle del Cauca), Salado de Consotá, La Cristalina, Marsella, Mápura, Opiramá (Risaralda) (Cortes y Cardona, 2006) y Salpa (Boyacá) (Alfaro, 2002).

2.5 COMUNIDADES MICROBIANAS EN SISTEMAS ACUÁTICOS SALINOS

El estudio de la composición microbiana de ambientes salinos, al igual que en muchos otros ambientes naturales, se ha realizado usando principalmente técnicas dependientes de cultivo e independientes de cultivo basadas en el análisis del gen que codifica para la subunidad pequeña del ARN ribosomal (Dong *et al.*, 2006).

Diferentes estudios han revelado que la capacidad metabólica de los organismos halotolerantes y halófilos es bastante amplia ya que se pueden encontrar organismos fotótrofos oxigénicos y anoxigénicos, heterótrofos aerobios y anaerobios, fermentadores, denitrificantes, sulfato reductores y metanógenos (Oren, 2002; Sabet *et al.*, 2009). Sin embargo, se ha observado que con el incremento en la salinidad la diversidad metabólica y de especies disminuye drásticamente (Benlloch *et al.*, 2002; Casamayor *et al.*, 2002; Jungblut *et al.*, 2005; Rothrock & García-Pichel, 2005).

El estudio de la diversidad microbiana a lo largo de gradientes salinos ha mostrado que la salinidad crea una barrera ambiental para las comunidades procariotas que habitan estos ambientes. En este sentido, Casamayor *et al.*, (2000), han reportado diferencias marcadas en la composición de las comunidades microbianas presentes en ambientes con concentraciones de sal (NaCl) menores al 10% (p/v), en ambientes con concentraciones entre 10 y 25% (p/v) y en ambientes con concentraciones mayores al 30% (p/v). Además, se ha observado que con el incremento de la salinidad, disminuye la diversidad microbiana pero aumenta su diversidad infraespecífica (ribotipos

cercanamente relacionados que muestran pocas diferencias en sus secuencias de 16S ARNr) (Benlloch *et al.*, 2002; Casamayor *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2006).

En particular, los ambientes que contienen salinidades superiores al 30% (p/v), denominados hipersalinos, están ampliamente distribuidos alrededor del mundo y han sido extensamente estudiados por ser uno de los hábitats de la Tierra más extremos debido a sus condiciones físicas y químicas (Benlloch *et al.*, 2002; Casamayor *et al.*, 2002; Litchfield & Gillevet 2002; Burns *et al.*, 2004, Maturrano *et al.*, 2006, Feazel *et al.*, 2008; Rosselló-Mora *et al.*, 2008).

Estos ambientes hipersalinos son habitados por organismo halófilos extremos que despiertan gran interés por su potencial aplicación industrial, por el estudio de sus características fisiológicas las cuales generarían hipótesis sobre la posibilidad de extinción y/o existencia de vida en Marte teniendo en cuenta las condiciones hipersalinas en ese planeta (Mancinelli, 2005), y por el aislamiento de organismos halófilos que han permitido estudiar la ecología de los halovirus (Porter *et al.*, 2005; Bath *et al.*, 2006).

El estudio de la diversidad microbiana de ambientes hipersalinos en diferentes sitios geográficos, ha revelado que frecuentemente estos ambientes mantienen una alta densidad celular ($10^6 - 10^8$ células.mL⁻¹), son ecosistemas altamente productivos (Oren, 2002; Burns *et al.*, 2004; Demergasso *et al.*, 2008; Clementino *et al.*, 2008) y con una gran uniformidad entre las comunidades microbianas (Oren, 2002).

Se ha reportado que los organismos predominantes en ambientes hipersalinos hacen parte del dominio *Archaea* y están cercanamente relacionados con organismos del orden *Halobacteriales* (filo *Euryarchaeota* clase *Halobacteria*) (Ochsenreiter *et al.*, 2002; Burns *et al.*, 2004; Oren, 2006b). También se han encontrado organismos del dominio *Bacteria* representados primordialmente por los fila *Proteobacteria* (de las clases α y γ -*Proteobacteria*) (Maturrano *et al.*, 2006; Pagaling *et al.*, 2009) y *Bacteroidetes*. En este último filo se han reportado principalmente organismos del género *Salinibacter* (Antón *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2006; Antón *et al.*, 2008; Baati *et al.*, 2008; Demargasso *et al.*, 2008; Sabet *et al.*, 2009), el cual presenta una alta microdiversidad infraespecífica (Clementino *et al.*, 2008) que podría generar distintas poblaciones ecológicas

(Casamayor *et al.*, 2002). En cuanto a *Cyanobacteria* se han encontrado los géneros halófilos relacionados con *Euhalothece*, *Cyanothece* y *Microcoleus* (Clementino *et al.*, 2008). En general, los patrones de diversidad observados en ambientes hipersalinos sugieren que la diversidad es fuertemente condicionada por el estrés osmótico al cual está expuesta la biota (Souza *et al.*, 2003).

Por otra parte, los estudios de diversidad microbiana relacionados con ambientes acuáticos salinos que presentan concentraciones de sal inferiores al 25% (p/v), han mostrado una densidad celular de 10^7 células.mL⁻¹ (Clementino *et al.*, 2008), gran diversidad y heterogeneidad microbiana, contrario a lo reportado para ambientes hipersalinos.

Perreault *et al.*, (2007) estudiaron las comunidades microbianas presentes en los sedimentos de dos manantiales salinos perennes ubicados en el Ártico Canadiense que se caracterizan por presentar una salinidad de 7.5-15.8% de sales, pH de 6.9-7.5 y altas concentraciones de sulfato (>2.300 mg.l⁻¹). En su estudio encontraron que las comunidades microbianas de sedimentos están relacionada con los fila *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes* y *Verrucomicrobia*, siendo, *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* los grupos dominantes. Dentro del dominio *Archaea* reportaron secuencias relacionadas con *Crenarchaeota* y *Euryarchaeota*. Por otra parte, al estudiar la composición de la comunidad microbiana en la columna de agua de los mismos manantiales salinos, Niederberger *et al.*, (2009) detectaron predominio de organismos quimiolitotróficos oxidadores de azufre relacionados con especies del género *Thiomicrospira*.

Clementino *et al.*, (2008) estudiaron la composición de la comunidad procariota en el agua de la laguna Araruama (Brasil), que presenta una salinidad promedio del 5.5% (p/v) de NaCl y pH de 8.0 y reportaron que la diversidad de organismos del dominio *Archaea* estaba relacionada con organismos aún no cultivados del filo *Euryarchaeota* y con organismos de las clases *Methanomicrobia* y *Methanococci*. Dentro del dominio *Bacteria* se observaron clones relacionados con los fila *Proteobacteria* (γ -*Proteobacteria*), *Actinobacteria* y *Cyanobacteria* (género *Synechococcus*).

Dong *et al.*, (2006) reportaron la composición de la comunidad microbiana en la interface agua-sedimento y sedimentos del lago salino Qinghai en China a 3196 metros de altura que presenta una salinidad de 1.25% (p/v) y un pH de 9.4. Los resultados indicaron predominio de organismos del filo *Proteobacteria* (*Alfa* (α), *Beta* (β) y *Gamma* (γ)-*Proteobacteria*), en las muestras de la interface agua-sedimento, y de bacterias Gram-positivas con bajo contenido de G+C (un subgrupo de Firmicutes), en los sedimentos anóxicos. La diversidad de *Archaea* fue más baja y las secuencias de los clones se relacionaron con secuencias de organismos no cultivados de los fila *Euryarchaeota* y *Crenarchaeota*, cercanamente relacionadas con secuencias recuperadas previamente de sedimentos ricos en metano.

De estos estudios es posible deducir que la composición de la comunidad microbiana es diferente entre los hábitats estudiados y esto podría estar relacionado con el efecto tanto de la discontinuidad entre hábitats como de los factores ambientales locales (Barberán & Casamayor, 2010).

Con respecto a la diversidad microbiana en ambientes marinos, se ha reportado principalmente la presencia de organismos de las clases α -*Proteobacteria* y γ -*Proteobacteria*.

Dentro de la clase α -*Proteobacteria* se ha reportado predominio de organismos de los grupos SAR11 (DeLong *et al.*, 2006; Gilbert *et al.*, 2008) y *Roseobacter* (Suzuki *et al.*, 1997; Buchan *et al.*, 2005), así como de diferentes géneros de los órdenes *Rhodospirillales* y *Rhizobiales* (Alonso-Sáez *et al.*, 2007; Feingersch *et al.*, 2010).

Dentro de la clase γ -*Proteobacteria*, se han reportado organismos relacionados con los grupos NOR5/OM60 (Kan *et al.*, 2008), que incluyen la especie *Congregibacter litoralis* (Fuchs *et al.*, 2007), uno de los primeros representantes de bacterias fototróficas anoxigénicas aerobias en esta clase (Feingersch *et al.*, 2010). Además, representantes de los grupos SAR92 y RAR86-I (Suzuki *et al.*, 2001; Cho & Giovannoni, 2004); *Oceanospirillales*, *Alteromonadales*, *Pseudomonadales*, *Vibrionales*, *Thiotricales* y *Chromatiales* (Feingersch *et al.*, 2010).

También se ha reportado la presencia de organismos de las clases *Sphingobacteria*, *Flavobacteria*, así como organismos del filo *Bacteroidetes/Chlorobi* y bacterias Gram-positivas que incluye *Actinobacterias* no cultivadas del grupo OM1 (Rappé *et al.*, 1997; Feingersch *et al.*, 2010) y del filo *Cyanobacteria* cuyos miembros más abundantes son los géneros *Synechococcus* y *Prochloococcus*, propios de aguas estratificadas.

2.6 FACTORES QUE AFECTAN LA COMPOSICIÓN DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS EN AMBIENTES SALINOS

La distribución de las comunidades microbianas en ambientes acuáticos, puede verse afectada tanto por factores espaciales como por factores ambientales (Langenheder & Ragnarsson 2007).

Entre los factores ambientales que más influyen en la composición de las comunidades microbianas está la salinidad (Wu *et al.*, 2006; Lozupone & Knight, 2007; Langenheder & Ragnarsson 2007; Barberán & Casamayor, 2010).

El efecto de la salinidad se ha visto fuertemente reflejado en los patrones de distribución de los principales grupos bacterianos planctónicos tales como α , β , y γ -*Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* (Wu *et al.*, 2006; Barberán & Casamayor, 2010). Con respecto a los organismos de las clases β -*Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Sphingobacteria*, se ha reportado una abundancia relativamente alta en ambientes de agua dulce y una disminución de su abundancia con el incremento de la salinidad (Glöckner *et al.*, 1999; Demergasso *et al.*, 2004; Kirchman *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006). Por el contrario, se ha reportado una correlación positiva entre la abundancia relativa de organismos de las clases α y γ -*Proteobacteria* y el incremento en la salinidad (Benlloch *et al.*, 2002; Humayoun *et al.*, 2003; Kirchman *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006), siendo usualmente la clase γ -*Proteobacteria* la que predomina en ambientes hipersalinos (Benlloch *et al.*, 2002; Humayoun *et al.*, 2003).

Con respecto a los patrones de diversidad β (diversidad entre áreas o a través de un gradiente ambiental), Barberán & Casamayor (2010) han reportado que en aguas superficiales de lagos terrestres salinos y de ambientes marinos, la presencia de organismos de las clases α y γ -*Proteobacteria* es controlada por la composición de sal (ambiente thalasoalino o athalasoalino), a diferencia de lo que ocurre con organismos

del filo *Bacteroidetes* cuyos patrones de diversidad β son afectados principalmente por la concentración de sal.

En general, el estudio de la composición microbiana y de los factores que determinan su distribución contribuyen en el entendimiento de la composición de las comunidades microbianas a escala global y de las fuerzas evolutivas que la forman (Ramette & Tiedje, 2006).

2.7 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS EN AMBIENTES SALINOS

El estudio de la composición de las comunidades microbianas en ambientes salinos ha adquirido importancia ya que permite profundizar en el conocimiento de la evolución temprana de la vida y la biosfera sobre la Tierra debido a las condiciones de estrés osmótico que prevalecieron durante su formación (Dundas, 1998; Knauth, 1998; Kunte *et al.*, 2002; Mancinelli, 2005) y además estos estudios podrían generar conocimiento sobre nuevas rutas metabólicas y propiedades fisiológicas de microorganismos halófilos/halotolerantes, interesantes en biotecnología (Bull *et al.*, 2000; De la Rosa-García *et al.*, 2007; Le Borgne *et al.*, 2008; Kebbouche-Gana *et al.*, 2009).

Desde el punto de vista biotecnológico los microorganismos halófilos han despertado gran interés no solo por sus mecanismos de adaptación, sino porque sus requerimientos nutricionales son generalmente simples ya que la mayoría puede usar un amplio rango de compuestos como única fuente de carbono y energía y porque por su capacidad para crecer a altas concentraciones de sal se minimiza el riesgo de contaminación durante los procesos de producción (Ventosa *et al.*, 1998).

Una de las aplicaciones de los microorganismos halófilos está relacionada con su capacidad para producir solutos compatibles (osmolitos orgánicos que contrarrestan el efecto de la presión osmótica y la baja actividad del agua debido a la salinidad). Estos compuestos han sido ampliamente estudiados por su utilidad como estabilizadores de biomoléculas (enzimas, ADN y membranas) y como moléculas protectoras en condiciones de alta salinidad, denaturación térmica, desecación y congelamiento (Galinski, 1992). Uno de los solutos compatibles más abundante en la naturaleza es la ectoína, comúnmente encontrado en bacterias halófilas heterotróficas aerobias (Galinski

1995) y se ha sugerido su aplicación como estabilizador en la PCR (Sauer & Galinski 1998). Otro soluto compatible, típicamente encontrado en bacterias fototróficas halófilas es la glicina-betaina, usado en plantas transgénicas como el maíz, algodón y tabaco para generar resistencia a altas concentraciones de sal y sequía (Shen *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2007). La trehalosa un compuesto encontrado en diferentes bacterias halotolerantes, puede ser usado como un crioprotector durante la liofilización de biomoléculas, pero también en la conservación de microorganismos por largos periodos de tiempo, ya que la estructura de la membrana celular es preservada en la presencia de este disacárido (Galinski & Tindall, 1992). Además, un estudio reciente muestra que la acumulación de trehalosa en una cepa de *Azospirillum brasilense* modificada genéticamente para favorecer la sobre expresión de este compuesto, mejora la tolerancia a la sequía y genera un aumento de biomasa (hojas y raíces) en plantas de maíz (Rodríguez-Salazar *et al.*, 2009).

Además, los microorganismos halófilos producen biopolímeros, tales como biosurfactantes que disminuyen la tensión superficial de compuestos como el aceite, incrementan su solubilidad y la movilidad de los hidrocarburos hidrofóbicos, favoreciendo su degradación, por lo cual pueden desempeñar un trabajo significativo en procesos de biorremediación en ambientes salinos contaminados con aceite (Kebbouche-Gana *et al.*, 2009).

Otro compuesto de interés es la bacteriorodopsina, encontrada principalmente en *Archaeas* halófilas extremas. Este es un pigmento de tipo retinol unido a la membrana celular que permite a los organismos usar la energía lumínica para llevar a cabo procesos bioenergéticos por la generación de un gradiente de protones (Oren, 1994; Lanyi, 1995). Se ha estudiado su aplicación en holografía, moduladores espaciales de luz, computación óptica y memorias ópticas de las cuales ya se han desarrollado varias patentes (Wise *et al.*, 2002).

La producción de enzimas intra y extracelulares es también de gran interés por ser activas a altas concentraciones de solutos. Se ha descrito la obtención de amilasas a partir de *Micrococcus halobius* (Onishi & Sonoda, 1979), lipasas de *Natronococcus* sp. (Boutaiba *et al.*, 2006) y esterasas de *Haloarcula marismortui* (Müller-Santos *et al.*, 2009), entre otras.

También se ha reportado actividad antifúngica de organismos halófilos como *Halomonas subglaciescola*, *Halobacillus litoralis*, *Marinococcus halophilus*, *Salinococcus roseus*, *Halovibrio variabilis* y *Halobacillus halophilus* contra *Botrytis cinerea* en plantas de tomate (Sadfi-Zouaoui *et al.*, 2008), y actividad antimicrobiana de cepas de los géneros *Aeromonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Shewanella*, *Stenotrophomonas*, aisladas de agua y sedimentos de ambientes salinos (De la Rosa-García *et al.*, 2007).

Por otra parte, el interés de producir plásticos biodegradables que reemplacen los plásticos derivados del petróleo, ha llevado al estudio de la producción biológica de polihidroxicanoatos (PHAs). Estos compuestos son poliésteres de reserva producidos por bacterias sometidas a condiciones de estrés, las cuales los sintetizan en varias formas químicas, entre las cuales está el polihidroxibutirato (PHB). La recuperación de estos compuestos a partir de organismos halófilos se facilita al exponer los microorganismos a bajas concentraciones de sal lo cual genera lisis celular (Ventosa *et al.*, 1998), la producción de PHB ha sido reportada en *Haloferax mediterranei* que puede acumular PHB hasta el 60% de su peso seco (Margesin & Schinner, 2001).

Además, los microorganismos halófilos pueden ser usados en la descontaminación de aguas residuales con alto contenido de sales y en la degradación de compuestos tóxicos en ambientes con altas concentraciones de solutos y baja actividad del agua (Le Borgne *et al.*, 2008).

En general, los estudios de diversidad de microorganismos halófilos y halotolerantes pueden abrir nuevos horizontes en el descubrimiento de novedades biológicas con posible aplicación biotecnológica.

1. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

El objetivo general del estudio es determinar la composición de las comunidades bacterianas de tres manantiales salinos ubicados en los departamentos de Risaralda y Boyacá.

Tres objetivos específicos serán desarrollados para llevar a cabo este estudio:

- a) Caracterizar la composición de los organismos del dominio *Bacteria* en dos manantiales salinos del departamento de Risaralda y en un manantial salino del departamento de Boyacá
- b) Determinar las características fenotípicas de miembros aislados de la comunidad microbiana de los tres manantiales estudiados.
- c) Determinar diferencias temporales y espaciales en la composición de las poblaciones más abundantes de los tres manantiales salinos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 DESCRIPCIÓN DE LOS SITIOS DE ESTUDIO

Para el desarrollo de este estudio se seleccionaron tres manantiales salinos, dos de los manantiales, el Salado de Consotá (SC) y La Cristalina (LC), se localizan en el departamento de Risaralda (Cordillera Central), el tercer manantial salino denominado Salpa (SP) se localiza en el departamento de Boyacá (Cordillera Oriental) (Figura 1).

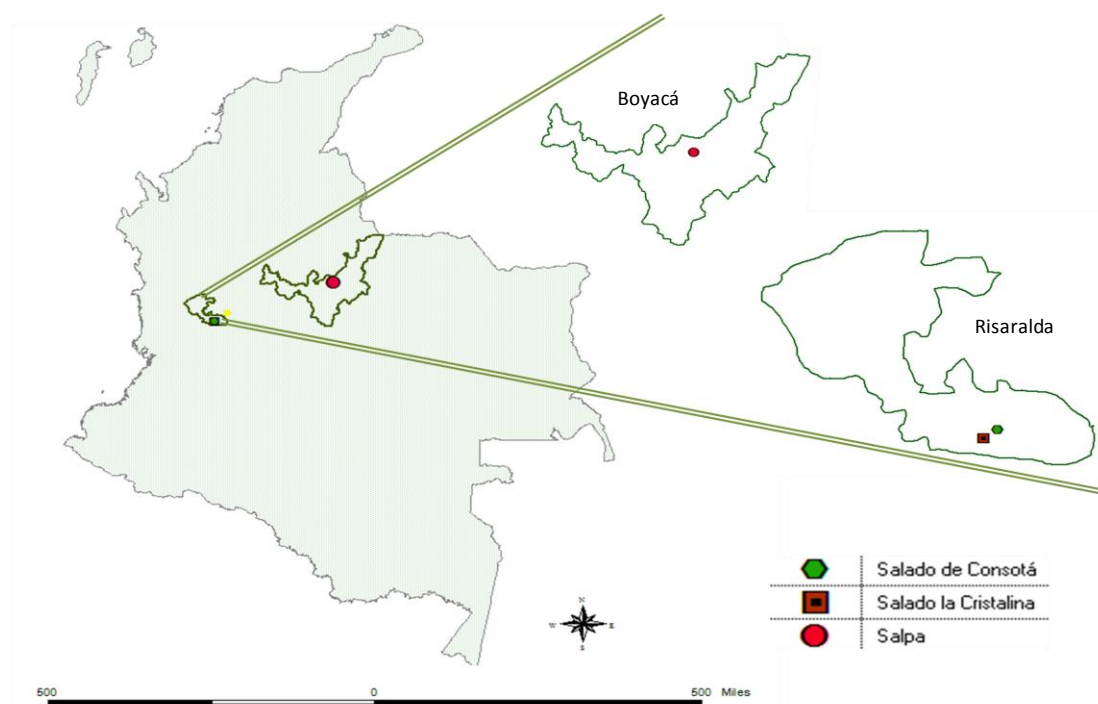


Figura 1. Ubicación geográfica de los manantiales Salado de Consotá, La Cristalina y Salpa en el mapa de Colombia.

4.1.1 Descripción de los manantiales del departamento de Risaralda

4.1.1.1 Manantial Salado de Consotá (SC)

El manantial SC está localizado al sur-oriente de la ciudad de Pereira en las coordenadas $4^{\circ}47'18.9''N$ $75^{\circ}41'35.0''W$, a una altura de 1.391 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m), sobre la llanura aluvial del río Consota, el cual recibe las aguas procedentes del manantial SC (Figura 2A, B y C).

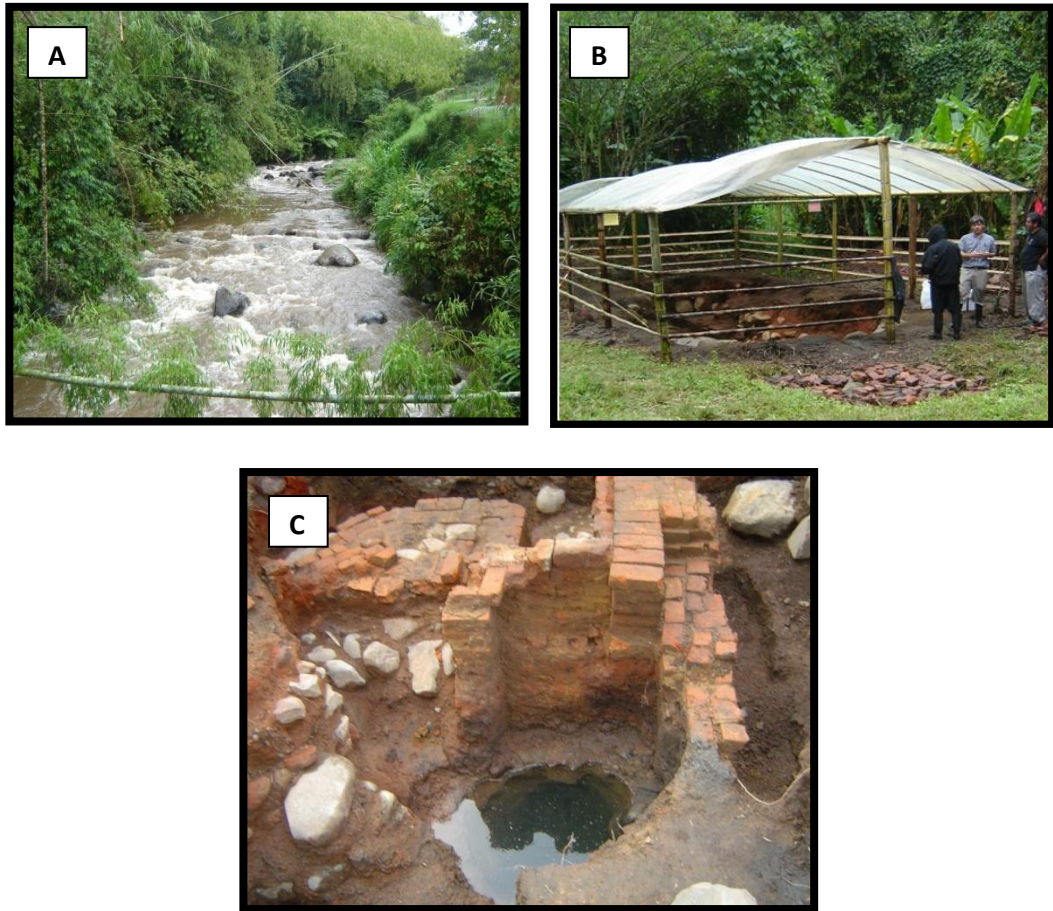


Figura 2. A) Vista del río Consota a la altura de la infiltración de agua del manantial SC. B) Sitio de exploración arqueológica donde se ubica el pozo de extracción del agua procedente del manantial SC. C) Pozo de extracción del agua procedente del manantial SC.

El manantial SC fue utilizado para la extracción de sal en épocas precolombinas según las crónicas escritas en el periodo de la conquista española (Pino, 2004). Aunque el manantial fue abandonado se re-descubrió en el año 2003 gracias al trabajo desarrollado en la Universidad Tecnológica de Pereira (UTP) y al Proyecto UTP-GTZ (*German Society for Technical Cooperation*), a partir de la información obtenida de los pobladores más antiguos de la región que generó aproximaciones para la localización del manantial y a partir de mediciones de conductividad eléctrica a lo largo de la quebrada El Chocho y del río Consota hasta encontrar el punto de filtración del agua salada como se observa en la figura 3 (Cano, 2004; Tistl, 2004).

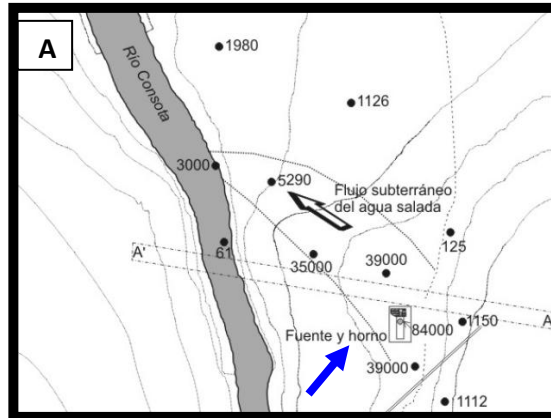


Figura 3. Ubicación del río Consota y de la fuente de agua salada, la cual se indica con la flecha de color azul. En esta imagen cada punto representa uno de los sitios en los cuales se realizó la apertura de un pozo de sondeo para detectar mediante la lectura de conductividad eléctrica el punto de infiltración del agua salada al río Consota. Los valores indican la conductividad del agua en $\mu\text{S}/\text{cm}$. Fuente: Tistl, 2004.

Desde su re-descubrimiento el manantial ha despertado interés arqueológico, debido al hallazgo de gran cantidad de cerámica y estructuras para la fabricación de sal que datan de 2.500 a 1.830 años antes del presente (A.P) y de periodos históricos de la conquista y la colonia española (Cano, 2004). La importancia del SC para los antiguos pobladores se evidencia en la acuarela “Salinas del Consotá” del año 1.852 elaborada por Henry Price, quién participó en la Tercera Fase de la Comisión Corográfica (1850-1859) dirigida por Agustín Codazzi, con el fin de realizar un mapa oficial de la geografía de Colombia (Ardila & Lleras, 1985; Mendoza, 2008) (Figura 4).

Debido a su importancia histórica el manantial ha sido declarado Zona de Influencia Arqueológica de Interés Nacional (Resolución ICANH 097 de 2004) y Bien de Interés Cultural de Orden Nacional (Resolución MINCULTURA 0998 de 2004).

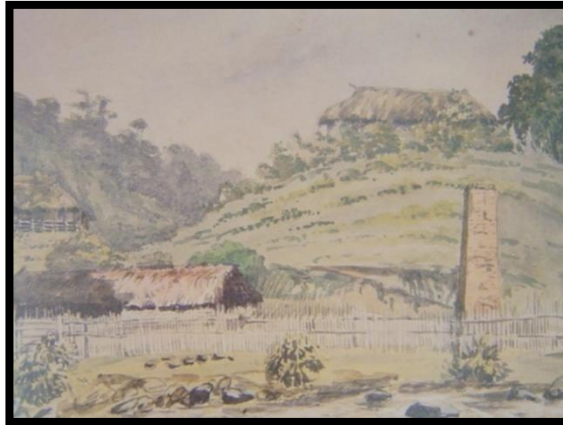


Figura 4. Acualera “Salinas del Consotá” elaborada por Henry Price. Dueño de la obra Juan Kalb, Medellín

- Generalidades de la vegetación aledaña al manantial SC

Durante los muestreos realizados en el manantial SC entre los años 2006 y 2008 no se observó ningún tipo de vegetación rodeando el pozo de extracción de agua del manantial (Figura 5A, B y C), sin embargo, en el último muestreo realizado en el año 2009 se evidenció la presencia de pastos rodeando el pozo del manantial producto de su inminente abandono (Figura 5D). En ningún momento se observó la presencia de macrófitas o algas en el agua del manantial.





Figura 5. Manantial SC durante los muestreos realizados; A) Vista del manantial SC en Abril de 2006; B) Vista del manantial SC en Enero de 2008; C) Vista del manantial SC en Junio de 2008; D) Vista del manantial SC en Junio de 2009.

4.1.1.2 La Cristalina (LC)

El manantial LC está localizado al sur-occidente de la ciudad de Pereira en la vereda de Arabia, en predios de la finca La Cristalina, en las coordenadas $4^{\circ}45'50.1''N$ $75^{\circ}43'55.1''W$ a una altura de 1.288 m.s.n.m y aproximadamente a cuatro metros de la quebrada Cestillal a la cual llegan las aguas procedentes del manantial (Figura 6A y B).



Figura 6. A) Quebrada Cestillal ubicada a cuatro metros del pozo de agua del manantial LC. B) Pozo del manantial LC.

Aunque no hay reportes exactos que mencionen la utilización de esta fuente en la producción de sal tal como ocurrió con el manantial SC, Vélez (2005) reportó en su libro “Cartago, Pereira, Manizales: cruce de caminos históricos” el proceso de

extracción de sal en la vereda de Arabia, y cita el texto escrito por Fray Pedro Simón, que dice: “tienen fuentes cerca del pueblo de agua salada en que se hace la sal con un modo maravilloso y es que echan el agua en pilas de cobre, no en barro porque no cuaja y cuando se va espesando al fuego la apartan y vuelven a desleír con agua salada y volviendo a hervir con ella hasta que se cuaja en granos, y no en pan como los de este reino, la sacan y envuelta en un paño la meten y aprietan entre ceniza fría, con que salen los granos de la sal muy blancos y buenos. De arroba y media de agua se saca una libra de sal”. Esta información permite deducir que esta vereda también alberga gran cantidad de fuentes de agua salada de importancia para los antiguos pobladores de la región y posiblemente una de estas fuentes fue el manantial LC.

Actualmente, el manantial es usado con fines terapéuticos por algunos pobladores de la vereda (comunicación personal con trabajadores de la finca La Cristalina). Por tal razón, antes de recolectar las muestras de agua en este sitio, se retiró el agua almacenada en el pozo que recolecta el agua que fluye del manantial y se esperó hasta que se recargara nuevamente y rebosara (Figura 7A, B).





Figura 7. A) Imagen del pozo del manantial LC después de descargar el agua contenida. B) Imagen del pozo del manantial LC completamente lleno.

- Generalidades de la vegetación aledaña al manantial LC

En el área aledaña al manantial solo se observó vegetación herbácea, principalmente pastos. Aunque debido a la estructura en concreto que demarca el pozo por el cual brota el agua del manantial no se observó influencia directa de la vegetación que lo rodea, pero sí se observó presencia de algas en el interior del pozo (Figura 8).



Figura 8. Imagen del manantial LC en el cual se observa la presencia de algas.

4.1.1.3 Generalidades hidrológicas y geológicas de la zona aledaña a los manantiales SC y LC

Los manantiales SC y LC están ubicados en el piedemonte de la vertiente occidental de la cordillera Central. Por su ubicación en posición media de la zona de convergencia intertropical, el régimen de lluvias se caracteriza por dos periodos de lluvia y dos periodos de sequía o de pocas lluvias. La temporada de lluvias ocurre entre los meses de Abril a Mayo, y de Octubre a Noviembre. La época de sequía ocurre entre los meses de Enero a Febrero y de Julio a Agosto. La precipitación media anual es del orden de 2.225 mm/año (Carder-Forec, 2000). Su temperatura media es de 21°C y la humedad relativa es de 79%.

Debido a las características hidrogeoquímicas de estos manantiales, Cortes & Cardona (2006), los han clasificado como manantiales de agua salada de tipo clorurada sódica con déficit en magnesio (Mg^{+2}) y potasio (K^{+}) comparada con la concentración media del agua de mar. La concentración del anión cloro (Cl^{-}) es de aproximadamente 14.500 $mg.L^{-1}$ en el manantial SC y de 11.000 $mg.L^{-1}$ en el manantial LC. En cuanto a los cationes, la concentración aproximada del ion sodio (Na^{+}) es de 6.500 $mg.L^{-1}$ en el manantial SC y de 5.600 $mg.L^{-1}$ en el manantial LC y de calcio (Ca^{2+}) de 3.000 $mg.L^{-1}$ en el manantial SC y de 952 $mg.L^{-1}$ en el manantial LC.

Desde el punto de vista geológico, Pereira pertenece a una secuencia vulcano-sedimentaria de edad cretácica, la cual se formó en un ambiente marino (Grupo Diabásico), con intrusiones de gabros y dioritas (Tistl, 2004). Tanto el manantial SC como el manantial LC se ubican en depósitos aluviales, a pocos metros de drenajes mayores (Cortes & Cardona, 2006) y cerca o sobre un trazo de falla geológica, lo cual favorece el ascenso del agua a la superficie; el manantial SC se localiza entre el cruce de la Falla Consota y una de las fallas geológicas del sistema Romeral (Tistl, 2004), mientras el manantial LC se ubica en cercanías del paso de la Falla de Montenegro (Cardona & Cortes, 2006).

Teniendo en cuenta la situación geológica de estas fuentes, su ubicación dentro de un régimen de subducción anterior al arco volcánico y las altas concentraciones de Ca^{2+} ,

Tistl (2004) sugiere que el origen de estos manantiales está asociado a procesos de deshidratación de la placa litosférica oceánica posterior al proceso de subducción.

La subducción se define como el proceso de hundimiento de una placa litosférica bajo otra, cuando dos secciones de la litósfera de la Tierra chocan (Aoya *et al.*, 2002). Generalmente, la subducción se presenta porque la litósfera oceánica, de mayor peso específico, es la que subduce bajo la litósfera continental, de menor peso específico. El lento movimiento de la placa oceánica hacia las capas más profundas de la Tierra, provoca un aumento lento de las temperaturas en las rocas del antiguo fondo del mar, hasta más de 1.000 °C y a una profundidad de aproximadamente 100 kilómetros las rocas de la placa oceánica se funden parcialmente. Debido al aumento de temperatura y presión, durante todo el proceso de subducción, la corteza oceánica y sus sedimentos liberan agua que fluye a la superficie debido a las características estructurales de la zona (Tistl, 2004).

Las características hidrogeoquímicas, geológicas e históricas de estos dos manantiales los convierte en sitios de interés para la realización de estudios biológicos, que permitan una mayor comprensión de su biota y en particular de la comunidad microbiana presente.

4.1.2 Descripción del manantial Salpa (SP) ubicado en el departamento de Boyacá

El manantial SP se localiza en el extremo noreste del área geotérmica de Paipa en el valle alto del río Chicamocha, en las coordenadas 05°46'09.2"N 73°06'09.7"W y a una altura de 2.517 m.s.n.m (Figura 9) (Alfaro *et al.*, 2010).

Este manantial ha sido estudiado por estar ubicado en la zona geotérmica de Paipa y por su alto contenido de sales. Actualmente, el manantial alimenta lagunas de evaporación para la producción industrial de sulfato de sodio (Na₂SO₄). Este compuesto se emplea tradicionalmente en la fabricación de detergente sólido, en la fabricación del papel *kraft*, y de vidrios especiales (García del Cura & Ordóñez, 1991).



Figura 9. Vista del manantial salino Salpa (SP).

- Generalidades de la vegetación aledaña al manantiales SP

En el área aledaña al manantial se observó durante todas la épocas de muestreo predominio de vegetación herbácea, principalmente de pastos. En ningún muestreo se observó la presencia de plantas acuáticas ni algas macroscópicas.

4.1.2.1 Generalidades hidrológicas y geológicas de la zona aledaña al manantial SP

El clima se caracteriza por presentar un régimen bimodal con dos épocas lluviosas de Marzo a Mayo y de Septiembre a Noviembre y dos épocas de menor precipitación de Junio a Agosto y de Diciembre a Febrero, la precipitación promedio anual es del orden de 944 mm/año. La temperatura promedio es de 13-15°C y la humedad relativa de 74%.

El manantial SP es una fuente salada de aproximadamente 25 metros de profundidad, presenta una baja descarga de metano (CH_4) y una fuerte descarga de CO_2 (Alfaro, 2005) (Figura 10).



Figura 10. Medición de gases en el pozo principal de Salpa. La abundante espuma refleja una alta descarga de gas. Fuente: Alfaro, 2005.

El estudio preliminar de la geoquímica del agua del manantial, mostró un contenido de sales cerca de 55.000 mg.L^{-1} y concentraciones de iones sodio (Na^+) de 13.250 mg.L^{-1} , de sulfato (SO_4^{-2}) de 20.800 mg.L^{-1} y relativamente bajas concentraciones de magnesio (Mg^{+2}) de 22.5 mg.L^{-1} , por lo cual ha sido clasificada como agua de tipo sulfatada sódica (Alfaro, 2002a). La composición iónica del manantial se explica por los procesos de disolución de evaporitas continentales lacustres con alto contenido de mirabilita ($\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) y tenardita (Na_2SO_4) (Alfaro, 2002).

Desde el punto de vista geológico, el manantial salino SP se localiza en la parte axial de la Cordillera Oriental, entre las Fallas geológicas El Hornito y el Bizcocho (Figura 11), en una región donde el basamento está conformado por rocas metamórficas y sedimentarias del Paleozoico, así como intrusivas y extrusivas del Jurásico que afloran en el Macizo de la Floresta, hacia el NE del municipio de Paipa (Boyaca) (Velandia, 2003).

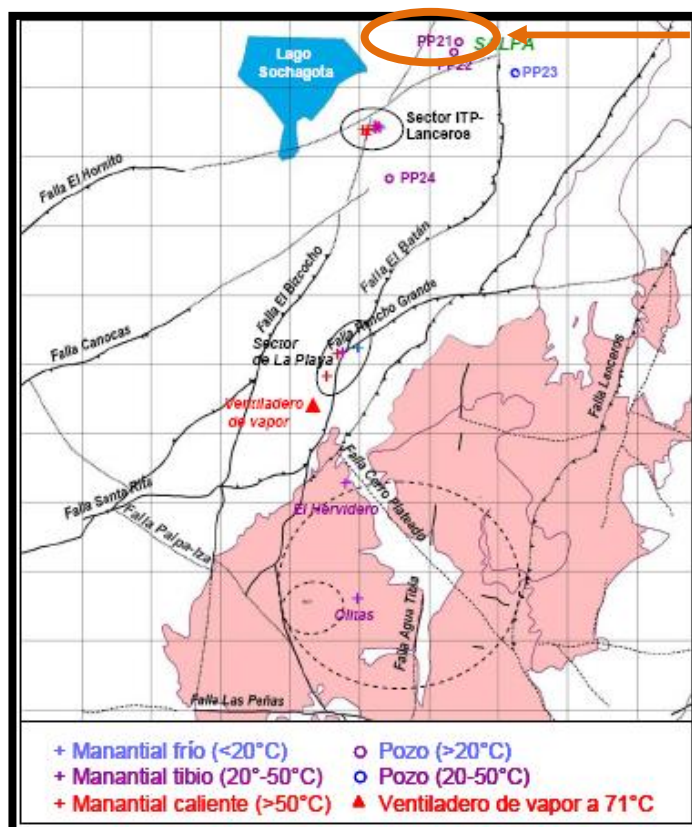


Figura 11. Localización de manifestaciones superficiales del sistema geotérmico de Paipa y fallas geológicas. La flecha muestra la ubicación del pozo PP21 o pozo principal de donde se tomaron las muestras para este estudio. Fuente: Alfaro, 2002.

Tanto la ubicación geográfica como las características hidrogeoquímicas de este manantial, lo hacen idóneo para el estudio de la composición de la comunidad microbiana y su comparación con las comunidades microbianas de los otros dos manantiales seleccionados.

4.2 MUESTREOS Y MEDICIONES

Los muestreos en el manantial SC y LC se realizaron en Abril de 2006, Marzo de 2008, Agosto de 2008 y Mayo de 2009. En el manantial SP se realizaron en Junio de 2006, Enero de 2007, Marzo de 2008 y Junio de 2009.

Teniendo en cuenta que los manantiales son fuentes naturales de caudal continuo, se realizó un muestreo puntual introduciendo los frascos de muestreo a la máxima profundidad posible. La profundidad a la cual se tomó las muestras en el manantial SC

estuvo entre 90 a 100 cm, en el manantial LC entre 70 y 80 cm y en SP entre 100 y 120 cm.

Para la determinación de la composición química del agua, se tomó un litro de agua en un recipiente de vidrio estéril y previamente purgado con agua del manantial antes de tomar la muestra definitiva. Las muestras fueron almacenadas en hielo durante un tiempo máximo de tres horas antes de ser llevados al laboratorio para su análisis.

Para la caracterización isotópica del agua se tomaron 500 mL de agua de cada uno de los manantiales en recipientes plásticos que fueron llenados en su totalidad para evitar la presencia de burbujas que pudieran alterar el contenido isotópico de la muestra.

Para la realización de recuentos microbianos por técnicas de tinción y de FISH, se tomaron 500 mL de muestra en frascos plásticos; las muestras se fijaron *in situ* con formaldehído al 2% (v/v) y fueron mantenidas a temperatura ambiente.

Para el desarrollo de técnicas dependientes de cultivo se recolectó en cada sitio de muestreo 100 mL de agua en botellas de vidrio estériles para ser usados como inóculos microbianos y cinco litros de agua en garrafas plásticas, previamente purgadas con agua del manantial, para la realización de los medios de cultivo utilizados en las diferentes series de aislamiento. Las muestras fueron mantenidas a baja temperatura hasta su llegada al laboratorio en la Pontificia Universidad Javeriana (PUJ) de Bogotá.

Para el desarrollo de técnicas independientes de cultivo se recolectó en cada uno de los manantiales tres muestras puntuales de cinco litros, las cuales fueron mantenidas a baja temperatura hasta su llegada al laboratorio de la PUJ en donde se almacenaron a 4°C mientras eran procesadas. Las muestras del manantial SP fueron procesadas cinco horas después de su recolección. Las muestras de los manantiales SC y LC fueron procesadas después de aproximadamente 24 horas después de su recolección.

Todos los recipientes usados fueron rotulados con el nombre del sitio de muestreo, las coordenadas de ubicación, la fecha de recolección y el tipo de análisis para el cual se tomaba la muestra.

Una vez recolectadas las muestra se realizó la determinación *in situ* del pH, utilizando un potenciómetro (HACH) y de la temperatura, usando un conductivímetro (HACH-Conductivity/TDS).

4.3 CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGUA DE LOS MANANTIALES

El análisis de la composición química del agua proveniente de los manantiales SC y LC, fue realizado en el Laboratorio de Química Ambiental de la Facultad de Ciencias Ambientales de la Universidad Tecnológica de Pereira (UTP), mientras las muestras tomadas en el manantial SP fueron analizadas en Analquim LTDA (Análisis químicos y tratamiento de aguas) en Bogotá.

Se determinó la conductividad eléctrica, sólidos disueltos totales (SDT), cloruro, potasio, calcio, sodio, magnesio, nitrato, sulfato, fósforo total, hierro, siguiendo las metodologías estándar descritas en *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005) (Tabla 1).

Tabla 1. Métodos utilizados para el análisis fisicoquímico de las muestras de agua

Ensayo	Métodos
Conductividad eléctrica	Electrométrico (2510B)
Sólidos disueltos totales (SDT)	Gravimétrico (2540C)
Cloruros (Cl^{2-})	Potenciométrico (4500 ClD)
Potasio (K^{+})	Absorción atómica- Horno de grafito (3111B-3111D)
Calcio (Ca^{2+})	Absorción atómica- Horno de grafito (3111B-3111D)
Sodio (Na^{+})	Absorción atómica- Horno de grafito (3111B-3111D)
Magnesio (Mg^{+2})	Absorción atómica- Horno de grafito (3111B-3111D)
Nitrato (NO_3^{-})	Colorimétrico(4500- NO_3 -B)
Sulfato (SO_4^{2-})	Fotométrico(4500- SO_4^{2-} E)
Fosforo total (P- PO_4)	Fotométrico (4500-P)
Hierro (Fe^{3+})	Absorción atómica- Horno de grafito (3111B-3111D)

4.3.1 Análisis de las variables fisicoquímicas

Los parámetros fisicoquímicos se sometieron a dos tipos de análisis, uno de los análisis consistió en determinar las diferencias de cada uno de los parámetros evaluados entre sitios de muestreo mediante un análisis de varianza (ANOVA) y el segundo análisis

consistió en examinar la relación existente entre las variables usando un análisis de componentes principales (ACP). A excepción de los valores de pH todos valores fueron transformados usando \log_{10} .

Antes de realizar el ANOVA se verificó que los datos de cada variable se ajustaran a una distribución normal; para ello se realizó la prueba de bondad de ajuste a una distribución normal de Kolmogorov Smirnov; posteriormente se comprobó la homogeneidad de varianzas de los datos de cada variable, utilizando la prueba de Levene. Cuando se cumplió el supuesto de normalidad pero no el de homogeneidad de varianzas, se utilizó el T2 de Tamhane. Cuando el análisis de ANOVA mostró diferencias significativas entre los parámetros evaluados, se realizó la prueba de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey y de Sheffé para realizar las comparaciones múltiples de medias y determinar específicamente entre qué sitios existe la diferencia. Los análisis se realizaron con el programa SPSS v 16.0 (IBM SPSS Data Collection).

Por otra parte, los parámetros fisicoquímicos fueron sometidos a un análisis de componentes principales (ACP), un método de modelamiento multidimensional que se basa en combinaciones de cálculo lineal entre numerosas variables, con el fin de examinar la relación existente entre ellas (Leps & Smilauer, 2003).

El ACP se realizó para las 13 variables que fueron determinadas en los tres sitios de muestreo. Las variables incluidas en el análisis fueron estandarizadas (substrayendo la media y dividiendo por la desviación estándar) y transformadas ($\log(x+1)$), siguiendo las recomendaciones de ter Braak & Smilauer (1998). El ACP se realizó usando el programa Canoco for Windows 4.5 (Biometrics-Plant Research International) (ter Braak & Smilauer, 2002).

4.4 COMPOSICIÓN ISOTÓPICA DEL AGUA

La determinación de los isotopos estables del oxígeno (O^{18}) y del hidrógeno (deuterio - H^2) y del isotopo radiactivo del hidrógeno tritio (H^3), fue realizada por espectrofotometría de masas (SIRMS - *Stable Isotope-Ratio Mass-Spectrometer*) en el Laboratorio de Isotopía Ambiental de la Universidad de Waterloo, en Ontario, Canadá.

Los isótopos O^{18} y H^2 que integran la molécula de agua, se consideran trazadores hidrológicos y permiten determinar tiempos de tránsito, tipos de agua y en general, investigar el origen del agua subterránea (Rodríguez, 2004).

Por otra parte, la determinación del H^3 permite determinar el tiempo de permanencia del agua en un acuífero. Este isótopo tiene una vida media de 12.56 años. El decaimiento radioactivo, que equivale a la emisión de radiación, reduce la concentración de este isótopo a la mitad de su concentración original en 12.56 años. El valor de H^3 del agua lluvia reciente ha sido inferido en 8 unidades de tritio (UT), por lo cual, valores de tritio de 4 UT corresponderían a agua infiltrada hace 12.5 años; valores de 2 UT a agua infiltrada hace 24 años; valores de 1 UT a agua con alrededor de 50 años de haber sido infiltrada y valores menores de 1 UT a agua con más de 50 años de haber sido infiltrada y que geohidrológicamente se califica como agua antigua (Clark & Fritz, 1997).

4.5 CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DE LOS MANANTIALES SALINOS

La caracterización de la composición de las comunidades microbianas se llevó a cabo determinando sus características morfológicas, la abundancia de grupos microbianos ampliamente reportados en ambientes acuáticos mediante FISH, generando inventarios biológicos mediante el aislamiento de organismos y evaluación de sus características fenotípicas y genotípicas y, a partir de la utilización de métodos independientes de cultivo usando como marcador molecular el gen que codifica para la subunidad pequeña del 16S ARNr.

4.5.1 Características morfológicas de las comunidades microbianas presentes en los manantiales salinos SC y SP

Para observar la comunidad microbiana *in situ* se realizó microscopía electrónica de barrido en los manantiales SC y SP. Para favorecer el establecimiento de biopelículas microbianas, se depositaron diez láminas de vidrio estériles de 22 x 22 mm en soportes plásticos que permitieran dejarlas sumergidas dentro de la columna de agua de cada manantial. Las láminas permanecieron sumergidas durante un tiempo de 8, 12, 24 y 48 horas, tiempo en el cual se retiraban tres láminas. Después de retirar las láminas de la fuente, éstas fueron sumergidas en una solución de glutaraldehído (Sigma) al 2.5% (v/v)

(solución fijadora) preparada en *buffer* fosfato 0.1 M a pH 7.4 (Mezcla de 95 mL de solución A (NaH_2PO_4 0.2 M) con 405 mL de solución B (Na_2HPO_4 0.2 M)) por lo menos durante una hora. Las láminas fueron lavadas en una solución de *buffer* fosfato (estéril) 0.1 M a pH 7.4 para eliminar el glutaraldehído presente. Posteriormente, las láminas se dejaron sumergidas en una nueva solución de *buffer* fosfato (estéril) hasta su evaluación por microscopia.

La evaluación microscópica se realizó siguiendo el protocolo descrito por Glauert (1975) que consistió en:

1. Introducir las láminas en una solución fresca de glutaraldehído (ProSciTech) al 3% (v/v) preparado en un *buffer* de cacodilato de sodio ($\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (BDH) 0.1 M a pH 7.4 (Se trabajó con una solución de $\text{Na}(\text{CH}_3)_2 \cdot \text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ al 0.2 M: 4.28 g /100 mL de agua desionizada, y para obtener el pH deseado se agregó 5.4 mL de HCl 0.2 M por cada 100 mL de solución de cacodilato), durante 2 horas a 4°C.
2. Realizar tres lavados de 5 minutos cada uno usando *buffer* cacodilato 0.1 M con sacarosa (BDH) al 4% (p/v), pH 7.4.
3. Realizar una post-fijación en una solución acuosa de tetróxido de osmio (ProSciTech) al 1% (p/v) pH 7.4 durante una hora a temperatura ambiente.
4. Realizar tres lavados de cinco minutos cada uno con *buffer* cacodilato 0.1 M, pH 7.4.
5. Someter las láminas a series ascendentes (25%, 50%, 70%, 85%, 95% y 100% (v/v)) de etanol (BDH) durante 10 minutos cada una, sin permitir que las muestras se sequen en ningún momento del procedimiento.
6. Secar las láminas usando un sistema de secado al vacío *Denton Vacuum Critical Point dryer* durante aproximadamente 40 minutos.

Cubrir las muestras con oro usando un *sputter-coated* (BioRad SC500) antes de su observación y obtención de imágenes digitales con un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 200, operado a 100kV.

4.5.2 Determinación del número total de células microbianas y detección de grupos microbianos particulares

La determinación del número total de células microbianas se realizó por tinción de las células con 4,6-diamidino-2-fenilindol diclorohidrato (DAPI) (Sigma) y la detección de grupos microbianos particulares se realizó usando la técnica FISH siguiendo la metodología descrita por Pernthaler *et al.*, 2001.

Para mantener la integridad morfológica de las células al realizar el procedimiento de tinción con DAPI y de FISH, se realizó la fijación de las células presentes en la muestra de agua añadiendo formaldehído (Scharlau) a una concentración final de 2% (v/v) a 500 mL de agua recién colectada, siguiendo el protocolo descrito por Porter & Feig, (1980).

Posteriormente, las células fueron recolectadas mediante filtración a través de membranas de policarbonato blanco (poro de 0.22 μm y 47 mm de diámetro, GTTP Millipore). Con el fin de facilitar los recuentos microbianos mediante una adecuada dispersión de las células en las membranas de filtración, se realizó la filtración de diferentes volúmenes de agua, 25, 50, 100 y 200 mL. Por último, las membranas de filtración se lavaron dos veces con 10 mL de agua del manantial previamente esterilizada por filtración, para eliminar el formaldehído residual.

Las membranas de filtración se secaron al aire y se cortaron en partes más pequeñas (aproximadamente 16 partes se obtenían de una membrana de 47 mm de diámetro). Las membranas que no eran procesadas inmediatamente fueron almacenadas a -20°C .

4.5.2.1 Recuento total de células

La tinción de células se realizó siguiendo el protocolo descrito que se describe a continuación:

1. Impregnar las membranas de filtración obtenidas después del proceso de fijación y filtración, con una solución de DAPI a una concentración de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ durante 10 minutos.
2. Lavar las membranas con agua desionizada estéril durante un minuto.
3. Pasar las membranas rápidamente por una solución de etanol (MolLabs) al 70% (v/v) y dejar secar al aire.

4. Colocar las membranas sobre una lámina portaobjeto, adicionar sobre cada membrana una gota de Citifluor AF1 (Citifluor Ltd), para evitar la pérdida de fluorescencia durante los recuentos, y cubrirlas con láminas cubreobjetos. De esta forma, las membranas pueden almacenarse a -20°C hasta su lectura.

Los recuentos de células se realizaron en un microscopio de epifluorescencia (Nikon-Eclipse 50i) equipado con un objetivo 100X PANFLUOR y un filtro de excitación triple DAPI-FITC-TRITC (Nikon).

4.5.2.2 Detección selectiva de grupos microbianos particulares usando la técnica de FISH.

Se realizó la detección de organismos del dominio *Archaea* y *Bacteria*. Dentro del dominio *Bacteria* se realizó la detección de organismos de las clases *Alfaproteobacteria* (α -*Proteobacteria*), *Betaproteobacteria* (β -*Proteobacteria*) y *Gammaproteobacteria* (γ -*Proteobacteria*) utilizando sondas complementarias a regiones conservadas del gen 16S o 23S ARNr.

La detección de organismos del dominio *Bacteria* se realizó usando la sonda de oligonucleótidos EUB338, la detección de organismos del dominio *Archaea* usando la sonda ARCH915, la detección de organismos de la clase α -*Proteobacteria* usando la sonda ALF968, la detección de organismos de la clase β -*Proteobacteria* usando la sonda BET42a, organismos de la clase γ -*Proteobacteria* usando la sonda GAM42a. Además, se utilizó la sonda NON338 como control negativo (Tabla 2).

Las sondas fueron sintetizadas, purificadas y conjugadas con los fluorocromos Alexa flour 488 o 546 en Invitrogen (USA).

La hibridización se realizó impregnando las membranas de filtración obtenidas después del proceso de fijación y filtración de las células con 20 μ l de *buffer* de hibridización (Tabla 3) que contenía la sonda de oligonucleótidos a utilizar a una concentración final de 50 ng.mL⁻¹.

Tabla 2. Sondas de oligonucleótidos usadas en este estudio.

Sonda	Secuencia (5´-3´)	Blanco en el rRNA (posición de anillamiento)*	Especificidad	(%) Formamida/ Concentración de NaCl (mM)	Referencia
EUB338	GCTGCCTCCCGTAG GAGT	16S, (338-355)	Mayoría domino <i>Bacteria</i>	35/80	Amann <i>et al.</i> 1990
ARCH915	GTGCTCCCCGCCA ATTCCT	16S, (915-934)	Mayoría dominio <i>Archaea</i>	20/225	Stahl & Amann 1991
ALF968	GGTAAGGTTCTGCG CGTT	16S, (968)	<i>Alphaproteobacteria</i>	20/225	Weisse, 1993
BET42a	GCC TTC CCA CTT CGT TT	23S, (1027-1043)	<i>Betaproteobacteria</i>	35/80	Manz <i>et al.</i> , 1992.
GAM42a	GCCTTCCACATCG TTT	23S, (1027-1043)	<i>Gammaproteobacteria</i>	35/80	Manz <i>et al.</i> 1992.
NON338	ACTCCTACGGGAG GCAGC	-	Control negativo	35/80	Amann <i>et al.</i> , 1990

*Los números hacen referencia a la numeración realizada en *Escherichia coli* (Brosius *et al.*, 1981).

Tabla 3. *Buffer* de hibridización para las sondas de oligonucleótidos evaluadas en este estudio

Reactivo	Volumen	Concentración final en el <i>buffer</i> de hibridización
NaCl 5 M	360µl	900mM
Tris/HCl 1 M	40µl	20mM
Formamida	Depende de la sonda utilizada	-
SDS 10% (p/v)	2µl	0.01%
H ₂ O	Hasta 2mL	

La hibridización se llevó a cabo a una temperatura de 46°C durante 90 minutos en cajas de petri forradas con papel aluminio y dentro de las cuales se depositaba papel absorbente impregnado con el *buffer* de hibridización (sin adición de la sonda), para mantener una atmósfera húmeda.

Posteriormente, las membranas se incubaron en 20 mL de *buffer* de lavado (Tabla 4) a 48°C durante 15 minutos, para eliminar sondas con unión inespecífica y el exceso de sonda.

Tabla 4. *Buffer* de lavado para eliminar las sondas de oligonucleótidos evaluadas en este estudio.

Reactivo	Volumen	Concentración final en el <i>buffer</i> de hibridización
NaCl 5 M	Depende de la concentración de formamida usada en el <i>buffer</i> de hibridización.	-
Tris/HCl 1 M	1 mL	20 mM
EDTA 0.5 M	500 μ l	5 mM
SDS 10% (p/v)	50 μ l	0.01%
H ₂ O	Hasta 50 mL	

Después, las membranas de filtración se secaron al aire antes de ser colocados sobre láminas portaobjetos y de ser impregnados con Citifluor AF1 para evitar la pérdida de fluorescencia. Las láminas que no fueron observadas al microscopio inmediatamente fueron almacenadas a -20°C hasta su lectura.

Los recuentos de células se realizaron en un microscopio de epifluorescencia (Nikon-Eclipse 50i) equipado con un objetivo 100X PANFLUOR y un filtro de excitación triple DAPI-FITC-TRITC (Nikon).

4.5.2.3 Recuento de células

El recuento total de células y de los grupos microbianos detectados usando la técnica de DAPI y FISH, se realizó por duplicado. Los recuentos se realizaron contando 50 campos visuales por membrana, si se observaba un número menor de 30 células por campo, y 20 campos visuales si se observaba un número mayor de células, hasta llegar como mínimo a contar 300 células por muestra siguiendo las recomendaciones de Kirchman *et al.*, (1982).

Los recuentos microbianos se expresaron como células por mililitro (cel.mL^{-1}) usando la fórmula:

$$\text{Total de células} = (\text{Número promedio de celular por campo} \times F) / \text{Volúmen filtrado mL}$$

Donde, F se obtiene al dividir área útil del filtro por el área examinada.

Se determinó si los recuentos presentaban diferencias significativas entre los sitios de muestreo y entre épocas de muestreo, mediante el estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis *one-way* AOV ($p < 0.05$), usando el programa Statistix versión 9.0.

4.5.3 Generación de inventarios biológicos a partir del aislamiento de microorganismos haloterantes y/o halófilos aerobios y anaerobios heterotróficos

Para favorecer el aislamiento de organismos halófilos y/o halotolerantes aerobios y anaerobios, se preparó un medio básico (MB) aerobio (MB-AER) y un MB anaerobio (MB-ANA). Tanto el MB-AER como el MB-ANA fueron preparados con agua del manantial en estudio (previamente filtrada) suplementada con 1 mL.L^{-1} de solución de oligoelementos (Un litro de agua destilada contenía 0.06 g de ZnCl_2 , 0.1 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.06 g de H_3BO_3 , 0.12–0.19 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.025 g de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.025–0.035 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g de AlCl_3 anhidra, 0.03 g de Na_2SeO_3 y 1.5 mL de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ diluido en HCl al 25% (v/v)), además, el MB-ANA fue suplementado con 0.5 g.L^{-1} de monohidrato de L-cisteína hidrociorada (Sigma) y 1 mL.L^{-1} de resazurina (Sigma) al 0.1% (p/v). El pH de los medios se ajustó con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) (Merck) al 10% (p/v), a 6.5 para las series de los manantiales SC y SP y a 8.0 para las series de cultivo del manantial LC, teniendo en cuenta los datos de pH tomados *in situ* de cada manantial.

Después de ajustar el pH de los medios, se transfirió un volumen de 5 mL de medio de cultivo de la serie MB-AER a tubos de ensayo. Por otra parte, el medio de cultivo MB-ANA fue calentado hasta ebullición y posteriormente enfriado en presencia de un flujo constante de gas nitrógeno (N_2). Se transfirieron 5 mL del medio a tubos Hungate y se taparon herméticamente con tapón de goma perforable, después, se realizó un intercambio de fase gaseosa con una mezcla de nitrógeno: dióxido de carbono ($\text{N}_2:\text{CO}_2$) (80:20), para eliminar trazas de oxígeno presentes en la atmósfera gaseosa de los tubos, siguiendo las técnicas anaerobias descritas por Hungate (1969). Los medios de cultivo fueron esterilizados a 121°C a 15 libras de presión (psi) durante 20 minutos.

Teniendo en cuenta que los microorganismos halófilos de los dominios *Archaea* y *Bacteria* tienen un amplio espectro metabólico (Le-Borgne *et al.*, 2008), se utilizaron diferentes sustratos orgánicos comúnmente reportados como materia orgánica disuelta

en sistemas acuáticos proveniente del medio ambiente circundante o de fuentes autóctonas como el fitoplancton, bacteriopláncton y perifiton ya sea por la producción de exopolisacáridos, muerte celular o liberación de exudados (Norman *et al.*, 1995; Gremm & Kaplan, 1997). Además, algunas series fueron suplementadas con antibióticos para favorecer el aislamiento de organismos del dominio *Archaea* tal como se ha descrito anteriormente (Elshahed *et al.*, 2004).

Después de esterilización, los MB-AER fueron suplementados con 0.2 g.L⁻¹ de extracto de levadura (Sigma) (MB-EXT) y diferentes fuentes de carbono (Tabla 5). Además, algunas series fueron suplementadas con 75 µg.mL⁻¹ de kanamicina (Sigma) (MB-KANA) o 75 µg.mL⁻¹ de ampicilina (Sigma) (MB-AMP). Los antibióticos fueron preparados en agua desionizada y esterilizados por filtración, usando membranas de 0.22 µm de tamaño de poro (Millipore). Los MB-ANA fueron suplementados con 0.05 mL de sulfuro de sodio (Na₂S·9H₂O) (Sigma) al 2% (p/v), 0.1 mL de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) (Merck) al 10% (p/v), 0.2 g.L⁻¹ de extracto de levadura, aceptores de electrones como sulfato de sodio (Na₂SO₄) (Sigma), tiosulfato de sodio (Na₂SO₃) (Sigma) y nitrato de potasio (KNO₃) (Merck), todos a una concentración final de 10 mM. Tanto las fuentes de carbono como los aceptores de electrones se adicionaron a cada tubo a partir de soluciones estériles anaerobias preparadas en agua reducida (Hungate, 1969).

Tabla 5. Fuentes de carbono adicionadas a los medios de cultivo MB-AER y MB-ANA

	Compuesto	Concentración
Donadores de electrones	Metanol (Merck)	5 mM
	Etanol (MolLabs)	5 mM
	Glicerol (Promega)	5 mM
	Acetato de sodio (Sigma)	5 mM
	Ácido Piruvico (Sigma)	5 mM
	Ácido succínico (Sigma)	5 mM
	Glicina (Sigma)	5 mM
	Casaminoácidos (Sigma)	0.5 g.L ⁻¹

Tabla 5. (Continuación) Fuentes de carbono adicionadas a los medios de cultivo MB-AER y MB-ANA

	Compuesto	Concentración
Donadores de electrones	Peptona (Oxoid)	0.5 g.L ⁻¹
	Gelatina (Sigma)	0.5 g.L ⁻¹
	D(+)Glucosa (Carlo Erba)	5 mM
	L(-)Arabinosa (Sigma)	5 mM
	D(+)Xilosa (Sigma)	5 mM
	D-Ribosa (Sigma)	5 mM
	Tween 80 (Sigma)	100 µL.L ⁻¹
	Tributil <i>O</i> -acetilcitrate	0.25 mM
	Almidón (Sigma)	0.5 g.L ⁻¹

4.5.3.1 Inoculación de las series de cultivo

Una vez se prepararon los medios de cultivo, los enriquecimientos se realizaron inoculando 1 mL del agua del manantial (como inóculo microbiano) por cada 5 mL de medio de cultivo. Posteriormente se incubó a 30°C en oscuridad y sin agitación.

Las series de cultivo se evaluaron periódicamente por microscopia usando un microscopio de contraste de fase (Nikon *i50*) usando un objetivo de 100X PANFLUOR.

4.5.3.2 Aislamiento de cepas microbianas

Una vez se observó crecimiento, se realizó una segunda siembra en las mismas condiciones de cultivo. Posteriormente, se realizó un tercer repicaje en medio sólido para lograr el aislamiento de los organismos presentes. Para ello, se realizaron diluciones seriadas de 10⁻¹ hasta 10⁻¹⁰. Las diluciones de 10⁻¹ a 10⁻³ se realizaron en medio líquido y las diluciones 10⁻⁴ hasta 10⁻¹⁰ en medio sólido usando agar bacteriológico (Oxoid) a una concentración de 10 g.L⁻¹ (para las series aerobias) o agar noble (Sigma) a una concentración de 20 g.L⁻¹ (para las series anaerobias).

El desarrollo de colonias fue monitoreado regularmente mediante observación al estereoscopio. Una vez identificadas y descritas las morfologías de las colonias, se seleccionaron las colonias presentes en la última dilución positiva y se procedió a su aislamiento en condiciones aerobias, mediante aislamiento en placa por estrías, o en

condiciones anaerobias, bajo flujo de gas N₂ siguiendo la técnica descrita por Hungate (1969). Este procedimiento se realizó al menos dos veces hasta obtener cultivos axénicos. La pureza de las cepas fue verificada por observación al microscopio y repicaje en medio enriquecido con extracto de levadura (2 g.L⁻¹) y glucosa (20 mM) hasta observar un único morfotipo.

4.5.3.3 Conservación de organismos aislados

Los organismos aislados fueron catalogados e incluidos en la colección de microorganismos de la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA). Los cultivos se preservaron en glicerol al 20% (v/v) a -70°C.

4.5.3.4 Estudio polifásico de las cepas aisladas

Después de realizar los aislamientos microbianos, se realizó la extracción de ADN de cada una de las cepas y secuenciación parcial del 16S ARNr (~ 800 pb) con el fin de realizar un primer reconocimiento taxonómico de los microorganismos...Véase el numeral 4.5.3.4.2...

Con base en la información obtenida del análisis de las secuencias parciales del 16S ARNr se seleccionaron aquellos microorganismos que presentaron un porcentaje de similitud menor al 97% con organismos previamente aislados, para la realización de un detallado estudio polifásico, que consistió en determinar sus características fenotípicas (tinción de Gram, morfología y estructuras celulares, metabolismo y condiciones de salinidad, temperatura, pH óptimas de crecimiento, presencia de quinonas y ácidos grasos de la membrana celular) y genotípicas (determinación del contenido G+C y secuenciación completa del 16S ARNr).

A los microorganismos con un porcentaje de similitud igual o superior al 97% se les realizó una caracterización fenotípica que incluía tinción de Gram, morfología, metabolismo y la determinación del rango de salinidad en el cual pueden crecer.

4.5.3.4.1 Caracterización fenotípica

- **Morfología y estructura de la célula bacteriana**

La determinación preliminar de la morfología celular y movilidad se realizó con microscopia en contraste de fases (Nikon i50).

Además, para obtener detalles más finos de la morfología celular y de la presencia y posición de flagelos, se utilizó microscopia electrónica realizando tinción negativa. La preparación de las células se realizó siguiendo el protocolo descrito por Glauert (1975) que se presenta a continuación:

1. Tomar una gota de suspensión microbiana en fase exponencial y colocarla sobre una rejilla de carbón-celulosa (ProScitech). Esperar 30 segundos para permitir la sedimentación de las células.
2. Retirar el exceso de fluido con un papel de filtro con precaución de no secar la muestra completamente y añadir una gota de agua destilada, después de unos segundos retirar el exceso de fluido con papel de filtro.
3. Añadir una gota de acetato de uranilo (BDH) al 1% (p/v) y esperar de 15 a 30 segundos antes de retirar el exceso de colorante con papel de filtro y permitir que se seque.

Las muestras se examinaron y fotografiaron usando un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1200EX operado a 80kV.

- **Determinación de estructuras celulares internas**

La observación de las estructuras internas de las células se realizó por microscopia electrónica de secciones ultradelgadas siguiendo el método estándar propuesto por Glauert, (1975).

Las células se obtuvieron después de centrifugar 5 mL de cultivo microbiano en fase de crecimiento exponencial a 3000 r.p.m. durante 5 minutos. En todos los pasos que se describen a continuación las células fueron centrifugadas de igual forma.

Fijación

1. Agregar al sedimento bacteriano glutaraldehído (ProScitech) al 3% (v/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente, lavar con *buffer* cacodilato (BDH) 0.1M a pH 7.4 toda la noche.
2. Agregar tetróxido de osmio (BDH) al 1% (p/v) durante 30-60 minutos, lavar dos veces agregando agua destilada durante 5 minutos.
3. Agregar acetato de uranilo (BDH) 1-2% (p/v) durante 20-30 minutos y lavar con agua destilada durante 5 minutos.

Deshidratación

4. Agregar concentraciones crecientes de etanol (BDH) y de acetona (BDH) de la siguiente forma:
Etanol al 50%: dos veces durante 5 minutos cada uno.
Etanol al 70%: dos veces durante 10 minutos cada uno.
Etanol al 90%: dos veces durante 10 minutos cada uno.
Acetona al 90%: dos veces durante 10 minutos cada uno.
Acetona al 100%: dos veces durante 15 minutos cada uno.

Infiltración

5. Añadir una mezcla de volúmenes iguales de acetona (BDH) al 100% y de resina EPON 812 y esperar durante una hora.

Polimerización

6. Llevar al horno de secado a 70°C durante 8 horas.

Ultramicrotomía (ultramicrotómo con cuchilla de diamante)

7. Generar cortes de 1-2 μm de espesor y examinar por microscopia de luz para seleccionar las áreas de resina en las cuales la muestra está embebida, encontrar el área de interés u orientación de la muestra y evaluar la calidad general del método de preparación.
8. Posteriormente, obtener cortes de 50 a 100 nm de espesor y depositarlos en cuadrículas de cobre de 200 mallas.

Método de tinción positiva de los cortes ultradelgados

9. Agregar a la cuadrícula una gota de acetato de uranilo (ProSciTech) 1% (p/v) durante 10 minutos

10. Lavar la cuadrícula con agua destilada y secar con papel de filtro.

11. Poner una gota de solución de citrato de plomo de Reynolds (Reynolds, 1963) durante 20 minutos.

La preparación fue examinada y fotografiada usando un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1200EX operado a 80kV.

- **Metabolismo microbiano**

La determinación de las características metabólicas se realizó en medio sintético aerobio (Tabla 6) o anaerobio (Tabla 7) y usando como inóculo cultivos microbianos de menos de 24 horas de inoculación. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y subcultivando el microorganismo al menos una vez en las condiciones de estudio antes de realizar las lecturas finales.

Tabla 6. Composición del medio sintético básico aerobio

Componente	Concentración g/l
KH ₂ PO ₄ (Merck)	0.3
K ₂ HPO ₄ (Merck)	0.3
NH ₄ Cl (Merck)	1
NaCl (Merck)	23
KCl (Carlo Erba)	0.1
CaCl ₂ ·2H ₂ O (Sigma)	0.1
Extracto de levadura (Sigma)	0.05
Solución mineral de elementos traza (Balch <i>et al.</i> 1979) (Anexo A)	10 mL

Tabla 7. Composición del medio sintético básico anaerobio

Componente	Concentración g/l
KH ₂ PO ₄ (Merck)	0.3
K ₂ HPO ₄ (Merck)	0.3
NH ₄ Cl (Merck)	1
NaCl (Merck)	23
KCl (Carlo Erba)	0.1
CaCl ₂ ·2H ₂ O (Sigma)	0.1
Extracto de levadura (Sigma)	0.05
Solución mineral de elementos traza (Balch <i>et al.</i> 1979) (Anexo A)	10 mL
L-Cisteína- HCl (Sigma)	0.5
Resazurina (Sigma) 0.1% (p/v)	1 mL

Nota: Antes de inocular el medio, se adicionó a cada tubo que contenía 5 mL de medio 0.1 mL de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Sigma) 2 % (p/v) y 0.1 mL de NaHCO_3 (Sigma) 10% (p/v). Los microorganismos anaerobios fueron cultivados siguiendo las técnicas anaerobias descritas por Hungate (1969).

- **Determinación de metabolismo fermentativo**

La capacidad para crecer en condiciones anaerobias se determinó inoculando 1 mL de cultivo microbiano en 5 mL de medio sintético básico anaerobio (Tabla 7). Se utilizó como fuente de carbono el sustrato original de aislamiento del microorganismo.

El crecimiento microbiano se determinó por microscopia de contraste de fase y mediante lecturas espectrofotométricas de la densidad óptica (DO) a 580 nm (Jenway 6400), registrando la DO inmediatamente después de realizar la inoculación y después de 24, 48 y 72 horas dependiendo de la velocidad de crecimiento del microorganismos.

- **Determinación de la utilización de diferentes aceptores de electrones**

Se determinó la capacidad de los microorganismos de realizar respiración anaerobia usando nitrato (NO_3^-) (Merck), sulfato (SO_4^{2-}) (Sigma), sulfito (SO_3^{2-}) (Sigma), tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) (Sigma), azufre elemental (S^0) (Merck) e hierro férrico (Fe^{3+}) (Sigma) como aceptores externos de electrones.

- **Reducción de nitrato**

La utilización de nitrato de sodio (NaNO_3) (10 mM) como aceptor de electrones se determinó en medio sintético anaerobio (Tabla 7), suplementado con la fuente de carbono en la cual se aislaron los microorganismos en estudio. La reducción de NO_3^- fue determinada usando el *kit Nitrite Test (Aqua One)* usando el protocolo descrito por el fabricante. Se utilizó como control negativo el medio sin inocular.

- **Reducción de sulfito, sulfato, tiosulfato y azufre elemental**

Se evaluó la capacidad de los microorganismos de reducir SO_3^{2-} (2mM), SO_4^{2-} (20mM), $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (20mM) y S^0 (20 g.L⁻¹), usando el método de Cord–Ruwisch (1985).

Este método consiste en determinar la concentración de sulfuro de hidrógeno (H_2S) producido después de reducir los compuestos de azufre mencionados, agregando 0.1 mL de cultivo microbiano a 4 mL del reactivo de Cord-Ruwisch que contiene sulfato de cobre (II) pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 5 mM y ácido clorhídrico (HCl) 50 mM. La reacción se leyó espectrofotométricamente a 480 nm y los valores de absorbancia se compararon con una curva patrón de sulfuros.

La curva patrón se realizó preparando una solución anaerobia de sulfuro de sodio ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) (Sigma) a una concentración final de 100 mM, a partir de esta solución se realizaron soluciones con concentraciones de 2 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM y 25 mM de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. Posteriormente se tomó 0.1 mL de cada solución y se mezcló con 4 mL del reactivo de Cord-Ruwisch, se realizó la lectura espectrofotométrica, se registró la absorbancia para cada una de las concentraciones conocidas y se realizó una gráfica de absorbancia vs concentración, con la cual se calculó la concentración de las muestras desconocidas. Se utilizó como control negativo el medio sin inocular.

- **Reducción de hierro férrico (Fe^{3+})**

La reducción de Fe^{3+} se evaluó en medio sintético anaerobio que contenía $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de citrato férrico de amonio ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{FeNH}_3$) (Sigma) (Lovley & Phillips, 1988). La reducción de Fe^{3+} fue inferida cuando el color rojo del óxido de Fe^{3+} cambiaba a un precipitado negro y se observaba una clarificación del medio de cultivo. Se utilizó como control de la reacción medio de cultivo sin inocular.

- **Capacidad de fijación de nitrógeno gaseoso**

Para determinar la capacidad de fijación de nitrógeno gaseoso, los microorganismos se cultivaron en el medio NFb (*nitrogen free broth*) (Tabla 8) libre de nitrógeno que contiene malato como fuente de carbono (Döbereiner & Day, 1976). La determinación de la capacidad para reducir acetileno fue realizada como lo describió Witty & Minchin (1988), usando la cepa *Azospirillum forbidum* (ATCC 29707^T) como cepa de referencia.

Las cepas se inocularon en medio NFb semisólido durante 24 horas a 28 °C. Después de 24 horas de crecimiento se extrajo 0.5 mL de aire de la fase gaseosa con una jeringa de 10 mL y se reemplazó por 0.5 mL de acetileno de la fase gaseosa del tubo (10% de la

fase gaseosa del tubo inoculado). Posteriormente, se incubó a 28 °C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, una muestra de 1 mL de la muestra gaseosa se inyectó en un cromatógrafo de gases (SHIMADZU), adaptado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna de nitrógeno Porapak de acero inoxidable (3.2 mm x 2 m, 80/100 mesh). El inyector, el horno y el detector se ajustaron a temperaturas de 110 °C, 90 °C y 250 °C respectivamente. Se utilizó nitrógeno gaseoso como gas transportador con una velocidad linear de 4.5 cm.s⁻¹.

Tabla 8. Composición del medio de cultivo Nfb

Componente	Concentración g/l
Ácido málico	5.0
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
NaCl	0.2
CaCl ₂	0.02
Solución de micronutrientes (Döbereiner <i>et al.</i> , 1976)	2 mL
Azul de bromotimol en KOH 0.2 N (0.5% p/v)	2 mL
Fe EDTA (1.64 % p/v)	4 mL
KOH	4.5
Solución de vitaminas*	1 mL

*La solución de vitaminas contenía 0.1 g.L⁻¹ de biotina y 0.2 g.L⁻¹ de pirodixal HCl.

Al mismo tiempo, se determinó la presencia del gen *nifH* realizando una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada con los iniciadores FGPH19/PolR y PolF/AQER (Simonet *et al.*, 1991, Poly *et al.*, 2001) como describe Demba Diallo *et al.*, (2004) (Tabla 9), usando *Azotobacter vinelandii* (ATCC 478^T) como control positivo (Demba Diallo *et al.*, 2004).

Tabla 9. Iniciadores usados para la amplificación del gen *nifH*

Iniciador	posición de anillamiento*	Secuencia (5' a 3')	Referencia
FGPH19	25	TAC GGC AAR GGT GGN ATH G	Simonet <i>et al.</i> , 1991
PolR	425	ATS GCC ATC ATY NTCR CCG GA	Poly <i>et al.</i> , 2001
AQER	436	G ACG ATG TAG ATY TCC TG	Poly <i>et al.</i> , 2001
PolF	115	TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC	Poly <i>et al.</i> , 2001

Cada reacción de PCR (50 μ l) consistía de 50 ng de ADN, 5 μ l de *Buffer* PCR (10X), 1.5 μ l de $MgCl_2$ (50 μ M), 2.5 μ l de cada iniciador (10 μ M), 1 μ l de dNTPs (10 mM), 10 μ l de albúmina de suero bovina (100 ng) y 1.25U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen). Para la segunda PCR se utilizó 3 μ l del producto de PCR (pPCR) obtenido en la primera PCR.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador *BioRad* realizando una denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, anillado a 55°C por 1 minuto para la primera PCR y a 48°C por 1 minuto para la segunda PCR, extensión a 72°C por 2 minutos y una extensión final a 72°C por 5 minutos.

- **Determinación de la utilización de sustratos orgánicos**

Para evaluar las fuentes de carbono asimilables por los microorganismos, se realizaron diferentes series de cultivo en las cuales el medio básico sintético aerobio (Tabla 6) o anaerobio (Tabla 7) se suplementó con ácidos orgánicos (ácido pirúvico, ácido succínico, ácido α -cetoglutárico y ácido cítrico) a una concentración de 10 mM, ácidos grasos volátiles (ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico) a una concentración de 5 mM, azúcares (D(+) glucosa, D(-) fructosa, D(-) arabinosa, D(+) xilosa, D(+) manosa, D(+) galactosa, α -lactosa monohidratada, D(+) trehalosa dihidratada, D(+) galactosa, D(+) xilosa, D-sorbitol, D(+) rafinosa, D-manitol, maltosa monohidratada y sacarosa) a una concentración de 10 mM, alcoholes (glicerol, metanol y etanol) a una concentración de 5 mM, aminoácidos (DL-serina, L-arginina, L-metionina, L-treonina, L-lisina, L-glicina, L-histidina, L-alanina, L-leucina, L-isoleucina, L-cisteína, DL-valina y L- glutamato) a una concentración de 10 mM, compuestos hidrolizados de proteínas como peptona 2 g.L⁻¹ y casaminoácidos 2 g.L⁻¹, compuestos proteicos como gelatina 2 g.L⁻¹, polisacáridos como el almidón a 2 g.L⁻¹ y otros compuestos como tween 80 del cual se agregó 10 μ l.mL⁻¹, aceite de oliva 10 μ l.mL⁻¹, etil oleato 0.25 mM y benzoato 0.25 mM.

El crecimiento microbiano se determinó mediante lecturas espectrofotométricas de la densidad óptica (DO) a 580 nm (Jenway 6400), registrando la DO inmediatamente después de realizar la inoculación y después de 24, 48 y 72 horas dependiendo de la

velocidad de crecimiento del microorganismos. Se consideró un crecimiento positivo si la DO incrementaba en más de 0.1 unidades, con respecto al control, el cual carecía de fuente de carbono.

En algunos casos, para evaluar los productos de degradación de ciertos sustratos se realizó cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en un cromatógrafo *Shimadzu Prominence* LC-20AT. La determinación se realizó con una columna ultra acuosa de fase reversa (150 mm x 4.6 mm de diámetro interno) y un detector de arreglo de yodos (SPD-M20A) a 210 nm.

- **Determinación de bacterioclorofila *a***

Para realizar la detección de pigmentos, el microorganismo a evaluar se inoculó en 50 mL de medio de cultivo usando como fuente de carbono el sustrato en el cual se realizó su aislamiento, e incubando en la oscuridad a 30°C durante 5 días. La determinación de pigmentos se realizó siguiendo el protocolo descrito por Biebl *et al.*, (2007) que consistió en centrifugar el cultivo microbiano a 9.000 g durante 10 minutos, posteriormente el sedimento microbiano fue resuspendido en 1 mL de acetona:metanol (7:2) e incubado a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, se realizó un espectro de absorción a longitudes de onda entre 340 y 900 nm usando un espectrofotómetro marca HACH 6400.

- **Determinación de condiciones óptimas de crecimiento**

La determinación de la temperatura, salinidad y pH óptimo de crecimiento, se realizó en medio sintético básico aerobio o anaerobio, suplementado con un sustrato asimilable por los microorganismos, usualmente glucosa (20 mM) o peptona (5 g.L⁻¹). Los medios de cultivo se inocularon con células microbianas pre-adaptadas a las condiciones de estudio, e inmediatamente después de la inoculación se registró la DO (DO t₀) a una longitud de onda de 580 nm y se llevó a incubación. Cada hora se realizó una nueva lectura de la DO a 580 nm.

Los datos de DO fueron transformados a logaritmo natural (LN) para realizar una gráfica LN vs tiempo, a partir de esta gráfica se realizó una regresión lineal y se calculó la pendiente que corresponde a la tasa de crecimiento (μ).

- **Determinación de la temperatura óptima de crecimiento**

La determinación de la temperatura óptima de crecimiento se realizó incubando los cultivos microbianos a 4°C, 15°C, 20°C, 25°C 30°C, 40°C, 45°C y 50°C y registrando la DO periódicamente como se describió anteriormente.

- **Determinación del pH óptimo de crecimiento**

La determinación del pH óptimo de crecimiento se realizó en medio sintético básico, al cual no se le ajustó el pH. Después de autoclavar el medio de cultivo a cada uno de los tubos se adicionaron diferentes volúmenes de soluciones estériles de HCl 1 M, NaHCO₃ (sigma) al 10 % (p/v) o carbonato de sodio (Na₂CO₃) (Sigma) al 8% (p/v) con el fin de generar diferentes valores de pH. Posterior a la inoculación, se tomó 1 mL de caldo de cultivo con el fin de medir el pH final del medio.

- **Determinación de salinidad óptima de crecimiento**

La determinación de la concentración de sal óptima de crecimiento se realizó adicionando NaCl directamente a cada tubo antes de agregar el medio de cultivo, obteniendo concentraciones de 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 y 120 g.L⁻¹.

- **Análisis quimiotaixonómicos**

Se realizó la determinación de la composición de ácidos grasos de la membrana celular por cromatografía gas-líquido (GLC) y la determinación de la presencia de ubiquinonas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) mediante el servicio de identificación de la DSMZ, Braunschweig, Alemania.

Para la determinación de ubiquinonas y de los ácidos grasos de la membrana celular se realizó el envío de 200 y 50 mg de células liofilizadas respectivamente.

La biomasa celular se obtuvo cultivando las cepas de interés en medio sintético aerobio (Tabla 6) o anaerobio (Tabla 7) teniendo en cuenta las condiciones óptimas de crecimiento. Una vez se observó crecimiento microbiano los cultivos fueron centrifugados a 5.000 r.p.m durante 10 minutos. Las células fueron congeladas a -20°C

antes de ser introducidas en una cámara de vacío que operaba a -40°C y a 133×10^{-3} mbar.

4.5.3.4.2 Caracterización genotípica

La caracterización genotípica incluyó la secuenciación completa del gen que codifica el 16S RNAr y la determinación del contenido G+C.

Secuenciación del gen que codifica para la subunidad pequeña del 16S ARNr

- **Extracción del ADN genómico de cepa pura**

La extracción del ADN microbiano se realizó centrifugando 15 mL de cultivo microbiano en fase exponencial a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos. La biomasa obtenida fue resuspendida en 467 μL de *buffer* P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, RNASE A 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (QIAGEN), suplementado con 8 μL de lisozima (50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y 16 μL de acromopeptidasa (6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y se incubó a 37°C durante 1 hora. Se adicionó 30 μL de dodecil sulfato de sodio (SDS) (Promega) al 10% (p/v), 3 μL de proteinasa K (Invitrogen) (20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y se incubó durante 1 hora a 50°C .

Posteriormente, se adicionó un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (Sigma), seguido de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El ADN fue precipitado con etanol al 70% (v/v) y re-suspendido en 50 μL de *buffer* TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM) y almacenado a -20°C hasta su uso.

La integridad del ADN fue determinada mediante electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen) a una concentración de 8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

- **Electroforesis en gel de agarosa**

La electroforesis en gel de agarosa fue realizada para visualizar fragmentos de ADN y productos de PCR (pPCR) en geles a concentraciones de 8 y 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente.

Los geles se prepararon fundiendo agarosa (Invitrogen) en *buffer* TAE 0.5X (preparado a partir de TAE 50X que contiene en 500 mL 121 g de Tris base, 28.6 mL de ácido acético y 50 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0) hasta lograr una solución transparente. La solución fue enfriada a $\sim 50^{\circ}\text{C}$ antes de agregar como colorante *Syber Safe* (Invitrogen)

(1X) o bromuro de etidio (Invitrogen) ($0.1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Posteriormente, la solución fue servida en un molde hasta su gelificación.

La electroforesis se realizó en *buffer* TAE 0.5 X a 80V durante 45 minutos. Las imágenes de los geles se capturaron con el sistema GelDocTM EQ (Bio-Rad).

Para cuantificar y verificar el tamaño de las bandas de ADN y pPCR se utilizó como marcador de peso molecular Hyperladder III (500pb-5Kb - Bioline). Para ello, se cargó en el primer carril del gel 5 μl del marcador que corresponde a 620 ng de ADN. Este marcador de peso permite la visualización de bandas que corresponden a una cantidad precisa de ADN (variando entre 30, 40, 50 y 100 ng/banda). Después de la electroforesis, se determinó la intensidad en píxeles de las bandas producidas por el marcador de peso molecular para realizar un análisis de regresión lineal y calcular la concentración de ADN de las muestras, usando el programa Quantity One versión 4.1 (BioRad Laboratories Inc., CA, USA).

- **Amplificación del gen que codifica el 16S ARNr de cepas puras**

El gen que codifica para el 16S ARNr fue amplificado inicialmente con los iniciadores Fd1 y Rd1 (Tabla 10). Las reacciones de PCR se realizaron en tubos de microcentrífuga de 0.6 mL usando diferentes concentraciones de ADN (ADN sin dilución y diluciones hasta 10^{-2}). Cada reacción de PCR (50 μl) consistía de 2 μl de ADN, 1 μl de cada iniciador (50 μM), 0.5 μl de dNTPs (25 mM), 5 μl de *Buffer* para *Taq* (10X) más $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4 μl de MgCl_2 (50mM), 0.2 μl de *Taq* polimerasa (5U/ μl ; 1 U por reacción, Fermentans). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador *Corbett thermal cycler* (Corbett Research) realizando una denaturación inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 95°C por 1 minuto, anillado a 50°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 2 minutos y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Tabla 10. Iniciadores usados para la amplificación del gen que codifica el 16S RNAr

Iniciador	Posición de anillamiento	Secuencia (5' a 3')	Referencia
Fd1	8	CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT	Redburn & Patel, 1993
Rd1	1542	CCC GGG ATC CAA GCT TAA GGA GG TGA TCC AGC C	Redburn & Patel, 1993

- **Limpieza del producto de PCR del 16S ARNr**

Para purificar el pPCR del 16S ARNr se utilizó el *kit QuiQuick PCR clean-up spin columns* (Qiagen), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para ello todo el pPCR (aproximadamente 50 μ l) fue cargado en geles de agarosa al 10 g.L⁻¹ visualizado en un transiluminador, cortado del gel con cuchillas estériles y depositados en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL previamente rotulados.

Para estimar la concentración aproximada del pPCR purificado obtenido, se realizó una electroforesis en gel de agarosa a 10 g.L⁻¹, cargando 3 μ l de la muestra y usando como marcador de peso molecular λ *Hind* III (Invitrogen).

- **Secuenciación del 16S ARNr**

La reacción de secuenciación se realizó usando 10 a 40 ng del pPCR del 16S ARNr purificado, 1 μ l del iniciador de secuenciación (3.2 μ M) (Tabla 11) (para una misma muestra se usaron al menos cuatro iniciadores con el fin de obtener una secuencia de más de 1300 pb), 4 μ l de BigDyeTM mix v3.1 (Applied Biosystems), 2 μ l de *buffer* de secuenciación 5X (Applied Biosystems) y agua desionizada estéril hasta completar un volumen final de 20 μ l por reacción.

Tabla 11. Iniciadores usados para la amplificación del gen que codifica el 16S RNAr

Iniciador	Posición de anillamiento	Secuencia (5' a 3')	Referencia
F2	785	CAG GAT TAG ATA CCC TGG TAG	Joulian <i>et al.</i> , 1998
F4	1391	TGT ACA CAC CGC CCG T	Joulian <i>et al.</i> , 1998
R2	519	GTA TTA CCG CGG CTG CTG	Joulian <i>et al.</i> , 1998
R4	907	CCG TCA ATT CAT TTG AGT TT	Joulian <i>et al.</i> , 1998
R6	1496	TAC GGT TAC CTT GTT ACG AC	Joulian <i>et al.</i> , 1998

La reacción térmica se llevó a cabo realizando una denaturación inicial a 96°C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos de denaturación a 96°C por 10 segundos, anillamiento a 50°C por 5 segundos y extensión a 60°C por 4 minutos.

- **Precipitación de los productos de la reacción de secuenciación**

El pPCR se precipitó adicionando 5 µl de EDTA (125 mM) y se transfirió a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. Se adicionaron 600 µl de etanol al 100%. La reacción se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente fueron centrifugados a 14.000 r.p.m. durante 20 minutos y el sobrenadante fue suavemente decantado. El precipitado fue lavado añadiendo 190 µl de etanol frío al 70% (v/v) y centrifugado a 14.000 r.p.m. durante 10 minutos. El sobrenadante fue cuidadosamente removido y el precipitado fue secado.

Los productos de reacción de secuenciación fueron almacenados en la oscuridad a 4°C (sí no eran usados inmediatamente). El producto de reacción de secuenciación fue separado por electroforesis capilar en un sistema *Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyser* usando el programa *Applied Biosystems DNA Sequencing Analysis Software v5.2* (Servicio de Biología molecular de la Universidad de Griffith, Brisbane, QLD, Australia).

- **Determinación del contenido G+C**

La determinación del contenido G+C se realizó siguiendo el método descrito por Ogg & Patel (2009). Para ello se realizó la extracción de ADN de la cepa en estudio y se amplificó el genoma usando el *kit TempliPhi Amplification* (Amersham Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante, exceptuando el tiempo de incubación para liberar el ADN cromosómico bacteriano, el cual se realizó a 95°C por 4.5 minutos. Brevemente, el protocolo de amplificación consiste en adicionar como máximo 1 µl de cultivo bacteriano en fase exponencial a 5 µl de *buffer de muestra*® y calentar a 95°C por 4.5 minutos para lisar las células bacterianas y liberar el ADN genómico. La muestra se enfrió y se combinó con 5 µl de *buffer de reacción*® y 0.2 µl de una mezcla enzimática que contenía ADN polimerasa φ29 y hexámeros aleatorios disueltos en glicerol al 50% (v/v), la mezcla fue incubada 30°C durante 18 horas. Al final de la incubación, la enzima se inactivó por calentamiento a 65°C durante 10 minutos. La reacción permitió obtener aproximadamente 1 a 1.5 µg de ADN genómico.

Posteriormente, el ADN genómico se diluyó hasta obtener una densidad óptica de 0.3 a 0.5, realizando lecturas a 260 nm. Las diluciones se realizaron en *buffer SSC (Saline-Sodium Citrate- SSC)* 1X o 0.33X, preparados a partir de una solución de trabajo 20X (NaCl 3 mM, citrato de sodio (Na₃C₆H₅O₇) 300 mM).

El contenido G+C se determinó como medida indirecta de la temperatura de fusión del ADN (T_m), la cual se realizó mediante el método de denaturación térmica (Mamur & Doty, 1962) usando un espectrofotómetro Cintra 20 (GBC Scientific Equipment) equipado con una celda de calentamiento (Peltier-effect jacketed thermocell). La longitud de onda fue ajustada a 260 nm. La celda de calentamiento incrementaba la temperatura a una tasa de 1°C/minuto iniciando a 55°C y terminando a 95°C. El registro de las lecturas de absorbancia se realizó automáticamente por cada grado de aumento de temperatura y se generó una curva en la cual se graficaba la absorbancia vs la temperatura. El T_m correspondía al promedio obtenido entre la temperatura a la cual la absorbancia mostraba un incremento y la temperatura en la cual la absorbancia se estabilizaba nuevamente.

Se utilizó como control ADN extraído de *Escherichia coli*, el cual fue preparado usando las mismas condiciones descritas anteriormente. El contenido G+C mol% fue calculado teniendo en cuenta la concentración del *buffer* SSC utilizada y de acuerdo a la ecuación descrita por De Lay (1970):

$$\text{SSC 0.33X: } \%G+C = 2.24T_m - 135.14$$

$$\text{SSC 0.1X: } \%G+C = 2.08T_m - 106.4$$

4.5.3.4.3 Detección de producción de enzimas hidrolíticas y producción de polihidroxialcanoatos (PHA)

- **Actividad amilolítica**

La actividad amilolítica se determinó inicialmente realizando una técnica cualitativa que consistió en observar la formación de halos de hidrólisis alrededor de las colonias en medio sintético básico (Tabla 6 y 7) suplementado con 2 g L⁻¹ de almidón (Sigma). La verificación se realizó con la adición de una solución de lugol (I₂KI = I₂ 0.026% + KI 0.26%) que permite evidenciar la presencia de halos de hidrólisis.

Los microorganismos para los cuales se evidenció la hidrólisis del almidón se cultivaron en medio sintético líquido suplementado con almidón 2 g.L⁻¹. Los cultivos microbianos se realizaron por duplicado y se incubaron a 30°C durante 48 horas, posteriormente se tomó 1.5 mL y se centrifugó a 5.000 r.p.m. a 4°C durante 10 minutos, el sobrenadante fue recuperado y depositado en un nuevo tubo de 1.5 mL para su posterior análisis usando la técnica del 3.5 ácido dinitro salicílico (DNS) para la detección de azúcares reductores siguiendo la técnica descrita por Miller (1959) que consistió en:

1. Mezclar 1 mL del sobrenadante con 1 mL de almidón al 10 g.L⁻¹ preparado en *buffer* fosfato 0.1 M.
2. Incubar las muestras durante 30 minutos a la temperatura de crecimiento del microorganismo.
3. Detener la reacción depositando los tubos en hielo durante cinco minutos.
4. Centrifugar a 5.000 r.p.m. a 4°C durante 15 minutos para separar el almidón no hidrolizado por la enzima y tomar el sobrenadante.

5. Mezclar 0.25 mL del sobrenadante o de agua para realizar el blanco con 0.25 mL de DNS (Disolver 1.6 g de NaOH en agua destilada, adicionar 30 g de tartrato de sodio y potasio, adicionar 2 g de DNS y aforar a 100 mL con agua destilada, almacenar en frascos ámbar a 4°C).
6. Llevar a ebullición por 5 minutos y detener la reacción colocando los tubos en hielo
7. Agregar 2.0 mL de agua a la reacción y realizar las lecturas en espectrofotómetro (HACH 6400) a una longitud de onda de 540 nm, ajustando el cero de absorbancia con el blanco de la prueba.
8. Cuantificar comparando la absorbancia obtenida contra una curva de calibración realizada con glucosa.

La curva de calibración se realizó preparando una solución de glucosa 2 g.L^{-1} a partir de la cual se prepararon soluciones con menores concentraciones de glucosa (0.1, 0.25, 0.5, 1 g.L^{-1}). Se mezcló 0.25 mL de las soluciones con concentración conocida de glucosa con 0.25 mL del reactivo DNS y se procedió como se describió anteriormente desde el numeral 5 hasta el 7. Se realizaron las determinaciones de absorbancia a una longitud de onda de 540 nm, ajustando el cero de absorbancia con el blanco de la prueba. Posteriormente, se realizó una regresión lineal de los datos de absorbancia en función de la concentración de glucosa y se calculó la ecuación de la línea recta así como su respectivo coeficiente de determinación (R^2) el cual no debía ser inferior a 0.9.

Como control positivo se utilizó *Bacillus licheniformis* (obtenido del cepario del Departamento de Microbiología de la PUJ), el cual fue repicado inicialmente en caldo nutritivo e incubado durante 24 horas a 37°C. Posteriormente para la prueba, el microorganismo se repicó en medio básico suplementado con almidón (2 g.L^{-1}) y se incubó a 37 °C durante 48 horas.

Los resultados de la prueba se expresaron como unidades amilolíticas (UA), en la cual una UA fue definida como la cantidad de enzima capaz de liberar $1 \mu\text{mol}$ glucosa/min/L bajo las condiciones de la prueba.

- **Detección de actividad proteolítica**

La capacidad para hidrolizar la caseína fue evidenciada por la presencia de zonas de hidrólisis alrededor de las colonias creciendo en medio sintético suplementado con 3 g.L⁻¹ de leche descremada estéril (autoclavado por separado a 110°C por 5min).

A las cepas con actividad positiva se les determinó cuantitativamente la capacidad proteolítica utilizando la técnica del ácido tricloroacético, según el método descrito por Hübner (1991). La prueba se realizó por duplicado inoculando los microorganismos seleccionados en medio sintético líquido suplementado con 3 g.L⁻¹ de caseína (Sigma) e incubando a 30°C durante 48 horas. Los cultivos fueron centrifugados a 5.000 r.p.m durante 20 minutos. Se tomó 1 mL del sobrenadante y se mezcló con 1 mL de solución de caseína a 10 g.L⁻¹ preparado en *buffer* fosfato 0.1 M, pH 7.2. La mezcla fue incubada a la temperatura de crecimiento del microorganismo durante 1 hora. Terminado el periodo de incubación, se agregó 1 mL de ácido tricloroacético 150 g.L⁻¹, para precipitar la caseína hidrolizada. La reacción se detuvo dejando las muestras en hielo durante 5 minutos. Posteriormente, se realizaron lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 280 nm, utilizando como blanco una solución que contenía 1 mL de ácido tricloroacético y 1 mL de *buffer* fosfato 0.1 M, pH 7.2.

La curva de calibración se realizó usando soluciones de tirosina de 10 a 100 mM disuelta en agua destilada y realizando lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 280 nm. Una unidad proteolítica (UP) fue definida como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μmol de tirosina/min/L bajo las condiciones de la prueba (Ghorbel *et al.*, 2005).

Como control positivo se utilizó la cepa *Bacillus subtilis* (obtenida del cepario del Departamento de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana). Para la cuantificación de la actividad proteolítica, este microorganismo se repicó inicialmente en caldo nutritivo y se incubó durante 24 horas a 37°C. Posteriormente para la prueba, el microorganismo se repicó en medio básico suplementado con caseína (3 g.L⁻¹) y se incubó a 37 °C durante 48 horas.

- **Detección de la actividad lipolítica**

La actividad lipolítica se evaluó repicando las cepas en medio sintético suplementado con extracto de levadura 0.5 g.L^{-1} y con los sustratos etil oleato (Sigma) 10 mM, gliceril trioleato (Sigma) 10 mM, tributirina (Sigma) 10 mM y aceite palma 0.5% (v/v). Las cepas que presentaron crecimiento positivo fueron repicadas en medio Luria Bertani (LB) (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl, ajustado a pH 7.5 con NaOH) suplementado con Rodamina B (Aldrich) 0.01 g.L^{-1} y en presencia de etil oleato (Sigma) 20 mM y gliceril trioleato (Sigma) 20mM. Las cepas fueron incubadas a 30°C hasta la aparición de halos de hidrólisis.

- **Detección de la actividad β -galactosidasa**

Las cepas bacterianas se inocularon en medio sintético suplementado con lactosa 20 mM. Después de 24 horas de incubación a 30°C , el cultivo microbiano se centrifugó a 5.000 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C y el precipitado se re-suspendió en 500 μl de *Bugbuster maxter*® (Biosciences) (reactivo para la extracción de proteínas solubles, compuesto de benzonasa y lisozima). La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Posteriormente, se tomaron 30 μl de la reacción y se mezclaron con *buffer* Bis-Tris (solución madre de Bis-Tris 1 M, pH 7.0 que se preparó diluyendo 20.9 g de Bis-Tris en 100 mL de agua destilada y ajustando el pH con HCl) a una concentración final de 4 mM y *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) a una concentración final de 2 mM. El control negativo se realizó adicionando 30 μl de agua estéril. Se realizó la incubación de la reacción a 30°C durante 10 y 30 minutos. La reacción se detuvo agregando carbonato de sodio (Na_2CO_3) a una concentración final de 0.5 M. Las lecturas se realizaron por triplicado a una longitud de onda de 405 nm.

Las μmoles de ONP liberadas se determinaron a partir de una curva de calibración midiendo el cambio en la absorbancia producida por diferentes concentraciones de ONP. La cantidad de ONP liberada/minuto es proporcional a la cantidad de enzima. Una unidad enzimática fue equivalente a 1 μmol de ONP liberada de ONPG/minuto/mL presente en el sobrenadante.

La determinación de la concentración de proteína se realizó mediante el ensayo Bio-Rad *Protein Assay*, basado en el método de Bradford (1976). La valoración se hizo respecto a una curva de calibración realizada con albúmina de suero bovina en un rango de concentración entre 0.1 y 1 mg.mL⁻¹.

- **Detección de polihidroxicanoatos (PHA)**

La detección de PHAs se realizó sometiendo las cepas a condiciones de estrés disminuyendo la fuente de nitrógeno de 1 g.L⁻¹ a 0.25 g.L⁻¹ y aumentando la fuente de carbono, es decir, glucosa de 20 a 40 mM (Tabla 12). La detección de gránulos de inclusión se realizó después de una semana de incubación a 36°C, usando la técnica de tinción Negro de Sudán (Schlegel *et al*, 1970).

Tabla 12. Composición del medio sintético básico usado para la detección de PHAs

Componente	Concentración g/l
KH ₂ PO ₄	0.3
K ₂ HPO ₄	0.3
NH ₄ Cl	0.1
NaCl	23
KCl	0.1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1
solución mineral de elementos traza (Balch <i>et al</i> . 1979) (Anexo A)	1 mL

4.5.4 Caracterización de la composición microbiana usando métodos independientes de cultivo

4.5.4.1 Extracciones de ADN comunitario

Se utilizó el método de extracción de ADN descrito por Schauer *et al.*, (2000), que consiste en la pre-filtración de las muestras de agua, aproximadamente cinco litros, a través de una membrana Durapore con un tamaño de poro de 5 µm (Fisherbrand Q5), para eliminar partículas de gran tamaño, algas y zooplancton.

Posteriormente, se realizó una segunda filtración a través de membranas de policarbonato con un tamaño de poro de 0.22 µm y 47 mm de diámetro (GTTP-Millipore) para la recolección de la biomasa microbiana.

Los filtros se incubaron con lisozima (Sigma) (concentración final $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) en un *buffer* de lisis (EDTA 40 mM, Tris-HCl 50 mM y sacarosa 0.75 M) a 37°C durante 45 minutos. Posteriormente, se adicionó proteinasa K (Invitrogen) a una concentración final de $0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y SDS (Promega) a una concentración final de 1 % (p/v), los filtros se incubaron a 55°C durante 1 hora.

Después, se adicionó un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1) (Sigma), seguido de cloroformo:alcohol isoamilico (24:1). El ADN se precipitó con etanol (MolLabs) al 70% (v/v) y se re-suspendió en 50 μl de *buffer* TE.

La purificación del ADN se realizó con el *kit Ultraclean 15* (cat 12100-300 MoBio) siguiendo las instrucciones del fabricante y se preservó a -20°C hasta su procesamiento.

4.5.4.1.1 Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación del ADN se realizó usando el equipo NanoDrop 2000c (Thermo Scientific), previamente calibrado con la misma solución en la cual estuviera resuspendido el ADN, la lectura de la concentración del ADN se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante.

4.5.4.2 Clonación y secuenciación del gen que codifica para la sub-unidad pequeña del 16S ARNr de muestras del manantial SC y SP

El ADN extraído a partir de tres muestras colectadas por sitio de muestreo fue usado como blanco en las reacciones de amplificación de un fragmento de aproximadamente 800 pb del 16S ARNr del dominio *Bacteria*. La amplificación por PCR se llevó a cabo usando los iniciadores universales F- (8-24) 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3' y R- (933-915) 5' CCC CGT CAA TTC ATT TGA 3' (Wang *et al.*, 1996).

Cada reacción de PCR (50 μl) contenía de 10 - 20 ng de ADN genómico, *Taq* polimerasa (Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity-Invitrogen) 1.25U, *buffer* de PCR a una concentración final de 1X, MgCl_2 a 4 mM, dNTPs a 0.2 mM y cada iniciador a 0.2 μM .

La reacción de PCR se llevó a cabo en un total de 30 ciclos, con una denaturación inicial a 94°C por 2 minutos seguidos de una denaturación a 94°C por 45 segundos,

anillado a 55°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 3 minutos. La extensión final se realizó a 72°C durante 5 minutos.

El pPCR se purificó usando el *kit* Ultraclean PCR (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, el pPCR de las tres muestras procesadas para cada uno de los sitios de muestreo se mezclaron y clonaron usando el *kit* TOPO TA-Cloning® (Invitrogen, catálogo # K4530-20), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se mezcló 1 µl de la reacción de ligación con 50 µl de células competentes de *E. coli* DHα5, las células se diluyeron 20 veces en medio SOC (triptona 20 g.L⁻¹, extracto de levadura 5 g.L⁻¹, NaCl 8.6 mM, KCl 2.5 mM, MgSO₄ 20 mM, glucosa 20 mM) y se incubó a 37°C durante 90 minutos en agitación.

Para verificar la transformación celular se realizaron siembras de diferentes volúmenes del cultivo (25 µl, 50 µl, 75 µl y 100 µl) en medio LB suplementado con 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina y 40 µl de 5-bromo-4-cloro-3-inolil-β-D-galactosidasa (X-Gal) (Invitrogen) (40 mg.mL⁻¹).

La verificación de las transformaciones positivas se realizó extrayendo el ADN plasmídico. Para ello se seleccionaron aleatoriamente 150 colonias individuales, se repicaron en 1 mL de medio LB suplementado con 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina (Sigma). El cultivo se dejó en agitación una noche a 37°C. Posteriormente, las células se centrifugaron a 3.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C, se resuspendieron en 200 µl de solución I (Tris HCl 25 mM, pH 8.0, glucosa 50 mM, EDTA 10 mM) y se incubó durante 5 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo se añadió 400 µl de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1% p/v), se mezcló suavemente por inversión y se incubó durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, se adicionó 300 µl de solución III (acetato sódico pH 4.8 3 M), se agitó cuidadosamente por inversión y se dejó a 4°C durante 5 minutos. Al sobrenadante obtenido tras centrifugar durante 15 minutos a 4°C, se le añadió 500 mL de isopropanol (Sigma) al 70% (v/v) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 5 minutos y el *pellet* de ADN, una vez seco, se re-suspendió en 200 µl de *buffer* TE al cual se añadió 0.5 µl de RNAsa (Promega) (1µg.mL⁻¹) y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente.

A partir de los plásmidos obtenidos se realizó una amplificación por PCR usando los iniciadores M13F 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' y M13R -5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'. Cada mezcla de PCR (50 µl) contenía de 10 a 100 ng de ADN plasmídico, *Taq* polimerasa (Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity-Invitrogen) 1.25U, *Buffer* de PCR 1 X, MgCl₂ 2.5 mM, dNTPs 0.2 mM y los iniciadores 0.2 µM. La amplificación se llevó a cabo a una denaturación inicial de 94°C durante 2 minutos, seguido de 25 ciclos de denaturación a 94° durante 1 minuto, anillamiento a 55°C durante 1 minuto, extensión a 72°C durante 1 minuto, y una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

De los clones que contenían el inserto, se enviaron 130 a un laboratorio externo (Macrogen, Corea) para su secuenciación. La secuenciación se realizó de manera unidireccional usando el iniciador M13F.

Los clones analizados fueron preservados en medio LB con ampicilina (Sigma) (100 µg.mL⁻¹) y glicerol (Promega) estéril (15% v/v) y almacenados a -20°C.

4.5.4.3 Pirosecuenciación 454 de la región V5-V6 del gen que codifica para el 16S ARNr del manantial LC

El ADN comunitario de la muestra LC fue purificado usando el *kit Ultra clean Gel Spin* (MoBio) siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación se realizó usando los iniciadores (Tabla 13) y protocolo de amplificación descrito por Osorio & Junca (comunicación personal) quienes realizaron el diseño de iniciadores específicos para las regiones variables V5 y V6 del gen que codifica para el 16S del ARNr. Los iniciadores fueron diseñados analizando 5330 secuencias ribosomales de cepas tipo descargadas de la base de datos del *Ribosomal Database Project release 10* (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/>), el porcentaje de anillamiento teórico para los nuevos iniciadores fue del 99.8%.

Tabla 13. Iniciadores usados para la amplificación de la región V5-V6 del 16S ARNr

Iniciador	Secuencia
F	gccttgccagcccgcctcag <i>agagatgagc</i> AGYTGDCGACRRCRTGCA
R	gccttgccagcccgcctcag <i>taatcagctg</i> GGATTAGATACCCBRGTAGTC

En letra minúscula se representa la secuencia de los adaptadores 454 *Life Science*, en letra cursiva minúscula se representa la secuencia el código de barras o secuencia *tag* y en letra mayúscula se describe la secuencia de los iniciadores.

La amplificación se realizó en un volumen final de 25 μ l, la mezcla de la reacción contenía 20 ng de ADN, *Pfu* Turbo polimerasa 2.5U (Stratagen, La Jolla, CA), *buffer Pfu* para PCR 1X, iniciadores 0.75 μ M, dNTP 0.6 mM y dimetilsulfóxido (DMSO) 5% (v/v). La reacción de PCR se realizó a una denaturación inicial a 95°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de denaturación a 94°C por 1 minuto, anillado entre 60-51°C por 1 minuto, disminuyendo 2°C cada seis ciclos, extensión a 72°C por 2 minutos y una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Posteriormente, el pPCR fue marcado con la secuencia *tag* AGATGAGC, para ello se realizó una segunda PCR siguiendo los parámetros descritos anteriormente, excepto que durante la amplificación se redujo el número de ciclos a 5 y la temperatura de anillamiento se mantuvo en 53°C. Una vez se realizó el marcaje del pPCR se realizó la unión del adaptador GCCTTGCCAGCCCGCTCAG reportado por ROCHE siguiendo las instrucciones del fabricante.

La pirosecuenciación se realizó mediante el servicio de secuenciación de *Engencore* de la Universidad de Carolina del Sur, Estados Unidos en un secuenciador 454 *Life Sciences* GS FLX <http://www.sph.sc.edu/engencore/>.

4.5.4.4 Análisis computacional de las secuencias de 16S ARNr

Todos los datos obtenidos a partir de los archivos de secuenciación automática del ADN fueron editados manualmente revisando los archivos tanto de la secuencia como del electroferograma para determinar nucleótidos codificados erróneamente, usando el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* versión 7.0 (Hall, 1999) (<http://www.mbio.ncsu.edu/RNaseO/info/programs/BIOEDIT/bioedit.html>).

Además, se generaron las secuencias consenso al concatenar las secuencias obtenidas con diferentes iniciadores originadas a partir del mismo “templete” de ADN, usando la aplicación *Conting Assembly Program* (CAP) del programa *BioEdit* versión 7.0 (Hall, 1999).

Para las secuencias obtenidas por clonación, se determinó la presencia del vector usando el programa Vecscreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>). El análisis de secuencias químéricas fue realizado con el servidor Bellerophon (Huber *et al.*, 2004) implementado en la página de Greengenes (DeSantis *et al.*, 2006) (http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-bel3_interface.cgi).

Todas las secuencias de 16S ARNr obtenidas en este estudio fueron comparadas contra la base de datos del GenBank (Benson *et al.*, 1999), usando una base de datos no redundante (nr) y el algoritmo BLAST por sus siglas en inglés *Basic Local Alignment Search Tool* (Altschul *et al.*, 1990) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y contra la base de datos del RDP versión 10 (Cole *et al.*, 2003) usando la opción “*sequence match*” (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp).

4.5.4.4.1 Alineamiento de las secuencias del 16S ARNr

Las secuencias obtenidas en este estudio y las secuencias más cercanamente relacionadas obtenidas de la base de datos del RDP fueron alineadas usando el aplicativo para alineamiento de secuencias del RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/myrdp/uploadSeqgrp.spr>) (Maidak *et al.*, 2001).

Las secuencias alineadas fueron ajustadas manualmente usando el programa Bioedit *Sequence Alignment Editor* versión 7.0 (Hall, 1999) removiendo los nucleótidos ambiguos.

4.5.4.4.2 Análisis filogenético de las secuencias del 16S ARNr

El análisis filogenético de las secuencias alineadas se realizó usando los programas *TreeCon for Windows* versión 1.3b (Van de Peer *et al.*, 1997) y MEGA versión 4 (Tamura *et al.*, 2007). Estos programas permitieron calcular las distancias evolutivas usando el modelo evolutivo de Jukes & Cantor (1969). El árbol filogenético fue construido a partir de las distancias evolutivas usando el método de *Neighbor-Joining* (Saito & Nei, 1987). La topología del árbol fue examinada por el método de *Bootstrap* (Felsenstein, 1985) realizando 1000 re-muestréos.

4.5.4.4.3 Agrupación de las secuencias en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs por sus siglas en inglés *Operational Taxonomic Units*)

Las secuencias del 16S ARNr fueron agrupadas en OTUs utilizando el programa DOTUR (Distance-Based OTU and Richness Determination; (<http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/dotur.html>; Schloss & Handelsman, 2005) usando el algoritmo del vecino más lejano (opción por defecto). El programa requiere una matriz de distancia como archivo de entrada, la cual fue construida con el programa DNADist (aplicación del programa BioEdit). A partir de la información obtenida con DOTUR se construyeron curvas de rarefacción para observar gráficamente la representatividad de la diversidad observada de las muestras de SC y SP.

4.5.4.4.4 Comparación filogenéticas de los taxones obtenidos por clonación

Para realizar comparaciones entre las comunidades microbianas de los manantiales SC y SP, se usó el programa Unifrac (<http://bmf2.colorado.edu/unifrac/>) (Lozupone & Knight, 2005), que mide la distancia filogenética entre los taxones de diferentes muestras graficadas en un árbol filogenético e identifica aquellas longitudes de ramas únicas dentro del árbol, que son atribuibles a una muestra particular y que reflejan presumiblemente adaptación a un ambiente.

Para ello, los árboles filogenéticos realizados con el programa MEGA versión 4 (Tamura *et al.*, 2007) (..numeral 2.5.4.4.2..), se usaron como archivo de entrada en el programa UniFrac, además del archivo en formato texto que contenía todas las secuencias incluidas en el árbol filogenético y en el cual se especificaba el ambiente al cual pertenecía cada secuencia. La distancia filogenética entre cada comunidad fue considerada significativa a un valor $p \leq 0.05$.

4.5.4.4.5 Análisis de las secuencias obtenidas por pirosecuenciación

Las secuencias obtenidas fueron sometidas a un proceso de selección con el fin de minimizar los efectos de errores de secuenciación, usando el protocolo de limpieza de 454 implementado en el portal de diversidad GeBiX (<http://www.gebix.org.co/portal/>). Durante ese proceso se eliminaron las secuencias de baja calidad que presentaron una o más bases ambiguas, las que tuvieron una extensión menor de 50 nucleótidos y las que

no coincidieron con los iniciadores de la PCR al inicio de la lectura. Posteriormente, se utilizó la base de datos del RDP para asignar las secuencias a grupos taxonómicos usando la aplicación *Classifier* (<http://pyro.cme.msu.edu/>) (Cole *et al.*, 2003) a un nivel de confianza del 80% y se calculó la curva de rarefacción para determinar la representatividad de la muestra.

4.5.5 Determinación de variaciones espaciales y temporales de las comunidades bacterianas dominantes de los manantiales salinos

4.5.5.1 Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)

Se realizó una amplificación parcial de aproximadamente 500 pb del gen que codifica para la subunidad pequeña del 16S ARNr del dominio *Bacteria* usando los iniciadores descritos en la tabla 14. Las muestras analizadas corresponden a los manantiales SC y LC de los muestreos realizados en Marzo de 2008 (1er muestreo), Julio de 2008 (2do muestreo) y Mayo de 2009 (3er muestreo), para el manantial SP las muestras corresponden a los muestreos realizados en Junio de 2006 (1er muestreo), Marzo de 2008 (2do muestreo) y Junio de 2009 (3er muestreo).

Tabla 14. Lista de pares de iniciadores usados en la técnica de DGGE

Especificidad	Iniciadores (posición de anillamiento)	Secuencia (5' a 3')	Referencia
16S ARNr Bacteria	341F1-GC(339-357)	CGC CCC CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GCT CCT ACG GGA GGC AGC AG	Muyzer <i>et al.</i> , 1993
	907R-(907-926)	CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT	Muyzer <i>et al.</i> , 1998

La amplificación se realizó en un volumen final de 50 µl. La mezcla de la reacción contenía aproximadamente 50 ng de ADN, *GoTaq Flexi DNA polymerase* (Promega) 1.25U, *Buffer* para PCR 1X, MgCl₂ 4 mM, iniciadores 0.2 µM y dNTPs 0.2 mM. La reacción de PCR se llevó a cabo en un total de 25 ciclos, con una denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, 10 ciclos de denaturación a 94°C por 1 minuto, anillado entre 65-55°C por 1 minuto, disminuyendo 1°C cada ciclo y extensión a 72°C por 3 minutos.

Posteriormente, 15 ciclos adicionales con una temperatura de denaturación de 94°C por 1 minuto, anillamiento a 55°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

Aproximadamente 800 ng de pPCR por muestra, se cargaron en geles de poliacrilamida al 6% (p/v) con un gradiente lineal de urea y formamida de 30-55%. Las soluciones denaturantes (30 y 55%) se realizaron a partir de soluciones de trabajo de 100% y 0% denaturante (Tabla 15).

Tabla 15. Componentes de las soluciones 100% y 0% usados como soluciones de trabajo para la realización de los geles de poliacrilamida.

Reactivo	0%	100%
Acrilamida/bis-acrilamida (Biorad) (37.5:1) 40%	15mL	15 mL
Formamida	-	40 mL
Urea	-	42 g
<i>Buffer</i> TAE 50X	2 mL	2 mL
Completar con agua desionizada a	100 mL	100 mL

Los geles fueron polimerizados al menos durante dos horas antes de iniciar la electroforesis. La electroforesis se realizó a 80V por 16 horas en *buffer* TAE 0.5X pH 8.0 a 60°C usando el equipo *DCode Universal Mutation Detection System* (BioRad).

Después de la electroforesis, los geles fueron teñidos con *SyberGold* (Invitrogen) 1 X en TAE 0.5X durante 1 hora y a 70 r.p.m. Las imágenes fueron captadas con el sistema GelDocTMEQ (Bio-Rad).

4.5.5.1.1 Identificación de los grupos taxonómicos más abundantes de la comunidad bacteriana a partir de DGGE.

Para identificar los grupos taxonómicos más abundantes de la comunidad microbiana se procedió al corte de las bandas más intensas siguiendo el protocolo descrito por Schäfer y Muyzer (2001), para su posterior secuenciación y análisis de secuencias.

Este protocolo consiste en lavar las bandas cortadas con 200 µl de agua desionizada estéril durante una o dos horas a temperatura ambiente, posteriormente, retirar el agua y

adicionar nuevamente un volumen de 25 a 50 μl de agua desionizada estéril y se incubó e incubó durante toda la noche a 4°C.

El agua del sobrenadante fue usada como ADN molde para su re-amplificación. El pPCR fue verificado en un gel de agarosa a una concentración de 10 g.L^{-1} y enviado a un laboratorio externo para su secuenciación (Macrogen, Corea).

4.5.5.1.2 Análisis estadístico del patrón de bandas de DGGE

El análisis de los geles se realizó usando el programa Quantity One versión 4.1 (BioRad Laboratories Inc). Para realizar el análisis de los geles se eliminó la señal de ruido generada por la tinción en cada uno de los carriles a analizar usando la opción de “*rolling disk*” que remueve los diferentes niveles de intensidad a lo largo de la línea. Posteriormente, se realizó la detección automática de las bandas y su verificación manual. Se asumió que cada banda correspondía a una OTU y que la intensidad de la banda, medida por el número de píxeles, correspondía a la abundancia relativa de cada OTU.

Para establecer patrones de agrupación temporal y espacial se utilizó el algoritmo de pares no ponderados de medias aritméticas (UPGMA) con los datos de ausencia/presencia de OTUs, la matriz de distancia fue computada usando el índice de Raup-Crick. El dendrograma se construyó usando el programa PAST (Palentological Statistics version 1.91) (Hammer *et al.*, 2001). Además, se realizó un análisis de similitud (ANOSIM por sus siglas en inglés *ANalysis Of Similarities*) (Clarke, 1993), este es un análisis no paramétrico que evalúa la separación de grupos en un espacio multivariado, probando la hipótesis de que no hay diferencias significativas entre dos o más grupos. El estadístico “R” de ANOSIM indica el grado de discriminación entre grupos y por lo general se encuentra entre 0 y 1. Si R es igual a uno todas las muestras dentro de un grupo son más similares entre sí que con cualquier otra muestra de los otros grupos. R se aproxima a cero si la hipótesis nula es verdadera y no hay diferencias entre los grupos. La significancia es calculada por permutaciones de cada uno de los miembros de cada grupo, con 10.000 replicas; este análisis también se realizó usando el programa PAST:

Complementariamente, se realizó un Análisis de Correspondencia (ACO) para determinar si había cambios en los patrones de distribución de las OTUs entre cada uno de los sitios evaluados (diferencias espaciales) y a lo largo del tiempo de muestreo (diferencias estacionales). Para este análisis, el patrón de bandas obtenido por DGGE se presentó en una matriz que incluía la abundancia relativa de cada banda (intensidad), los datos de intensidad fueron transformados usando $\log(x+1)$ para reducir el efecto de la varianza entre muestras. El análisis se realizó usando el programa PC-ORD versión 5.0 (McCune & Mefford, 1999).

La relación entre el patrón de bandas obtenido por DGGE y los parámetros fisicoquímicos fue resumido en un Análisis de Correspondencia Canónica (ACC) (ter Braak & Verdonschot, 1995). Este análisis se realizó con el programa CANOCO 4.51 (Biometris-Plant Research International) (ter Braak & Smilauer, 2002). Para este análisis, el patrón de bandas obtenido por DGGE se presentó en una matriz binaria con los datos de ausencia (0) y presencia (1). Esta matriz no fue transformada, mientras que las variables fisicoquímicas se transformaron usando $\log(x+1)$ antes de ser incluidas en el análisis de ACC. Este análisis se realizó para todos los datos obtenidos, seleccionando las variables significativas mediante *Forward selection* y utilizando el *Test* de Montecarlo (499 permutaciones) para probar la significancia del modelo. La significancia estadística se mantuvo en $p \leq 0.05$ para todos los análisis. El desarrollo de los modelos de ordenación siguió las recomendaciones de ter Braak & Smilauer (1998).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN FISICOQUÍMICA DEL AGUA DE LOS MANANTIALES SALINOS

La caracterización fisicoquímica del agua de los manantiales es un punto de partida para determinar los factores abióticos que podrían influenciar la distribución de las comunidades microbianas. Las características fisicoquímicas de estos manantiales se presentan en la tabla 16.

Las características físicas permitieron establecer que los manantiales SC y SP tienen una temperatura promedio de 21°C, mientras que el manantial LC presenta una temperatura promedio de 25°C. Tanto la temperatura promedio del agua del manantial SP como la del manantial LC son superiores a la temperatura ambiente promedio de la región, ya que en Paipa la temperatura ambiental oscila entre 13 y 15°C mientras que en Pereira oscila entre 18-25°C. El pH en el manantial SC oscila entre 6.1 y 7.4, en el manantial LC el pH se mantiene alrededor de 8.5 y en el manantial SP el pH se mantiene cercano a 6.5.

De acuerdo con los rangos de conductividad eléctrica reportados por LaBaugh (1989), los manantiales SC y LC pueden ser clasificarlos como hábitats polisalinos (33.000-40.000 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) mientras el manantial SP puede ser clasificado como un hábitat eusalino (46.000-55.000 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). Los análisis químicos del agua de los manantiales SC y LC mostraron un alto contenido de cloro (Cl^-), sodio (Na^+) y calcio (Ca^{2+}). Mientras que las aguas provenientes del manantial SP se caracterizan por una alta concentración de sodio (Na^+), potasio (K^+) y sulfato (SO_4^{2-}).

Tabla 16. Caracterización fisicoquímica de las aguas de los manantiales estudiados

Manantial	Fecha	Temperatura °C	pH	Conductividad $\mu\text{S/cm}$	SDT (mg/L)	Cl ⁻ (mg/L)	K ⁺ (mg/L)	Ca ²⁺ (mg/L)	Na ⁺ (mg/L)	Mg ²⁺ (mg/L)	NO ₃ ⁻ (mg/L)	SO ₄ ²⁻ (mg/L)	P Total (mg/L)	Fe ³⁺ (mg/L)
SC1	Marzo de 2008	20,9	7,4	35150	24185	13237	38,7	2018	4283	6,2	4,95	593	0,28	0,78
SC2	Agosto de 2008	20,7	6,7	35560	23300	12736	31,4	2223	4991	3,38	4,8	751	0,05	1,46
SC3	Junio de 2009	22,6	6,1	35700	22468	11962	44,3	2516	5257	5,02	4,46	742	0,06	0,63
LC1	Marzo de 2008	26,3	8,42	40025	20235	11190	45,1	961	4342	1,24	4,2	694	0,15	0,12
LC2	Agosto de 2008	25,1	8,5	35258	20500	10423	43,9	642	5304	0,94	4,27	1028	0,02	0,5
LC3	Junio de 2009	25,3	9,8	33350	19842	10868	48,1	1012	5360	0,81	4,72	1039	0,17	0,12
SP1*	Febrero de 2002	21	6,7	46000	41612	5455	1637	175	13250	22,5	0,5	20812	0,09	0,2
SP2	Marzo de 2008	21	6,5	50450	53957	7050	2100	160	36000	29,76	0,5	53957	0,17	1,2
SP3*	Junio de 2009	21,5	6,28	54900	54264	10115	1644	108	15300	25,5	0,5	20862	0,01	7,3

*Datos suministrados por Claudia Alfaro (Ingeominas) (comunicación personal). Nd: no determinado.

5.1.1 Determinación de las diferencias en los parámetros fisicoquímicos entre los diferentes sitios de muestreo

El análisis de varianza (ANOVA) de los datos fisicoquímicos mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) para los parámetros temperatura, pH, conductividad, SDT, cloro, calcio, potasio, sodio, nitrato y sulfato.

Para detectar entre qué sitios de muestreo ocurría una diferencia significativa de las variables mencionadas anteriormente, se realizó un análisis *Post-Hoc* (HDS de Tukey y Sheffé). Este análisis permitió determinar que los parámetros SDT, calcio y nitrato difieren significativamente en los tres manantiales. Con respecto a la conductividad eléctrica y a las concentraciones de potasio, cloro, sodio y sulfato, no hay diferencias significativas entre los manantiales SC y LC pero si entre estos dos manantiales y el manantial SP. En cuanto a los parámetros físicos de temperatura y pH se observó que el manantial LC, el cual presenta el rango de temperatura y de pH más alto, difiere significativamente de los manantiales SC y SP los cuales a su vez no presentan diferencias significativas entre ellos (Tabla 17).

Tabla 17. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) de los parámetros fisicoquímicos y comparaciones *Post-Hoc*.

Parámetro	ANOVA valor p	Comparaciones múltiples <i>Post-Hoc</i>
Temperatura	0.001	SC \neq LC, LC \neq SP
pH	0.005	SC \neq LC, LC \neq SP
Conductividad eléctrica	0.002	SC \neq SP, LC \neq SP
Sólidos disueltos totales (SDT)	<0.0001	Todos son diferentes
Cloruros (Cl^{2-})	0.013	SC \neq SP
Potasio (K^+)	<0.0001	SC \neq SP, LC \neq SP

*Los valores son significativos si $p \leq 0.05$. Los sitios de muestreo entre los cuales hay diferencias significativas se indican con el símbolo diferentes (\neq).

Tabla 17. (Continuación) Resultados del análisis de varianza (ANOVA) de los parámetros fisicoquímicos y comparaciones *Post-Hoc*.

Parámetro	ANOVA valor <i>p</i>	Comparaciones múltiples <i>Post-Hoc</i>
Calcio (Ca ²⁺)	<0.0001	Todos son diferentes
Sodio (Na ⁺)	0.049	SC ≠ SP, LC ≠ SP
Magnesio (Mg ⁺²)	0.114	No hay diferencias
Nitrato (NO ₃ ⁻)	<0.0001	Todos son diferentes
Sulfato (SO ₄ ²⁻)	0.021	SC ≠ SP, LC ≠ SP
Fosforo total (P-PO ₄)	0.9	No hay diferencias
Hierro (Fe ³⁺)	0.4	No hay diferencia

*Los valores son significativos si $p \leq 0.05$. Los sitios de muestreo entre los cuales hay diferencias significativas se indican con el símbolo diferentes (≠).

5.1.2 Análisis de Componentes Principales (ACP)

El ACP demostró correlaciones positivas o negativas entre las 13 variables fisicoquímicas evaluadas y los tres manantiales estudiados. El primer eje explicó el 67.2% de la varianza de los datos y el segundo eje explicó el 16.8%, lo cual indica que el 84% del total de la varianza es representada en los dos primeros ejes del ACP. La correlación de las variables ambientales se consideró significativa si presentaba valores superiores a 0.5 (Anexo B).

En la representación gráfica del ACP se pueden distinguir dos gradientes, un primer gradiente (primer componente) dado principalmente por la composición química del agua de los manantiales (cationes y aniones) en el cual hay una correlación positiva con la conductividad, SDT, potasio, sodio, manganeso y sulfato y correlación negativa con cloro, calcio y nitratos, lo cual permite diferenciar el manantial SC del manantial SP, y un segundo gradiente (segundo componente) dado principalmente por las variables físicas, en el cual existe correlación negativa con el pH y la temperatura y correlación positiva con hierro, que permite diferenciar el manantial salino LC de los otros dos manantiales (Figura 12).

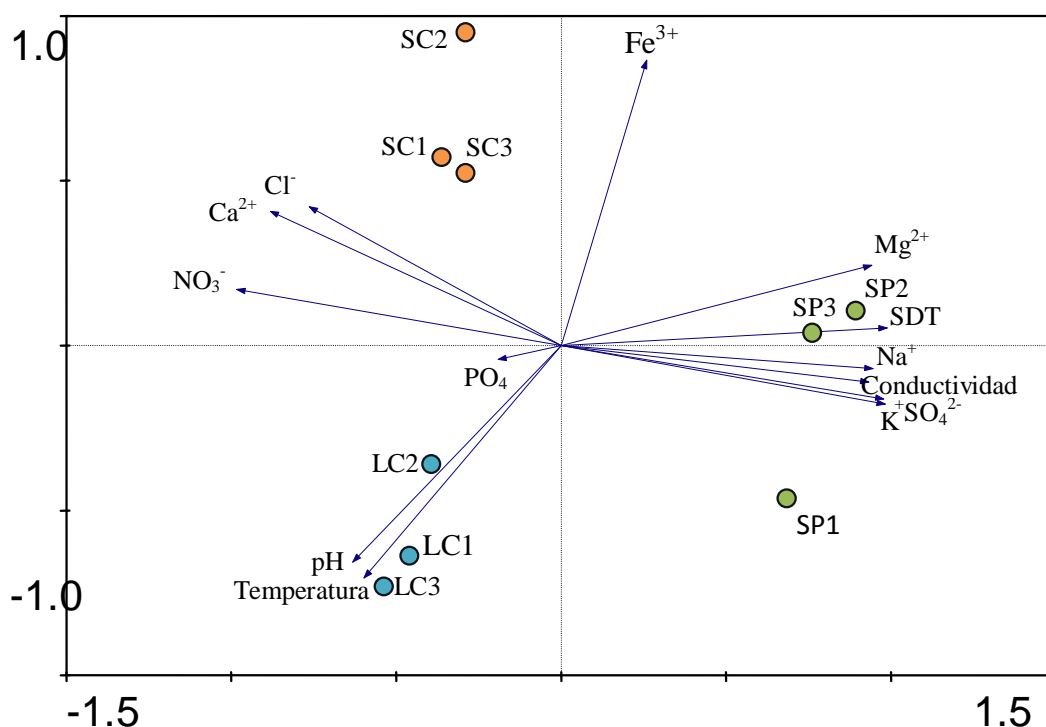


Figura 12. Representación gráfica del análisis de componentes principales de las variables fisicoquímicas evaluadas.

Del ACP se deduce que las muestras de agua de los manantiales SC, LC y SP se pueden diferenciar por sus variables fisicoquímicas. Las variables que mejor describen las diferencias entre cada uno de los sitios son el contenido de cloro y calcio para el SC, la conductividad, el contenido de sulfato, potasio y sodio para el manantial SP y las condiciones de pH y temperatura para LC. Así mismo, es posible sugerir que la composición fisicoquímica de los manantiales fue relativamente estable durante el tiempo de muestreo para cada uno de los manantiales.

Tanto el ANOVA como el ACP muestran diferencias en las características fisicoquímicas entre cada uno de los sitios de muestreo, indicando variaciones en las condiciones ambientales locales, lo cual debe ser tenido en cuenta para el análisis de los resultados de la comunidad microbiana ya que se ha demostrado que factores ambientales como la temperatura, el pH y la composición iónica afectan la composición biótica de ambientes salinos (Pagaling *et al.*, 2009).

5.2 Composición isotópica del agua

Para la interpretación de los isotopos estables del agua, los resultados de oxígeno-18 (O^{18}) y deuterio (H^2) (Tabla 18) fueron graficados con respecto a la línea meteórica mundial (SMOW por sus siglas en inglés *Standard Mean Ocean Water*) (Figura 13). La representación gráfica indicó que las aguas provenientes de los manantiales no se ajustan a la línea SMOW y por tanto su origen no está relacionado con la presencia de agua meteórica recientemente acumulada en los acuíferos. Por otra parte, los valores del contenido de tritio (H^3) para las tres muestras fueron menores a 0.8 Unidades de Tritio (UT) (Tabla 18) indicando que estos manantiales contienen agua *antigua* con más de 50 años de haberse infiltrado.

Tabla 18. Caracterización isotópica del agua de los manantiales estudiados

Muestra	δO^{18} (‰ vs SMOW)	δH^2 (‰ vs SMOW)	δH^3
SC	-2.49	-38.45	<0.8
LC	-4.68	-57.35	<0.8
SP	-6.45	-67.31	<0.8

SC: Salado de Consotá; LC: La Cristalina; SP: Salpa

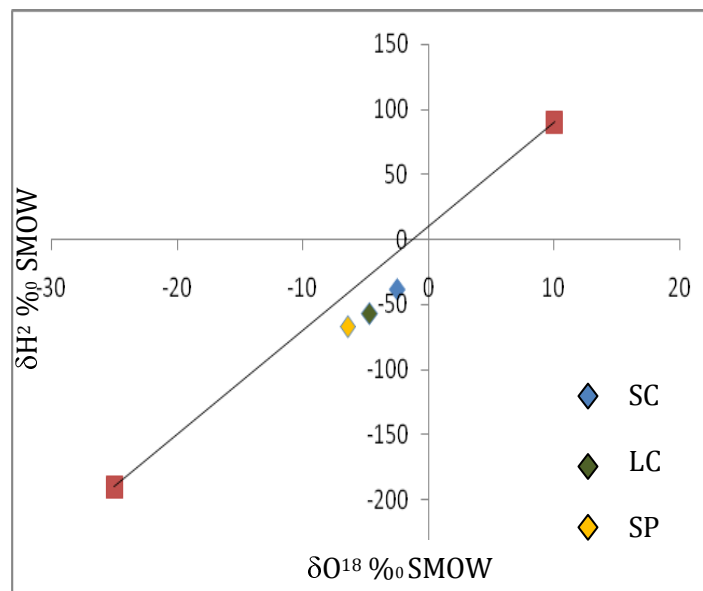


Figura 13. Composición de isotopos estables con respecto a la línea meteórica mundial SMOW.

La información isotópica indica que los tres manantiales fluyen a partir de aguas subterráneas antiguas, lo cual sugiere que su régimen hidrológico no está directamente relacionado con recargas pluviométricas recientes. Por otra parte, tal como lo describen Sigee, (2005), la permanencia del agua en un acuífero, su interacción con la roca del reservorio y la presencia de minerales evaporíticos podrían ser las causas principales de las diferencias en las características fisicoquímicas de las aguas de los manantiales, esto indicaría también que los manantiales SC y LC que se encuentran en la misma región, se originan de acuíferos diferentes.

5.3 CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS

5.3.1 Características morfológicas de las comunidades microbianas presentes en los manantiales salinos SC y SP

Con el fin de describir las características morfológicas de los microorganismos predominantes en los manantiales en estudio, se realizó microscopía electrónica de barrido. Aunque inicialmente se buscaba realizar una descripción de los morfotipos dominantes en los tres manantiales salinos, este proceso no pudo ser llevado a cabo en el manantial LC debido al hurto de las láminas depositadas en el manantial. Las láminas incubadas (durante un tiempo de 8, 12, 24 y 48 horas) tanto en el manantial SC como SP, fueron observadas por microscopía electrónica de barrido, pero solamente se obtuvieron imágenes claras de las células microbianas en las láminas incubadas durante 24 horas, ya que las láminas con menores tiempo de incubación no presentaban o presentaban escasas células microbianas y las láminas con 48 horas de incubación mostraban una alta precipitación de sales dificultando la observación de células.

- **Manantial SC**

En el manantial SC la microscopía electrónica de barrido permitió observar bacilos curvos de extremos puntiagudos de 0.3 μm de ancho por 2.5-2.7 μm de largo, bacilos rectos de 0.5-0.7 μm de ancho por 1.5-2.0 μm de largo (Figura 14A y 14B), bacilos rectos de extremos redondos de 0.6 μm de ancho por 2.5 μm de largo solos o en pares (Figura 14B) y bacilos rectos de extremo redondo de 0.6 μm de ancho por 2.0 μm de largo (Figura 14C).

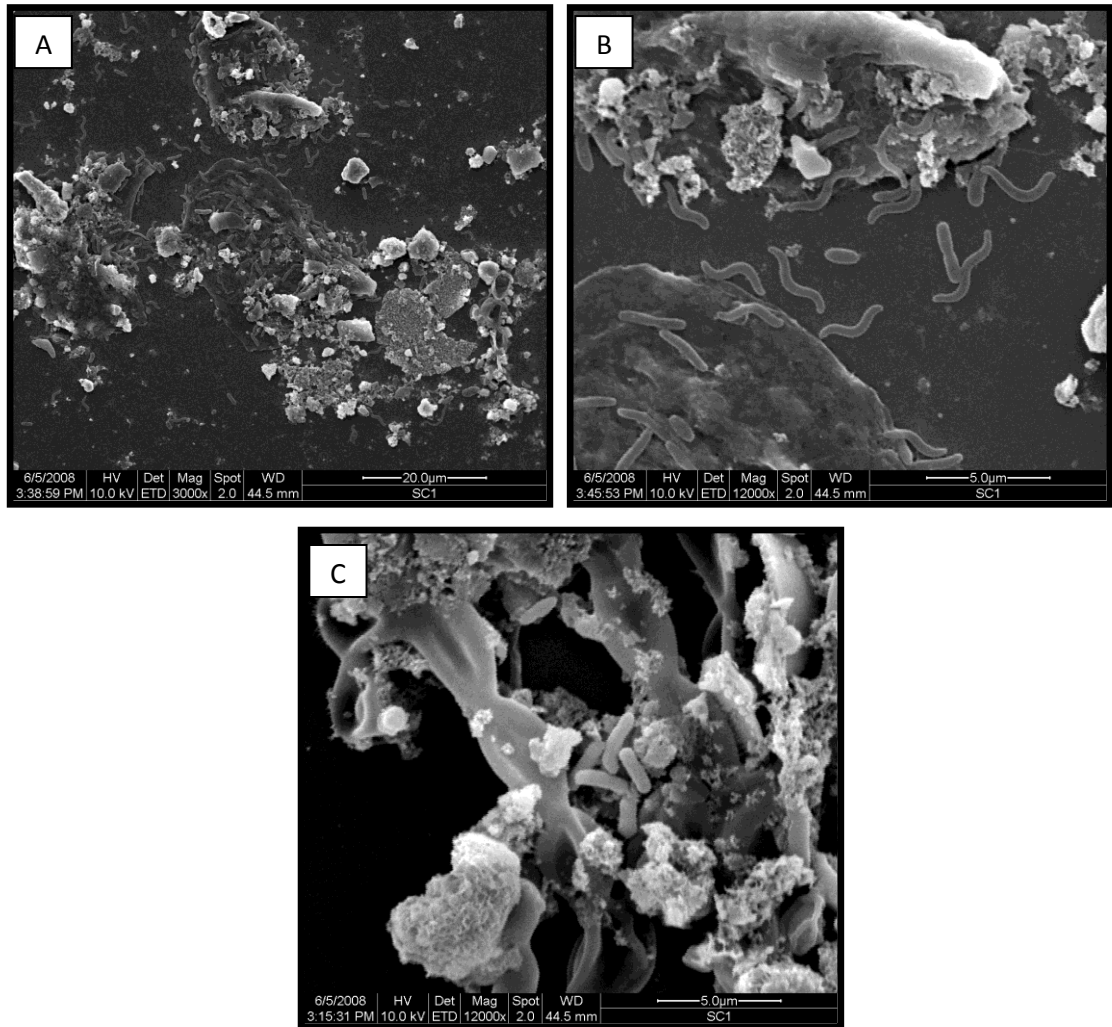


Figura 14. A) Microscopia electrónica de barrido del manantial SC. B) Imagen ampliada (magnitud 12000X) de la imagen A. C) Fotografía que muestra la presencia de bacilos rectos de extremos redondos. La escala es indicada en cada imagen.

También se observó el desarrollo de una colonia (Figura 15A) compuesta de bacilos rectos o ligeramente curvos de extremos redondos de aproximadamente 0.4- 0.5 μm de ancho por 1.25- 3 μm de largo, adheridos entre sí posiblemente por la producción de exopolisacáridos (Figura 15B).

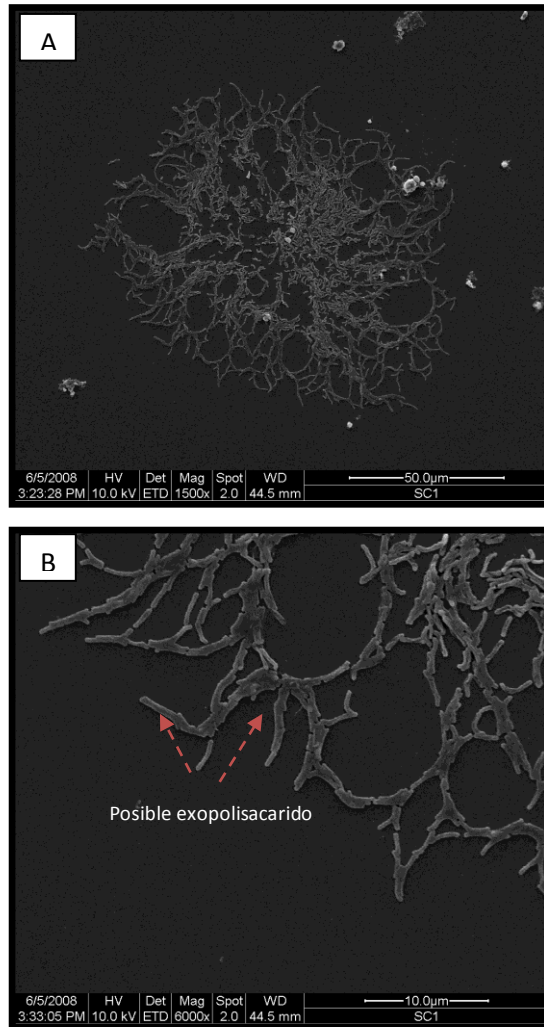


Figura 15. A) Colonia microbiana observada en el manantial SC, B) Células microbianas que componen la colonia unidas posiblemente por la producción de exopolisacáridos. La escala es indicada en cada una de las imágenes. La escala se indica en cada una de las imágenes.

Además, se observó la presencia de células ligeramente englobadas de 3.5-4.0 μm de ancho por 5.5 μm de largo que presentan en uno de sus extremos una pequeña elongación (Figura 16A y 16B). De acuerdo con su tamaño podrían ser catalogados como protozoos siguiendo la clasificación descrita por Sieburth *et al.*, (1978). Los protozoos, organismos fagotróficos y depredadores (Pernthaler, 2005), podrían tener influencia en la composición de la comunidad microbiana del manantial en estudio.

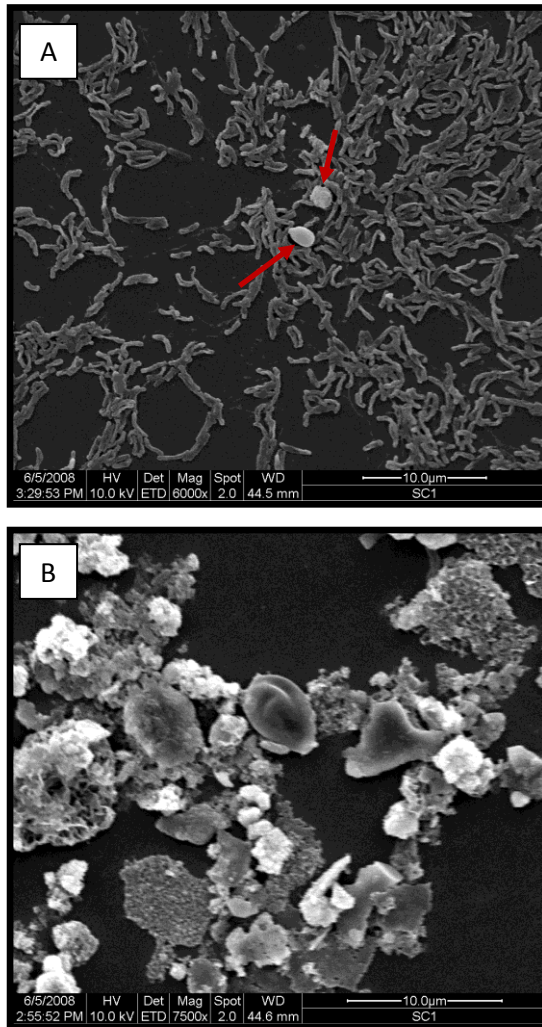


Figura 16. Las figuras A y B corresponden a fotos de microscopía electrónica de barrido en las cuales se indica con una flecha la presencia de células redondas y ligeramente englobadas. La escala es indicada en cada imagen.

- Manantial SP

La microscopía electrónica de barrido para el manantial SP, permitió observar una gran precipitación de sales a las cuales se adhieren los microorganismos. Los morfotipos dominantes en este manantial son bacilos rectos o ligeramente curvos con terminación en punta de 0.6 μm de ancho por 6 μm de largo (Figura 17A), bacilos ligeramente curvos con extremos redondos de 0.4 μm de ancho por 1.5-2.0 μm de largo (Figura 17B), bacilos rectos de extremo redondo de 0.15 μm de ancho por 1.2 μm de largo, bacilos de 0.3 μm de ancho por 0.6 μm de largo, bacilos de 0.5-0.6 μm de ancho por 0.7 -1.15 μm de largo en pares o individuales y cocos en menor proporción (Figura 17C).

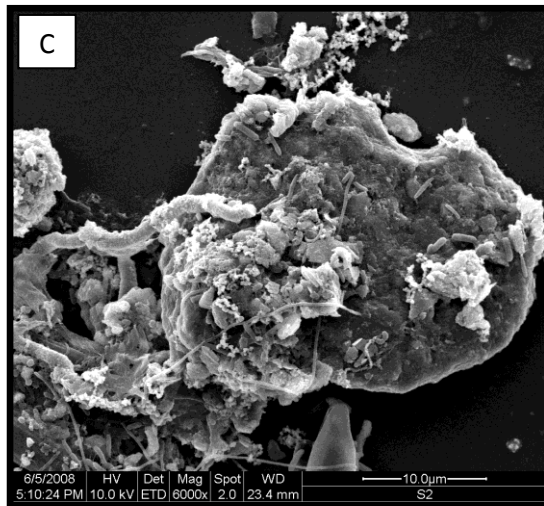
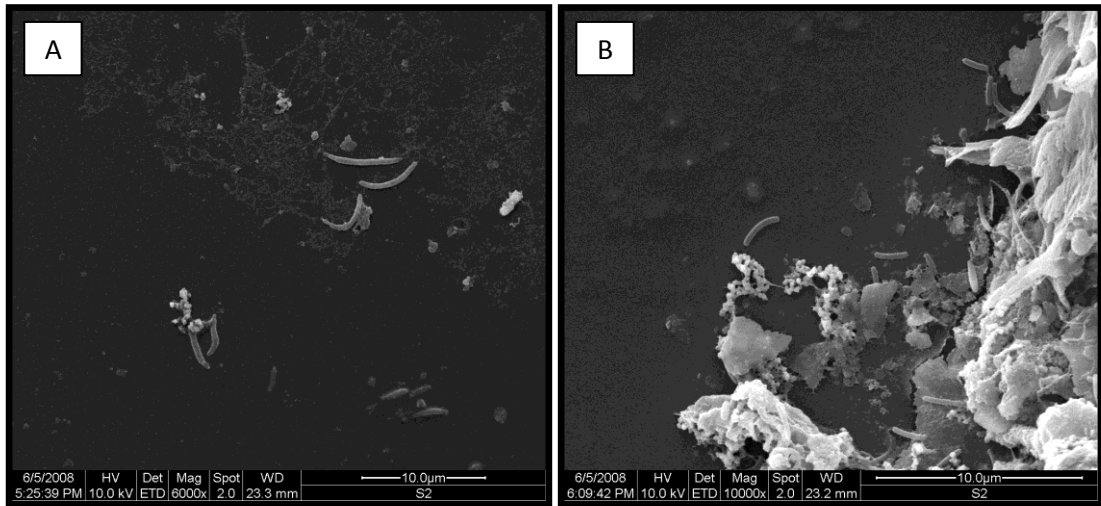


Figura 17. Microscopia electrónica de barrido que muestra tanto en A, B y C los morfotipos dominantes en el manantial salino SP. La escala se indica en cada imagen.

También se observaron células filamentosas de más de 0.2 - 0.3 μm de ancho por más de 20 μm de largo (Figura 18A y B).

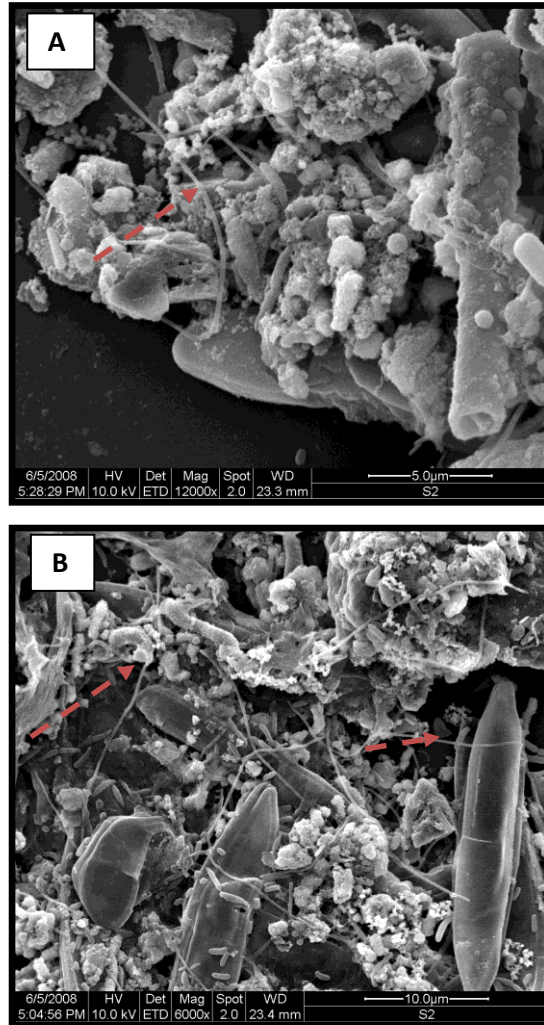


Figura 18. Microscopia electrónica de barrido del manantial salino SP, tanto en la figura A como B se indica con flechas de color rojo los largos filamentos.

Además, fue evidente la presencia de diatomeas, principalmente del género *Nitzchia*, las cuales son comúnmente reportadas en ambientes marinos (Salm *et al.*, 2009), lagos metasalinos (Gell & Gasse, 1990) y lagunas de cristalización de sal (Estrada *et al.*, 2004) (Figura 19 A, B y C). Las diatomeas son organismos fotoautotróficos oxigénicos que contribuyen con una porción significativa de la absorción de carbono por el fitoplancton en muchos ecosistemas (Fay, 1992; DuRand *et al.*, 2001).

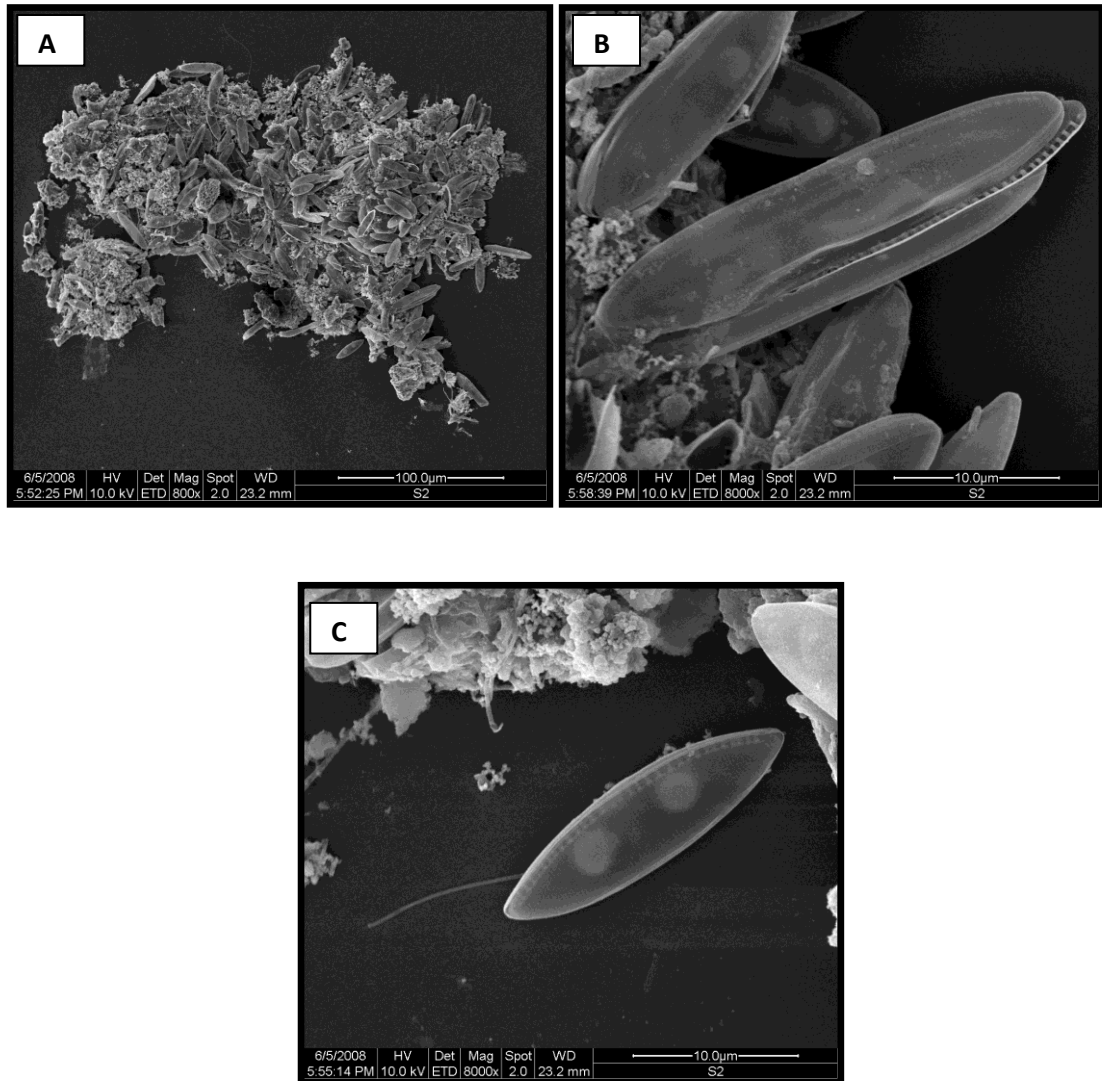


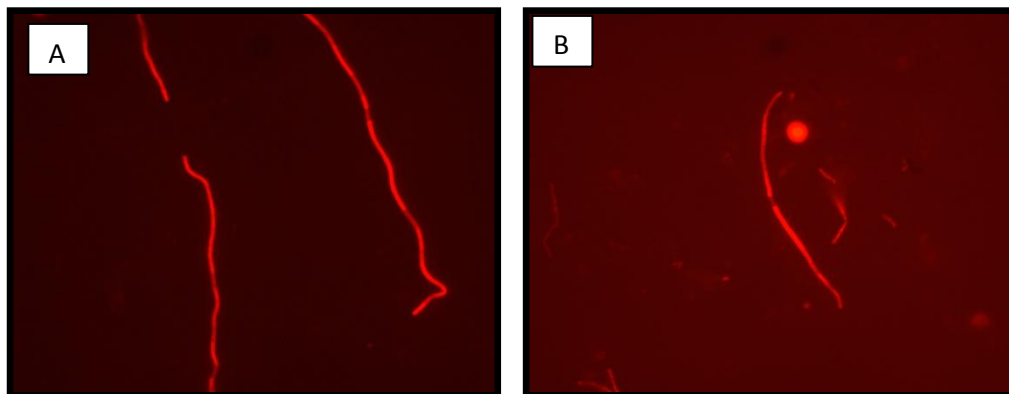
Figura 19. Microscopía electrónica de barrido del manantial SP en la cual se muestran tanto en la figura A, B y C la presencia de diatomeas del género *Nitzschia*.

En general, la microscopía electrónica de barrido muestra claras diferencias en la morfología celular observada entre los manantiales SC y SP. En el manantial SC predominan bacilos curvos o espirilos, mientras que en SP estas morfologías no fueron predominantes y se observó el predominio de bacilos rectos y cocos. Por otra parte, en el manantial SC se observaron células similares a las de protistas que posiblemente corresponden a protozoos. Los protozoos son organismos heterotróficos que habitan diferentes hábitats incluyendo aguas subterráneas y en acuíferos prístinos se puede encontrar alrededor de 10^2 células por gramo de material seco (Sinclair, 1991). También se ha reconocido que estos organismos son causantes de la mortalidad bacteriana en la mayoría de ambientes acuáticos, restringiendo su sobrepoblación.

Además, se observó la presencia de diatomeas únicamente en el manantial SP. Las diatomeas hacen parte del fitoplancton y participan en procesos de producción primaria, los cambios en la composición de la comunidad fitoplanctónica pueden influenciar la composición de las comunidades bacterianas (Rooney-Varga *et al.*, 2005). El fitoplancton libera aproximadamente 25% del total de carbono orgánico fijado por fotosíntesis (Doucette, 1995) y posteriormente la materia orgánica disuelta es rápidamente consumida y remineralizada por la comunidad bacteriana, por lo cual, los cambios en su composición se verán reflejados en la composición de la comunidad microbiana (Obernosterer & Herndle, 1995).

5.4 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS MICROBIANAS Y DETECCIÓN DE GRUPOS MICROBIANOS PARTICULARES

La microscopia de fluorescencia no solo permitió realizar el recuento de células totales teñidas con DAPI, sino que también, de forma indirecta permitió detectar en los manantiales LC y SP autofluorescencia producida por cianobacterias durante todos los muestreos realizados (Figura 20). En cuanto al manantial SC no se observó autofluorescencia durante el primero ni el segundo muestreo pero sí durante el tercer muestreo (No hay foto disponible).



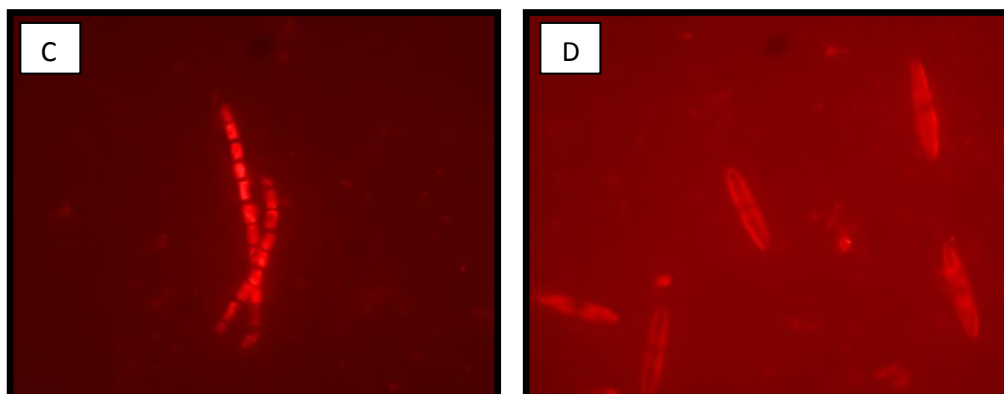


Figura 20. Autofluorescencia detectada por la presencia de cianobacterias en las muestras de agua de los manantiales A y B) Manantial LC, y C y D) Manantial SP.

Los recuentos de células totales durante los tres muestreos evaluados, variaron entre 1.8 y 2.8×10^6 células.mL⁻¹ en el manantial SC, entre 1.0 y 2.6×10^6 células.mL⁻¹ en el manantial LC y entre 1.7 y 4.8×10^6 células.mL⁻¹ en el manantial SP (Tabla 19). El análisis estadístico indicó que estos recuentos no presentaron diferencias significativas entre los sitios de muestreo ($p= 0.7$), pero sí entre las épocas de muestreo ($p= 0.025$) para cada manantial. Sugiriendo cambios en la abundancia de las comunidades microbianas al interior de cada hábitat a lo largo del tiempo.

Tabla 19. Cuantificación de células microbianas y de los organismos pertenecientes a los dominios *Bacteria* (α , β , γ -*Proteobacteria*) y *Archaea*.

Muestra	DAPI Células/mL ±DE*	ARCH915 ±DE*	EUB338 ±DE*	ALF968 ±DE*	BET42a ±DE*	GAM42a ±DE*
SC I	$1.87 \pm 1.03 \times 10^6$	$7.82 \pm 4.1 \times 10^4$	$2.45 \pm 3.5 \times 10^5$	$4.49 \pm 3.9 \times 10^5$	$1.55 \pm 1.4 \times 10^3$	$1.02 \pm 2.5 \times 10^6$
SC II	$2.85 \pm 3.52 \times 10^6$	$4.63 \pm 5.9 \times 10^5$	$1.46 \pm 1.1 \times 10^5$	$6.1 \pm 3.0 \times 10^5$	$1.24 \pm 0.5 \times 10^3$	$1.06 \pm 1.5 \times 10^6$
SC III	$2.85 \pm 1.42 \times 10^6$	$3.64 \pm 1.7 \times 10^5$	$1.32 \pm 1.7 \times 10^5$	$1.34 \pm 1.4 \times 10^5$	$2.3 \pm 0.2 \times 10^3$	$8.22 \pm 1.0 \times 10^5$
LC I	$1.16 \pm 1.45 \times 10^6$	$8.73 \pm 2.8 \times 10^4$	$6.63 \pm 2.1 \times 10^5$	$1.15 \pm 1.2 \times 10^5$	$9.04 \pm 0.3 \times 10^3$	$2.64 \pm 0.8 \times 10^5$
LC II	$1.49 \pm 1.03 \times 10^6$	$6.77 \pm 2.46 \times 10^4$	$8.23 \pm 1.3 \times 10^5$	$1.04 \pm 0.9 \times 10^5$	$1.03 \pm 1.0 \times 10^3$	$2.23 \pm 1.1 \times 10^5$
LC III	$2.65 \pm 3.04 \times 10^6$	$4.54 \pm 1.0 \times 10^4$	$9.52 \pm 1.1 \times 10^5$	$9.04 \pm 0.7 \times 10^4$	$6.04 \pm 0.5 \times 10^3$	$3.20 \pm 1.2 \times 10^5$
SP I	$1.74 \pm 1.24 \times 10^6$	$4.22 \pm 2.8 \times 10^5$	$6.33 \pm 2.1 \times 10^5$	$1.22 \pm 0.9 \times 10^5$	$7.37 \pm 0.2 \times 10^4$	$2.07 \pm 1.8 \times 10^5$
SP II	$2.19 \pm 2.5 \times 10^6$	$7.79 \pm 2.1 \times 10^4$	$8.44 \pm 1.8 \times 10^5$	$1.09 \pm 0.6 \times 10^5$	$8.03 \pm 1.0 \times 10^4$	$2.51 \pm 0.1 \times 10^5$
SP III	$4.8 \pm 1.04 \times 10^6$	$3.54 \pm 1.2 \times 10^5$	$1.52 \pm 2.4 \times 10^6$	$3.18 \pm 1.5 \times 10^5$	$1.04 \pm 0.5 \times 10^5$	$6.20 \pm 0.5 \times 10^5$

* : Media; DE: Desviación estándar

Por otra parte, en los tres manantiales se observó predominio de organismos del dominio *Bacteria* sobre organismos del dominio *Archaea* (Figura 21). En el manantial SC se encontró que entre el 46 y el 55% del total de células detectadas por DAPI, hibridó con la sonda específica para *Bacteria* y entre el 4 y el 16% de las células hibridaron con la sonda específica para *Archaea*. En el manantial LC, entre el 35 y 57%

de las células hibridaron con la sonda específica para *Bacteria*, mientras que entre el 1 y el 7% del total de células hibridaron con la sonda específica para *Archaea*. En el manantial SP, entre el 31 y 38% de las células detectadas por DAPI hibridaron con la sonda específica para *Bacteria*, mientras que entre el 3 y el 7% hibridaron con la sonda específica para organismos del dominio *Archaea*.

Los recuentos de organismos del dominio *Bacteria* no presentaron diferencias significativas entre los sitios de muestreo ($p= 0.7$), mientras que los recuentos de organismos del dominio *Archaea* sí presentaron diferencias altamente significativas ($p= 0.004$). Por el contrario, al evaluar en cada manantial las diferencias entre los recuentos obtenidos a lo largo del tiempo de muestreo, se detectaron diferencias significativas para organismos del dominio *Bacteria* ($p= 0.025$), pero no para organismos del dominio *Archaea* ($p= 0.13$). Los resultados sugieren que al interior de cada comunidad la abundancia de organismos del dominio *Bacteria* cambia constantemente, mientras que las poblaciones de organismos del dominio *Archaea* pueden ser más estables a lo largo del tiempo.

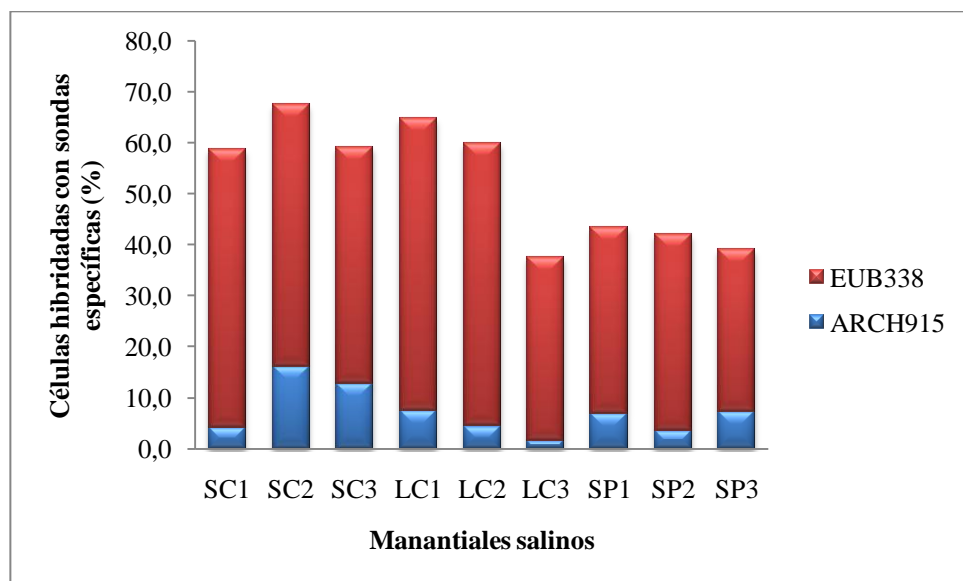


Figura 21. Porcentaje de células hibridadas con las sondas EUB338 y ARCH915.

Además, cuando se realizó el recuento de organismos del dominio *Bacteria* relacionados con las clases α , β y γ -*Proteobacteria*, se encontró que en los tres manantiales hay predominio de organismos de la clase γ -*Proteobacteria* (Figura 22). En el manantial SC el porcentaje de células del dominio *Bacteria* que hibridó con la sonda

GAMM42a osciló entre el 41 y el 67%, en LC entre el 27 y el 39% y en SP entre el 30 y el 40%.

Los resultados obtenidos con la sonda ALF968 específica para organismos de la clase α -*Proteobacteria*, representaron menos del 20% del total de células del dominio *Bacteria*, en los tres manantiales y durante los tres muestreos. En particular se encontró que en el manantial SC los recuentos de α -*Proteobacteria* variaron entre el 7 y el 18%, en el manantial LC entre el 9 y el 17% y en el manantial SP entre el 12 y el 20%.

Con respecto a los recuentos realizados con la sonda BETA42a específica para organismos de la clase β -*Proteobacteria*, se obtuvieron recuentos inferiores al 0.2% del total de células de *Bacteria* en los manantiales SC y LC durante los tres muestreos, mientras que en el manantial SP los recuentos variaron entre el 7 y el 12%.

El análisis estadístico de los resultados presentados anteriormente indicó diferencias significativas entre los tres manantiales para los recuentos obtenidos con la sonda BETA42a ($p= 0.02$). Mientras que al evaluar al interior de cada comunidad la abundancia de las poblaciones de organismos de las clases α , β y γ -*Proteobacteria* se encontró diferencias significativas para los recuentos obtenidos con las sondas ALF968 ($p= 0.02$) y GAMM42a ($p= 0.02$), lo cual confirma que la abundancia de poblaciones del dominio *Bacteria* cambia constantemente a lo largo del tiempo para cada sitio de muestreo.

La técnica de FISH se ha convertido en una herramienta útil en ecología microbiana para cuantificar microorganismos en ambientes naturales sin la necesidad de aislarlos y sin la necesidad de amplificar fragmentos de ADN por PCR (Ouverney & Fuhrman, 1997). Aunque como cualquier otra técnica también tiene limitaciones, que están asociadas con la dificultad de detectar células microbianas con bajo contenido de ribosomas ya que generan poca intensidad en la señal de fluorescencia, lo cual hace difícil su detección, penetrabilidad y especificidad de la sonda (Yeates *et al.*, 2003). Es posible que debido a estas limitaciones las sondas utilizadas para la detección de organismos del dominio *Bacteria* y *Archaea* hayan permitido detectar solamente del 40 al 70% del total de células presentes en cada manantial.



Figura 22. Porcentaje de células hibridadas con las sondas BETA42a, GAMM42a y ALF968.

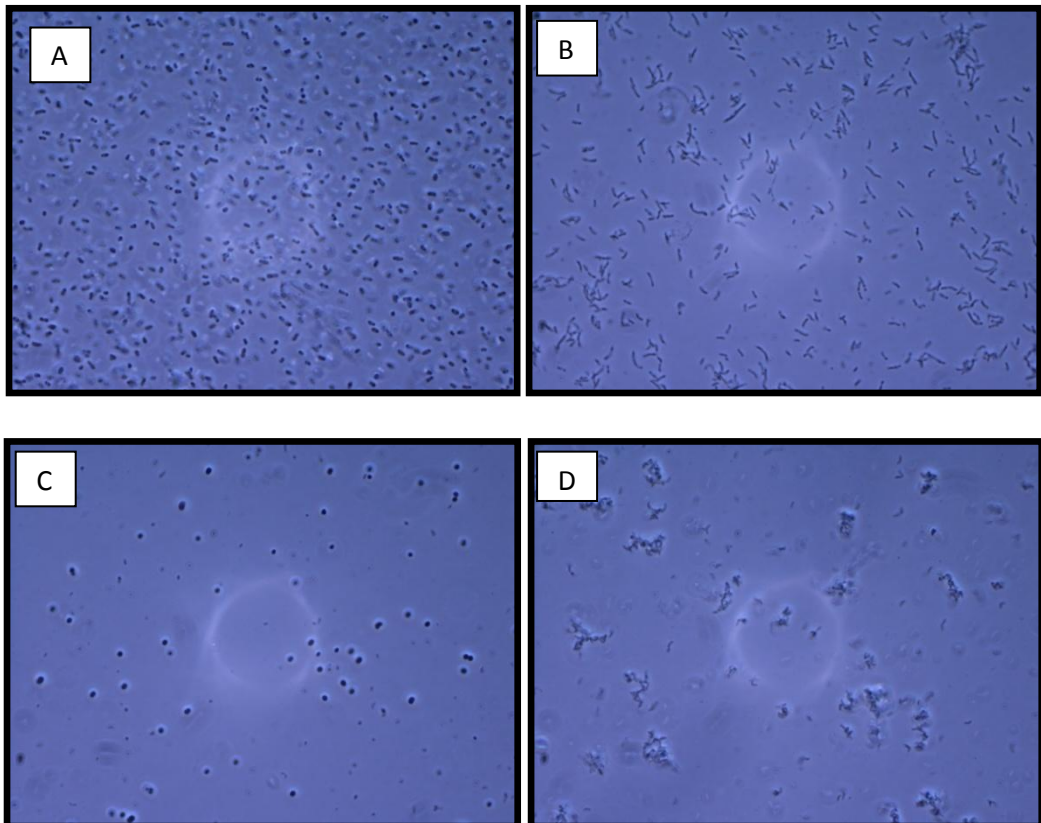
En este estudio los resultados permiten sugerir que en la comunidad microbiana de los tres manantiales predominan organismos del dominio *Bacteria* y no *Archaea*, lo cual ha sido ampliamente reportado en ambientes con salinidad inferior al 25% (p/v) (Dong *et al.*, 2006; Perreault *et al.*, 2007; Clementino *et al.*, 2008). Además, los recuentos más altos están relacionados con organismos de la clase γ -*Proteobacteria*, lo cual también ha sido reportado en ambientes salinos (Wu *et al.*, 2006). Además, vale la pena resaltar que los más altos recuentos de organismos de la clase β -*Proteobacteria* se obtuvieron en el manantial SP ubicado en departamento de Boyacá, a diferencia de lo reportado en los manantiales SC y LC, ubicados en el departamento de Risaralda, lo cual evidencia diferencias en la composición de las comunidades microbianas a escala espacial.

5.5 GENERACIÓN DE INVENTARIOS BIOLÓGICOS A PARTIR DEL AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS HALÓFILOS Y/O HALOTERANTES AEROBIOS Y ANAEROBIOS HETEROTRÓFICOS

En este trabajo se realizaron diferentes enriquecimientos para favorecer el crecimiento de organismos halófilos y/o halotolerantes heterotróficos tanto aerobios como anaerobios, usando el agua proveniente de cada uno de los manantiales en estudio como elemento clave para el aislamiento de organismos autóctonos para simular en el laboratorio la composición química del medio original.

En todas las series de cultivo se observó crecimiento microbiano, principalmente de bacilos rectos y ligeramente curvos móviles o inmóviles, además, en los enriquecimientos realizados a partir de agua del manantial LC también se observó la presencia de cocos (Figura 23). A pesar de que en todas las series de enriquecimiento se observó crecimiento, no fue posible obtener cultivos puros de todas las series de cultivo, sugiriendo que uno de los mayores limitantes en el proceso de aislamiento de los microorganismos en este estudio estuvo relacionado con el proceso de purificación.

Las diferentes series de cultivo permitieron el aislamiento y purificación de 62 cepas de las cuales 31 fueron aisladas del manantial SC, 14 del manantial LC y 17 del manantial SP (Tabla 20). Las cepas aisladas fueron conservadas en glicerol (20%v/v) a -70°C y depositadas en la colección de microorganismos del departamento de Biología de la Pontificia Universidad Javeriana.



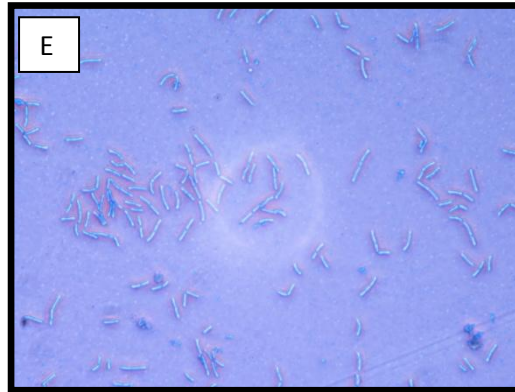


Figura 23. Morfología de cepas bacterianas aisladas mediante las series de enriquecimiento. Se observan morfologías muy distintas desde bacilos pequeños de extremo redondo (A), bacilos largos rectos o ligeramente curvos (B), cocobacilos (C), bacilos de forma irregular y en agrupaciones (D) y bacilos rectos solos o en cadena (E).

El 84% de las cepas del SC, el 92% de las cepas de LC y el 88% de las cepas de SP, presentaron una respuesta de tinción típica de organismos Gram-negativos, la recuperación de organismos Gram-negativos por métodos dependientes de cultivo ha sido también reportada en otros ambientes salinos (Jiang *et al.*, 2007; Catón *et al.*, 2009) y en aguas subterráneas (Chapelle 2001; De la Rosa-García *et al.*, 2007).

Más del 70% de las cepas son móviles. La movilidad puede ser una característica importante en aguas lóxicas en las cuales la materia orgánica disuelta de bajo peso molecular (azúcares, fosfatos y aminoácidos) es disponible en un tiempo y espacio limitado en la columna de agua, por lo cual, una conducta móvil sensorial proporciona a las células ventajas competitivas que favorecen su supervivencia (Alexandre *et al.*, 2004).

Con respecto a la capacidad de crecer en presencia o ausencia de oxígeno, se detectó que el 6% de las cepas aisladas del SC, el 14% de las cepas LC y 29% de las cepas de SP, eran anaerobias estrictas y el 42% de las cepas aisladas de SC, el 64% de las cepas aisladas de LC y el 59% de las cepas aisladas de SP se comportan como organismos facultativos. Estos hábitats también favorecen el desarrollo de poblaciones anaerobias y facultativas cuyos procesos de fermentación o respiración anaerobia pueden desempeñar una función importante en el desarrollo de otros grupos tróficos por la liberación al medio de los productos finales de fermentación tales como el acetato, lactato, formato, aminoácidos, hidrógeno y amoníaco (NH₃).

Tabla 20. Cepas aisladas de los tres manantiales estudiados utilizando diferentes series de cultivo y sus principales características fenotípicas y relación taxonómica.

Manantial	Cepa	Serie de aislamiento	Organismos más cercano (% de similitud de la secuencia 16S ARNr con este organismo más cercano)	Grupo taxonómico	Ambiente donde ha sido reportado previamente	Morfología celular	Coloración de Gram	Movilidad	Aceptores de electrones S ⁰ , SO ₄ , S ₂ O ₃ , Fe ³⁺ , NO ₃	Relación con el oxígeno	Rango de NaCl que permite crecimiento (% p/v)
SC	USBA 38	MB-AMP Acetato de sodio	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (99%)	γ -proteobacteria	Suelos, aguas marinas, lodos activados (Nishino & Sapin, 1993; Borsodi <i>et al.</i> , 2005)	Bacilo recto de 2.5-3.0 μ m de largo por 0.1 μ m de ancho, disposición en pares.	-	+	-	Aerobio	0-5
SC	USBA 40	MB-AMP Acetato de sodio	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (99%)	γ -proteobacteria	Suelos, aguas marinas, lodos activados (Nishino & Sapin, 1993; Borsodi <i>et al.</i> , 2005)	Bacilo recto de 1.5 μ m de largo por 0.2 μ m de ancho.	-	+	-	Aerobio	0-5
SC	USBA 76	MB-KANA Piruvato	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (98%)	α -Proteobacteria	Hojas y tallos de plantas de caña de azúcar (Cavalcante & Döbereiner, 1988)	Bacilo recto de 1 μ m de largo por 0.1 μ m de ancho.	-	+	-	Aerobio	0-7
SC	USBA 78	MB-AMP Glicerol	<i>Thalassospira xiamenensis</i> (98%)	α -Proteobacteria	Aguas costeras océano Pacífico (Liu <i>et al.</i> , 2007)	Bacilo curvo de 0.8 μ m de largo por 0.2 μ m de ancho, disposición en cadenas.	-	+	NO ₃	Aerobio	0.5-10
SC	USBA 83	MB-AMP Glicerol	<i>Thalassospira xiamenensis</i> (98%)	α -Proteobacteria	Aguas costeras Océano Pacífico (Liu <i>al.</i> 2007)	Bacilo curvo de 0.8 μ m de largo por 0.2 μ m de ancho, disposición en cadenas.	-	+	NO ₃	Aerobio	0.5-10
SC	USBA 85	MB-AMP Casaminoácidos	<i>Lysobacter</i> sp. OC7 (99%)	γ -proteobacteria	Agua marina en Japón (Maeda <i>et al.</i> , 2009)	Bacilo recto de 1.5 μ m de largo por 0.1 μ m de ancho.	-	+	NO ₃	Aerobio facultativo	0-10
SC	USBA 349	MB-AER Gelatina	<i>Roseovarius mucosus</i> (99%)	α -Proteobacteria	Cultivo del dinoflagelado <i>Alexandrium ostenfeldii</i> (Biebl <i>et al.</i> , 2005)	Bacilo recto de 1.3-3.0 μ m de largo por 0.5 μ m de ancho.	-	-	-	Aerobio	0-6
SC	USBA 350	MB-ANA-Tween 80	<i>Clostridium bifermentans</i> (99%)	Firmicutes	Aguas residuales (Chamkha <i>et al.</i> , 2001); lodos (Wang <i>et al.</i> , 2003)	Bacilo recto de 1.0-2.0 μ m de largo por 0.5 μ m de ancho.	+	-	NO ₃	Anaerobio	0-3

Tabla 20. (Continuación) Cepas aisladas de los tres manantiales estudiados utilizando diferentes series de cultivo y sus principales características fenotípicas y relación taxonómica.

Manantial	Cepa	Serie de aislamiento	Organismos más cercano (% de similitud de la secuencia 16S ARNr con este organismo más cercano)	Grupo taxonómico	Ambiente donde ha sido reportado previamente	Morfología celular	Coloración de Gram	Movilidad	Aceptores de electrones S ⁰ , SO ₄ , S ₂ O ₃ , Fe ³⁺ , NO ₃	Relación con el oxígeno	Rango de NaCl que permite crecimiento (% p/v)
SC	USBA 351	MB-AER Tributil	<i>Shewanella algae</i> (98%)	γ -proteobacteria	Ambientes acuáticos (Gram <i>et al.</i> , 1999)	Bacilo recto de 3.0 μ m de largo por 0.5 μ m de ancho.	-	+	Fe ³⁺ , NO ₃ , S ⁰ , S ₂ O ₃	Aerobio facultativo	0-6
SC	USBA 352	MB-AMP Piruvato	<i>Stappia indica</i> (99%)	α -Proteobacteria	Agua de mar enriquecida con hidrocarburos aromáticos policíclicos en India (Lai <i>et al.</i> , 2010).	Bacilo de 3.0 μ m de largo por 0.2 μ m de ancho.	-	+	NO ₃	Aerobio	0-6
SC	USBA 353	MB-ANA-Aceite de oliva	<i>Lysobacter</i> sp. OC7 (99%)	γ -Proteobacteria	Agua marina en Japón (Maeda <i>et al.</i> , 2009)	Bacilos ligeramente curvos solos o en parejas de 3.0 μ m de largo por 0.5-0.75 μ m de ancho.	-	+	NO ₃	Aerobio facultativo	0-10
SC	USBA 354	MB-ANA-Tributil	<i>Vibrio alginolyticus</i> (99%)	γ -Proteobacteria	Aguas marinas (Oberbeckmann <i>et al.</i> , 2011)	Bacilos de 3.0-4.0 μ m de largo por 1.0 – 1.5 μ m de ancho.	-	+	NO ₃	Anaerobio facultativo	0.5- 9
SC	USBA 355	MB-AER Almidón	<i>Thalassobaculum</i> sp (90%)	α -Proteobacteria	Aguas marinas - Gori Korea (Zhang <i>et al.</i> , 2008)	Bacilos curvos con puntas redondas de 5.0-7.0 μ m de largo por 1.3 μ m de ancho.	-	+	-	Aerobio	0-4
SC	USBA 356	MB-AER Glucosa, xilosa, ribosa	<i>Vibrio vulnificus</i> (99%)	γ -proteobacteria	Ambientes marinos y estuarios (Jones <i>et al.</i> , 2008)	Bacilos, solos, en pares o cadenas de 0.4-1.0 μ m de largo por 0.2-0.3 μ m de ancho.	-	+	NO ₃	Aerobio	0-7
SC	USBA 357	MB-AER Gelatina	<i>Prolixibacter bellariivorans</i> (98%)	Bacteroidetes	Sedimentos marinos (Holmes <i>et al.</i> , 2007)	Bacilos rectos de 1.3-3.0 μ m de largo por 0.5-0.7 μ m de ancho.	-	-	-	Anaerobio facultativo	0-4
SC	USBA 358	MB- AER Almidón	<i>Thioclava pacifica</i> (98%)	α -Proteobacteria	Ambiente marino (Sorokin <i>et al.</i> , 2005).	Bacilo filamentosos de 3.0 μ m de largo por 0.5-0.7 μ m de ancho.	-	-	-	Aerobio	0-7

Tabla 20. (Continuación) Cepas aisladas de los tres manantiales estudiados utilizando diferentes series de cultivo y sus principales características fenotípicas y relación taxonómica.

Manantial	Cepa	Serie de aislamiento	Organismos más cercano (% de similitud de la secuencia 16S ARNr con este organismo más cercano)	Grupo taxonómico	Ambiente donde ha sido reportado previamente	Morfología celular	Coloración de Gram	Movilidad	Aceptores de electrones S ⁰ , SO ₄ , S ₂ O ₃ , Fe ³⁺ , NO ₃	Relación con el oxígeno	Rango de NaCl que permite crecimiento (% p/v)
SC	USBA 359	MB-AMP Acetato de sodio	<i>Stappia indica</i> (99%)	α -Proteobacteria	Agua de mar enriquecida con hidrocarburos aromáticos policíclicos en India (Lai <i>et al.</i> , 2010).	Bacilo de 1.5 μ m de largo por 0.1 μ m de ancho.	-	+	NO ₃	Aerobio	0-6
SC	USBA 360	MB-AER Metanol	<i>Vibrio natriegens</i> (99%)	γ -Proteobacteria	Ambientes marinos (Farmer, 1992)	Bacilos rectos de 0.6-0.9 μ m de largo por 0.2 μ m de ancho.	-	+	-	Anaerobio facultativo	0.5-10
SC	USBA 361	MB-ANA-Peptona	<i>Desulfovibrio acrylicus</i> (90%)	δ -Proteobacteria	Sedimentos marinos (Van der Maarel <i>et al.</i> 1995)	Bacilos ligeramente curvos de 0.3-0.4 μ m de largo por 0.1 μ m de ancho.	-	+	S ⁰ , SO ₄ , S ₂ O ₃	Anaerobio	0-4
SC	USBA 362	MB-ANA-Almidón	<i>Cellulomonas bogoriensis</i> (97%)	Actinobacteria	Sedimentos de zona litoral en Kenia (Jones <i>et al.</i> , 2005)	Bacilos rectos solos o en pares de 0.4-1.0 μ m de largo por 0.1 μ m ancho. Algunos presentan una gran protuberancia en el extremo	+	+	-	Anaerobio	0-3
SC	USBA 363	MB-AER Trioleato	<i>Thioclava pacifica</i> (98%)	α -Proteobacteria	Ambiente marino (Sorokin <i>et al.</i> , 2005)	Bacilos filamentosos de 3.0 μ m de largo por 0.5-0.7 μ m de ancho.	-	-	-	Aerobio	0-7
SC	USBA 364	MB-ANA Aceite de oliva	<i>Clostridium bifermentans</i> (99%)	Firmicutes	Aguas residuales (Chamkha <i>et al.</i> , 2001); lodos (Wang <i>et al.</i> , 2003)	Bacilos ligeramente curvos 2.0-4.0 μ m de largo por 0.5-1.0 μ m de ancho.	+	-	NO ₃	Anaerobio	0-6
SC	USBA 365	MB-AER Xilosa	<i>Vibrio vulnificus</i> (99%)	γ -Proteobacteria	Ambientes marinos y estuarios (Jones <i>et al.</i> , 2008)	Bacilo, solos en pares o cadenas de 0.4-1.0 μ m de largo por 0.2-0.3 μ m de ancho.	-	+	NO ₃	Anaerobio facultativo	0-10
SC	USBA 366	MB-ANA-Almidón	<i>Vibrio vulnificus</i> (99%)	γ -Proteobacteria	Ambientes marinos y estuarios (Jones <i>et al.</i> , 2008)	Bacilo, solos, en pares o cadenas de 0.4-1.0 μ m de largo por 0.2-0.3 μ m de ancho.	-	+	NO ₃	Anaerobio facultativo	0-7

Tabla 20. (Continuación) Cepas aisladas de los tres manantiales estudiados utilizando diferentes series de cultivo y sus principales características fenotípicas y relación taxonómica.

Manantial	Cepa	Serie de aislamiento	Organismos más cercano (% de similitud de la secuencia 16S ARNr con este organismo más cercano)	Grupo taxonómico	Ambiente donde ha sido reportado previamente	Morfología celular	Coloración de Gram	Movilidad	Aceptores de electrones S ⁰ , SO ₄ , S ₂ O ₃ , Fe ³⁺ , NO ₃	Relación con el oxígeno	Rango de NaCl que permite crecimiento (% p/v)
SC	USBA 367	MB-ANA-Peptona	<i>Clostridium bifermentans</i> (99%)	<i>Firmicutes</i>	Aguas residuales (Chamkha <i>et al.</i> , 2001); lodos (Wang <i>et al.</i> , 2003)	Bacilo recto de 4.0-8.0 µm de largo por 1.0-1.5 µm de ancho.	+	-	-	Anaerobio	0-3
SC	USBA 368	MB-ANA-Tween 80	<i>Pleomorphomonas oryzae</i> (98%)	<i>α-Proteobacteria</i>	Suelos inundados (Xie & Yokota, 2005a)	Bacilo pleomorfo 1.0-5.0 µm de largo por 0.5-1.0 µm de ancho.	-	-	NO ₃	Anaerobio	0-3
SC	USBA 369	MB-ANA-Tributil	<i>Aurantimonas altamirensis</i> (95%)	<i>α-Proteobacteria</i>	Cueva en Altamira – España (Jurado <i>et al.</i> , 2006)	Bacilo recto de 1.5-2.0 µm de largo por 0.8-1.5 µm de ancho.	-	+	NO ₃	Anaerobio facultativo	0-7
SC	USBA 371	MB-AMP-Piruvato	<i>Labrenzia aggregata</i> (99%)	<i>α-Proteobacteria</i>	Aguas marinas - Japón, mar Amarillo, mar Mediterráneo (Biebl <i>et al.</i> , 2007)	Bacilo solo o en pares de 2.0 µm de largo por 0.2 µm de ancho.	-	+	NO ₃	Aerobio facultativo	0-6
SC	USBA 482	MB-AMP-Casaminoácidos	<i>Caenispirillum bisanense</i> (98%)	<i>α-Proteobacteria</i>	Lodos de tintorerías - Corea, Rizósfera (Jung-Hoon, <i>et al.</i> , 2007)	Bacilo recto de 4.5 µm de largo por 0.1 µm de ancho, disposición en cadenas	-	-	NO ₃	Aerobio facultativo	0-15
SC	USBA 483	MB-AMP-Acetato de sodio	<i>Stappia indica</i> (99%)	<i>α-Proteobacteria</i>	Agua de mar enriquecida con hidrocarburos aromáticos policíclicos en India (Lai <i>et al.</i> , 2010).	Bacilo de 1.5 µm de largo por 0.1 µm de ancho.	-	+	NO ₃	Aerobio facultativo	0-6
SC	USBA 484	MB-AMP-Acetato de sodio	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (97%)	<i>γ-Proteobacteria</i>	Suelos, aguas marinas, lodos activados (Nishino & Sapin, 1993; Borsodi <i>et al.</i> , 2005)	Bacilo solo o en pares de 3.5 µm de largo por 0.2 µm de ancho.	-	-	-	Aerobio	0-5
LC	USBA 36	MB-AMP-Etanol	<i>Oceanibaculum indicum</i> (99%)	<i>α-Proteobacteria</i>	Agua marina en India (Lai <i>et al.</i> , 2010).	Bacilo de 2.5-3.0 µm de largo por 0.1 µm de ancho.	-	+	NO ₃	Aerobio facultativo	0-9

Tabla 20. (Continuación) Cepas aisladas de los tres manantiales estudiados utilizando diferentes series de cultivo y sus principales características fenotípicas y relación taxonómica.

Manantial	Cepa	Serie de aislamiento	Organismos más cercano (% de similitud de la secuencia 16S ARNr con este organismo más cercano)	Grupo taxonómico	Ambiente donde ha sido reportado previamente	Morfología celular	Coloración de Gram	Movilidad	Aceptores de electrones S ⁰ , SO ₄ , S ₂ O ₃ , Fe ³⁺ , NO ₃	Relación con el oxígeno	Rango de NaCl que permite crecimiento (% p/v)
LC	USBA 37	MB-AMP Piruvato	<i>Lysobacter</i> sp OC7 (99%)	γ -Proteobacteria	Agua marina en Japón (Maeda <i>et al.</i> , 2009)	Bacilo ligeramente curvo, solo o en cadenas de 3.5 μ m de largo por 0.2 μ m de ancho.	-	-	-	Aerobio	0-10
LC	USBA 86	MB-AMP Piruvato	<i>Caenispirillum bisanense</i> (98%)	α -Proteobacteria	Lodos de tintorerías - Corea, Rizosfera (Jung-Hoon, <i>et al.</i> 2007)	Bacilo recto de 4.0 - 5.0 μ m de largo por 0.3 μ m de ancho.	-	+	-	Aerobio	0-5
LC	USBA 140	MB-AMP-Casaminoácidos	<i>Caenispirillum bisanense</i> (98%)	α -Proteobacteria	Lodos de tintorerías - Corea, rizósfera (Jung-Hoon, <i>et al.</i> , 2007)	Bacilo recto de 2.5 μ m de largo por 0.2 μ m de ancho	-	+	-	Aerobio-	0-15
LC	USBA 151	MB-ANA-Peptona	<i>Dethiosulfovibrio peptidovorans</i> (94%)	<i>Synergistetes</i>	Pozo petrolero (Magot <i>et al.</i> , 1997)	Bacilos ligeramente curvos con extremos redondos de 5.0-7.0 μ m de largo por 1.5 μ m de ancho.	-	+	S ⁰ , S ₂ O ₃	Anaerobio	0.1-7
LC	USBA 370	MB-ANA-Almidón	<i>Prolixibacter bellariivorans</i> (98%)	<i>Bacteroidetes</i>	Sedimentos marinos (Holmes <i>et al.</i> , 2007)	Bacilos rectos de 1.0 -3.0 μ m de largo por 0.05 μ m de ancho.	-	-	-	Anaerobio facultativo	0-4
LC	USBA 372	MB-ANA-Tween-80	<i>Lysobacter</i> sp (99%)	γ -Proteobacteria	Agua marina en Japón (Maeda <i>et al.</i> , 2009)	Bacilos ligeramente curvos solos o en parejas de 1.0-3.0 μ m de largo por 0.5-0.75 μ m de ancho.	-	+	NO ₃	Anaerobio facultativo	0-10
LC	USBA 373	MB-ANA-Tributil + NO ₃	<i>Lysobacter</i> sp (99%)	γ -Proteobacteria	Agua marina en Japón (Maeda <i>et al.</i> , 2009)	Bacilos ligeramente curvos solos o en parejas de 1-3 μ m de largo por 0.5-0.75 μ m de ancho.	-	-	NO ₃	Anaerobio facultativo	0-10
LC	USBA 374	MB-ANA-Gelatina	<i>Vibrio alginolyticus</i> (99%)	γ -Proteobacteria	Aguas marinas (Oberbeckmann <i>et al.</i> , 2011)	Bacilos de 3.0-6.0 μ m de largo por 1.0 μ m de ancho.	-	+	NO ₃	Anaerobio Facultativo	0.1-10

Tabla 20. (Continuación) Cepas aisladas de los tres manantiales estudiados utilizando diferentes series de cultivo y sus principales características fenotípicas y relación taxonómica.

Manantial	Cepa	Serie de aislamiento	Organismos más cercano (% de similitud de la secuencia 16S ARNr con este organismo más cercano)	Grupo taxonómico	Ambiente donde ha sido reportado previamente	Morfología celular	Coloración de Gram	Movilidad	Aceptores de electrones S ⁰ , SO ₄ , S ₂ O ₃ , Fe ³⁺ , NO ₃	Relación con el oxígeno	Rango de NaCl que permite crecimiento (% p/v)
LC	USBA 376	MB-ANA-Peptona	<i>Dethiosulfovibrio peptidovorans</i> (94%)	<i>Synergistetes</i>	Pozo petrolero (Magot <i>et al.</i> , 1997)	Bacilos ligeramente curvos con extremos redondos de 5.0-7.0 µm de largo por 1.5 µm de ancho.	-	+	S ⁰ , S ₂ O ₃	Anaerobio	0.1-7
LC	USBA 377	MB-ANA Tween 80	<i>Vibrio vulnificus</i> (100%)	<i>γ-Proteobacteria</i>	Ambientes marinos y estuarios (Jones <i>et al.</i> , 2008)	Bacilos de 5.0-6.0 µm de largo por 1.0-1.5 µm de ancho.	-	+	NO ₃	Anaerobio facultativo	0-8
LC	USBA 378	MB-ANA Xilosa	<i>Vibrio alginolyticus</i> (99%)	<i>γ-Proteobacteria</i>	Peces marinos y aguas marinas (Oberbeckmann <i>et al.</i> , 2011)	Bacilos de 3.0 -4.0 µm de largo por 1.0-1.5 µm de ancho.	-	+	NO ₃	Anaerobio facultativo	0.5-10
LC	USBA 485	MB-AMP Piruvato	<i>Caenispirillum bisanense</i> (98%)	<i>α-Proteobacteria</i>	Lodos de tintorerías - Corea, rizósfera (Jung-Hoon <i>et al.</i> , 2007)	Bacilo de 3.0 µm de largo por 0.2 µm de ancho.	-	+	-	Aerobio	0-5
LC	USBA 486	MB-AMP Piruvato	<i>Bacillus licheniformis</i> (96%)	<i>Firmicutes</i>	Manantial termal marino Italia (Maugeri <i>et al.</i> , 2002)	Bacilo de 2.5 µm de largo por 0.3 µm de ancho.	+	+		Anaerobio facultativo	0-10
SP	USBA 82	MB-ANA Peptona	<i>Dethiosulfovibrio peptidovorans</i> (94%)	<i>Synergistetes</i>	Pozo petrolero (Magot <i>et al.</i> , 1997)	Bacilos ligeramente curvos con extremos redondos de 5.0-7.0µm de largo por 1.5 µm de ancho.	-	+	S ⁰ , S ₂ O ₃	Anaerobio	0.1-7
SP	USBA 84	MB-ANA Piruvato	<i>Desulfovibrio dechloracetivorans</i> (98%)	<i>δ-Proteobacteria</i>	Sedimentos marinos (Sun <i>et al.</i> , 2000)	Bacilos ligeramente curvos 0.3-0.35 µm de largo por 0.1 µm de ancho.	-	+	SO ₄ , S ⁰ , S ₂ O ₃	Anaerobio	0.1-3
SP	USBA 340	MB-AER Aceite de oliva	<i>Vibrio vulnificus</i> (99%)	<i>γ-Proteobacteria</i>	Ambientes marinos y estuarios (Jones <i>et al.</i> , 2008)	Bacilos de 5.0-6.0 µm de largo por 1.0-.5 µm de ancho.	-	+	NO ₃	Aerobio facultativo	0-4

Tabla 20. (Continuación) Cepas aisladas de los tres manantiales estudiados utilizando diferentes series de cultivo y sus principales características fenotípicas y relación taxonómica.

Manantial	Cepa	Serie de aislamiento	Organismos más cercano (% de similitud de la secuencia 16S ARNr con este organismo más cercano)	Grupo taxonómico	Ambiente donde ha sido reportado previamente	Morfología celular	Coloración de Gram	Movilidad	Aceptores de electrones S ⁰ , SO ₄ , S ₂ O ₃ , Fe ³⁺ , NO ₃	Relación con el oxígeno	Rango de NaCl que permite crecimiento (% p/v)
SP	USBA 341	MB-ANA Acido oleico	<i>Providencia rettgeri</i> (98%)	γ -Proteobacteria	Muestra clínica (Marchandin <i>et al.</i> , 1999). Lago alcalino en India (Joshi <i>et al.</i> , 2008).	Bacilo recto de 2.5µm de largo por 0.5 µm de ancho.	-	-	-	Anaerobio	0-2.5
SP	USBA 342	MB-ANA- Peptona	<i>Lysobacter</i> sp.OC7 (99%)	γ -Proteobacteria	Agua marina en Japón (Maeda <i>et al.</i> , 2009).	Bacilos ligeramente curvos solos o en parejas de 1.0-3.0 µm de largo por 0.5-0.75 µm de ancho.	-	+	NO ₃	Anaerobio facultativo	0-10
SP	USBA 343	MB-ANA Glucosa	<i>Lysobacter</i> sp.OC7 (99%)	γ -Proteobacteria	Agua marina en Japón (Maeda <i>et al.</i> , 2009).	Bacilos ligeramente curvos solos o en parejas de 1.0-3.0 µm de largo por 0.5-0.75 µm de ancho.	-	+	NO ₃	Anaerobio facultativo	0-10
SP	USBA 344	MB-AER peptona	<i>Shewanella algae</i> (98%)	γ -Proteobacteria	Ambientes acuáticos (Gram <i>et al.</i> , 1999)	Bacilos solos o en pares de 0.7-0.2 µm de largo por 0.2 µm de ancho.	-	+	NO ₃ , Fe ³⁺ , S ⁰ , S ₂ O ₃	Anaerobio facultativo	0-6
SP	USBA 345	MB-ANA Aceite de oilva	<i>Lysobacter</i> sp.OC7 (99%)	γ -Proteobacteria	Agua marina en Japón (Maeda <i>et al.</i> , 2009).	Bacilos de 3.0-4.0 µm de largo por 1.0-1.5 µm de ancho.	-	+	NO ₃	Anaerobio facultativo	0.5-10
SP	USBA 346	MB-ANA Tween 80 + S ₂ O ₃	<i>Clostridium bifermentans</i> (99%)	Firmicutes	Aguas residuales (Chamkha <i>et al.</i> , 2001); lodos (Wang <i>et al.</i> , 2003)	Bacilo recto de 4.0-8.0 µm de largo por 1.0-1.5 µm de ancho.	+	-	-	Anaerobio	0-3
SP	USBA 347	MB-ANA Tween 80	<i>Clostridium bifermentans</i> (99%)	Firmicutes	Aguas residuales (Chamkha <i>et al.</i> , 2001); lodos (Wang <i>et al.</i> , 2003)	Bacilo recto de 4.0-8.0 µm de largo por 1.0-1.5 µm de ancho.	+	-	-	Anaerobio	0-3
SP	USBA 348	MB-AER Gelatina	<i>Shewanella algae</i> (98%)	γ -Proteobacteria	Ambientes acuáticos (Gram <i>et al.</i> , 1999)	Bacilos solos o en pares de 0.7-0.2 µm de largo por 0.2 µm de ancho.	-	+	NO ₃ , Fe ³⁺ , S ⁰ , S ₂ O ₃	Anaerobio facultativo	0-6

Tabla 20. (Continuación) Cepas aisladas de los tres manantiales estudiados utilizando diferentes series de cultivo y sus principales características fenotípicas y relación taxonómica.

Manantial	Cepa	Serie de aislamiento	Organismos más cercano (% de similitud de la secuencia 16S ARNr con este organismo más cercano)	Grupo taxonómico	Ambiente donde ha sido reportado previamente	Morfología celular	Coloración de Gram	Movilidad	Aceptores de electrones S ⁰ , SO ₄ , S ₂ O ₃ , Fe ³⁺ , NO ₃	Relación con el oxígeno	Rango de NaCl que permite crecimiento (% p/v)
SP	USBA 822	MB-AER Glucosa	<i>Nitratireductor aquibiodomus</i> (99%)	<i>α-Proteobacteria</i>	Sistema denitrificante alimentado con metanol (Labbé <i>et al.</i> , 2004)	Bacilo recto de 1.0-2.5 μm de largo por 0.6-0.7 μm de ancho.	-	+	NO ₃ ⁻	Aerobio	0-6
SP	USBA 823	MB-AER Glucosa	<i>Shewanella algae</i> (98%)	<i>γ-Proteobacteria</i>	Ambientes acuáticos (Gram <i>et al.</i> , 1999)	Bacilos solos o en pares de 0.7-0.2 μm de largo por 0.2 μm de ancho.	-	+	NO ₃ , Fe ³⁺ , S ⁰ , S ₂ O ₃	Anaerobio facultativo	0-6
SP	USBA 824	MB-AER Glucosa	<i>Shewanella algae</i> (98%)	<i>γ-Proteobacteria</i>	Ambientes acuáticos (Gram <i>et al.</i> , 1999)	Bacilos solos o en pares de 0.7-0.2 μm de largo por 0.2 μm de ancho.	-	+	NO ₃ , Fe ³⁺ , S ⁰ , S ₂ O ₃	Anaerobio facultativo	0-6
SP	USBA 825	MB-AER Glucosa	<i>Shewanella algae</i> (98%)	<i>γ-Proteobacteria</i>	Ambientes acuáticos (Gram <i>et al.</i> , 1999)	Bacilos solos o en pares de 0.7-0.2 μm de largo por 0.2 μm de ancho.	-	+	NO ₃ , Fe ³⁺ , S ⁰ , S ₂ O ₃	Anaerobio facultativo	0-6
SP	USBA 826	MB-AER Glucosa	<i>Shewanella algae</i> (98%)	<i>γ-Proteobacteria</i>	Ambientes acuáticos (Gram <i>et al.</i> , 1999)	Bacilos solos o en pares de 0.7-0.2 μm de largo por 0.2 μm de ancho.	-	+	NO ₃ , Fe ³⁺ , S ⁰ , S ₂ O ₃	Anaerobio facultativo	0-6
SP	USBA 827	MB-AER Glucosa	<i>Shewanella algae</i> (98%)	<i>γ-Proteobacteria</i>	Ambientes acuáticos (Gram <i>et al.</i> , 1999)	Bacilos solos o en pares de 0.7-0.2 μm de largo por 0.2 μm de ancho.	-	+	NO ₃ , Fe ³⁺ , S ⁰ , S ₂ O ₃	Anaerobio facultativo	0-6

Por otra parte, la caracterización taxonómica, usando como marcador molecular el gen que codifica para el 16S del ARNr, permitió determinar que todas las cepas aisladas hacen parte del dominio *Bacteria*, por lo cual la utilización de los antibióticos kanamicina y ampicilina no fue lo suficientemente selectivo para favorecer la recuperación de organismos del dominio *Archaea*.

Los organismos aislados fueron afiliados taxonómicamente a los fila *Proteobacteria* (α , *Delta* (δ) y γ -*Proteobacteria*), *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Synergistetes* y *Actinobacteria*. Siendo α y γ -*Proteobacteria* los grupos de los cuales se aisló una mayor cantidad de géneros microbianos.

5.5.1 Microorganismos aislados del manantial SC

La identificación taxonómica de las 31 cepas aisladas permitió clasificarlos dentro de los fila *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Actinobacteria*.

Filo *Proteobacteria*

Los organismos aislados del filo *Proteobacteria* pertenecen a las clases α , δ y γ -*Proteobacteria*.

Clase α -*Proteobacteria*

En la clase α -*Proteobacteria* se clasificaron once cepas relacionadas con organismos de las familias *Rhodospirillaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Methylocystaceae*, *Acetobacteraceae* y *Aurantimonadaceae*.

- Familia *Rhodospirillaceae*: a esta familia se asignaron las cepas USBA 78, USBA 83 y USBA 355.

El análisis de la secuencia del 16S ARNr de las cepas USBA 78 y USBA 83 indicó que estas dos cepas tienen un porcentaje de similitud entre ellas del 100%, y del 98% con *Thalassospira xiamenensis*, un microorganismo aislado de una piscina de agua de mar y desechos de aceite en China (Liu *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta el porcentaje de similitud entre las cepas USBA 78 y USBA 83, se seleccionó la cepa USBA 83 para su posterior análisis fenotípico.

La cepa USBA 83 es un bacilo curvo de 0.8 μm de largo por 0.2 μm de ancho, Gram-negativo, no esporoformador, móvil, aerobio facultativo. En condiciones anaerobias utiliza nitrato (NO_3^-) como aceptor de electrones pero no azufre elemental (S°), tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), sulfato (SO_4^{2-}) ni hierro férrico (Fe^{3+}). Crece en un rango de NaCl de 0.5 a 10% (p/v) presentando un crecimiento óptimo en 2 a 4% (p/v) de NaCl. Tiene un metabolismo quimioheterotrófico y crece utilizando etanol, glicerol, formiato, acetato, propionato, butirato, casaminoácidos, peptona, pepticasa, xilosa, trehalosa, fructosa, rafinosa, arabinosa, mannososa, maltosa, ribosa, pero no metanol ni citrato. Los resultados obtenidos indican que la cepa USBA 83 y *T. xiamenensis*, comparten muchas de sus características fenotípicas, la única diferencia observada a partir de los análisis realizados es que la cepa *T. xiamenensis* no utiliza rafinosa.

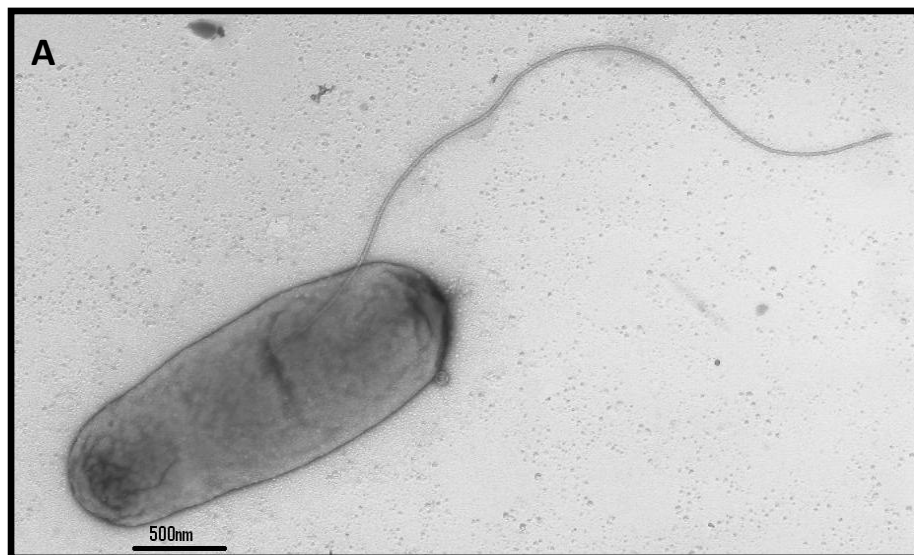
Con respecto a la cepa USBA 355, el análisis de la secuencia del 16S ARNr mostró un porcentaje de similitud del 90% con organismos del género *Thalassobaculum* y debido a este bajo porcentaje de similitud con organismos previamente cultivados se realizó un análisis polifásico que incluyó la determinación de sus características fenotípicas, genotípicas y quimiotaxonómicas. Los resultados de estos análisis se describen más adelante.

- Familia *Rhodobacteraceae*: a esta familia se asignaron las cepas USBA 352, USBA 359, USBA 483, USBA 371, USBA 358, USBA 363, USBA 349 y 482.

El análisis de la secuencia del 16S del ARNr de las cepas USBA 352, USBA 359 y USBA 483 indicó una similitud del 100% entre sus secuencias y un porcentaje de similitud del 99% con la especie *Stappia indica* aislada en India a partir de agua de mar enriquecida con hidrocarburos aromáticos policíclicos (Lai *et al.*, 2010). Dada la similitud en la secuencia del 16S del ARNr de las cepas mencionadas se seleccionó la cepa USBA 352 para su análisis fenotípico.

La cepa USBA 352 es un bacilo recto de 2.5 μm de largo por 0.8 μm de ancho, móvil por la presencia de un flagelo subpolar, no esporoformador, (Figura 24A), Gram-negativo (Figura 24B). Se comporta como un organismo aerobio facultativo ya que puede crecer en condiciones anaerobias en presencia de NO_3^- , pero no en presencia de S° , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SO_4^{2-} ni Fe^{3+} . Se evidenció la presencia del gen *nifH* mediante PCR

siguiendo el protocolo descrito por Demba Diallo *et al.*, (2004), aunque esta característica no ha sido evaluada en la cepa tipo. La cepa crece en un rango de NaCl de 0 a 6% (p/v) con un crecimiento óptimo al 1% (p/v). Tiene un metabolismo quimioheterotrófico, utiliza ribosa, lactosa, acetato pero no etanol. A diferencia de la cepa USBA 352, *Stappia indica* no crece en ausencia de NaCl (0.5 a 11% p/v de NaCl), sin embargo, se requiere de un mayor estudio de las características genotípicas, que incluya hibridización ADN-ADN, análisis quimiotaxonómicos y una mayor profundización en sus características fenotípicas para lograr identificar si la cepa USBA 352 es una nueva especie del género *Stappia*.



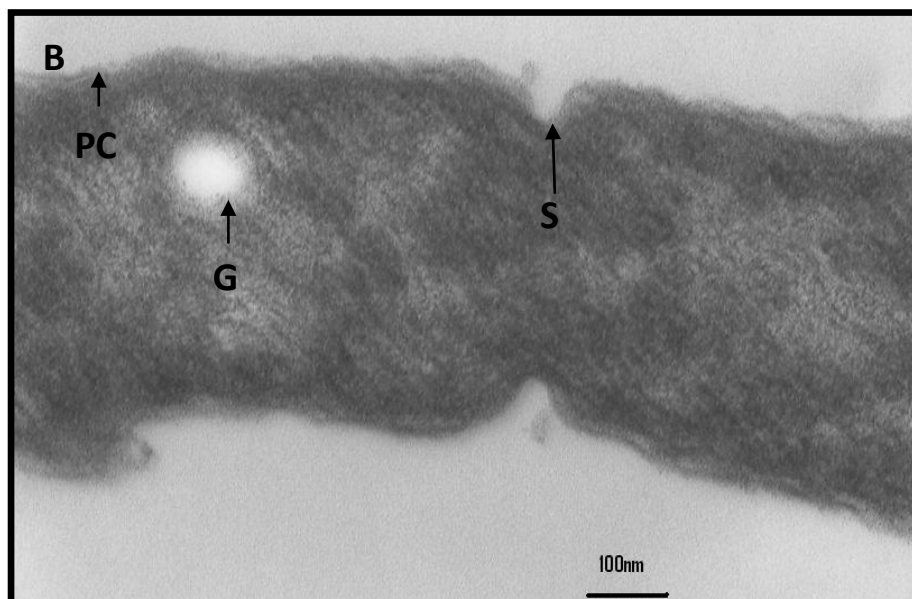


Figura 24. Microscopía electrónica de la cepa USBA 352. A) Muestra la presencia de un flagelo subpolar. B) Microscopía de delgadas secciones que muestran una pared celular típica de bacterias Gram-negativa, PC: pared celular, S: septo de división celular y G: gránulo de inclusión.

El análisis de la secuencia del 16S del ARNr de la cepa USBA 371 indicó un porcentaje de similitud del 99% con la especie *Labrenzia aggregata* (Uchino *et al.*, 1998; Biebl *et al.*, 2007). La cepa USBA 371 es un bacilo recto de 2.0 μm de largo por 0.2 μm de ancho, Gram-negativo, no esporoformador y móvil. Se comporta como un organismo aerobio facultativo ya que puede crecer en condiciones anaerobias en presencia de NO_3^- , pero no en presencia de S° , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SO_4^{2-} ni Fe^{3+} o por fermentación. Crece a concentraciones de NaCl de 0 a 6% (p/v) con un óptimo a 1% (p/v). No se detectó la producción de carotenoides ni de bacterioclorofila *a* (Bchl *a*) creciendo en glucosa (10 mM), en condiciones aerobias y en la oscuridad, siguiendo la metodología realizada por Biebl *et al.*, (2007) para la cepa *Labrenzia alexandrii*. Vale la pena resaltar que la expresión de genes relacionados al proceso fotosintético es altamente dependiente de parámetros ambientales en organismos aerobios que producen Bchl *a*, además la producción de Bchl *a* puede variar entre especies que muestran un alto grado de similitud en su secuencia de 16S ARNr (Biebl & Wagner-Döbler, 2006), lo anterior indica que aunque bajo los parámetros evaluados no se detectó producción de Bchl *a* en la cepa USBA 371, sería necesario realizar otras pruebas como la amplificación de genes relacionados con el centro de reacción fotosintético como el gen *pufLM*. En condiciones quimioheterotróficas creció en acetato, propionato, piruvato, citrato,

casaminoácidos, xilosa, trehalosa, arabinosa, mannososa, glucosa y ribosa. Crece débilmente en maltosa y no utiliza butirato ni lactosa. A partir de los análisis realizados se encontró que a diferencia de la cepa USBA 371, la cepa *Labrenzia aggregata* crece en un rango de NaCl de 0.3 a 6% (p/v) (Uchino *et al.*, 1998) mientras que la cepa USBA 371 no requiere de iones Na⁺ para crecer. No se observó crecimiento en etanol, metanol ni citrato.

El análisis de la secuencia del 16S del ARNr indicó que las cepas USBA 358 y USBA 363 tienen un porcentaje de similitud entre ellas de 100% y del 98% con la especie *Thioclava pacifica* aislada de un pozo marino hidrotermal sulfúrico en Papúa, Nueva Guinea (Sorokin *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta el alto porcentaje de similitud en la secuencia del 16S ARNr de las cepas aisladas se seleccionó la cepa USBA 363 para su posterior análisis fenotípico. La cepa USBA 363 es un bacilo filamentosos de 3.0 µm de largo por 0.5-0.7 µm de ancho, Gram negativo, no esporoformador, no móvil, aerobio estricto. Crece en un rango de NaCl de 0 a 7% (p/v), presentando un crecimiento óptimo en 3 a 4% (p/v) de NaCl. La cepa crece en condiciones quimiheterotróficas utilizando metanol, etanol, glicerol, formiato, acetato, propionato, citrato, casaminoácidos, peptona, pepticasa, glucosa, trehalosa, fructosa, arabinosa, mannososa y ribosa. También utiliza débilmente xilosa, rafinosa y maltosa. No se observó crecimiento en butirato. La cepa USBA 363 se diferencia de *Thioclava pacifica* por su capacidad para utilizar sustratos como metanol, formiato, ribosa y fructosa, además no requiere de iones Na⁺ a diferencia de la cepa *T. pacifica* la cual crece en un rango de NaCl de 0.1 a 9.0% (p/v). A pesar de las diferencias observadas se requiere de una mayor profundización en la determinación de las características genotípicas y quimiotaxonómicas para identificar si la cepa USBA 363 es una nueva especie del género *Thioclava*.

El análisis de la secuencia del 16S del ARNr de la cepa USBA 349 indicó que esta tiene un porcentaje de similitud del 99% con *Roseovarius mucosus* aislado de un cultivo del dinoflagelado *Alexandrium ostenfeldii* presente en ambientes marinos (Biebl *et al.*, 2005). La cepa USBA 349 es un bacilo recto de 1.3–2.0 µm de largo por 0.5–0.7 µm de ancho, Gram-negativo, no esporoformador, no móvil, aerobio estricto. Crece en un rango de NaCl de 0 a 6% (p/v) y tiene un crecimiento óptimo a una concentración de 0.1%. La cepa USBA 349 es un organismo asacarolítico, que en condiciones

quimioheterotróficas crece en glicerol, acetato, butirato fumarato, lactato, piruvato y succinato. No se observó crecimiento en etanol, metanol ni citrato. No se detectó la producción de carotenoides ni de Bchl *a* creciendo en peptona (1% p/v), en condiciones aerobias y en la oscuridad tal como lo describe Bielb *et al.*, (2005) para la cepa *Roseovarius mucosus*, en la cual se detectaron cantidades traza. Sin embargo, tal como se mencionó anteriormente sería necesario realizar otras pruebas como la amplificación del gen *pufLM* para determinar si efectivamente la cepa carece de esta característica. Además de la ausencia de Bchl *a* en la cepa USBA 349, las dos cepas se diferencian en los requerimientos de iones Na⁺, ya que la cepa USBA 349 no requiere iones Na⁺ mientras *Roseovarius mucosus* crece en un rango de salinidad de 0.3 a 10% (p/v) de NaCl.

El análisis de la secuencia del 16S del ARNr de la cepa USBA 482 indicó que tiene un porcentaje de similitud del 98% con *Caenispirillum bisanense* aislada de una planta de tratamiento de aguas residuales de una empresa de colorantes en Corea (Yoon *et al.* 2007a), es un bacilo recto de 4.5 µm de largo por 0.1 µm de ancho, se observa solo o en cadenas, Gram negativo, no móvil, aerobio. No crece en condiciones anaerobias en presencia de NO₃⁻, S^o, S₂O₃²⁻, SO₄²⁻ ni Fe³⁺. Se evidenció la presencia del gen *nifH* mediante PCR siguiendo el protocolo descrito por Demba Diallo *et al.*, (2004), aunque la capacidad para fijar nitrógeno atmosférico no ha sido evaluada previamente para la cepa tipo de la especie. Por otra parte, la cepa crece en un rango de NaCl de 0 a 15% (p/v) siendo su crecimiento óptimo a 2.0% (p/v). Tiene crecimiento quimioheterotrófico y crece en presencia de glicerol, formiato, lactato, acetato, piruvato, lactato, casaminoácidos, pepticasa, peptona, glucosa y ribosa, pero no en etanol, metanol, citrato, butirato, propionato, trehalosa, arabinosa, mannososa, xilosa ni maltosa. Se diferencia de *C. bisanense* por el rango de salinidad en el cual crece que es de 0 a 5% (p/v) de NaCl.

- Familia *Methylocystaceae*: a esta familia se asignó la cepa USBA 368.

El análisis de la secuencia del 16S del ARNr indicó que la cepa USBA 368 presenta un porcentaje de similitud del 98% con *Pleomorphomonas oryzae*, organismo aislado por primera vez de la rizósfera de plantas de arroz (Xie & Yokota, 2005). La cepa USBA 368 es un bacilo recto de 1.0–5.0 µm de largo por 0.6–1.0 µm de ancho, Gram-negativo,

no esporoformador, no móvil, anaerobio con la capacidad de usar NO_3^- como aceptor de electrones pero no S° , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SO_4^{2-} ni Fe^{3+} . Se evidenció la presencia del gen *nifH* mediante PCR siguiendo el protocolo descrito por Demba Diallo *et al.*, (2004). Crece a una concentración de NaCl de 0 a 3.0% (p/v), presentando un crecimiento óptimo a 0.5% (p/v). Crece quimioheterotróficamente en glicerol, piruvato, acetato, glucosa, trehalosa, fructosa, arabinosa, mannososa, ribosa, sacarosa, manitol. No se observó crecimiento en metanol, etanol, lactato, citrato o maltosa. Las características evaluadas no permiten determinar diferencias con la cepa *Pleomorphomonas oryzae*.

- Familia *Acetobacteraceae*: a esta familia se asignó la cepa USBA 76.

La cepa USBA 76 presentó 98% de similitud en su secuencia de 16S ARNr con *Gluconacetobacter diazotrophicus*, organismo reportado como fijador endófito de nitrógeno aislado por primera vez de las hojas y tallos de plantas de caña de azúcar (Cavalcante & Döbereiner, 1988). La cepa USBA 76 es un bacilo de 1.0 μm de largo por 0.1 μm de ancho, Gram-negativo, no esporoformador, móvil, aerobio. No se evidenció la presencia del gen *nifH* al realizar PCR siguiendo el protocolo descrito por Demba Diallo *et al.*, (2004). Crece en un rango de NaCl de 0 a 7.0% (p/v) con un óptimo de 2.5 a 4.0%. Crece quimioheterotróficamente en etanol, glicerol, formiato, acetato, propionato, piruvato, citrato, casaminoácidos, pepticasa, peptona, glucosa y xilosa. Creció débilmente en metanol, trehalosa, rafinosa y fructosa. No se observó crecimiento en arabinosa, mannososa, maltosa ni ribosa. A diferencia de *G. diazotrophicus*, en la cepa USBA 76 no se detectó la presencia del gen *nifH*, lo cual sugiere que la cepa aislada puede ser una nueva especie del género *Gluconacetobacter*, sin embargo, se requiere determinar las características genotípicas y quimiotaxonómicas de la cepa para su clasificación.

- Familia *Aurantimonadaceae*: a esta familia se asignó la cepa USBA 369.

El análisis de la secuencia del 16S del ARNr mostró que la cepa USBA 369 tiene un porcentaje de similitud del 95% con *Aurantimonas altamirensis* aislada de la cueva Altamira en España (Mendes *et al.*, 2008). La cepa USBA 369 es un organismo Gram-negativo, móvil, aerobio facultativo. No requiere de iones Na^+ y presenta crecimiento quimioheterotrófico. Debido a sus características genotípicas y fenotípicas se realizó un

análisis polifásico para una completa descripción de la especie, la cual se describe más adelante.

Clase δ -Proteobacteria

De la clase δ -Proteobacteria se aisló la cepa USBA 361 un microorganismo de la familia *Desulfovibrionaceae* y distantemente relacionada con la especie *Desulfovibrio acrylicus* (90% de similitud) un organismo aislado de sedimentos marinos (van Der Maarel *et al.*, 1995). La cepa aislada es un bacilo ligeramente curvo de 0.3 μm de largo por 0.1 μm de ancho, Gram-negativo, móvil, anaerobio con la capacidad de usar SO_4^{2-} como aceptor de electrones. Crece en un rango de NaCl de 0 a 4% (p/v) y óptimamente a 0.5% (p/v). Es un organismo quimioheterotrófico que crece en etanol, piruvato, lactato, succinato y peptona. Un análisis polifásico más detallado no fue posible debido a la dificultad de mantener un cultivo viable de esta cepa.

Clase γ -Proteobacteria

Los microorganismos pertenecientes a esta clase están relacionados con las familias *Xanthomonadaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Vibrionaceae* y *Shewanellaceae*.

- Familia *Xanthomonadaceae*: a esta familia se asignaron las cepas USBA 85 y USBA 353.

El análisis de la secuencia del 16S del ARNr de las cepas aisladas indicó que tienen un porcentaje de similitud del 99% con la cepa *Lysobacter* sp. OC7 aislada de aguas marinas en Japón (Maeda *et al.*, 2009), a excepción de la cepa USBA 85, la cepa USBA 353 presentó un porcentaje de similitud del 99.9% con las cepas USBA 037, USBA 372, USBA 373, USBA 342 y USBA 343 aisladas de los manantiales salinos LC y SP. Teniendo en cuenta la similitud en las características morfológicas, rasgos fenotípicos y secuencia del 16S del ARNr entre las cepas se seleccionó la cepa USBA 372 para la descripción de sus características fenotípicas que se presentará posteriormente.

- Familia *Pseudomonadaceae*: a esta familia se asignaron las cepas USBA 40, USBA 38 y USBA 484.

El análisis de la secuencia del 16S ARNr de las cepas mencionadas muestra un porcentaje de similitud del 99% para las cepas USBA 38 y USBA 40 y del 97% para la cepa USBA 484 con la especie *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Stanier, 1966). Las cepas aisladas son bacilos rectos de 2.0-3.0 μm de largo por 0.5-0.75 μm de ancho, Gram-negativos (Figura 25), aerobios, no móviles. Las cepas crecen en un rango de NaCl de 0 a 5% (p/v). Las tres cepas son capaces de crecer quimioheterotróficamente en lactato, acetato y arabinosa pero no en sacarosa, mannososa ni maltosa. Además entre las cepas aisladas se observaron diferencias, ya que a diferencia de la cepa USBA 40, las cepas USBA 38 y USBA 484 crecen en etanol y fructosa. Además, la cepa USBA 484 no crece en citrato, que es utilizado por las cepas USBA 38 y USBA 40. En general las tres cepas se diferencian de *P. pseudoalcaligenes* por su capacidad para usar lactato, acetato y arabinosa (Goto, 1983).

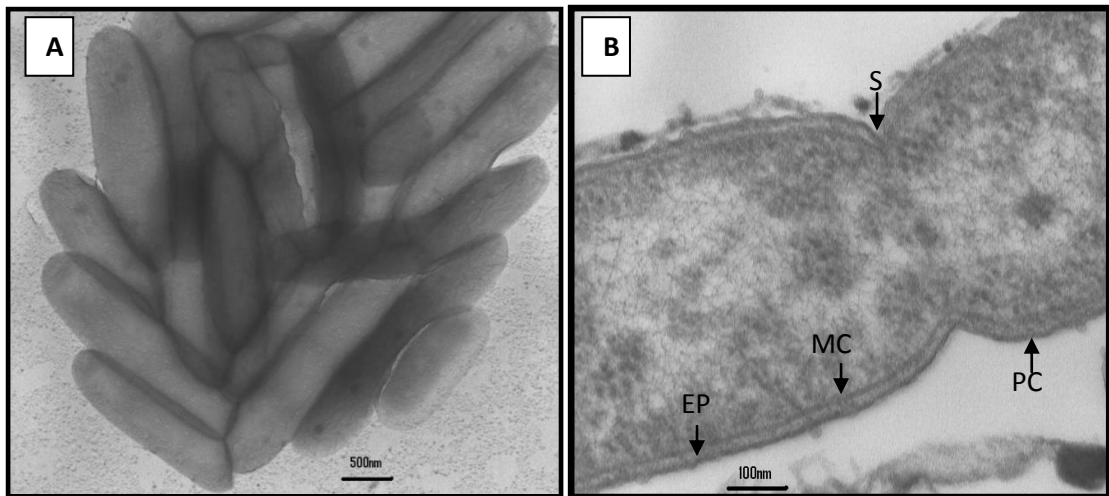


Figura 25. (A) Tinción negativa de la cepa USBA 484 (B) Microscopía electrónica que muestra la pared típica de bacterias Gram-negativas, PC: pared celular, EP: espacio periplásmico, MC: membrana citoplasmática y S: septo de división celular.

- Familia *Vibrionaceae*: a esta familia se asignaron las cepas USBA 354, USBA 356, USBA 360, USBA 365 y USBA 366.

El análisis de la secuencia del 16S del ARNr mostró que la cepa USBA 354 está cercanamente relacionada con *Vibrio alginolyticus* (99% de similitud), las cepas USBA

356, USBA 365 y USBA 366 están cercanamente relacionadas con *Vibrio vulnificus* (99% de similitud) y la cepa USBA 360 está cercanamente relacionada con *Vibrio natriegens* (99% de similitud). Todas las cepas son bacilos curvos de 0.5-1.0 μm de largo por 0.2-0.3 μm de ancho, son bacilos Gram-negativos, móviles, anaerobios facultativos. La capacidad para reducir NO_3^- fue evidenciada en las cepas USBA 354, USBA 365 y USBA 366 pero no en la cepa USBA 360. Las cepas USBA 356, USBA 365 y USBA 366 crecen en un rango de NaCl de 0 a 10% (p/v) y óptimamente al 0.1% (p/v). La cepa USBA 360 crece en un rango de NaCl de 0.5 a 10% (p/v) con un óptimo de 1 a 4% (p/v). Estas cepas son quimioheterotróficas y crecen en acetato, peptona, casaminoácidos, glucosa, trehalosa, manosa, maltosa, sacarosa y metanol. A diferencia de la especie *Vibrio vulnificus* las cepas USBA 356, USBA 365 y USBA 366 no requieren iones Na^+ , aunque se ha publicado que todas las cepas aisladas de la especie *V. vulnificus* requieren Na^+ , también se ha reportado que algunas cepas de la familia *Vibrionaceae* pueden crecer en ausencia de este ión (Farmer, 1992), lo cual sugiere una amplia variedad metabólica en los organismos de esta familia.

- Familia *Shewanellaceae*: a esta familia se asignó la cepa USBA 351.

El análisis de la secuencia del 16S del ARNr de la cepa USBA 351 mostró un porcentaje de similitud del 98% con *Shewanella algae* ampliamente reportada en ambientes marinos (Venkateswaran *et al.*, 1999). La cepa USBA 351 es un bacilo recto de 1.5-3.0 μm de largo por 0.2-0.7 μm de ancho, Gram-negativo, no esporoformador, móvil, anaerobio facultativo, que crece en un rango de NaCl de 0 a 6% (p/v) presentando óptimo crecimiento a 0.5% (p/v). La cepa USBA 351 reduce Fe^{3+} , NO_3^- , S^0 y $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ como se ha reportado previamente para *Shewanella algae*, sin embargo, se diferencia de esta cepa por la ausencia de gelatinasas y la capacidad para crecer usando fructosa como fuente de carbono.

Filo Firmicutes

El análisis de las secuencias del 16S del ARNr permitió clasificar a las cepas USBA 350, USBA 364 y USBA 367, en la familia *Clostridiaceae*. Las cepas presentaron un porcentaje de similitud del 99% con *Clostridium bifermentans*. Las cepas aisladas son bacilos de 3.0-5.0 μm de largo por 0.9-1.5 μm de ancho, Gram-positivos,

esporoformadores, anaerobios. A excepción de la cepa 364 que crece en un rango de NaCl de 0 a 6% (p/v) y a una concentración óptima de 1.5% (p/v), todas crecen en un rango de NaCl de 0 a 3% (p/v). Además, se detectó la capacidad de la cepa USBA 364 de reducir NO_3^- , lo cual no ha sido reportado para *C. bif fermentans* pero sí para especies del género como *C. butyricum*, *C. perfringens* y *C. tertium* (Keith *et al.*, 1982). Todas las cepas presentaron crecimiento positivo en etanol, acetato, formiato, propionato, isobutirato, glucosa, y ribosa.

Filo Bacteroidetes

El análisis de la secuencia del 16S del ARNr permitió clasificar a la cepa USBA 357 en el filo *Bacteroidetes*. La cepa USBA 357 tiene un porcentaje de similitud del 97% con *Prolixibacter bellariivorans* un organismo aislado de sedimentos marinos (Holmes *et al.*, 2007). La cepa USBA 357 es un bacilo recto de 10-11 μm de largo por 0.2-0.3 μm de ancho, Gram-negativo, no móvil, no esporoformador, anaerobio facultativo crece fermentativamente y no utiliza como aceptores de electrones Fe^{3+} , NO_3^- , S° ni $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$. Crece en un rango de NaCl de 0 a 4% (p/v), siendo la concentración óptima de 0 a 0.1% (p/v). La cepa USBA 357 crece quimiorganotróficamente en formiato, acetato, propionato, citrato, casaminoácidos, peptona, pepticasa, glucosa, xilosa, trehalosa, fructosa, arabinosa, mannososa, ribosa y maltosa. Crece débilmente sobre rafinosa y lactato y no fue posible observar crecimiento en etanol, metanol ni butirato. Aunque la cepa aislada comparte muchas de las características fenotípicas reportadas para *P. bellariivorans*, se diferencian en el rango y concentración óptima de NaCl en la cual crecen, ya que *P. bellariivorans* crece a concentraciones de NaCl de 0.5 a 8 % (p/v) y presenta crecimiento óptimo al 2.0% (p/v). Además se observó que a diferencia de la cepa USBA 357, *P. bellariivorans* no crece en acetato, citrato, propionato, casaminoácidos ni ribosa. Estas diferencias sugieren que la cepa USBA 357 puede ser una nueva especie del género, sin embargo, se requiere profundizar en las caracterizaciones quimiotaxonómicas y genotípicas de la cepa.

Filo Actinobacteria

Del filo *Actinobacteria* se aisló la cepa USBA 362 la cual tiene un porcentaje de similitud del 97% con *Cellulomonas bogoriensis* un organismo alcalofílico de la familia

Cellulomonadaceae aislado de sedimentos de una zona litoral en Kenia (Jones *et al.*, 2005). La cepa USBA 362 es un bacilo recto de 0.4-1.0 μm de largo por 0.1 μm de ancho, se observa solo o en pares, es Gram-positivo y anaerobio. Crece en un rango de NaCl de 0 a 3% (p/v) con un óptimo a 1.5% (p/v) y a un rango de pH de 6-8.5 con un óptimo a 7.4. Crece quimioheterotróficamente en glucosa, xilosa, trehalosa, arabinosa, fructosa y sacarosa. No utiliza mannososa, ribosa, piruvato, butirato, peptona, pepticasa, casaminoácidos ni gelatina. La cepa USBA 362 presentó diferencias marcadas con la cepa *C. bogoriensis* ya que esta cepa es un organismo alcalófilo que crece óptimamente a pH de 9 a 10 y en un rango de NaCl de 0 a 8.0% (p/v). Además, en cuanto a la utilización de sustratos, *C. bogoriensis* crece en mannososa, peptona y gelatina. Estas diferencias permiten sugerir que la cepa USBA 362 puede ser una nueva especie del género. Pero se requiere de un completo análisis polifásico que permita definir su clasificación.

5.5.1.1 Descripción taxonómica de la cepa USBA 355

El bajo porcentaje de similitud en la secuencia del 16S ARNr de la cepa USBA 355 con organismos del género *Thalassobaculum* (90% de similitud) sugiere que la cepa USBA 355 puede ser un nuevo género de la familia *Rhodospirillaceae*, por lo cual se realizó un análisis polifásico que incluyó la determinación de características fenotípicas, genotípicas y quimiotaxonómicas.

La familia *Rhodospirillaceae* está formada por 26 géneros microbianos que presentan gran variedad en sus propiedades metabólicas pues incluye organismos fotoheterotróficos, fotoautotróficos y quimioheterotróficos.

Los géneros quimioheterotróficos pueden ser anaerobios facultativos como los géneros *Skermanella*, *Telmatospirillum*, *Caenispirillum*, *Novispirillum*, *Thalassobaculum*, *Nisaea*, *Fordinicurvata* (Sly & Stackebrandt, 1999; Sizova *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2007a; Yoon *et al.*, 2007b; Zhang *et al.*, 2008; Urios *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009) o pueden ser aerobios y/o microaerófilos como los géneros *Azospirillum*, *Conglomeromonas*, *Magnetospirillum*, *Thalassospira*, *Tistrella*, *Inquilinus*, *Defluviicoccus*, *Insolitispirillum*, *Oceanibaculum*, *Marispirillum*, *Pelagibius*, *Dongia* (Tarrand *et al.*, 1978; Skerman *et al.*, 1983; Schleifer *et al.*, 1991; López-López *et al.*,

2002; Shi *et al.*, 2002; Coenye *et al.*, 2002; Maszenan *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2007b; Lai *et al.*, 2009a; Lai *et al.*, 2009b; Choi *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010). Algunos miembros tienen la capacidad de cambiar su modo nutricional dependiendo de la disponibilidad de luz, concentración de oxígeno y fuente de carbono, tal es el caso de los géneros *Rhodocista*, *Rhodospira*, *Roseospira*, *Rhodovibrio*, *Rhodospirillum* y *Phaeospirillum*, *Phaeovibrio* (Kawasaki *et al.*, 1992; Pfennig *et al.*, 1997; Imhoff *et al.*, 1998; Lakshmi *et al.*, 2011), mientras que otros tienen la capacidad de fijar nitrógeno gaseoso, como los organismos del género *Azospirillum* (Xie & Yokota, 2005b).

Teniendo en cuenta la variedad fenotípica de los organismos de la familia *Rhodospirillaceae* se realizaron diferentes pruebas que permitieran detectar las principales características de la cepa USBA 355.

- Morfología de la cepa

La cepa USBA 355 se observó en fase exponencial de crecimiento en glucosa (20 mM), como un bacilo ligeramente curvo y recto de 3.0–3.5 μm de largo por 0.6–0.7 μm de ancho, además, aunque en medio líquido las células se observan móviles, la microscopía electrónica no reveló la presencia de flagelos (Figura 26) o filamento axial (Figura 27B), las células se observan solas o en pares y no presentan esporas ni fueron termoresistentes.

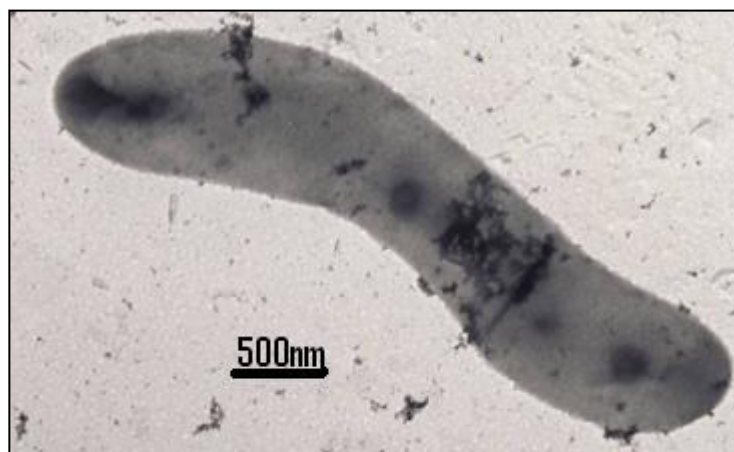


Figura 26. Tinción negativa de la cepa USBA 355.

Aunque la cepa USBA 355 presentó tinción Gram-negativa, la microscopía electrónica de finas secciones de la célula reveló una pared celular típica de células Gram-positivas

(Figura 27A). También se observó la presencia de gránulos de inclusión y la ausencia de membranas fotosintéticas intracelulares (Figura 27B).

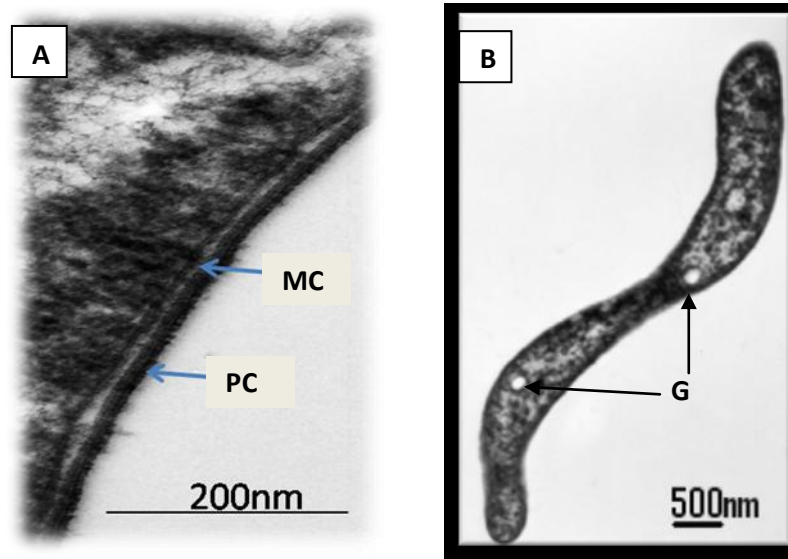


Figura 27. Micrografía electrónica A) delgadas secciones de la cepa USBA 355 la cual revela una estructura de pared celular típica de organismos Gram-positivos. PC: pared celular, MC: membrana citoplasmática B) Se observa la presencia de gránulos de inclusión (G).

- Crecimiento y propiedades metabólicas

La cepa USBA 355 crece a un rango de temperatura de 20 a 40°C y óptimamente a 30°C, crece en un rango de pH de 5.0 a 8.0 y óptimamente a un pH de 6.5 a 6.7, aunque la cepa USBA 355 no requirió NaCl para su crecimiento, toleró hasta 4.0 % (p/v) de NaCl y creció óptimamente a una concentración de 0.5% (p/v) de NaCl.

La cepa USBA 355 es un organismo aerobio, quimioheterotrófico que crece en piruvato, butirato, succinato, glucosa, mannososa, xilosa, galactosa, arabinosa, trehalosa, celobiosa, ramnosa, fructosa, maltosa, lactosa, sacarosa, gelatina, peptona, triptona, pepticasa, casaminoácidos, arginina, alanina, leucina, isoleucina, valina, glutamato, glicerol e inositol. No utilizó formiato, acetato, metanol, lactato, citrato, α -cetoglutarato, ribosa, rafinosa, metionina, treonina, lisina, glicina, histidina, tween 80, etil-oleato, aceite de oliva ni benzoato. Tampoco presentó crecimiento quimiolitotrófico en MB suplementado con NaHCO_3 y $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (10mM), S° (1% p/v) o SO_3^{2-} (5mM), en condiciones aerobias y en la oscuridad.

La cepa USB A 355 utiliza como fuente de nitrógeno urea (0.1% p/v), NO_3^- (10mM) y glutamato (2.5mM) pero no NO_2^- (10mM). Por otra parte, en ausencia de fuentes de nitrógeno y en condiciones microaerofílicas se detectó su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico al realizar la prueba de reducción de acetileno y también se detectó la presencia del gen *nifH*.

- Determinación de la susceptibilidad a antibióticos

La prueba de sensibilidad a antibióticos reveló que la cepa USB A 355 es sensible a una concentración de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ampicilina y estreptomycin y a una concentración de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de tetraciclina, cloranfenicol y penicilina.

- Determinación de presencia de bacterioclorofila *a*

Teniendo en cuenta que la familia *Rhodospirillaceae* incluye géneros aerobios fototróficos que producen Bchl *a*, se evaluó la capacidad de la cepa USB A 355 para producir este fotopigmento. El análisis mostró solo un pico de absorción a 380 nm indicando la presencia de carotenoides y la ausencia de la Bchl *a* (Yurkov & van Gemerden, 1993) (Figura 28), lo cual sugiere que la cepa USB A 355 es claramente distinguible de los géneros fotosintéticos de la familia *Rhodospirillaceae*.

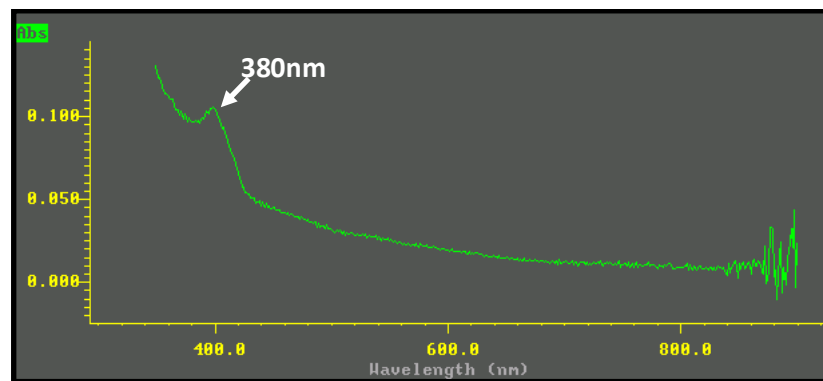


Figura 28. Evaluación espectrofotométrica de pigmentos celulares en la cepa USB A 355

- Análisis quimiotaxonómico de la cepa USB A 355

El análisis de quinonas mostró que la cepa USB A 355 tiene una alta concentración de ubiquinona-10 (Q-10) (95%) y en menor cantidad Q-9 (5%). Estos datos confirman la afiliación filogenética de la cepa a la familia *Rhodospirillaceae*, ya que una característica

de la mayoría de los miembros de esta familia es la presencia de Q-10 (Xie & Yokota, 2005b).

El análisis de ácidos grasos indicó que el mayor contenido de ácidos grasos de la cepa USBA 355 fue C_{19:0} ciclo ω8c (38%), seguido de C_{18:1} ω7c (26%) y de C_{18:0} (18%). En menor cantidad se encontró la presencia de los ácidos grasos C_{18:0} iso (1%), C11 metil_{18:1} ω7c (0.7%) y C_{20:2} ω6.9c (1.2%). Los ácidos grasos hidroxilados fueron C_{18:1} 2 OH (3.7%), C_{18:0} 3 OH (3.6%), C_{16:1} ω7c/15 ISO 2OH (1.5 %) y C_{14:0} 3 OH/16:1 ISO I (0.7%). Estos datos sugieren que la cepa USBA 355 posee un perfil lipídico único ya que entre los miembros de la familia *Rhodospirillaceae* la cepa USBA 355 es la única que presenta como mayor componente de ácidos grasos el C_{19:0} ciclo ω8c, mientras que en muchos de los miembros de esta familia predomina el ácido graso C_{18:1} o el C_{18:1}ω7c (Tabla 21).

Caracterización genotípica de la cepa USBA 355

- Contenido de G+C (mol%)

El contenido de G+C fue de 71.1 mol%, este porcentaje fue similar al reportado para organismos de los géneros *Inquilinus* (70.9 mol%), *Azospirillum* (67-71 mol%), *Caenispirillum* (70 mol%), *Magnetospirillum* (64-71 mol%) y *Thalassobaculum* (68 mol%) (Tabla 22).

- Análisis de la secuencia del gen 16S del ARNr

El análisis de la secuencia del gen 16S ARNr de la cepa USBA 355 mostró la afiliación taxonómica de la cepa USBA 355 a la familia *Rhodospirillaceae* y una mayor relación con el género *Thalassobaculum* (90% de similitud) que con otros miembros de la familia (Figura 29).

Además de la distancia filogenética que separa a la cepa USBA 355 de organismos del género *Thalassobaculum*, se encontraron diferencias relacionadas con el contenido G+C, 71.1 mol% para USBA 355 y 65-68 mol% para especies del género *Thalassobaculum*, y con la composición de ácidos grasos de la membrana celular ya que en la cepa USBA 355 se observa predominio del ácido graso C_{19:0} ciclo ω8c mientras

que en organismos del género *Thalassobaculum* predomina el ácido graso C18:1 ω 7c (Tabla 21).

Así mismo, la cepa USBA 355 puede ser diferenciada de otros miembros de la familia *Rhodospirillaceae* con base en sus características fenotípicas. Aunque la cepa USBA 355 fija nitrógeno atmosférico se puede diferenciar del género *Azospirillum* (Tarrand *et al.*, 1978) por su composición de ácidos grasos, ya que este microorganismo tiene una gran cantidad de C_{18:1} ω 7c, C_{16:1} ω 7c y C_{16:0} (Xie & Yokota, 2005b).

El rango de tolerancia a la sal (NaCl) también permite diferenciar la cepa USBA 355 (<4% p/v) de otros organismos quimioheterotróficos de la familia *Rhodospirillaceae* como miembros del género *Thalassospira* (<10 %) (López-López *et al.*, 2002), *Inquilinus* (< 6 %) (Coenye *et al.*, 2002) y *Tistrella* (< 1 %) (Shi *et al.*, 2002).

La cepa USBA 355 se puede diferenciar de géneros fototróficos tales como *Roseospira* y *Rhodovibrio* por la ausencia de Bchl *a* y de membranas fotosintéticas intracelulares (Imhoff *et al.*, 1998; Guyoneaud *et al.*, 2002).

En conclusión las diferencias genotípicas y fenotípicas con otros miembros de la familia *Rhodospirillaceae*, indican que la cepa USBA 355 puede ser considerada un nuevo género y especie microbiana. Se propuso el nombre de *Tistlia consotensis* [**Tistl**. **li. a.N.L.** fem. n. *Tistlia* nombrada *Tistl*, en honor a Michael Tistl, el geólogo que re-descubrió el manantial Salado de Consotá; **con.so.ten'sis** N.L. fem. adj. *Consotensis* perteneciente al manantial salino Salado de Consota, Risaralda-Colombia, que corresponde a la ubicación geográfica del cual el organismo fue aislado por primera vez).

Tabla 21. Características fenotípicas de la cepa USBA 355 y géneros de la familia *Rhodospirillaceae*. Taxón: 1, USBA 355^T; 2, *Rhodospira* (Pfennig *et al.*, 1997); 3, *Rhodovibrio* (Imhoff *et al.*, 1998); 4, *Roseospira* (Imhoff *et al.*, 1998); 5, *Rhodocista* (Kawasaki *et al.*, 1992); 6, *Rhodospirillum* (Imhoff *et al.*, 1998); 7, *Phaeospirillum* (Imhoff *et al.*, 1998); 8, *Thalassospira* (López-López *et al.*, 2002); 9, *Defluviicoccus* (Maszenan *et al.*, 2005); 10, *Tistrella* (Shi *et al.*, 2002); 11, *Inquilineus* (Coenye *et al.*, 2002); 12, *Azospirillum* (Tarrand *et al.*, 1978); 13, *Skermanella* (Sly & Stackebrandt, 1999); 14, *Telmatospirillum* (Sizova *et al.*, 2007); 15, *Caenispirillum* (Yoon *et al.*, 2007a); 16, *Thalassobaculum* (Zhang *et al.*, 2008); 17, *Magnetospirillum* (Schleifer *et al.*, 1991; Sakane & Yokota, 1994) y 18, *Nisaea* (Urios *et al.*, 2008)

Característica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Habitat	Manantial salino	Pantano salino	Agua de mar	Manantial sulfuroso	Agua dulce	Agua dulce	Agua dulce anóxico	Agua de mar	Lodo	Agua residual	Pacientes fibrosis quística	Suelo, raíz agua dulce	Agua de lago	Pantano	Lodo	Agua de mar	Agua dulce	Agua mar
Flagelo	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	ND	+	+	+	+	+	+	+
Contenido G+C (mol%)	71	65.7	66-67	66.6	69.9	63-66	60.5-65.3	54.7	66	67.5	70.9	67-71	67	61.5-64	70	68	64-71	60
Metabolismo	QH AE	FH AN	FH AN	FH AN	FH AN	FH AN	FH AN	QH AE	QH AE	QH AE	QH AE	QH AE	QH FA	QH AN o MO	QH AE	QH FA	QH MO-O	QH AE
Metabolismo alternativo	QH MO	QH MO	QH MO	QH MO			CH MO						CL O	QH AN con NO ₃				
Factores de crecimiento	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	ND	V	-	ND	-	-	-	-
Requerimiento Na ⁺	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	ND	-	-	ND	-	+	-	-
Tolerancia a NaCl (%)	<4	5	3-24	> 15	ND	ND	ND	Up to 10	ND	<1	<6	<5	<2	ND	<5	<10	ND	<6
Salinidad óptima (%)	0.5	2	V	4-7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.5	2-4	ND	2
pH óptimo	6.5-6.7	7.3-7.5	7-8	7.0	6.8	6.5-7.5	7.3	ND	7.5-8.0	7.4	ND	5.8-6.8*	ND	5.7-6.5	7.0-8.0	8.0	7.0	6
Temperatura óptima °C	30	25-30	35-42	30-35	31-45	25-35	25-30	13	25-30	30	ND (25-42)	34-37	28	25-28	37	30-35	30	30
Actividad catalasa	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+	+	V	+	-	+	+	V	+
NO ₃ ⁻ a NO ₂ ⁻	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	+ débil	+	ND	+	+	ND	+	+	-	+
NO ₃ ⁻ como fuente de N	+	ND	ND	ND	-	ND	ND	+	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Crecimiento en carbohidratos	+	-	-	Solo fructosa	-	V	+	+	+	+	-	+	+	+	Solo ribosa	Ribosa-sacarosa	-	+
Quinona	Q-10, Q-9	Q-7, MK-7	Q-10, MK-10	ND	Q-9	Q-10, RQ-10	Q-9, MK-9	ND	ND	Q-10	ND	Q-10	Q-10	ND	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10
Ácidos grasos	C19:0cyclo w8c	C18:1	C18:1	ND	ND	C18:1	C18:1	C18:1 <i>ciso7</i>	ND	C18:1 ω 7c	ND	ND	ND	C18:1 ω 7c	C18:1 ω 7c	C18:1 ω 7c	C18:1	C18:1 ω 7c
	C18:1 w7c	C16:0	C18:0			C16:1	C16:1	C16:0		2-OH C18:0				C17:0 cy	C17:0	C16:0	C16:1	C16:1 ω 7c
	C18:0	C14:0	C16:0			C16:0	C16:0	C16:0 <i>ciso7</i>		3-OH C14:0				C18:0	C17:0	C16:0	C16:0	C16:0
		C18:0	C14:0			C14:0	C18:0			3-OH C14:0				C14:0		C19:0cyclo ω 8c	3-OH C14:0	
		C16:1								C18:1 ω 7c 11methyl				C16:1 ω 7c			3-OH C16:0	

+: positivo; - : negativo; V: variable; ND: No hay datos disponibles.

QH: quimioheterotrófico; FH: Fototrófico; FL: fotolitotrófico; QL: quimiolitotrófico; AE: Aerobio; AN: Anaerobio; MO: Microaerófilico; FA: Anaerobio facultativo; O: Óxico.

*Excepción por *Azospirillum halopraeferans*, el cual tiene una temperatura óptima de 41 °C y un pH óptimo de 8.0

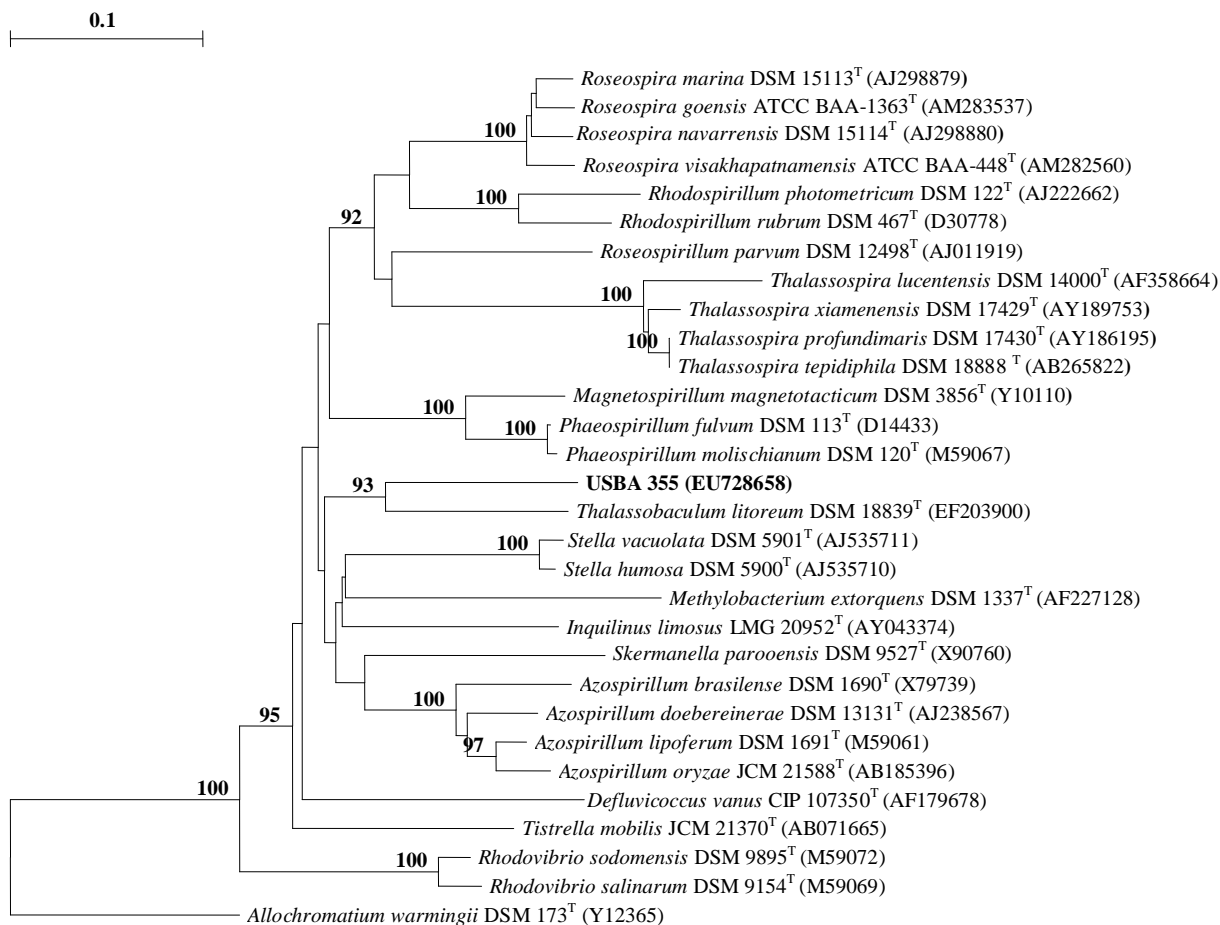


Figura 29. Dendrograma que muestra la posición filogenética de la cepa USBA 355 y de los organismos más cercanamente relacionados (número de acceso al GenBank se encuentra entre paréntesis). El dendrograma muestra valores *bootstrap* (1000 re-muestréos) superiores al 90 %. La barra de escala indica el cambio de 0.1 nucleótidos por cada 100. El análisis se realizó con un total de 1430 nucleótidos, los *gaps* y nucleótidos inciertos fueron omitidos.

5.5.1.2 Descripción taxonómica de la cepa USBA 369

Teniendo en cuenta que el análisis de la secuencia del 16S del ARNr mostró que la cepa USBA 369 tiene un porcentaje de similitud del 95% con *Aurantimonas altamirensis* se realizó un análisis polifásico para determinar su afiliación taxonómica a este género.

El género *Aurantimonas* hace parte del orden *Rhizobiales* y a la fecha se han descrito cuatro especies, *Aurantimonas coralicida* aislada de un coral (Denner *et al.*, 2003), *A. altamirensis* aislada de una cueva (Jurado *et al.*, 2006), *A. ureilytica* aislada de una

muestra de aire (Weon *et al.*, 2007) y *A. frigidaquae* aislada de un sistema de enfriamiento de agua (Kim *et al.*, 2008).

- Morfología de la cepa

La cepa USBA 369, en fase exponencial de crecimiento sobre glucosa (20 mM), se observó como un bacilo recto de 1.5 μm de largo por 0.8 μm de ancho, móvil por la presencia de múltiples flagelos peritricos (Figura 30A y B). La microscopía electrónica de finos cortes reveló la presencia de una pared celular típica de organismos Gram-negativos (Figura 30C). La cepa USBA 369 no presentó esporas ni es termoresistente.

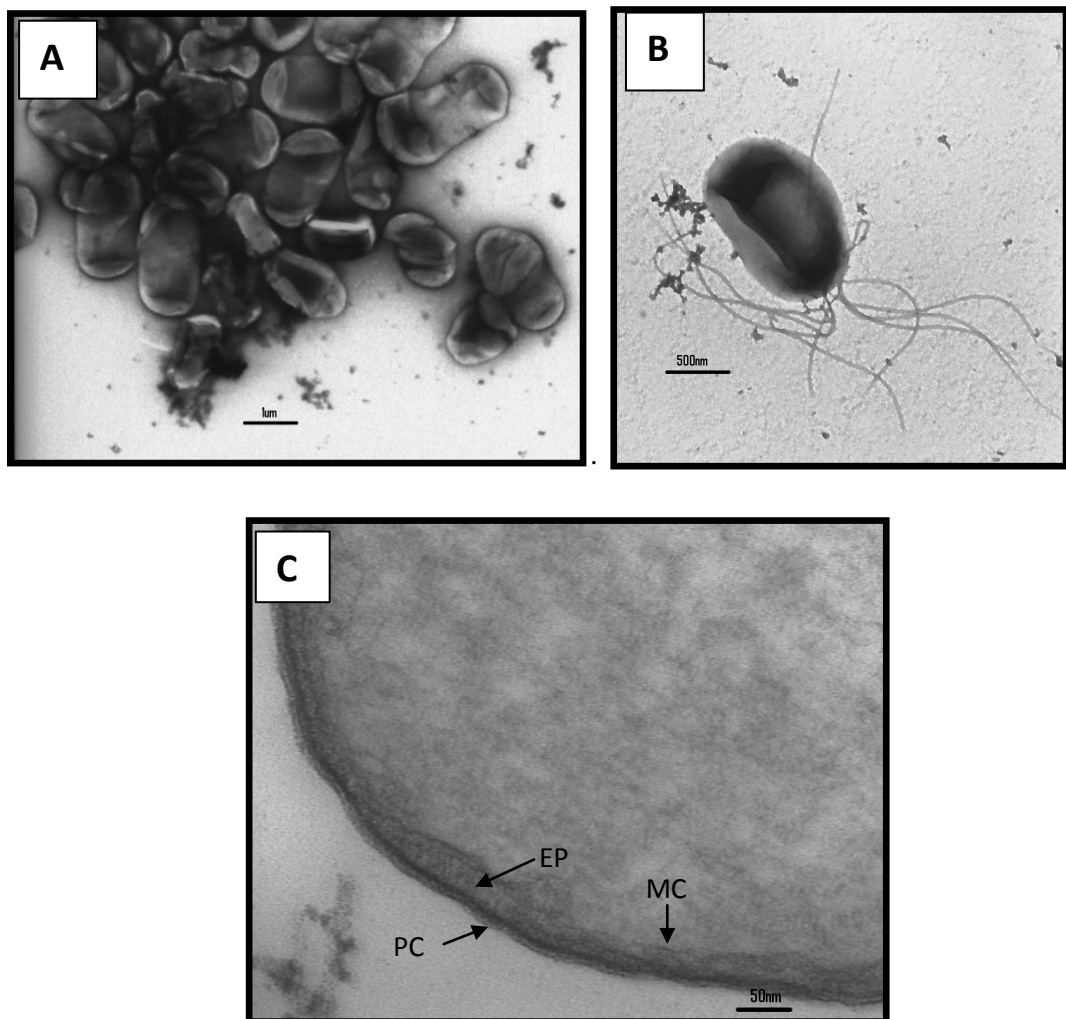


Figura 30. Micrografía electrónica cepa USBA 369 A) Micrografía de tinción negativa que muestra agregados de la cepa USBA 369. B) Tinción negativa que permite evidenciar la presencia de flagelos peritricos. C) Delgadas secciones de la cepa USBA 369 la cual revela una pared celular típica de

organismos Gram-negativos, PC: pared celular, MC: membrana citoplasmática y EP: espacio periplásmico.

- Crecimiento y propiedades metabólicas

La temperatura óptima de crecimiento de la cepa USBA 369 fue de 30°C, con un rango entre 20 a 40°C, creció en un rango de pH de 5.0 a 9.0, el crecimiento óptimo fue a pH 6.9-7.5, aunque la cepa USBA 369 no requirió NaCl para su crecimiento, toleró hasta 7% (p/v) de NaCl y creció óptimamente a una concentración de 1.5% (p/v).

La cepa USBA 369 es un organismo aerobio facultativo, crece fermentativamente en glucosa y es capaz de reducir NO_3^- pero no $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SO_4^{2-} , sulfito (SO_3^{2-}), S^0 ni Fe (III). En condiciones aerobias la cepa creció en glucosa, arabinosa, manosa, sacarosa, peptona, casaminoácidos, formiato, fumarato, glicerol, manitol e inositol pero no en rafinosa, ribosa, xilosa, celobiosa, galactosa, rhamnosa, citrato, propionato, malato ni etanol.

La cepa USBA 369 tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, esta característica se evidenció por la detección del gen *nifH* y por su capacidad para reducir acetileno. Sin embargo, esta característica no ha sido evaluada en otras especies del género *Aurantimonas*.

- Análisis quimiotaxonómico de la cepa USBA 369

El perfil de ácidos grasos de la membrana celular de la cepa USBA 369 mostró que el ácido graso predominante es $\text{C}_{18:1} \omega 7c$ (60.18%) seguido de $\text{C}_{19:0}$ ciclo $\omega 8c$ (23.78%), $\text{C}_{16:0}$ (8.31%) y $\text{C}_{18:0}$ (3.82%). La presencia mayoritaria del ácido graso $\text{C}_{18:1} \omega 7c$ es común en las cuatro especies validadas del género, en las cuales constituye más del 60% de los ácidos grasos de la membrana celular. Sin embargo, en comparación con las otras cuatro especies del género *Aurantimonas* la cepa USBA 369 presentó el contenido más alto de $\text{C}_{19:0}$ ciclo $\omega 8c$ (Tabla 22).

Tabla 22. Características fenotípicas y quimiotaxonómicas de la cepa USBA 369 y especies del género *Aurantimonas*.

Características	USBA 369	<i>A. Altamirensis</i>	<i>A. coralicida</i>	<i>A. ureilytica</i>	<i>A. frigidaquae</i>
Fuente de aislamiento	Manantial salino	Cueva de Altamira	Corales	Aire	Sistema de enfriamiento de agua
Morfología	0.8-1.5 x 1.5-2.0µm	0.9 x 1.1µm	1 x 1.5-2.0µm	1.0-1.5 x 1.5-2.5µm	0.6-0.8x0.8-1.2µm
Gram	-	-	-	-	-
Movilidad	+	-	+	+	+
Relación con el O ₂	FC	AE	AE	AE	FC
Reducción de NO ₃	+	-	-	-	+
Rango de NaCl	0-7	0-5	Requiere iones Na ⁺	0-3	0-7
NaCl Óptimo	1.5	0-2	Nd	Nd	0
Rango Temperatura °C	20-40	4- 46	4-37	4.0 – 37	15-37
Temperatura óptima °C	30	28	Nd	25 – 30	25
Rango pH	5-9	Nd	Nd	4-9	5-11
pH óptimo	6.9-7.5	Nd	Nd	7-8	7
Utilización de sustrato					
Arabinosa	+	+	+	+	-
Manitol	+	+	-	+	+
Maltosa	-	+	-	-	-
Glucosa	+	+	+	+	+
Mannosa	+	+	+	+	Nd
Citrato	-	-	-	-	-
Principales ácidos grasos	C _{18:1 ω7c} (60,2%) C _{19:0 ciclo ω8c} (23.8%) C _{16:0} (8.3%)	C _{18:1 ω7c} (72.9%) C _{16:0} (8.0%) C _{19:0 ciclo ω8c} (7.8%)	C _{18:1 ω7c} (61.8%) C _{19:0 ciclo ω8c} (11%) C _{16:0} 2-OH (5.2%)	C _{18:1 ω7c} (62.2%) C _{18:1} 2-OH (12.7%) C _{16:0} (9%)	C _{18:1 ω7c} (64.7%) C _{16:0} (14.1%) C _{19:0 ciclo ω8c} (6.5%)
Contenido G+C (mol%)	61.6	71.8±1.8	66.3	67	63.9
Referencia	Este estudio	Jurado <i>et al.</i> , 2006	Denner <i>et al.</i> , 2003	Weon <i>et al.</i> , 2007	Kim <i>et al.</i> , 2008

Nd: No determinado, FC: anaerobio facultativo, AE: aerobio

Caracterización genotípica de la cepa USBA 369

Contenido de G+C (mol%)

El contenido de G+C fue de 61.6 mol% indicando que a la cepa USBA 369 presenta el contenido más bajo de G+C en comparación con las cepas tipo *A. altamirensis* (71.8 mol%) y con *A. coralicida* (66.3 mol%), *A. ureilytica* (67 mol%) y *A. frigidaquae* (63.9 mol%) (Tabla 22).

Análisis de la secuencia del gen 16S del ARNr

El análisis de la secuencia del gen 16S del ARNr permitió clasificar la cepa USBA 369 dentro del orden *Rhizobiales*, familia *Aurantimonadaceae* y género *Aurantimonas*. La afiliación filogenética de la cepa USBA 369 al género *Aurantimonas* se evidencia en el dendrograma que incluye las cuatro cepas tipo del género, *A. altamirensis*, *A. coralicida*, *A. ureilytica* y *A. frigidaquae*, junto con dos nuevas especies, aún no validadas, aisladas de ambientes marinos “*Aurantimonas manganoxydans*” y “*Aurantimonas litoralis*” (Anderson *et al.*, 2009) (Figura 31).

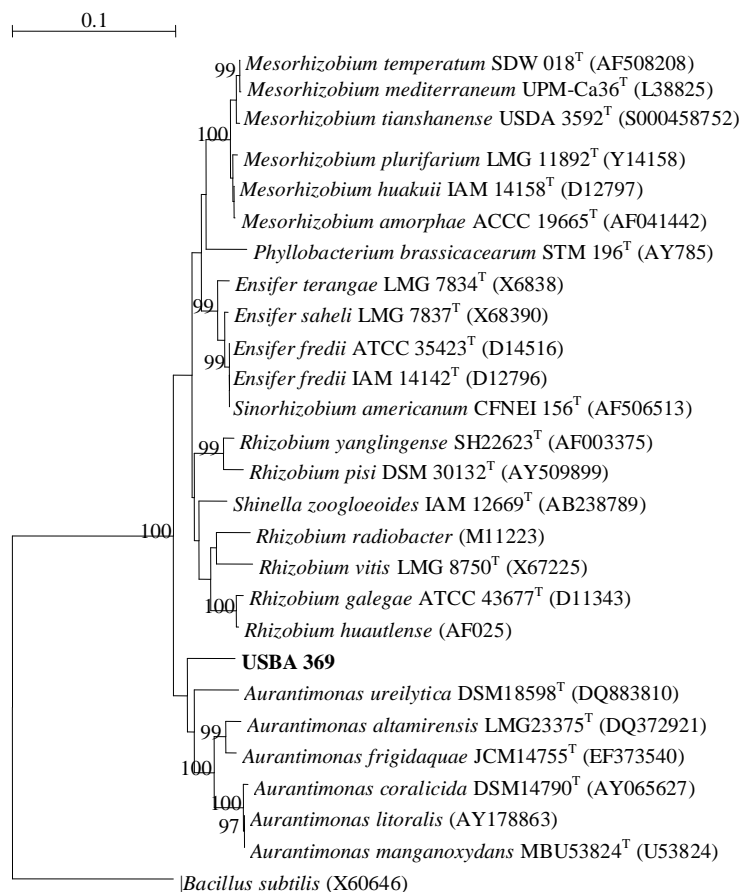


Figura 31. Dendrograma que muestra la posición filogenética de la cepa USBA 369 y de los organismos más cercanamente relacionados (número de acceso al GenBank se encuentra entre paréntesis). El dendrograma muestra valores de *bootstrap* (1000 re-muestrados) superiores al 90%. La barra de escala indica el cambio de 0.1 nucleótidos por cada 100. El análisis se realizó con un total de 1264 nucleótidos, los *gaps* y nucleótidos inciertos fueron omitidos.

Además de las diferencias genotípicas y quimiotaxonómicas detectadas en la cepa USBA 369 con respecto a los otros miembros del género *Aurantimonas*, es posible hallar claras diferencias en las características fisiológicas. Es así como la cepa USBA 369 se diferencia de *A. altamirensis*, *A. coralicida* y *A. ureilytica* por su capacidad para crecer en condiciones anaerobias y reducir NO_3^- ya que las tres cepas mencionadas se comportan como aerobios estrictos. Por otra parte, aunque la cepa USBA 369 comparte con la cepa *A. frigidaquae* la capacidad para crecer en condiciones anaerobias, la capacidad para reducir NO_3^- y el rango de concentración de NaCl en la cual pueden crecer (0-7% p/v), se diferencian en el rango de temperatura y pH en el cual crecen y en la utilización de sustratos como arabinosa y maltosa (Tabla 22).

Las características mencionadas anteriormente permiten sugerir que la cepa USBA 369 representa una nueva especie del género *Aurantimonas*, por lo cual se propone el nombre de *Aurantimonas mobile* (mo'bi.le. L. masc. adj. *mobile* móvil).

5.5.2 Microorganismos aislados del manantial LC

Las 14 cepas aisladas se clasifican dentro de los fila *Proteobacteria*, *Synergistetes*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*.

Filo *Proteobacteria*

Los organismos del filo *Proteobacteria* pertenecen a las clases α y γ -*Proteobacteria*.

Clase α -*Proteobacteria*

Se aislaron las cepas USBA 36, USBA 86, USBA 140 y USBA 485 que pertenecen a la familia *Rhodospirillaceae*. El análisis de la secuencia del 16S del ARNr indicó que la cepa USBA 36 tiene un porcentaje de similitud del 99% con *Oceanibaculum indicum*, un microorganismo aislado de agua marina enriquecida con hidrocarburos (Lai *et al.*, 2009a). Esta cepa es un bacilo de 2.5-3.0 μm de largo por 0.1 μm de ancho, móvil, Gram-negativo, anaerobio facultativo. Crece en un rango de NaCl de 0 a 8% (p/v). Es capaz de reducir NO_3 pero no S° , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ni Fe^{3+} . En condiciones aerobias crece en glicerol, etanol, lactato, acetato, propionato, butirato, casaminoácidos, peptona, pepticasa, xilosa, trehalosa, fructosa, manosa, ribosa y maltosa pero no en arabinosa, citrato, metanol ni formiato. La única diferencia encontrada entre la cepa USBA 36 y la cepa *O. indicum* a partir de los resultados obtenidos es el rango de salinidad de crecimiento, donde *O. indicum* crece entre 0 y 9% (p/v) NaCl).

Por otra parte, el análisis de la secuencia del 16S del ARNr de las cepas USBA 86, USBA 140 y USBA 485 muestra un porcentaje de similitud del 100% entre ellas y del 98% con *Caenispirillum bisanense* (Jung-Hoon *et al.*, 2007). Para la caracterización fenotípica se seleccionó la cepa USBA 86, un bacilo de 2.5-4 μm de largo por 0.2-0.6 μm de ancho, móvil, Gram-negativo, aerobio. Crece a una concentración de NaCl de 0 a 12% (p/v), con un crecimiento óptimo al 1% (p/v). Crece quimioheterotróficamente en propionato, lactato, casaminoácidos, pepticasa y peptona. También se observó crecimiento pero débilmente en glicerol y acetato. No se observó crecimiento en metanol, etanol, formiato, butirato, citrato,

glucosa, xilosa, trehalosa, rafinosa, fructosa, arabinosa, mannososa, ribosa ni maltosa. La cepa USBA 86 se diferencia de *C. bisanense* por su mayor tolerancia al NaCl, ya que *C. bisanense* crece en un rango de 0 a 5% (p/v). Además *C. bisanense* utiliza citrato y ribosa contrario a lo observado para la cepa USBA 86.

Clase γ -Proteobacteria

Los organismos asignados a esta clase pertenecen a las familias *Xanthomonadaceae* y *Vibrionaceae*.

- Familia *Xanthomonadaceae*: a esta familia se asignaron las cepas USBA 37, USBA 372, USBA 373 y USBA 374

Las cepas USBA 37, USBA 372, USBA 373 y USBA 374, presentan un porcentaje de similitud entre ellas del 100% y un porcentaje de similitud del 99.9% con las cepas USBA 85 y USBA 353 reportadas anteriormente en el manantial SC y con las cepas 342 y USBA 343 aisladas en el manantial SP. Las cepas aisladas tienen un porcentaje de similitud del 99% con la cepa *Lysobacter* OC7 aislada de aguas marinas colectadas en Japón (Maeda *et al.*, 2009) y con la cepa *Lysobacter enzymogenes* un organismo aislado de suelo (Christensen & Cook, 1978). Teniendo en cuenta la similitud fenotípica y alto porcentaje de similitud en las secuencias del 16S ARNr de las cepas aisladas se seleccionó la cepa USBA 372 para su análisis fenotípico.

La cepa USBA 372 es un bacilo recto de 1.5 μm de largo por 0.1 μm de ancho, no móvil, Gram-negativo (Figura 32), no esporoformador y aerobio facultativo. Crece en un rango de NaCl de 0 a 10% (p/v) y óptimamente de 1 a 4% (p/v), en un rango de temperatura de 10 a 40°C con un óptimo a 30°C y a en un rango de pH de 6.0 a 9.0 con un óptimo a pH de 6.5-7.0. Reduce NO_3 pero no S° , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SO_4^{2-} ni Fe^{3+} . En condiciones microaerófilicas tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, evidenciado por la presencia del gen *nifH* y por su capacidad para reducir acetileno. La capacidad para fijar nitrógeno atmosférico no ha sido estudiada en ninguna de las 19 cepas tipo del género, sin embargo, Iwata *et al.*, (2010) publicaron el primer reporte de una cepa de *Lysobacter* sp. capaz de fijar nitrógeno atmosférico, por lo cual es posible sugerir que esta característica puede estar presente en más de un organismo del género.

En condiciones aerobias la cepa USBA 372 crece en etanol, glicerol, formiato, citrato, piruvato, α -cetoglutarato, lactato, glucosa, fructosa, sacarosa, arabinosa, manosa, maltosa, casaminoácidos, pepticasa, peptona y débilmente en acetato y propionato. No utiliza metanol ni buritato.

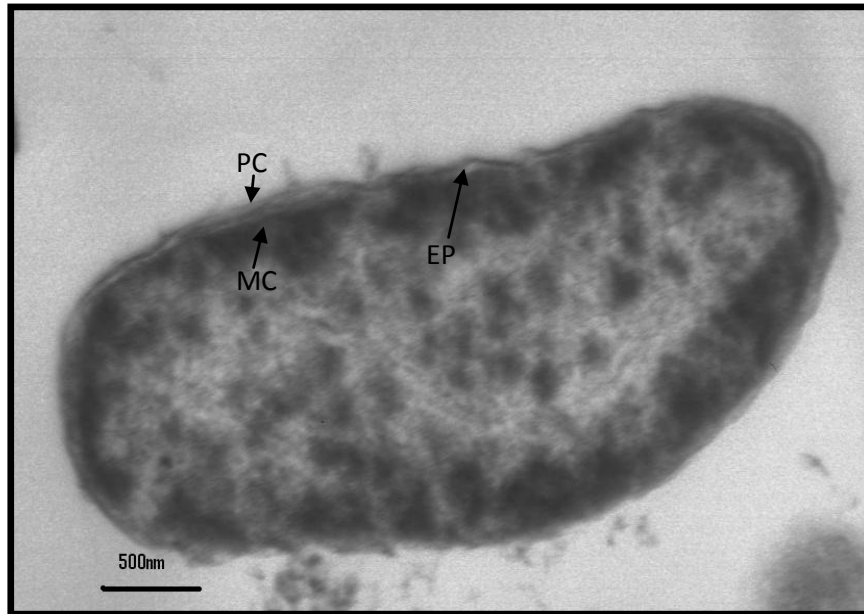


Figura 32. Microscopía electrónica de la cepa USBA 372. Muestra una pared celular típica de bacterias Gram-negativas, PC: pared celular, EP: espacio periplásmico, MC, membrana citoplasmática.

La cepa USBA 372 se diferencia de *L. enzymogenes* por el rango de temperatura a la cual crece (5 a 40 °C), el rango de pH (pH 5 a 10) y el rango de tolerancia a la sal ya que *L. enzymogenes* no crece a una salinidad mayor del 1.0% (p/v).

En particular, el rango de tolerancia a la sal es una característica que inclusive diferencia la cepa USBA 372 de las 19 cepas validadas a la fecha, ya que de estas 19 cepas solamente las cepas *L. spongiicola* y *L. defluvii* toleran hasta 6% (p/v) de NaCl, mientras que la mayoría de las especies del género crecen a menos del 3% (p/v) de NaCl. Otra característica importante es que la cepa USBA 372 creció en condiciones anaerobias lo cual solo ha sido reportado para las cepas *L. capsici* (Park *et al.*, 2008) y *L. oryzae* (Aslam *et al.*, 2009).

Por otra parte, a excepción de *L. spongiicola*, aislada de una esponja marina (Romanenko *et al.*, 2008), todas las especies validadas del género *Lysobacter* han sido aisladas del suelo, sin

embargo, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que los organismos de este género tienen una amplia distribución ambiental y pueden estar desempeñando funciones importantes como la fijación de nitrógeno en ambientes salinos.

Las características mencionadas anteriormente sugieren que la cepa USBA 372 podría ser considerada una nueva especie del género *Lysobacter*, sin embargo, debido al alto porcentaje de similitud entre la cepa USBA 372 y *L. enzymogenes* se tendría que realizar una caracterización más detallada que incluya una hibridación DNA-DNA y continuar con la determinación del contenido G+C y ácidos grasos de la membrana celular.

- Familia *Vibrionaceae* a esta familia se asignaron las cepas USBA 374, USBA 377 y USBA 378.

El análisis de la secuencia del 16S ARNr indicó que las cepas USBA 374 y USBA 378 tienen un porcentaje de similitud del 99% con *Vibrio alginolyticus*. Las cepas aisladas son bacilos curvos de 3.0-5.0 µm de largo por 1.0 µm de ancho, Gram-negativos, anaerobios facultativos, móviles capaces de reducir NO₃ a NO₂. La cepa USBA 374 crece en un rango de NaCl de 0.1 a 10% (p/v) y la cepa USBA 378 crece en un rango de NaCl de 0.5 a 10% (p/v). Crecen en glucosa, trehalosa, mannososa, maltosa, sacarosa, galactosa, manitol, peptona, pepticasa, casaminoácidos, lactato, propionato, acetato y citrato pero no en metanol, glicerol ni butirato. A partir de los análisis realizados solo se detectó que a diferencia de las cepas USBA 374 y USBA 378, *V. alginolyticus* tiene la capacidad de crecer en glicerol.

Por otra parte, la cepa USBA 377 presentó un porcentaje de similitud de 100% con *Vibrio vulnificus*. La cepa aislada es un bacilo curvo de 5.0-6.0 µm de largo por 1.0 -1.5 µm de ancho, móvil, Gram-negativo, anaerobio facultativo, no esporoformador, capaz de crecer a concentraciones de NaCl de 0 a 8% (p/v), reduce NO₃ a NO₂⁻ y se comporta como un organismo quimioheterotrófico capaz de crecer en glucosa, sacarosa, sorbitol, arabinosa pero no en inositol, citrato, rhamnosa, melibiosa, adonitol, malonato ni arginina. La principal diferencia de la cepa USBA 377 con *V. vulnificus* es que esta última no crece en ausencia de NaCl.

Filo Synergistetes

A este filo se asignaron las cepas USBA 151 y USBA 376; el análisis de la secuencia del 16S ARNr indicó un porcentaje de similitud de 100% entre ellas y con la cepa USBA 82 aislada del manantial SP. Las cepas aisladas presentaron un porcentaje de similitud del 94% con *Dethiosulfovibrio peptidovorans*. Debido al porcentaje de similitud en la secuencia del 16S ARNr entre las cepas aisladas se seleccionó la cepa USBA 82 para su caracterización fenotípica y genotípica la cual se describe más adelante en este texto.

Filo Firmicutes

A este filo pertenece la cepa USBA 486, el análisis de la secuencia del 16S ARNr indicó que tiene un porcentaje de similitud del 96% con *Bacillus licheniformis*, del orden *Bacillales*. Estos microorganismos son encontrados en casi todos los ambientes de la Tierra desde la estratósfera (Wainwright *et al.*, 2003) hasta profundidades oceánicas o terrestres (Boone *et al.*, 1995; Batzke *et al.*, 2007) debido a su gran versatilidad en cuanto a producción de enzimas y utilización de sustratos. La cepa USBA 486 es un bacilo de 2.5 µm de largo por 0.2 µm de ancho, Gram-positivo, esporoformador. Crece en un rango de NaCl de 0 al 7% (p/v) con un crecimiento óptimo de 0.5%. Es un organismo quimioheterotrófico que utiliza glucosa, xilosa y piruvato. Los análisis realizados para la cepa USBA 486 no mostraron diferencias con *Bacillus licheniformis*.

Filo Bacteroidetes

El análisis de la secuencia del 16S ARNr indicó que la cepa USBA 370, tiene un porcentaje de similitud de 98% con *Prolixibacter bellariivorans*. La cepa USBA 370 comparte una similitud del 100% en su secuencia del 16S ARNr con la cepa USBA 357 reportada previamente en el manantial SC y presenta las mismas características fenotípicas.

5.5.3 Microorganismos aislados del manantial SP

Las 17 cepas aisladas se agruparon en los filo *Proteobacteria*, *Synergistetes* y *Firmicutes*.

Filo Proteobacteria

Los organismos del filo *Proteobacteria* pertenecen a las clases α , δ y γ -*Proteobacteria*.

Clase α -Proteobacteria

En esta clase se clasificó la cepa USBA 822 relacionada con la familia *Phyllobacteriaceae*. El análisis de la secuencia del 16S ARNr de la cepa USBA 822 mostró una similitud del 97% con *Nitratireductor aquibiodomus* aislada de un acuario del Biodôme de Montreal (Canada) (Labbé *et al.*, 2004). La caracterización fenotípica y genotípica de la cepa aislada se describe más adelante en este texto.

Clase δ -Proteobacteria

A esta clase se asignó la cepa USBA 84, perteneciente a la familia *Desulfovibrionaceae* y cercanamente relacionada con *Desulfovibrio dechloracetivorans* (98% de similitud), aislado de sedimentos marinos (Sun *et al.*, 2000). La cepa USBA 84 es un bacilo de 1-2 μm de longitud por 0.5 μm de ancho, Gram-negativo, anaerobio, móvil, capaz de crecer en un rango de NaCl de 0 a 3% (p/v), reduce NO_3^- , SO_4^{2-} y $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, utiliza como fuente de carbono lactato, piruvato, citrato, fumarato y etanol. A diferencia de la cepa USBA 84, *Desulfovibrio dechloracetivorans* crece en un rango de salinidad de 0.16 a 2.5% (p/v) de NaCl.

Clase γ -Proteobacteria

En esta clase se clasificaron las cepas USBA 340, USBA 341, USBA 342, USBA 343, USBA 344, USBA 345, USBA 348, USBA 823, USBA 824, USBA 825, USBA 826 y USBA 827, relacionadas con las familias *Xanthomonadaceae*, *Enterobacteriaceae* y *Shewanellaceae*.

- Familia *Xanthomonadaceae*: a esta familia se asignaron las cepas USBA 342, USBA 343 y USBA 345.

El análisis de la secuencia del 16S ARNr de las cepas USBA 342, USBA 343 y USBA 345 mostró una similitud del 99% con la cepa *Lysobacter enzymogenes*. Las cepas aisladas presentan una similitud en su secuencia de 16S ARNr del 100% con las cepas USBA 37, USBA 353, USBA 372 y USBA 373 descritas anteriormente para los manantiales SC y LC y características fenotípicas similares a las descritas anteriormente para el mismo género.

- Familia *Enterobacteriaceae*: a esta familia se asignó la cepa USBA 341

La cepa USBA 341 presentó un porcentaje de similitud en su secuencia de 16S ARNr del 98% con *Providencia rettgeri*. La cepa aislada es un bacilo de 2.5 μm de largo por 0.5 μm de

ancho, es Gram-negativo, anaerobio, quimioheterotrófico. El género *Providencia* ha sido aislado de diferentes muestras clínicas (Marchandin *et al.*, 1999) por lo cual su presencia sugiere contaminación por escorrentía de suelos aledaños o por efecto de actividades humanas o animales por lo cual no se realizaron estudios fenotípicos en detalle.

- Familia *Shewanellaceae* a esta familia se asignaron las cepas USBA 344, USBA 348, USBA 823, USBA 824, USBA826 y USBA 827

Las cepas USBA 344, USBA 348, USBA 823, USBA 824, USBA 825, USBA 826 y USBA 827 están cercanamente relacionadas con *Shewanella algae* (98% de similitud), estas cepas presentan una similitud superior al 99% en sus secuencias de 16S ARNr con respecto a las cepas del mismo género reportadas anteriormente en el manantial SC y las mismas características fenotípicas descritas anteriormente.

Filo Synergistetes

A este grupo pertenece la cepa USBA 82 relacionada con *Dethiosulfovibrio peptidovorans* (94% de similitud), como se mencionó anteriormente una completa descripción taxonómica se realizará posteriormente.

Filo Firmicutes

A este grupo pertenecen las cepas USBA 346 y USBA 347 cercanamente relacionadas con *Clostridium bifermentans* (99% de similitud), cuyas características han sido mencionadas anteriormente.

5.5.3.1 Descripción taxonómica de la cepa USBA 822

El análisis preliminar de la secuencia del 16S del ARNr de la cepa USBA 822 mostró un porcentaje de similitud del 97% con *Nitratireductor aquibiodomus* (Labbé *et al.*, 2004). El género *Nitratireductor* consta a la fecha de cuatro especies validadas, *N. aquibiodomus*, *N. basaltis* (Kim *et al.*, 2009), *N. kimnyeongensis* (Kang *et al.*, 2009) y *N. indicus* (Lai *et al.*, 2011), aisladas principalmente de ambientes marinos.

A pesar del alto porcentaje de similitud en la secuencia del 16S ARNr entre la cepa USBA 822 y *N. aquibiodomus* se observaron importantes diferencias fenotípicas y quimiotaxonómicas que se describen a continuación.

- Morfología de la cepa

La cepa USBA 822 es un bacilo recto móvil de 1.0–2.5 μm de largo por 0.6–0.7 μm de ancho, Gram-negativo, no esporoformador ni termoresistente.

- Crecimiento y propiedades metabólicas

La cepa USBA 822 crece en un rango de temperatura de 20 a 33°C con un óptimo a 23°C, crece con un rango de pH de 5.0 a 9.5 con un óptimo a pH 7.0-7.1, aunque esta cepa no requirió NaCl para su crecimiento, toleró hasta 6% (p/v) de NaCl y creció óptimamente a una concentración de 1% (p/v) de NaCl.

La cepa 822 es un organismo aerobio con la capacidad de reducir NO_3^- a NO_2^- . En condiciones aerobias crece en formiato, acetato, propionato, butirato, ácido málico, lactato, citrato, piruvato, α -cetoglutarato, mannososa, maltosa, ribosa, xilosa, sacarosa, rafinosa, arabinosa, trehalosa, glucosa, glicerol, casaminoácidos y triptona. Crece débilmente en benzoato y no crece en dimetil tartrato, tributil *O*-acetilcitrato, ácido oleico, metanol, etanol ni propanol. No se evidenció crecimiento quimiolitotrófico en MB suplementado con NaHCO_3 y $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (10mM) o S° (1% p/v) en condiciones aerobias y en la oscuridad. Utiliza como fuente de nitrógeno urea (0.1% p/v), NO_3^- (10mM) y glutamato (2.5mM).

- Análisis quimiotaxonómico de la cepa USBA 822

Los resultados indican que la cepa USBA 822 tiene una alta concentración de ubiquinona-9 (Q-9) (93%) y en menor cantidad la Q-8 (7%). Esta característica no ha sido determinada en ninguna especie del género *Nitratireductor*.

El análisis de ácidos grasos de la membrana celular mostró predominio del ácido $\text{C}_{16:0}$ (37.05%), seguido de $\text{C}_{17:0}$ Ciclo (26.3%), $\text{C}_{19:0}$ ciclo $\omega 8\text{c}$ (6.7%), $\text{C}_{18:1}$ $\omega 7\text{c}$ (4.5%), $\text{C}_{12:0}$ 3OH (4.29%), $\text{C}_{12:0}$ (4,24%), $\text{C}_{10:0}$ 3OH (3.48%) y $\text{C}_{15:0}$ ISO 2OH/ $\text{C}_{16:1}$ $\omega 7\text{c}$ (2.9%). La composición lipídica de la cepa USBA 822 es diferente de la reportada para las especies validadas del género *Nitratireductor* ya que en estas predomina el ácido graso $\text{C}_{18:1}\omega 7\text{c}$, seguido de $\text{C}_{19:0}$ ciclo $\omega 8\text{c}$ y $\text{C}_{18:0}$ (Tabla 24).

Caracterización genotípica de la cepa USBA 822

Contenido de G+C (mol%)

El contenido de G+C fue de 60 mol%, este valor fue similar al reportado para *Nitratireductor indicus* (60.4 mol%) y *N. kimnyeongensis* (59 mol%), pero más alto que los valores reportados para *N. aquibiodomus* (57 mol%) y para *N. basaltis* (56.7±1.3 mol%) (Tabla 23).

Análisis de la secuencia del gen 16S del ARNr

El análisis filogenético muestra la inclusión de la cepa USBA 822 en la familia *Phyllobacteriaceae* y particularmente en el género *Nitratireductor* aunque se observa como una rama independiente dentro del grupo (Figura 33).

En general la cepa USBA 822 se puede diferenciar de todas las cepas del género *Nitratireductor* con base en la composición de ácidos grasos de su membrana celular. Además, se puede diferenciar de *N. aquibiodomus* por el contenido G+C y características fisiológicas como el rango de tolerancia a la sal, la temperatura óptima de crecimiento y la utilización por parte de USBA 822 de sustratos como manosa y maltosa (Tabla 23). Todas las características mencionadas anteriormente permiten sugerir que la cepa USBA 822 es una nueva especie del género *Nitratireductor*, aunque con base en el perfil lipídico se podría sugerir que se trata de un nuevo género de la familia, sin embargo, sería necesario realizar pruebas de hibridación ADN-ADN para corroborar esta información.

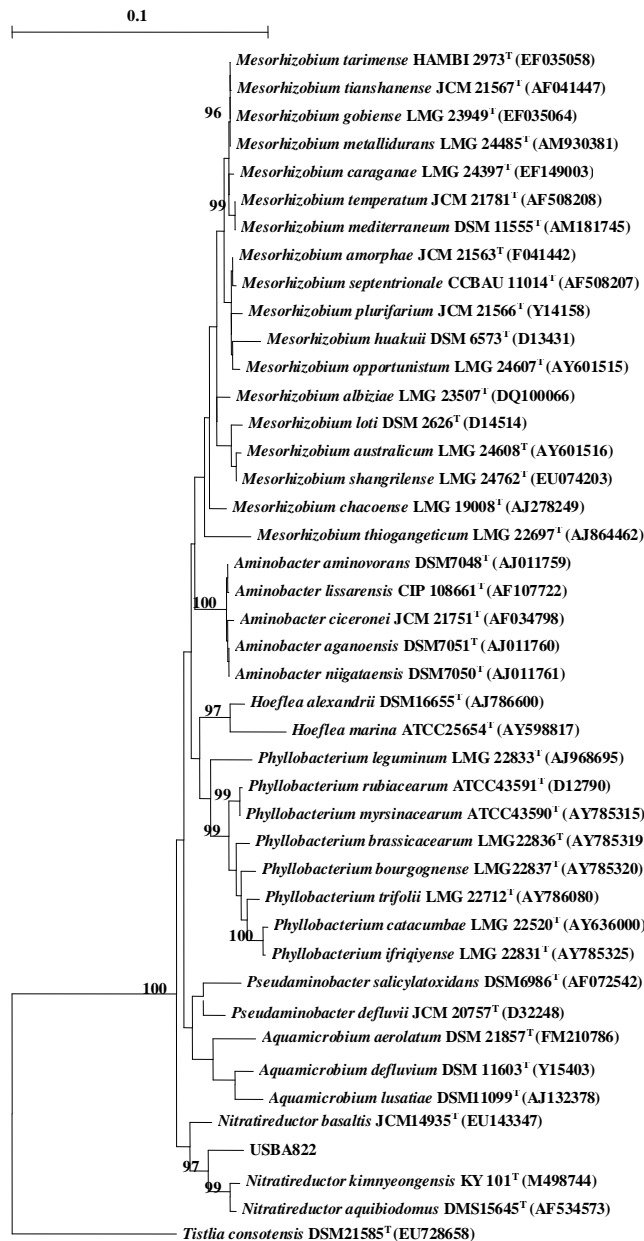


Figura 33. Dendrograma que muestra la posición filogenética de la cepa USBA 822 y de los organismos más cercanamente relacionados (número de acceso al GenBank se encuentra entre paréntesis). El dendrograma muestra valores *bootstrap* (1000 re-muestrados) superiores al 90 %. La barra de escala indica el cambio de 0.1 nucleótidos por cada 100. El análisis se realizó con un total de 1360 nucleótidos, los *gaps* y nucleótidos inciertos fueron omitidos

Tabla 23. Caracterización fenotípica de la cepa USBA 822 y microorganismos del género *Nitratireductor*

Características	USBA 822	<i>N. aquibiodomus</i>	<i>N. basaltis</i>	<i>N. kimnyeongensis</i>	<i>N. indicus</i>
Fuente de aislamiento	Manantial salino	Acuario de denitrificación	Arena	Algas marinas	Agua de mar
Morfología μm	0.6–0.7 x 1.0–2.5	1.0 x 2.0-3.0	Coco o bacilo	0.4-0.5x1.2-2.7	1.3x3.0
Movilidad	+	+	-	+	+
Relación con el O ₂	AE	AE	AE	AE	AE
Reducción de NO ₃	+	+	+	-	+
Rango NaCl (% p/v)	0-6	0-5	0-8	0-7	0-7
Óptimo NaCl (% p/v)	1	1	Nd	Nd	3
Rango Temperatura °C	20-33	Nd	10-45	10-40	10-37
Temperatura óptima °C	23	30-35	Nd	Nd	25-30
Rango pH	5.0-9.5	Nd	5.5-10	6.1-12.1	Nd
pH óptimo	7.0-7.1	7.0-7.5	Nd	Nd	Nd
Utilización de sustrato					
Arabinosa	+	+	+	+	-
Mannosa	+	-	-	-	Nd
Glucosa	+	+	Nd	+	+
Maltosa	+	-	+	-	-
Citrato	+	+	-	-	+
Principales ácidos grasos	C16:0 (37.05%) C17:0ciclo (26.3%) C19:0 ciclo ω 8c (C18:1 ω 7c (75 %) C19:0 ciclo ω 8c (9.4%) C18:0 (4.2%)	C18:1 ω 7c (82%) C19:0 ciclo ω 8c (4.3%) C18:0 (4.0%)	C18:1 ω 7c/C18:1 ω 9c/C18:1v12t.	C18:01 ω 7c/ ω 6c (81.8%) C18:0 (7.0%)
Quinona	Q9	Nd	Nd	Nd	Nd
Contenido G+C (mol%)	60	57	56.7 \pm 1.3	60.4	59
Referencia	Este estudio	Labbé <i>et al.</i> , 2004	Kim <i>et al.</i> , 2009	Kang <i>et al.</i> , 2009	Lai <i>et al.</i> , 2011

+: positivo; - : negativo, Nd: no determinado.

5.5.3.2 Descripción taxonómica de la cepa USBA 82

El análisis preliminar de la secuencia del 16S ARNr de la cepa USBA 82 indicó que esta cepa está relacionada con *Dethiosulfovibrio peptidovorans* (94% de similitud) del filo *Synergistetes* (Jumas-Bilak *et al.*, 2009), este filo incluye los géneros *Dethiosulfovibrio*, *Synergistes*, *Anaerobaculum*, *Aminobacterium*, *Thermanaerovibrio*, *Aminomonas*, *Thermovirga*, *Aminiphilus*, *Jonquetella* y *Cloacibacillus* (Rees *et al.*, 1997, Baena *et al.*, 1998, Baena *et al.*, 1999a; Baena *et al.*, 1999b; Dahle & Birkeland 2006, Díaz *et al.*, 2007, Jumas-Bilak *et al.*, 2007, Glanesan *et al.*, 2008) cuya principal característica es su capacidad para degradar aminoácidos (Vartoukian *et al.*, 2007).

Debido al porcentaje de similitud encontrado para la cepa USBA 82 con respecto a *D. peptidovorans* se realizó un análisis polifásico para determinar si la cepa aislada puede ser considerada una nueva especie del género *Dethiosulfovibrio*.

- Morfología de la cepa

La cepa USBA 82 es un bacilo que se observa solo o en pares, es ligeramente curvo con extremo redondo de 5-7 μm de largo por 1.5 μm de ancho, móvil por la presencia de flagelos laterales, Gram negativo (Figura 34A y B), no esporoformador.

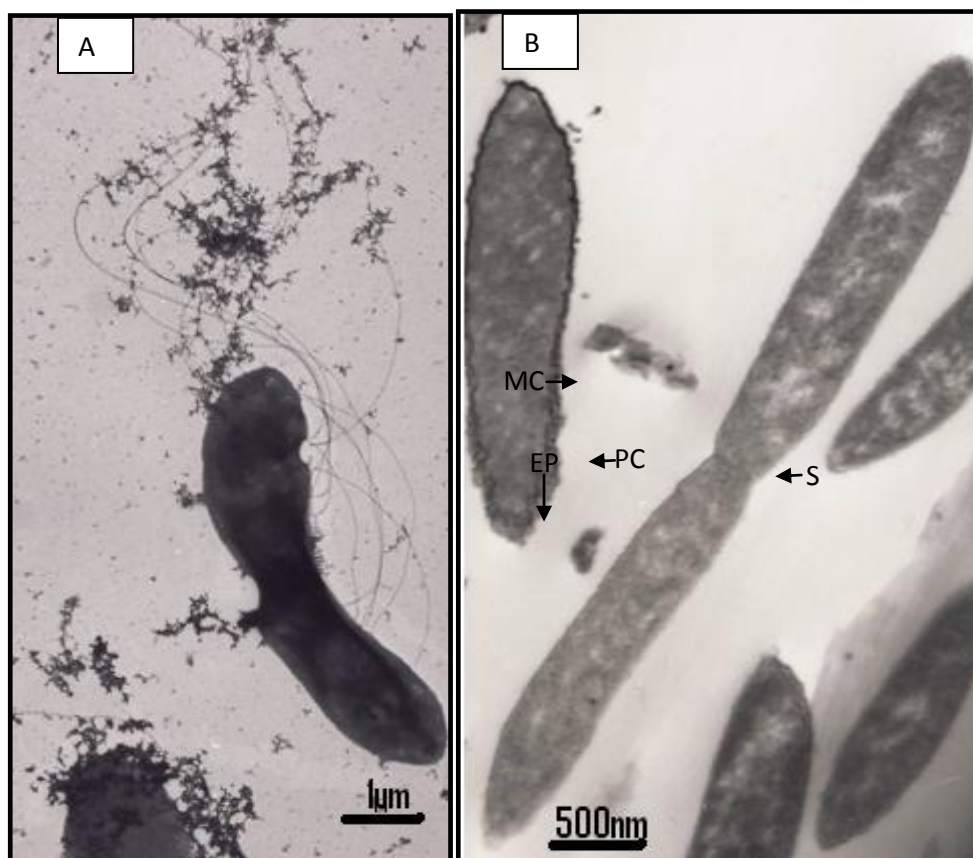


Figura 34. Micrografía electrónica de la cepa USBA 82 A) Tinción negativa que permite evidenciar la morfología celular y la presencia de flagelos laterales. B) Delgadas secciones de la cepa USBA 82 que revela una pared celular típica de organismos Gram-negativos, PC: pared celular, MC: membrana citoplasmática, EP: espacio periplásmico y S: septo de división celular.

- Crecimiento y propiedades metabólicas

La cepa USBA 82 creció en un rango de temperatura de 20 a 40°C con un óptimo a 30°C, en un rango de pH de 5.5 a 8.5 con un óptimo a pH 7.3 y en un rango de NaCl de 0.1 a 7.0% (p/v) con un óptimo a 2 % (p/v).

Es anaerobio estricto, crece tanto fermentativamente como por respiración anaerobia en presencia de S° y $S_2O_3^{2-}$ pero no en presencia de SO_4^{2-} , SO_3^{2-} , NO_3^- o NO_2^- . Fermentó casaminoácidos, peptona, triptona, serina, histidina, treonina, arginina, glutamato, piruvato, y citrato. No se observó crecimiento en lisina, glicina, prolina, valina, alanina, cisteína, leucina, isoleucina, lactato, succinato, formato, acetato, propionato, butirato, fructosa, celobiosa, xilosa, glucosa,

mannosa, manitol, maltosa, ribosa, sacarosa, lactosa, galactosa, arabinosa, rafinosa glicerol, metanol, etanol e inositol en presencia o en ausencia de $S_2O_3^{2-}$ ni de S^0 .

Al evaluar los productos de la degradación de peptona en ausencia y presencia de $S_2O_3^{2-}$ se detectó que los productos finales en ausencia de aceptores externos de electrones fueron acetato, succinato, propionato y trazas de etanol, mientras que en presencia de $S_2O_3^{2-}$ los únicos productos detectados fueron acetato y succinato.

- Análisis quimiotaxonómico de la cepa USBA 82

El análisis mostró que los ácidos grasos predominantes son $C_{19:0} \omega 9c/19:1 \omega 11c$ (18.96%), seguido de $C_{14:0}$ (16.21%), $C_{13:0}$ iso (16.01%), $C_{15:0}$ Iso (10.95%), $C_{13:0}$ (7.45%), $C_{11:0}$ iso (4.54%), $C_{18:0}$ (4.72%), $C_{13:0}$ iso 3OH (3.37%), $C_{16:0}$ (2.78%), $C_{17:0}$ (1.56%) y $C_{16:1} \omega 9c$ (1.26%). Este perfil lipídico no es posible compararlo con otros organismos del género pues no han sido determinados anteriormente.

Caracterización genotípica de la cepa USBA 82

- Contenido de G+C (mol%)

El contenido de G+C de la cepa USBA 82 es 52 mol% mientras que el de la cepa tipo del género, *Dethiosulfovibrio peptidovorans*, es de 56 mol%.

- Análisis de la secuencia del gen 16S del rDNA

El análisis filogenético de la cepa USBA 82 mostró su agrupación en el filo *Synergistetes* y en particular esta cercanamente relacionada con *Dethiosulfovibrio peptidovorans* (100% de *bootstrap*) con la cual comparte el 94% de similitud en la secuencia del gen 16S del ARNr (Figura 35).

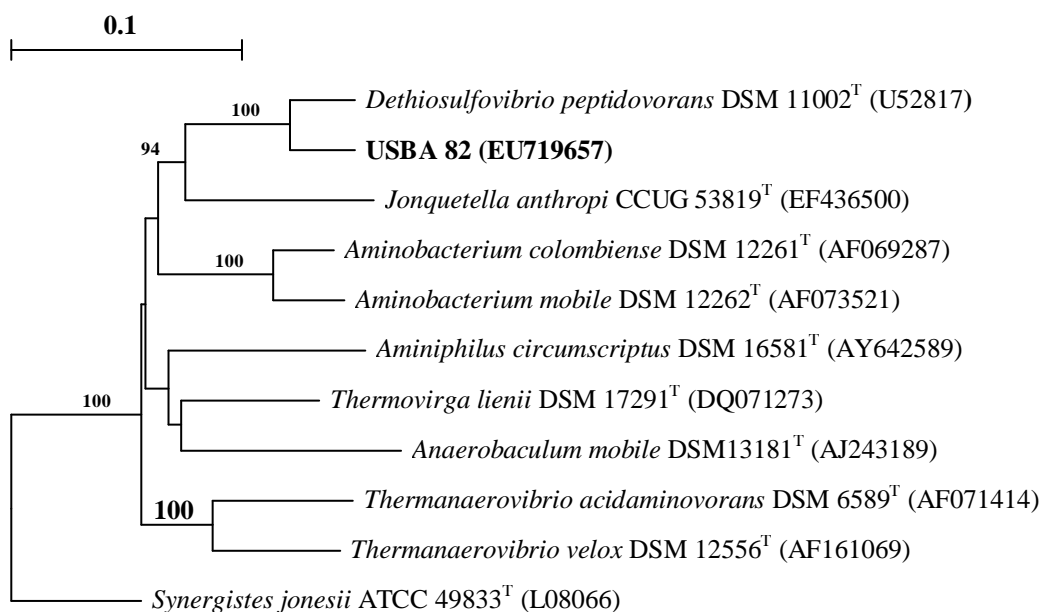


Figura 35. Dendrograma que muestra la posición filogenética de la cepa USBA 82 y de los organismos más cercanamente relacionados (número de acceso al GenBank se encuentra entre paréntesis). El dendrograma muestra valores *bootstrap* (1000 re-muestrajes) superiores al 90 %. La barra de escala indica el cambio de 0.1 nucleótidos por cada 100. El análisis se realizó con un total de 1300 nucleótidos, los *gaps* y nucleótidos inciertos fueron omitidos.

En conclusión, la cepa USBA 82 comparte con *D. peptidovorans* ciertas características fenotípicas propias del género como lo son la capacidad para fermentar peptona, triptona, casaminoácidos, serina e histidina y la incapacidad para usar carbohidratos, ácidos grasos y ácidos orgánicos como fuente de carbono y energía, así como también por la capacidad para reducir S° y $S_2O_3^{2-}$ hasta H_2S . Sin embargo, la cepa USBA 82 puede diferenciarse de *D. peptidovorans* por su capacidad para crecer fermentativamente en arginina, glutamato, valina, treonina y citrato y por su incapacidad para usar alanina, isoleucina y leucina en presencia o ausencia de S° o $S_2O_3^{2-}$ (Tabla 24).

Tabla 24. Características fisiológicas de la cepa USBA 82 y de otro organismo del género *Dethiosulfovibrio*. +, Positivo; -, negativo; +¹, lo usa únicamente en presencia de S₂O₃²⁻ o S^o; Nd, no determinado. Las especies mencionadas no usan lactato, formato, acetato, propionato, butirato, succinato, etanol, metanol, glicerol ni manitol. Las dos cepas reducen S₂O₃²⁻ y S^o pero no SO₄²⁻ ni SO₃²⁻.

Características	USBA 82	<i>Dethiosulfovibrio peptidovorans</i>
Hábitat	Manantial salino	Pozo de petróleo
Morfología celular	Bacilos curvos o espirales	Vibrio
Tamaño celular (µm)	1.5x5-7	1x3-5
DNA G+C	52	56
Rango de Temperatura °C (óptimo)	20-40 (30)	20-45 (42)
Rango de NaCl (% p/v) (óptimo)	0.1-6 (2)	(3)
Rango de pH (óptimo)	5.5-8.5(7.3)	5.5-8.8(7.0)
Utilización de:		
Citrato	+	-
Piruvato	+	Nd
Alanina	-	+ ¹
Arginina	+	+ ¹
Cisteína	-	Nd
Glutamato	+	+ ¹
Isoleucina	-	+ ¹
Leucina	-	+ ¹
Lisina	-	-
Treonina	+	-
Valina	-	+ ¹
Referencia	Este estudio	Magot <i>et al.</i> , 1997

Con base en sus características fenotípicas, en el análisis de la secuencia del gen que codifica para el 16S del ARNr y en la determinación del contenido G+C, la cepa USBA 82 se propone como un nuevo miembro del género *Dethiosulfovibrio*, con el nombre de *Dethiosulfovibrio salsuginis* sp. nov. (salsuginis: sal.su'gi.nis. L. gen. n. salsuginis, de agua salada).

5.5.4 Detección de enzimas hidrolíticas y polioxidialcanoatos en cepas aisladas

La demanda de enzimas industriales y en particular aquellas de origen microbiano, ha incrementado debido a su aplicación en la industria de alimentos, farmacéutica, de detergentes, textiles y cosmética entre otras. Las enzimas

microbianas son una alternativa interesante ya que son económicas y fáciles de producir, por lo cual la búsqueda de enzimas producidas por microorganismos aislados de diferentes fuentes naturales se ha incrementado notablemente (Enache & Kamekura, 2010).

Los microorganismos halófilos han despertado gran interés ya que producen enzimas estables y solubles a altas concentraciones de sal y baja concentración de agua (Bhatnagar *et al.*, 2005). Entre las especies halófilas moderadas estudiadas y utilizadas en biotecnología están los géneros *Halomonas*, *Halobacillus*, *Bacillus*, *Marinococcus*, *Salinicoccus* (Coronado *et al.*, 2000; DasSarma & Arora, 2001). Con el fin de conocer el potencial hidrolítico de las cepas aisladas en este estudio, se realizó la determinación de su actividad amilolítica, proteolítica, lipolítica y β -galactosidasa, así como la capacidad para producir gránulos de polihidroxibutirato (PHA)

5.5.4.1 Actividad amilolítica

Los microorganismos que tienen actividad amilolítica poseen enzimas amilasas que hidrolizan el almidón, constituido por amilosa y amilopectina. Las amilasas pueden ser α -amilasa, β -amilasa, amiloglucosidas y pululanasa de las cuales las más usadas industrialmente son la α -amilasa y la β -amilasa. Estas enzimas tienen aplicación en la industria de papel, en la fabricación de pan, almíbar de glucosa y fructosa, jugos de fruta, bebida alcohólicas, endulzantes y detergentes.

En este estudio se evaluó la actividad amilolítica de 19 cepas relacionadas con organismos de los géneros *Lysobacter*, *Roseovarius*, *Stappia*, *Thioclava*, *Aurantimonas*, *Nitratireductor*, *Vibrio* y *Bacillus*, después de 48 horas de incubación a 30°C (Tabla 25).

Tabla 25. Evaluación de la actividad amilolítica en 19 cepas aisladas

Cepa	Género	Actividad enzimática UA(μmol/minuto/L)
USBA 37	<i>Lysobacter</i> sp.	18
USBA 85	<i>Lysobacter</i> sp.	17
USBA 349	<i>Roseovarius</i> sp.	-
USBA 352	<i>Stappia</i> sp.	-
USBA 353	<i>Lysobacter</i> sp.	8
USBA 354	<i>Vibrio</i> sp	97
USBA 356	<i>Vibrio</i> sp	120
USBA 358	<i>Thioclava</i> sp	-
USBA 365	<i>Vibrio</i> sp	185
USBA 366	<i>Vibrio</i> sp	150
USBA 369	<i>Aurantimonas</i> sp	-
USBA 372	<i>Lysobacter</i> sp.	15
USBA 373	<i>Lysobacter</i> sp.	54
USBA 374	<i>Vibrio</i> sp	20
USBA 377	<i>Vibrio</i> sp	138
USBA 378	<i>Vibrio</i> sp	102
USBA 380	<i>Bacillus</i> sp	56
USBA 486	<i>Bacillus</i> sp.	10
USBA 822	<i>Nitratireductor</i> sp.	-
Control	<i>Bacillus licheniformis</i>	205

De las cepas evaluadas, se detectó actividad amilolítica en 14 cepas relacionadas con los géneros *Lysobacter*, *Vibrio* y *Bacillus*, para los cuales ya anteriormente se ha reportado este tipo de actividad (Zappe *et al.*, 1992; Najafi & Kembhavi, 2005; Reichenbach, 2006).

En las condiciones de cultivo evaluadas se determinó que la cepa USBA 365, cercanamente relacionada con *Vibrio vulnificus*, presentó la mayor actividad amilolítica (185 UA), aunque este valor fue menor al registrado para la cepa control y también menor al reportado para otros organismos aislados de fuentes naturales en Colombia como los manantiales termales, en los cuales se han aislados organismos de los géneros *Themonaerobacter* y *Anoxybacillus* que

presentan actividad amilolítica de 905 y 973 UA/min/L respectivamente (Posada *et al.*, 2004).

5.5.4.2 Actividad proteolítica

Los microorganismos con actividad proteolítica generan proteasas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas generando aminoácidos y péptidos. Estas enzimas han sido usadas en la industria de alimentos, farmacéutica, textil y de detergentes (Haki & Rakshit, 2003).

La actividad proteolítica se evaluó en 26 cepas relacionadas con los géneros *Oceanibaculum*, *Lysobacter*, *Gluconacetobacter*, *Thalassospira*, *Caenispirillum*, *Dethiosulfobivrio*, *Roseovarius*, *Thioclava*, *Aurantimonas*, *Nitratireductor* y *Pseudomonas*, después de 48 horas de crecimiento a 30°C (Tabla 26).

Tabla 26. Evaluación de la actividad proteolítica en 29 cepas aisladas

Cepa	Afiliación taxonómica	Actividad Proteolítica UP/minuto/L
USBA 36	<i>Oceanibaculum</i> sp.	-
USBA 37	<i>Lysobacter</i> sp.	43
USBA 38	<i>Pseudomonas</i> sp.	44
USBA 78	<i>Thalassospira</i> sp.	-
USBA 85	<i>Lysobacter</i> sp.	67
USBA 86	<i>Caenispirillum</i> sp.	-
USBA 151	<i>Dethiosulfobivrio</i> sp.	30
USBA 345	<i>Vibrio</i> sp.	-
USBA 349	<i>Roseovarius</i> sp.	-
USBA 353	<i>Lysobacter</i> sp.	19
USBA 354	<i>Vibrio</i> sp.	80
USBA 356	<i>Vibrio</i> sp.	70
USBA 360	<i>Vibrio</i> sp.	-
USBA 363	<i>Thioclava</i> sp.	-
USBA 365	<i>Vibrio</i> sp.	143

Tabla 26. (Continuación) Resultados obtenidos de la evaluación de la actividad proteolítica en 29 cepas aisladas de los manantiales salinos.

Cepa	Afiliación taxonómica	Actividad Proteolítica UP/minuto/L
USBA 366	<i>Vibrio</i> sp.	115
USBA 369	<i>Aurantimonas</i> sp.	-
USBA 372	<i>Lysobacter</i> sp.	134
USBA 373	<i>Lysobacter</i> sp.	130
USBA 374	<i>Vibrio</i> sp.	35
USBA 376	<i>Dethiosulfovibrio</i> sp.	45
USBA 377	<i>Vibrio</i> sp.	134
USBA 378	<i>Vibrio</i> sp.	40
USBA 482	<i>Caenispirillum</i> sp.	-
USBA 484	<i>Pseudomonas</i> sp.	21
USBA 822	<i>Nitratireductor</i> sp.	80
Control	<i>Bacillus subtilis</i>	80

De las cepas evaluadas se detectó actividad proteolítica en 17 relacionadas con organismos de los géneros *Lysobacter*, *Pseudomonas*, *Dethiosulfovibrio* y *Nitratireductor*. La mayor actividad proteolítica fue registrada para la cepa USBA 365 relacionada con el género *Vibrio vulnificus*, para la cual se registró un valor de 143 UP (minuto/L), que fue superior al registrado para la cepa control, sin embargo, es inferior al registrado para otros organismos como *Thermus* sp (1467U/mg) (Freeman *et al.*, 1993), *Haloferax mediterranei* (1082 U/mL) (Nolasco *et al.*, 2002) o *Bacillus stearothermophilus* (187 U/mg) (Sookkheo *et al.*, 2000) los cuales son usados comercialmente.

5.5.4.3 Actividad lipolítica

Las lipasas son definidas como carboxilesterasas que catalizan la hidrólisis de triacilgliceroles a diacilgliceroles, monoacilgliceroles, ácidos grasos y glicerol. Estas enzimas son usadas en la industria de alimentos, farmacéutica, detergentes, cosmética y del cuero (Thomson *et al.*, 1999).

En este estudio se evaluó la capacidad lipolítica de nueve cepas relacionadas con organismos de los géneros *Lysobacter*, *Vibrio*, *Thioclava*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Tabla 27).

Tabla 27. Evaluación de la actividad lipolítica en nueve cepas aisladas

Cepa	Afiliación taxonómica	Actividad lipolítica
USBA 38	<i>Lysobacter</i> sp.	+
USBA 354	<i>Vibrio</i> sp	-
USBA 358	<i>Thioclava</i> sp	-
USBA 365	<i>Vibrio</i> sp	-
USBA 366	<i>Vibrio</i> sp	-
USBA 372	<i>Lysobacter</i> sp.	+
USBA 373	<i>Lysobacter</i> sp.	+
USBA 484	<i>Pseudomonas</i> sp	+
USBA 486	<i>Bacillus</i> sp	-

Después de cuatro días de incubación a 30°C se detectó actividad lipolítica en cuatro cepas relacionadas con organismos de los géneros *Lysobacter* y *Pseudomonas*, lo cual ha sido previamente reportado para organismos de estos géneros (Von Tigerstrom & Stelmaschuk, 1989; Ramani *et al.*, 2010).

5.5.4.4 Actividad β -galactosidasa

La enzima β -galactosidasa cataliza reacciones tanto hidrolíticas como de transglicosilación. Estas enzimas son de especial interés para remover la lactosa de la leche y de productos lácteos, para la producción de bioetanol a partir de materia prima con alto contenido de lactosa, en el tratamiento de aguas residuales generadas durante la producción de productos lácteos y como biosensor en la detección cuantitativa de lactosa en muestras de leche (Marrakchi *et al.*, 2008; Hildebrandt *et al.*, 2009).

En este estudio se evaluó actividad β -galactosidasa en la cepa USBA 355 de la familia *Rhodospirillaceae* y en siete cepas relacionadas con los géneros *Lysobacter*, *Cellulomonas*, *Thioclava*, *Aurantimonas* y *Vibrio* (Tabla 28).

Tabla 28. Evaluación de la actividad β -galactosidasa en ocho cepas aisladas

Cepa	Género	Actividad específica (Unidades/mL)/(mg/mL de proteína total)
USBA 342	<i>Lysobacter</i> sp	3.3
USBA 345	<i>Lysobacter</i> sp	3.8
USBA 355	Nuevo género	2.0
USBA 362	<i>Cellulomonas</i> sp	16
USBA 363	<i>Thioclava</i> sp.	126
USBA 366	<i>Vibrio</i> sp.	2.0
USBA 369	<i>Aurantimonas</i> sp	2.0
USBA 377	<i>Vibrio</i> sp.	2.0

La actividad específica más alta fue encontrada en la cepa USBA 363 relacionada con el género *Thioclava*, lo cual no había sido previamente reportado para organismos de este género.

5.5.4.5 Detección de polihidroxicanoatos

Los polihidroxicanoatos (PHA) son poliésteres de reserva de energía producido por los microorganismos sometidas a condiciones de estrés lo cual incrementa su supervivencia en ambientes poco estables y oligotróficos (Lauro *et al.*, 2009). Dependiendo de la longitud de la cadena lateral de sus unidades monoméricas se pueden obtener PHAs con diferentes puntos de fusión, cristalización, flexibilidad, biocompatibilidad y velocidad de biodegradación por lo cual constituyen una buena alternativa para la producción biotecnológica de bioplásticos (Zinn *et al.*, 2001; Chen & Wu, 2005; Koller *et al.*, 2007).

La detección de PHAs se realizó en 20 cepas relacionadas con los géneros *Caenispirillum*, *Lysobacter*, *Pseudomonas*, *Gluconacetobacter*, *Thalassospira*, *Labrenzia*, *Bacillus* y para un nuevo género de la familia *Rhodospirillaceae* (Tabla 29).

Tabla 29. Detección de la producción de gránulos de PHAs en 20 cepas aisladas

Cepa	Género	Producción de PHAs
USBA 36	<i>Caenispirillum</i> sp.	+
USBA 37	<i>Lysobacter</i> sp.	+
USBA 38	<i>Pseudomonas</i> sp.	-
USBA 40	<i>Pseudomonas</i> sp.	-
USBA 76	<i>Gluconacetobacter</i> sp.	-
USBA 78	<i>Thalassospira</i> sp.	+
USBA 83	<i>Thalassospira</i> sp.	+
USBA 85	<i>Lysobacter</i> sp.	+
USBA 86	<i>Caenispirillum</i> sp.	+
USBA 140	<i>Caenispirillum</i> sp.	+
USBA 352	<i>Labrenzia</i> sp.	-
USBA 353	<i>Lysobacter</i> sp.	+
USBA 355	Nuevo género	+
USBA 359	<i>Labrenzia</i> sp.	+
USBA 371	<i>Labrenzia</i> sp.	-
USBA 482	<i>Caenispirillum</i> sp.	+
USBA 483	<i>Labrenzia</i> sp.	-
USBA 484	<i>Pseudomonas</i> sp.	-
USBA 485	<i>Caenispirillum</i> sp.	+
USBA 486	<i>Bacillus</i> sp.	-

Los resultados indicaron que la cepa USBA 355 de la familia *Rhosdospirillaceae* y 11 cepas más relacionadas con los géneros *Caenispirillum*, *Lysobacter* y *Thalassospira*, almacenaban gránulos de PHA's, lo cual no había sido reportado previamente.

En general, los resultados muestran que muchos de los microorganismos aislados y en particular los relacionados con el género *Lysobacter* son versátiles en cuanto a sus propiedades hidrolíticas y acumulación de gránulos de reserva (PHAs), por lo cual se convierten en buenos candidatos para una caracterización más detallada de su potencial enzimático, teniendo en cuenta que tal como se describió previamente, estos organismos pueden crecer en un amplio rango de salinidad y compuestos orgánicos.

5.5.5 Generalidades de los microorganismos aislados

Los enriquecimientos favorecieron el aislamiento tanto de organismos comúnmente reportados en ambientes salinos, como de organismos de amplia distribución ambiental o cosmopolita. Dentro de los organismos aislados también se encontraron nuevos géneros y/o especies microbianas indicando que los manantiales son reservorio de nueva diversidad biológica.

De las 31 cepas aisladas del manantial SC se encontró que 17 han sido típicamente reportadas en ambientes salinos, principalmente marinos, y están relacionadas con los géneros *Roseovarius*, *Thalassospira*, *Thalassobaculum*, *Labrenzia*, *Stappia*, *Thioclava*, *Dethiosulfovibrio*, *Vibrio* y *Prolixibacter*, además se aislaron 14 cepas de distribución cosmopolita relacionadas con los géneros *Gluconacetobacter*, *Caenispirillum*, *Pleomorphomonas*, *Lysobacter*, *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Clostridium* y *Cellulomonas*. De los organismos aislados se encontró que las cepas USBA 355, USBA 361 y USBA 369 tienen menos del 97% de similitud con organismos previamente aislados de la familia *Rhodospirillaceae* y de los géneros *Desulfovibrio* y *Aurantimonas* respectivamente. Además, el análisis fenotípico de las cepas USBA 357 y USBA 362, sugiere que pueden ser nuevas especies de los géneros *Prolixibacter* y *Cellulomonas*.

De las 14 cepas aisladas del manantial LC se encontró que cinco han sido típicamente reportadas en ambientes marinos y se relacionan con los géneros *Oceanibaculum*, *Dethiosulfovibrio* y *Vibrio*, las nueve cepas restantes presentan distribución cosmopolita y están relacionadas con los géneros *Caenispirillum*, *Lysobacter* y *Bacillus*. De los organismos aislados se encontró que las cepas USBA 151, USBA 376 y USBA 486 presentaron menos del 97% de similitud con organismos previamente aislados, sugiriendo que se trata de nuevas especies microbianas de los géneros *Dethiosulfovibrio* y *Bacillus*. Por otra parte, aunque a nivel del 16S ARNr la cepa USBA 372 presentó 99% de similitud con un organismo cultivado, su caracterización fenotípica muestra claras diferencias que permiten sugerir que puede tratarse de una nueva especie del género *Lysobacter*,

aunque se requiere profundizar en su estudio y utilizar técnicas como hibridización ADN-ADN y MLSA.

Del manantial SP se aislaron 17 cepas de las cuales dos, relacionadas con los géneros *Desulfovibrio* y *Dethiosulfovibrio*, han sido previamente reportadas en ambientes salinos, las 15 cepas restantes están relacionadas con organismos de distribución cosmopolita de los géneros *Nitratireductor*, *Shewanella*, *Lysobacter*, *Clostridium* y *Providencia*. De las 17 cepas, la cepa USBA 82 presentó menos del 97% de similitud con organismos previamente aislados del género *Dethiosulfovibrio* y a su vez un porcentaje de similitud en su secuencia del 16S ARNr del 100% con las cepas USBA 151 y USBA 376 aisladas del manantial LC.

Una generalidad en los tres manantiales fue el aislamiento de organismos relacionados con los géneros *Vibrio* y *Lysobacter*, mientras que organismos relacionados con los géneros *Caenispirillum* y *Prolixibacter* solo fueron aislados de los manantiales SC y LC, organismos de los géneros *Desulfovibrio*, *Shewanella* y *Clostridium* de los manantiales SC y SP y organismos del género *Dethiosulfovibrio* de los manantial LC y SP (Figura 36).

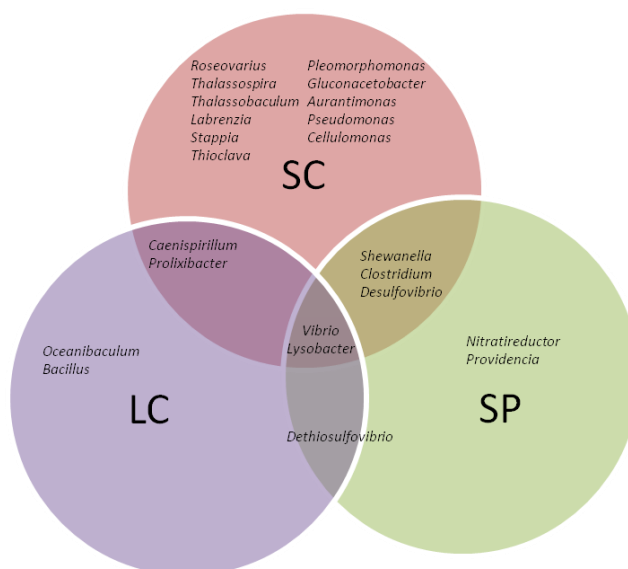


Figura 36. Representación gráfica que muestra la afiliación taxonómica de las cepas aisladas en cada uno de los manantiales, SC: Salado de Consotá; LC: la Cristalina; SP: Salpa.

Por otra parte, la caracterización fenotípica de los microorganismos aislados, que incluyó la determinación del rango de NaCl que favorece su crecimiento, permitió detectar que aunque los manantiales SC, LC y SP presentan una salinidad inclusive más alta que la reportada para ambientes marinos, la mayoría de las cepas aisladas no tienen un requerimiento específico por el ion Na⁺, incluso aquellas cepas cercanamente relacionadas con organismos de géneros de ambientes marinos que requieren de este ión, tales como *Stappia* (Lai *et al.*, 2010), *Labrenzia* (Biebl *et al.*, 2007), *Roseovarius* (Biebl *et al.*, 2005), *Thioclava* (Sorokin *et al.*, 2005) y *Vibrio*.

También vale la pena resaltar que a pesar del elevado pH del manantial LC que oscila entre 8.4 y 9.8; lo cual a su vez lo diferencia de los otros dos manantiales, ninguno de los organismos aislados está relacionado con organismos alcalófilos y a excepción de una cepa relacionada con el género *Bacillus*, todas son Gram-negativas. Estos resultados difieren de los resultados obtenidos en otros ambientes salinos alcalinos, en los cuales se han aislado principalmente, organismos del Filo *Firmicutes* relacionados con bacterias Gram-positivas de bajo contenido G+C de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Alkalibacillus*, *Exiguobacterium*, *Planococcus*, *Enterococcus* y *Vagococcus* (Joshi *et al.*, 2008).

En conclusión los enriquecimientos realizados en este estudio favorecieron el aislamiento de organismos halotolerantes de los grupos α , δ y γ -*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Synergistetes*. Los cuales a su vez presentan heterogeneidad fenotípica al ser comparados con los organismos cultivados más cercanamente relacionados y con potencial hidrolítico que puede ser explorado con más detalle para describir su posible aplicación en procesos biotecnológicos.

5.6 CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN MICROBIANA USANDO MÉTODOS INDEPENDIENTES DE CULTIVO

El estudio de la composición de las comunidades bacterianas de los tres manantiales salinos se complementó utilizando técnicas independientes de cultivo

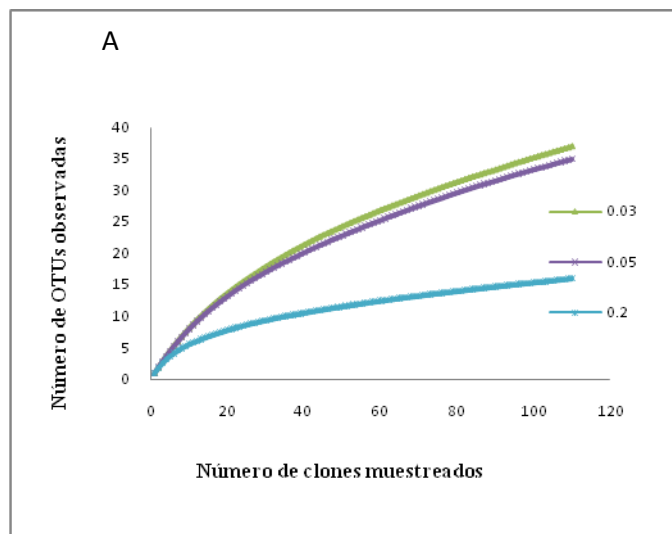
utilizando como marcador molecular el gen que codifica para la subunidad pequeña del 16S del ARNr.

5.6.1 Análisis de la genoteca del 16S ARNr de muestras del manantial SC y SP

Se evaluaron 130 secuencias de aproximadamente 840 nucleótidos, para cada una de las muestras de SC y SP. Después de realizar la edición manual y eliminación de las secuencias quiméricas, se obtuvieron 105 secuencias de la muestra de SC y 114 secuencias de la muestra de SP.

Las secuencias obtenidas generaron una cobertura del 83% para el manantial SC y del 79% para el manantial SP, según el estimador no paramétrico de Good. Además, el análisis de rarefacción mostró que al agrupar las secuencias a una distancia genética de 0.2, usando el programa DOTUR, se logra llegar a la asíntota, y a una distancia menor o igual a 0.05 hay una aproximación a esta (Figura 37 A y B).

Tanto el estimador de cobertura de Good como las curvas de rarefacción, sugieren que en estas genotecas se ha capturado la mayoría de los grupos bacterianos presentes en los manantiales SC y SP, lo cual permitirá generar una descripción confiable de la composición de la comunidad bacteriana de las muestras de estos dos hábitats.



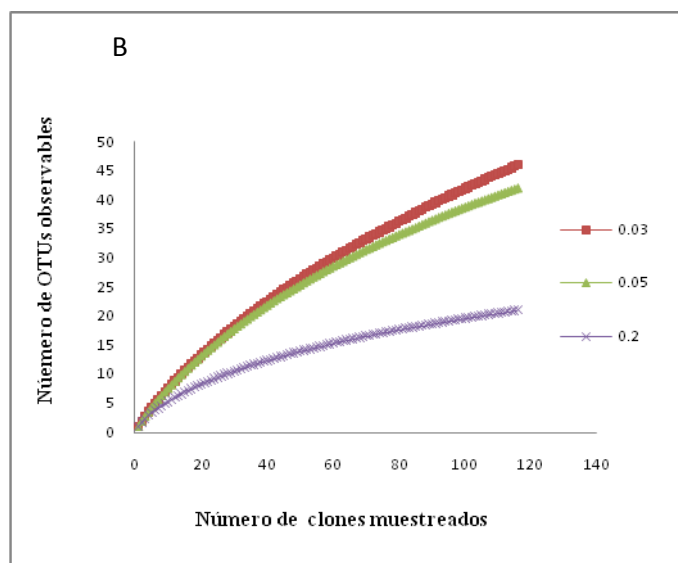


Figura 37. A) Curva de rarefacción para los clones obtenidos en la muestra de Salado de Consotá. B) Curva de rarefacción para los clones obtenidos en la muestra de Salpa. Las series indican la distancia.

5.6.1.1 Asignación taxonómica de las Unidades Taxonómica Operacionales (OTUs) obtenidas en la muestra del manantial SC

La composición de la comunidad bacteriana en el manantial SC fue representada por 105 secuencias asignadas a 34 OTUs (las OTUs fueron definidas a un nivel de similitud del 97% usando el programa DOTUR) relacionadas con los fila (de mayor a menor) *Proteobacteria* (87.6% de las secuencias), *Chlorobi* (3.8%), *Bacteroidetes* (2.9%), *Acidobacteria* (0.95%), *Chloroflexi* (0.95%) y OTUs de las cuales no fue posible establecer relación taxonómica (3.8%) (Tabla 30).

Filo *Proteobacteria*

En el filo *Proteobacteria* se encontraron 24 OTUs relacionadas con las clases (de mayor a menor abundancia) γ -*Proteobacteria* (53.3% de las secuencias), α -*Proteobacteria* (19%), β -*Proteobacteria* (9.5%), ε -*Proteobacteria* (4.8%) y δ -*Proteobacteria* (0.95%).

Clase γ -*Proteobacteria*

La clase γ -*Proteobacteria* fue la más abundante entre los grupos filogenéticos encontrados en la biblioteca de clones, y coincide con los resultados de recuentos

bacterianos obtenidos por FISH. Las secuencias relacionadas con esta clase fueron agrupadas en 11 OTUs relacionadas con las familias *Oceanospirillaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Vibrionaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudoalteromonadaceae* y *Coxiellaceae*.

A la familia *Oceanospirillaceae* se asignaron tres OTUs (24% de las secuencias analizadas), dos de las cuales están relacionadas con *Marinomonas pontica* (97 y 98% de similitud). El género *Marinomonas* incluye especies aisladas de ambientes marinos, que se caracterizan por ser halófilos, móviles y quimioheterotróficos (Ivanova *et al.*, 2005). A pesar de ser el grupo más abundante en la biblioteca de clones, en este estudio no se logró el aislamiento de microorganismos cercanamente relacionados con este género. La tercera OTU presentó 94% de similitud con *Thalassolituus oleivorans*, aislada de muestras de agua y sedimento marino; este es un organismos halófilo, móvil, quimioheterotrófico, que usa como única fuente de carbono hidrocarburos alifáticos y sus derivados oxidados (Yakimov *et al.*, 2004). Mediante los enriquecimientos utilizados en este estudio tampoco se recuperaron organismos relacionados con este género.

Tabla 30. Afiliación taxonómica de las OTUs obtenidas en la biblioteca de clones de la muestra del manantial salino SC

OTU	Número de clones SC	% clones SC	Filo	Clase	Familia	Especie	% similitud	Número de acceso GenBank de organismo más cercanamente relacionado
SC39	3	2.8	Proteobacteria	α -Proteobacteria	Rhodobacteraceae	<i>Roseovarius mucosus</i>	99	AJ534215
SC13	1	0.9	Proteobacteria	α -Proteobacteria	Rhodobacteraceae	<i>Oceanicola nanhaiensis</i>	96	DQ414420
SC65	1	0.9	Proteobacteria	α -Proteobacteria	Methylocystaceae	<i>Terasakiella pusilla</i>	95	NR024656
SC18	12	11.3	Proteobacteria	α -Proteobacteria	Methylocystaceae	<i>Terasakiella pusilla</i>	97	NR024656
SC29	2	1.9	Proteobacteria	α -Proteobacteria	Rhodospirillaceae	<i>Thalassospira xianheensis</i>	98	AY189753
SC37	1	0.9	Proteobacteria	α -Proteobacteria	Rickettsiales	Clon d021	90	AF422632
SC40	2	1.9	Proteobacteria	β -Proteobacteria	Orden Burkholderiales	<i>Mitsuaria chitosanitabida</i>	99	AB006851
SC47	5	4.7	Proteobacteria	β -Proteobacteria	Rhodocyclaceae	<i>Methyloversatilis universalis</i>	93	DQ442273
SC16	2	1.9	Proteobacteria	β -Proteobacteria	Rhodocyclaceae	<i>Georfuchsia toluolica</i>	93	EF219370
SC12	1	0.9	Proteobacteria	β -Proteobacteria	Gallionellaceae	<i>Sideroxydans paludicola</i>	95	DQ386858
SC7	1	0.9	Proteobacteria	δ -Proteobacteria	Desulfobacteraceae	<i>Desulfosarcina variabilis</i>	92	M34407
SC1	5	4.7	Proteobacteria	γ -Proteobacteria	Xanthomonadaceae	<i>Lysobacter</i> sp. G6/ L. sp OC7	99	AB429529/AB429072
SC4	10	9.4	Proteobacteria	γ -Proteobacteria	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas abietaniphila</i>	99	AJ011504
SC36	1	0.9	Proteobacteria	γ -Proteobacteria	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas parafulva</i>	96	AB046999.
SC6	6	5.7	Proteobacteria	γ -Proteobacteria	Vibrionaceae	<i>Vibrio ordalii</i>	99	X74718
SC49	4	3.8	Proteobacteria	γ -Proteobacteria	Vibrionaceae	<i>Vibrio vulnificus</i>	99	X76333
SC8	10	9.4	Proteobacteria	γ -Proteobacteria	Oceanospirillaceae	<i>Marinomonas pontica</i>	98	AY539835
SC17	10	9.4	Proteobacteria	γ -Proteobacteria	Oceanospirillaceae	<i>Marinomonas pontica</i>	97	AY539835
SC21	5	4.7	Proteobacteria	γ -Proteobacteria	Oceanospirillaceae	<i>Thalassolituus oleivorans</i>	94	AM279755
SC10	2	1.9	Proteobacteria	γ -Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter hormaechei</i>	99	AJ853889
SC15	2	1.9	Proteobacteria	γ -Proteobacteria	Pseudoalteromonadaceae	<i>Pseudoalteromonas</i> sp E407-2	98	FJ169963
SC61	1	0.9	Proteobacteria	γ -Proteobacteria	Coxiellaceae	<i>Rickettsiella melolonthae</i>	98	EF408231
SC5	1	0.9	Proteobacteria	ϵ -Proteobacteria	Helicobacteriaceae	<i>Sulfurimonas denitrificans</i>	97	CP000153
SC35	4	3.8	Proteobacteria	ϵ -Proteobacteria	Helicobacteriaceae	<i>Sulfurimonas denitrificans</i>	96	CP000153

Tabla 30. (Continuación) Afiliación taxonómica de las OTUs obtenidas en la biblioteca de clones de la muestra del manantial salino SC.

OTU	Número de clones SC	% clones SC	Filo	Clase	Familia	Especie	% similitud	Número de acceso GenBank del organismo más cercanamente relacionado
SC41	1	0.9	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteriodaceae</i>	<i>Bacteroides finegoldii</i>	95	AB222699
SC54	1	0.9	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	No clasificada	<i>Marinifilum fragile</i>	87	FJ394546
SC38	1	0.9	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Flexibacteraceae</i>	<i>Roseivirga seohaensis</i>	96	AY739663
SC9	1	0.9	<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteriaceae</i>	<i>Koribacter versatilis</i>	99	CP000360
SC11	4	3.8	<i>Chlorobi</i>	<i>Chlorobia</i>	<i>Chlorobiaceae</i>	<i>Chlorobium limicola</i>	97	Y10645
SC19	1	0.9	<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineae</i>	<i>Caldilineaceae</i>	<i>Bellilinea caldifistulae</i>	80	AB243672
SC50	1	0.9	No clasificado	No clasificado	No clasificado	<i>Dethiobacter alkaliphilus</i>	83	ACJM01000032
SC55	1	0.9	No clasificada	No clasificada	No clasificada	<i>Natranaerobius trueperi</i>	76	EU338490
SC62	1	0.9	No clasificada	No clasificada	No clasificada	Clon DSSD4	97	AY328704
SC63	1	0.9	No clasificada	No clasificada	No clasificada	Clon MD2902-B12	93	EU048619

A la familia *Pseudomonadaceae* se asignaron dos OTUs (10.6% de las secuencias analizadas), relacionadas con *Pseudomonas abietaniphila* (99% de similitud) aislada de agua residual industrial con alto contenido de resinas ácidas (Mohn *et al.*, 1999) y *Pseudomonas parafulva* (96% de similitud) aislada de plantas de arroz y otros cereales (Uchino *et al.*, 2001). La abundancia de este género microbiano en el manantial SC no solo se refleja en el número de clones obtenidos sino en el aislamiento de tres cepas relacionados con *P. pseudoalcaligenes*, las cuales se caracterizan por su gran versatilidad metabólica.

A la familia *Vibrionaceae* se asignaron dos OTUs (9.6% de las secuencias analizadas), una de ellas relacionada con *Vibrio ordalii* (99% de similitud) y la otra cercanamente relacionada con *V. vulnificus* (99% de similitud), ambos organismos asociados con la generación de vibriosis en peces (Schiewe *et al.*, 1981). En este estudio también se aislaron tres cepas del género *Vibrio* relacionados con *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* y *V. natrieigenis*, su gran versatilidad metabólica y capacidades hidrolíticas sugieren una función ecológica importante en los procesos de degradación de la materia orgánica en el manantial SC.

En la familia *Xanthomonadaceae* se encontró una OTU (4.8% de las secuencias analizadas) cercanamente relacionada con *Lysobacter* sp OC7 (99% de similitud) un organismo de origen marino capaz de degradar carbozol, un compuesto heterocíclico aromático usado para la fabricación de colorantes (Maeda *et al.*, 2009). Como se mencionó anteriormente, del manantial SC también se logró el aislamiento de dos organismos relacionados con este género, los cuales presentan 100% de similitud en su secuencia de 16S ARNr con los clones obtenidos.

En la familia *Enterobacteriaceae* se encontró una OTU (1.9% de las secuencias analizadas) cercanamente relacionada con *Enterobacter hormaechei* (99% de similitud) un organismo quimioheterotrófico (O'Hara *et al.*, 1989), aislado de muestras clínicas y ambientales. En el ambiente, estos organismos tienen actividad promotora de crecimiento vegetal o pueden fijar nitrógeno atmosférico (Kämpfer *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2009). A pesar de ser organismos fácilmente recuperados por métodos dependientes de cultivo, en este estudio no se aisló ninguna cepa relacionada.

En la familia *Pseudoalteromonadaceae* se encontró una OTU (0.9% de secuencias analizadas) cercanamente relacionada con *Pseudoalteromonas* sp E407-2 (98% de similitud) un organismo proteolítico aislado de sedimentos marinos en China (Zhou *et al.*, 2009). Los organismos de este género han sido ampliamente reportados en ambientes marinos (González *et al.*, 2000), se caracterizan por ser halófilos, quimioheterotróficos, con capacidades hidrolíticas relacionadas con la degradación de almidón, Tween 80, alginato, caseína, gelatina, quitina y agar-agar (Ivanova *et al.*, 1998), pero tampoco se aislaron organismos cercanamente relacionados con este género.

En la familia *Coxiellaceae*, se encontró una OTU (0.9% de las secuencias analizadas) cercanamente relacionada con un organismo patógeno de desarrollo intracelular en coleópteros (Leclerque & Kleespies, 2008) pero su presencia no fue detectada mediante los enriquecimientos realizados.

Clase α -Proteobacteria

Tal como se detectó por FISH, la clase α -Proteobacteria representa un grupo abundante dentro de la comunidad bacteriana del manantial. Las secuencias asignadas a esta clase fueron agrupadas en seis OTUs relacionadas con las familias *Methylocystaceae*, *Rhodobacteriaceae*, *Rhodospirillaceae* y organismos del orden *Rickettsiales*.

A la familia *Methylocystaceae* se asignaron dos OTUs (12.5% de las secuencias analizadas) relacionadas con *Terasakiella pusilla*, con porcentajes de similitud del 95% y del 97%. Este organismo aislado de ambientes marinos, es un organismo halófilo, quimioheterotrófico, que no cataboliza carbohidratos (Satomi *et al.*, 2002). A pesar de su abundancia en la biblioteca de clones ningún organismo relacionado con este género fue aislado de los enriquecimientos realizados.

En la familia *Rhodobacteriaceae* se encontraron dos OTUs (3.8% de las secuencias analizadas), una de las OTUs estaba cercanamente relacionada con *Roseovarius mucosus* (99% de similitud), el cual también fue recuperado a partir de los enriquecimientos realizados, como se mencionó anteriormente. La segunda OTU fue relacionada con la cepa *Oceanicola nanhaiensis* (96% de similitud), el género *Oceanicola* consta de seis especies, aisladas de agua o sedimentos marinos, se caracterizan por ser organismos halotolerantes, quimioheterotróficos, con la capacidad

para acumular gránulos de polihidroxi-butirato (Cho & Giovannoni, 2004), ningún organismo cercanamente relacionado con este género fue aislado en este estudio.

En la familia *Rhodospirillaceae* se detectó una OTU (1.9% de las secuencias analizadas) cercanamente relacionada con *Thalassospira xianhensis* (98% de similitud) un organismo halófilo, quimioheterótrofo, reportado típicamente en ambientes marinos (Liu *et al.*, 2007). En este estudio también se logró el aislamiento de dos cepas relacionadas con este género y cercanamente relacionadas con la especie *T. xiamenensis*, sugiriendo una amplia distribución de organismos de este género en ambientes salinos.

Dentro del orden *Rickettsiales* se encontró una OTU (0.9% de las secuencias analizadas) distantemente relacionada (90% de similitud) con un organismo no cultivado reportado en el estudio de un ambiente contaminado con tricloroetano (Lowe *et al.*, 2002), pero en este estudio no se logró el aislamiento de organismos pertenecientes a este orden.

Clase β -Proteobacteria

Mediante FISH se detectó poca abundancia de organismos de esta la clase β - *Proteobacteria* ($<2.3 \times 10^3$ células.mL⁻¹). Las secuencias relacionadas con esta clase fueron asignadas a cuatro OTUs (11.8% de las OTUs) relacionadas con las familias *Rhodocyclaceae*, *Gallionellaceae* y al orden *Burkholderiales*. Ningún organismo relacionado a esta clase fue recuperado mediante las técnicas de cultivo utilizadas en este estudio.

En la familia *Rhodocyclaceae* se encontraron dos OTUs (6.7% de las secuencias analizadas). Una de las OTUs presentó 93% de similitud con *Georgfuchsia toluolica* un organismo aislado de un acuífero contaminado con hidrocarburos en Holanda, es anaerobio estricto, capaz de degradar compuestos aromáticos usando como aceptor de electrones Fe³⁺, Mn⁴⁺ o NO₃⁻ (Weelink *et al.*, 2011). La segunda OTU presentó un 93% de similitud con *Methyloversatilis universalis*, a la fecha este organismo es la única especie del género y se caracteriza por crecer metilotróficamente. Los organismos de esta familia se encuentran principalmente en hábitats acuáticos oligotróficos y presentan capacidades metabólicas versátiles relacionadas con la degradación de compuestos halogenados, desnitrificación y fijación nitrógeno atmosférico (Kalyuznaya *et al.*, 2006).

A la familia *Gallionellaceae* se asignó una OTU (0.9% de las secuencias) distantemente relacionada con “*Sideroxydans paludicola*” (95% de similitud) un organismo aislado de agua subterránea, capaz de crecer litoautotróficamente a expensas de hierro (Fe^{2+}) a pH neutro (Weiss *et al.*, 2007). Los organismos de este género suelen encontrarse en la interfase anaerobia y aerobia ya que el Fe^{2+} no es estable a pH neutro en presencia de oxígeno y es rápidamente oxidado a Fe^{3+} que es insoluble (Emerson & Moyer, 1997).

Al orden *Burkholderiales* se asignó una OTU (1.9% de las secuencias) relacionada con *Mitsuaria chitosanitabida* (99% de similitud), un organismo aislado de muestras de suelo en Japón, quimioheterotrófico capaz de degradar quitosan, un polisacárido deacetilado derivado de la quitina, encontrado en crustáceos (Amakata *et al.*, 2005).

Clase δ -Proteobacteria

A la clase δ -Proteobacteria, se asignó una OTU (0.9% de las OTUs) que presentó 92% de similitud con *Desulfosarcina variabilis* (Kuever *et al.*, 2005). Los organismos de este género son anaerobios, sulfato reductores capaces de usar como donadores de electrones hidrógeno, formato, lactato, etanol, ácidos grasos, fumarato y benzoato, algunos han sido aislados de cultivos enriquecidos con sulfato y petróleo crudo como única fuente de carbono (Harms *et al.*, 1999) y han sido usualmente reportados en sedimentos anóxicos (Sass *et al.*, 1997). Aunque en este estudio no se aislaron organismos de este género, sí se obtuvo en cultivo puro un organismo sulfato reductor del género *Desulfovibrio*, el cual fue también distantemente relacionado con organismos previamente aislados, sugiriendo que este manantial alberga poblaciones de bacterias sulfato-reductoras que no han sido anteriormente descritas.

Clase ε -Proteobacteria

A la clase ε -Proteobacteria se asignaron dos OTUs (4.8% de las OTUs) relacionadas con la familia *Helicobacteriaceae* que presentaron porcentajes de similitud del 96 y 97% con *Sulfurimonas denitrificans*. Los organismos de este género han sido aislados de sedimentos marinos costeros (Takai *et al.* 2006), hidrotermales (Huber *et al.*, 2003) y pozos de petróleo (Watanabe *et al.*, 2000), su principal característica es la capacidad de crecer quimiolitoautotróficamente usando como fuente de carbono CO_2 , como donadores de electrones compuestos reducidos de azufre (sulfuro, azufre elemental y

tiosulfato), hidrógeno y formato y como aceptores de electrones, NO_3^- , NO_2^- y oxígeno (Takai *et al.* 2006).

Filo Bacteroidetes

Este filo fue el segundo más abundante después de *Proteobacteria*, se ha reportado que este es uno de los principales grupos heterotróficos implicados en la utilización de materia orgánica disuelta de alto peso molecular en ecosistemas acuáticos (Cottrell & Kirchman, 2000). Los organismos de este filo han sido ampliamente reportado en lagos de agua dulce, lagos hipersalinos, sedimentos marinos, manantiales termales salinos y hábitats marinos (O'Sullivan *et al.*, 2006).

A este filo se asignaron tres OTUs (8.8% de las OTUs), una de las OTUs presentó 95% de similitud con *Bacteroides finegoldii* reportado en el tracto intestinal de humanos (Bakir *et al.*, 2006). La segunda OTU presentó un 87% de similitud con *Marinifilum fragile*, un organismo anaerobio facultativo, halófilo moderado aislado de sedimentos marinos (Na *et al.*, 2009) y la tercera OTU asignada a la familia *Flexibacteriaceae* presentó un 96% de similitud con *Roseivirga seohaensis*, organismo aislado de ambientes marinos, halotolerante, quimioheterotrófico, pigmentado (Lau *et al.*, 2006). Aunque no se logró el aislamiento de organismos cercanamente relacionados con los clones obtenidos, sí se aisló una cepa del filo *Bacteroidetes* relacionada con el género *Prolixibacter*.

Filo Acidobacteria

Se encontró una OTU (0.9% de las OTUs) asignada a la familia *Acidobacteriaceae* y cercanamente relacionada con "*Koribacter versatilis*" (99% de similitud), aislado de suelo, la secuenciación del genoma de este organismo indicó que puede crecer tanto en azúcares simples como sustratos complejos tales como celulosa y quitina (Ward *et al.*, 2009). Los organismos de este filo también han sido reportados en fluidos ricos en metales (Sahl *et al.*, 2008).

Filo Chlorobia

Se encontró una OTU (3.5% de las OTUs) cercanamente relacionada con *Chlorobium limicola* (97% de similitud), una bacteria verde del azufre (GSB por sus siglas en inglés *Green Sulfur Bacteria*) reportada en ambientes ricos en sulfuro, como fuentes termales

y sedimentos (Overman, 2001). Poseen pigmentos fotosintéticos y carotenoides y son capaces de crecer a intensidades de luz en las cuales otros fotótrofos no pueden sobrevivir (Menske *et al.*, 2005). En general las GSB son anaerobias estrictas y fotoautotróficas obligadas, ninguna es capaz de respirar en la oscuridad o de realizar metabolismo fermentativo. La mayoría de estas bacterias usan electrones derivados de compuestos reducidos de azufre en presencia de luz para reducir carbono y nitrógeno (Frigaard *et al.*, 2003). Algunas cepas pueden utilizar hidrógeno como donador de electrones para crecer fotoautotróficamente y otras como *Chlorobium limicola* sp 245 asimilan acetato y propionato en crecimiento mixotrófico (Imhoff, 2003).

Filo Chloroflexi

Se encontró una OTU (0.9% de OTUs) relacionada con la familia *Caldilineaceae* y distantemente relacionada con *Bellilinea caldifistulae* (80% de similitud), organismo anaerobio, termofílico, aislado del lodo de un digestor anaerobio (Yamada *et al.*, 2007). La familia *Caldilineaceae* está integrada por bacterias filamentosas, termofílicas, que pueden crecer tanto en condiciones aerobias como anaerobias y no son fotosintéticas (Sekiguchi *et al.*, 2003).

Secuencias no clasificadas

Se encontraron cuatro OTUs (3.5% de las OTUs) que no fue posible clasificar dentro de grupos microbianos reportados previamente. La OTU SC50 presentó 83% de similitud con *Dethiobacter alkaliphilus*, aislado de un lago de soda (Sorokin *et al.*, 2008). La OTU SC55 presentó 76% de similitud con *Natranaerobius trueperi* un microorganismo anaerobio, halófilo alcalitermofílico aislado de sedimentos de un lago alcalino hipersalino en Egipto (Mesbah *et al.*, 2009). La OTU SC63 presentó 93% con el clon MD2902-B12, reportado en el estudio de la diversidad microbiana de sedimentos marinos en China (Li & Wang, 2008), la OTU SC62 presentó 97% de similitud con el clon DSSD4 reportado en el estudio filogenético de la diversidad bacteriana presente en un sistema de distribución de agua potable (Williams *et al.*, 2004).

5.6.1.2 Asignación taxonómica de OTUs obtenidas en la muestra del manantial SP

La composición de la comunidad bacteriana en el manantial SP estuvo representada por 114 secuencias asignadas a 47 OTUs relacionadas con los fila *Proteobacteria* (79% de las secuencias), *Bacteroidetes* (4.4%), *Chlorobi* (3.5%), *Chloroflexi* (2.6%), *Cyanobacteria* (2.6%), *Acidobacteria* (1.7%), *Spirochaetes* (0.9%), *Verrucomicrobia* (0.9%), *Actinobacteria* (0.9%) y no clasificados (3.5 %) (Tabla 31).

Filo *Proteobacteria*

Al filo *Proteobacteria* se asignaron 28 OTUs relacionadas con las clases γ -*Proteobacteria* (36.2% de las secuencias), α -*Proteobacteria* (12.8%), β -*Proteobacteria* (4.3%), δ -*Proteobacteria* (4.3%) y zeta (ζ)-*Proteobacteria* (2.1%).

Clase γ -*Proteobacteria*

Tal como se evidenció en los datos de FISH, la clase γ -*Proteobacteria* representa el grupo más abundante dentro del filo *Proteobacteria*, presentando recuentos que oscilaron entre 2.0 y 6.2×10^5 células.mL⁻¹.

Las secuencias relacionadas con esta clase fueron agrupadas en 17 OTUs relacionadas con las familias *Xanthomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Oceanospirillaceae*, *Moraxellaceae*, *Piscirickettsiaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Vibrionaceae*, *Chromatiaceae*, *Aeromonadaceae* y *Alteromonadaceae*.

A la familia *Xanthomonadaceae* se asignaron dos OTUs (29% de las secuencias analizadas). Una de las OTUs estaba cercanamente relacionada con *Stenotrophomonas maltophilia* (99% de similitud) un organismo quimioheterotrófico que crece principalmente a expensas de disacáridos; se encuentra en ambientes acuáticos y es patógeno para humanos. En el ambiente, algunos organismos de este género reducen nitrato y participan en los procesos de remoción de nitrógeno del suelo (Heylen *et al.*, 2007).

Tabla 31. Afiliación taxonómica de las OTUs obtenidas en la biblioteca de clones de la muestra del manantial salino SP

OTU	Número de clones SP	% de clones SP	Filo	Clase	Familia	Especie	% similitud	Número de acceso GenBank
SP59	1	0.9	<i>Proteobacteria</i>	<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Methylobacteriaceae</i>	<i>Methylobacterium extorquens</i>	99	AF531770
SP60	2	1.7	<i>Proteobacteria</i>	<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Methylobacteriaceae</i>	<i>Methylobacterium aquaticum</i>	99	NR025631
SP43	1	0.9	<i>Proteobacteria</i>	<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Phaeobacter daeponensis</i>	95	DQ981486
SP18	4	3.4	<i>Proteobacteria</i>	<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Methylocystaceae</i>	<i>Terasakiella pusilla</i>	97	NR024656
SP2	2	1.7	<i>Proteobacteria</i>	<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Brevundimonas nasdae</i>	99	EU741090
SP29	1	0.9	<i>Proteobacteria</i>	<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Rhodospirillaceae</i>	<i>Thalassospira xianheensis</i>	98	AY189753
SP48	1	0.9	<i>Proteobacteria</i>	<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Insolitispirillum peregrinum</i>	96	AB074521
SP12	7	6.0	<i>Proteobacteria</i>	<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Gallionellaceae</i>	<i>Sideroxydans paludicola</i>	95	DQ386858
SP7	1	0.9	<i>Proteobacteria</i>	<i>δ-Proteobacteria</i>	<i>Desulfobacteraceae</i>	<i>Desulfosarcina ovata</i>	95	Y17286
SP51	1	0.9	<i>Proteobacteria</i>	<i>δ-Proteobacteria</i>	<i>Desulfobacteraceae</i>	<i>Desulfosarcina variabilis</i>	92	M34407
SP1	32	27.4	<i>Proteobacteria</i>	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Lysobacter</i> sp. G6	99	AB429529
SP42	1	0.9	<i>Proteobacteria</i>	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99	AB2944553
SP4	1	0.9	<i>Proteobacteria</i>	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas abietaniphila</i>	99	AJ011504
SP36	1	0.9	<i>Proteobacteria</i>	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas parafulva</i>	96	AB046999
SP44	1	0.9	<i>Proteobacteria</i>	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Cellvibrio gandavensis</i>	97	AJ289162
SP6	2	1.7	<i>Proteobacteria</i>	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio ordalii</i>	99	X74718
SP49	1	0.9	<i>Proteobacteria</i>	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	99	X76333
SP8	1	0.9	<i>Proteobacteria</i>	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Oceanospirillaceae</i>	<i>Marinomonas pontica</i>	98	AY539835
SP17	3	2.6	<i>Proteobacteria</i>	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Oceanospirillaceae</i>	<i>Marinomonas pontica</i>	97	AY539835
SP21	2	1.7	<i>Proteobacteria</i>	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Oceanospirillaceae</i>	<i>Thalassolituus oleivorans</i>	94	AM279755
SP10	7	6.0	<i>Proteobacteria</i>	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter hormaechei</i>	99	AJ853889
SP45	1	0.9	<i>Proteobacteria</i>	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Serratia proteamaculans</i>	99	AJ233434
SP14	6	5.1	<i>Proteobacteria</i>	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	99	AY823621
SP20	4	3.4	<i>Proteobacteria</i>	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Piscirickettsiaceae</i>	<i>Thiomicrospira crunogena</i>	96	CP000109

Tabla 31. (Continuación) Afiliación taxonómica de las OTUs obtenidas en la biblioteca de clones de la muestra del manantial salino SP

OTU	Número de clones SP	% de clones SP	Filo	Clase	Familia	Especie	% similitud	Número de acceso GenBank
SP34	1	0.9	<i>Proteobacteria</i>	γ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Chromatiaceae</i>	<i>Thiorhodococcus drewsii</i>	99	FM178273
SP58	1	0.9	<i>Proteobacteria</i>	γ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Aeromonadaceae</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	99	X74677
SP56	1	0.9	<i>Proteobacteria</i>	γ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Alteromonadaceae</i>	<i>Marinobacterium georgiense</i>	98	U58339
SP26	3	2.6	<i>Proteobacteria</i>	" ζ - <i>Proteobacteria</i> "	No clasificada	<i>Mariprofundus ferrooxydans</i>	99	EF493243
SP24	2	1.7	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	No clasificada	<i>Prolixibacter bellariivorans</i>	96	AY918928
SP25	1	0.9	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Cryomorpaceae</i>	<i>Owenweeksia hongkongensis</i>	85	AY682382
SP28	1	0.9	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Yeosuana aromativorans</i>	91	AY682382
SP64	1	0.9	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Cryomorpaceae</i>	<i>Owenweeksia hongkongensis</i>	87	AY682382
SP27	1	0.9	<i>Spirochaetes</i>	<i>Spirochaetes</i>	<i>Leptospiraceae</i>	<i>Leptospira noguchii</i>	92	FJ154588
SP30	1	0.9	<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteriaceae</i>	Clon QEDR2CC08	93	CU922156
SP9	1	0.9	<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteriaceae</i>	" <i>Koribacter versatilis</i> "	99	CP000360
SP53	1	0.9	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Nocardioideae</i>	<i>Aeromicrobium erythreum</i>	96	AF005021
SP52	1	0.9	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Opiritaceae</i>	<i>Opiritatus terrae</i>	89	CP001032
SP11	3	2.6	<i>Chlorobi</i>	<i>Chlorobia</i>	<i>Chlorobiaceae</i>	<i>Chlorobium limicola</i>	97	Y10645
SP22	1	0.9	<i>Chlorobi</i>	<i>Chlorobia</i>	<i>Chlorobiaceae</i>	<i>Chlorobaculum parvum</i>	99	CP001099
SP23	2	1.7	<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineae</i>	<i>Caldilineaceae</i>	<i>Levilinea sacchalolytica</i>	90	AB109439
SP19	1	0.9	<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineae</i>	<i>Caldilineaceae</i>	<i>Bellilinea caldifistulae</i>	82	AB243672
SP31	2	1.7	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	Familia IX	<i>Synechocystis</i> sp. MMG-7	98	FJ839358
SP57	1	0.9	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	Familia IV	<i>Oscillatoria</i> sp. 16S	98	AJ133106
SP46	1	0.9	No clasificada	No clasificada	No clasificada	División candidata OD1-04D2Z86	80	DQ397501
SP32	1	0.9	No clasificada	No clasificada	No clasificada	Clon Hg92B6	92	EU236391
SP33	1	0.9	No clasificada	No clasificada	No clasificada	Clon F1_05	91	EU236394
SP66	1	0.9	No clasificada	No clasificada	No clasificada	Clon AB16	93	AF275926

La segunda OTU, que presentó el mayor número de secuencias (32 secuencias de la biblioteca de clones del manantial SP), fue cercanamente relacionada con *Lysobacter* sp OC7 (99% de similitud). Las secuencias asociadas a esta OTU presentaron 100% de similitud con las reportadas en la biblioteca de clones del manantial SC y con las tres cepas aisladas en este manantial. Estos datos sugieren ubicuidad de los organismos del género *Lysobacter* en manantiales salinos terrestres ubicados en la Cordillera de los Andes Colombianos.

A la familia *Enterobacteriaceae* se asignaron dos OTUs (7% de las secuencias analizadas) cercanamente relacionadas con *Enterobacter hormaechei* (99% de similitud) (O'Hara *et al.*, 1989), reportado también en la biblioteca de clones del manantial SC y con *Serratia proteamaculans* (99% de similitud) un organismo que promueve el crecimiento vegetal (Paine & Stansfield, 1919; Sproer *et al.*, 1999), es posible que la presencia de estos organismos esté relacionada con procesos de escorrentía del suelo.

A la familia *Oceanospirillaceae* se asignaron tres OTUs (5.3% de las secuencias analizadas), dos OTUs se relacionaron con *Marinomonas pontica* con porcentajes de similitud del 97 y 98%, mientras que la tercera OTU fue distantemente relacionada con *Thalassolituus oleivorans* (94% de similitud). Estas tres OTUs fueron también reportadas en la biblioteca de clones del manantial SC, sugiriendo una amplia distribución en manantiales salinos. Los enriquecimientos realizados para muestras de agua del manantial SP no favorecieron el aislamiento de organismos de esta familia.

A la familia *Moraxellaceae* se asignó una OTU (5.3% de las secuencias analizadas) cercanamente relacionada con *Acinetobacter calcoaceticus* (99% de similitud), este organismo puede crecer como saprófito ubicuo en la naturaleza, debido a su gran versatilidad metabólica (Bouvet & Grimont, 1986), sin embargo, no se recuperó por los métodos dependientes de cultivo.

A la familia *Piscirickettsiaceae* se asignó una OTU (3.5% de las secuencias analizadas) relacionada con *Thiomicrospira crunogena* (96% de similitud). Las especies del género *Thiomicrospira* son quimiolitautotróficas que usan compuestos reducidos del azufre (sulfuro, tiosulfato y azufre elemental) como fuente de energía y CO₂ como fuente de carbono (Knittel *et al.*, 2005). Este género se diferencia de otros oxidadores de azufre

por su tolerancia a la salinidad y altas tasas de crecimiento (Tourova *et al.*, 2006). Se ha reportado su presencia en diferentes ambientes que incluyen chimeneas hidrotermales (Muyzer *et al.*, 1995; Brinkhoff *et al.*, 1999; Corre *et al.*, 2001; Inagaki *et al.*, 2003; Takai *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2005; Brazelton *et al.*, 2006), sedimentos marinos, lagunas hipersalinas y manantiales salinos (Brinkhoff & Muyzer, 1997; Knittel *et al.*, 2005). Debido a su metabolismo quimiolitotrófico los enriquecimientos realizados no favorecieron el aislamiento de organismos de este género.

A la familia *Pseudomonadaceae* se asignaron tres OTUs (2.6% de las secuencias analizadas), dos de las cuales estaban cercanamente relacionadas con *Pseudomonas abietaniphila* (99% de similitud) y con *Pseudomonas parafulva* (96% de similitud), las cuales también fueron encontradas en la biblioteca de clones del SC, sugiriendo que los organismos de este género hacen parte importante de la comunidad heterotrófica en los manantiales salinos estudiados. La tercera OTU fue cercanamente relacionada con *Cellvibrio gandavensis* (97% de similitud), un organismo aislado de suelo cuya principal característica es la capacidad para degradar celulosa (Mergaert *et al.*, 2003), su presencia en el manantial podría estar asociado a procesos de escorrentía.

A la familia *Vibrionaceae* se asignaron dos OTUs (2.6% de las secuencias analizadas) cercanamente relacionadas con *Vibrio ordalii* (99% de similitud) (Schiewe *et al.*, 1981) y *Vibrio vulnificus* (99% de similitud) (Farmer, 1980). Estas dos OTUs presentaron una similitud del 100% en su secuencia del 16S ARNr con las dos OTUs reportadas en el manantial SC, además, los enriquecimientos también favorecieron la recuperación en este manantial de un organismo cercanamente relacionado con *V. vulnificus*, cuya secuencia de 16S ARNr también presenta 100% de similitud con la OTU reportada, sugiriendo una amplia distribución de organismos del género *Vibrio* en los manantiales salinos estudiados.

A la familia *Chromatiaceae* se asignó una OTU (0.9% de las secuencias analizadas) cercanamente relacionada con *Thiorhodococcus drewsii* (99% de similitud), un organismo halotolerante, capaz de crecer fotolitotróficamente bajo condiciones anóxicas usando compuestos reducidos de azufre como donadores de electrones y CO₂ como única fuente de carbono. También presenta crecimiento mixotrófico creciendo en presencia de gran variedad de ácidos grasos volátiles, alcoholes, ácidos orgánicos y

péptidos y crecimiento fotoorganotrófico usando acetato como donador de electrones (Zaar *et al.*, 2003). Los organismos de este género han sido reportados en sedimentos de lagunas de cristalización, manantiales sulfurosos marinos y estuarios (Anil-Kumar *et al.*, 2007), sin embargo, en este estudio no fueron recuperados por los métodos dependientes de cultivo.

A la familia *Aeromonadaceae* se asignó una OTU (0.9% de las secuencias analizadas) cercanamente relacionada con *Aeromonas hydrophila* (99% de similitud). Las especies del género *Aeromonas* son bacterias quimioorganotróficas, habitantes comunes de ambientes acuáticos y han sido relacionados con enfermedades de peces (Martínez-Murcia *et al.*, 2009), a pesar de su carácter quimioorganotrófico no se aislaron organismos relacionados.

En la familia *Alteromonadaceae*, se encontró una OTU (0.9% de las secuencias analizadas) cercanamente relacionada con *Marinobacterium georgiense* (98% de similitud), un organismo halófilo, quimioorganotrófico reportado principalmente en ambientes marinos (Gonzalez *et al.*, 1996). En este estudio no se logró la recuperación por métodos dependientes de cultivo de organismos relacionados con esta familia.

Clase α -Proteobacteria

La clase α -Proteobacteria representa el segundo grupo más abundante del filo *Proteobacteria*, y según los recuentos obtenidos por FISH la abundancia de los organismos de esta clase osciló entre 1.1 y 3.2 x 10⁵ células.mL⁻¹.

Las secuencias relacionadas con la clase α -Proteobacteria fueron agrupadas en seis OTUs (12.8% de las OTUs), relacionadas con las familias *Methylobacteriaceae*, *Methylocystaceae*, *Rhodospirillaceae*, *Rhodobacteriaceae* y *Caulobacteriaceae*.

A la familia *Methylobacteriaceae* fueron asignadas dos OTUs (2.6% de las secuencias analizadas) cercanamente relacionadas con *Methylobacterium extorquens* (99% de similitud) y *Methylobacterium aquaticum* (99% de similitud) (Gallego *et al.* 2005). El género *Methylobacterium* ha sido reportado en una amplia variedad de hábitats naturales, incluyendo suelo, polvo, aire, agua y sedimentos acuáticos (Hiraishi *et al.*, 1995; Trotsenko *et al.*, 2001; Ultee *et al.*, 2004). Los organismos de este género se

caracterizan por ser aerobios estrictos, metilotróficos facultativos, resistentes a altas concentraciones de cloro (Hiraishi *et al.*, 1995; Gallego *et al.* 2005).

A la familia *Methylocystaceae* se asignó una OTU (3.5% de las secuencias analizadas) cercanamente relacionada con *Terasakiella pusilla* (97% de similitud) (Satomi *et al.*, 1998), esta OTU presentó 100% de similitud en su secuencia de 16S ARNr con la OTU reportada en la biblioteca de clones del manantial SC, lo cual sugiere una amplia distribución de organismos de este género en los manantiales salinos.

A la familia *Rhodospirillaceae* se asignó una OTU (0.9% de las secuencias) cercanamente relacionada con *Thalassospira xianhensis* (98% de similitud), esta OTU presentó 100% de similitud en su secuencia de 16S ARNr con una de las OTUs reportada en la biblioteca de clones del manantial SC, sugiriendo amplia distribución de organismos de este género en manantiales salinos terrestres en Colombia. Sin embargo, los enriquecimientos realizados con agua del manantial SP no favorecieron la recuperación de organismos de este género, lo cual sí ocurrió con los enriquecimientos realizados con agua del manantial SC.

A la familia *Rhodobacteriaceae* se asignó una OTU (0.9% de las secuencias) relacionada con *Phaeobacter daeponensis* (95% de similitud) un organismo quimioheterotrófico, halófilo, aislado de sedimentos marinos en el mar Yellow en Corea (Yoon *et al.*, 2007c).

Clase β -Proteobacteria

La clase β -Proteobacteria fue el tercer grupo más abundante del filo *Proteobacteria*, los recuentos realizados mostraron que su abundancia oscila entre 7.0×10^4 a 1.0×10^5 células.mL⁻¹. Las secuencias relacionadas con esta clase fueron agrupadas en dos OTUs (4.3% del total de OTUs) relacionadas con las familias *Gallionellaceae* y *Neisseriaceae*.

A la familia *Gallionellaceae* se asignó una OTU (6.1% de las secuencias) distantemente relacionada con "*Sideroxydans paludicola*" (95% de similitud), esta OTU presentó 100% de similitud en su secuencia de 16S ARNr con la reportada en el manantial SC. Estos resultados indican que en los dos manantiales se podría estar generando

condiciones anaerobias o microaerófilas que favorecen la oxidación de Fe^{2+} a pH neutro.

A la familia *Neisseriaceae* se asignó una OTU (0.9% de las secuencias) relacionada con *Insolitispirillum peregrinum* (96% de similitud), este organismo es la única especie del género y fue aislada de restos de pescado en descomposición (Yoon *et al.*, 2007b). Usualmente los miembros de esta familia han sido asociados con la generación enfermedades en humanos, pero poco se conoce sobre su importancia ambiental.

Clase δ -Proteobacteria

Las secuencias relacionadas a la clase δ -Proteobacteria fueron agrupadas en dos OTUs (4.3% de las OTUs). Una de las OTUs presentó un 92% de similitud con *Desulfosarcina variabilis* y 100% de similitud con la OTU SC7 reportada en el manantial SC. La segunda OTU presentó 95% de similitud con *Desulfosarcina ovata*. Los organismos del género *Desulfosarcina* han sido reportados en estudios de la composición de la comunidad microbiana en aguas subterráneas y marinas (Alfreider *et al.*, 2002; Purdy *et al.*, 2003). Aunque en este estudio no se logró el aislamiento de organismos de esta familia, sí se logró el aislamiento de otro organismo sulfato reductor del género *Desulfovibrio*, lo cual sugiere que en este manantial, los procesos de mineralización de materia orgánica en condiciones anaerobias pueden estar asociados a la reducción disimilatoria de sulfato.

Clase ζ -Proteobacteria

Las secuencias relacionadas a la clase ζ -Proteobacteria fueron agrupadas en una OTU (2.6% de las OTUs) cercanamente relacionada con “*Mariprofundus ferrooxydans*” (99% de similitud), un organismo detectado en ambientes marinos que se caracteriza por crecer quimiolitotóticamente a partir de la oxidación de Fe^{2+} a pH neutro (Emerson *et al.*, 2007; Davis & Moyer, 2008; Santelli *et al.*, 2008; Kato *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta que también en la clase β -Proteobacteria se obtuvo una OTU implicada en la oxidación de Fe^{2+} a pH neutro, es posible sugerir que este puede ser un proceso importante en el manantial SP.

Filo *Bacteroidetes*

El filo *Bacteroidetes* comprende el segundo filo más abundante de la comunidad bacteriana en el manantial SP, tal como se observó en la biblioteca de clones del manantial SC.

A este filo se asignaron cuatro OTUs (8.5% de las OTUs). Una de las OTUs (1.75% de las secuencias) se relacionó con *Prolixibacter bellariivorans* (96% de similitud) un organismo anaerobio facultativo, heterotrófico aislado de sedimentos marinos (Holmes *et al.*, 2007), que también fue recuperado en este estudio mediante las técnicas dependientes cultivo a partir de muestras de agua del manantial SC y LC. La segunda OTU (0.9% de las secuencias) fue distantemente relacionada con *Yeosuana aromativorans* (91% de similitud), un organismo aislado de sedimentos de estuarios en Corea, degradador de compuesto aromáticos (Kwon *et al.*, 2006). Las otras dos OTUs (0.9% de las secuencias) presentaron un porcentaje de similitud del 85 y 87% con *Owenweeksia hongkongensis*, un organismo aislado de agua marina en China, que se caracteriza por ser un organismos pigmentado no fermentativo (Lau *et al.*, 2005).

Filo *Spirochaetes*

Al filo *Spirochaetes* se asignó una OTU (2.1% de las OTUs) de la familia *Leptospiraceae*, distantemente relacionada con *Leptospira noguchii* (92% de similitud). Los organismos de la familia *Leptospiraceae* se caracterizan por utilizar ácidos grasos y alcoholes de cadena larga como fuente de carbono y energía (Yasuda *et al.*, 1987). En este estudio no se logró el aislamiento de organismos de este grupo.

Filo *Acidobacteria*

Al filo *Acidobacteria* se asignaron dos OTUs (4.3% de las OTUs) pertenecientes a la familia *Acidobacteriaceae* y relacionadas con “*Koribacter versatilis*” (99% de similitud), el cual también fue reportado en el manantial SC. La segunda OTU presentó un porcentaje de similitud del 93% con el clon QEDR2CCO8 reportado en un estudio de la comunidad microbiana del lodo de un digestor anaerobio (Riviere *et al.*, 2009).

Filo *Actinobacteria*

Al filo *Actinobacteria* se asignó una OTU (2.1% de las OTUs) relacionada con la familia *Nocardiaceae*, que presentó una similitud del 96% con *Aeromicrobium erythreu* un organismo productor de eritromicina (Miller *et al.*, 1991). El filo *Actinobacteria* comprende principalmente organismos saprofitos que participan en la degradación de sustratos complejos como la quitina, pectina, queratina, hemicelulosa y lignina. Los organismos de este filo han sido ampliamente reportados en suelo y en ambientes marinos (Du *et al.*, 2006). En este estudio se aisló una cepa del filo *Actinobacteria*, relacionada con el género *Cellulomonas* en el manantial SC pero no en SP.

Filo *Verrucomicrobia*

Al filo *Verrucomicrobia* se asignó una OTU (2.1% de las OTUs) de la familia *Opitutaceae*, distantemente relacionada con *Opitutus terrae* (89% de similitud) aislado de suelo, este organismo es un coco, anaerobio obligado, que utiliza polisacáridos, pero no alcoholes, aminoácidos ni ácidos orgánicos para crecer (Chin *et al.*, 2001).

Filo *Chlorobi*

Al filo *Chlorobi* se asignaron dos OTUs (4.3% de las OTUs), una de ellas presentó 99% de similitud con *Chlorobium limicola* un organismo también detectado en la biblioteca de clones del manantial SC. La otra OTU presentó un porcentaje de similitud del 99% con *Chlorobaculum parvum*. Estos organismos realizan fotosíntesis anoxigénica a partir de la oxidación de compuestos reducidos de azufre y fijación de CO₂.

Filo *Chloroflexi*

Al filo *Chloroflexi* se asignaron dos OTUs (4.3% de las OTUs) relacionadas con *Levilinea sacchalolytica* (90% de similitud) un organismo anaerobio, mesofílico, sacarolítico, aislado del lodo de un reactor anaerobio (Yamada *et al.*, 2006) y con *Bellilinea caldifistulae* (82% de similitud) también reportada en la biblioteca de clones del SC.

Filo *Cyanobacteria*

Al filo *Cyanobacteria* se asignaron dos OTUs (4.3% de las secuencias) cercanamente relacionadas con *Oscillatoria* sp (98% de similitud) reportado en lagos eutróficos y con *Synechocystis* sp un organismo reportado en agua dulce con la capacidad de crecer tanto fototróficamente como heterotróficamente en ausencia de luz (Kucho *et al.*, 2005). Los organismos relacionados con estos géneros han sido previamente reportados en ambientes salinos del desierto de Atacama (Dorador *et al.*, 2008).

Secuencias no clasificadas

Se encontraron cuatro OTUs (3.4% de las secuencias) que no fue posible asignar a grupos taxonómicos conocidos. La OTU SP46 presentó un porcentaje de similitud de 80% con un clon de la división candidata OD1 reportado en el estudio de la composición microbiana en un tapete microbiano hipersalino en Guerrero Negro (Ley *et al.*, 2006), la OTU SP66 presentó un 93% de similitud con un organismo no cultivado reportado en un digestor anaerobio (Delbès *et al.*, 2000), la OTU SP32 fue distantemente relacionada con el clon Hg92B6 (92% de similitud) obtenido en el estudio de organismos simbioses de la esponja *Haliclona gellius* (Sipkema *et al.*, 2009) y la OTU SP33 fue distantemente relacionada con el clon F1-05 (91% de similitud) reportado en el estudio de enfermedades de corales del Caribe (Sekar *et al.*, 2008).

5.6.1.3 Comparación filogenéticas de los taxones obtenidos por clonación

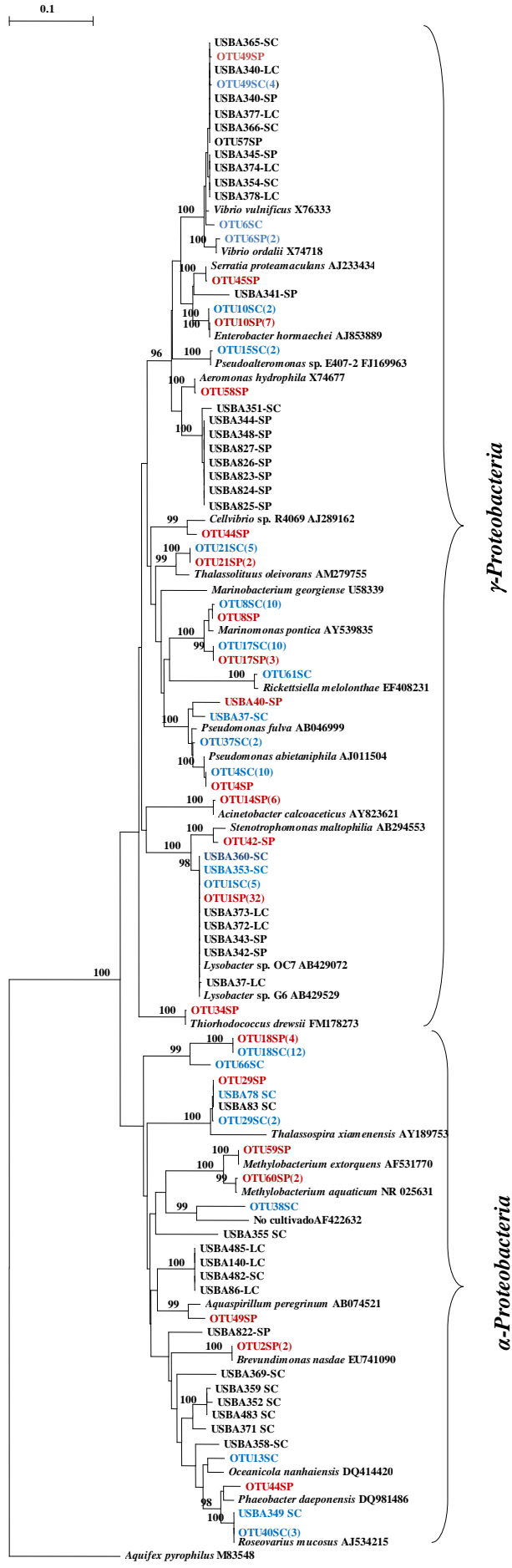
La comparación filogenética de todas las secuencias obtenidas por clonación se realizó utilizando el algoritmo UniFrac el cual comparó el grado total de divergencia filogenética entre las secuencias del manantial SC y las del manantial SP, revelando diferencias altamente significativas ($p = 0.01$ a un nivel de confianza del 95%) entre los dos grupos de secuencias. Es de resaltar que cuándo se realizó la comparación filogenética a nivel de OTUs agrupadas al 97% de similitud, no se detectó diferencias significativas entre los dos manantiales, lo cual indica una alta variabilidad intraespecífica al interior de cada OTU.

La diferencia en la composición de la comunidad bacteriana revelada por Unifrac fue confirmada por el análisis filogenético de las OTUs, que mostró que los dos manantiales

difieren con respecto al número de OTUs y el número de ramas que representan diferentes grupos taxonómicos (Figura 38).

La mayor divergencia podría estar relacionada con las OTUs representadas por solo una secuencia del 16S ARNr (17 para SC y 31 para SP), que hacen parte de los grupos β y δ -*Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobiae* y *Acidobacteria* y que a su vez contienen el mayor número de secuencias que no fue posible relacionar con organismos previamente cultivados, como se observa en el árbol filogenético (Figura 38), sugiriendo que cada uno de estos manantiales alberga una diversidad microbiana única.

Los manantiales no solo difieren en la composición de su comunidad microbiana, también albergan nueva diversidad biológica, ya que en el manantial SC y en el manantial SP, el 50% y el 47% de las OTUs, respectivamente, presentaron menos del 97% de similitud con organismos previamente aislados, sugiriendo que estos manantiales son un importante reservorio de nuevas especies lo que se confirma con el aislamiento y caracterización taxonómicas de las nuevas especies microbianas obtenidas en este estudio.



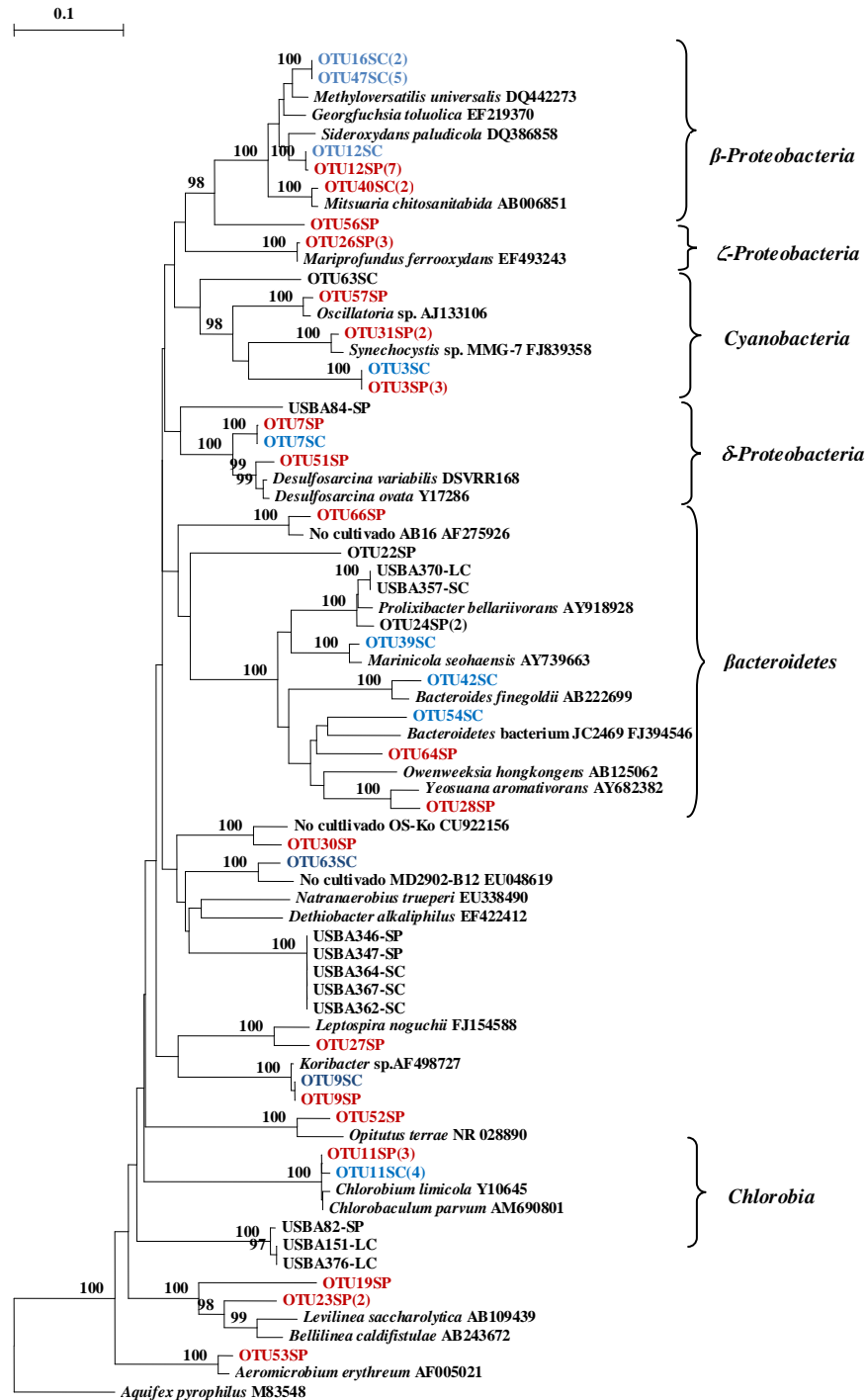


Figura 38. Relación filogenética de las OTUs obtenidas en la biblioteca de clones del manantial SC (OTU SC), SP (OTU SP) y las cepas aisladas. El árbol fue inferido usando el algoritmo de neighbor-joining y 402 posiciones homólogas de las secuencias de microorganismos o clones. Los números en los nodos corresponden a valores de *bootstrap* (porcentaje) basado en 1000 réplicas. La barra de escala indica el número estimado de cambios de bases en la secuencia de nucleótidos. El número de secuencias relacionadas con cada OTU se indica entre paréntesis.

5.6.2 Distribución taxonómica de las secuencias obtenidas por pirosecuenciación de la región V5 y V6 del gen que codifica para el 16S ARNr en manantial LC

Para el manantial LC se obtuvieron 6082 secuencias (~240 pb) de las cuales se eliminaron 1008 secuencias después de filtrar las secuencias de mala calidad. El análisis de las 5704 secuencias que pasaron el filtro de calidad generó una cobertura del 93% según el análisis obtenido con el estimador paramétrico de Good. Además de la alta cobertura obtenida, las curvas de rarefacción muestran que agrupando las secuencias a una distancia genética de 0.2 se logra llegar a la asíntota, y cuando se agrupan a una distancia de 0.05 y 0.03 hay una fuerte aproximación a ésta (Figura 39), sugiriendo que el análisis de las secuencias permitirá generar una descripción confiable de la composición de la comunidad bacteriana en el manantial LC.

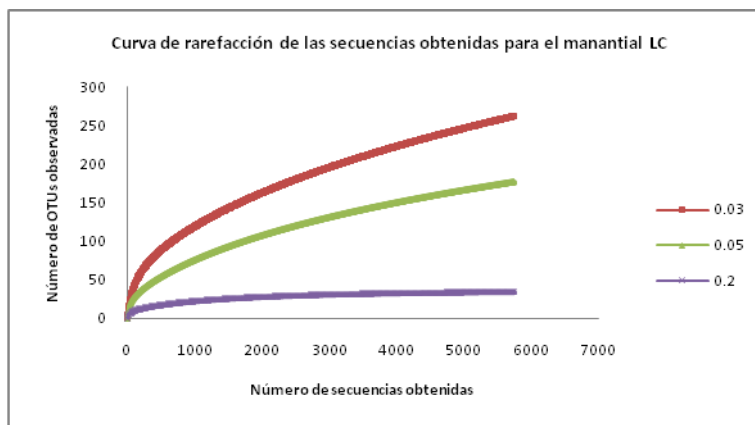


Figura 39. Curva de rarefacción para las secuencias obtenidas en la muestra de La Cristalina. Las series indican la distancia.

5.6.2.1 Asignación taxonómica de OTUs obtenidas en la muestra del manantial LC

Las secuencias fueron clasificadas en los filas *Proteobacteria* (98.5% del total de secuencias), *Bacteroidetes* (0.12%), *Deinococcus* (0.03%), *Plantomycetes* (0.03%), *Actinobacteria* (0.01%), *Cyanobacteria* (0.1%) y secuencias no clasificadas (1.1%).

Filo *Proteobacteria*

En el filo *Proteobacteria* que representa el mayor número de secuencias obtenidas, se encontraron secuencias relacionadas con las clases γ -*Proteobacteria* (72%), α -

Proteobacteria (25%) y en menor cantidad δ -*Proteobacteria* (0.1%) y β -*Proteobacteria* (0.09%) (Figura 40).

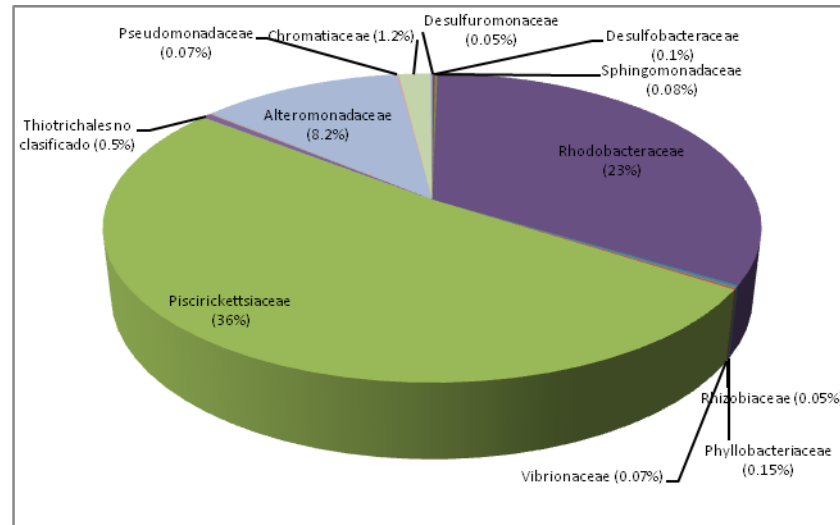


Figura 40. Distribución de familias del Filo *Proteobacteria* (γ -*Proteobacteria*, α -*Proteobacteria*, β -*Proteobacteria* y δ -*Proteobacteria*) encontradas por pirosecuenciación de las regiones V5 y V6 del gen que codifica para el 16S ARNr para la muestra del manantial salino LC. En paréntesis se encuentra el porcentaje que representa cada familia (N=5704).

Clase γ -*Proteobacteria*

La clase γ -*Proteobacteria* estuvo representada por secuencias de las familias *Piscirickettsiaceae* (36%), *Alteromonadaceae* (8.2%), *Chromatiaceae* (1.2%), *Vibronaceae* (0.07%), *Pseudomonadaceae* (0.07%), *Oceanospirillaceae* (0.05%), *Xanthomonadaceae* (0.03%) y *Shewanellaceae* (0.01%) (Figura 39).

De la familia *Piscirickettsiaceae* que comprende el mayor número de secuencias obtenidas, solamente el 0.03% de las secuencias se relacionan con el género *Thiomicrospira*, las otras secuencias corresponden a secuencias no clasificadas dentro de la familia *Piscirickettsiaceae*. Esta familia integra seis géneros, *Cycloclasticus*, *Hydrogenovibrio*, *Methylophaga*, *Piscirickettsia*, *Thioalkalimicrobium*, *Sulfurivirga* y *Thiomicrospira*, que se caracterizan por ser quimiolitotróficos oxidadores de azufre, oxidadores de hidrógeno y metilotróficos. Los organismos de ésta familia han sido principalmente reportados en ambientes marinos (Janvier *et al.*, 1985; Nishihara *et al.*, 1991; Dyksterhouse *et al.*, 1995; Knittel *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007), lagos de soda

salinos (Doronina *et al.*, 2003; Sorokin *et al.*, 2001; Sorokin *et al.*, 2002) y lagos hipersalinos (Sorokin *et al.*, 2006).

En la familia *Alteromonadaceae* se encontraron secuencias relacionadas con el género *Marinobacter* (8.2% secuencias), a este género pertenecen organismos Gram-negativos, aerobios, halófilos moderados, quimiorganotróficos con la capacidad de usar una amplia variedad de compuestos hidrocarbonados como fuente de carbono y energía, y han sido reportados en agua y sedimentos marinos (Gorshkova *et al.*, 2003; Romanenko *et al.*, 2005; Antunes *et al.*, 2007; Roh *et al.*, 2008;), suelo salino (Gu *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2003), manantiales salinos polares (Perreault *et al.*, 2008), manantiales termales costeros (Shieh *et al.*, 2003), pozos productores de petróleo (Huu *et al.*, 1999) y cultivos de dinoflagelados (Green *et al.*, 2006).

La familia *Chromatiaceae*, estuvo representada por los géneros *Marichromatium* (0.16% de las secuencias) y *Rheinheimera* (0.03% de las secuencias), una característica de todos los géneros de esta familia es que usan sulfuro de hidrógeno o azufre elemental como donador de electrones.

La familia *Shewanellaceae* comprende el género *Shewanella* reportado principalmente en ambientes acuáticos. Los organismos de este género son anaerobios facultativos, quimioorganotróficos, que reducen óxido de manganeso, óxido de hierro, $S_2O_3^-$, S^0 y NO_3^- (Bozal *et al.*, 2002). Algunos organismos de este género fueron aislados del manantial SP pero no de LC.

Además, de las familias microbianas mencionadas, un pequeño porcentaje de secuencias (<0.1%) se relacionaron con las familias *Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Xanthomonadaceae* y *Oceanospirillaceae*. Algunos microorganismos relacionados con la familia *Vibrionaceae* también fueron aislados de LC.

Clase α -Proteobacteria

La clase α -Proteobacteria estuvo representada por secuencias de las familias *Rhodobacteriaceae* (23%), *Phyllobacteriaceae* (0.15%), *Sphingomonadaceae* (0.08%), *Rhizobiaceae* (0.05%) y *Aurantimonadaceae* (0.01%) (Figura 39).

La mayoría de secuencias (23% de las secuencias) de la familia *Rhodobacteriaceae* se relacionaron con organismos no cultivados, solamente el 0.2% de las secuencias se relacionaron con organismos del género *Oceanicaulis*. La familia *Rhodobacteriaceae* es fenotípica, metabólica y ecológicamente diversa, incluye fotoheterótrofos que también pueden crecer fotoautotróficamente o quimiotróficamente dependiendo de las condiciones ambientales, quimioorganotróficos con metabolismo aerobio o anaerobio facultativo, organismos fermentativos facultativos y metilotróficos facultativos. Usualmente los miembros de esta familia han sido reportados en ambientes acuáticos y muchos requieren de NaCl para crecer (Garrity *et al.*, 2005).

Clase δ -Proteobacteria

La clase δ -Proteobacteria estuvo representada por secuencias relacionadas con las familias *Desulfuromonadaceae* y *Desulfobacteraceae*. La familia *Desulfuromonadaceae* incluye organismos aislados principalmente de sedimentos marinos y de agua dulce y se caracterizan por la capacidad para oxidar acetato hasta CO₂ mediante la reducción de Fe³⁺ y S⁰ (Roden & Lovley 1993). Por su parte, la familia *Desulfobacteraceae* incluye organismos anaerobios que obtienen energía a partir de la reducción de SO₄²⁻.

Clase β -Proteobacteria

La clase β -Proteobacteria estuvo representada por secuencias relacionadas con la familia *Nitrosomonadaceae*, compuesta principalmente de bacterias litoautotróficas como oxidadoras de amonio, con la familia *Rhodocyclaceae* compuesta principalmente por organismos denitrificantes con gran versatilidad metabólica, que habitan ambientes acuáticos y preferiblemente oligotróficos y con la familia *Comamonadaceae* compuesta de bacterias quimioorganotróficas o quimiolitotróficas oxidadoras de H₂ o CO (Willems *et al.*, 1991).

Otros grupos microbianos

Además de los grupos mencionados anteriormente, menos del 0.2% de las secuencias analizadas, se relacionaron con los filas *Cyanobacteria*, *Plantomycetes*, *Deinococcus-Thermus*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* (Figura 41).

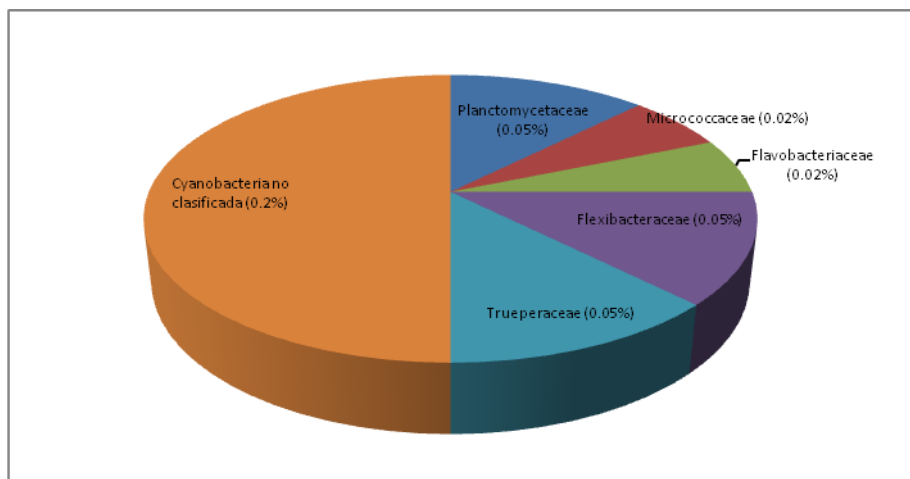


Figura 41. Distribución de familias de los Fila *Cyanobacteria*, *Planctomycetes*, *Deinococcus-Thermus*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* encontradas por pirosecuenciación de las regiones V5 y V6 del gen que codifica para el 16S ARNr para la muestra del manantial salino La Cristalina. En paréntesis se encuentra el porcentaje que representa cada familia (N=5704).

Filo *Cyanobacteria*

A este filo se asignaron el 0.2% de las secuencias. La presencia de *Cyanobacterias* también se observó por microscopia de fluorescencia.

Filo *Planctomycetes*

Las secuencias (0.05% de las secuencias) asignadas a este filo se relacionaron con la familia *Planctomycetaceae*, este es un grupo que se diferencia de otros grupos del dominio *Bacteria* por la ausencia de peptidoglicano en la pared celular y se caracteriza por formar apéndices. Los organismos de este grupo son quimioorganotróficos y se ha reconocido su importancia en la oxidación aerobia de amonio en ambientes marinos (Mohamed *et al.*, 2010).

Filo *Deinococcus-Thermus*

A este filo se asignaron secuencias (0.05% de las secuencias) relacionadas con la familia *Trueperaceae*, algunos organismos de esta familia han sido aislados de manantiales termales, se caracterizan por ser quimioorganotróficos aerobios con la capacidad para resistir radiación iónica (Albuquerque *et al.*, 2006).

Filo *Actinobacteria*

Las secuencias (0.02% de las secuencias) asignadas a este filo fueron relacionadas con la familia *Micrococcaceae*, esta familia incluye bacterias Gram-positivas aerobias, las cuales han sido principalmente reportadas en suelos (Chen *et al.*, 2009).

Filo *Bacteroidetes*

A este filo se asignaron secuencias (0.02% de las secuencias) relacionadas con la familia *Flavobacteriaceae*, los organismos de esta familia pueden ser anaerobios facultativos o aerobios estrictos, quimioheterotróficos, muchos de los cuales han sido aislados principalmente de ambientes salinos (Hwang *et al.*, 2009).

En general, la comunidad bacteriana en el manantial LC es dominada por organismos de las clases γ y α -*Proteobacteria*. Las secuencias asociadas con la clase γ -*Proteobacteria* se relacionaron con géneros microbianos quimiolitautotróficos oxidadores de azufre, reportados principalmente en ambientes marinos. Mientras que las secuencias asociadas con la clase α -*Proteobacteria* se relacionaron con grupos de organismos fotoheterótrofos y fotoautotróficos. Además, muchas de las secuencias no se relacionaron con géneros microbianos previamente reportados, lo cual indica la gran diversidad biológica que aún falta por conocer.

Un aspecto interesante es que los datos obtenidos por pirosecuenciación refuerzan la observación realizada mediante los aislamientos, en el sentido de que predominan grupos microbianos comúnmente reportados en ambientes salinos y no alcalinos. Estos resultados son contrastantes con respecto a resultados obtenidos en lagos salinos y alcalinos en los cuales hay predominio de organismos Gram-positivos de bajo contenido G+C (Humayoun *et al.*, 2003; Mesbah *et al.*, 2007).

5.6.3 Generalidades sobre la composición de las comunidades bacterias en los tres manantiales basados en el análisis de las secuencias del 16S ARNr

La composición microbiana de los tres manantiales fue dominada por organismos del filo *Proteobacteria* de las clases γ -*Proteobacteria* (53.3% en el manantial SC, 72% en LC y 36% en el manantial SP) y α -*Proteobacteria* (19% en el manantial SC, 25% en LC y 13% en el manantial SP). Estos resultados coinciden con los reportes de estudios de

aguas marinas (Kaartokallio *et al.*, 2005), pero difieren de los reportados en ambientes salinos terrestres como manantiales perennes, moderadamente salinos del Ártico Canadiense en los cuales se ha reportado predominio de γ -*Proteobacteria* y δ -*Proteobacteria* (Perreault, *et al.*, 2007) y lagos hipersalinos en los cuales predomina el filo *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes* (Demergasso *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2006).

La composición microbiana de los manantiales SC y LC estuvo en su mayoría dominada por organismos halófilos reportados principalmente en ambientes marinos. Por el contrario, la composición microbiana del manantial SP fue bastante heterogénea y relacionada con organismos de agua dulce, halotolerantes y halófilos de sedimentos de lagunas de cristalización, manantiales sulfurosos marinos y estuarios, agua dulce y suelo.

Por otra parte, el análisis taxonómico de las OTUs permitió inferir que la comunidad bacteriana en los tres manantiales está compuesta por organismos fotoautotróficos aerobios y anoxigénicos, organismos heterotróficos y organismos quimiolitototróficos relacionados con la oxidación de compuestos reducidos de azufre y de hierro.

Los organismos fotoautotróficos aerobios como las cianobacterias fueron encontrados en los manantiales LC y SP pero no en la biblioteca de clones del manantial SC, lo cual coincide con las observaciones microscópicas. Mientras que organismos fotoautotróficos anoxigénicos como los del grupo GSB fueron encontrados en los manantiales SC y SP pero no en LC. Se ha detectado que estas poblaciones microbianas de organismos fototróficos pueden influenciar tanto la actividad como la composición de las comunidades microbianas acuáticas mediante la incorporación al sistema de materia orgánica asimilable por las poblaciones heterotróficas.

A excepción del manantial LC, en el cual se encontró predominio de organismos quimiolitototróficos, en los manantiales SC y SP predominaron grupos bacterianos heterotróficos principalmente de los filo *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*. En este estudio se logró el aislamiento de un gran número de organismos relacionados con los grupos predominantes, tal es el caso de las cepas USBA 85, USBA 353, USBA 342 y USBA 343 relacionadas con el género *Lysobacter* (99% de similitud), el cual representó el 27%

de las secuencias obtenidas en el manantial SP, además se aislaron las cepas USBA 340, USBA 345, USBA 354, USBA 356, USBA 360, USBA 365 y USBA 366 relacionadas con el género *Vibrio* (98% de similitud), que también fue abundante en las dos bibliotecas de clones. Así mismo, se aislaron otros organismos detectados en la biblioteca de clones del manantial SC como las cepas USBA 38, USB 40, USBA 484 relacionadas con *Pseudomonas* sp (99% de similitud), las cepas USBA 78 y USBA 83 relacionadas con *Thalassospira* sp (98%), la cepa USBA 349 relacionada con *Roseovarius* sp (99% de similitud), la cepa USBA 357 relacionada con *Prolixibacter* sp (98% de similitud) y las cepas USBA 358 y USBA 363 relacionadas con *Thioclava* sp (98% de similitud), la información obtenida de la caracterización fenotípica de estos organismos permitió detectar propiedades ecofisiológicas que no habían sido descritas previamente, como la capacidad de fijación de nitrógeno de los organismos del género *Lysobacter* o los diferentes rangos de tolerancia a la sal, lo cual a su vez permitió definir que las comunidades microbianas son principalmente halotolerantes y no halófilas.

Una característica única de la comunidad heterotrófica del manantial SC, es el gran número OTUs relacionadas con bacterias AAP de la clase α -*Proteobacteria*, estos organismos presentan un metabolismo mixto, y por tanto, no están tan condicionados por los ciclos diurnos de intensidad luminosa, estratificación, profundidad o la longitud de onda de la radiación. Se ha reportado que la capacidad de combinar respiración y captación de luz los convierte en microorganismos eficientes, adaptados para aprovechar las escasas fuentes de carbono que se hallan disueltas en el medio marino, sugiriendo que la capacidad fotoheterotrófica de estos organismos, presenta una ventaja sobre organismos heterotróficos estrictos en condiciones de limitación de nutrientes (Kolber *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2009).

Otra característica interesante en los tres manantiales está relacionada con la detección de OTUs de la clase δ -*Proteobacteria* sin filiación con organismos cultivados indicando que aún queda mucho por conocer sobre los organismos de esta clase.

Por otra parte, la comunidad bacteriana dominante del manantial LC se relacionó con microorganismos quimiolitotróficos de la familia *Piscirickettsiaceae* y del género *Thiomicrospira*, que participan en la oxidación de compuestos reducidos de azufre. Algunas OTUs relacionadas con los géneros *Thiomicrospira* y *Sulfurimonas*, también se

encontraron en las bibliotecas de clones de los manantiales SC y SP. Reportes previos han señalado que estos géneros están típicamente distribuidos en ambientes donde el metabolismo relacionado con el azufre es un proceso primario de energía (Knittel *et al.*, 2005; Takai *et al.*, 2006, Hirayama *et al.*, 2007; Perreault *et al.*, 2007; Niederberger *et al.*, 2009).

De otro lado, la comunidad quimiolitotrófica del manantial SP fue dominada por organismos oxidadores de Fe^{2+} a pH neutro, relacionadas con los géneros “*Sideroxydans*” y “*Mariprofundus*” (Emerson & Moyer, 1997; Emerson *et al.*, 2007). Se ha descrito que los potenciales ambientes que soportan la oxidación aerobia de Fe^{2+} a pH neutro son chimeneas hidrotermales, profundidades oceánicas, cuevas, sedimentos asociados con rizósfera y aguas subterráneas con altas concentraciones de sulfato de calcio (Weber *et al.*, 2006), similares a las reportadas en este manantial.

La información generada por los métodos dependientes e independientes de cultivo es consistente y permite generar una visión global de los procesos metabólicos que predominan en los manantiales estudiados. Además, revela que estos ambientes son hábitats de diversidad biológica autóctona.

5.6.4 Determinación de variaciones espaciales y temporales de las comunidades bacterianas dominantes de los manantiales salinos

Con el fin de determinar variaciones espaciales y temporales en la composición de la comunidad microbiana, se han usado diferentes métodos moleculares que incluyen técnicas de huella genética como el DGGE. Esta técnica permite comparar niveles relativos de diversidad entre muestras, mediante la observación del número de bandas y abundancia de OTUs, y ha sido utilizada como una alternativa relativamente simple para caracterizar comunidades microbianas en una gran variedad de ambientes (Llirós *et al.*, 2010; Adams *et al.*, 2010; Gugkiandolo *et al.*, 2011).

En este estudio, mediante el uso de la técnica de DGGE se evaluaron diferencias espaciales y temporales en la composición de las comunidades bacterianas de los manantiales salinos SC, LC y SP, durante tres épocas de muestreo (muestreo 1, 2 y 3), correspondientes a los meses de Marzo de 2008 (época lluviosa), Agosto de 2008 (época seca) y Mayo de 2009 (época lluviosa) para los manantiales SC y LC y a los

meses de Junio de 2006 (época seca), Enero de 2007 (época seca) y Junio de 2009 (época seca) para el manantial SP, cada una de las muestras fue trabajada por duplicado (Figura 42).

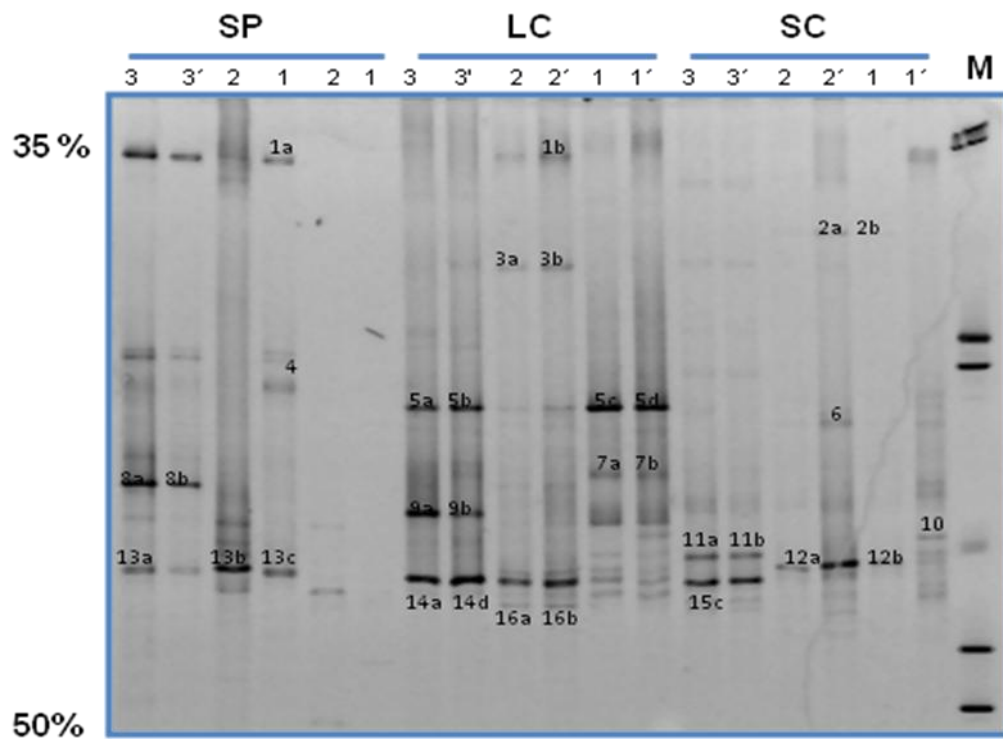


Figura 42. Patrón de bandas del dominio *Bacteria* de los manantiales salinos SC, LC y SP durante tres épocas de muestreo (1, 2, 3) evaluadas por duplicado. El gradiente denaturante es mostrado al lado izquierdo del gel. Los números indican las bandas cortadas.

Mediante el análisis del patrón de bandas, se buscó establecer si las comunidades microbianas presentan algún tipo de estructura espacial y/o temporal. Para ello se realizó un análisis de agrupamiento y un Análisis de Correspondencia (ACO).

El análisis de agrupamiento se realizó utilizando el índice de asociación de Raup-Crick (Figura 43), el dendrograma muestra tres grupos, los cuales asocian de manera independiente las muestras de cada uno de los manantiales estudiados.

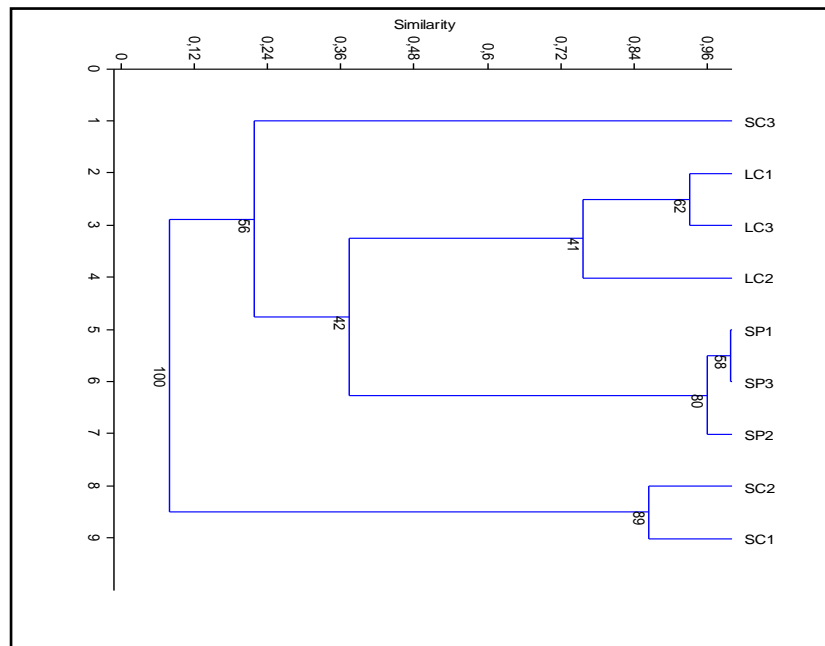


Figura 43. Dendrograma que representa la similitud entre la composición de organismos del dominio *Bacteria* en los manantiales SC, LC y SP en tres épocas de muestreo (1, 2 y 3), usando una matriz de ausencia-presencia y el índice de asociación de Raup-Crick. El dendrograma fue inferido con el algoritmo UPGMA. Los valores de 1000 *bootstraps* (en porcentaje) son reportados en los nodos.

El primer grupo incluye las muestras obtenidas en el manantial LC, en este grupo se observó una similitud superior al 84% entre las muestras LC1 y LC3, tomadas durante época de lluvia, y una similitud del 72% entre el grupo formado por LC1 y LC3 y la muestra LC2, tomada en época de sequía.

El segundo grupo asocia el patrón de bandas de los tres muestreos del manantial SP, las tres muestras fueron tomadas durante época de sequía y presentaron un porcentaje de similitud superior al 84% entre ellas.

El tercer grupo asocia la muestra SC1, tomada en época de lluvia, y SC2, tomada en época de sequía, estas dos muestras presentan aproximadamente un 75% de similitud entre ellas y un porcentaje de similitud menor al 24% con la muestra SC3, tomada en época de lluvia. La disimilitud observada entre el grupo formado por las muestras SC1 y SC2 con respecto a la muestra SC3, podría estar relacionada con cambios en la

vegetación que rodeaba el manantial durante ese muestreo, tal como se mencionó anteriormente. La vegetación podría tener un fuerte impacto en la composición de la comunidad microbiana mediante la incorporación al sistema de materia orgánica proveniente de los exudados de las raíces, de la descomposición de hojas y de la infiltración del agua a través del perfil orgánico del suelo (Bunte & Simon, 1999), lo cual puede alterar la composición de la comunidad microbiana.

Las diferencias entre el patrón de bandas de cada manantial se corroboró con la prueba ANOSIM la cual mostró diferencias significativas entre los tres manantiales ($R = 0.9$; $P = 0.003$), indicando que las comunidades bacterianas dominantes de cada manantial son diferentes.

Por otra parte, tal como se observó en el análisis de agrupamiento, el ACO mostró una clara segregación entre hábitats estudiados y una composición de las comunidades bacterianas relativamente estables a lo largo del tiempo (escala temporal), a excepción de la muestra del tercer muestreo del manantial SC (SC3) (Figura 44).

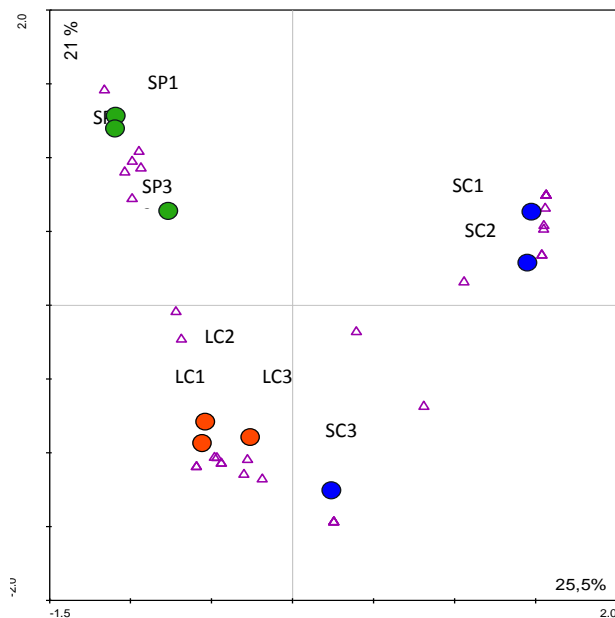


Figura 44. Análisis de correspondencia del patrón de bandas obtenido por DGGE, que representa la composición de la comunidad bacteriana dominante de los manantiales salinos SC, LC y SP durante tres épocas de muestreo (1, 2, 3).

En general, tanto el análisis de agrupamiento como el ACO sugieren que a lo largo del tiempo hay poca variabilidad en los grupos bacterianos dominantes en la comunidad microbiana de los tres manantiales, sugiriendo que no hay un efecto marcado de la época de lluvia o sequía, lo cual es de esperarse ya que como se determinó con el análisis isotópico de las aguas de los manantiales, estas no tienen un origen meteorológico reciente y su composición fisicoquímica es estable a lo largo del tiempo. Además, los agrupamientos muestran una clara diferenciación de la comunidad bacteriana dominante por hábitat y que al interior de cada hábitat las comunidades microbianas son relativamente estables.

Para determinar si los parámetros ambientales locales evaluados en este estudio pueden explicar la variación en los patrones de DGGE se realizó un Análisis de Correlación Canónica (ACC) (ter Braak & Verdonschot 1995) (Figura 45).

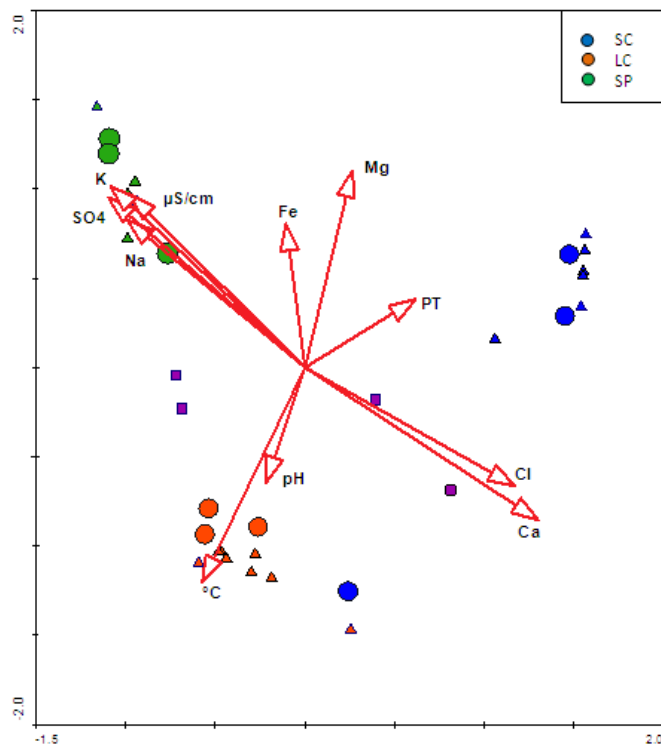


Figura 45. Diagrama del análisis de correlación canónica para el patrón de bandas generado para el dominio *Bacteria* de los manantiales SC, LC y SP durante tres épocas de muestreo.

El ACC presentó una alta correlación ($r=1.0$) entre OTUs y las variables ambientales estudiadas, lo que sugiere influencia de las variables ambientales en la variación de la composición microbiana.

Los dos primeros ejes canónicos explicaron el 25.5% y 21% respectivamente, de la variabilidad en la composición de la comunidad bacteriana dominante. Cuando se evaluó el efecto de cada variable ambiental, se encontró una alta significancia de la concentración del ion calcio (Ca^{2+}) (Monte Carlo, $F=2.13$, $P=0.005$) y de la temperatura (Monte Carlo, $F=2.20$, $P=0.006$), sugiriendo que estos dos parámetros son los tensores ambientales que más pueden estar influenciando la composición de la comunidad bacteriana.

La mayor concentración de Ca^{+2} fue registrada en el manantial SC (~2000 – 2500 mg/l), seguido del manantial LC (~600-1000mg/l) y del manantial SP (~100-175mg/l), el análisis de varianza (ANOVA) mostró diferencias altamente significativas ($P<0.0001$) de este ión entre los tres manantiales. El Ca^{2+} presente en el agua de los manantiales podría originarse por procesos de disolución de rocas sedimentarias tales como la caliza (CaCO_3), dolomita ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$), marga (roca sedimentaria compuesta de caliza y arcilla), yeso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) o anhidrita (CaSO_4) (Risacher & Fritz, 2009). El efecto del ión Ca^{+2} en la composición de la comunidad bacteriana podría estar relacionado con su efecto en la disminución de la disponibilidad del fósforo ya que se ha documentado que los cationes divalentes y trivalentes, y en particular el Ca^{2+} , precipitan el fósforo soluble (Robertson & Alexander, 1992; Tunesi *et al.*, 1999). Por tanto, altas concentraciones del ión Ca^{+2} pueden favorecer la pérdida de nutrientes en solución por precipitación o conversión a suspensiones coloidales de difícil acceso para los microorganismos. Teniendo en cuenta los valores de Ca^{2+} detectados en los manantiales, es posible sugerir que el manantial SC presente las mayores deficiencias en fósforo soluble de fácil acceso para los microorganismos y las algas, esta podría ser una de las razones por las cuales durante los dos primeros muestreos no se detectaron algas ni cianobacterias en este manantial.

Por otra parte, la temperatura promedio para los manantiales SC y SP fue de ~21°C, mientras que para el manantial LC la temperatura promedio fue cercana a ~25°C. El análisis estadístico reveló diferencias altamente significativas ($P < 0.05$) entre la

temperatura del manantial LC y la temperatura de los manantiales SC y SP. Se ha reportado que la temperatura influye en la tasa de respiración de los microorganismos, ya que la tasa de respiración se puede incrementar hasta un 10% por cada grado centígrado (1°C) de aumento en la temperatura (Giller & Malmqvist, 1998). Por tanto, cambios en la temperatura (inclusive una relativa poca variación) puede modificar la tasa metabólica de los microorganismos, a altas temperaturas las tasas metabólicas aumentan y las bacterias son capaces de utilizar sustratos orgánicos más rápidamente, lo cual a su vez incrementa la productividad secundaria (Adams *et al.*, 2010). Así mismo, la temperatura afecta la afinidad por sustratos, a bajas temperaturas las bacterias pierden afinidad por sustratos llevando a una limitación del carbono a pesar de la disponibilidad de recursos en el ambiente (Wiebe *et al.*, 1992; Simon *et al.*, 1999; Adams *et al.*, 2010). Algunos estudios ya han reconocido que la temperatura es un factor ambiental que afecta la composición de la comunidad microbiana, es así como Pagaling *et al.*, (2009), encontraron efecto de la temperatura en la composición de organismos del dominio *Archaea* en lagos salinos mientras que Wang *et al.*, (2010) reportaron que la abundancia de organismos del dominio *Bacteria*, picoeucariotas y nanofitoplancton esta correlacionada positivamente con la temperatura en aguas costeras de Qingdao (China) durante el verano.

Con las variables investigadas en este estudio se logró explicar el 46.5% de la variación en la composición de las comunidades bacterianas de los tres manantiales, el porcentaje restante de variabilidad podría estar relacionado con factores tales como la concentración y composición de materia orgánica disuelta (Langenheder *et al.*, 2005; Judd *et al.*, 2006), la composición del fitoplancton (Pinhassi *et al.*, 2004), la presencia de protozoos y de virus (Weinbauer, 2004) y la distancia geográfica (Langenheder & Ragnarsson, 2007).

5.6.4.1 Identificación de los grupos taxonómicos más abundantes de la comunidad bacteriana a partir del corte de bandas del DGGE.

La determinación de los grupos taxonómicos más abundantes en los tres manantiales se realizó mediante el corte de las bandas más intensas y posterior secuenciación y comparación de las secuencias obtenidas con la base de datos del RDP (Maidak *et al.* 2001) y del GenBank (Benson *et al.* 1999). Para corroborar la asignación taxonómica de

cada OTU, se realizó el corte del mayor número de bandas posibles observadas en la misma posición del gel (las OTUs fueron designadas con números mientras que las distintas bandas observadas en la misma posición fueron designadas con letras).

Manantial SC

El perfil de bandas (OTUs) de DGGE para el dominio *Bacteria* en el manantial SC indicó la presencia de 11 OTUs en el primer muestreo, siete OTUs en el segundo muestreo y ocho OTUs en el tercer muestreo. Durante el primero y segundo muestreo se observaron cuatro OTUs en común.

Se realizó el corte y posterior secuenciación de seis OTUs designadas como 2 (a y b), 6, 10, 11 (a y b), 12 (a y b) y 15 (c), sin embargo, solo se obtuvo buena calidad en la secuencia de la OTU 11 (a y b), observada durante el primero y tercer muestreo, de la OTU 12, observada durante el primer y segundo muestreo y de la OTU 15 (c) observada durante el tercer muestreo (Tabla 32).

El análisis de las secuencias obtenidas indica que la OTU 11 está cercanamente relacionadas con organismos del género *Porphyrobacter* (98% de similitud), la OTU 12 está distantemente relacionada con organismos del género *Pseudoruegeria* (94% de similitud) y la OTU 15 está cercanamente relacionada con organismos del género *Roseovarius* (99% de similitud).

Tabla 32. Identificación de las OTUs obtenidos por DGGE del manantial SC usando el algoritmo de BLAST del NCBI

Banda	Clase	Especie	Ambientes donde han sido reportados	% de similitud	Característica del organismo más cercanamente relacionado	Número de acceso GenBank
11a	α - <i>Proteobacteria</i>	<i>Porphyrobacter cryptus</i>	Manantial termal-Portugal	98	Quimioorganotrófico - produce Bchl _a y carotenoides	AF465834
11a	α - <i>Proteobacteria</i>	<i>Porphyrobacter cryptus</i>	Manantial termal-Portugal	98	Quimioorganotrófico - produce Behl _a y carotenoides	AF465834
12 ^a	α - <i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudoruegeria aquimaris</i>	Agua marina -Corea	94	Quimioorganotrófico	DQ675021
15c	α - <i>Proteobacteria</i>	<i>Roseovarius mucosus</i>	Dinoflagelado	99	Quimioorganotrófico - produce Bchl _a	AJ534215

Estos géneros microbianos pertenecen a la clase α -*Proteobacteria*, tanto *Roseovarius* como *Pseudoruegeria* se encuentran dentro de las familias *Rhodobacteraceae*, mientras que *Porphyrobacter* hace parte de la familia *Erythrobacteraceae*.

Los tres géneros microbianos se caracterizan por ser heterotróficos, halófilos moderados, aislados en su mayoría de ambientes marinos. Además, los géneros *Porphyrobacter* y *Roseovarius* hacen parte del grupo de bacterias AAP.

Como se mencionó anteriormente, organismos del género *Roseovarius* también fueron detectados por los métodos dependientes de cultivo y en la biblioteca de clones realizada para este manantial, lo cual sugiere que las poblaciones microbianas relacionadas con este género microbiano son abundantes y permanecen a lo largo del tiempo.

Manantial LC

El perfil de bandas (OTUs) para el dominio *Bacteria* en el manantial LC indicó la presencia de nueve OTUs en el primer muestreo, ocho OTUs en el segundo muestreo y de diez OTUs en el tercer muestreo.

Se realizó el corte y posterior secuenciación de siete OTUs designadas como 1 (b), 3 (a y b), 5 (a, b, c, d), 7 (a y b), 9 (a y b), 14 (a y b), 16 (a y b), de las cuales se obtuvo buena calidad en la secuencia de las OTUs 1 (b), 3 (a y b), 5 (a y c), 9 (a), 14 (a y b) y 16 (a y b) (Tabla 33).

La OTU 1 se observó durante el segundo muestreo y está relacionada con el plástido de diatomeas del género *Nitzschia* (98% de similitud).

La OTU 5 se observó en los tres muestreos y está relacionada con *Thiomicrospira thyasirae* (98% de similitud), un organismo de la clase γ -*Proteobacteria* y de la familia *Piscirickettsiaceae*, la presencia de organismos relacionados con esta familia también se reportó previamente a partir de los resultados obtenidos por pirosecuenciación lo cual confirma su abundancia en este manantial.

Tabla 33. Identificación de las OTUs obtenidos por DGGE del manantial LC usando el algoritmo de BLAST del NCBI

Banda	Clase	Especie	Ambientes donde han sido reportados	% de similitud	Característica del organismo más cercanamente relacionado	Número de acceso GenBank
1b	Diatomea	<i>Nitzschia thermalis</i>	Ríos, lagunas, ambientes marinos	98	Fotosintética	FJ002224
3a	<i>Mollicutes</i>	Clon no cultivado 2P9SHNG554	Pozo petrolero en Alaska	100	Nd	FJ469288
3b	<i>Mollicutes</i>	Clon no cultivado 2P9SHNG554	Pozo petrolero en Alaska	100	Nd	FJ469288
5a	γ <i>Proteobacteria</i>	<i>Thiomicrospira thyasirae</i>	Ambiente marino	98	Quimiolitotrófico Oxida S ^o	NR_024854
5c	γ <i>Proteobacteria</i>	<i>Thiomicrospira thyasirae</i>	Ambiente marino	98	Quimiolitotrófico Oxida S ^o	NR_024854
9a	<i>Clostridia</i>	Clon TCB133x	Pozo petrolero en el mar del Norte	99	Nd	DQ647100
14a	α - <i>Proteobacteria</i>	<i>Lutimaribacter saemankumensis</i>	Mar Yellow Corea	100	Quimioorganotrófico	EU336981
14a	α - <i>Proteobacteria</i>	<i>Lutimaribacter saemankumensis</i>	Mar Yellow Corea	100	Quimioorganotrófico	EU336981
16a	α - <i>Proteobacteria</i>	<i>Rhodobacter azotoformans</i>	Lodo activado	98	Fototrófica purpura no del azufre	D70846
16b	α - <i>Proteobacteria</i>	<i>Rhodobacter azotoformans</i>	Lodo activado	98	Fototrófica purpura no del azufre	D70846

Nd, no determinada.

La OTU 14 se observó en los tres muestreos y está cercanamente relacionada con *Lutimaribacter saemankumensis* (100% de similitud) un organismo de la clase α -*Proteobacteria* de la familia *Rhodobacteriaceae*. A la fecha, la única especie validada del género *Lutimaribacter* ha sido descrita como un organismo de origen marino, anaerobio facultativo, halófilo y quimioheterotrófico (Yoon *et al.*, 2009).

La OTU 16 se observó en el segundo muestreo y está relacionada con *Rhodobacter azotoformans* (98% de similitud), un organismo de la clase α -*Proteobacteria* y de la familia *Rhodobacteriaceae*. Los organismos del género *Rhodobacter*, se comportan como fototróficos anoxigénicos o fotoheterótrofos facultativos lo cual les permite asimilar compuestos reducidos de azufre presentes a bajas concentraciones, hidrógeno y algunas moléculas orgánicas pequeñas (Hiraishi *et al.*, 1995, 1996).

Además, se detectaron dos OTUs, la OTU 3 presente en el segundo y tercer muestreo y relacionada con el clon 2P9SHNG554 (100% de similitud) de la clase *Mollicutes* y la OTU 9 presente en el tercer muestreo y cercanamente relacionada con el clon TCB133x (99% de similitud) de la clase *Clostridia*, las cuales han sido reportadas en el estudio de diversidad microbiana de campos petroleros en el mar del Norte (Dahle *et al.*, 2008) y en Alaska (Duncan *et al.*, 2009), respectivamente.

Estos datos ratifican que la comunidad bacteriana del manantial LC es dominada por organismos halófilos que asocian su metabolismo a la oxidación de compuestos reducidos de azufre y que este manantial alberga diversidad biológica que no ha sido previamente descrita.

Manantial SP

El perfil de bandas para el manantial SP indicó la presencia de seis OTUs en el primer muestreo, siete OTUs en el segundo muestreo y seis OTUs en el tercer muestreo. Se realizó el corte y posterior secuenciación de cuatro OTUs designadas como 1 (a), 4 (b), 8 (a y b) y 13 (a y b) (Tabla 34).

Tabla 34. Identificación de las OTUs obtenidos por DGGE del manantial SP usando el algoritmo de BLAST del NCBI

Banda	Clase	Especie	Ambientes donde han sido reportados	% de similitud	Característica del organismo más cercanamente relacionado	Número de acceso GenBank
1a	Diatomea-plástido	<i>Nitzschia thermalis</i>	Ríos, lagunas, ambientes marinos	98	Fotosintética	FJ002224
4b	<i>Bacteroidetes</i> no clasificada	Clon CC1B	Sistema cárstico sulfidogénico	96	Nd	EU662336
8a	β - <i>Proteobacteria</i>	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Fijación de nitrógeno en plantas de arroz	99	Diazótrofo	AB049133
8b	β - <i>Proteobacteria</i>	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Fijación de nitrógeno en plantas de arroz	99	Diazótrofo	AB049133
13a	β - <i>Proteobacteria</i>	" <i>Sideroxydans lithotrophicus</i> "	Aguas subterráneas	96	Quimiolitotrófico Oxida Fe ²⁺	DQ386264
13b	β - <i>Proteobacteria</i>	" <i>Sideroxydans lithotrophicus</i> "	Aguas subterráneas	96	Quimiolitotrófico Oxida Fe ²⁺	DQ386264

Nd, no determinada.

La OTU 1, presente durante los tres muestreos fue relacionada con el plástido de diatomeas del género *Nitzschia* sp (98% de similitud), la cual también se observó por microscopia electrónica de barrido, lo cual confirma su abundancia y permanencia a lo largo del tiempo en este manantial.

La OTU 4, presente durante el primer muestreo se relacionó con el clon CC1B (96% de similitud) del filo *Bacteroidetes*, reportado en un estudio de diversidad de organismos quimiolitotrofos en un sistema cárstico sulfidogénico (Porter *et al.*, 2009).

La OTU 8, presente durante el tercer muestreo, se relacionó con *Herbaspirillum seropedicae* (98% de similitud) de la clase β -*Proteobacteria*, los organismos de este género usualmente son encontrados en material vegetal y se caracterizan por su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico en condiciones microaerófilas (Baldani *et al.*, 1986).

Por último la OTU 13 detectada durante los tres muestreos se relacionó con "*Sideroxydans lithotrophicus*" (96% de similitud), de la clase β -*Proteobacteria*, esta OTU también se detectó en la biblioteca de clones de este manantial, por lo cual se confirma la importancia de los procesos asociados a la oxidación de hierro en este hábitat.

En general, los datos obtenidos a partir de la secuenciación y análisis de las bandas observadas por DGGE reiteran las observaciones realizadas previamente en la biblioteca de clones de los manantiales SC y SP y en el análisis de las secuencias obtenidas por pirosecuenciación del manantial LC. Queda claro que muchos de los organismos dominantes permanecen a lo largo del tiempo, sugiriendo estabilidad temporal. Los organismos dominantes en el manantial SC, están relacionados con organismos quimioorganotróficos, algunos de ellos aerobios anoxigénicos fototróficos de las familias *Rhodobacteraceae* y *Erythrobacteraceae*, reportados principalmente en ambientes marinos (Kolber *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2009). Los organismos dominantes en el manantial LC, están relacionados con organismos quimiolitotróficos relacionados con bacterias oxidadoras de azufre de la familia *Piscirickettsiaceae*, reportadas también en manantiales salinos perennes del Ártico Canadiense en donde la

comunidad microbiana es sostenida por producción primaria quimiolitotrófica (Perreault *et al.*, 2008; Niederberger *et al.*, 2009). Los organismos dominantes en el manantial SP, están relacionados con organismos quimiolitotróficos oxidadores de Fe^{2+} a pH neutro de la familia *Gallionellaceae*, que han sido previamente reportados en aguas subterráneas con altas concentraciones de sulfato de calcio (Weber *et al.*, 2006). Las diferencias observadas en cuanto a la composición de las comunidades microbianas dominantes sugieren la presencia de nichos ecológicos contrastantes entre los tres manantiales estudiados.

5.7 DISCUSIÓN GENERAL DEL ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS EN LOS TRES MANANTIALES SALINOS ESTUDIADOS

Este es uno de los pocos trabajos que se ha centrado en estudiar la composición de las comunidades microbianas de manantiales polisalinos y eusalinos que fluyen a partir de aguas subterráneas con más de 50 años de haberse infiltrado.

Los manantiales seleccionados en este estudio no solo son importantes desde una perspectiva histórica (SC y LC) o económica (SP), o por el hecho de representar hábitats poco explorados en el país, sino porque también hacen parte de un complejo hidrológico que alimenta continuamente drenajes de agua dulce mayores como el río Consotá y la quebrada Cestillal, en el caso de los manantiales SC y LC respectivamente. El continuo intercambio entre aguas subterráneas y ríos ha sido poco documentado, sin embargo, este es un proceso de importancia para el mantenimiento de la integridad de los dos ecosistemas pues las aguas subterráneas dependen en gran parte de la transferencia de materia orgánica disuelta y particulada que llega desde la superficie, mientras que los ríos reciben una considerable entrada de nutrientes provenientes de las aguas subterráneas que a su vez es mediada por los microorganismos (Brunke & Gonser, 1997).

Se ha estimado que la abundancia de organismos procariotas en aguas subterráneas oscila entre 10^3 a 10^7 células.mL⁻¹ (Pedersen & Ekendahl, 1990; Pedersen, 1993; Pedersen *et al.*, 1996), lo cual coincide con los resultados obtenidos en este estudio donde se obtuvieron recuentos que oscilaron entre 1 y 4×10^6 células.mL⁻¹. Del total de células detectadas, entre el 30 y 57% hibridó con la sonda específica para organismos

del dominio *Bacteria*, mientras que menos del 16% hibridó con la sonda específica para organismos del dominio *Archaea*.

Aunque los recuentos de organismos del dominio *Bacteria* no mostraron diferencias significativas entre los tres manantiales a lo largo del tiempo, la composición de las comunidades bacterianas sí presentó variaciones espaciales. Estas variaciones podrían estar relacionadas, principalmente, con las características geológicas y con los factores ambientales locales, tal como ha sido reportado en diferentes sistemas acuáticos (Pedersen *et al.*, 1996; Ven der Gucht *et al.*, 2007).

En este estudio, aproximadamente el 50% de la variación en la composición de la comunidad bacteriana dominante fue explicada por los parámetros fisicoquímicos evaluados y en particular por la concentración del ión Ca^{2+} y la temperatura, este último ha sido comúnmente reportado como uno de los factores físicos que afecta la composición de comunidades microbianas en lagos salinos (Pagaling *et al.*, 2009), en lagos de agua dulce (Yannarell & Triplett, 2004; Lindström *et al.*, 2005) y en ríos (Adams *et al.*, 2010).

En este estudio no se detectó efecto de la salinidad, medida indirectamente a través de la conductividad eléctrica, a pesar de que este parámetro fue significativamente diferente entre los manantiales estudiados. Este resultado sugiere que las comunidades bacterianas de estos manantiales, en las cuales predominaron organismos relacionados con las clases γ y α -*Proteobacteria*, son influenciadas por la composición y no por la concentración de sal, tal como se ha reportado al estudiar los patrones de diversidad β para organismos de las clases α y γ -*Proteobacteria* en aguas superficiales de lagos terrestres salinos y de ambientes marinos (Barberán & Casamayor, 2010).

Como se mencionó anteriormente, en los tres manantiales se observó predominio de organismos relacionados con las clases γ y α -*Proteobacteria*, lo cual ha sido ampliamente reportado en hábitats salinos (Humayoun *et al.*, 2003; Kirchman *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006), sin embargo, cabe destacar que organismos de la clase β -*Proteobacteria* también fueron importantes en la comunidad microbiana del manantial salino SP.

A pesar de la similitud a nivel de filo, clase y familia en la composición de las comunidades microbianas (Figura 46), a nivel de género se observaron diferencias en las poblaciones bacterianas que habitan cada uno de los manantiales. Muchos de los géneros microbianos reportados en los manantiales SC y LC han sido ampliamente reportados en ambientes marinos, mientras que la mayoría de los géneros microbianos detectados en SP presentan una distribución más cosmopolita, lo cual podría estar relacionado con el origen de estos manantiales (Pedersen *et al.*, 1996).

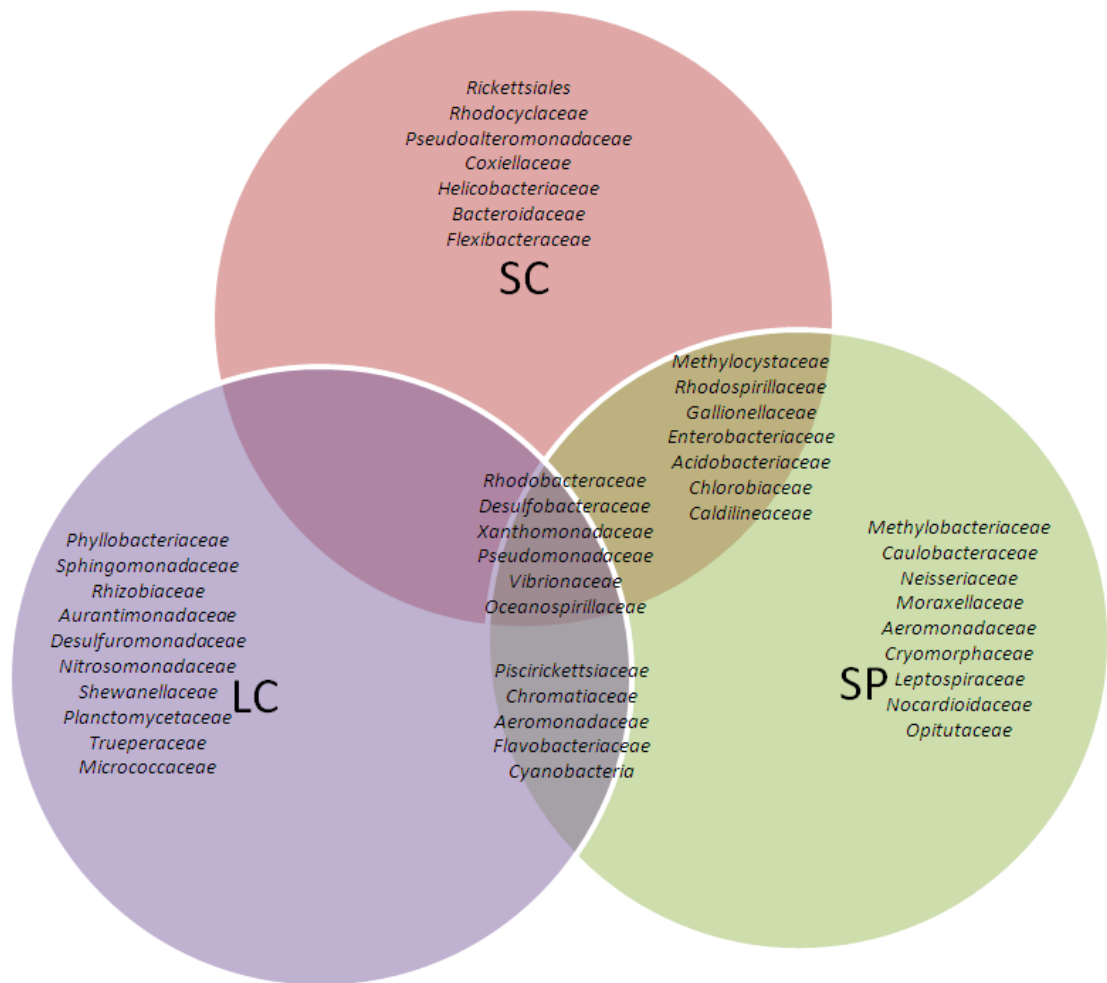


Figura 46. Representación gráfica que representa la similitud entre la composición de organismos del dominio *Bacteria* en los manantiales SC, LC y SP

Por último, es de resaltar que aunque se utilizaron métodos con diferentes grados de resolución, los resultados siempre fueron reiterativos, indicando que con este estudio se logró obtener una descripción confiable de la composición de las comunidades microbianas en los tres manantiales, los cuales son sin duda un importante reservorio de diversidad microbiana, como se evidenció mediante los resultados obtenidos por las bibliotecas de clones y pirosecuenciación, en las cuales aproximadamente el 50% de las OTUs presentaron menos del 97% de similitud con organismos previamente aislados y a partir del aislamiento de nuevos géneros y/o especies microbianas (Díaz *et al.*, 2010a y b).

6. CONCLUSIONES

- La comunidad microbiana de los manantiales SC, LC y SP fue dominada por organismos del dominio *Bacteria* del filo *Proteobacteria*, de las clases γ y α -*Proteobacteria*. Tanto en los manantiales SC y LC, se aislaron cepas bacterianas y se detectaron OTUs relacionadas principalmente con organismos halófilos de ambientes marinos. Por el contrario, la composición microbiana del manantial SP fue bastante heterogénea y relacionada con organismos halotolerantes y halófilos de agua dulce, sedimentos de lagunas de cristalización, manantiales sulfurosos marinos, estuarios y suelo.
- Los microorganismos aislados fueron en su mayoría Gram-negativos, móviles, halotolerantes y aerobios facultativos en presencia de nitrato como aceptor final de electrones. Muchos exhiben diferencias fenotípicas con respecto a los organismos cultivados más cercanamente relacionados, posiblemente como resultado de su adaptación a las condiciones particulares de cada hábitat. En particular se destaca el alto número de aislamiento de cepas relacionadas con el género *Lysobacter*, las cuales mostraron propiedades fenotípicas que no habían sido reportadas previamente. Además, las cepas aisladas presentaron tanto versatilidad metabólica, que se refleja en sus capacidades hidrolíticas, como novedad taxonómica, como se deduce de las nuevas especies aisladas y caracterizadas. Su caracterización permitió clasificar una de las cepas como un nuevo género de la familia *Rhodospirillaceae* y dos de las cepas como nuevas especies de los géneros *Dethiosulfovibrio* y *Aurantimonas*.
- Se encontró poca variabilidad temporal en las comunidades bacterianas dominantes de los tres manantiales, sugiriendo que no hay un efecto significativo de la época de lluvia o sequía. Sin embargo, se encontraron diferencias altamente significativas en la composición de las comunidades microbianas a escala espacial, es decir entre los tres manantiales salinos. Esta variabilidad puede ser explicada por los parámetros fisicoquímicos y

principalmente por la concentración del ion calcio y de la temperatura sugiriendo que estos dos parámetros son los factores ambientales que pueden estar influenciando la composición de la comunidad bacteriana de los tres manantiales.

7. PERSPECTIVAS

Aunque es evidente que el avance en técnicas moleculares permite obtener una gran cantidad de información sobre las comunidades microbianas de ambientes naturales, considero importante continuar con el desarrollo de nuevas técnicas de aislamiento y de estrategias de enriquecimiento, que favorezcan la recuperación en cultivo de microorganismos de ambientes naturales para generar mayor información sobre su fisiología, ecología y evolución.

Los microorganismos aislados en este estudio podrían tener aplicación biotecnológica por lo cual se podría continuar con la exploración e identificación de metabolitos que actúen como agentes antitumorales y actividades enzimáticas, producción de fitohormonas, sideróforos y solubilización de fósforo, que actúen como agentes promotores de crecimiento vegetal.

Estudios futuros, también podrían incluir un estudio metagenómico y la evaluación de la actividad microbiana, para determinar cuál es la función de los microorganismos en su hábitat y cómo sus actividades contribuyen en los ciclos biogeoquímicos.

Por otra parte, se podría continuar con la exploración de los mecanismos bióticos y abióticos que contribuyen con la variación de las comunidades microbianas de manantiales salinos del sistema montañoso de los Andes.

BIBLIOGRAFIA

- Acevedo A, Martínez S. La sal y las mercaderías en la provincia de Quimbaya. Primeras noticias y crónicas de los salados del río Consotá. En C. López y M. Cano (Eds). *Cambios Ambientales en Perspectiva Histórica. Ecorregión del Eje Cafetero*. Proyecto UTP-GTZ, Pereira. 2004; 167-187.
- Achtman M, Wagner M. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nature Reviews* 2008; **6**, 431-440.
- Adams H.E, Crump B.C, Kling G.W. Temperature control on aquatic bacterial production and community dynamics in arctic lakes and streams. *Environmental Microbiology* 2010; **12**, 1319-1333.
- Albuquerque L, Somoos C, Nobre M.F, Pino N.M, Battista J.R, Silva M.T, Rainey F.A, da Costa M.S. *Truepera radiovictrix* gen. nov., sp. nov., a new radiation resistant species and the proposal of *Trueperaceae* fam. nov. *FEMS Microbiology Letters* 2005; **247**, 161-169.
- Alfaro C. 2002. Geoquímica del sistema geotérmico de Paipa. INGEOMINAS, informe inédito. Bogotá. 2002, 88p
- Alfaro, C. Geoquímica preliminar de gases del sistema geotérmico de Paipa. Ministerio de Minas y Energía. INGEOMINAS, informe inédito. Bogotá. 2005, 43p
- Alfaro C, Velandia F, Cepeda H, Pardo N. Preliminary conceptual model of the Paipa geothermal system, Colombia. *Proceedings World Geothermal Congress*. Bali, Indonesia, 2010, 25-29 Abril.
- Alexandre G, Greer-Phillips S, Zhulin IB. Ecological role of energy taxis in microorganism. *FEMS Microbiology Reviews* 2004; **28**(1), 113-126.
- Alfreider A, Vogt C., Babel W. Microbial diversity in an *in situ* reactor system treating monochlorobenzene contaminated groundwater as revealed by 16S ribosomal DNA analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 2002; **25**(2), 232-240.
- Alonso-Sáez L, Balagué V, Sá E.L, Sánchez O, González J.M, Pinhassi J et al. Seasonality in bacterial diversity in north-west Mediterranean coastal waters: assessment through clone libraries, fingerprinting and FISH. *FEMS Microbiology Ecology* 2007; **60**, 98-112.
- Altschul S.F, Madden T.L, Schäffer A.A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; **25**, 3389-3402.
- Amakata D, Matsuo Y, Shimono K, Park J.K, Yun C.S, Matsuda H, Yokota A, Kawaamukai M. *Mitsuaria chitosanitabida* gen. nov., sp. nov., an aerobic, chitosanase-

producing member of the 'Betaproteobacteria'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005; **55**, 1927-1932.

Amann R.I, Krumholz L, Stahl D.A. Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative phylogenetic and environmental studies in microbiology. *The Journal of Bacteriology* 1990; **172**, 762-770.

Amann R.I, Wolfgang L, Schleifer K.H. Phylogenetic Identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews* 1995; **59** (1), 143–169.

Amaral-Zettler L, Peplies J, Ramette A, Fuchs B, Ludwig W, Glöckner F.O. Proceedings of the international workshop on Ribosomal RNA technology, April 7–9, 2008, Bremen, Germany. *Systematic and Applied Microbiology* 2008; **31**, 258-268.

Anderson C.R; Dick G.J; Chu M.L; Cho J.C, Davis R.E; Bräuer, S.L, Tebo B.M. *Aurantimonas manganoxydans*, sp. nov. and *Aurantimonas litoralis*, sp. nov.: Mn(II) oxidizing representatives of a globally distributed clade of alpha-*Proteobacteria* from the order *Rhizobiales*. *Geomicrobiol Journal* 2009; **26**(3), 189–198.

Anil Kumar P, Sasi Jyothsna T.S, Srinivas, T.N.R, Sasikala C, Ramana CH.V, Imhoff J.F: Two novel species of marine phototrophic *Gammaproteobacteria*: *Thiorhodococcus bheemlicus* sp. nov. and *Thiorhodococcus kakinadensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007; **57**, 2458-2461.

Antón J., Peña A., Santos F, Martínez-García M., Schmitt-Kopplin P., Rosselló-Móra, R. Distribution, abundance and diversity of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Saline Systems* 2008; 4:15

Antón J., Rosello-Mora R., Rodríguez-Varela F, Amann R. 2000. Extremely halophilic *Bacteria* in crystallizer ponds from solar salterns. *Applied and Environmental Microbiology* 2000; **66**(7), 3052-3057.

Antunes A, Franca L, Rainey F.A, Huber R, Nobre M.F, Edwards K.J, da Costa M.S. *Marinobacter salsuginis* sp. nov., isolated from the brine–seawater interface of the Shaban deep, Red Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007; **57**, 1035-1040.

Aoya M, Wallis R. Thermal consequences of a subduction boundary jump: a numerical model for generating subduction - related clockwise pressure - temperature paths: *Tectonics* 2002; **21**, 1 - 10.

APHA-AWWA and WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed. American Public Health Association, Washington, D.C. 2005.

Ardila J. y C. Lleras (Eds) Batalla Contra el Olvido. Acuarelas Colombianas 1850. Bogotá. 1985.

Aslam Z, Yasir M, Jeon C.O, Chung Y.R. *Lysobacter oryzae* sp. nov., isolated from the rhizosphere of rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2009; **59**, 675-680.

Baati H, Guerhazi S, Amdouni R, Gharsallah N, Sghir A, Ammar E. Prokaryotic diversity of a Tunisian multipond solar saltern. *Extremophiles* 2008; **12**, 505-518.

Baena S, Fardeau M.L, Labat M, Ollivier B, Garcia J.L, Patel B.K.C. *Aminobacterium colombiense* gen. nov. sp. nov., an amino acid-degrading anaerobe isolated from anaerobic sludge. *Anaerobe* 1998; **2**, 241-250.

Baena S, Fardeau M.L, Labat M, Ollivier B, Thomas P, Patel B.K.C. *Aminomonas paucivorans* gen. nov., sp. nov., a mesophilic, anaerobic, amino-acid utilizing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1999b; **49**, 975-982.

Baena S, Fardeau M.L, Woo T.H.S, Ollivier B, Labat M, Patel B.K.C. Phylogenetic relationships of three amino-acid-utilizing anaerobes, *Selenomonas acidaminovorans*, "*Selenomonas acidaminophila*" and *Eubacterium acidaminophilum*, as inferred from partial 16S rDNA nucleotide sequences, and proposal of *Thermanaerovibrio acidaminovorans* gen. nov., comb. nov. and *Anaeromusa acidaminophila* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1999a; **49**, 969-974.

Bakir M.A, Kitahara M, Sakamoto M, Matsumoto M, Benno Y: *Bacteroides finegoldii* sp. nov., isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2006; **56**, 931-935.

Balch W.E, Fox G.E, Magrum R.J, Wolfe R.S. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiology Reviews* 1979; **43**: 260-296.

Baldani J.I, Baldani V.L.D, Seldin L, Dobereiner J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov. a Root- Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1986; **36**(1), 86-93.

Barberán A, Casamayor E.O. Global phylogenetic community structure and β -diversity patterns in surface bacterioplankton metacommunities. *Aquatic Microbial Ecology* 2010, **59**(1), 1-10.

Bath C, Cukalac T, Porter K, Dyall-Smith M.L. His1 and His2 are distantly related, spindle-shaped haloviruses belonging to the novel virus group, *Salterprovirus*. *Virology* 2006; **350**:228-239.

Batzke A, Engelen B, Sass H, Cypionka H. Phylogenetic and physiological diversity of cultured deep-biosphere bacteria from equatorial Pacific ocean and Peru margin sediments. *Geomicrobiol Journal* 2007; **24**, 261-273.

Ben-Dov E, Kramarsky-Winter E, Kushmaro A. An *in situ* method for cultivating microorganisms using a double encapsulation technique. *FEMS Microbiology Ecology* 2009; **68**,363-371.

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

Benson D.A, Boguski M.S, Lipman D.J, Ostell J, Ouellette B.F.F, Rapp B.A, Wheeler D.L. GenBank. *Nucleic Acids Research* 1999; **27**, 12-17.

Bhatnagar T; Boutaiba S; Hacene H; Cayol J; Fardeau M.L, Ollivier B; Baratti J. Lipolytic activity from *Halobacteria*: Screening and hydrolase production. *FEMS Microbiology Letters* 2005; **248**, 133-140.

Biebl H, Allgaier M, Lünsdorf H, Pukall R, Tindall B.J, Wagner-Döbler I. *Roseovarius mucosus* sp. nov., a member of the Roseobacter clade with trace amounts of bacteriochlorophyll *a*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005; **55**, 2377-2383.

Biebl H, Pukall D; Lünsdorf H, Schulz S, Allgaier M, Tindall B, Wagner-Döbler I. Description of *Labrenzia alexandrii* gen. nov., sp. nov., a novel alphaproteobacterium containing bacteriochlorophyll *a*, and a proposal for reclassification of *Stappia aggregata* as *Labrenzia aggregata* comb. nov., of *Stappia marina* as *Labrenzia marina* comb. nov. and of *Stappia alba* as *Labrenzia alba* comb. nov., and emended descriptions of the genera *Pannonibacter*, *Stappia* and *Roseibium*, and of the species *Roseibium denhamense* and *Roseibium hamelinense*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007; **57**, 1095-1107.

Biebl H, Wagner-Döbler I. Growth and bacteriochlorophyll *a* formation in taxonomically diverse aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in chemostat culture: influence of light regimen and starvation. *Process Biochemistry* 2006; **41**, 2153-2159.

Boone D.R, Liu Y, Zhao Z.J, Balkwill D.L, Drake G.R, Stevens T.O, Aldrich H.C. *Bacillus infernus* sp. nov., an Fe(III)-reducing and Mn(IV)-reducing anaerobe from the deep terrestrial subsurface. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1995; **45**, 441-448.

Borsodi A.K, Micsinai A, Ruzsnyák A, Vladár P, Kovács G, Tóth E.M, Márialigeti K. Diversity of alkaliphilic and alkalitolerant bacteria cultivated from decomposing reed rhizomes in a Hungarian soda lake. *Microbial Ecology* 2005; **50**(1), 9-18.

Boutaiba S, Bhatnagar T, Hancene H, Mitchell D.A, Baratti J.C. Preliminary characterization of a lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon, *Natronococcus* sp. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2006; **41**, 21-26.

Bouvet P.J.M, Grimont P.A.D. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended

descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *International Journal of Systematic and Bacteriology* 1986; **36**, 228-240.

Bozal N, Montes M.J, Tudela E, Jiménez F, Guinea J. *Shewanella frigidimarina* and *Shewanella livingstonensis* sp. Nov. isolated from Antarctic coastal area. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2002; **52**, 192-205.

Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; **72**, 248-254.

Brazelton W.J, Schrenk M.O, Kelley D.S, Baross J.A. Methane- and sulfur-metabolizing microbial communities dominate the Lost City hydrothermal field ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology* 2006; **72**: 6257-6270.

Brinkhoff T, Muyzer G. Increased species diversity and extended habitat range of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 1997; **63**, 3789-3796.

Brinkhoff T, Sievert S.M, Kuever J, Muyzer G. Distribution and diversity of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* spp. at a shallow-water hydrothermal vent in the Aegean Sea (Milos, Greece). *Applied and Environmental Microbiology* 1999; **65**, 3843-3849.

Brosius J, Dull T.L, Steeter D.D, Noller H.F. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 1981; **148**, 107-127.

Brunke M, Gonser T. The ecological significance of exchange processes between rivers and groundwater. *Freshwater Biology* 1997; **37**:1-33.

Bruns A, Cypionka H, Overmann J. Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the Central Baltic Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 2002; **68**(8), 3978-3987.

Buchan A, González J.M, Moran M.A. Overview of the marine *Roseobacter* Lineage. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; **71**(10), 5665-5677.

Buesing N, Filippini M, Bürgmann H, Gessner MO. Microbial communities in contrasting freshwater marsh microhabitats. *FEMS Microbiology Ecology* 2009; **69**(1), 84-97.

Bull A.T, Ward C, Goodfellow M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2000; **64**(3), 573-606.

Bunte C, Simon M. Bacterioplankton turnover of dissolved free monosaccharides in a mesotrophic lake. *Limnology and Oceanography* 1999; **44**, 1862-1870.

Burns D.G, Camakarlis H.M, Janssen P.H, Dyall-Smith M.L. Combined use of cultivation-dependent and cultivation-independent methods indicates that members of most haloarchaeal groups in an Australian crystallizer pond are cultivable. *Applied and Environmental Microbiology* 2004;**70**, 5258-5265.

Button D.K, Robertson B.R, Lepp P, Schmidt T. A small, dilute cytoplasm, high-affinity, novel bacterium isolated by extinction culture and having kinetics compatible with growth at ambient concentrations of dissolved nutrients in seawater. *Applied and Environmental Microbiology* 1998; **64**(11), 4467-4476.

Carder-Forec. Base ambiental con énfasis en riesgo, municipio de Pereira. Pereira. 2000, 136 p.

Casamayor E.O, Massana R, Benlloch S, Øvreås L, Díez B, López-López A. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a mutipond solar saltern. *Environmental Microbiology* 2002; **4**, 338-348.

Casamayor E.O, Schäfer H, Bañeras L, Pedrós-Alió C, Muyzer G. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 2000; **66**, 499-508.

Catón T.M, Caton I.R, Witte L.R, Schneegurt M.A. Archaeal diversity at the Great Salt plains of Oklahoma described by cultivation and molecular analyses. *Microbial Ecology* 2009; **58**, 519-528.

Cavalcante V.A, Döbereiner J. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 1988; **108**, 23-31.

Chalmers N. R. Monitoring and inventoring biodiversity. Collections data and training, En: F. Di Castri y T. Yuonés (Eds). *Biodiversity, science and development*. Cambridge: CAB International, University Press. 1996, pp. 171-179.

Chamkha M, Patel B.K.C, Garcia J-L, Labat M. Isolation of *Clostridium bifermentans* from oil mil wastewaters converting cinnamic acid to 3-phenylpropionic acid and emendation of the species. *Anaerobe* 2001; **7**(4), 189-197.

Chapelle F. Ground-water microbiology and geochemistry. En John Wiley & Sons, Inc. (Eds). *Microorganisms present in the ground-water environment*. United States of America. 2001, pp. 32-57.

Chen G.Q, Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* 2005; **26**: 6565-6578.

Chen H.H, Zhao G.Z, Park D.J, Zhang Y.Q, Xu L.H, Lee J.C, Kim C.J, Li W.J. *Micrococcus endophytticus* sp. nov., isolated from surface – sterilized aquilaria sinensis roots. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2009; **59**, 1070-1075.

Chin K.J, Liesack W, Janssen P.H. *Opitutus terrae* gen. nov., sp. nov., to accommodate novel strains of the division 'Verrucomicrobia' isolated from rice paddy soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2001; **51**, 1965-1968.

Cho J.C, Giovannoni S.J. Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine *Gammaproteobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology* 2004; **70**: 432-440.

Choi D.H, Hwang C.Y, Cho B.C. *Pelagibius litoralis* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium in the family *Rhodospirillaceae* isolated from coastal seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2009; **59**, 818-823.

Christensen P, Cook F. *Lysobacter*, a new genus of nonfruiting, gliding bacteria with a high base ratio. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1978; **28**:367-393.

Clark I.D, Fritz P. 1997. Environmental isotopes in hidrogeology. Lewis Publishers, New York, 328 p.

Clarke K.R. Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* 1993; **18**, 117-143.

Clementino M.M, Vieira R.P, Cardoso A.M, Nascimento A.P.A, Silveira C.B, Riva, T.C, Gonzalez A.S.M, Paranhos R, Albano R.M, Ventosa A, Martins O.B. Prokaryotic diversity in one of the largest hypersaline coastal lagoons in the world. *Extremophiles* 2008; **12**:595-604.

Coenye T, Goris J, Spilker T, Vandamme P, Lipuma J.J. Characterization of unusual bacteria isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis patients and description of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; **40**, 2062-2069.

Cohan F.M. What are bacterial species?. *Annual Review of Microbiology* 2002; **56**, 457-487.

Cohan F.M. Towards a conceptual and operational union of bacterial systematic, ecology, and evolution. *Philosophical Transactions* 2006; **361**, 1985-1996.

Cole J.R, Chai B, Marsh T.L, Farris R.J, Wang Q, Kulam S.A, Chandra S, McGarrell D.M, Schmidt T.M, Garrity G.M, Tiedje J.M. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomic. *Nucleic Acids Research* 2003; **31**, 442-443.

Cord-Ruwish R. A quick method for determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *Journal Microbial Methods* 1985; **4**, 33-36.

Coronado M, Vargas C, Hofemcister J, Ventosa A, Nieto J. Production and biochemical characterization of an α -amilasa from the moderate halophilic *Halomonas meridiana*. *FEMS Microbiology Letters* 2000; **183**, 67- 71.

Corre E, Reysenbach A.L, Prieur D. ϵ -proteobacterial diversity from a deep-sea hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge. *FEMS Microbiology Letters* 2001; **205**, 329-335.

Cortés L, Cardona J.J. Cartografía geológica detallada para el salado de Consotá y sus alrededores. En: López, M. Cano y D. Rodríguez (Compiladores). Cambios ambientales en perspectiva histórica. Ecología Histórica y Cultura Ambiental. Universidad Tecnológica de Pereira-Sociedad Colombiana de Arqueología, Pereira. 2006, pp. 93-109.

Cottrell M.T, Kirchman D.L. Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Applied and Environmental Microbiology* 2000; **66**, 1692-1697.

Dahle H, Birkeland N.K. *Thermovirga lienii* gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic, anaerobic, amino-acid-degrading bacterium isolated from a North Sea oil well. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2006; **56**, 1539-1545.

Dahle H, Garshol F, Madsen M, Birkeland N.K. Microbial community structure analysis of produced water from a high-temperature North Sea oil-field. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2008; **93** (1-2), 37-49.

DasSarma S, Arora P. Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences*. Macmillan Press. 2001.

Davis R, Moyer C. Extreme spatial and temporal variability of hydrothermal microbial mat communities along the Mariana island arc and southern Mariana backarc system. *Journal of Geophysical Research* 2008; **113**, 15-17.

De la Rosa-García S.C, Muñoz-García A.A, Barahona-Pérez L.F, Gamboa-Angulo M.M. Antimicrobial properties of moderately halotolerant bacteria from cenotes of the Yucatan peninsula. *Letters in Applied Microbiology* 2007; **45**, 289-294.

De Ley J. Reexamination of the association between melting point, buoyant density, and chemical base composition of deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology* 1970; **101**, 738-754.

Delbès C, Moletta R, Godon J.J. Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase chain reaction--single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology* 2000; **2**(5), 506-515.

DeLong EF, Preston CM, Mincer T, Rich V, Hallam SJ, Frigaard N-U *et al.* Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior *Science* 2006; **311**, 496-503.

Demergasso C; Casamayor E.O, Chong G, Galleguillos P, Escudero L, Pedrós-Alio C. Distribution of prokaryotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, Northern Chile. *FEMS Microbiology Ecology* 2004; **48**, 57-69.

Demergasso C, Escudero L, Casamayor E.O, Chong G, Balague V, Pedrós-Alio C. Novelty and spatio-temporal heterogeneity in the bacterial diversity of hypersaline Lake Tebenquiche (Salar de Atacama). *Extremophiles* 2008; **12**, 491-504.

Denner E.B.M, Smith G.W, Busse H.J, Schumann P, Narzt T, Polson S.W, Lubitz W, Richardson L.L. *Aurantimonas coralicida* gen. nov., sp. nov., the causative agent of white plague type II on *Caribbean scleractinian* corals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2003; **53**, 1115-1122.

DeSantis T.Z, Brodie E.L, Moberg J.P, Zubieta I.X, Piceno YM, Andersen G.L. High-density universal 16S rRNA microarray analysis reveals broader diversity than typical clone library when sampling the environment. *Microbial Ecology* 2007; **53**, 371-383.

DeSantis T.Z, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie E. L, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P., Andersen G.L. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology* 2006; **72**, 5069-5072.

Demba Diallo M.D, Willems A, Vloemans N, Cousin S, Vandekerckhove T.T, de Lajudie P, Neyra M, Vyverman W, Gillis M, Van der Gucht K. Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N₂ -fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortilis* ssp. *Raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal. *Environmental Microbiology* 2004; **6**(4), 400-415.

Díaz C, Baena S, Fardeau M.L, Patel B.K.C. *Aminiphilus circumscriptus* gen. nov., sp. nov., an anaerobic amino-acid-degrading bacterium from an upflow anaerobic sludge reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007; **57**, 1914-1918.

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

Díaz-Cárdenas C; Patel B.K.C, Baena, S. *Tistlia consotensis* gen. nov., sp. nov., a novel aerobic chemoheterotrophic free-living nitrogen-fixing α -*Proteobacteria*, isolated from a Colombian saline spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2010b; **60**, 1437-1444.

Döbereiner J, Day J.M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. En: Newton and C.J. Nyman (Eds.). Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation. Washinton State University Press, Pullman. 1976, pp 518-538.

Dong H, Zhang G, Jiang H, Yu B, Chapman L, Lucas C. & Fields M. Microbial Diversity in Sediments of Saline Qinghai Lake, China: Linking Geochemical Controls to Microbial Ecology. *Microbial Ecology* 2006; **51**, 65-82.

- Doolittle W, Zhaxybayeva O. On the origin of prokaryotic species. *Genome Research*. 2009; **19**, 744-756.
- Dorador C, Vila I, Imhoff J.F, Witzel K.P. Cyanobacterial diversity in Salar de Huasco, a high altitude saline wetland in northern Chile: an example of geographical dispersión?. *FEMS Microbiology Ecology* 2008; **64**(3), 419-432.
- Doronina N.V, Darmaeva T.D, Trotsenko Y.A. *Methylophaga alcalica* sp. nov., a novel alkaliphilic and moderately halophilic, obligately methylotrophic bacterium from an East Mongolian saline soda lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2003; **53**, 223-229.
- Doucette G.J. Interactions between bacteria and harmful algae: a review. *Journal of Natural Toxins* 1995; **3**, 65-74.
- Du H; Nianzhi J, Yaohua H, Yonghui Z. Diversity and distribution of pigmented heterotrophic bacteria in marine environments. *FEMS Microbiology Ecology* 2006; **57**, 92-105
- Duncan K.E, Gieg L.M, Parisi V.A, Tanner R.S, Tringe S.G, Bristow J, Suflita J.M. biocorrosive thermophilic microbial communities in Alaskan North slope oil facilities. *Environmental Science and Technology* 2009; **43**(20), 7977-7984.
- Dundas I. Was the environment for primordial life hypersaline? *Extremophiles* 1998; **2**, 375-377.
- DuRand M.D, Olson R.J, Chisholm S.W. Phytoplankton population dynamics at the Bermuda Atlantic Time-series station in the Sargasso Sea. *Deep Sea Res Part II* 2001; **48**, 1983-2003.
- Dysterhouse S.E, Gray J.P, Herwig R.P, Lara J.C, Staley J.T. *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1995; **45**, 116-123.
- Eilers H.J, Pernthaler J, Glockner F.O; Amann R. Isolation o novel pelagic bacteria from the German Bight and their seasonal contributions to surface picoplakton. *Applied and Environmental Microbiology* 2001; **67**, 5134-5142.
- Elshahed M, Najjar F, Roe B, Oren A, Dewers T, Krumholz L. Survey of Archaeal diversity reveals an abundance of halophilic *Archaea* in a low-salt, sulfide and sulfur-rich spring. *Applied and Environmental Microbiology* 2004; **70**(4), 2230-2239.
- Emerson D, Moyer C.L. Isolation and characterization of novel iron-oxidizing bacteria that grow at circumneutral pH. *Applied and Environmental Microbiology* 1997; **3** (63), 4784-4792.

Emerson D, Rentz J.A, Lilburn T.G, Davis R.E, Aldrich H, Chan C, Moyer C.L. A novel lineage of proteobacteria involved in formation of marine Fe-oxidizing microbial mat communities. *Plos ONE* 2007; 2(8), e667. doi: 610.1371/journal.pone.0000667.

Enache M, Kamekura M. Hydrolytic enzymes of halophilic microorganisms and their economic values. *Romanian Journal of Biochemistry* 2010; **47**(1), 47-59.

Farmer III J.J. Revival of the name *Vibrio vulnificus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1980; **30**, 656.

Farmer J.J III. The family *Vibrionaceae*. En: A. Balows, H. G. Tru per, M. Dworkin, W. Harder & K.-H. Schleifer (Eds). *The Prokaryotes*, 2nd edn., New York, Springer. 1992, pp. 2938-2951.

Fay P. Oxygen relations of nitrogen fixation in *Cyanobacteria*. *Microbiology Reviews* 1992; 56,340-373

Feazel L.M, Spear J.R, Berger A.B, Harris K.J, Frank D.N, Ley R.E, Pace N.R. Eucaryotic diversity in a hypersaline microbial mat. *Applied and Environmental Microbiology* 2008; **74**(1), 329-332.

Feingersch R, Suzuki M.T, Shmoish M, Sharon I, Sabehi G, Partensky F, Béjà O. Microbial community genomics in eastern Mediterranean sea surface waters. *The ISME Journal* 2010; **4**:78-87.

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; **39**, 783-79.

Foti M, Sorokin D, Lomans B, Mussman M, Zacharova E, Pimenov N, Kuenen G, Muyzer G. Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes. *Applied and Environmental Microbiology* 2007; **73**(7), 2093-2100.

Fraser C, Alm E.J, Polz M.F, Spratt B.G, Hanage W.P. The bacterial species challenge: making sense of genetic and ecological diversity. *Science* 2009; **323**, 741-746.

Freeman S.A, Peek K, Prescott M, Daniel, R. Characterization of a chelator-resistant proteinase from *Thermus* strain Rt4A2. *Biochemical Journal*. 1993. 295:463-469.

Frigaard N-U, Li H, Gomez Maqueo Chew A, Maresca J.A, Bryant D.A. *Chlorobium tepidum*: insights into the physiology and biochemistry of green sulfur bacteria from the complete genome sequence. *Photosynthesis Research* 2003; **78**, 93-117.

Fuchs BM, Spring S, Teeling H, Quast C, Wulf J, Schattenhofer M *et al*. Characterization of the first marine *gammaproteobacterium* capable of aerobic anoxygenic photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007; **104**, 2891-2896.

Galinski EA. Osmoadaptation in bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 1995; **37**, 272-328.

Galinski E.A, Tindall B.J. Biotechnological prospects for halophiles and halotolerant microorganisms. En: Herbert RD, Sharp RJ (Eds). Molecular biology and biotechnology of extremophiles. Blackie, London. 1992, pp 76-114.

Gallego V, García M.T, Ventosa A. *Methylobacterium hispanicum* sp. nov. and *Methylobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from drinking water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005; **55**, 281-287.

Ganesan A, Chaussonnerie S, Tarrade A, Dauga C, Bouchez, T, Pelletier E, Lepaslier D, Sghir A. *Cloacibacillus evryensis* gen. nov., sp. nov., a novel asaccharolytic, mesophilic, amino-acid-degrading bacterium within the phylum 'Synergistetes', isolated from an anaerobic sludge digester. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2008; **58**, 2003-2012.

García del Cura, M.A.; Ordóñez, S. El sulfato de sódico natural: Características generales y yacimientos. En: R. Lunar & R. Oyarzun (eds.). Yacimientos minerales. Técnicas de estudio – Tipos – Evolución metalogénica – Exploración. Centro de Estudios Ramón Areces, Madrid. 1991, 1211-1228.

Garrity G.M, Bell J.A, Lilburn T. Order III. *Rhodobacterales* ord nov. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edición, vol. 2. The Proteobacteria, part C, *The Alpha-, Beta, Gamma-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New-York: Springer. 2005, pp. 161.

Gell, P, Gasse F. Relationships between salinity and diatom flora from some Australian saline lakes 11th International Diatom Symposium California Academy of Sciences, pp. San Francisco, USA. 1990, 631–641.

Ghorbel B, Sellami A, Fakhfakh N, Haddar A, Manni L, Nasri M. Production and purification of calcium-dependent protease from *Bacillus cereus* BG1. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology* 2005; **32**, 186-194.

Gilbert JA, Mühling M, Joint I. A rare SAR11 fosmid clone confirming genetic variability in the '*Candidatus Pelagibacter ubique*' genome. *The ISME Journal* 2008; **2**, 790-793.

Giller Paul S, Malmqvist Bjorn. "The Biology of Streams and Rivers." Oxford University Press. 1998, pp 296

Giovannoni S.J, Foster R.A, Rappé M.S, Epstein S. New cultivation strategies bring more microbial plankton species into the laboratory. *Oceanography* 2007; **20**, 62–69.

Glauert A.M. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. En *Practical methods in electron microscopy*. Vol. 3. Part I (Glauert, A.M., ed.): North-Holland, Amsterdam. 1975, 1-207.

Glöckner F.O, Fuchs B.M, Amann R. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence *in situ* hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 1999; **65**, 3721-3726.

Gonzalez J.M, Whitman W.B, Hodson R.E, Moran M.A. Identifying numerically abundant culturable bacteria from complex communities: an example from a lignin enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology* 1996; **62**(12), 4433-4440.

González J.M, Simó R, Massana R, Covert J, Casamayor E.O, Pedrós-Alió C, Moran, M.A. Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing North Atlantic algal bloom *Applied and Environmental Microbiology* 2000; **66**(10): 4237-4246.

Gorshkova N.M, Ivanova E.P, Sergeev A.F, Zhukova N.V, Alexeeva Y, Wright J.P, Nicolau D.V, Mikhailov V.V, Christen R. *Marinobacter excellens* sp. nov., isolated from sediments of the sea of Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2003; **53**, 2073-2078.

Goto M. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *konjaci* subsp. nov., the causal agent of bacterial leaf Blight of Konjac (*Amorphophalus konjac* Koch.). *International Journal of Systematic Bacteriology* 1983; **33**(3), 539-545.

Gram L, Bundvad A, Melshorsen J, Johansen C, Fønnesbech Vogel B. Occurrence of *Shewanella algae* in Danish coastal water and effects of water temperature and culture conditions on its survival. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999; **65**, 3896-3900.

Green D.H, Bowman J.P, Smith E.A, Gutierrez T, Bolch C.J. *Marinobacter algicola* sp. nov., isolated from laboratory cultures of paralytic shellfish toxin-producing dinoflagellates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2006; **56**, 523-527.

Gremm T, Kaplan L. Dissolved carbohydrates in streamwater determined by HPLC and pulsed amperometric detection. *Limnology and Oceanography* 1997; **42**(2); 385-393.

Griebler C, Lueders T. Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshwater Biology* 2009; **54**, 649-677.

Gu J, Cai H, Yu S.L, Qu R, Yin B, Guo Y.F, Zhao J.Y, Wu X.L. *Marinobacter gudaonensis* sp. nov., isolated from an oilpolluted saline soil in a Chinese oilfield. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007; **57**, 250-254.

Gugkiandolo C, Lentini V, Maugeri T.. Distribution and diversity of Bacteria in a saline meromictic lake as determined by PCR-DGGE of 16S rRNA gene fragmenst. *Current Microbiology* 2011; **62**, 159-166.

Guyoneaud R, Mouné S, Eatock C, Bothorel V, Hirschler-Réa A, Willison J, Duran R, Liesack W, Herbert R, Matheron R, Caumette P. Characterization of three spiral-shaped purple nonsulfur bacteria isolated from coastal lagoon sediments, saline sulfur springs, and microbial mats: emended description of the genus *Roseospira* and description of *Roseospira marina* sp. nov., *Roseospira navarrensis* sp. nov., and *Roseospira thiosulfatophila* sp. nov. *Archive in Microbiology* 2002; **178**, 315-324.

Haki G, Rakshit S. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 2003; **89**, 17-34.

Hall T.A. Bioedit: a user-friendly biology sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 1999; 95-98.

Hammer O, Harper D.A.T, Ryan P.D. PAST: Paleontological Statistic software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 2001; **4**(1), pp. 9.

Harms G, Zengler K, Rabus R, Aeckersberg F, Minz D, Roselló-Mora R., Widdel F. Anaerobic oxidation of o-xylene, m-xylene, and homologous alkylbenzenes by new types of sulfate-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 1999; **65**(3), 999-1004.

Heylen K, Vanparys B, Peirsegaale F, Lebbe L, De Vos P. *Stenotrophomonas terrae* sp. nov. and *Stenotrophomonas humi* sp. nov., two nitrate-reducing bacteria isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007; **57**, 2056-2061.

Hildebrandt P, Wanarska M, Kur J. A new cold-adapted β -D-galactosidase from the Antarctic *Arthrobacter* sp. 32c – gene cloning, overexpression, purification and properties. *BMC Microbiology* 2009; **9**(151), 1-11.

Hiraishi A, Furuhashi K, Matsumoto A, Koike K, Fukuyama M, Tabuchi K. Phenotypic and genetic diversity of chlorineresistant *Methylobacterium* strains isolated from various environments. *Applied and Environmental Microbiology* 1995; **61**, 2099–2107.

Hiraishi A, Muramatsu K, Ueda Y. Molecular genetic analyses of *Rhodobacter azotoformans* sp. nov. and related species of phototrophic bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 1996; **19**, 168-177

Hiraishi A, Muramatsu K, Urata K. Characterization of new denitrifying *Rhodobacter* strains isolated from photosynthetic sludge for wastewater treatment. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1995; **79**, 39-44.

Hirayama H, Sunamura M, Takai K, Nunoura T, Noguchi T, Oida H, Furushima Y, Yamamoto H, Oomori T, Horikoshi K. Culture-dependent and -independent characterization of microbial communities associated with a shallow submarine hydrothermal system occurring within a coral reef off Taketomi island, Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 2007; **73**(23): 7642–7656.

Holmes D.E; Nevin K.P; Woodard T.L; Peacock A.D, Lovley D.R. *Prolixibacter bellariivorans* gen. nov., sp. nov., a sugar-fermenting, psychrotolerant anaerobe of the phylum *Bacteroidetes*, isolated from a marine-sediment fuel cell. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007; **57**, 701-707.

Huber J, Butterfield D.A, Baross, J.A. Bacterial diversity in a subseafloor habitat following a deep-sea volcanic eruption. *FEMS Microbiology Ecology* 2003; **43**:393-409.

Huber T, Faulkner G, Hugenholtz P. BELLEROPHON: a program to detect chimeric sequences in multiple alignments. *Bioinformatics* 2004; **20**, 2317–2319

Hübner U, Bock U, Schügerl K. Production of alkaline serine protease subtilisin Carlsberg by *Bacillus licheniformis* on complex medium in a stirred tank reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1993; **40**, 182-188.

Hull D.L. The ideal species concept-and why we can't get it. In: Species: the Units of Biodiversity (Claridge, M.F., Dawah, H.A. and Wilson, M.R., Eds.), Chapman and Hall, London. 1997, pp. 357-380.

Humayoun S.B, Bano N, Hollibaugh J.T. Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda lake in California. *Applied and Environmental Microbiology* 2003; **69**, 1030–1042.

Hungate, R.E. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. En: Methods in Microbiology, Vol. 3B (Norris, J.R. and Ribbons, D.W., Eds.). Academic Press, London. 1969, pp. 117-132.

Huu N.B, Denner E.B, Ha D.T, Wanner G, Stan-Lotter H. *Marinobacter aquaeolei* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1999; **49**, 367-375.

Hwang C.Y, Kim M.H, Bae G.D, Zhang G.I, Kim Y.H, Cho B.C. *Muricauda olearia* sp. nov., isolated from crude-oil contaminated seawater, and emended description of the genus *Muricauda*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2009; **59**, 1856-1861.

Imhoff J. Phylogenetic taxonomy of the family *Chlorobiaceae* on the basis of 16S rRNA and fmo (Fenna– Matthews–Olson protein) gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2003; **53**, 941–951.

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

Inagaki F, Takai K, Kobayashi H, Nealson K.H, Horikoshi K. *Sulfurimonas autotrophica* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing epsilon-proteobacterium isolated from hydrothermal sediments in the mid-Okinawa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2003; **53**, 1801–1805.

Ivanova E.P, Kiprianova E.A, Mikhailov V.V, Levanova G.F, Garagulya A.D, Gorskova N.M, Vysotskii M.V, Nicolau D.V, Yumoto N, Taguchi T, Yoshikawa S. Phenotypic diversity of *Pseudoalteromonas citrea* from different marine habitats and emendation of the description. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1998; **48**, 247-256

Ivanova E.P, Onyshchenko O.M, Christen R, Lysenko A.M, Zhukova N.V, Shevchenko L.S, Kiprianova E.A. *Marinomonas pontica* sp. nov., isolated from the Black Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005; **55**, 275-279.

Iwata K, Azlan A, Yamakawa H, Omori T. Ammonia accumulation in culture broth by the novel nitrogen-fixing bacterium, *Lysobacter* sp. E4. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2010; **110** (4), 415-418.

Janssen P, Yater P.S, Grinton B.E, Taylor P.M, Sait M. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* and *Verrucomicrobia*. *Applied and Environmental Microbiology* 2002; **68**, 2391-2396.

Janvier M, Frehel C, Grimont F, Gasser F. *Methylophaga marina* gen. nov., sp. nov. and *Methylophaga thalassica* sp. nov., marine methylotrophs. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1985; **35**, 131-139

Joshi A.A, Kanekar P.P, Kelkar A.S, Shouche Y.S, Vani A.A, Borgave S.B, Sarnaik S.S. Cultivable bacterial diversity of alkaline Lonar lake, India. *Microbial Ecology* 2008; **55**, 163-172.

Jiang H, Dong H, Ji S, Ye Y, Wu N. Microbial diversity in the deep marine sediments from the Qiongdongnan Basin in South China Sea. *Geomicrobiol Journal* 2007; **24**, 505-517.

Jiang H, Dong H, Yu B, Lv G, Deng S, Wu Y, Dai M, Jiao N. Abundance and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in saline lakes on the Tibetan plateau. *FEMS Microbiology Ecology* 2009; **67**, 268-278.

Jiang H, Dong H, Zhang G, Yu B, Chapman L. R, Fields M.W. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. *Applied and Environmental Microbiology* 2006; **72**, 3832– 3845.

Jones B.E; Grant W.D; Duckworth A.W; Schumann P; Weiss N; Stackebrandt E.. *Cellulomonas bogoriensis* sp. nov., an alkaliphilic cellulomonad. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005; **55**, 1711–1714

Joulian C, Ollivier B, Patel B.K.C, Roger P.A. Phenotypic and phylogenetic characterization of dominant culturable methanogens isolated from ricefield soils. *FEMS Microbiology Ecology* 1998; **25**, 135-145

Judd K, Crump B, Kling G. Variation in dissolved organic matter controls bacterial production and community composition. *Ecology* 2006; **87**, 2068–2079.

Jumas-Bilak E, Carlier J.P, Jean-Pierre H, Citron D, Bernard K, Damay A, Gay B, Teyssier C, Campos J, Marchandin H. *Jonquetella anthropi* gen. nov., sp. nov., the first member of the candidate phylum 'Synergistetes' isolated from man. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007; **57**, 2743-2748.

Jumas-Bilak E, Roudière L, Marchandin H. Description of 'Synergistetes' phyl. nov. and emended description of the phylum 'Deferribacteres' and of the family *Syntrophomonadaceae*, phylum 'Firmicutes'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2009; **59**(5), 1028-35.

Jukes, T. H. & Cantor, C. R. Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*. Edited by H. H. Munro. New York: Academic Press. 1969, pp. 21-123.

Jungblut A.D, Hawes I, Mountfort D, Hitzfeld B, Dietrich D.R, Burns B.P, Neilan B.A. Diversity within cyanobacterial mat communities in variable salinity meltwater ponds of McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Environmental Microbiology* 2005; **7**, 519–529.

Jung-Hoon Y, So-Jung K, Sooyeon P, Tae-Kwang O. *Caenispirillum bisanense* gen. nov., sp. nov., isolated from sludge of a dye works. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007; **57**, 1217-1221.

Jurado V, Gonzalez J.M, Laiz L, Saiz-Jimenez C. *Aurantimonas altamirensis* sp. nov., a member of the order *Rhizobiales* isolated from Altamira Cave. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2006; **56**, 2583-2585.

Kaartokallio H, Laamanen M, Sivonen K. Responses of Baltic sea ice and open-water natural bacterial communities to salinity change. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; **71**(8), 4364-4371.

Kalyuznaya M.G, De Marco P, Bowerman S, Pacheco C.C, Lara J.C, Lidstrom M.E, Chistoserdova L. *Methyloversatilis universalis* gen. nov., sp. nov., a novel taxon within the *Betaproteobacteria* represented by three methylotrophic isolates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2006; **56**, 2517-2522.

Kämpfer P, Ruppel S, Remus R. *Enterobacter radicincitans* sp. nov., a plant growth promoting species of the family *Enterobacteriaceae*. *Systematic and Applied Microbiology* 2005; **28**, 213-221

Kan J, Evans S.E, Chen F, Suzuki M.T. Novel estuarine bacterioplankton in rRNA operon libraries from the Chesapeake Bay. *Aquatic Microbial Ecology* 2008; **51**, 55–66.

- Kang H.S, Yang H.L, Lee S.D. *Nitratireductor kimnyeongensis* sp. nov., isolated from seaweed. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2009; **59**, 1036-1039.
- Kato S, Kobayashi C, Kakegawa T, Yamagishi A. Microbial communities in iron-silica-rich microbial mats at deep-sea hydrothermal fields of the Southern Mariana Trough. *Environmental Microbiology* 2009; **11**(8), 2094-2111.
- Kawasaki H, Hoshino Y, Kuraishi Y, Yamasato K. *Rhodocista centenaria* gen. nov., sp. nov., a cystforming anoxygenic photosynthetic bacterium and its phylogenetic position in the *Proteobacteria* alpha group. *The Journal of General and Applied Microbiology* 1992; **38**, 541-551.
- Kebbouche-Gana S, Gana M.L, Khemili S, Fazouane-Naimi F, Bouanane N.A, Penninckx M, Hacene H. Isolation and characterization of halophilic Archaea able to produce biosurfactants. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2009; **36**, 727-738.
- Keith S.M, McFarlane G.T, Herbert R.A. Dissimilatory nitrate reduction by a strain of *Clostridium butyricum* isolated from estuarine sediments. *Archives of Microbiology*, 1982; **132**(1), 62-66.
- Kim H.G, Doronina N.V, Trotsenko Y.A, Kim S.W. *Methylophaga aminisulfidivorans* sp. nov., a restricted facultatively methylotrophic marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007; **57**, 2096-2101.
- Kim K.H, Roh S.W, Chang H.W, Nam Y.D, Yoon J.H, Jeon C.O, Oh H.M, Bae J.W. *Nitratireductor basaltis* sp. nov., isolated from black beach sand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2009; **59**, 135-138.
- Kim M.S, Hoa K.T.Q, Baik K.S, Park S.C, Seong C.N. *Aurantimonas frigidaquae* sp. nov., isolated from a water-cooling system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2008; **58**, 1142-1146.
- Knittel K, Kuever J, Meyerdierks A, Einke R, Amann R, Brinkhoff T. *Thiomicrospira arctica* sp. nov. and *Thiomicrospira psychrophila* sp. nov., psychrophilic, obligately chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacteria isolated from marine Arctic sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005; **55**, 781-786.
- Kirchman D.L, Dittel A.I, Malmstrom R.R, Cottrell M.T. Biogeography of major bacterial groups in the Delaware Estuary. *Limnology and Oceanography* 2005; **50**, 1697-1706.
- Kirchman D, Sigda J, Kapuscinski R, Mitchell R.. Statistical analysis of the direct count method for enumerating bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 1982; **44**, 376-382.
- Knauth L.P. Salinity history of the Earth's early ocean. *Nature* 1998; **395**, 554-555.

- Kolber Z.S, Plumley F.G, Lang A.S, Beatty J.T, Blankenship R.E, VanDover C.L, Vetriani C, Koblizek M, Rathgeber C, Falkowski PG. Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean. *Science* 2001; **292**, 2492-2495.
- Koller M, Hesse P, Bona R, Kutschera C, Atlic A, Brauneegg G. Potential of various archae- and eubacterial strains as industrial polyhydroxyalkanoate producers from whey. *Macromolecular Bioscience* 2007; **7**, 218-226.
- Konopka A. What is microbial community ecology?. *The ISME Journal* 2009; **3**, 1223-1230.
- Kremen C, Colwell R.K, Erwin T.L, Murphy D.D, Noss R.F, Sanjayan M.A. Terrestrial arthropod assemblages: their use in conservation planning. *Conservation Biology* 1993; **7**, 796-808.
- Kucho K, Okamoto K, Tsuchiya Y, Nomura S, Nango M, Kanehisa M, Ishiura M. "Global analysis of circadian expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803". *The Journal of Bacteriology* 2005; **187** (6), 2190–2199.
- Kuever J, Rainey F.A, Widdel F. Genus X. *Desulfosarcina* Widdel 1981, 382^{VP} (Effective publication: Widdel 1980, 382). En: D.J. BRENNER, N.R. KRIEG, J.T. STALEY and G. M. GARRITY (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition, vol. 2 (The *Proteobacteria*), part C (The *Alpha-*, *Beta-*, *Delta-*, and *Epsilonproteobacteria*), Springer, New York, 2005, pp. 981-984
- Kunte H.J, Truper H.G, Stan-Lotter H. Halophilic microorganisms. En: G. Horneck and C. Baumstark-Khan (ed.), *Astrobiology, the quest for the conditions of life*. Springer, Koln, Germany. 2002, pp 185-200.
- Kwon K.K, Lee H.S, Jung H.B, Kang J.H, Kim S.J. *Yeosuana aromativorans* gen. nov., sp. nov., a mesophilic marine bacterium belonging to the family *Flavobacteriaceae*, isolated from estuarine sediment of the South Sea, Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2006; **56**, 727-732.
- LaBaugh JW. Chemical characteristics of water in northern prairie wetlands. En Valk AV. Ames (Eds). *Northern Prairie Wetlands*. Iowa University Press. 1989, 57-90.
- Labbé N, Parent S, Villemur R. *Nitratireductor aquibiodomus* gen. nov., sp. nov., a novel α -proteobacterium from the marine denitrification system of the Montreal Biodome (Canada). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2004; **54**, 269-273.
- Lai Q, Qiao N, Wu C, Sun F, Yuan J, Shao Z. *Stappia indica* sp. nov., isolated from deep seawater of the Indian Ocean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2010; **60**, 733-736.

Lai Q, Yu Z, Yuan J, Sun F, Shao Z. *Nitratireductor indicus* sp. nov., isolated from deep-sea water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2011; **61**, 295-298.

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

Lai Q, Yuan J, Wu C, Shao Z. *Oceanibaculum indicum* gen. nov., sp. nov., isolated from deep seawater of the Indian Ocean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2009a; **59**(7), 1733-1737.

Lakshmi K.V.N.S, Sasikala C, Ashok Kumar G.V, Chandrasekaran R, Ramana C.V. *Phaeovibrio sulfidiphilus* gen. nov., sp. nov., phototrophic alphaproteobacteria isolated from brackish water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2011; **61**, 828-833.

Langenheder S, Lindström E.S, Tranvik L.J. Weak coupling between community composition and functioning in aquatic bacteria. *Limnology and Oceanography* 2005; **50**, 957-967.

Langenheder S, Ragnarsson H. The role of environmental and spatial factors for the composition of aquatic bacterial communities. *Ecology* 2007; **88**, 2154-2161.

Lanyi JK. Bacteriorhodopsin as a model for proton pumps. *Nature (Lond)* 1995; **75**:461-463

Lau K.W.K, Ng C.Y.M, Ren J, Lau S.C.L, Qian P.Y, Wong P.K, Lau T.C, Wu M. *Owenweeksia hongkongensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium of the phylum 'Bacteroidetes'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005; **55**, 1051-1057.

Lau S.C.K.; Tsoi M.M.Y; Li X; Plakhotnikova I; Dobretsov S; Wu M; Wong P.K; Pawlik J.R; Qian P.Y. Description of *Fabibacter halotolerans* gen. nov., sp. nov. and *Roseivirga spongicola* sp. nov., and reclassification of [*Marinicola*] *seohaensis* as *Roseivirga seohaensis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2006; **56**, 1059-1065.

Lauro F.M, McDougald D, Thomas T, Williams T.J, Eganb S, Ricc S, DeMaereb M, Ting L, Ertanb H, Johnson J, Ferrierae S, Lapidusf A, Anderson I, Kyrpides N, Munk C, Detterg C, Hang C.S, Brown M.B, Robb F, Kjelleberg S, Cavicchiolia R. The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009; **106**(37), 15527-15533.

- Le-Borgne S, Paniagua D, Vazquez-Duhalt R. Biodegradation of organic pollutants by halophilic Bacteria and Archaea. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2008; **15**, 74-92.
- Leclerque A, Kleespies R.G. "16S rRNA-, GroEL- and MucZ-based assessment of the taxonomic position of '*Rickettsiella melolonthae*' and its implications for the organization of the genus *Rickettsiella*". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2008; **58**(4), 749-55.
- Lee S, Fuhrman J.A. Spatial and temporal variation of natural bacterioplankton assemblages studied by total genomic DNA cross-hybridization. *Limnology and Oceanography* 1991; **36**, 1277-1287.
- Leps J, Smilauer P. Multivariate analysis of ecological data using CANOCO. Cambridge University Press. 2003.
- Ley R.E, Harris J.K, Wilcox J, Spear J.R, Miller S.R, Bebout B.M, Maresca J.A, Bryant D.A, Sogin M.L, Pace N.R. Unexpected diversity and complexity of the Guerrero Negro hypersaline microbial mat. *Applied and Environmental Microbiology* 2006; **72**(5), 3685-3695.
- Li T, Wang P.X. Microbial diversity in surface sediments of the Xisha Trough the South China Sea. *Sheng Tai Xue Bao* 2008; **28** (3), 1166-1173.
- Lindström E.S, Miranda P, Kamst-Van A, Gabriel Z. Distribution of typical Freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature, and Lake water retention time *Applied and Environmental Microbiology* 2005; **71**(12), 8201-8206.
- Litchfield C.D, Gillevet PM. Microbial diversity and complexity in hypersaline environments: a preliminary assessment. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2002; **28**, 48–55.
- Liu C, Wu Y, Li L, Ma Y, Shao Z. *Thalassospira xiamenensis* sp. nov. and *Thalassospira profundimaris* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007; **57**, 316-320.
- Liu Y, Jin J.H, Liu Y.H, Zhou Y.G, Liu Z.P. *Dongia mobilis* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Rhodospirillaceae* isolated from a sequencing batch reactor for treatment of malachite green effluent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2010; **60**, 2780-2785.
- Llirós M, Gich F, Plasencia A, Auguet J.C, Darchambeau F, Casamayor E.O, Descy J.P, Borrego C. Vertical distribution of ammonia-oxidizing Crenarchaeota and Methanogens in the epipelagic waters of Lake Kivu (Rwanda-Democratic Republic of the Congo). *Applied and Environmental Microbiology* 2010; **76**(20), 6853-6863.

- López-López A, Pujalte M.J, Benlloch S, Mata-Roig M, Rossello-Mora R, Garay E, Rodriguez-Valera F. *Thalassospira lucentensis* gen. nov., sp. nov., a new marine member of the α -Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2002; **52**, 1277–1283.
- Lovley D.R, Phillips E.J.P. Novel mode of microbial energy metabolism, organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Applied and Environmental Microbiology* 1988; **54**, 1472-1480.
- Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; **71**, 8228–8235
- Lozupone C, Knight R. Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007; **104**(27), 11436–11440
- Lowe M, Madsen E.L, Schindler K, Smith C, Emrich S, Robb F, Halden R.U. Geochemistry and microbial diversity of a trichloroethene-contaminated Superfund site undergoing intrinsic in situ reductive dechlorination. *FEMS Microbiology Ecology* 2002; **40**(2), 123-134.
- Madsen E.L. Identifying microorganisms responsible for ecologically significant biogeochemical processes. *Nature Reviews Microbiology* 2005; **3**, 439-446.
- Maeda R, Nagashima H, Widada J, Iwata K, Omori T. Novel marine carbazole-degrading bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 2009; **292**, 203-209.
- Maidak B.L, Cole J.R, Lilburn T.G, Parker C.T, Saxman P.R, Farris R.J, Garrity G.M, Olsen G.J, Schmidt T.M, Tiedje J.M. The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Research* 2001; **29**, 173–174.
- Magot M, Ravot G, Campaignolle X, Ollivier B, Patel B.K.C, Fardeau M.L, Thomas P, Crolet J.L, Garcia J.L. *Dethiosulfobivrio peptidovorans* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic, slightly halophilic, thiosulfate-reducing bacterium from corroding offshore oil wells. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1997; **47**, 818-824.
- Mancinelli R.L. Microbial life in brines, evaporites and saline sediments: the search for life on Mars. En: Tetsuya Tokano (Ed.). *Water on Mars and Life, Adv. Astrobiol. Biogeophys.* 2005, pp. 277-297.
- Manske A.K, Glaeser J, Kuypers M.M.M, Overmann J. Physiology and phylogeny of green sulfur bacteria forming a monospecific phototrophic assemblage at a depth of 100 meters in the Black Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; **71**, 8049-8060.

Manz W, Amann R, Ludwig W, Wagner M, Schleifer K.H. Phylogenetic oligonucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology* 1992; **15**, 593-600.

Marchandin H, Carrier C, Sirot D, Jean-Pierre H, Darbas H. TEM-24 Produced by Four Different Species of *Enterobacteriaceae*, Including *Providencia rettgeri*, in a Single Patient. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1999; **43**(8), 2069-2073.

Margesin R, Schinner F. Potential of halotolerant and halophilic microorganism for biotechnology. *Extremophiles* 2001; **5**, 73-83.

Marmur J, Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *Journal of Molecular Biology* 1962; **5**, 109-118.

Marrakchi M, Dzyadevych S.V, Lagarde F, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Conductometric biosensor based on glucose oxidase and beta-galactosidase for specific lactose determination in milk. *Material Science and Engineering C*. 2008; **28**, 872-875.

Martin S, Márquez M.C, Sánchez-Porro C, Mellado E, Arahál D.R, Ventosa A. *Marinobacter lipolyticus* sp. nov., a novel moderate halophile with lipolytic activity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2003; **53**, 1383-1387.

Martínez-Murcia A, Monera A, Alperi A, Figueras, M.J, Saavedra, M.J. Phylogenetic evidence suggests that strains of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* belong to the species *Aeromonas aquariorum* sp. nov. *Current Microbiology* 2009; **58**, 76-80.

Maszenan, A.M., Seviour, R.J., Patel, B.K.C., Janssen, P.H. & Wanner, J. *Defluvicoccus vanus* gen. nov., sp. nov., a novel Gram-negative coccus/coccobacillus in the ' α -Proteobacteria' from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005; **55**, 2105-2111.

Maturrano L, Santos F, Rosselló-Móra R, Antón J. Microbial Diversity in Maras Salterns, a Hypersaline Environment in the Peruvian Andes. *Applied and Environmental Microbiology* 2006; **72**(6), 3887-3895.

Maugeri T.L, Gugliandolo C, Caccamo D, Panico A, Lama L, Gambacorta A, Nicolaus B. A halophilic thermotolerant *Bacillus* isolated from a marine hot spring able to produce a new exopolysaccharide. *Biotechnology Letters* 2002; **24**, 515-519.

Mayden R.L. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. En: Claridge M.F, Dawah H.A., Wilson M.R. (Eds.). *Species: the Units of Biodiversity*. Chapman and Hall, London. 1997, pp. 381-24.

McCune B, Mefford M. PC-ORD. Multivariate analysis of ecological data. Version 4.0. MjM Software Design. Gleneden beach, Oregon. 1999.

Mendes R.E, Denys G.A, Fritsche T.R, Jones R.N. Case report of *Aurantimonas altamirensis* blood stream infection. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; **7**, 2435-2437.

Mendoza Vargas H. *Acuarelas y dibujos de Henry Price para la Comisión Corográfica de la Nueva Granada*. *Invest. Geog* [online]. ISSN 0188-4611. 2008, n.66, pp.161-163.

Mergaert J, Lednická D, Goris J, Cnockaert M.C, De Vos P, Swings J. Taxonomic study of *Cellvibrio* strains and description of *Cellvibrio ostraviensis* sp. nov., *Cellvibrio fibrivorans* sp. nov. and *Cellvibrio gandavensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2003; **53**, 465-471.

Mesbah N.M, Abou-El-Ela SH, Wiegel J. Novel and unexpected prokaryotic diversity in water and sediments of the alkaline, hypersaline lakes of the Wadi An Natrun, Egypt. *Microbial Ecology* 2007; **54**, 598-617.

Mesbah N.M, Wiegel J. *Natronovirga wadinatrunensis* gen. nov., sp. nov. and *Natranaerobius trueperi* sp. nov., halophilic, alkalithermophilic micro-organisms from soda lakes of the Wadi An Natrun, Egypt. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2009; **59**, 2042-2048.

Miller E.S, Woese C.R, Brenner S. Description of the erythromycin-producing bacterium *Arthrobacter* sp. strain NRRL B-3381 as *Aeromicrobium erythreum* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1991; **41**, 363-368.

Miller G. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 1959; **3**, 426-428.

Moeseneder, M.M., Arrieta, J.M., Muyzer, G., Winter, C. & Herndl, G. Optimization of Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 1999; **65**(8), 3518-3525.

Mohamed NM, Saito K, Tal Y, Hill RT. Diversity of aerobic and anaerobic ammonia-oxidizing bacteria in marine sponges. *The ISME Journal* 2010; **4**(1), 38-48.

Mohn W.W, Wilson A.E, Bicho P, Moore E.R. Physiological and phylogenetic diversity of bacteria growing on resin acid. *Systematic and Applied Microbiology* 1999; **22** (1), 68-78.

Moore E.R.B, Mihaylova S.A, Vandamme P, Krichevsky M.I, Dijkshoorn L.D.. Microbial systematic and taxonomy: relevance for a microbial commons. *Research in Microbiology* 2010; **161**:430-438.

Müller-Santos M, de Souza E.M, Pedrosa F, Mitchell D.A, Longhi S, Carriere F, Canaan S, Krieger N. First evidence for the salt-dependent folding and activity of an

esterase from the halophilic archaea *Haloarcula marismortui*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009; **1791**(8), 719-729.

Mukamolova G.V, Yanopolskaya N.D, Kell D.B, Kaprelyants A.S. On resuscitation from the dormant state of *Micrococcus luteus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1998; **73**, 237-243.

Muyzer G, Brinkhoff T, Nübel U, Santegoed C, Schäfer H, Wawer C. En A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas, F.J. de Bruijn (Eds). "Molecular Microbial Ecology Manual", Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 1998, pp. 1-27.

Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 1993; **59**, 695–700.

Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 1998; **73**:127-141.

Muyzer G, Teske A, Wirsén C, Jannasch H. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives of Microbiology* 1995; **164**, 165–172.

Na H, Kim S, Moon E.Y, Chun J. *Marinifilum fragile* gen. nov., sp. nov., isolated from tidal flat sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2009; **59**, 2241-2246.

Najafi M, Kembhavi A. One step-purification and characterization of an extracellular α -amylase from marine *Vibrio* sp. *Enzyme and Microbial Technology* 2005; **36**(4), 535-539.

Nakagawa S, Takai K, Inagaki F, Hirayama H, Nunoura T, Horikoshi K, Sako Y. Distribution, phylogenetic diversity and physiological characteristics of epsilon-proteobacteria in a deep-sea hydrothermal field. *Environmental Microbiology* 2005; **7**, 1619-1632.

Niederberger T.D, Perreault N.N, Lawrence J.R, Nadeau J.L, Mielke R.E, Greer C.W, Andersen D.T, Whyte L.G. Novel sulfur-oxidizing streamers thriving in perennial cold saline springs of the Canadian high Arctic. *Environmental Microbiology* 2009; **11**(3), 616–629.

Nishihara H, Igarashi Y, Kodama T. *Hydrogenovibrio marinus* gen. nov., sp. nov., a marine obligately chemolithoautotrophic hydrogen-oxidizing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1991; **41**, 130-133.

Nishino S.F, Spain J. Degradation of nitrobenzene by a *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 1993; **59**(8):2520-2525.

Nolasco H, Kushner D, Ochoa J.L. Purification and properties of an extracellular halophilic serine-protease from *Haloflex Mediterranei*. *Journal of the Mexican Chemical Society* 2002; **46**(3), 202-211.

Norman B, Zscheifel U.L, CS Hopkinson J, Fry B. Production and utilization of dissolved organic carbon during an experimental diatom bloom. *Limnology and Oceanography* 1995; **40**, 898-907.

Noss R.F. Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical approach. *Conservation Biology* 1990; **4**, 355-364.

Oberbeckmann S, Wichels A, Maier T, Kostrzewa M, Raffelberg S, Gerds G. A polyphasic approach for the differentiation of environmental *Vibrio* isolates from temperate waters. *FEMS Microbiology Ecology* 2011; **75**(1), 145-162.

Obernosterer I, Herndl G.J. Phytoplankton extracellular release and bacterial growth: dependence on the inorganic N:P ratio. *Marine Ecology Progress Series* 1995; **116**, 247-257.

Ochsenreiter T, Pfeifer F, Schleper C. Diversity of *Archaea* in hypersaline environments characterized by molecular-phylogenetic and cultivation studies. *Extremophiles* 2002; **6**, 267-274.

Ogg C, Patel B.K.C.. *Caloramator australicu* sp. nov., a thermophilic anaerobic bacterium from the Great Artesian Basin of Australia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2009; **59**, 95-101.

O'Hara C.M, Steigerwalt A.G, Hill B.C, Farmer III J.J, Fanning G.R, Brenner D.J. *Enterobacter hormaechei*, a new species of the family *Enterobacteriaceae* formerly known as Enteric Group 75. *Journal of Clinical Microbiology* 1989; **27**, 2046-2049.

Olsen G.J, Lane D.J, Giovannoni S.J, Pace N.R, Stahl D.A. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *The Annual Review of Microbiology* 1986; **40**, 337-365.

Onishi H, Sonoda K. Purification and some properties of an extracellular amylase from a moderate halophile, *Micrococcus halobius*. *Applied and Environmental Microbiology* 1979; **38** (4), 616-620.

Oren A. Molecular ecology of extremely halophilic archaea. *FEMS Microbiology Reviews* 1994; **13**, 415-440.

Oren A. 2002. Molecular ecology of extremely halophilic *Archaea* and *Bacteria*. *FEMS Microbiology Ecology* 2002; **39**, 1-7.

Oren A. Life at high salt concentrations, En: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. 3rd ed. Springer-Verlag, New York (Electronic publication). 2006.

Oren A. The order *Haloanaerobiales*. En Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (Eds). *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria Volume 4*. 3rd edition. New York: Springer. 2006b. 804-817.

O'Sullivan L, Rinna J, Humphreys G, Weightman A, Fry J. Culturable phylogenetic diversity of the phylum 'Bacteroidetes' from river epilithon and coastal water and description of novel members of the family *Flavobacteriaceae*: *Epilithonimonas tenax* gen. nov., sp. nov. and *Persicivirga xylanidelens* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2006; **56**, 169-180.

Ouverney C.C, Fuhrman J.A. Increase in fluorescence intensity of 16S rRNA in situ hybridization in natural samples treated with chloramphenicol. *Applied and Environmental Microbiology* 1997; **63**, 2735-2740.

Overmann J. Green sulfur bacteria. En: D.R. Boone, R. W. Castenholz (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2 nd Edition, Volume I*. Springer-Verlag, New York. 2001, pp. 601-605

Øvreås L, Torsvik V. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microbial Ecology* 1998; **36**, 303-315.

Pagaling E, Wang H, Venables M, Wallace A, Grant W.D, Cowan D.A, Jones B.E, Ma Y, Ventosa A, Heaphy S. Microbial Biogeography of Six Salt Lakes in Inner Mongolia, China, and a Salt Lake in Argentina. *Applied and Environmental Microbiology* 2009, **75**(18), 5750-5760.

Paine S.G, Stansfield H. Studies in Bacteriosis. III. A bacterial leafspot disease of *Protea cynaroides*, exhibiting a host reaction of possibly bacteriolytic nature. *Annals of Applied Biology* 1919; **6**, 27-39.

Park J.H, Kim R, Aslam Z, Jeon C.O, Chung Y.R. *Lysobacter capsici* sp. nov., with antimicrobial activity, isolated from the rhizosphere of pepper, and emended description of the genus *Lysobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2008; **58**, 387-392.

Pedersen K. The deep subterranean biosphere. *Earth-Science Reviews* 1993; **34**, 243-260.

Pedersen K, Arlinger J, Hallbeck L, Pettersson C. Diversity and distribution of subterranean bacteria in groundwater at Oklo in Gabon, Africa, as determined by 16S rRNA gene sequencing. *Molecular Ecology* 1996; **5**, 427-436.

Pedersen K, Ekendahl S. Distribution and activity of bacteria in deep granitic groundwaters of southeastern Sweden. *Microbial Ecology* 1990; **20**, 37-52.

Peng G, Zhang W, Luo H, Xie H, Lai W, Tan, Z. *Enterobacter oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the wild rice species *Oryza latifolia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2009; **59**, 1650-1655

- Peplies J, Kottmann R, Ludwig W, Glöckner F. A standard operating procedure for phylogenetic inference (SOPPI) using (rRNA) marker genes. *Systematic and Applied Microbiology* 2008; **31**, 251-257.
- Pernthaler J. Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nature Reviews Microbiology* 2005; **3**, 537–546.
- Pernthaler J, Glöckner F.O, Schönhuber W, Amann R. Fluorescence in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes. En: J. Paul (Ed.). *Methods in Microbiology: Marine Microbiology*. Academic Press Ltd, San Diego, USA. vol.30. 2001, p. 207-226.
- Perreault N.N, Andersen D.T, Pollard W.H, Greer C.W, Whyte L.G. Characterization of the prokaryotic diversity in cold saline perennial springs of the Canadian high Arctic. *Applied and Environmental Microbiology* 2007; **73**(5), 1532–1543
- Perreault N.N, Greer C.W, Andersen D.T, Tille S, Lacrampe-Couloume G, Sherwood Lollar B, Whyte L. Heterotrophic and autotrophic microbial populations in cold perennial springs of the high Arctic. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008; **74**(22), 6898-6907.
- Pfennig N, Lunsdorf H, Suling J, Imhoff J.F. *Rhodospira trueperi*, gen. nov. and sp. nov., a new phototrophic proteobacterium of the alpha-group. *Archives of Microbiology* 1997; **168**, 39-45.
- Pinhassi J, Sala M.M, Havskum H, Peters F, Guadayol O, Malits A, Marrase C.L. Changes in bacterioplankton composition under different phytoplankton regimens. *Applied and Environmental Microbiology* 2004; **70**, 6753-6766.
- Pino J.I. Reconocimiento arqueológico en el Salado de Consotá. En: López C., Cano, M. (Eds). *Cambios Ambientales en Perspectiva Histórica*. Ecorregión del Eje Cafetero. Universidad Tecnológica de Pereira, Programa Ambiental GTZ. Pereira, Colombia. 2004, pp. 237-255.
- Poly F, Monrozier L.J, Bally R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology* 2001; **152**, 95-103.
- Polz M.F, Cavanaugh C. Bias in template-to-product in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 1998; **64**(10), 3724-3730.
- Porter K.G, Feig Y.S. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 1980; **25**, 943-948.
- Porter K, Kukkaro P, Bamford J.K, Bath C, Kivela H.M, Dyall-Smith M.L, Bamford DH. SH1: A novel, spherical halovirus isolated from an Australian hypersaline lake. *Virology* 2005; **335**:22-33.

Porter M.L, Engel A.S, Kane T.C, Kinkle B.K. Productivity-diversity relationships from chemolithoautotrophically based sulfidic karst systems. *International Journal of Speleology* 2009; **28**(1), 27-40.

Portillo M.C, Gonzalez J.M. Statistical differences between relative quantitative molecular fingerprints from microbial communities. *Antonie van Leeuwenhoek* 2008; **94**, 157-163.

Posada Y, Pachón L, Agudelo A, Álvarez E, Díaz C, Fardeau M.L, Joulian C, Ollivier B, Baena S. Cuantificación, aislamiento e identificación de comunidades anaerobias amilolíticas de un manantial termomineral de Paipa, Boyacá. *Revista Colombiana de Biotecnología* 2004 VI (2), 90-100.

Purdy K.J, Nedwell D.B, Embley T.M. Analysis of the sulfate-reducing bacterial and methanogenic archaeal populations in contrasting Antarctic sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 2003; **69**(6), 3181-3191.

Ramani K, Chockalingam E, Sekaran G. Production of a novel extracellular acid lipase from *Pseudomonas gessardii* using slaughterhouse waste as a substrate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2010; **37**(5), 531-535.

Ramette A, Tiedje J. Biogeography: an emerging cornerstone for understanding prokaryotic diversity, ecology, and evolution. *Microbial Ecology* 2007; **53**, 197-207.

Rappé M.S, Kemp P.F, Giovannoni S.J. Phylogenetic diversity of marine coastal picoplankton 16S rRNA genes cloned from the continental shelf off Cape Hatteras, North Carolina. *Limnology and Oceanography* 1997; **42**, 811-826.

Redburn A.C. Patel B.K.C. Phylogenetic analysis of *Desulfotomaculum thermobenzoicum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *FEMS Microbiology Letters* 1993; **113**, 81-86.

Ree G.N, Patel B.K.C, Grassia G.S, Sheehy A.J. *Anaerobaculum thermoterrenum* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic bacterium which ferments citrate. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1997; **47**, 150-154.

Reichenbach H. The genus *Lysobacter*. En: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer K-H (Eds). *The Prokaryotes* 2nd ed, vol. IV, 2006, pp 3256–3275.

Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain for electron microscopy. *The Journal of Cell Biology* 1963; **17**, 208.

Risacher F, Fritz B. Origin of salts and brine evolution of Bolivian and Chilean salars. *Aquatic Geochemistry* 2009; **15**, 123-157.

Riviere D, Desvignes V, Pelletier E, Chaussonnerie S, Guermazi S, Weissenbach J, Li T, Camacho P, Sghir A. Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *The ISME Journal* 2009; **3**(6), 700-714.

Robertson B.K, Alexander M. Influence of calcium. Iron and pH on phosphate availability for microbial mineralization of organic chemical. *Applied and Environmental Microbiology* 1992; **58**(1), 38-41.

Roden E.E, Lovley D. Dissimilatory Fe (III) reduction by marine microorganism *Desulfuromonas acetoxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* 1993; **59**(3), 734-742.

Rodríguez C.O. Línea meteórica isotópica de Colombia. *Meteorología Colombiana* 2004; **8**,43-51.

Rodríguez-Salazar J, Suárez R, Caballero-Mellado J, Iturriaga G. Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants. *FEMS Microbiology Letters* 2009; **296**, 52-59.

Roh S.W, Quan Z.X, Nam Y.D, Chang H.W, Kim K.H, Rhee S.K, Oh H.M, Jeon C.O, Yoon J.H, Bae J.W. *Marinobacter goseongensis* sp. nov., from seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2008; **58**, 2866-2870.

Romanenko L.A, Schumann P, Rohde M, Zhukova N.V, Mikhailov V.V, Stackebrandt E. *Marinobacter bryozoorum* sp. nov. and *Marinobacter sediminum* sp. nov., novel bacteria from the marine environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005; **55**, 143-148.

Romanenko L.A, Uchino M, Tanaka N, Frolova G.M, Mikhailov V.V *Lysobacter spongiicola* sp. nov., isolated from a deep-sea sponge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2008; **58**, 370-374.

Romero M, Cabrera E, Ortiz N. 2008. Informe sobre el estado de la biodiversidad en Colombia 2006-2007. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá D. C., Colombia. 181 p. URL: http://www.humboldt.org.co/download/INSEB_2006-2007.pdf

Rooney-Varga J.N, Giewat M.W, Savin M.C, Sood S, LeGresley M, Martin J.L. Links between phytoplankton and bacterial community dynamics in a coastal marine Environment. *Microbial Ecology* 2005; **49**, 163-175.

Rosselló-Mora R, Amann R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 2001; **25**, 39-67.

Roselló-Mora R, Peña L, Brito-Echeverria J, López-López A, Valens-Vadell M *et al.* Metabolic evidence for biogeographic isolation of the extremophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *The ISME Journal* 2008; **2**, 242-253.

Rothrock M.J, Garcia-Pichel F. Microbial diversity of benthic mats along a tidal desiccation gradient. *Environmental Microbiology* 2005; **7**, 593-601.

- Sabet S, Diallo L, Hays L, Jung W, Dillon J.G. Characterization of halophiles isolated from solar salterns in Baja California, Mexico. *Extremophiles* 2009; **13**, 643-656.
- Sadfi-Zouaoui N, Essghaier B, Hajlaoui M.R, Fardeau M.L, Cayaol J.L, Ollivier B, Boudabous A. Ability of moderately halophilic bacteria to control grey mould disease on tomato fruits. *Journal Phytopathology* 2008; **156**, 42-52.
- Sahl J, Schmidt R, Swanner E, Mandernack K, Templeton A, Kieft T, Scith R., Sanford, W, Callaghan R, Mitton J, Spear J. Subsurface microbial diversity in deep-granitic-fracture water in Colorado. *Applied and Environmental Microbiology* 2008; **74**(1), 143-152.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biological Evolution* 1987; **4**, 406-425.
- Sakane T, Yokota A. Chemotaxonomic investigation of heterotrophic, aerobic and microaerophilic spirilla, the genera *Aquaspirillum*, *Magnetospirillum* and *Oceanospirillum*. *Systematic and Applied Microbiology* 1994; **17**, 128-134.
- Salm C.R, Saros J.E, Martin C.S, Erickson J.M. Patterns of seasonal phytoplankton distribution in prairie saline lakes of the northern Great Plains (U.S.A.). *Saline Systems* 2009; **5**(1), 1-13.
- Santelli C.M, Orcutt B.N, Banning E, Bach W, Moyer C.L, Sogin M.L., *et al.* Abundance and diversity of microbial life in ocean crust. *Nature* 2008; **453**, 653-656.
- Sass H, Cypionka H, Babenzien H.D. Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria at the oxic-anoxic interface in sediments of the oligotrophic Lake Stechlin. *FEMS Microbiology Ecology* 1997; **22**, 245-255.
- Satomi M, Kimura B, Hamada T, Harayama S, Fujii T. Phylogenetic study of the genus *Oceanospirillum* based on 16S rRNA and *gyrB* genes: emended description of the genus *Oceanospirillum*, description of *Pseudospirillum* gen. nov., *Oceanobacter* gen. nov. and *Terasakiella* gen. nov. and transfer of *Oceanospirillum jannaschii* and *Pseudomonas stanieri* to *Marinobacterium* as *Marinobacterium jannaschii* comb. nov. and *Marinobacterium stanieri* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2002; **52**, 739-747.
- Sauer T, Galinski EA. Bacterial milking: a novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnology and Bioengineering* 1998; **57**, 306-313.
- Schäfer H, Muyzer G. En: John Paul (Ed). *Methods in Microbiology*. Academic Press, London. 2001, pp 425-468.
- Schauer M, Massana R, Pedrós-Alió C. Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalan coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting. *FEMS Microbiology Ecology* 2000; **33**, 51-59.

- Schiewe M.H, Trust T.J, Crosa J.H. *Vibrio ordalii* sp. nov.: a causative agent of vibriosis in fish. *Current Microbiology* 1981; **6**, 343-348.
- Schink B. Synergistic interactions in the microbial world. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002; **81**, 257-261.
- Schlegel H, Lafferty R, Krauss I. The isolation of mutants not accumulating poly-a-hydroxybutyric acid. *Archives of Microbiology* 1970; **71**, 283-294.
- Schleifer K.H, Schüler D, Spring S, Weizenegger M, Amann R, Ludwig W, Köhler M. The genus *Magnetospirillum* gen. nov. description of *Magnetospirillum gryphiswaldense* sp. nov. and transfer of *Aquaspirillum magnetotacticum* to *Magnetospirillum magnetotacticum* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1991; **14**, 379-385.
- Schloss P.D, Handelsman J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; **71**(3), 1501-1506.
- Sekar R., Kaczmarek L.T, Richardson L.L. Microbial community composition of black band disease on the coral host *Siderastrea siderea* from three regions of the wider Caribbean. *Marine Ecology Progress Series* 2008; **362**, 85-98.
- Sekiguchi Y, Yamada T, Hanada S, Ohashi A, Harada H, Kamagata Y. *Anaerolinea thermophila* gen. nov., sp. nov. and *Caldilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., novel filamentous thermophiles that represent a previously uncultured lineage of the domain *Bacteria* at the subphylum level. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2003; **53**, 1843-1851.
- Shen Y.G, Du B.X, Zhang W.K, Zhang J.S, Chen S.Y. Ah-CMO, regulated by stress in *Atriplex hortensis*, can improve drought tolerance in transgenic tobacco. *Theoretical and Applied Genetics* 2002; **105**, 815-821.
- Shi B.H, Arunpairojana V, Palakawong S, Yokota A. *Tistrella mobilis* gen. nov., sp. nov., a novel polyhydroxyalkanoate-producing bacterium belonging to α -*Proteobacteria*. *Journal of General Applied Microbiology* 2002; **48**, 335-343.
- Sieburth J.M, Smetacek V, Lenz J. Pelagic ecosystem structure-heterotrophic compartments of plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnology and Oceanography* 1978; **23**, 1256-1263.
- Sigee, D.C. *Freshwater Microbiology: biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the freshwater environment*. Primera edición. John Wiley & Sons Ltd, Inglaterra. 2005, 524 p.
- Simon M, Glöckner F.O, Amann R. Different community structure and temperature optima of heterotrophic picoplankton in various regions of the Southern Ocean. *Aquatic Microbial Ecology* 1999; **18**, 275-284.

Simonet P, Grojean M.C, Misra A.K, Nazaret S, Cournoyer B, Normand P. *Frankia* genus-specific characterization by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 1991; **57**, 3278-3286.

Sinclair J.L. Eukaryotic microorganisms in subrfce environments. En: Proceedings of the First International Symposium on Microbiology of the Deep Subsurface, 15-19 Enero 1990, Orlando, Florida (Fliermans, C.B y Hanzen, T.C. Eds) WSRC Information Services, Aiken. SC. 1991, pp 3-51.

Sipkema D, Holmes B, Nichols S, Blanch H.W. Biological characterization of *Haliclona* (Agellius) sp: sponge and associated microorganisms. *Microbial Ecology*. 2009; **58**, 903-920.

Sizova M.V, Panikov N.S, Spiridonova E.M, Slobodova N.V, Tourova T.P. Novel facultative anaerobic acidotolerant *Telmatospirillum siberiense* gen. nov. sp. nov. isolated from mesotrophic fen. *Systematic and Applied Microbiology* 2007; **30**, 213-220

Skerman V.B.D, Sly L.I, Williamson M.L. *Conglomeromonas largomobilis* gen. nov., sp. nov., a sodium-sensitive, mixed-flagellated organism from fresh waters. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1983; **33**, 300-308.

Sly L.I, Stackebrandt E. Description of *Skermanella parooensis* gen. nov., sp. nov. to accommodate *Conglomeromonas largomobilis* subsp. parooensis following the transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1999; **49**, 541-544.

Sookkheo B, Sinchaikul S, Phutrakul S, Chen S.T. Purification and Characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Protein Expression and Purification* 2000; **20**, 142-157.

Sorokin D.Y, Gorlenko V.M, Tourova T.P, Tsapin A.I, Nealson K.H, Kuenen G.J. *Thioalkalimicrobium cyclicum* sp. nov. and *Thioalkalivibrio jannaschii* sp. nov., novel species of haloalkaliphilic, obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria from hypersaline alkaline Mono Lake (California). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2002; **52**, 913-920.

Sorokin D.Y, Lysenko A.M, Mityushina L.L, Tourova T.P, Jones B.E, Rainey F.A, Robertson L.A, Kuenen G.J. *Thioalkalimicrobium aerophilum* gen. nov., sp. nov. and *Thioalkalimicrobium sibericum* sp. nov., and *Thioalkalivibrio versutus* gen. nov., sp. nov., *Thioalkalivibrio nitratis* sp. nov. and *Thioalkalivibrio denitrificans* sp. nov., novel obligately alkaliphilic and obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria from soda lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2001; **51**, 565-580.

Sorokin D.Y, Tourova T.P, Kolganova T.V, Spiridonova E.M, Berg I.A, Muyzer G. *Thiomicrospira halophila* sp. nov., a moderately halophilic, obligately

chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium from hypersaline lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2006; **10**, 2375-2380.

Sorokin D.Y, Tourova T.P, Mubman M, Muyzer G. *Dethiobacter alkaliphilus* gen. nov. sp. nov., and *Desulfovibrio alkaliphilus* gen. nov. sp. nov.: two novel representatives of reductive sulfur cycle from soda lakes. *Extremophiles* 2008; **12**, 431-439.

Sorokin D.Y, Tourova T.P, Spiridonova E.M, Rainey F.A, Muyzer G. *Thioclava pacifica* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively autotrophic, marine, sulfur-oxidizing bacterium from a near-shore sulfidic hydrothermal area. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005; **55**, 1069-1075.

Souza M.F.L, Kjerfve B, Knoppers B, Landim de Souza WF, Damasceno R.N. Nutrient budgets and trophic state in a hypersaline coastal lagoon: Lagoa de Araruama, Brazil. *Estuarine, Coast and Shelf Science* 2003, **57**, 843-858.

Sproer C, Mendrock U, Swiderski J, Lang E, Stackebrandt E. The phylogenetic position of *Serratia*, *Buttiauxella* and some other genera of the family *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1999; **49**(4), 1433-1438.

Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity G.M, Grimont P.A.D, Kampfer P, Maiden M C.J, Nesme X, Rosselló-Mora R. Swings J, Truper H.G., *et al.* Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2002; **52**, 1043–1047.

Stackebrandt E, Goebel B.M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1994; **44**, 846-849.

Stahl D.A, Amann R. Development and application of nucleic acid probes. En E. Stackebrandt, M. Goodfellow (Eds.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, United Kingdom. 1991, p. 205-248.

Stahl D.A, Flesher B, Mansfield H.R, Montgomery L. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology* 1988; **54**, 1079-1084.

Stams A.J, De Bok F.A, Plugge C.M, Van Eekert M.H, Dolfing J, Schraa G. Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities. *Environmental Microbiology* 2006; **8**:371-382.

Stanier R.Y, Palleroni N.J, Doudoroff M. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *Journal of General Microbiology* 1966, **43**, 159-271.

Sun B, Cole J, Sanford R, Tiedje J.M. Isolation and characterization of *Desulfovibrio dechloracetivorans* sp. nov., a marine dechlorinating bacterium growing by coupling the

oxidation of acetate to the reductive dechlorination of 2-chlorophenol. *Applied and Environmental Microbiology* 2000; **66**(6), 2408-2413.

Suzuki MT, Béjà O, Taylor LT, DeLong EF. Phylogenetic analysis of ribosomal RNA operons from uncultivated coastal marine bacterioplankton. *Environmental Microbiology* 2001; **3**, 323-331.

Suzuki M.T, Rappe M.S, Haimberger Z.W, Winfield H, Adair N, Strobel J, Giovannoni S.J. Bacterial diversity among small-subunit rRNA gene clones and cellular isolates from the same seawater sample. *Applied and Environmental Microbiology* 1997; **63**, 983-989.

Takai K, Hirayama H, Nakagawa T, Suzuki Y, Nealson K.H, Horikoshi K. *Thiomicrospira thermophila* sp. nov., a novel microaerobic, thermotolerant, sulfur-oxidizing chemolithomixotroph isolated from a deep-sea hydrothermal fumarole in the TOTO caldera, Mariana Arc, Western Pacific. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2004; **54**, 2325-2333.

Takai K, Miyazaki M, Nunoura T, Hirayama H, Oida H, Furushima Y, Yamamoto H, Horikoshi K. *Sulfurivirga caldicuralii* gen. nov., sp. nov., a novel microaerobic, thermophilic, thiosulfate-oxidizing chemolithoautotroph, isolated from a shallow marine hydrothermal system occurring in a coral reef, Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2006; **56**, 1921-1929.

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 2007; **24**, 1596-1599.

Tarrand J.J, Krieg N.R, Döbereiner J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov., and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology* 1978; **24**, 967-980.

ter Braak C.J.F, Smilauer P. CANOCO reference manual and CanoDraw for Window user's guide: software for canonical community ordination (version 4.5). Microcomputer Power, Ithaca, New York, USA. 2002.

ter Braak, C.J.F, Verdonschot P.F.M. Canonical correspondence analysis and related multivariate methods in aquatic ecology. *Aquatic Science* 1995; **57**, 255–289.

ter Braak C.J.F, Smilauer P. CANOCO Version 4.0, Software for Canonical Community Ordination. Microcomputer Power Ithaca, New York. 1998.

Thompson C.C, Vicente A.C, Souza R, Vasconcelos A, Vesth T, Alves N, Ussery D, Iida T, Thompson F. Genomic taxonomic of vibrios. *BMC Evolutionary Biology* 2009; **9**, 258

Thomson C.A, Delaquis P.J, Mazza G. Detection and Measurement of Microbial Lipase Activity: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1999; **39** (2), 165-187.

Tindall B.J, Rosselló-Móra R, Busse H.J, Ludwig W, Kampfer P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2010; **60**(1), 249-266.

Tistl M. Sal, Cobre y Oro en el Consotá. En: López, C, Cano, M. (Eds.) Cambios Ambientales en Perspectiva Histórica. Ecorregión del Eje Cafetero. Universidad Tecnológica de Pereira, Programa Ambiental GTZ. Pereira, Colombia. 2004, pp. 41-53.

Torsvik V, Salte K, Sørheim R, Goksøyr J. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 1990; **56**(3), 776-781.

Tourova T.P, Spiridonova E.M, Berg I.A, Kuznetsov B.B, Sorokin D.Y. Occurrence, phylogeny and evolution of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes in obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria of the genera *Thiomicrospira* and *Thioalkalimicrobium*. *Microbiology* 2006; **152**, 2159-2169.

Tringe S, Hugenholtz P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Current Opinion in Microbiology* 2008; **11**, 442-446.

Trotsenko Y.A, Ivanova E.G, Doronina N.V. Aerobic methylotrophic bacteria as photosymbionts. *Microbiology* 2001; **70**, 725-736.

Tunesi S., Poggi V, Gessa C. Phosphate adsorption and precipitation in calcareous soils: role of calcium ion in solution and carbonate minerals. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 1999; **53**(3), 219-227.

Uchino M, Shida O, Uchimura T, Komagata K. Recharacterization of *Pseudomonas fulva* Iizuka and Komagata 1963, and proposals of *Pseudomonas parafulva* sp. nov. and *Pseudomonas cremoricolorata* sp. nov. *Journal of General and Applied Microbiology* 2001; **46**, 247-261.

Uchino Y, Hirata A, Yakota A, Sugiyama J. Reclassification of marine *Agrobacterium* species: proposals of *Stappia stellulata* gen. nov., comb. nov., *Stappia aggregata* sp. nov., nom. rev., *Ruegeria atlantica* gen. nov., comb. nov., *Ruegeria gelatinovora* comb. nov., *Ruegeria algicola* comb. nov., and *Ahrensia kieliensis* gen. nov., sp. nov., nom. rev. *Journal of General and Applied Microbiology* 1998; **44**, 201-210.

Ultee A, Souvatzi N, Maniadi K, König H. Identification of the culturable and nonculturable bacterial population in ground water of a municipal water supply in Germany. *Journal of Applied Microbiology* 2004; **96**, 560-568-

Urios L, Michotey V, Intertaglia L, Lesongeur F, Lebaron P. *Nisaea denitrificans* gen. nov., sp. nov. and *Nisaea nitritireducens* sp. nov., two novel members of the class α -*Proteobacteria* from the Mediterranean Sea. *International Journal of Systematic Bacteriology* 2008; **58**, 2336-2341.

- Van de Peer Y, Jansen J, De Rijk P, De Wachter P. Database on the structure of small ribosomal subunit RNA. *Nucleic Acids Research* 1997; **25**, 111-116.
- Van der Gucht K, Cottenie K, Muylaert K, Vloemans N, Cousin S, Declerck E.J, Conde-Porcuna J.M, Schwenk K, Zwart G, Degans H, Vyverman W, De Meester L. The power of species sorting: local factors drive bacterial community composition over a wide range of spatial scales. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007; **104**(51), 20404-20409.
- Van der Maarel M.J.E.C, Van Bergeijk S, Van Werkhoven A.F, Laverman A.M, Meijer W.G, Stam W.T, Hansen T.A. Cleavage of dimethylsulfoniopropionate and reduction of acrylate by *Desulfovibrio acrylicus* sp. nov. *Archives in Microbiology* 1996; **166**, 109-115.
- Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews* 1996; **60**, 407-438.
- Vartoukian S, Palmer R, Wade W. The división “Synersgistes”. *Anerobe* 2007; **13**(4), 99-106.
- Velandia F, Héctor C, Alfaro C, Vásquez L.E, Bernal N, Aguirre A. Integración geocientífica para la obtención del modelo geotérmico de Paipa. INGEOMINAS. Dg 53 No. 34-53
- Vélez A. Cartago, Pereira, Manizales: cruce de caminos históricos. Editorial Papiro. Edición en la biblioteca virtual: Enero de 2005.
- Venkateswaran K; Moser D.P; Dollhopf M.E; Lies D.P; Saffarini D.A; MacGregor B.J; Ringelberg D.B, White, D.C; Nishijirna M; Sano H.; Burghardt J., Stackebrand E, Nealsonl K.H. Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1999; **49**, 705-724.
- Ventosa A, Nieto J.J, Oren, A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998; **62** (2), 504-544.
- Von Tigerstrom R, Stelmaschuk S. Localization and characterization of lipolytic enzymes produced by *Lysobacter enzymogenes*. *Journal of General Microbiology*. 1989; **135**, 1027-1035.
- Wainwright M, Wickramasinghe N.C, Narlikar J.V, Rajaratnam P. Microorganisms cultured from stratospheric air samples obtained at 41 km. *FEMS Microbiology Letters* 2003; **218**,161-165.
- Wang C.C, Chang C.W, Chu C.P, Lee D.J, Chang B.V, Liao C.S. Producing hydrogen from wasterwater sludge by *Clostridium bifermentans*. *Journal of Biotechnology* 2003; **102** (1), 83-92.

Wang M, Liang Y, Bai X, Xuejiao J, Wang F, Qiao W. Distribution of microbial populations and their relationship with environmental parameters in the coastal waters of Qingdao, China. *Environmental Microbiology* 2010; **12**(7), 1926-1939.

Wang Y, Liu J.H, Zhang X.X, Chen Y.G, Wang Z.G, Chen Y, Li Q.Y, Peng Q, Cui X.L. *Fodinicurvata sediminis* gen. nov., sp. nov. and *Fodinicurvata fenggangensis* sp. nov., poly- β -hydroxybutyrate-producing bacteria in the family *Rhodospirillaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2009; **59**, 2575-2581.

Wang Y, Zhang Z, Ruan J. Phylogenetic analysis reveals new relationships among members of the genera *Microtetrastora* and *Microbispora*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1996; **46**(3), 658–663.

Ward N.L, Challacombe J.F, Janssen P.H *et al.* Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyle of these microorganismos in soils. *Applied and Environmental Microbiology* 2009; **75**(7), 2046-2056.

Watanabe K, Watanabe K, Kodama Y, Syutsubo K, Harayama S. Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities. *Applied and Environmental Microbiology* 2000; **66**, 4803-4809.

Waters C.M, Bassler B.L. Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2005; **21**, 319–346.

Wayne L.G, Brenner D.J, Colwell R.R, Grimont P.A.D, Kandler O, Krichevsky M.I, Moore L.H, Moore W.E.C, Murray R.G.E, Stackebrandt E., *et al.* Report of the Ad Hoc Committee on reconciliation of approaches to Bacterial Systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1987; **37**, 463-464.

Weber K; Achenbach L.A, Coates J.D. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature* 2006; **4**, 752-764.

Webster G, Yarram L, Freese E, Koster J, Sass H, Parkes R.J, Weightman A.J. Distribution of candidate division JS1 and other Bacteria in tidal sediments of the German Wadden Sea using targeted 16S rRNA gene PCR-DGGE. *FEMS Microbiology Ecology* 2007; **62**, 78–79.

Weelink S.A.B, Van Doesburg W, Saia F.T, Rijpstra W.I.C, Röling W.F.M, Smidt H, Stams A.J.M. A strictly anaerobic betaproteobacterium *Georgfuchsia toluolica* gen. nov., sp. nov. degrades aromatic compounds with Fe(III), Mn(IV) or nitrate as an electron acceptor. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009; **70**, 575-585.

Winbauer M.G. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews* 2004; **28**, 127-181.

Weiss J.V, Rentz J.A, Plaia T, Neubauer S.C, Merrill-Floyd M, Lilburn T, Bradburne C, Megonigal J.P., Emerson D. Characterization of neutrophilic Fe(II)-oxidizing bacteria isolated from rhizosphere of wetland plants and description of *Ferritrophicum radicola* gen. nov. sp. nov., and *Sideroxydans paludicola* sp. nov. *Geomicrobiology Journal* 2007; **24**, 559-570.

Weisse T. Dynamic of autotrophic picoplankton in marine and freshwater ecosystems. *Advance in Microbiology Ecology* 1993; **13**, 327-370.

Weon H.Y, Kim B.Y, Yoo S.H, Joa J.H, Lee K, Zhang Y.S, Kwon S.W, Koo B.S. *Aurantimonas ureilytica* sp. nov., isolated from an air sample. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007; **57**, 1717-1720.

West P.A, Brayton P.R, Bryant T.N, Colwell R.R. Numerical taxonomy of vibrios isolated from aquatic environments. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1986; **36**(4), 531-543.

Wiebe W.J, Sheldon W.M, Pomeroy L.R. Bacterial growth in the cold: evidence for an enhanced substrate requirement. *Applied and Environmental Microbiology* 1992; **58**, 359-364.

Willems A, De Ley J, Gillis M, Kersters K. *Comamonadaceae*, a new Family encompassing the *Acidovorans* rRNA complex, including *Variovorax paradoxus* gen. nov. ,comb. nov. for *Alcaligenes paradoxus* (Davis 1969). *International Journal of Systematic Bacteriology* 1991; **41**(3), 445-450.

Williams M.M, Domingo J.W, Meckes M.C, Kelty C.A, Rochon H.S. Phylogenetic diversity of drinking water bacteria in a distribution system simulator. *Journal of Applied Microbiology* 2004; **96** (5), 954-964.

Wise K, Gillespie N.B, Stuart J, Krebs M, Birge R. Optimization of bacteriorhodopsin for bioelectronic devices. *Trends in Biotechnology* 2002; **20**(9), 387-394.

Witty J.F, Minchin F.R. Measurement of nitrogen fixation by the acetylene reduction assay; myths and mysteries. En: Beck DP & Materon LA (Eds). *Nitrogen Fixation by Legumes in Mediterranean Agriculture*. Syria: Aleppo, ICARDA. 1988, pp 331-343.

Wu Q.L, Zwart G, Schauer M, Kamst-van Agterveld M.P, Hahn M.W. Bacterioplankton community composition along a salinity gradient of sixteen high-mountain lakes located on the Tibetan plateau, China. *Applied and Environmental Microbiology* 2006; **72**, 5478-5485.

Xie C.H, Yokota A. *Pleomorphomonas oryzae* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from paddy soil of *Oryza Sativa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005a; **55**, 1233-1237.

Xie C.H, Yokota A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005b; **55**, 1435-1438.

Yakimov M.M, Giuliano L, Denaro R, Crisafi E, Chernikova T.N, Abraham W.R, Luensdorf H, Timmis K.N, Golyshin P.N. *Thalassolituus oleivorans* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2004; **54**, 141-148.

Yamada T, Imachi H, Ohashi A, Harada H, Hanada S, Kamagata Y, Sekiguchi Y. *Bellilinea caldifistulae* gen. nov., sp. nov. and *Longilinea arvoryzae* gen. nov., sp. nov., strictly anaerobic, filamentous bacteria of the phylum *Chloroflexi* isolated from methanogenic propionate-degrading consortia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007; **57**, 2299-2306.

Yamada T, Sekiguchi Y, Hanada S, Imachi H, Ohashi A, Harada H, Kamagata Y. *Anaerolinea thermolimosa* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae* classis nov. and *Caldilineae* classis nov. in the bacterial phylum *Chloroflexi*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2006; **56**, 1331-1340.

Yannarell A.C, Triplett E.W. Within- and between-lake variability in the composition of bacterioplankton communities: investigations using multiple spatial scales. *Applied and Environmental Microbiology* 2004; **70**, 214-223.

Yasuda P.H, Steigerwalt A.G, Sulker K.R, Kaufmann A.F, Rogers F, Brenner D.J: Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1987; **37**, 407-415.

Yeates C, Saunders A.M, Crocetti G.R, Blackall L.L, Limitations of the widely used GAM42a and BET42a probes targeting bacteria in the Gammaproteobacteria radiation. *Microbiology* 2003; **149**, 1239-1247.

Yoon J.H, Kang S.J, Park S, Oh T.K. *Caenispirillum bisanense* gen. nov., sp. nov., isolated from sludge of a dye works. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007a; **57**, 1217-1221.

Yoon J.H, Kang S.J, Park S, Lee S.Y, Oh T.K. Reclassification of *Aquaspirillum itersonii* and *Aquaspirillum peregrinum* as *Novispirillum itersonii* gen. nov., comb. nov. and *Insolitispirillum peregrinum* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007b; **57**, 2830-2835.

Yoon J.H, Kang S.J, Lee S.Y, Oh T.K. *Phaeobacter daeponensis* sp. nov., isolated from a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007c; **57**, 856-861.

Yoon J.H, Kang S.J, Lee J.S, Oh T.K. *Lutimaribacter saemankumensis* gen. nov., sp. nov., isolated from a tidal flat of the Yellow Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2009; **59**, 48-52.

Younger P.L. Groundwater in the environment: an introduction. Blackwell Publishing 2007, pp 318.

Yurkov V, van Gemerden H. Abundance and salt tolerance of obligately aerobic, phototrophic bacteria in a marine microbial mat. *Netherlands Journal Sea Research* 1993; **31**, 57-62.

Zaar A, Fuchs G, Golecki J.R, Overmann J. A new purple sulfur bacterium isolated from a littoral microbial mat, *Thiorhodococcus drewsii* sp. nov. *Archives in Microbiology* 2003; **179**(3),174-183.

Zappe, H., Blatch, G., Wood, D. Expression of *Bacillus amyloliquefaciens* amylase and *Vibrio alginolyticus* protease A fusion genes. *Journal of General Microbiology* 1992; **138**, 319-327.

Zengler K, Toledo G, Rappé M, Elkins J, Mathur E.J, Short J.M, Keller M. Cultivating the uncultured. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; **99**(15), 681-686.

Zhang G.I, Hwang C.Y, Cho B.C. *Thalassobaculum litoreum* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Rhodospirillaceae* isolated from coastal seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2008; **58**, 479-485.

Zhang H.J, Dong H.Z, Shi Y.J, Chen S.Y, Zhu Y.H. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) with AhCMO gene and the expression of salinity tolerance. *Acta Agronica Sinica* 2007; **33**,1073-1078.

Zhou H.Y, Luan X.W, Zhang X.Y, He H.L, Zhou B.C, Zhang Y.Z. Diversity of both the cultivable protease-producing bacteria and their extracellular proteases in the sediments of the South china sea. *Microbial Ecology* 2009; **58**(3), 582-590.

Zinn M, Witholt B, Egli T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001; **53**, 5-21.

ANEXO A

Solución mineral de elementos traza de Balch (Balch *et al.* 1979)

Componente	Concentración g/l
Ácido nitrilotriacético	1.5
MgSO ₄ ·2H ₂ O	3.0
MnSO ₄ ·2H ₂ O	0.5
NaCl	1.0
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1
CoSO ₄ o CoCl ₂	0.1
ZnSO ₄	0.1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.01
AlK(SO ₄)	0.01
H ₃ BO ₃	0.01
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.01

Disolver el ácido nitrilotriacético en 800 mL de agua y ajustar el pH a 6.5 con KOH. Posteriormente disolver los minerales en orden y ajustar el pH a 7.0 y completar el volumen a un litro.

ANEXO B

Análisis de Componentes Principales (ACP), datos de correlación entre las variables fisicoquímicas y los ejes explicativos.

Variable	Eje 1	Eje 2	Eje 3	Eje 4
EIG	0.6720	0.1683	0.0833	0.0345
Temperatura	-0.5976	-0.7051	-0.2120	-0.2002
pH	-0.6320	-0.6566	0.1841	-0.2642
Conductividad	0.9325	-0.1105	-0.0946	-0.1401
Sólidos disueltos totales SDT	0.9878	0.0539	0.0373	-0.0918
Cloro (Cl ⁻)	-0.7641	0.4210	-0.0965	-0.3201
Potasio (K ⁺)	0.9823	-0.1780	0.0297	0.0097
Calcio (Ca ²⁺)	-0.8818	0.4074	0.1037	0.1520
Sodio (Na ⁺)	0.9453	-0.0697	0.0851	-0.1922
Magnesio (Mg ²⁺)	0.9416	0.2431	0.1403	0.1251
Nitrato (NO ₃ ⁻)	-0.9837	0.1700	0.0228	-0.0277
Sulfato (SO ₄ ²⁻)	0.9781	-0.1620	0.0331	-0.0710
Fósforo total (P-PO ₄)	-0.1916	-0.0426	0.9713	-0.0597
Hierro (Fe ³⁺)	0.2586	0.8655	-0.0263	-0.3509

ANEXO C

Presentaciones en congresos

Poster

Díaz, C., López, G., Patel, B.K.C., Baena, S. Unexpected bacterial diversity in saline springs in the Andean region of Colombia. 12th International Symposium on Microbial Ecology ISME-12 Microbial Diversity-Sustaining the blue planet. Cairns, Australia. Agosto 17-22 de 2008.

Díaz, C., Rubiano, C., Baena, S. Manantiales salinos de los Andes colombianos: hallazgos desde la microbiología. XII Congreso Colombiano de Geología. Paipa, Boyacá. Septiembre 8-11 de 2009.

Presentación oral

Díaz, C. Diversidad microbiana y bioprospección. 2° Congreso Colombiano de Microbiología XII Congreso Nacional ACEBAMIC. Medellín, Abril 28-30 de 2010.

Díaz, C., López, G., Patel, B.K.C., Baena. Estudio de la diversidad microbiana de un fuente salina terrestre del departamento de Risaralda (Colombia). Sexto Simposio Latinoamericano de Biodegradación y Biodeterioro 6-LABS. Bogotá. Mayo 1-4 de 2007.

Publicaciones

Díaz-Cárdenas, C.; Patel, B.K.C and Baena, S. 2010. *Tistlia consotensis* gen. nov., sp. nov., a novel aerobic chemoheterotrophic free-living nitrogen-fixing α -Proteobacteria, isolated from a Colombian saline spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 1437 – 1443.

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

Publicación en revista informativa

Díaz-Cárdenas, C., S. Baena. "Biodiversidad microbiana y manantiales salinos, ¡Un mundo para explorar!". En: Colombia
Revista Innovación y Ciencia *ISSN: 0121-5140 ed: Asociación Colombiana Para El Avance De La Ciencia v.XVII fasc.N/A p.17 - 25 ,2010*

Tistlia consotensis gen. nov., sp. nov., an aerobic, chemoheterotrophic, free-living, nitrogen-fixing alphaproteobacterium, isolated from a Colombian saline spring

C. Díaz-Cárdenas,¹ B. K. C. Patel² and S. Baena¹

Correspondence

S. Baena

baena@javeriana.edu.co

¹Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental, Departamento de Biología, Pontificia Universidad Javeriana, POB 56710, Bogotá, Colombia

²Microbial Gene Research and Resources Facility, School of Biomolecular and Physical Sciences, Griffith University, Brisbane 4111, Australia

A Gram-negative, aerobic, mesophilic, non-spore-forming, chemotrophic, chlorophyll-lacking, nitrogen-fixing bacterium, designated strain USBA 355^T, was isolated from the saline spring 'Salado de Consotá' situated in the Colombian Andes. The non-flagellated cells of strain USBA 355^T were straight to slightly curved rods (0.6–0.7 × 3.0–3.5 μm). Growth occurred optimally at 30 °C (growth temperature range between 20 and 40 °C), at pH 6.5–6.7 (pH growth range between 5.0 and 8.0) and at 0.5 % NaCl (w/v) (range between 0 and 4 %). The major quinone present was Q-10 and the predominant fatty acids identified were C_{19:0} cyclo ω8c, C_{18:1}ω7c and C_{18:0}. The G + C content of the chromosomal DNA was 71 ± 1 mol%. 16S rRNA gene sequence analysis indicated that strain USBA 355^T formed a distant phylogenetic line of descent with members of the genus *Thalassobaculum*, family *Rhodospirillaceae*, class *Alphaproteobacteria* (90 % gene sequence similarity). Comparison of the phylogenetic, chemotaxonomic and physiological features of strain USBA 355^T with all other members of the family *Rhodospirillaceae* suggested that it represents a novel genus and species for which the name *Tistlia consotensis* gen. nov., sp. nov. is proposed. The type strain of the type species is USBA 355^T (=JCM 15529^T=KCTC 22406^T).

The family *Rhodospirillaceae* currently comprises 21 genera of varying metabolic and nutritional properties and includes photoheterotrophs, photoautotrophs and chemoheterotrophs. The chemoheterotrophs include the facultative anaerobic genera *Skermanella*, *Telmatospirillum*, *Caenispirillum*, *Thalassobaculum* and *Nisaea* (Sly & Stackebrandt, 1999; Sizova *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Urios *et al.*, 2008) and the aerobic and microoxic genera *Azospirillum*, *Conglomeromonas*, *Magnetospirillum*, *Thalassospira*, *Tistrella*, *Inquilius* and *Defluviococcus* (Tarrand *et al.*, 1978; Skerman *et al.*, 1983; Schleifer *et al.*, 1991; Coenye *et al.*, 2002; López-López *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002; Maszenan *et al.*, 2005). Some members of the family are known to change from one nutritional mode to another depending on the availability of light and the concentration of oxygen and carbon sources. This strategy is exemplified by members of the genera *Rhodocista*, *Rhodospira*, *Roseospira*, *Rhodovibrio*, *Rhodospirillum* and *Phaeospirillum* (Kawasaki *et al.*, 1992; Pfennig *et al.*, 1997; Imhoff *et al.*, 1998). Other genera of

the family, such as members of the genus *Azospirillum*, even have the ability to fix nitrogen (Xie & Yokota, 2005a). In this paper, the isolation and characterization of a novel aerobic, chemoheterotrophic, nitrogen-fixing bacterium, strain USBA 355^T, is reported. This new strain was isolated from samples collected from the saline spring, Salado de Consotá, located in the Colombian Andes (64° 40' 43.1" N, 75° 31' 34.3" W). Salado de Consotá is a neutral pH spring with a salt content of 4.5 % (w/v). The dominant ions in the spring water are Na⁺, Ca²⁺ and Cl⁻ (Tistl, 2004).

Water samples were collected aseptically from the Salado de Consotá spring in 2006 by filling sterile glass containers to the brim. The samples were capped tightly, placed on ice and transported to our laboratory in Bogotá. Enrichments were initiated by inoculating a 2 ml water sample in 10 ml filter-sterilized saline spring water which had been amended with 0.1 % (w/v) starch (Sigma) and 0.02 % (w/v) yeast extract (Sigma). Turbidity was observed after 10 days incubation at 37 °C. Subsequent phase-contrast microscopy (Eclipse 50i; Nikon) revealed the presence of curved and rod-shaped cells. Several colonies developed

The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain USBA 355^T is EU728658.

from serial dilutions of the enrichment culture streaked onto the same medium fortified with 2% (w/v) noble agar (Sigma) after 3 days incubation at 37 °C. A beige and slightly raised, circular, mucoid colony (1 mm diameter) was selected and the culture derived from this, designated strain USBA 355^T, was then used for further studies. Strain USBA 355^T was routinely cultured in a basal medium (BM) supplemented with 20 mM D-glucose and 0.1% (v/v) yeast extract. BM contained (l⁻¹ deionized water): 1 g NH₄Cl, 0.3 g K₂HPO₄, 0.3 g KH₂PO₄, 3 g MgCl₂·6H₂O, 0.1 g CaCl₂·2H₂O, 0.1 g KCl, 23 g NaCl and 1 ml Zeikus' trace-element solution (Zeikus *et al.*, 1979); the pH of the medium was adjusted to 7.1 with 1 M NaOH. Cells were preserved at -20 °C in BM supplemented with 20% (v/v) glycerol.

Samples were prepared for electron microscopy as described previously (Patel *et al.*, 1985). Cells of strain USBA 355^T occurred singly or in pairs and were slightly curved to straight rods (0.6–0.7 × 3.0–3.5 µm). Although tumbling motility was observed, neither flagella nor axial filaments were evident by electron microscopy. Cells of strain USBA 355^T stained Gram-negative but electron micrographs of ultrathin sections revealed a typical Gram-positive cell-wall ultrastructure (Fig. 1). Spores were not observed and cells were not resistant to heating at 90 °C for 5 min.

Characterization studies were performed in BM. Cell growth was monitored at 580 nm and all tests were

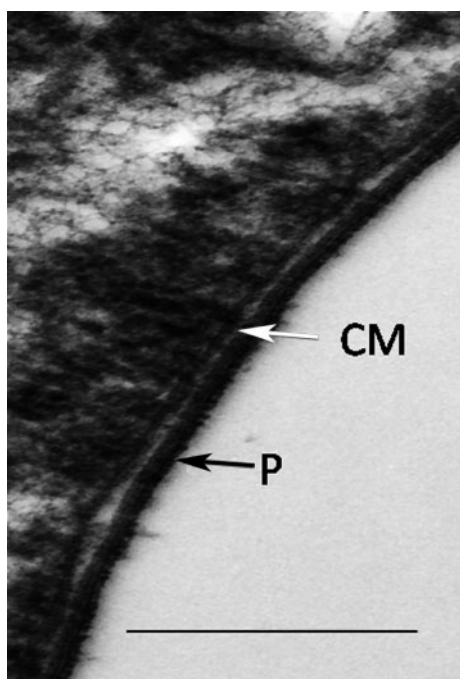


Fig. 1. Transmission electron micrograph of a thin section of a cell of strain USBA 355^T revealing a typical Gram-positive cell-wall ultrastructure. CM, cytoplasmic membrane; P, cell wall. Bar, 200 nm.

performed in duplicate with the strain subcultured at least once under the same experimental conditions before use. The pH range for growth was tested in BM in which the pH was adjusted to between pH 4.0 and 9.0 with stock solutions of NaHCO₃ (10%, w/v), Na₂CO₃ (10%, w/v) and citrate buffer (1 M). Strain USBA 355^T grew optimally at pH 6.5–6.7 (range 5.0–8.0). The temperature optimum was 30 °C (range 20–40 °C) and the optimum NaCl concentration for growth was 0.5% (w/v) (range 0–4% NaCl, w/v). Unless indicated otherwise, all subsequent growth experiments were conducted using these optimal conditions.

Strain USBA 355^T was able to use glucose or peptone as a sole carbon source but the addition of 0.1% (w/v) yeast extract increased the cell yield and was thus added to BM in order to determine the nutritional spectrum of the new isolate. Monosaccharides, disaccharides, polysaccharides, peptides and sugar alcohols were tested at a final concentration of 0.2% (w/v), organic acids, alcohols and amino acids were tested at a final concentration of 20 mM and aromatic compounds were tested at a final concentration of 5 mM. An increase in optical density of more than 0.1 OD unit relative to controls (which lacked carbon sources, but included 0.1% yeast extract) was regarded as a positive reaction for growth on the substrate. Strain USBA 355^T grew on a range of substrates and these are given in more detail in the species description.

The strain USBA 355^T did not grow anaerobically using the method of Baena *et al.* (1998) and was catalase-negative using the method of Smibert & Krieg (1994). Strain USBA 355^T was sensitive to ampicillin and streptomycin at 10 µg ml⁻¹ and to tetracycline, chloramphenicol and penicillin at concentrations of 50 µg ml⁻¹.

The novel strain did not grow chemolithotrophically on 10 mM thiosulfate, on 1% (w/v) elemental sulfur or on 5 mM sulfide with 0.1% (v/v) NaHCO₃ under aerobic dark conditions.

In order to test the use of nitrogen sources, the novel strain was cultured aerobically in BM but without chemical or organic nitrogen sources. Strain USBA 355^T was able to utilize 0.1% (w/v) urea, 10 mM nitrate and 2.5 mM glutamate, but not 10 mM nitrite.

The ability to fix dinitrogen was tested on nitrogen-free semisolid malate (NFb) enrichment medium (Baldani & Döbereiner, 1980) and acetylene reduction activity was measured as described previously by Witty & Minchin (1988), using *Azospirillum forbidum* ATCC 29707^T as the reference strain. Further, the presence of the *nifH* gene fragment was determined by using a nested PCR to increase sensitivity. The amplification was conducted with the primers Set 1 FGPH19/PolR and Set 2 AQER/PolF (Simonet *et al.*, 1991; Poly *et al.*, 2001) as described by Diallo *et al.* (2004). The novel strain showed very high acetylene reduction activity and was found to possess the *nifH* gene.

Respiratory lipoquinone analyses were carried out by the Identification Service and Dr B. J. Tindall, DSMZ, Braunschweig, Germany, and showed that ubiquinone Q-10 was the most dominant (95%) quinone in strain USBA 355^T. Lower concentrations of Q-9 (5%) were also present. These data support the affiliation of strain USBA 355^T as a member of the class *Alphaproteobacteria* since a characteristic of this group is the possession of ubiquinone Q-10 as the major quinone (Xie & Yokota, 2005b). Fatty acid analysis performed by the identification services of the DSMZ showed that the major cellular fatty acids of strain USBA 355^T were C_{19:0} cyclo ω 8c (38%), C_{18:1} ω 7c (26%) and C_{18:0} (18%). Fatty acids 11 methyl C_{18:1} ω 7c (0.7%), C_{20:2} ω 6.9c (1.2%) and C_{18:0} iso (1%) were also present but in lower concentrations. The hydroxy fatty acids identified were C_{18:1} 2-OH (3.7%), C_{18:0} 3-OH (3.6%), C_{16:1} ω 7c/C₁₅ iso 2-OH (1.5%) and C_{14:0} 3-OH/C_{16:1} iso I (0.7%). These data suggest that strain USBA 355^T possesses a unique fatty acid profile amongst members of the family *Rhodospirillaceae* (Table 1).

Aerobic liquid cultures of strain USBA 355^T were colourless but the microbial pellet presented a brownish-pink tinge. The absorption spectra (Cintra20, GBC) of a cell pellet suspended in a sucrose solution (Pfennig & Trüper, 1992) or after ethanol extraction (Yurkov & van Gemerden, 1993) showed a single absorption peak at 398 nm, which indicated the absence of bacteriochlorophyll *a*.

DNA of strain USBA 355^T was prepared by using the whole genome amplification method (Ogg & Patel, 2009) and the G + C content of the DNA was determined by the thermal denaturation (*T_m*) method (Marmur & Doty, 1962) and was calculated to be 71 ± 1 mol%.

The methods used for the purification of the DNA, PCR amplification, sequencing of the 16S rRNA gene and phylogeny were as described previously (Redburn & Patel, 1993; Woo *et al.*, 1997; Spanevello *et al.*, 2002). The partial sequences that were generated were assembled using BioEdit v5.0.1 (Hall, 1999) and the consensus sequence of 1430 nucleotides was corrected manually for errors. The most closely related sequences in GenBank (version 152) and the Ribosomal Database Project II (RDP; release 10) identified using BLAST (Altschul *et al.*, 1997) were extracted, aligned and manually adjusted according to the 16S rRNA secondary structure obtained from RDP using BioEdit. Nucleotide ambiguities were omitted and evolutionary distances were calculated by using the Jukes and Cantor option (Jukes & Cantor, 1969) in TREECON (Van de Peer *et al.*, 1997). Phylogenetic trees were constructed from evolutionary distances using the neighbour-joining method (Saitou & Nei, 1987). The tree topology was re-examined by the bootstrap method (1000 replications) of resampling (Felsenstein, 1985).

Phylogenetic analysis revealed that strain USBA 355^T was most closely related to members of the genus *Thalassobaculum*, family *Rhodospirillaceae*, class *Alphaproteobacteria*, phylum

Proteobacteria, with a 16S rRNA gene sequence similarity value of 90% (Fig. 2).

In addition to the large phylogenetic distance separating strain USBA 355^T from members of the genus *Thalassobaculum*, strain USBA 355^T could be differentiated from this genus on the basis that it could not grow under anaerobic conditions, was catalase-negative and, despite being motile, did not appear to possess flagella. The salt tolerance range for growth of the novel strain was lower (0–4%) compared with 1–10% (w/v) for members of the genus *Thalassobaculum*. The DNA G + C content of the novel strain was also higher (71 mol% versus 68 mol%; Zhang *et al.*, 2008). Strain USBA 355^T could also be differentiated from other chemoheterotrophic, aerobic, nitrogen-fixing genera, such as *Azospirillum* (Tarrand *et al.*, 1978), in the family *Rhodospirillaceae* by its fatty acid composition. Members of the genus *Azospirillum* contain a large amount of C_{18:1} ω 7c, C_{16:1} ω 7c, C_{16:0} and the major hydroxyl fatty acids C_{14:0} 3-OH and C_{16:0} 3-OH (Xie & Yokota, 2005a). The salt tolerance range distinguished strain USBA 355^T (<4%, w/v) from the genera *Thalassospira* (<10%) (López-López *et al.*, 2002), *Inquilineus* (<6%) (Coenye *et al.*, 2002) and *Tistrella* (<1%) (Shi *et al.*, 2002). The novel strain was distinguishable from some phylogenetically related phototrophic bacteria such as members of the genera *Roseospira* and *Rhodovibrio* by the absence of bacteriochlorophyll *a* and intracellular photosynthetic membranes (Imhoff *et al.*, 1998; Guyoneaud *et al.*, 2002). The low level of 16S rRNA gene sequence similarity between strain USBA 355^T and all other members of the family *Rhodospirillaceae*, together with the differential phenotypic properties (Table 1), suggest that the new isolate represents a novel species of a new genus for which the name *Tistlia consotensis* gen. nov., sp. nov. is proposed.

Description of *Tistlia* gen. nov.

Tistlia (Tist'li.a. N.L. fem. n. *Tistlia* named after Tistl, honouring Michael Tistl, a geologist for his rediscovery of the Salado de Consotá saline spring).

Cells are strictly aerobic, slightly curved to straight rods which do not possess pili or form spores. Gram-reaction is negative. Q-10 is the predominant ubiquinone and C_{19:0} cyclo ω 8c, C_{18:1} ω 7c and C_{18:0} are the dominant fatty acids. 16S rRNA gene sequence analysis places the genus *Tistlia* in the family *Rhodospirillaceae*, class *Alphaproteobacteria*, phylum *Proteobacteria*. The type species is *Tistlia consotensis*.

Description of *Tistlia consotensis* sp. nov.

Tistlia consotensis (con.so.ten'sis. N.L. fem. adj. *consotensis* pertaining to Salado de Consotá saline spring, Risaralda-Colombia, the geographical location from which the organism was first isolated).

Exhibits the following properties in addition to those given in the genus description. Cells reveal a Gram-positive

Table 1. Phenotypic characteristics of strain USBA 355^T and some genera of the family *Rhodospirillaceae*

Taxa: 1, USBA 355^T; 2, *Rhodospira* (Pfennig *et al.*, 1997); 3, *Rhodovibrio* (Imhoff *et al.*, 1998); 4, *Roseospira* (Imhoff *et al.*, 1998); 5, *Rhodocista* (Kawasaki *et al.*, 1992); 6, *Rhodospirillum* (Imhoff *et al.*, 1998); 7, *Phaeospirillum* (Imhoff *et al.*, 1998); 8, *Thalassospira* (López-López *et al.*, 2002); 9, *Defluviicoccus* (Maszenan *et al.*, 2005); 10, *Tistrella* (Shi *et al.*, 2002); 11, *Inquilinus* (Coenye *et al.*, 2002); 12, *Azospirillum* (Tarrand *et al.*, 1978); 13, *Skermanella* (Sly & Stackebrandt, 1999); 14, *Telmatospirillum* (Sizova *et al.*, 2007); 15, *Caenospirillum* (Yoon *et al.*, 2007); 16, *Thalassobaculum* (Zhang *et al.*, 2008); 17, *Magnetospirillum* (Schleifer *et al.*, 1991; Sakane & Yokota, 1994); 18, *Nisaea* (Urios *et al.*, 2008). +, Positive; -, negative; v, variable; ND, no data available; CH, chemoheterotrophic; PH, photoheterotrophic; CL, chemolithotrophic; AE, aerobic; AN, anaerobic; MO, microoxic; FA, facultatively anaerobic; O, oxic.

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Habitat	Saline spring	Salt marsh, sediment mats	Seawater salterns	Sulfur spring	Freshwater, wastewater	Freshwater	Stagnant and anoxic freshwater	Seawater	Sludge
Flagella	-	+	+	+	+	+	+	+	-
DNA G+C content (mol%)	71	65.7	66-67	66.6	69.9	63-66	60.5-65.3	54.7	66
Preferred metabolism	CH AE	PH AN	PH AN	PH AN	PH AN	PH AN	PH AN	CH AE	CH AE
Alternative metabolism		CH MO	CH MO	CH MO	CH MO		CH MO		
Growth factors	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Na ⁺ requirement	-	+	+	+	-	-	-	+	-
Salt tolerance (% w/v)	<4	5	3-24	Up to 15	ND	ND	ND	Up to 10	ND
Salt optimum (% w/v)	0.5	2	3.5	4-7	ND	ND	ND	ND	ND
pH optimum	6.5-6.7	7.3-7.5	7-8	7.0	6.8	6.5-7.5	7.3	ND	7.5-8.0
Temperature optimum (°C)	30	25-30	35-42	30-35	31-45	25-35	25-30	13	25-30
Catalase activity	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+
NO ₃ ⁻ to NO ₂ ⁻	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	+
NO ₃ ⁻ as N source	+	ND	ND	ND	-	ND	ND	+	ND
Growth on carbohydrates	+	-	-	Only fructose	-	v	+	+	+
Major quinones	Q-10, Q-9	Q-7, MK-7	Q-10, MK-10	ND	Q-9	Q-10, RQ-10	Q-9, MK-9	ND	ND
Major fatty acids	C _{19:0} cyclo ω8c, C _{18:1} ω7c, C _{18:0}	C _{18:1} , C _{16:0} , C _{14:0} , C _{18:0} , C _{16:1}	C _{18:1} , C _{18:0} , C _{16:0} , C _{14:0}	ND	ND	C _{18:1} , C _{16:1} , C _{16:0} , C _{14:0}	C _{18:1} , C _{16:1} , C _{16:0} , C _{18:0}	C _{18:1} cis ω7, C _{16:0} , C _{16:0} cis ω7	ND
Characteristic	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Habitat	Wastewater	Cystic fibrosis patients	Soil, root, freshwater	Lake water	Mesotrophic Siberian fen	Sludge	Seawater	Freshwater ponds, swamps	Seawater
Flagella	+	ND	+	+	+	+	+	+	+
DNA G+C content (mol%)	67.5	70.9	67-71	67	61.5-64	70	68	64-71	60
Preferred metabolism	CH AE	CH AE	CH AE	CH FA	CH AN or MO	CH AE	CH FA	CH MO-O	CH AE
Alternative metabolism					CL O	CH AN with NO ₃			
Growth factors	+	ND	v	-	ND	-	-	-	-
Na ⁺ requirement	-	ND	-	-	ND	-	+	-	-
Salt tolerance (% w/v)	<1	<6	<5	<2	ND	<5	<10	ND	<6
Salt optimum (% w/v)	ND	ND	ND	ND	ND	0.5	2-4	ND	2
pH optimum	7.4	ND	5.8-6.8*	ND	5.7-6.5	7.0-8.0	8.0	7.0	6
Temperature optimum (°C)	30	ND (25-42)	34-37	28	25-28	37	30-35	30	30
Catalase activity	+	+	v	+	-	+	+	v	+
NO ₃ ⁻ to NO ₂ ⁻	+	ND	+	+	ND	+	+	-	+
NO ₃ ⁻ as N source	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Table 1. cont.

Characteristic	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Growth on carbohydrates	+	–	+	+	+	Only ribose	Ribose, sucrose	–	+
Major quinones	Q-10	ND	Q-10	Q-10	ND	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10
Major fatty acids	<i>C</i> _{18:1} ω 7 <i>c</i> , <i>C</i> _{18:1} 2-OH, <i>C</i> _{14:0} 3-OH, <i>C</i> _{16:0} 3-OH, <i>C</i> _{18:1} ω 7 <i>c</i> 11 methyl	ND	<i>C</i> _{18:1} ω 7 <i>c</i> , <i>C</i> _{16:1} ω 7 <i>c</i> , <i>C</i> _{16:0} , <i>C</i> _{14:0} 3-OH, <i>C</i> _{16:0} 3-OH	ND	<i>C</i> _{18:1} ω 7 <i>c</i> , <i>C</i> _{17:0} cyclo, <i>C</i> _{18:0} , <i>C</i> _{14:0} , <i>C</i> _{16:1} ω 7 <i>c</i>	<i>C</i> _{18:1} ω 7 <i>c</i>	<i>C</i> _{18:1} ω 7 <i>c</i> , <i>C</i> _{16:0} , <i>C</i> _{17:0} , <i>C</i> _{19:0} cyclo ω 8 <i>c</i>	<i>C</i> _{18:1} , <i>C</i> _{16:1} , <i>C</i> _{16:0} , <i>C</i> _{14:0} 3-OH, <i>C</i> _{16:0} 3-OH	<i>C</i> _{18:1} ω 7 <i>c</i> , <i>C</i> _{16:1} ω 7 <i>c</i> , <i>C</i> _{16:0}

*Except for *Azospirillum halopraeferans*, which has an optimal temperature of 41 °C and an optimal pH of 8.0.

cell-wall ultrastructure. Cells are 0.6–0.7 × 3.0–3.5 µm, multiply by binary fission and show tumbling motility. Mesophilic and slightly halophilic with optimum growth occurring at 30 °C (growth temperature range 20–40 °C), pH 6.5–6.7 (pH growth range 5.0–8.0) and salinity of 0.5 % (w/v) (NaCl growth range 0–4 %). Chemoheterotrophic. Cells grow on glucose or peptone as a sole carbon source. Yeast extract is not required for growth but increases biomass yields. Grows on pyruvate, butyrate, succinate, glucose, mannose, xylose, galactose, arabinose, trehalose,

cellobiose, lactose, sucrose, rhamnose, fructose, maltose, peptone, Casamino acids, tryptone, pepticase, gelatin, arginine, alanine, leucine, isoleucine, valine, glutamate, glycerol, inositol and starch, but not on formate, acetate, methanol, lactate, citrate, α -ketoglutarate, ribose, raffinose, methionine, threonine, lysine, glycine, histidine, Tween 80, ethyl oleate, olive oil, benzoate or cinnamate. Urea, nitrate and glutamate can serve as sole nitrogen sources. Sensitive to ampicillin, streptomycin, chloramphenicol, tetracycline and penicillin.

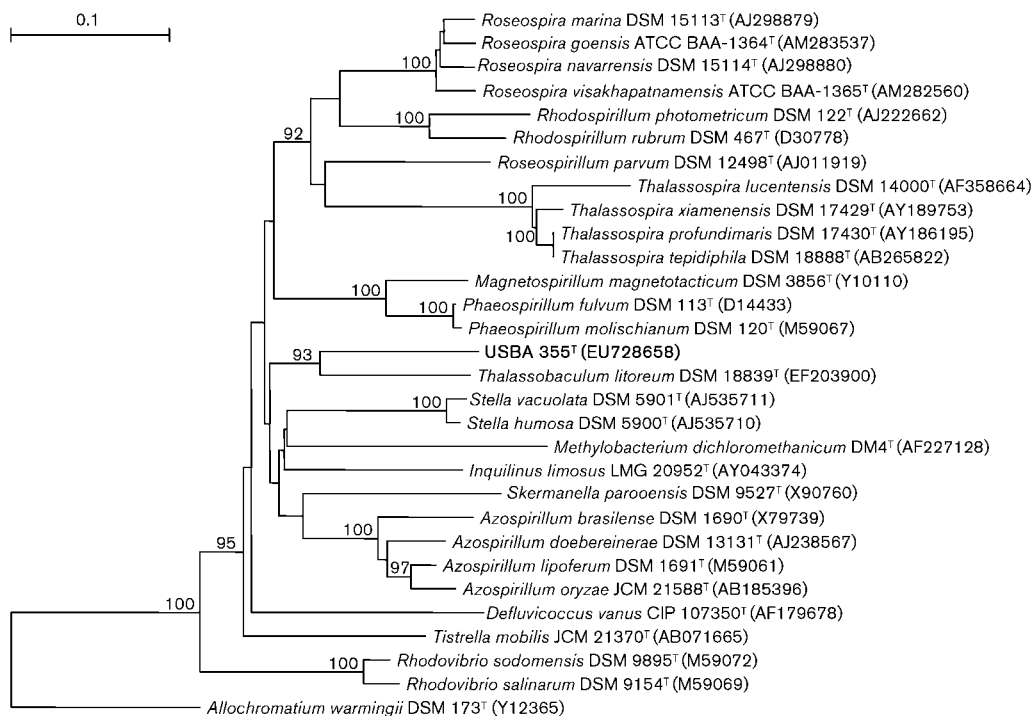


Fig. 2. Dendrogram showing the phylogenetic position of strain USBA 355^T and the closest relatives. GenBank accession numbers are given parentheses. Bootstrap values >90 % from 1000 replicates are shown. Bar, 0.1 nucleotide changes per 100 nucleotides.

The type strain, USBA 355^T (=JCM 15529^T=KCTC 22406^T), was isolated from the Salado de Consotá saline spring, Colombia. The DNA G+C content of the type strain is 71 ± 1 mol%.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología (Colciencias) and International Foundation for Science (IFS).

References

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389–3402.
- Baena, S., Fardeau, M.-L., Labat, M., Ollivier, B., Garcia, J.-L. & Patel, B. K. C. (1998). *Aminobacterium colombiense* gen. nov., sp. nov., an amino acid-degrading anaerobe isolated from anaerobic sludge. *Anaerobe* **4**, 241–250.
- Baldani, V. L. D. & Döbereiner, J. (1980). Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biol Biochem* **12**, 433–439.
- Coenye, T., Goris, J., Spilker, T., Vandamme, P. & Lipuma, J. J. (2002). Characterization of unusual bacteria isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis patients and description of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp. nov. *J Clin Microbiol* **40**, 2062–2069.
- Diallo, M. D., Willems, A., Vloemans, N., Cousin, S., Vandekerckhove, T. T., de Lajudie, P., Neyra, M., Vyverman, W., Gillis, M. & Van der Gucht, K. (2004). Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N₂-fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortilis* ssp. *Raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal. *Environ Microbiol* **6**, 400–415.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783–791.
- Guyoneaud, R., Mouné, S., Eatock, C., Bothorel, V., Hirschler-Réa, A., Willison, J., Duran, R., Liesack, W., Herbert, R. & other authors (2002). Characterization of three spiral-shaped purple nonsulfur bacteria isolated from coastal lagoon sediments, saline sulfur springs, and microbial mats: emended description of the genus *Roseospira* and description of *Roseospira marina* sp. nov., *Roseospira navarrensis* sp. nov., and *Roseospira thiosulfatophila* sp. nov. *Arch Microbiol* **178**, 315–324.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**, 95–98.
- Imhoff, J. F., Petri, R. & Süling, J. (1998). Reclassification of species of the spiral-shaped phototrophic purple non-sulfur bacteria of the α -*Proteobacteria*: description of the new genera *Phaeospirillum* gen. nov., *Rhodovibrio* gen. nov., *Rhodothalassium* gen. nov. and *Roseospira* gen. nov. as well as transfer of *Rhodospirillum fulvum* to *Phaeospirillum fulvum* comb. nov., of *Rhodospirillum molischianum* to *Phaeospirillum molischianum* comb. nov., of *Rhodospirillum salinarum* to *Rhodovibrio salinarum* comb. nov., of *Rhodospirillum sodomense* to *Rhodovibrio sodomense* comb. nov., of *Rhodospirillum salexigens* to *Rhodothalassium salexigens* comb. nov. and of *Rhodospirillum mediosalinum* to *Roseospira mediosalina* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 793–798.
- Jukes, T. H. & Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, vol. 3, pp. 21–132. Edited by H. N. Munro. New York: Academic Press.
- Kawasaki, H., Hoshino, Y., Kuraishi, Y. & Yamasato, K. (1992). *Rhodocista centenaria* gen. nov., sp. nov., a cyst-forming anoxygenic photosynthetic bacterium and its phylogenetic position in the *Proteobacteria* alpha group. *J Gen Appl Microbiol* **38**, 541–551.
- López-López, A., Pujalte, M. J., Benlloch, S., Mata-Roig, M., Rosselló-Mora, R., Garay, E. & Rodríguez-Valera, F. (2002). *Thalassospira lucentensis* gen. nov., sp. nov., a new marine member of the α -*Proteobacteria*. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1277–1283.
- Marmur, J. & Doty, P. (1962). Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J Mol Biol* **5**, 109–118.
- Maszenan, A. M., Seviour, R. J., Patel, B. K. C., Janssen, P. H. & Wanner, J. (2005). *Defluvicoccus vanus* gen. nov., sp. nov., a novel Gram-negative coccus/coccobacillus in the '*Alphaproteobacteria*' from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 2105–2111.
- Ogg, C. D. & Patel, B. K. C. (2009). *Caloramator australicus* sp. nov., a thermophilic anaerobic bacterium from the Great Artesian Basin of Australia. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 95–101.
- Patel, B. K. C., Morgan, H. W. & Daniel, R. M. (1985). *Fervidobacterium nodosum* gen. nov. and spec. nov., a new chemoorganotrophic, caldoactive, anaerobic bacterium. *Arch Microbiol* **141**, 63–69.
- Pfennig, N. & Trüper, H. G. (1992). The family *Chromatiaceae*. In *The Prokaryotes*, pp. 320–322. Edited by A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- Pfennig, N., Lünsdorf, H., Süling, J. & Imhoff, J. F. (1997). *Rhodospira trueperi* gen. nov. and spec. nov., a new phototrophic proteobacterium of the alpha-group. *Arch Microbiol* **168**, 39–45.
- Poly, F., Monrozier, L. J. & Bally, R. (2001). Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res Microbiol* **152**, 95–103.
- Redburn, A. C. & Patel, B. K. C. (1993). Phylogenetic analysis of *Desulfotomaculum thermobenzoicum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *FEMS Microbiol Lett* **113**, 81–86.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406–425.
- Sakane, T. & Yokota, A. (1994). Chemotaxonomic investigation of heterotrophic, aerobic and microaerophilic spirilla, the genera *Aquaspirillum*, *Magnetospirillum* and *Oceanospirillum*. *Syst Appl Microbiol* **17**, 128–134.
- Schleifer, K. H., Schüler, D., Spring, S., Weizenegger, M., Amann, R., Ludwig, W. & Köhler, M. (1991). The genus *Magnetospirillum* gen. nov. description of *Magnetospirillum gryphiswaldense* sp. nov. and transfer of *Aquaspirillum magnetotacticum* to *Magnetospirillum magnetotacticum* comb. nov. *Syst Appl Microbiol* **14**, 379–385.
- Shi, B. H., Arunpairojana, V., Palakawong, S. & Yokota, A. (2002). *Tistrella mobilis* gen. nov., sp. nov., a novel polyhydroxyalkanoate-producing bacterium belonging to α -*Proteobacteria*. *J Gen Appl Microbiol* **48**, 335–343.
- Simonet, P., Grojean, M. C., Misra, A. K., Nazaret, S., Cournoyer, B. & Normand, P. (1991). *Frankia* genus-specific characterization by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* **57**, 3278–3286.
- Sizova, M. V., Panikov, N. S., Spiridonova, E. M., Slobodova, N. V. & Tourova, T. P. (2007). Novel facultative anaerobic acidotolerant *Telmatospirillum siberiense* gen. nov., sp. nov. isolated from mesotrophic fen. *Syst Appl Microbiol* **30**, 213–220.
- Skerman, V. B. D., Sly, L. I. & Williamson, M. L. (1983). *Conglomeromonas largomobilis* gen. nov., sp. nov., a sodium-sensitive, mixed-flagellated organism from fresh waters. *Int J Syst Bacteriol* **33**, 300–308.

- Sly, L. I. & Stackebrandt, E. (1999).** Description of *Skermanella parooensis* gen. nov., sp. nov. to accommodate *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* following the transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum*. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 541–544.
- Smibert, R. M. & Krieg, N. R. (1994).** Phenotypic characterization. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*, pp. 607–654. Edited by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Spanevello, M. D., Yamamoto, H. & Patel, B. K. C. (2002).** *Thermaerobacter subterraneus* sp. nov., a novel aerobic bacterium from the Great Artesian Basin of Australia, and emendation of the genus *Thermaerobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 795–800.
- Tarrand, J. J., Krieg, N. R. & Döbereiner, J. (1978).** A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov., and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can J Microbiol* **24**, 967–980.
- Tistl, M. (2004).** Sal, Cobre y Oro en el Consotá. In *Cambios Ambientales en Perspectiva Histórica. Ecorregión del Eje Cafetero*, pp. 41–53. Edited by C. López & M. Cano. Pereira, Colombia: Universidad Tecnológica de Pereira, Programa Ambiental GTZ (in Spanish).
- Urios, L., Michotey, V., Intertaglia, L., Lesongeur, F. & Lebaron, P. (2008).** *Nisaea denitrificans* gen. nov., sp. nov. and *Nisaea nitriti-reducens* sp. nov., two novel members of the class *Alphaproteobacteria* from the Mediterranean Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 2336–2341.
- Van de Peer, Y., Jansen, J., De Rijk, P. & De Wachter, P. (1997).** Database on the structure of small ribosomal subunit RNA. *Nucleic Acids Res* **25**, 111–116.
- Witty, J. F. & Minchin, F. R. (1988).** Measurement of nitrogen fixation by the acetylene reduction assay; myths and mysteries. In *Nitrogen Fixation by Legumes in Mediterranean Agriculture*, pp. 331–343. Edited by D. P. Beck & L. A. Materon. Syria: Aleppo, ICARDA.
- Woo, T. H. S., Patel, B. K. C., Smythe, L. D., Symonds, M. L., Norris, M. A. & Dohnt, M. F. (1997).** Comparison of two PCR methods for rapid identification of *Leptospira* genospecies *interrogans*. *FEMS Microbiol Lett* **155**, 169–177.
- Xie, C.-H. & Yokota, A. (2005a).** *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1435–1438.
- Xie, C.-H. & Yokota, A. (2005b).** *Pleomorphomonas oryzae* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from paddy soil of *Oryza sativa*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1233–1237.
- Yoon, J. H., Kang, S. J., Park, S. & Oh, T. K. (2007).** *Caenispirillum bisanense* gen. nov., sp. nov., isolated from sludge of a dye works. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 1217–1221.
- Yurkov, V. & van Gemerden, H. (1993).** Abundance and salt tolerance of obligately aerobic, phototrophic bacteria in a marine microbial mat. *Neth J Sea Res* **31**, 57–62.
- Zeikus, J. G., Hegge, P. W. & Anderson, M. A. (1979).** *Thermoanaerobium brockii* gen. nov. and sp. nov., a new chemoorganotrophic, caldoactive, anaerobic bacterium. *Arch Microbiol* **122**, 41–48.
- Zhang, G. I., Hwang, C. Y. & Cho, B. C. (2008).** *Thalassobaculum litoreum* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Rhodospirillaceae* isolated from coastal seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 479–485.

Dethiosulfovibrio salsuginis sp. nov., an anaerobic, slightly halophilic bacterium isolated from a saline spring

C. Díaz-Cárdenas,¹ G. López,¹ B. K. C. Patel² and S. Baena¹

Correspondence

Sandra Baena

baena@javeriana.edu.co

¹Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental, Departamento de Biología, Pontificia Universidad Javeriana, POB 56710, Bogotá, Colombia

²Microbial Gene Research and Resources Facility, School of Biomolecular and Physical Sciences, Griffith University, Brisbane 4111, Australia

A mesophilic, strictly anaerobic, slightly halophilic bacterium, designated strain USBA 82^T, was isolated from a terrestrial saline spring in the Colombian Andes. The non-spore-forming curved rods (5–7×1.3 μm) with pointed or rounded ends, stained Gram-negative and were motile by means of laterally inserted flagella. The strain grew optimally at 30 °C (growth range 20–40 °C), pH 7.3 (growth range pH 5.5–8.5) and 2% (w/v) NaCl (growth range 0.1–7% NaCl). The strain fermented peptides, amino acids and a few organic acids, but growth was not observed on carbohydrates, alcohols or fatty acids. The strain reduced thiosulfate and sulfur to sulfide. Sulfate, sulfite, nitrate and nitrite were not used as electron acceptors. On peptone alone, acetate, succinate, propionate and traces of ethanol were formed, but in the presence of thiosulfate, acetate and succinate were formed. The G+C content of the chromosomal DNA was 52 mol% (T_m). 16S rRNA gene sequence analysis indicated that strain USBA 82^T was affiliated to *Dethiosulfovibrio peptidovorans* within the phylum *Synergistetes* with a similarity value of approximately 93%. Based on the differences between the new strain and the type species of the genus *Dethiosulfovibrio*, we suggest that strain USBA 82^T represents a novel species of the genus for which the name *Dethiosulfovibrio salsuginis* sp. nov. is proposed. The type strain is USBA 82^T (=DSM 21565^T=KCTC 5659^T).

The phylum *Synergistetes* (Jumas-Bilak *et al.*, 2009) currently includes members of the genera *Dethiosulfovibrio*, *Synergistes*, *Anaerobaculum*, *Aminobacterium*, *Thermanaerovibrio*, *Aminomonas*, *Thermovirga*, *Aminiphilus*, *Jonquetella* and *Cloacibacillus* (Rees *et al.*, 1997; Baena *et al.*, 1998, 1999a, b; Dahle & Birkeland, 2006; Díaz *et al.*, 2007; Jumas-Bilak *et al.*, 2007; Ganesan *et al.*, 2008). A distinguishing feature that is common to all members of this phylum is the capacity to degrade amino acids (Vartoukian *et al.*, 2007). *Dethiosulfovibrio peptidovorans* is the type species of the genus *Dethiosulfovibrio*. It was obtained from a corroding offshore oil well in Congo and is a non-saccharolytic peptide- and amino acid-degrading species which grows on several different amino acids in the presence of elemental sulfur or thiosulfate. During such growth, an increase in peptide utilization, cell yields and growth rates has been noted (Magot *et al.*, 1997). In this report, we describe the characterization of a new *Dethiosulfovibrio* strain, isolated from the 'Salpa' saline spring.

As part of our ongoing research into the microbial diversity of the Salpa terrestrial saline spring, samples were collected

in sterile containers, the containers were capped, stored over ice, transported to the laboratory and maintained at 4 °C until used. The Salpa saline spring is located in the Andean region of Colombia at 2500 m above sea level. The spring has a constant temperature of 21 °C and a pH of 6.5 throughout the year. The predominant dissolved ion is sulfate (20 g l⁻¹) and the conductivity is approximately 50 mS cm⁻¹ (Alfaro, 2002).

Enrichments were initiated in a medium prepared by filtering saline spring water through polycarbonate membranes (Durapore) with a pore size of 0.22 μm. The medium was supplemented with peptone (0.2%, w/v), yeast extract (0.02%, w/v) and the trace element solution (1 ml l⁻¹) as described by Imhoff-Stuckle & Pfenning (1983). The medium was boiled and then cooled to room temperature under a stream of oxygen-free nitrogen. An 8 ml aliquot was dispensed into Hungate tubes under oxygen-free nitrogen gas and sterilized by autoclaving at 121 °C for 20 min at a pressure of 1–1.5 kg cm⁻². The enrichment medium was inoculated with 2 ml water samples, incubated at 36 °C for up to two weeks and examined by phase-contrast light microscopy (Eclipse 50i; Nikon).

The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain USBA 82^T is EU719657.

To isolate pure cultures, serial dilutions of the enrichment cultures were made in an artificial basal medium (BM) fortified with 2% (w/v) Noble agar using the roll-tube technique. BM contained (l^{-1} deionized water): 1 g NH_4Cl , 0.3 g K_2HPO_4 , 0.3 g KH_2PO_4 , 3 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.1 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.1 g KCl , 23 g $NaCl$, 1 ml trace element solution (Imhoff-Stuckle & Pfenning, 1983), 0.5 g cysteine-HCl, 1.0 g yeast extract and 0.5% (w/v) peptone. The pH of the medium was adjusted to 7.1 with 1 M NaOH solution and then boiled, cooled and dispensed as described previously (Baena *et al.*, 1998). Three morphologically similar cultures were isolated and 16S rRNA gene sequences of all of the isolates showed an identical sequence (100% similarity). One of the three isolates, designated strain USBA 82^T, was selected and studied further. The pure cultures were stored at $-80^\circ C$ in glycerol-BM (20:80).

Cell morphology was determined by phase-contrast microscopy. Samples for electron microscopy were prepared as described by Patel *et al.* (1985). Cells of strain USBA 82^T were slightly curved rods with pointed or rounded ends ($5-7 \times 1.5 \mu m$) and occurred singly or in pairs. Cells stained Gram-negative and were motile by laterally inserted flagella. Spores were not observed and exponential phase cultures were killed when heated to $90^\circ C$ for 5 min.

All growth studies were performed in duplicate in BM as described above. The novel strain was subcultured at least once under the same experimental conditions before use. To investigate the pH range for growth, studies were performed in BM adjusted to pH values between 4.0 and 9.0 with anoxic stock solutions of $NaHCO_3$ (10%, w/v), Na_2CO_3 (10% w/v) or citrate buffer (1 M). Strain USBA 82^T grew between pH 5.5 and 8.5, with optimum growth at pH 7.3. The temperature range for growth was between 20 and $40^\circ C$, with optimum growth occurring at $30^\circ C$. To determine the NaCl tolerance of the strain, NaCl was added directly into the tubes to obtain the desired concentration and the BM was then added. Strain USBA 82^T grew in concentrations of 0.1–7% NaCl, but not in NaCl concentrations below 0.1% or above 8%. Cells grew optimally at 2% NaCl (w/v).

Thiosulfate (10 mM), sulfate (10 mM), sulfite (5 mM), elemental sulfur (3%, w/v), sodium nitrate (20 mM) and sodium nitrite (5 mM) were tested as electron acceptors in BM lacking yeast extract and supplemented with 0.2% (w/v) peptone rather than the usual 0.5% (w/v). H_2S production from the reduction of sulfate, sulfite, elemental sulfur and thiosulfate was determined using the method of Cord Ruwisch (1985). The reduction of nitrate, nitrite and ammonia was determined as described by Ogg & Patel (2009). Strain USBA 82^T was able to weakly reduce elemental sulfur and thiosulfate, but not sulfate, sulfite, nitrate or nitrite. Strain USBA 82^T was unable to grow under aerobic conditions.

Substrate utilization tests were performed in the presence or absence of thiosulfate and sulfur in BM lacking peptone

and amended with 0.025% (w/v) yeast extract rather than 1.0%. Substrates from autoclaved or filter-sterilized anaerobic stock solutions of monosaccharides, disaccharides, polysaccharides, sugar alcohols and peptides were added to a final concentration of 0.2% (w/v) and organic acids and amino acids were added to a concentration of 10 mM. Growth was measured by inserting Hungate tubes into a Novaspec LKB spectrophotometer (Pharmacia-Biotech Pty. Ltd) and monitoring the optical density at 580 nm. Cultures were recorded as positive for growth if they exhibited an increase in optical density relative to controls (which lacked any added carbon sources). Strain USBA 82^T fermented Casamino acids, peptone, tryptone, serine, histidine, threonine, arginine, glutamate, pyruvate and citrate. Growth did not occur on lysine, glycine, proline, valine, alanine, cysteine, leucine, isoleucine, lactate, succinate, formate, acetate, propionate, butyrate, fructose, cellobiose, xylose, glucose, mannose, mannitol, maltose, ribose, sucrose, lactose, galactose, arabinose, raffinose, glycerol, methanol, ethanol or inositol either in the presence or the absence of thiosulfate or sulfur.

End products from peptone fermentation and respiration were measured by HPLC (LC-20AT; Shimadzu Prominence) equipped with a reverse-phase C18 ultra aqueous column ($150 mm \times 4.6 mm$ ID) and a diode array detector (SPD-M20A) at 210 nm. The end products detected from peptone fermentation were acetate, succinate, propionate and traces of ethanol. In the presence of thiosulfate, the only end products detected were acetate and succinate.

Using the whole genome amplification method (Ogg & Patel, 2009), the G + C content of the DNA of strain USBA 82^T was calculated to be 52 mol% (T_m).

DNA purification, PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene were performed as described by Andrews & Patel (1996). Raw sequence data were imported into BioEdit, version 5.0.9 (Hall, 1999), the base calling was carefully examined and a contiguous consensus sequence of 1388 bp was generated. Using this consensus sequence, the closest relatives identified against the GenBank database (Altschul *et al.*, 1997; Benson *et al.*, 1999) using BLASTN and against the Ribosomal Database Project using the Sequence Aligner Program (Maidak *et al.*, 2001) were downloaded. The sequences were aligned and positions of sequence and alignment ambiguity were omitted. A pairwise evolutionary distance matrix was generated using the method of Jukes & Cantor (1969) and a dendrogram was constructed using the neighbour-joining method (Saitou & Nei, 1987) as implemented in TREECON (Van de Peer & De Wachter, 1994). Confidence in the tree topology was determined by using 1000 bootstrapped trees (Felsenstein, 1985). Phylogenetic analysis placed strain USBA 82^T in the phylum *Synergistetes*, closest to *Dethiosulfovibrio peptidovorans* DSM 11002^T (93% gene sequence similarity) (Magot *et al.*, 1997) (Fig. 1).

Strain USBA 82^T and *D. peptidovorans* DSM 11002^T shared the ability to ferment yeast extract, peptone, tryptone,

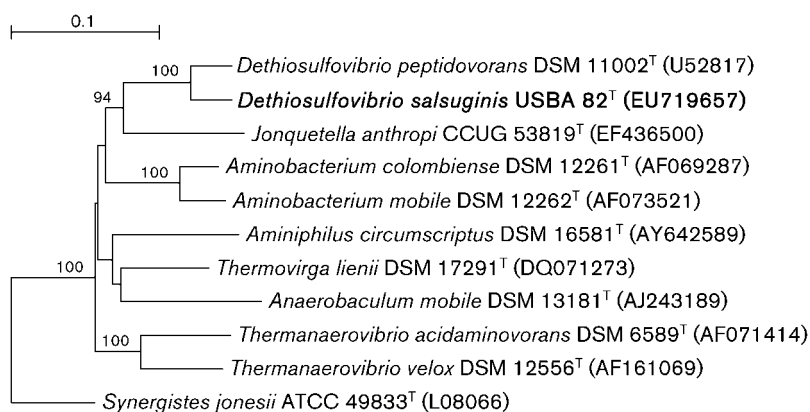


Fig. 1. Neighbour-joining dendrogram showing the phylogenetic position of strain USBA 82^T and its closest relatives. GenBank accession numbers are given in parentheses. Bootstrap values >90% are shown. Bar, 10 nucleotide changes per 100 nucleotides.

Casamino acids, serine and histidine and the inability to use carbohydrates, fatty acids and organic acids as sole carbon and energy sources. Both strains reduced the electron acceptors sulfur and thiosulfate to sulfide. Sulfur or thiosulfate was obligately required by *D. peptidovorans* for growth on the amino acids arginine, glutamate and valine, but not by strain USBA 82^T which grew on these amino acids fermentatively (Table 1). Strain USBA 82^T could also be differentiated from *D. peptidovorans* by its ability to ferment threonine and citrate and its inability to use alanine, isoleucine and leucine in the presence or absence of sulfur or thiosulfate (Table 1). On the basis of its phenotypic characteristics, the phylogeny based on 16S rRNA gene sequence analysis and its G+C content, strain USBA 82^T may be categorized as a novel member

of the genus *Dethiosulfovibrio*, for which the name *Dethiosulfovibrio salsuginis* sp. nov. is proposed.

Description of *Dethiosulfovibrio salsuginis* sp. nov.

Dethiosulfovibrio salsuginis (sal.su'gi.nis. L. gen. n. *salsuginis* of salt water).

Cells stain Gram-negative and are slightly curved or vibrioid-like rods with rounded or pointed ends, 5–7 × 1.5 µm. Cells are highly motile by means of lateral flagella. Endospores are not formed. Obligately anaerobic. Growth occurs in media containing 0.1–6.0% (w/v) NaCl; 2% (w/v) is optimal for growth. NaCl is tolerated up to 7%, but no growth occurs at 8% or below 0.01%. The pH range

Table 1. Physiological characteristics of strain USBA 82^T and the type species of the genus *Dethiosulfovibrio*

Strains: 1, USBA 82^T; 2, *D. peptidovorans* DSM 11002^T (data from Magot *et al.*, 1997). +, Positive; –, negative; +¹, used only in the presence of thiosulfate or sulfur; ND, not determined. Neither of the strains use lactate, formate, acetate, propionate, butyrate, succinate, ethanol, methanol, glycerol or mannitol. Both taxa reduce sulfur and thiosulfate to sulfide, but do not reduce sulfate to sulfide.

Characteristic	1	2
Sampling site	Saline spring	Corroding offshore oil well
Cell morphology	Curved rods or spirals	Vibrio
Cell size (µm)	1.5 × 5–7	1 × 3–5
DNA G+C content (mol%)	52	56
Temp. range (optimum) (°C)	20–40 (30)	20–45 (42)
NaCl range (% w/v) (optimum)	0.1–7 (2)	(3)
pH range (optimum)	5.5–8.5 (7.3)	5.5–8.8 (7.0)
Utilization of:		
Alanine	–	+ ¹
Arginine	+	+ ¹
Citrate	+	–
Cysteine	–	ND
Glutamate	+	+ ¹
Isoleucine	–	+ ¹
Leucine	–	+ ¹
Lysine	–	–
Pyruvate	+	ND
Threonine	+	–
Valine	–	+ ¹

for growth is 5.5–8.5 with an optimum at pH 7.3. The temperature range for growth is 20–40 °C with an optimum at 30 °C. The type strain is able to reduce elemental sulfur (weakly) and thiosulfate when growing on peptone, but is not able to reduce sulfate, sulfite, nitrate or nitrite. Ferments pyruvate, citrate, Casamino acids, peptone, tryptone, serine, histidine, threonine, arginine and glutamate. Growth does not occur on lysine, glycine, proline, valine, alanine, cysteine, leucine, isoleucine, lactate, succinate, formate, acetate, propionate, butyrate, fructose, cellobiose, xylose, glucose, mannose, mannitol, maltose, ribose, sucrose, lactose, galactose, arabinose, raffinose, glycerol, methanol, ethanol or inositol either the presence or the absence of thiosulfate or sulfur. The main end products of fermentation are acetate and succinate.

The type strain, USBA 82^T (=DSM 21565^T=KCTC 5659^T), was isolated from the Salpa saline spring. The DNA G + C content of the type strain is 52 mol%.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología (Colciencias) and International Foundations Science (IFS). Special gratitude is expressed to Carolina Rubiano, Luisa Fernanda Bernal and Javier Gómez for chromatographic analysis.

References

- Alfaro, C. (2002).** *Geoquímica del Sistema Geotérmico de Paipa*. Documento interno ministerio de Minas y Energía – INGEOMINAS, p. 40. Bogotá, Colombia: Proyecto Exploración y Evaluación de los Recursos Geotérmicos (in Spanish).
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389–3402.
- Andrews, K. T. & Patel, B. K. C. (1996).** *Fervidobacterium gondwanense* sp. nov., a new thermophilic anaerobic bacterium isolated from nonvolcanically heated geothermal waters of the Great Artesian Basin of Australia. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 265–269.
- Baena, S., Fardeau, M.-L., Labat, M., Ollivier, B., Garcia, J.-L. & Patel, B. K. C. (1998).** *Aminobacterium colombiense* gen. nov. sp. nov., an amino acid-degrading anaerobe isolated from anaerobic sludge. *Anaerobe* **4**, 241–250.
- Baena, S., Fardeau, M.-L., Woo, T. H. S., Ollivier, B., Labat, M. & Patel, B. K. C. (1999a).** Phylogenetic relationships of three amino-acid utilizing anaerobes, *Selenomonas acidaminovorans*, '*Selenomonas acidaminophila*' and *Eubacterium acidaminophilum*, as inferred from partial 16S rDNA nucleotide sequences and proposal of *Thermanaerovibrio acidaminovorans* gen. nov., comb. nov. and *Anaeromusa acidaminophila* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 969–974.
- Baena, S., Fardeau, M.-L., Ollivier, B., Labat, M., Thomas, P., Garcia, J.-L. & Patel, B. K. C. (1999b).** *Aminomonas paucivorans* gen. nov., sp. nov., a mesophilic, anaerobic, amino-acid-utilizing bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 975–982.
- Benson, D. A., Boguski, M. S., Lipman, D. J., Ostell, J., Ouellette, B. F., Rapp, B. A. & Wheeler, D. L. (1999).** GenBank. *Nucleic Acids Res* **27**, 12–17.
- Cord-Ruwisch, R. (1985).** A quick method for determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J Microbiol Methods* **4**, 33–36.
- Dahle, H. & Birkeland, N. K. (2006).** *Thermovirga lienii* gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic, anaerobic, amino-acid-degrading bacterium isolated from a North Sea oil well. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1539–1545.
- Diaz, C., Baena, S., Fardeau, M. L. & Patel, B. K. C. (2007).** *Aminiphilus circumscriptus* gen. nov., sp. nov., an anaerobic amino-acid-degrading bacterium from an upflow anaerobic sludge reactor. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 1914–1918.
- Felsenstein, J. (1985).** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783–791.
- Ganesan, A., Chaussonnerie, S., Tarrade, A., Dauga, C., Bouchez, T., Pelletier, E., Le Paslier, D. & Sghir, A. (2008).** *Cloacibacillus evryensis* gen. nov., sp. nov., a novel asaccharolytic, mesophilic, amino-acid-degrading bacterium within the phylum '*Synergistetes*', isolated from an anaerobic sludge digester. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 2003–2012.
- Hall, T. A. (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**, 95–98.
- Imhoff-Stuckle, D. & Pfenning, N. (1983).** Isolation and characterization of a nicotinic-acid degrading sulfate-reducing bacterium, *Desulfococcus niacini* sp. nov. *Arch Microbiol* **136**, 194–198.
- Jukes, T. H. & Cantor, C. R. (1969).** Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, vol. 3, pp. 21–132. Edited by H. N. Munro. New York: Academic Press.
- Jumas-Bilak, E., Carlier, J.-P., Jean-Pierre, H., Citron, D., Bernard, K., Damay, A., Gay, B., Teyssier, C., Campos, J. & Marchandin, H. (2007).** *Jonquetella anthropi* gen. nov., sp. nov., the first member of the candidate phylum '*Synergistetes*' isolated from man. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2743–2748.
- Jumas-Bilak, E., Roudière, L. & Marchandin, H. (2009).** Description of *Synergistetes* phyl. nov. and emended description of the phylum *Deferribacteres* and of the family *Syntrophomonadaceae*, phylum *Firmicutes*. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 1028–1035.
- Magot, M., Ravot, G., Campaignolle, X., Ollivier, B., Patel, B. K., Fardeau, M. L., Thomas, P., Crolet, J. L. & Garcia, J. L. (1997).** *Dethiosulfovibrio peptidovorans* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic, slightly halophilic, thiosulfate-reducing bacterium from a corroding offshore oil wells. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 818–824.
- Maidak, B. L., Cole, J. R., Lilburn, T. G., Parker, C. T., Jr, Saxman, P. R., Farris, R. J., Garrity, G. M., Olsen, G. J., Schmidt, T. M. & Tiedje, J. M. (2001).** The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res* **29**, 173–174.
- Ogg, C. D. & Patel, B. K. C. (2009).** *Caloramator australicus* sp. nov., a thermophilic anaerobic bacterium from the Great Artesian Basin of Australia. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 95–101.
- Patel, B. K. C., Morgan, H. W. & Daniel, R. M. (1985).** *Fervidobacterium nodosum* gen. nov. and spec. nov., a new chemoorganotrophic, caldoactive, anaerobic bacterium. *Arch Microbiol* **141**, 63–69.
- Rees, G. N., Patel, B. K. C., Grassia, G. S. & Sheehy, A. J. (1997).** *Anaerobaculum thermoterrenum* gen. nov., sp. nov., a novel, thermophilic bacterium which ferments citrate. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 150–154.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406–425.
- Van de Peer, Y. & De Wachter, R. (1994).** TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput Appl Biosci* **10**, 569–570.
- Vartoukian, S. R., Palmer, R. M. & Wade, W. G. (2007).** The division '*Synergistes*'. *Anaerobe* **13**, 99–106.