



**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA CEPA SULFATO REDUCTORA
TERMOFÍLICA USBA 53 AISLADA DEL MANANTIAL TERMAL OJO DEL DIABLO EN
PAIPA, BOYACÁ**

**CARVAJAL CALDERÓN MARÍA CATALINA
PERDOMO FRANCO NATALIA**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
Bogotá, D.C
Julio de 2008**



**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA CEPA SULFATO REDUCTORA
TERMOFÍLICA USBA 53 AISLADA DEL MANANTIAL TERMAL OJO DEL DIABLO EN
PAIPA, BOYACÁ**

MARÍA CATALINA CARVAJAL CALDERÓN

NATALIA PERDOMO FRANCO

**TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar al título de**

Microbióloga Industrial

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
Bogotá, D.C
Abril de 2008**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“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”.

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA CEPA SULFATO REDUCTORA
TERMOFÍLICA USBA 53 AISLADA DEL MANANTIAL TERMAL OJO DEL DIABLO EN
PAIPA, BOYACÁ**

MARÍA CATALINA CARVAJAL CALDERÓN

NATALIA PERDOMO FRANCO

APROBADO

**Sandra Baena Ph. D
Directora**

**José Salvador Montaña, M.Sc
Jurado**

**Ivonne Balzer, Ph.D
Jurado**

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA CEPA SULFATO REDUCTORA
TERMOFÍLICA USBA 53 AISLADA DEL MANANTIAL TERMAL OJO DEL DIABLO EN
PAIPA, BOYACÁ**

MARÍA CATALINA CARVAJAL CALDERÓN

NATALIA PERDOMO FRANCO

APROBADO

**Ingrid Schuler, Ph. D
Decana Académica
Facultad de Ciencias**

**Janeth Arias Palacios, M.Sc-M.Ed
Directora Carreras de Microbiología**

Este trabajo de grado lo dedico a mis padres,
hermanos y familia, quienes han estado
siempre a mi lado para comprenderme,
apoyarme y ayudarme a cumplir todas las metas
que a lo largo de mi vida me he propuesto.
A Jonathan quien siempre ha estado conmigo
y ha vivido como yo todo este proceso,
por su paciencia y sobre todo su amor.
A Natalia con quien compartí muchas
momentos importantes a lo largo de estos años
ya que sin ella no lo hubiese logrado.
A Dios por darme la fuerza y
valentía para lograr mis sueños.

María Catalina Carvajal Calderón

Al finalizar este trabajo de grado quiero dedicarlo a las personas que siempre estuvieron a mi lado, que me impulsaron diariamente a seguir adelante y a hacer las cosas bien hechas, mis padres, hermanas y sobrinos. A mi mami por enseñarme a engrandecer mi espíritu con sus consejos y por su constante apoyo durante todo este tiempo. A mi compañera Catalina por su perseverancia, responsabilidad y apoyo, con quien compartí muchas experiencias durante estos cinco años y porque sin ella no hubiera sido posible su culminación y sobre todas las cosas, a Dios por no dejarme desfallecer y por darme la fuerza y paciencia que junto con el apoyo de mi familia me han llevado a cumplir las metas que me he propuesto en la vida, haciendo de ellas una experiencia de crecimiento personal inigualable.

Natalia Perdomo Franco

AGRADECIMIENTOS

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

A la Doctora Sandra Baena en quien reconocemos a un gran ser humano y que por su dirección, apoyo y la constante enseñanza de sus conocimientos fue posible el desarrollo de esta investigación.

A la Ingeniera Balkys Quevedo por su excelente asesoría a lo largo de este trabajo.

A nuestros compañeros de USBA Javier Gómez, Carolina Díaz y Carolina Rubiano por su apoyo, acompañamiento, colaboración y aporte incondicional en este proyecto.

A nuestros amigos y familiares que estuvieron con nosotras dándonos su apoyo constante.

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	16
2	MARCO TEÓRICO	18
2.1	AMBIENTES EXTREMOS	18
2.2	AMBIENTES TERMALES EN PAIPA, BOYACÁ	19
2.3	DIVERSIDAD MICROBIANA DE LOS MANANTIALES TERMALES	22
2.3.1	Microorganismos termófilos e hipertemófilos	22
2.3.2	Ecología de las Bacterias Sulfato Reductoras	26
2.3.3	Hábitats de las Bacterias Sulfato Reductoras.	30
2.3.4	Efectos del pH, temperatura y salinidad sobre el crecimiento de las Bacterias Sulfato Reductoras	32
2.4	METABOLISMO DEL CARBONO EN BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS	33
2.4.1	Reducción desasimilatoria del sulfato	34
2.4.2	Degradación de compuestos orgánicos en presencia de sulfato	36
2.4.3	Fermentación de sustratos	40
2.4.4	Reducción de Azufre elemental, Nitrato y Oxígeno	41

2.4.5	Reducción de metales por Bacterias Sulfato Reductoras Desasimilatorias	42
2.5	FILOGENIA DE LAS BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS	43
3	FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	47
4	OBJETIVOS	48
4.1	OBJETIVO GENERAL	48
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
5	MATERIALES Y MÉTODOS	49
5.1	DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	49
5.1.1	Población de estudio y muestra	49
5.2	MÉTODOS	51
5.2.1	Análisis de la secuencia parcial del gen 16S rRNA	51
5.2.2	Enriquecimiento	51
5.2.3	Determinación de las características morfológicas	52
5.2.4	Determinación de las características fenotípicas	53
5.2.5	Prueba de resistencia a antibióticos	55
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
6.1	DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	56
6.1.1	Estudios morfológicos y fisiológicos	56
6.2	DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS	61
6.2.1	Evaluación de parámetros de crecimiento	61

6.2.2	Establecimiento de una curva de calibración para la determinación de peso seco microbiano	63
6.3	UTILIZACIÓN DE DONADORES Y ACEPTORES DE ELECTRONES	64
6.3.1	Prueba de catalasa y resistencia a antibióticos.	68
7	CONCLUSIONES	71
8	RECOMENDACIONES	72
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales características de manantiales termales y salinos en la región central de la Cordillera Oriental (Boyacá),	20
Tabla 2. Compuestos que pueden ser usados como sustratos para la reducción desasimilatoria del sulfato,	33
Tabla 3. Características principales de los MT Ojo del Diablo, Hotel Lanceros e IZA 03,	50
Tabla 4. Análisis de aguas de los MT Ojo del Diablo, Hotel Lanceros e IZA 03,	50
Tabla 5. Composición de MB de cultivo para bacterias termofílicas- halotolerantes sulfato-reductoras,	52
Tabla 6. Principales características de la cepa USBA 53 y de las especies <i>D. hydrothermale</i> , <i>D. infernum infernum</i> y <i>D. subterraneum</i> .,	59, 61
Tabla 7. Concentración de productos finales en la evaluación de donadores de electrones con 20mM de SO ₄ a 57 °C, pH 6.75 y 25 g/L de NaCl.,	63
Tabla 8. Crecimiento de la cepa USBA 53 en Penicilina G y Cloranfenicol a las concentraciones de 50 y 100 µg/mL.,	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Vista microscópica de la cepa USBA 53 mostrando su morfología típica.,	57
Figura 2 Vista microscópica de la cepa USBA 53 mostrando la formación de agregados celulares en forma de L y U observados después de varias semanas de incubación.,	57
Figura 3. Rango y temperatura óptima de crecimiento de la cepa USBA 53 evaluado a pH de 7.0 +/- 0.2, 23 g/L de NaCl.,	64
Figura 4. Rango y pH óptimo de crecimiento de la cepa USBA 53 evaluado a 55°C y 23g/L de NaCl.,	64
Figura 5. Rango y concentración de NaCl óptima de crecimiento de la cepa USBA 53 evaluado a 55°C y pH 7.0 +/- 0.2.,.....	65
Figura 6. Curva de peso seco. Valor de las DO 580nm vs Peso seco (µg/ml) evaluada a 57°C, pH 6.75 y 25 g/L de NaCl.,	67
Figura 7. Biomasa vs tiempo del crecimiento de la cepa USBA 53 evaluada a 57°C, pH 6.75 y 25 g/L de NaCl.,.....	67
Figura 8. Ln X/X ₀ vs tiempo de la cepa USBA 53 para la determinación de µX y Td evaluada a 57°C, pH 6.75 y 25 g/L de NaCl.,	67

RESÚMEN

Cinco cepas denominadas USBA 3, USBA 43, USBA 46, USBA 53 y USBA 58 fueron aisladas de un Manantial Termal en Paipa, Boyacá, estas se encontraron relacionadas con el género *Desulfacinum* con una similaridad cercana al 93%. El análisis y comparación de la secuencia del 16S rRNA entre estas 5 cepas, el valor de la similitud obtenido con relación al género *Desulfacinum* y diferencias fenotípicas identificadas previamente, permitieron concluir que este grupo podría constituirse en un nuevo género microbiano. Para realizar la caracterización fenotípica en este estudio se seleccionó la cepa USBA 53 como representativa del grupo. Las células de esta cepa son ovoides o bacilos cortos (0,04 µm de largo por 0,02 µm de ancho), no móviles, no formadoras de esporas y Gram positivas. Su crecimiento ocurre a una temperatura de 50 a 62°C, y la óptima es de 57°C. El rango de crecimiento a una concentración de NaCl es entre 5 y 30 g/L, con una concentración óptima de 25 g/L de NaCl. El rango de pH se encuentra entre 5.7 y 7.7 con un pH óptimo de 6.75. En presencia de sulfato, este organismo puede utilizar formato, propionato, butirato, valerato, isovalerato, etanol, glicerol, piruvato, lactato, serina y puede crecer autotróficamente en H₂+CO₂. Como aceptores de electrones puede utilizar el sulfato y no puede utilizar nitrato. Todos estos análisis fenotípicos y la comparación con especies del género *Desulfacinum*, *D. hydrothermale*, *D. infernum* y *D. subterraneum* permitieron establecer las características fenotípicas de este nuevo género.

ABSTRACT

Five strains which were tagged as USBA 3, USBA 43, USBA 46, USBA 53 and USBA 58, were isolated from a thermal hot spring located in Paipa, Boyaca. These strains were found to be related to the genus *Desulfacinum*, with a similarity close to 93%. The analysis and comparison of the 16S rRNA sequence between these strains, the value of the similarity obtained with *Desulfacinum* and the phenotypic differences identified previously allowed the conclusion that this group could constitute a new microbial genus. In order to carry out the phenotypic characterization in this study, the strain USBA 53 was selected as representative of the group. The cells of these strains are oval or short rods (0,04-0,06µm long by 0,02µm wide), non motile, non-spore forming and gram-positive. Their growth occurs at a temperature between 50 and 62°C, with an optimum temperature of 57°C. The growth range occurs at a concentration of NaCl between 5 and 30g/L, with an optimum concentration of 25g/L of NaCl. The range of pH is between 5.7 and 7.7 with an optimum pH of 6.75. In the presence of sulphate, this organism can use formate, propionate, butyrate, valerate, isovalerate, ethanol, glycerol, piruvate, lactate, serine and can grow autotrophically in H₂+CO₂. As electron acceptors, it can use the sulphate and can not use nitrate. The analysis and comparison of the 16S rRNA sequence between these strains, the value of the similarity obtained with *Desulfacinum* and the phenotypic differences identified previously allowed the conclusion that this group could constitute a new microbial genus.

1. INTRODUCCIÓN

En Colombia existen diferentes hábitats que pueden ser considerados ambientes extremos que permiten la proliferación de seres vivos adaptados a sus condiciones extremas. Entre estos ambientes extremos se encuentran los manantiales termales (MT) que se definen como manifestaciones de actividad geológica. Estos manantiales tienen diferentes propiedades físico químicas que dependen de las características geológicas de su ubicación geográfica y en donde las fuentes de calentamiento, abastecimientos magmáticos y la actividad hidrotermal están muy relacionados.

Los MT de Boyacá localizados principalmente en los municipios de Paipa e Iza son hábitats con comunidades microbianas diversas debido probablemente a las condiciones abióticas y presencia de formas oxidadas y reducidas del azufre y materia orgánica. Una de las comunidades microbianas encontradas en estos hábitats son las Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) termofílicas, consideradas anaerobios ecológicamente importantes en diversos procesos por su capacidad de degradar materia orgánica y de establecer diferentes interacciones con los microorganismos metanogénicos y tiobacterias. Estos organismos son capaces de reducir el sulfato a sulfuro en presencia de compuestos orgánicos e inorgánicos.

El interés por el estudio de las BSR ha ido incrementándose en los últimos años debido a sus potenciales aplicaciones biotecnológicas como la formación de precipitados metálicos insolubles durante la biomineralización, así como en la biodesulfuración de gases, procesos biohidrometalúrgicos y su impacto e importancia a nivel ambiental y económico.

Estudios previos de la diversidad microbiana en MT en los municipios de Paipa e Iza llevados a cabo en la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental de la Pontificia Universidad Javeriana mostraron que aproximadamente el 30% de los organismos aislados eran BSR. El análisis de la secuencia del gen 16S rRNA mostró además que 11 de los organismos aislados presentaban un porcentaje de similitud inferior al 95% con organismos sulfato reductores. Sumado a los estudios fenotípicos, este análisis molecular permitió establecer que estos organismos sulfato reductores se agrupaban en 2 grupos diferentes, el primero compuesto por 6 organismos sulfato reductores termofílicos relacionados con el género *Desulfomicrobium*, y fueron clasificados posteriormente como una nueva especie de este género denominada *Desulfomicrobium*

thermophilum. El segundo grupo conformado por 5 organismos denominados USBA 3, USBA 43, USBA 46, USBA 53 y USBA 58 se encontraron relacionados con el género *Desulfacinum* con una similaridad del gen 16S rRNA cercana al 93%. El análisis y comparación de la secuencia del 16S rRNA entre estos 5 organismos y comparaciones fenotípicas hechas previamente, permitieron concluir que este segundo grupo podría constituirse en un nuevo género microbiano sulfato reductor. Para la definición taxonómica de estos 5 organismos, se seleccionó la cepa USBA 53 como representativa del grupo para realizar su descripción fenotípica siendo este el objetivo principal de este estudio.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 AMBIENTES EXTREMOS

Los ambientes extremos son hábitat donde los factores abióticos presentes no son tolerados por la mayoría de las formas de vida. Dentro de estos factores se encuentran pH, temperatura, altas concentraciones de sal, presencia de metales pesados, condiciones bajas en nutrientes, bajo potencial redox o niveles de radiación elevados. Sin embargo, se conoce gran diversidad de microorganismos con capacidad de sobrevivir y aún de reproducción en estos ambientes (**Rossi et al., 2003; Schlegel & Jannasch., 2006**).

La diversidad de ambientes extremos es amplia, entre estos se encuentran fuentes termales submarinas, hielos del mar Antártico, suelos carbonatados, lagos alcalinos, suelos y manantiales salinos, lagos naturales con una elevada salinidad y manantiales termales (**Rossi et al., 2003; Kjeldsen et al., 2007**).

Algunos hábitats antropogénicos pueden considerarse también como un tipo de ambiente extremo, estos hábitats incluyen pilas de compostaje de residuos domiciliarios, calentadores de agua y efluentes termales de plantas eléctricas (**Burgess et al., 2007**).

Pentecost (2005) clasificó los MT en calientes, tibios y fríos de acuerdo a su relación con la temperatura media anual del aire (TMAA). Los manantiales con temperatura menor a la TMAA se denominan manantiales ambientales; manantiales con temperaturas superiores a la TMAA pero sin exceder los 36.7°C se denominan manantiales superambientales; y finalmente, cuando la temperatura del agua se aproxime a los 36.7°C y sobrepase este valor se consideran manantiales termales.

De acuerdo a la temperatura del agua de los manantiales Marín, 1992 los clasificó en hipertermales (temperaturas mayores a 50 °C), mesotermiales (temperaturas entre 30° y 50 °C), hipotermiales (temperaturas de 20° a 30 °C), prototermiales (temperaturas de 15° a 25°C) y fuentes frías (temperaturas menores a 20 °C). La temperatura, como un factor ambiental, afecta a todos los microorganismos vivos que por el resultado de millones de

años de evolución, se han adaptado para vivir en temperaturas extremas cuyo límite superior se ha definido en 150°C y como límite inferior -20°C (**Burgess et al., 2007**).

En los MT las fisuras y fallas que se presentan en la corteza terrestre permiten que el agua (marina, subterránea o lluvia) se infiltre y descienda. Este fluido se mueve a través de la corteza terrestre y alcanza la cámara magmática, el fluido se calienta y reacciona con las rocas circundantes, adquiere algunos minerales y gases (hierro, manganeso, dióxido de carbono, hidrógeno y sulfuro de hidrógeno) y remueve otros (como el sulfato de magnesio en las aguas marinas). El fluido es finalmente forzado a volver a la superficie como un fluido altamente caliente, y con propiedades químicas similares a las de la corteza terrestre (**Reysenbach & Rising, 2001**). En mezclas rápidas con agua fría oxigenada y minerales rápidamente precipitados, el fluido toma una apariencia gaseosa conocida como fumarola negra. Como los minerales anteriormente mencionados se han precipitado, se crean poros de azufre mineral llamados chimeneas. En los manantiales termales terrestres, el fluido puede ser expulsado forzosamente como géiseres ó simplemente como burbujas dentro del termal (**Reysenbach & Rising, 2001**).

La composición química general de los MT refleja la presencia de compuestos como cloruros (Cl^{-1}), sulfatos (SO_4^{-2}), nitratos (NO_3^{-}), nitritos (NO_2^{-}), amoníaco (NH_3^{+}), sílice (SiO_2); y elementos como calcio (Ca^{+2}), magnesio (Mg^{+2}), flúor (F_2), entre otros. Lo cual permite clasificarlas en aguas bicarbonatadas, cloruradas, sódicas, sulfuradas, cálcicas, clorosulfuradas, ferruginosas, arsenicales y radioactivas (**Alfaro, 2002**). Las aguas radioactivas de un sistema hidrotermal presentan niveles de radioactividad natural que puede ser 100 veces mayor a la de la superficie de la Tierra, por el incremento en la ocurrencia de elementos como ^{210}Pb , ^{210}Po y ^{222}Rn (**Burgess et al., 2007**). Sin embargo, la composición química exacta de los MT depende de los componentes de las rocas por donde pasa el agua y de la temperatura del agua del reservorio que contribuye a la solubilización de dichos componentes (**Ávila & Sánchez, 2003**).

2.2 AMBIENTES TERMALES EN PAIPA, BOYACÁ

Un sistema geotérmico se define a partir de sus características como la fuente de calor, reservorio, capa sello, zona de recarga, zona de descarga y temperatura del reservorio (**Alfaro, 2002**).

Alfaro (2002) determinó que el sistema geotérmico de Paipa está integrado por 22 MT ubicados a lo largo de siete kilómetros en línea recta hacia el sur del municipio, en la región central de la cordillera oriental sobre el altiplano cundiboyacense. Las temperaturas máximas son de 77°C, tienen un rango de pH entre 3.6 y 7.4 y una

concentración de NaCl entre 0.05 y 56 g/L presentando el mayor contenido en sales entre los manantiales en Colombia, que se encuentran resumidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales características de manantiales termales y salinos en la región central de la Cordillera Oriental (Boyacá)

	Manantial P-1	Manantial P-2	Manantial P-3	Manantial P-4	Manantial P-5	Manantial P-6	Manantial IZA 03
Localización	5°45'34.81"N	5°45'35.20"N	5°45'33.29"N	5°45'30.69"N	5°43'47.69"N	5°43'37.29"N	Cuitiva, Vereda la Vega
	73°6'44.68"W	73°6'46.31"W	73°6'49.89"W	73°6'50.61"W	73°7'4.10"W	73°7'9.19"W	
Altitud (m.s.n.m)	2495	2496	2500	2500	2510	2520	2540
pH	7.0	6.8-7.2	6.9	7.0 – 7.2	6.76	6.8	6.8 - 6.45
T (°C)	54.0	44 – 53	64 – 68	64.0	74.2	55.0	56 - 57
Conductividad (mS/cm)	44.5	43.0	43.5	42.5	21.7	52.3	609 – 590 µS/cm
Salinidad (STD) (g/L)	43.0	42.0	41.2	41.1	13.5	24.5	0.3
SO₄ (mg/L)	20187	19750	19250	19375	8250	8750	1.8
Clasificación de los manantiales de acuerdo a sus principales especies químicas acuosas	Sulfatado	Sulfatado	Sulfatado	Sulfatado	Sulfatado	Clorado- Sulfatado	Bicarbonatado

P-1: Pozo Azul
P-2: Pozo Inundado
P-3: Manantial Ojo del Diablo
P-4: Manantial Hotel Lanceros
P-6: Manantial Escuela La Playa
P-6^a: Manantial La Playa
P-8: Manantial El Hervidero
IZA 03: Manantial El Batán
Fuente: (Alfaro, 2002)

2.3 DIVERSIDAD MICROBIANA DE LOS MANANTIALES TERMALES

2.3.1 Microorganismos termófilos e hipertemófilos

Los organismos termófilos se encuentran en todos los dominios de la vida, y abarcan desde fotosintetizadores oxigénicos y anoxigénicos, quimiolitotótrofos, heterótrofos, alcalófilos, neutrófilos hasta acidófilos **(Reysenbach et al., 2002)**.

En los dominios Bacteria y Archaea estos organismos son clasificados de acuerdo a sus temperaturas óptimas (T_{opt}) de crecimiento, así: mesófilos (T_{opt} entre 20 y 45°C), termófilos (T_{opt} entre 45 y 80°C) e hipertemofílicos (T_{opt} mayores a 80°C). Bajo este esquema de clasificación, usando las temperaturas máximas y mínimas de crecimiento, los termófilos están además divididos en termotolerantes, que crecen a temperaturas óptimas mesofílicas pero tienen temperaturas máximas de crecimiento mayores a 50°C (T_{opt} entre 50° y 70°C), y termófilos extremos (T_{opt} mayores a 70°C). Los procariontes con T_{opt} mayores a 65°C y con un máximo de 75°C, son considerados termófilos extremos tolerantes de temperatura **(Burgess et al., 2007)**.

Dentro de las comunidades microbianas de los sistemas geotérmicos se encuentran los microorganismos termófilos particularmente quimiolitótrofos, estos pueden ser termófilos e hipertemófilos. Se han descrito algunos hipertemófilos con una temperatura óptima de crecimiento de 105 °C y que no pueden crecer por debajo de los 85 °C **(Atlas & Bartha, 2002)**.

Las altas temperaturas y las características inusuales de los manantiales termales marinos y terrestres, crean nichos ecológicos que son aprovechados por los organismos termófilos presentes en los dominios Bacteria y Archaea **(Reysenbach & Rising, 2001)**. Los microorganismos pertenecientes al dominio Archaea encontrados en MT se agrupan en tres reinos a saber: Crenarchaeota dentro del que se destacan los géneros *Aeropyrum*, *Acidilobus*, *Pyrobaculum*, *Pyrodictium*, *Pyrolobus*, y *Sulfolobus*, en el reino Euriarchaeota se destacan los géneros *Archaeoglobus*, *Picrophilus*, *Pyrococcus*, *Thermococcus*, y *Thermoplasma*, y por último el reino Nanoarchaeota **(Egorova & Antranikian, 2005; Huber et al., 2002)**. Los miembros de los géneros *Archaeoglobus*, *Caldivirga* y *Thermocladium* son las únicas BSR representativas incluidas dentro del dominio Archaea **(Castro et al., 2000; Fauque & Ollivier, 2004; Itoh et al., 1998, 1999)**. Estudios recientes de cultivo e independientes de cultivo han sugerido una amplia diversidad de BSR existentes en ecosistemas termales **(Thevenieau et al., 2007b)**.

Los microorganismos pertenecientes al dominio Bacteria que han sido aislados a partir de sistemas geotermales en su mayoría pertenecen al orden Thermotogales, dentro de este se encuentra el género *Thermotoga* al que pertenecen las especies *T. maritima* (Huber et al., 1986), *T. neapolitana* (Jannasch et al., 1989), aisladas a partir de sistemas geotermales y *T. thermarum* aislada en un manantial termal africano (Windberger et al. 1992). Dentro de este orden Thermotogales también se encuentran los géneros *Fervidobacterium*, *Marinitoga* y *Thermosipho*. Dentro del género *Fervidobacterium* se encuentran las especies *F. gondwanense* (Andrews & Patel, 1996) aislada de aguas geotermales australianas, *F. islandicum* (Huber et al., 1990); *F. changbaicum* (Cai et al., 2007) aislada de aguas geotermales en China; *F. nodosum* (Patel et al., 1985); y *F. pennivorans* (Friedrich & Antranikian, 1999). Al género *Marinitoga* pertenecen las especies *M. camini* (Wery et al., 2001a), *M. okinawensis* (Nuroura et al., 2006) y *M. piezophila* (Alain et al., 2002a) aisladas a partir de hidrotemales marinos; y *M. hydrogenitolerans* aislada de una fumarola negra del océano Atlántico (Postec et al., 2005). Dentro del género *Thermosipho* se encuentran las especies aisladas de fuentes hidrotermales *Thermosipho atlanticus* (Urios et al., 2004), *T. japonicus* (Takal & Horikoshi, 2000), *T. melanesiensis* (Antoine et al., 1997), *T. africanus* (Huber et al., 1989) y *T. geolei* (L'Haridon et al., 2001).

Dentro del dominio Bacteria los géneros de microorganismos termofílicos predominantes en ambientes termofílicos son: *Thermoanaerobacter*, *Caloramator*, *Anoxybacillus*, *Caloranaerobacter*, *Hydrogenophilus*, *Geotoga*, *Thermoanaerobacterium* (Baena, 2005). Por ejemplo, dentro del género *Thermoanaerobacter* se han reportado las especies termofílicas *T. Brockii* (Lee et al., 1993), *T. ethanolicus* (Lee et al., 1993), *T. italicus* (Kozianowski et al., 1997), *T. mathranii* (Larsen et al., 1998), *T. yonseiensis* (Fardeau et al., 2004), *T. wiegelii* (Cook et al., 1996), *T. sulfurigignens* (Lee et al., 2007), *T. subterraneus* (Fardeau et al., 2000) y *T. siderophilus* (Slobodkin et al., 1999). Sin embargo, no se ha observado un único patrón ambiental o geoquímico que determine la presencia de grupos únicos o exclusivos de microorganismos, no obstante es claro que la presencia de aceptores finales de electrones como sulfato, tiosulfato, ión férrico y nitrato es importante para el crecimiento de los microorganismos. Las comunidades microbianas encontradas en los MT están conformadas por poblaciones termofílicas de organismos sulfato reductores, tiosulfato reductores no sulfato reductores, organismos reductores de ión férrico, organismos reductores de nitratos y principalmente organismos fermentativos (Baena, 2005).

Dentro del orden Clostridiales se han aislado bacterias termofílicas del género *Clostridium* como *Clostridium cellulosi* y *Clostridium thermosaccharolyticum* (Huber &

Hannig., 2006; Rainey *et al.*, 1993); del género *Thermohalobacter*, *T. berrensensis* (Cayol *et al.*, 2000) aislada de un manantial salino; del género *Caminicella*, *C. sporogenes* aislada de un hidrotermal marino (Alain *et al.*, 2002b); también *Caloranaerobacter azorensis* aislada de un hidrotermal marino (Wery *et al.*, 2001b). El género *Caloramator* también ha sido reportado en MT con especies *C. fervidus* (Patel *et al.*, 1987; Collins *et al.*, 1994), *C.indicus* (Chrisostomos *et al.*, 1996) y *C.viterbiensis* (Seyfried *et al.*, 2002).

Dentro del orden Bacillales, los organismos del género *Anoxybacillus* también se han aislado organismos de MT como *Anoxybacillus amylolyticus* aislada del Monte Rittman en la Antártica (Poli *et al.*, 2006), *A. ayderensis* encontrada en un manantial termal en Turquía (Dulger *et al.*, 2004); *A. flavithermus* (Pikuta *et al.*, 2000b); *A. gonensis* (Belduz *et al.*, 2003); *A. kamchatkensis* (Kevrin *et al.*, 2006); *A. kestanbolensis* (Dulger *et al.*, 2004), *A.rupiensis* (Derekova *et al.*, 2007) y *A.voinovskiensis* (Yumoto *et al.*, 2004).

Dentro del orden Thermales, se han reportado organismos aislados de MT pertenecientes al género *Thermus* (Huber & Hannig., 2006) como *Thermus igniterraek* y *T. antrakianii* (Chung *et al.*, 2000) aisladas en Islandia; *T. aquaticus* y *T. brockianus* aisladas a partir de MT del National Yellowstone Park (Williams *et al.*, 1995), *Thermus silvanus* y *Thermus chliarophilus* aisladas en un MT de Portugal (Tenreiro *et al.*, 1995), *Thermus oshimai* (Williams *et al.*, 1996) y *T. thermophilus* (Manaia *et al.*, 1994). A este orden también pertenece el género *Meiothermus* (Da Costa *et al.*, 2006) del que se han reportado organismos aislados de MT como *Meiothermus taiwanensis* (Chen *et al.*, 2002).

Por último, dentro del orden Thermoanaerobacterales organismos del género *Thermoanaerobacterium* (Rainey *et al.*, 1993) han sido reportados como aislados a partir de MT, por ejemplo, *Thermoanaerobacterium aciditolerans* (Kublanov *et al.*, 2007), *T. aotearoense* (Liu *et al.*, 1996), *T. zeae* (Cann *et al.*, 2001), entre otras.

Kaksonen *et al.*, 2006a han reportado la presencia de BSR termofílicas aisladas en su mayoría de hábitats geotermales, incluyendo aguas de yacimientos de petróleo, MT y aguas subterráneas geotermales. Dentro de las BSR aisladas de MT se han reportado miembros de los géneros *Desulfotomaculum* (Blank *et al.*, 2002), *Thermodesulfovibrio* (Fauque & Ollivier, 2004), *Thermodesulfobacterium* (Ferris *et al.*, 2003), *Thermodesulfobium*, (Fishbain *et al.*, 2003), *Desulfomicrobium* (Thevenieau *et al.*, 2007b) y *Desulfacinum* (Stefan *et al.*, 2000; Rozanova *et al.*, 2001; Rees *et al.*, 1995).

Algunos de los organismos sulfato reductores aislados de hábitats geotermales y que pertenecen al género *Desulfotomaculum* son las especies *D. geothermicum* que tiene una T_{opt} de 54°C y un pH óptimo entre 7.3 y 7.5 (Daumas *et al.*, 1990), *D. luciae* (Liu *et al.*, 1997), *D. thermosapovorans* que tiene una T_{opt} de 50°C y aislada en un hábitat termal (Fardeau *et al.*, 1995) y por último aislada de una mina subterránea localizada en un área geotermalmente activa con una T_{opt} entre 61 y 66°C, un pH óptimo de crecimiento de 7.2 a 7.4 la especie *D. thermosubterraneum* (Kaksonen *et al.*, 2006b).

Dentro del género *Thermodesulfovibrio* se han aislado las especies *T. islandicus* a partir de un manantial termal con pH óptimo de 7.0 y T_{opt} de 65°C (Sonne-Hansen & Ahring, 1999) y *T. yellowstonii* aislada de un termal y su T_{opt} de crecimiento es de 65°C (Henry *et al.*, 1994). Con respecto al género *Thermodesulfobacterium* se han aislado a partir de hábitats geotermales *T. commune* (Henry *et al.*, 1994 & Trüper, 2003), *T. hveragerdense* su T_{opt} está entre 70 y 74°C y un pH 7.0 (Sonne-Hansen & Ahring, 1999), *T. hydrogeniphilum* cuya T_{opt} es de 75°C y su pH óptimo es 6.5 (Jeanthon *et al.*, 2002), y *T. thermophilum* (Trüper, 2003). En el género *Thermodesulfobium* está la especie *T. narugense* que fue aislada de manantial termal (Mori *et al.*, 2003).

La detección de nuevos linajes filogenéticamente relacionados de BSR (*Desulfobacula*-like y *Desulfomicrobium*K-like) de manantiales geográficamente distantes, sugieren que estos microorganismos son propios de los manantiales termales y que juegan un papel prominente en el ciclo del azufre dentro de estos ecosistemas (Thevenieau *et al.*, 2007b).

Por último las especies pertenecientes al género *Desulfacinum* aisladas de hábitats geotermales son *D. hydrothermale* aislada de un sistema hidrotermal marino, tiene una T_{opt} de crecimiento de 60°C y un pH óptimo de 7.0 (Sievert & Kuever, 2000), *D. infernum* aislada de un agua de un reservorio de petróleo en el Mar del Norte, que tiene una T_{opt} de crecimiento de 60°C y un pH óptimo entre 7.1 y 7.5 (Rees *et al.*, 1995) y *D. subterraneum* que se aisló de un reservorio de petróleo en Vietnam y mostró una T_{opt} de crecimiento de 60°C y un pH óptimo entre 7.2 y 7.4 (Rozanova *et al.*, 2001).

De los MT de Paipa se han aislado microorganismos sulfato reductores relacionados con el género *Desulfomicrobium* que fueron identificados como una nueva especie termofílica *Desulfomicrobium thermophilum* aislada del MT Escuela La Playa ubicado en la Región Andina colombiana, *D. thermophilum* tiene una T_{opt} de crecimiento de 55°C y su pH óptimo es 6.6 (Thevenieau *et al.*, 2007b).

De 5 organismos sulfato reductores aislados de los MT no fue posible su identificación taxonómica basada en el análisis de la secuencia parcial del gen 16S rRNA debido a la calidad de estas secuencias.

Finalmente, 5 organismos sulfato reductores USBA 3, USBA 43, USBA 46, USBA 53 y USBA 58 se encontraron cercanos al género *Desulfacinum* con una similitud de la secuencia parcial del gen 16S rRNA del 93%.

2.3.2 Ecología de las Bacterias Sulfato Reductoras

La reducción del sulfato ha sido estudiada extensivamente y los efectos de una variedad de parámetros como el pH, temperatura, disponibilidad y el tipo de donador de electrones, concentraciones de sulfato, los efectos inhibitorios de iones metálicos y el sulfuro sobre las cinéticas de reacción de las BSR (**Baskaran & Nemat, 2006**).

Las BSR son consideradas anaerobios ecológicamente importantes que tienen en común su habilidad para reducir desasimilatoriamente el SO_4 . Dos motivos pueden discernirse para este interés ecológico. Un motivo involucra los procesos de mineralización microbianos en donde la materia orgánica es descompuesta para simplificar moléculas inorgánicas; y el segundo es concerniente al rol contaminante de las BSR (**Devereux & Stahl, 1993**).

Además de su importancia obvia en el ciclo del azufre, las BSR son importantes reguladores de una variedad de procesos en los suelos húmedos, la degradación de materia orgánica, la biodegradación de contaminantes aromáticos clorados y la metilación del mercurio (**Castro et al., 2000**). Las BSR también juegan un importante rol contaminante debido a la producción H_2S , un compuesto tóxico para los organismos vivos (**Barton, 1995**). Estas características distintas determinan su presencia en diversos ecosistemas, incluyendo ambientes extremos como manantiales salinos, alcalinos y hábitat termales (**Grant & Long, 1989**). La productividad primaria alta y las altas concentraciones de sulfato son características de muchos sistemas hipersalinos acuáticos, favoreciendo la actividad de las BSR en zonas anóxicas (**Kjeldsen et al., 2007**).

Dentro del dominio Bacteria hay aproximadamente cuarenta y cuatro géneros de BSR, implicados en la reducción desasimilatoria de sulfato entre estos: *Desulfovibrio*, *Desulfarculus*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfobulbus*, *Desulfococcus*, *Desulfohalobium*, *Desulfomicrobium*, *Desulfomonile*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina*, *Desulfotomaculum*, *Thermodesulfobacterium* (**Fauque, 1995; Hartzell & Reed, 2006**),

Desulfacinum (Sievert & Kuever, 2000; Rees et al., 1995; Rozanova et al., 2001), *Desulfarculus* (Kuever et al., 2006), *Desulfatibacillum* (Cravo-Laureau et al., 2004), *Desulfatiferula* (Cravo-Laureau et al., 2007), *Desulfatirhabdium* (Balk et al., 2008), *Desulfobacca* (Oude-Elferink et al., 1999), *Desulfobacula* (Rabus et al., 2000), *Desulfocapsa* (Janssen et al., 1997), *Desulfocella* (Brandt et al., 1999), *Desulfofaba*, *Desulfofrigus* (Knoblauch et al., 1999), *Desulfofustis* (Friedrich et al., 1996), *Desulfoglaeba* (Davidova et al., 2006), *Desulfomusa* (Finster et al., 2001), *Desulfonatronovibrio* (Zhilina et al., 1997), *Desulfonatronum* (Pikuta et al., 1998), *Desulfonauticus* (Audiffren et al., 2003), *Desulfonispota* (Denger et al., 1999), *Desulfopila* (Suzuki et al., 2007), *Desulforegula* (Rees & Patel, 2001), *Desulforhabdus* (Oude-Elferink et al., 1997), *Desulforhopalus* (Isaksen & Teske, 1999), *Desulfospira* (Finster et al., 1997), *Desulfosporosinus* (Stackebrandt et al., 2003), *Desulfovermiculus* (Belyakova et al., 2007), *Desulfovirga* (Tanaka et al., 2000), *Desulfovirgula* (Kaksonen et al., 2007a), *Desulfurella* (Bonch-Osmolovskaya et al. 1990), *Desulfurispora* (Kaksonen et al., 2007b), *Desulfurobacterium* (L'Haridon et al., 2006) y *Desulfurococcus* (Zillig & Stetter, 1982). Dentro de Archaea se conocen los géneros: *Archaeoglobus*, *Thermocladium* y *Caldivirga* (Castro et al., 2000; Fauque & Ollivier, 2004; Itoh et al., 1998, 1999; Hartzell & Reed, 2006).

Estas bacterias crecen sobre un amplio rango de sustratos entre los que se encuentran ácidos orgánicos, alcoholes, aminoácidos y compuestos xenobióticos. Este grupo de bacterias participan activamente en la transformación y ciclaje de materia orgánica en ambientes anaerobios, entre los que se encuentran procesos de compostaje y biodegradación de contaminantes policlorados (Castro et al., 2000; Thevenieau et al., 2007a).

La degradación anaerobia de la materia orgánica es un proceso complejo que requiere la interacción de diferentes grupos de microorganismos. Cada grupo microbiano funciona en la cadena alimenticia donde el producto metabólico final de un grupo es el sustrato de otro hasta que la oxidación sea completa. En los hábitats anóxicos el primer grupo de organismos que intervienen son los fermentativos que hidrolizan los polímeros de alto peso molecular (proteínas, polisacáridos, lípidos, ácidos nucleicos) y la fermentación de su respectivo monómero (aminoácidos, azúcares, ácidos grasos, nucleótidos) a H₂, CO₂, acetato, ácidos orgánicos, y alcoholes. El acetato, H₂ y CO₂ son reutilizados directamente por las metanoarchaeas. El segundo grupo son las bacterias acetogénicas que clivan los ácidos orgánicos y alcoholes en acetato, H₂ y CO₂. El tercer grupo de microorganismos está formado por metanoarchaeas que utilizan los productos finales de todos los procesos previos (H₂, CO₂, acetato, formato) para producir metano. El cuarto

grupo consiste en las BSR quienes compiten con los metanógenos y acetógenos por la disponibilidad de sustratos. La metanogénesis y la reducción desasimilatoria de sulfato son dos procesos terminales de la mineralización anaerobia, y la predominancia de uno de estos procesos depende principalmente de la disponibilidad del sulfato (**Barton, 1995; Reysenbach et al., 2002**).

Respecto a la biodegradación de contaminantes aromáticos clorados, las BSR son capaces de utilizar diferentes fuentes de nitrógeno. Diferentes organismos pueden fijar nitrógeno y además usar el nitrógeno de los aminoácidos. Las principales fuentes naturales de compuestos aromáticos son aminoácidos aromáticos y lignina, sus precursores y compuestos de degradación. La degradación de compuestos aromáticos por las BSR se lleva a cabo por su capacidad de romper la estructura aromática del anillo en varios compuestos. Algunas especies de *Desulfotomaculum* convierten el trimetoxibenzoato a trihidroxibenzoato, al igual que algunas especies de *Desulfovibrio* oxidan ciertos sustitutos de benzaldehídos a sus respectivos ácidos benzóicos. La deshalogenación reductiva del 3- clorobenzoato y otros halobenzoatos a benzoato por *Desulfomonile tiedjei* y la oxidación del 3- fenilpropionato a benzoato por *Desulfococcus niacini* son algunos ejemplos de la utilización de compuestos aromáticos sin la destrucción de la estructura del anillo (**Hansen, 1993b**).

El proceso de metilación del mercurio es un proceso que involucra el cambio del mercurio en forma inorgánica (Hg^{2+}) a las formas metiladas metilmercurio (CH_3Hg^+) y dimetilmercurio ($\text{CH}_3)_2\text{Hg}$) y puede llevarse a cabo por una ruta bioquímica anaerobia involucrando el uso de la metilcobalamina. Este proceso se realiza principalmente en los sedimentos de las aguas oceánicas y cuerpos de aguas continentales (**Verbel & Restrepo, 2002**). Se ha demostrado que *D. desulfuricans* transforma el mercurio a metilmercurio, y esta metilación es mediada por la metilcobalamina (B_{12}) (**Barton, 1995**). La metilcobalamina ($\text{CH}_3\text{CoB}_{12}$) transfiere un metilcarbanión (CH_3^-) al ión mercúrico (Hg^{2+}) para generar $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$. Esta especie es insoluble en agua y es además altamente volátil, por lo que se difunde en forma rápida a la atmósfera. Una vez en la atmósfera, el dimetilmercurio es fotolizado por la luz ultravioleta para dar Hg_0 y radicales de metilo. Los radicales de metilo pueden unirse a un hidrógeno para producir moléculas de metano o acoplarse dos de ellos para formar una molécula de etano. Una vez el metilmercurio es liberado por los microorganismos entra en contacto con la biota acuática a través de una rápida difusión, facilitando la bioacumulación y biomagnificación por las especies de la cadena alimenticia aumentando los niveles de acumulación y toxicidad en los organismos vivos por lo cual causan un daño ecológico en los ecosistemas (**Verbel & Restrepo, 2002**).

La producción de sulfuro de hidrógeno está asociada a la degradación de compuestos orgánicos en ambientes anaerobios que procede a través del consumo de aceptores de electrones como el O_2 , NO_3 y SO_4^{2-} con la formación de H_2O , N_2 , H_2S y CH_4 , respectivamente **(Devereux & Stahl, 1993)**. Las concentraciones de sulfato en los ecosistemas influyen directamente sobre la actividad metabólica de las BSR y la producción del H_2S . Cuando la concentración de sulfato es alta, productos complejos de fermentación son oxidados a CO_2 y agua. En condiciones de concentraciones bajas de sulfato, las BSR oxidan lactato usando protones como aceptores de electrones y generan H_2 . Las consecuencias ambientales del crecimiento de las BSR pueden ser devastadoras. Ellas son las responsables de las muertes masivas de peces, de trabajadores de las alcantarillas por intoxicación con sulfuro de hidrógeno, de la generación de “nieblas tóxicas del amanecer”, y la muerte de los cultivos de arroz por el agotamiento del oxígeno en los arrozales **(Devereux & Stahl, 1993)**.

Las BSR tienen un impacto en la salud humano en el desarrollo de enfermedades gastrointestinales ya que por ejemplo *Desulfovibrio desulfuricans* se ha detectado en rúmen de oveja y en el intestino humano causando inflamación del colon. Gracias al desarrollo de técnicas de cultivo anaerobias, recientes estudios han reportado que cerca del 50% de la totalidad de los abscesos de hígado piogénicos son causados por bacterias anaerobias sulfato reductoras **(Tee et al., 1996)**.

Los metales son importantes como cofactores para varias enzimas de las BSR y algunos metales deben estar presentes para su crecimiento. El níquel y el selenio se requieren para la actividad de hidrogenasa. El hierro es un elemento esencial para la producción de citocromos e hidrogenasa **(Barton, 1995)**. La interrelación entre las BSR y los metales pesados presentes en las alcantarillas, lagos, y riachuelos están solo parcialmente siendo resueltos, pero lo que si es aparente, es que las sulfato reductoras juegan un papel importante en la movilización y toxicidad de contaminantes industriales generando daños como la corrosión de los metales y el deterioro de las estructuras de concreto, entre otros. En este tipo de daños se ha demostrado que la reducción del sulfato a sulfuro está presente tanto en los materiales metálicos como en las aguas que reciben. Dos procesos pueden explicar esta relación: un proceso químico, en donde el sulfato fue reducido por metano o el petróleo mismo; y otro por un proceso microbiano en el que se sostiene que las BSR estuvieron presentes en la formación del petróleo **(Devereux & Stahl, 1993)**.

La corrosión es un fenómeno electroquímico en donde una corriente de electrones se establece cuando existe una diferencia de potenciales entre dos áreas adyacentes de

una superficie metálica en un medio conductor ó electrolito, lo cual genera un área anódica desde la cual migran los electrones y otra catódica, que es el área que recibe los electrones. El oxígeno es el aceptor de electrones catódico clásico, con la combinación de productos de las reacciones anódicas y catódicas que dan paso a hidróxidos metálicos y óxidos característicos de la oxidación. Las BSR que inducen la biocorrosión están involucradas en un evento electroquímico, cuya propiedad crucial es la producción de sulfuro el cual reacciona con los iones metálicos para producir un rango de sulfuros de hierro, que determinan la naturaleza química y la forma física de los sulfuros producto de la corrosión. La naturaleza química y física de estos sulfuros está críticamente influenciada por parámetros ambientales **(Barton, 1995)**. Las BSR juegan un importante rol en la formación de sulfuros férricos (FeS y FeS₂) dentro de los sedimentos marinos aeróbios y anaeróbios. Sin embargo, es poco lo que se conoce sobre la formación de sulfuros debido a la acción de las BSR en ambientes hidrotermales calientes **(Nakagawa et al., 2002)**.

2.3.3 Hábitats de las Bacterias Sulfato Reductoras.

Las BSR están ampliamente distribuidas en ambientes terrestres y acuáticos. La alta actividad metabólica de estos microorganismos es fácilmente reconocida por el oscurecimiento del agua y del sedimento, debido a la precipitación del sulfuro de hierro y por el olor del sulfuro de hidrógeno. Los hábitat de mayor permanencia y significancia de las BSR en la naturaleza son sedimentos marinos, estuarios y pantanos salados, así como lagos hipersalinos y termales, debido a su alto contenido de sulfato. Estas también han sido reportadas en hábitat no-salinos como suelos y sedimentos de agua dulce contaminada. Las BSR han sido detectadas en ambientes contaminados como plantas anaerobias de tratamiento, residuos de alimentos y plantas de drenaje o alcantarillados. También han sido aisladas de campos de arroz, contenidos de rúmen, digestores ácidos, heces de animales y humanos **(Barton, 1995)**.

Las minas subterráneas también han sido reportadas como hábitats de las BSR. Estas minas se encuentran a grandes profundidades de 80 a 600 metros bajo tierra **(Nakagawa et al., 2002)**. A grandes profundidades, donde la temperatura es alta, las bacterias termofílicas residen, pero sus propiedades y actividades han sido poco estudiadas **(Rozanova et al., 2001)**. Estas minas generalmente se encuentran en sitios con sistemas geotermales activos en donde las paredes de roca mantienen las altas temperaturas. Minerales como calcopirita, galena, esfalerita y pirita se obtienen como la mayoría de los minerales de cobre (Cu), plomo (Pb) y zinc (Zn) de las venas de sulfuro y que se precipitan a una temperatura entre 250 y 300°C durante la mineralización muy

temprana en las minas. Las venas de sulfuro contienen algunos poros llenos de agua hidrotermal anóxica sugiriendo que las venas permiten la formación de fluidos minerales y que el agua hidrotermal anóxica es un remanente de fluidos formados por minerales. Además, los densos tapetes microbianos se atribuyen a la presencia de una pared que permite la acumulación bajo el flujo de un agua geotermal y la formación de pirita se lleva a cabo por actividad microbiológica en el área de descarga del fluido hidrotermal. Similarmente, el agotamiento del ^{34}S de los sulfuros (FeS y FeS_2) dentro de los tapetes microbianos es estimulado a través de la reducción desasimilatoria del sulfato por sulfato reductores. Esto es esencial para la detección de procariotas sulfato reductores dentro de efluentes hidrotermales subterráneos y tapetes microbianos en la subsuperficie de ambientes termofílicos **(Nakagawa et al., 2002)**.

En los reservorios de petróleo se ha estudiado la microbiología de hábitats subsuperficiales compuesta principalmente por BSR. En estos reservorios la explotación del petróleo se lleva a cabo a través de inundación con agua marina para mantener la presión dentro de ellos, lo cual resulta en la recolecta de una larga fracción de los remanentes de crudo, ó de crudo absorbido por las rocas; también resultando en la disminución de la temperatura alcanzando entre los 50 y 100°C en zonas cercanas al fondo del pozo de inyección. Desde la perspectiva microbiológica el peligro de esta práctica es que las emulsiones de petróleo-agua crean las condiciones favorables para el crecimiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos, las cuales generan sustratos para otras bacterias, entre ellas las sulfato reductoras **(Devereux & Stahl, 1993)**. Así, el estrato del reservorio exhibe condiciones apropiadas para el desarrollo de microorganismos termofílicos. La formación de gas contiene bajas cantidades de sulfuro de hidrógeno. Las BSR son los principales representantes de la microflora termofílica **(Rozanova et al., 2001)**.

Las BSR pueden utilizarse en biorremediación por su capacidad de degradar compuestos como los alcanos. Los alcanos son los mayores componentes de los combustibles de petróleo, el ataque inicial de las cadenas alifáticas es generalmente mediada por monooxigenasas bajo condiciones aerobias. Por el contrario, la biodegradación de alcanos bajo condiciones anóxicas es poco conocida. Se ha reportado que cepas de *Desulfovibrio* bajo condiciones de sulfato reducción degradan alcanos, junto con otras cepas aisladas de BSR que bajo condiciones rigurosas, muestran la capacidad de degradar y de crecer sobre alcanos bajo condiciones estrictamente anóxicas. Un nuevo tipo de bacteria termofílica sulfato reductora aislada de un sedimento de la cuenca de Guaymas en el Golfo de California, México fue reportado, y se demostró su capacidad de desarrollar la degradación anaerobia de alcanos **(Ming**

So & Young, 1999). El crecimiento bacteriano es restringido por la temperatura y la presión. Cuando estos efectos se combinan, el crecimiento envuelto por temperatura y presión puede definirse. Este proceso para la sulfato reducción en pozos muy profundos puede llevarse a cabo en una presión superior a las 640 atm y a 45°C **(Devereux & Stahl, 1993).**

La supervivencia de estas BSR en estos ambientes depende de las capacidades de adaptación a factores biológicos y físico-químicos que son decisivas para el crecimiento y la actividad de un microorganismo, estos factores incluyen la temperatura, pH y salinidad **(Barton, 1995).**

2.3.4 Efectos del pH, temperatura y salinidad sobre el crecimiento de las Bacterias Sulfato Reductoras

Las aguas termales se mueven a través de rocas de sedimentos de diferente composición, lo cual le confiere características geoquímicas al fluido. El grado de mezcla subterránea puede llegar a diluir y cambiar el menú geoquímico de las comunidades residentes en un ambiente termal. Consecuentemente, el pH del agua puede variar de 1 a 10. Los metales, nutrientes y concentraciones de gases como CO₂, CH₄ y H₂ pueden diferir del mismo modo considerablemente, y compuestos inusuales como hidrocarburos pueden estar presentes en hábitats como los manantiales termales. El pH obviamente puede afectar las solubilidades de diferentes minerales, la influencia mineral en la radioactividad y precipitación, y por lo tanto, la biodisponibilidad de estos minerales **(Reysenbach et al., 2002).**

Las BSR crecen mejor sobre condiciones poco alcalinas. El pH es restringido (pH 7.0 – 7.8) y la tolerancia de los valores oscila entre 5.5 a 9.0. Sin embargo, la reducción desasimilatoria de sulfato ha sido observada en ambientes altamente ácidos, como drenajes mineros y en humedales **(Barton, 1995).**

Con respecto a la temperatura las BSR mesofílicas crecen mejor entre 28 y 38°C y tienen un límite máximo de temperatura de 45°C. La temperatura óptima para las BSR termofílicas tiene un rango de 56 a 85°C, aproximadamente. La mayoría de estas bacterias termofílicas han sido aisladas de hábitat geotérmicos y aguas de campos de petróleo **(Barton, 1995).** Las BSR son las más representativas de la microflora termofílica de las subsuperficies. A grandes profundidades, donde la temperatura es alta, residen las BSR termofílicas, pero sus propiedades y actividades han sido poco estudiadas **(Roanova et al., 2001).**

Las concentraciones de sal son otro factor determinante para las BSR termofílicas, la mayoría de estas han sido aisladas de ambientes marinos con una concentración promedio de 1 a 4% de NaCl, sin embargo, estas bacterias también han sido aisladas de manantiales termales con una concentración de 0.05 a 56 g/L (**Barton, 1995; Thevenieau et al., 2007b**). La mayoría de las BSR que han sido caracterizadas han mostrado una adaptación pobre en condiciones extremas hipersalinas, el reporte más alto *in vivo* de crecimiento óptimo para especies conocidas es de 10% de salinidad (**Kjeldsen et al., 2007**).

2.4 METABOLISMO DEL CARBONO EN BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS

La mayor parte de los compuestos utilizados como fuentes de energía por las BSR se presentan resumidos en la Tabla 2. Algunos de estos compuestos son usados por muchos microorganismos, mientras que otros han sido identificados como fuentes de energía convenientes para un solo organismo. El crecimiento con polímeros, tal como polisacáridos no ha sido observado en estas bacterias. Entre esta variedad de compuestos orgánicos que son utilizados se encuentran los de bajo peso molecular que incluyen ácidos mono y di- carboxílicos, compuestos aromáticos e incluso hidrocarburos. La oxidación de estos compuestos puede ser completa e incompleta (**Rabus et al., 2006**).

Tabla 2. Compuestos que pueden ser usados como sustratos para la reducción desasimilatoria del sulfato

TIPO DE COMPUESTO	COMPUESTO UTILIZADO
Inorgánicos	Hidrógeno (H ₂), monóxido de carbono (CO)
Hidrocarburos	Alcanos (C ₁₂ a C ₂₀)
Ácidos Monocarboxílicos (alifáticos)	Formato, acetato, propionato, butirato, ácidos grasos de cadena larga, isobutirato, 2-metilbutirato, 3-metilbutirato, 3-metilvalerato, piruvato, lactato
Ácidos Dicarboxílicos	Succinato, fumarato, malato, oxalato
Alcoholes	Metanol, etanol, propanol-1, butanol-1, pentanol-1, isobutanol, propanol-2, butanol-2, etilen glicol (mono, di, tri y tetra), 1,2-propanodiol
Aminoácidos	Glicina, serina, alanina, cisteína, cistina, treonina, valina, leucina, isoleucina, aspartato, glutamato, fenilalanina
Azúcares	Fructosa, glucosa, manosa, xilosa, ramnosa
Compuestos Aromáticos	Benzoato, 2,3-y4-hidroxibenzoato, fenol, p-cresol, catecol, hidroquinonas, 2,4-dihidroxibenzoato, 3,4-dihidroxibenzoato, 2-aminobenzoato, 4-aminobenzoato, aminobenzeno, hipurato, ácido nicotínico, fenilacetato, 4-hidroxifenilacetato, 3-fenilpropionato, timetoxibenzoato, vainillina
Otros	Colina, beina, acetona, dihidroxiacetona, furfural, ciclohexanona, ciclohexanol, ciclohexanocarboxilato

Modificado a partir de Hansen, 1993a.

2.4.1 Reducción desasimilatoria del sulfato

La reducción desasimilatoria del sulfato en BSR es enzimológicamente distinta de la reducción asimilatoria del sulfato que ocurre en plantas verdes, algas, y otros grupos de procariotas. La reducción desasimilatoria del sulfato en especies de *Desulfovibrio* está ligada al transporte de electrones junto con la fosforilación oxidativa porque la fosforilación a nivel de sustrato es inadecuada para su crecimiento. Las BSR correspondientes al género *Desulfovibrio* poseen un número de características únicas fisiológicas y bioquímicas como el requerimiento de ATP para reducir el sulfato inorgánico, la localización citoplasmática de las enzimas (APS reductasas y bisulfito reductasas) involucradas en la vía de la reducción respiratoria del sulfato, la localización periplasmática de algunas hidrogenasas, y la abundancia de citocromos multihémicos de tipo-c (Fauque & Ollivier, 2004).

2.4.1.1 Mecanismos bioenergéticos de la reducción desasimilatoria del sulfato

Los mecanismos bioenergéticos de la reducción desasimilatoria del sulfato son tres: la activación del sulfato y su reducción a bisulfito, la reducción del bisulfito a sulfuro y el metabolismo del hidrógeno. En la activación del sulfato y su reducción a bisulfito, el sulfato necesita primero ser activado por el consumo de ATP mediante la intervención de enzimas como la ATP sulfurilasa que forma APS (adenilil sulfato) y PP_i (pirofosfato) a partir del sulfato y el ATP, debido a la desfavorabilidad termodinámica de esta reacción se necesita de la intervención de una segunda enzima, una pirofosfatasa inorgánica, la pirofosfatasa fosfohidrolasa, la cual hidroliza el PP_i dando lugar a la formación de 2 Pi. La reducción de APS a AMP y bisulfito, es catalizada por la APS reductasa presente, en su mayoría, en cepas de *Desulfovibrio* y en Archaeas hipertermofílicas sulfato reductoras (Fauque & Ollivier, 2004).

El proceso de reducción del bisulfito a sulfuro puede llevarse a cabo por dos mecanismos propuestos. El primero involucra la reducción de seis electrones del bisulfito a H₂S en un paso catalizado por la bisulfito reductasa, sin la formación de intermediarios. En el segundo paso, también conocido como la vía del tritionato, el bisulfito es reducido a sulfuro en tres pasos con la formación de intermediarios libres entre el tritionato y el tiosulfato. Este proceso es mediado por los dos tipos de bisulfito reductasas que se han encontrado en BSR, también por la presencia de desulfovirdina y desulforubidina encontradas principalmente en los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfomicrobium*, desulfofuscidina del género termofílico *Thermodesulfobacterium*, y P-582 del género esporo formador *Desulfotomaculum* (Fauque & Ollivier, 2004).

Por último, el metabolismo del hidrógeno es un proceso clave debido a la intermediación metabólica del hidrógeno en varios microorganismos. Además, el hidrógeno juega un rol central en la energía del metabolismo de las BSR, su intervención está dada a través de las hidrogenasas, constituidas por proteínas redox muy diversas en su estructura y composición; ellas catalizan la oxidación reversible del dihidrógeno molecular a protones y electrones, generando potenciales de membrana y gradientes transmembranales de pH con el bombeo de protones a través de la membrana celular (Fauque & Ollivier, 2004).

2.4.2 Degradación de compuestos orgánicos en presencia de sulfato

2.4.2.1 Oxidación completa o incompleta

Las capacidades metabólicas de las BSR se dividen en dos amplias categorías, aquellos organismos capaces de oxidar completamente compuestos orgánicos a CO₂ y aquellos organismos incapaces de realizar la oxidación completa. Algunas BSR no pueden oxidar sustratos completamente a CO₂, esta limitación metabólica por lo general refleja la ausencia de la vía para la oxidación del acetil - CoA a CO₂ (**Hansen, 1993a; Rabus et al., 2006**).

Las BSR que realizan la oxidación completa, no siempre oxidan sustratos directamente a CO₂. La utilización de compuestos orgánicos fácilmente degradables como butirato, lactato o etanol conduce a una producción de acetato y la oxidación a partir de éste puede darse muy lentamente. Esto implica que algunas veces sea necesario que la evaluación de los sustratos producidos durante la oxidación se realice en un periodo de tiempo amplio (**Hansen, 1993a**).

La oxidación completa del grupo acetil CoA a CO₂ por las BSR puede realizarse por medio de dos vías, la vía del ciclo del ácido cítrico y por la vía de la monóxido carbono deshidrogenasa. La vía del ciclo del ácido cítrico es diferente a la encontrada en la mayoría de los aerobios, debido a la presencia de una deshidrogenasa α-cetoglutarato que es ferredoxina contraria a una NAD-dependiente, al enlace de membrana independiente de NAD en la malato deshidrogenasa y por una ATP citrato liasa en lugar de una citrato sintasa. La activación del acetato procede a través de la vía de transferencia del grupo CoA del succinil-CoA. La ATP citrato liasa disponible en el organismo permite obtener ATP por fosforilación a nivel de sustrato por la oxidación del acetato a dos CO₂. Esto puede deberse a una necesidad bioenergética porque se requiere de dos ATP para la activación del sulfato y porque el rendimiento de ATP por transporte de electrones asociados a la oxidación muy probablemente no excede dos moléculas de ATP. El NAPH generado por la isocitrato deshidrogenasa es reoxidada por una deshidrogenasa- NADPH asociada a la membrana, y la ferredoxina reducida es reoxidada por el NAD(P)+ (**Hansen, 1993a**).

La vía de la monóxido carbono deshidrogenasa no es cíclica pero involucra el clivaje de dos unidades de carbono del grupo metil y del monóxido de carbono y cada una de estas es oxidada por vías independientes (**Hansen, 1993a**).

Ambos mecanismos de oxidación proveen la energía requerida para los procesos metabólicos, a partir de sustratos energéticos como alcoholes, aminoácidos, compuestos aromáticos, ácidos dicarboxílicos y lactato, entre otros **(Hansen, 1993a)**.

2.4.2.2 Oxidación del lactato

El lactato es uno de los sustratos más usados para cultivar BSR en estudios bioquímicos. Sin embargo, diferentes organismos descritos en los últimos 15 años son incapaces de crecer sobre este sustrato. Entre estos se encuentran algunas especies de los géneros *Desulfotomaculum*, *Desulfobacter*, *Desulfonema* y *Desulfobacterium* que realizan oxidación completa. Este sustrato clásico es utilizado por la mayoría de las diferentes especies de BSR y puede ser oxidado completa e incompletamente **(Hansen, 1993a; Rabus et al., 2006)**.

La oxidación del L- y D-lactato a piruvato es mediado por la lactato deshidrogenasa independiente de NAD(P)⁺ y ocurre principalmente en la membrana celular. En la oxidación incompleta de sustratos orgánicos, el acetyl Co-A producido a partir del piruvato es convertido a acetato principalmente por la fosfotransacetilasa y la acetato quinasa. Algunos cálculos energéticos revelan que en *Desulfovibrio* spp el ATP neto obtenido por la fosforilación a nivel de sustrato en el crecimiento sobre lactato y sulfato puede ser de cero. Dos moléculas de lactato oxidado por molécula de sulfato pueden presentar un rendimiento de dos moléculas de ATP durante la liberación de acetato vía acetato quinasa. Estas dos moléculas de ATP son consumidas por la activación del sulfato, es decir una por la reacción de ATP sulfurilasa y otra para la regeneración de ADP a AMP **(Rabus et al., 2006)**.

2.4.2.3 Oxidación de alcoholes primarios, alcoholes secundarios, dioles, y glicerol

El etanol es usado como fuente de energía por muchos microorganismos entre estos miembros del género *Desulfovibrio* y varios representantes de otros géneros como *Desulfobulbus*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacterium*, *Desulfotomaculum* y también por algunas cepas de *Desulfobacter*. El etanol es donador de electrones y fuente de carbono para las BSR por oxidación completa e incompleta. Así, los alcoholes primarios, metanol, glicerol y dioles también son utilizados para ésta función **(Hansen, 1993a)**.

Los alcoholes primarios como el 1-propanol y el 1-butanol pueden también actuar como donadores de H₂ para las BSR. La oxidación por especies de *Desulfovibrio* es incompleta así como en algunas especies de *Desulfobulbus* que oxidan incompletamente el 1-

propanol a acetato. Por último, especies de otros géneros pueden oxidar estos alcoholes (1-propanol y 1-butanol) completamente. Lo más probable es que estos alcoholes sean utilizados debido a la poca especificidad de la etanol y la acetaldehído deshidrogenasa **(Hansen, 1993a; Rabus et al., 2006)**. La utilización de los alcoholes primarios puede llevarse a cabo usualmente, cuando está presente en el medio otra fuente de carbono (acetato+CO₂). La alcohol deshidrogenasa ha sido activada al 100% con etanol, en un 72% con propanol y un 36% con butanol, pero no ha sido activada en presencia de isopropanol **(Hansen, 1993a)**.

A diferencia del etanol y de alcoholes primarios, el metanol es un donador de electrones menos común para las BSR y así el crecimiento sobre este es usualmente lento. Sin embargo, el mecanismo de oxidación del metanol es desconocido en la actualidad **(Rabus et al., 2006)**. Solo pocas BSR como *Desulfococcus multivorans* y *D. salexigens* pueden utilizar alcoholes secundarios como el 2-butanol y el 2-propanol **(Hansen, 1993a)**. La presencia de sulfato no ejerce efectos considerables sobre la conversión del metanol bajo condiciones mesofílicas. En contraste, la presencia de sulfato afecta grandemente la conversión del metanol bajo condiciones termofílicas **(Valero et al., 2003)**.

Con respecto a los dioles, el metabolismo de especies de *Desulfovibrio* envuelve generalmente dos procesos, la oxidación inicial del grupo alcohol primario o la deshidratación del diol a un aldehído **(Rabus et al., 2006)**.

Por otro lado, el glicerol es oxidado por especies de *Desulfovibrio* a acetato y CO₂ vía glicerol- 3- fosfato, como por ejemplo, *Desulfovibrio fructosovorans* **(Ollivier et al., 1988)**. Mientras que *Desulfovibrio carbinolicus* oxida el glicerol a 3-hidroxipropionato indicando que el glicerol puede ser oxidado completa e incompletamente **(Rabus et al., 2006)**. En la vía metabólica del glicerol actúa la glicerol quinasa, una glicerol 3-fosfato deshidrogenasa y enzimas de la ruta glicolítica a piruvato. La glicerol quinasa también usa dihidroxiacetona como sustrato generando un buen crecimiento de las cepas que utilizan el glicerol como sustrato. La mayor parte de la de la oxidación del glicerol a 3-hidroxipropionato es iniciado por una deshidratación a 3-hidroxipropanal **(Hansen, 1993a)**.

2.4.2.4 Oxidación de formato, propionato y azúcares

El formato puede ser oxidado por casi todas las especies de *Desulfovibrio*, por algunas especies de *Desulfotomaculum*, *Desulfococcus*, *Desulfobacterium*, y *Desulfonema*. En

las especies de *Desulfovibrio* la reacción es catalizada por la formato deshidrogenasa y como aceptor de electrones puede utilizar el citocromo C₅₅₃ **(Hansen, 1993a)**.

El propionato a diferencia del formato, es un sustrato característico para *Desulfobulbus* y este es oxidado a acetato y CO₂. Varias de las BSR que realizan oxidación completa también utilizan propionato pero lentamente. *Desulfobulbus* oxida propionato mediante una vía que implica una trascarboxilación de propionil - CoA a metilmalonil-CoA con oxalacetato como donador de electrones **(Hansen, 1993a)**.

Sólo pocas especies representantes del género *Desulfovibrio* muestran la capacidad de utilizar azúcares, sin embargo, el uso de fructosa en ausencia o presencia de sulfato se ha observado en *D. fructosovorans*, así como se ha reportado la utilización de glucosa en *Desulfotomaculum nigrificans* y *D. salexigens*. De igual forma, se reporta que la utilización de fructosa es mayor que la de glucosa en las BSR **(Rabus et al., 2006)**.

2.4.2.5 Oxidación de compuestos aromáticos

El rango de compuestos aromáticos que pueden ser degradados por las BSR es amplio. Los mecanismos de degradación de estos compuestos son dos, uno de ellos no implica la destrucción del anillo aromático y el otro incluye la destrucción del anillo aromático para realizar su degradación. Las fuentes naturales de compuestos aromáticos son aminoácidos aromáticos y lignina; otras fuentes pueden ser los compuestos xenobióticos, como la anilina **(Hansen, 1993a)**. La degradación de compuestos aromáticos bajo condiciones anaeróbicas ha sido estudiada en sedimentos y cultivos enriquecidos de bacterias denitrificantes, metanoarchaeas y BSR, las cuales son capaces de degradar hidrocarburos aromáticos como el tolueno **(Rabus et al., 2006)**.

La vía de degradación anaerobia de compuestos aromáticos que más se conoce es la degradación del tolueno. El bencilsuccinato, ha sido el primer metabolito identificado en el metabolismo del tolueno en cepas de *Desulfobacula toluoica*, y mostró una dependencia sobre la formación del fumarato debido a la presencia de la enzima bencilsuccinato sintasa, una enzima con un radical bencil que ataca el grupo metilo del tolueno en combinación con el fumarato. Además, la degradación del bencilsuccinato se cree que procede a través de una vía de reacciones análogas a la β-oxidación de la ramificación metil de los ácidos grasos, produciendo benzoil-CoA como un intermediario central. De acuerdo con esta utilización del tolueno por parte de las BSR, estas pueden crecer en benzoato, naftaleno y del 2-naftoato utilizando la carboxilación como un mecanismo de activación inicial del hidrocarburo aromático biccíclico **(Rabus et al., 2006)**.

2.4.2.6 Oxidación de malato, succinato y otros ácidos dicarboxílicos

Los ácidos dicarboxílicos son sustratos comunes de completa e incompleta oxidación por las BSR. El crecimiento de estos microorganismos es generalmente más rápido en fumarato y malato que en succinato. Algunas especies utilizan uno o más de estos compuestos, estas diferencias se deben a la falta del sistema de transporte o a la ausencia de las enzimas implicadas en la degradación de los compuestos. Los rendimientos de crecimiento sobre succinato, son más bajos que sobre malato, es de suponer debido a que su crecimiento es menor en succinato. La vía de degradación del malato en especies de *Desulfovibrio* involucra la enzima malato dependiente de NADPH, como la enzima clave en la conversión de malato a piruvato (**Rabus et al., 2006**).

2.4.2.7 Oxidación de aminoácidos

La utilización de aminoácidos se reporta principalmente en microorganismos marinos que incluyen algunas especies de *Desulfovibrio*, también se han aislado BSR mesofílicas que utilizan principalmente aminoácidos como *D. aminophilus* (**Baena et al., 1998**). Uno de los aminoácidos utilizados más frecuentemente es la alanina, que sirve como donador de electrones en varias especies como *Desulfotomaculum ruminis* y *Desulfovibrio salexigens*. La oxidación de L-alanina en cepas de *Desulfovibrio* y en *Desulfotomaculum ruminis*, requiere la acción de la alanina dehidrogenasa dependiente de NAD⁺ (**Rabus et al., 2006**).

Otros aminoácidos como la serina, glicina y cisteína también son reportados como donadores de electrones en dos especies de *Desulfovibrio*, mientras el glutamato es usado por algunas cepas de *Desulfobacterium* (**Rabus et al., 2006**).

Las BSR además de presentar la capacidad de oxidar los sustratos anteriormente mencionados como donadores de electrones, pueden tomar estos compuestos en la ausencia del sulfato como aceptor final de electrones, llevando a cada entonces un proceso de fermentación.

2.4.3 Fermentación de sustratos

Las BSR pueden utilizar procesos de conservación de la energía diferentes de la reducción desasimilatoria del sulfato; ellas pueden utilizar aceptores de electrones diferentes al sulfato, sulfito ó tiosulfato y son capaces de crecer fermentativamente por dismutación o disproporción de compuestos orgánicos e inorgánicos (**Fauque & Olliver, 2004**). La dismutación es una reacción en la que dos moléculas de un sustrato

idénticas tienen destinos diferentes. Particularmente, una reacción en la que una de las moléculas sustrato se oxida y la otra se reduce (**Mathews et al., 2003**).

2.4.3.1 Fermentación de sustratos orgánicos

La capacidad fermentativa de las BSR incluye diferentes sustratos como piruvato, peptona, glicina, serina, treonina, cisteína, malato, lactato, fumarato y casaminoácidos teniendo como productos principales el acetato, dióxido de carbono, hidrógeno y etanol (**Fauque & Olliver, 2004**).

Así algunas especies de *Desulfovibrio* fermentan malato y fumarato con formación de succinato, acetato y dióxido de carbono. En la ausencia de sulfato algunas especies pertenecientes a los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus*, *Desulfotomaculum*, y *Desulfobulbus*, fermentan piruvato produciendo acetato, dióxido de carbono e hidrógeno (**Fauque & Olliver, 2004**).

Los sulfato reductores del género *Desulfovibrio* que no pueden crecer por fermentación de lactato, etanol o colina puede crecer con estos sustratos en la ausencia de sulfato en cocultivos sintróficos con las Archaeas metanogénicas (**Fauque & Olliver, 2004**).

2.4.3.2 Fermentación de compuestos inorgánicos del azufre

Con el mecanismo de fermentación de compuestos inorgánicos del azufre, las BSR son capaces de conservar la energía para el crecimiento bajo condiciones estrictamente anaerobias por dismutación del sulfito o tiosulfato a sulfato y sulfuro. Las enzimas requeridas para estas dismutaciones son parecidas a las de la sulfato reducción. Se ha demostrado que durante la fermentación de compuestos inorgánicos del azufre, la formación del sulfato se da a través de la APS reductasa y de la ATP sulfurilasa, pero no por la sulfito oxidoreductasa. El transporte reverso de electrones es necesario para alcanzar la reducción del sulfito o del tiosulfato con los electrones derivados de la APS reductasa (**Fauque & Olliver, 2004**).

2.4.4 Reducción de Azufre elemental, Nitrato y Oxígeno

2.4.4.1 Reducción del azufre elemental

Varios géneros del dominio Archaea y Bacteria pueden obtener energía para su crecimiento por medio de la reducción desasimilatoria del azufre elemental a sulfuro de hidrógeno en un tipo de metabolismo respiratorio. Las bacterias facultativas reductoras del azufre como las BSR, utilizan el azufre elemental como un sustrato respiratorio en

ausencia de otros posibles aceptores de electrones como el nitrato, sulfato, sulfito o tiosulfato. Algunas cepas del género *Desulfovibrio* y *Desulfomicrobium* usan el azufre elemental como un aceptor de electrones alternativo debido a la presencia del citocromo c3, que posee la actividad azufre reductasa (**Fauque & Olliver, 2004**).

2.4.4.2 Reducción desasimilatoria del nitrato

La reducción desasimilatoria del nitrato o nitrito a amoníaco (proceso también conocido como amonificación) puede funcionar como único proceso de conservación de energía en algunas BSR. El nitrato es reducido a amoníaco (con nitrito como intermediario) por la intervención de la enzima nitrato reductasa que es inducible por nitrito o nitrato, mientras que la nitrito reductasa no. La nitrato reductasa es una enzima periplasmática monomérica con una masa molecular de 74kDa, que contiene un átomo de molibdeno y un centro (4Fe 4S) por molécula, y su estructura es cristalina. La nitrito reductasa es un heterooligómero del citocromo c que contiene dos tipos de subunidades de 62 y 19kDa y solo cataliza la reducción de sulfito a sulfuro (**Fauque & Olliver, 2004**).

2.4.4.3 Reducción del oxígeno

Las BSR han sido consideradas estrictamente anaerobias, pero se ha demostrado que algunas de ellas pueden tolerar la presencia de trazas de oxígeno molecular. Sin embargo, usualmente las BSR no crecen con el dióxigeno como un aceptor de electrones. Las BSR obviamente contienen oxidasas terminales diferentes a las presentes en microorganismos aerobios. Las sulfato reductoras usan superóxido reductasas como un componente de un proceso oxidativo de protección al estrés que cataliza la reducción en lugar de la dismutación de superóxido a peróxido de hidrógeno. Dos clases de superperóxido reductasas existen en las BSR y contienen uno (neelaredoxina) o dos (rubredoxina oxidoreductasa o desulfoferredoxina) centros de hierro (**Fauque & Olliver, 2004**).

2.4.5 Reducción de metales por Bacterias Sulfato Reductoras Desasimilatorias

Además de su habilidad para usar compuestos del azufre como aceptores de electrones terminales, las BSR han demostrado su capacidad de reducir un amplio rango de metales pesados como cromo (Cr), molibdeno (Mo), selenio (Se), hierro (Fe), tecnecio (Tc), manganeso (Mn), arsénico (As), paladio (Pd) y uranio (U). Por estas habilidades pueden considerarse varias BSR como biorremediadoras de ambientes contaminados por metales pesados. La reducción del metal puede obtenerse no solo por reducción directa cuando el sulfato es sustituido en el medio de cultivo, favoreciendo así la

concomitante producción de sulfuro y la precipitación del metal (**Fauque & Olliver., 2004**).

El uso de metales pesados en lugar de sulfato como un aceptor de electrones por las BSR no está generalmente relacionado con el crecimiento. La reducción directa de metales pesados por las BSR mediada por actividad enzimática ha sido poco estudiada, sin embargo, se ha encontrado en algunas cepas la presencia de enzimas metal hidrogenasas y también se ha detectado la intervención del citocromo *c3* alterado que por mutagénesis de sitio directo indica que el potencial negativo redox es crucial para la actividad de las metal hidrogenasas. Así se sugiere que los citocromos y las hidrogenasas de las BSR juegan un papel importante en la reducción de los metales (**Fauque & Olliver, 2004**).

2.5 FILOGENIA DE LAS BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS

Las BSR son un grupo bacteriano complejo fisiológicamente, varias propiedades utilizadas para la clasificación general de todos los microorganismos han sido usadas en su clasificación tradicional. Las más importantes de esas propiedades son: morfología de la célula (forma, tamaño, movilidad, estructuras visibles externas e internas, formación de agregados, diferenciación celular, ultraestructura general), morfología de la colonia (aparición de células en suspensión y aparición de las colonias), composición celular (coloración de Gram, contenido de G-C del DNA, materiales de reserva), fisiología (temperatura, pH, metabolismo energético, relaciones con el oxígeno, aceptores de electrones, fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y fuentes de azufre) y ecología (hábitat natural) (**Schleifer & Truper, 2006**). Además de la determinación de la presencia de desulfoviridina y citocromos y la oxidación completa e incompleta del acetato (**Castro et al., 2000**) que son características propias para la clasificación de las BSR.

Desde hace 25 años, las técnicas que involucran el análisis del rRNA ó de los genes que codifican para el rRNA (rDNA) han revolucionado la taxonomía procariota. Las conclusiones de los estudios han permitido ver que los genes del rRNA son altamente conservados debido a su importante rol ribosomal en la síntesis de proteínas. Las moléculas de rRNA reflejan la filogenia de los microorganismos, al asumir que su tasa de mutación es muy baja, ya que se encuentran bajo una fuerte presión conservadora. Además, debido a sus moléculas largas el rRNA contiene información genética considerable que ha sido utilizada como base molecular de las reconstrucciones filogenéticas procariotas. Dos argumentos adicionales son la base para validar esta

afirmación a saber: la transferencia lateral de genes “no ocurre” entre genes rRNA, y la cantidad de evolución o de disimilitud entre secuencias rRNA de un par de organismos es representativo para la variación mostrada por los correspondientes genomas. Si esto es verdad, entonces las variaciones en la cantidad de estructuras primarias rRNA en procariotas, se vería reflejado en la cantidad de organismos distantes. Las secuencias de 16S rRNA y los análisis de comparación han demostrado tener un alto poder de resolución para la medida del grado de relación entre organismos por encima del nivel de especie evolutivamente (**Burgess et al., 2007; Rosselló-Mora & Amann, 2001**).

Los análisis de las secuencias de rRNA han permitido la organización de las BSR dentro de cuatro grupos filogenéticos, entre los que se encuentran: BSR mesofílicas Gramnegativas; BSR esporoformadoras Grampositivas; bacterias termofílicas sulfato reductoras; y las arqueas termofílicas sulfato reductoras. Todos estos grupos se caracterizan por utilizar el sulfato como aceptor terminal de electrones durante la respiración anaerobia. La asignación de especies individuales dentro de grupos apropiados con base en los análisis rRNA es en general, un acuerdo al que se ha llegado por taxonomía tradicional, aunque existen algunas excepciones (**Castro et al., 2000; Fauque & Ollivier, 2004; Thevenieau et al., 2007a**).

Las BSR mesofílicas Gramnegativas se encuentran dentro de la subclase de las δ -Proteobacterias. Desde el punto de vista en su historia evolutiva, la clase δ diverge de otras Proteobacteria en el ancestro común fotótrofo, y los miembros de la subclase delta perdieron probablemente su habilidad fotosintética y se convirtieron en heterotróficas (**Castro et al., 2000**).

La subclase δ -Proteobacteria incluye las familias Desulfovibrionaceae y Desulfobacteriaceae. La familia Desulfovibrionaceae incluye los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfomicrobium*. Y la familia Desulfobacteriaceae incluye los géneros *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfomonile*, *Desulfonema*, *Desulfotulus* y *Desulfarculus*. Dentro de esta familia podrían también incluirse con base en los análisis de rRNA los géneros *Desulfobacula*, *Desulfospira*, *Desulfocella*, *Desulfocapsa*, *Desulforhopalus*, entre otros. La mayoría de los miembros de esta familia son mesofílicos; sin embargo existen cinco excepciones, *Desulfacinum infernum*, *D. hydrotermale*, *D. subterraneum*, *Desulfomicrobium thermophilum* y *Thermodesulforhabdus norvegicus* que registran temperaturas óptimas de crecimiento alrededor de los 60°C (**Castro et al., 2000; Devereux & Stahl, 1993; Mori et al., 2003; Thevenieau et al., 2007b**).

Dentro de la subclase δ -Proteobacteria se encuentran tanto bacterias no sulfato reductoras como bacterias azufre reductoras, y a su vez se divide en cuatro subgrupos: myxobacteria, bdellovibrios, las BSR desasimilatorias y bacterias sintróficas. Cinco ramas están incluidas dentro de esta subclase *Desulfovibrio*, *Desulfuromonas*, *Desulfobacter*, *Synthrophobacter* y *Desulfurella*. Adicionalmente las bacterias sintróficas comprenden los géneros *Syntrophobacter*, *Desulforhabdus*, *Desulfovirga*, *Desulfacinum* y *Thermodesulforhabdus*. Las relaciones filogenéticas entre las BSR y otros miembros de la subclase delta no se ha resuelto, aunque se ha sugerido que *Myxobacteria* y bdellovibrios pueden representar adaptaciones aeróbicas de un ancestro anaeróbico de fenotipo azufremetabolizador **(Kerstens et al., 2006; Castro et al., 2000)**.

La relación existente entre los géneros *Desulfacinum*, *Desulfomicrobium* y *Thermodesulforhabdus* con los organismos sulfato reductores del grupo al que pertenece la cepa USBA 53, permite ubicarlos dentro de la subclase δ -Proteobacteria. Algunas de las características del género *Desulfacinum* son los sitios de aislamiento son hábitats geotermales marinos y yacimientos de petróleo cuyas temperaturas son termofílicas, valores de pH que se acercan a la neutralidad y un rango de altas concentraciones de NaCl (0-50 g/L); las especies de este género han sido clasificadas como no esporo formadoras. El género *Desulfomicrobium* incluye especies mesofílicas y una especie ha sido reportada como termofílica, *Desulfomicrobium thermophilum* que presenta crecimiento a 55°C (37-60°C), pH 6.6 (5.8-8.8) y concentraciones de NaCl 0.5% (0-4.5%) **(Rozanova et al., 2001; Sievert & Kuever, 2000; Rees et al., 1995; Thevenieau et al., 2007b)**.

Las BSR esporoformadoras Grampositivas están dentro de las bacterias Gram positivas con bajo contenido de Guanina-Citosina (GC) que son generalmente mesofílicos o moderadamente termofílicos con la capacidad de formar esporas como *Bacillus* y *Clostridium*. A este grupo pertenecen los géneros *Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus* y *Thermoacetogenium* **(Castro et al., 2000; Mori et al., 2003)**.

Los microorganismos sulfato reductores del Dominio Archaea son filogenéticamente divididos en dos géneros *Archaeoglobus* *Caldivirga* y *Thermocladium*. Al género *Archaeoglobus* pertenecen las especies *A. fulgidus*, *A. profundus* y *A. veneficus*. La mayor diferencia entre *Archaeoglobus fulgidus* y *A. profundus* es que *A. fulgidus* posee flagelo, es quimiolitótrofa facultativa y produce una pequeña cantidad de metano, mientras que *A. profundus* no posee flagelo, es quimiolitótrofa obligada y no produce metano **(Castro et al., 2000)**. Mientras al género *Caldivirga* pertenece una sola especie *Caldivirga maquilensis* y al género *Thermocladium* pertenece la especie *T.*

modesticus. Este grupo de organismos exhibe temperaturas óptimas de crecimiento superiores a 80°C (**Mori *et al.*, 2003; Hartzell & Reed, 2006; Castro *et al.*, 2000; Itoh *et al.*, 1998**).

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Estudios previos de la diversidad microbiana en los MT de Paipa e Iza en Boyacá realizados por la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA), mostraron que aproximadamente el 30% de las cepas aisladas correspondían a organismos sulfato reductores termofílicos y el análisis parcial de 850pb de las secuencias del gen 16S rRNA mostraron además que 11 de las cepas aisladas presentaban un porcentaje de similitud inferior al 95% con organismos previamente aislados. Junto con los análisis fenotípicos realizados a estas 11 cepas, se estableció que estos organismos se agrupaban en dos grupos diferentes, el primero compuesto por 6 cepas sulfato reductoras relacionadas con *Desulfomicrobium thermophilum* y el segundo compuesto por 5 cepas aisladas USBA 3, USBA 43, USBA 46, USBA 53 y USBA 58 del cual el valor de similitud obtenido y las diferencias fenotípicas determinadas previamente, permitieron concluir que este segundo grupo podría constituirse en un nuevo género microbiano.

Este trabajo de grado pretende contribuir a definir el estatus taxonómico de la cepa USBA 53, por medio de estudios fenotípicos.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar fenotípicamente la cepa sulfato reductora termofílica USBA 53, aislada del manantial termal Ojo del Diablo del municipio de Paipa, Boyacá.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las características morfológicas, fisiológicas y de crecimiento de la cepa USBA 53.
- Evaluar los sustratos utilizados como aceptores y donadores de electrones utilizados por la cepa USBA 53.
- Determinar los productos a partir de la degradación de diferentes sustratos utilizados por la cepa USBA 53.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) perteneciente al Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana.

5.1 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

5.1.1 Población de estudio y muestra

En el año 2003 se recolectaron muestras de agua y sedimento de tres MT, Ojo del Diablo, Hotel Lanceros y Escuela La Playa, localizados en el departamento de Boyacá y cuyas características pueden verse en la Tabla 3. A partir de esto se aislaron cinco BSR (USBA 3, USBA 43, USBA 46, USBA 53 y USBA 58), de las cuales la cepa USBA 53 se seleccionó como representativa del grupo para realizar su caracterización fenotípica.

La población de estudio es la cepa sulfato reductora termofílica USBA 53 aislada del MT Ojo del Diablo (P-3) localizado en la margen derecha de la vía que lleva al parqueadero del Hotel Lanceros en el municipio de Paipa ($5^{\circ} 45' 33.29''$ N, $73^{\circ} 6' 49.89''$ W) cuyas características principales se encuentran en la Tabla 4, y cuya composición química está conformada en su mayoría por elementos como sodio (Na), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), litio (Li), boro (B), hierro (Fe), manganeso (Mn), cloro (Cl), silicio (Si) ; y compuestos como sulfato (SO_4), carbonato (HCO_3) y sulfito (SO_3) (**Alfaro, 2002**).

Tabla 3. Características principales de los MT Ojo del Diablo, Hotel Lancers e IZA 03

		MT OJO DEL DIABLO (PAIPA)	MT HOTEL LANCEROS (PAIPA)	MT EL BATÁN (IZA)
PARÁMETRO	Temperatura	68.1°C	63.4°C	56°C
	Conductividad	43200 µS/cm	42500 µS/cm	609 µS/cm
CLASIFICACIÓN	pH	7.0	7.2	6.8
	Sólidos disueltos	41138 mg/L	41096.50 mg/L	543.26 mg/L
	Físico (T°)	Hipertermal	Hipertermal	Semitermal
NOMENCLATURA	Composición Química	Sulfatada ácida	Sulfatada	Bicarbonatada
	INGEOMINAS	PP11	PP10	IZ-03
CEPA AISLADA	USBA	P-3	P-4	IZA 03
		USBA 53	USBA 43	USBA 3
		USBA 58	USBA 46	

Basado en Alfaro, 2002.

Tabla 4. Análisis de aguas de los MT Ojo del Diablo, Hotel Lancers e IZA 03

(CONCENTRACIÓN mg/L)

PARÁMETRO	MT Ojo del Diablo	MT Hotel Lancers	MT Iza 03
Turbiedad en SiO ₂	77.1	64	56
Bicarbonato en HCO ₃	2606	2520	310
Cloruro	5103	5138	55
Sulfatos	19250	19375	1.8
Hierro total	0.2	0.3	<0.2
Calcio	175	87	4.0
Magnesio	21.2	17	4.0
Manganeso	1.6	1.7	0.2
Sodio	12375	12500	105
Potasio	1562	1400	20
Litio	18.2	18	0.4
Boro	5.10	4.90	0.26

Fuente: Alfaro, 2002.

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Análisis de la secuencia parcial del gen 16S rRNA

La secuencia de los nucleótidos del gen 16S rRNA de las cepas USBA 3, USBA 43, USBA 46, USBA 53 y USBA 58 fue alineada con el 16S rRNA de las especies sulfato reductoras pertenecientes a la subclase δ -Proteobacteria utilizando el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) usando la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) obteniendo una similaridad del 100% entre las cinco cepas y del 93% con el género *Desulfacinum*.

5.2.2 Enriquecimiento

La cepa USBA 53, crioconservada en glicerol al 20% se recuperó en medio básico (MB) suplementado con lactato sódico (20mM), extracto de levadura (1g/L) y $MgCl_2$ (3g/L). Para la prueba de pureza, la cepa se inoculó en MB, extracto de levadura (1g/L) y glucosa (20 mM), con el objetivo de no evidenciar crecimiento, ni la presencia de otra morfología diferente que pudiera crecer a expensas de la glucosa (**Thevenieau et al., 2007b**).

El MB de cultivo para bacterias termofílicas- halotolerantes sulfato-reductoras (Tabla 5) se preparó utilizando la técnica de Hungate, y se incubó a 55°C. El pH se ajustó a 7.2 con NaOH 10N y posteriormente se llevó a ebullición. El medio fue transferido a tubos Hungate (5mL en cada tubo) en condiciones de anaerobiosis con N_2 como fase gaseosa y seguidamente se realizó el intercambio de la fase gaseosa O_2 y N_2 con $N_2 - CO_2$ (80: 20 v/v). El medio se esterilizó a 15 p.s.i, a 121°C durante 20 minutos. Una vez autoclavados los tubos con MB, se les adicionó: 0.05 ml de $Na_2S - 9H_2O$ al 2% como agente reductor asegurando las condiciones de anaerobiosis, 0.05 ml de $NaHCO_3$ al 10% como buffer para mantener el pH del medio y 0.1 ml de $MgCl_2$ (150 g/L) y como fuente de carbono se les adicionó lactato (20mM) y como aceptor de electrones SO_4^{-2} (20mM) (**Thevenieau et al., 2007b**).

Tabla 5. Composición de MB de cultivo para bacterias termofílicas- halotolerantes sulfato-reductoras

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
KH ₂ PO ₄	0.3 (g/L)
K ₂ HPO	0.3 (g/L)
NH ₄ Cl	1 (g/L)
NaCl	23 (g/L)
CaCl ₂	0.1 (g/L)
Cisteína-HCl	0.5 (g/L)
KCl	0.1 (g/L)
Na ₂ SO ₄	2.96 (g/L)
Solución de oligoelementos de Balch (Balch <i>et al.</i> , 1979)	10 (ml/L)
Resazurina 0.1%	1 (ml/L)

El enriquecimiento de la cepa USBA 53 se inició por la inoculación de 1ml de los tubos criconservados en el medio. El crecimiento de la cepa USBA 53 en el MB se determinó por el aumento en la turbidez del medio, observación en el microscopio de contraste de fases y cuantificación de la producción de H₂S por la técnica de Cord-Ruwisch (1985).

5.2.3 Determinación de las características morfológicas

5.2.3.1 Estudios morfológicos

Para el estudio de la morfología se utilizó un microscopio de Epifluorescencia (Nikon), referencia Eclipse 50□, y se determinó forma y tamaño de la célula, movilidad, estructuras visibles y coloración de Gram (Schleifer & Truper, 2006).

5.2.3.1.1 Coloración de Gram

La coloración de Gram se realizó siguiendo el protocolo expuesto por Hucker, 1965 donde se utilizaron dos controles *Escherichia coli* (control Gram negativo) y *Bacillus licheniformis* (control Gram positivo).

5.2.3.1.2 Morfología y descripción de la colonia

La morfología y descripción de la colonia se realizó con la técnica de Tubo Rodado para el cultivo de microorganismos anaerobios descrita por Hungate (1969), en medio sólido con Agar Noble 2%. Los tubos se llevaron a incubación bajo condiciones normales

durante dos semanas, aproximadamente y posteriormente se examinaron macroscópicamente en el esteroscopio.

5.2.3.2 Determinación de la presencia de esporas

La presencia de esporas se determinó inoculando dos tubos de medio de cultivo con la cepa en fase exponencial; los inóculos se sometieron a las siguientes condiciones: 80° y 90° C durante una hora, realizando una revisión microscópica cada 10 minutos para detectar la presencia de esporas, posteriormente se realizó el repique a medio fresco incubándolo a su temperatura habitual. La observación de esporas al microscopio o un crecimiento abundante después de incubación, se tomó como un resultado positivo para la presencia de esporas (**López & Guerra, 2004**).

5.2.3.3 Evaluación de relación con el O₂

Para verificar la anaerobiosis estricta de la cepa, esta fue inoculada en medio de cultivo oxigenado (exento de agentes reductores como cisteína- HCl y Na₂S). Los tubos por triplicado fueron incubados a la temperatura habitual del crecimiento de la cepa y bajo agitación para facilitar la difusión del oxígeno en el medio. Se tomaría como negativa la prueba si las cepas presentaban crecimiento abundante en el medio oxigenado, lo cual se verificó por densidad óptica a 580nm (DO_{580nm}) y observación al microscopio de contraste de fases (**López & Guerra, 2004**).

5.2.4 Determinación de las características fenotípicas

5.2.4.1 Determinación de condiciones óptimas de crecimiento

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado en tubos Hungate, utilizando MB con lactato (20mM), extracto de levadura (1g/L) y Na₂SO₄ (20mM). Las cepas fueron subcultivadas dos veces consecutivas (R₁ y R₂) bajo las mismas condiciones experimentales de temperatura (55°C), pH (7.1-7.2) y salinidad (23 g/L de NaCl). El rango de temperatura evaluado para el crecimiento fue de 36 a 65 °C (36, 45, 50, 52, 55, 57, 60, 62 y 65°C). Para los estudios del pH el valor se ajustó con adiciones de NaHCO₃ 10% ó Na₂CO₃ 10% (**Thevenieau et al., 2007b**) en un rango de pH de 5.7 a 8.0 (5.7, 6.3, 6.5, 6.75, 6.8, 7.00, 7.15, 7.3, 7.7 y 8.00). Para los estudios del requerimiento de NaCl se evaluó un rango de 0 a 50 g NaCl /L (**Sievert & Kuever, 2000**) (0, 1, 3, 5, 10, 12, 15, 20, 23, 25, 27, 30, 40 y 50 g NaCl/L). Estas evaluaciones se realizaron midiendo la velocidad específica de crecimiento, μ_x (expresada en h⁻¹) y el tiempo de duplicación Td (expresado en h), la velocidad corresponde a la pendiente de la recta: $\ln(X/X_0) =$

$\mu X+b$, y el Td al $\ln 2/\mu X$. El crecimiento se midió directamente por la lectura de DO_{580nm} en un espectrofotómetro (Jenway 6400) cada dos horas durante 24 horas.

5.2.4.2 Establecimiento de una curva de calibración para la determinación de peso seco bacteriano

El cultivo bacteriano se realizó en MB con lactato (20mM), extracto de levadura (1g/L) y Na_2SO_4 (2.96 g/L). A partir del cultivo se realizó una suspensión bacteriana (solución madre) y una suspensión de trabajo, a partir de las cuáles se determinó el valor de biomasa bacteriana por mg de cultivo con el objetivo de obtener una curva patrón para obtener las concentraciones de biomasa en cada uno de los parámetros de crecimiento y establecer las condiciones óptimas para la cepa USBA 53.

5.2.4.3 Utilización de donadores y aceptores de electrones

La evaluación de los donadores de electrones se llevó a cabo por triplicado, se realizaron dos repiques (R_1 y R_2) en medio mínimo que contenía extracto de levadura (1g/L) y Na_2SO_4 (2.96 g/L) y bajo los parámetros óptimos de crecimiento que se determinaron previamente de 57°C, 25 g/L de NaCl y un pH de 6.75. Los donadores de electrones que se evaluaron fueron: etanol y metanol en una concentración final de 5 mM. Pepticasa y casaminoácidos (10g/L). Alanina, arginina, serina y valina en una concentración de 10mM. Galactosa, sacarosa, formato, acetato, propionato, butirato, fumarato, succinato, malato, lactato, glicerol, citrato y piruvato a una concentración de 20 mM (**Thevenieau et al., 2007b**). Valerato e isovalerato (2.56 mM) (**Rozanova et al., 2001**). Como control se utilizó MB suplementado con extracto de levadura (1g/L) y Na_2SO_4 (20mM). Los productos fueron evaluados por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) utilizando un equipo SHIMADZU equipado con una columna Ultra Aqueous C18 (5 μ m 150 x 4.6mm), utilizando como fase móvil H_3PO_4 0.05% pH 2.5 estabilizado con K_2HPO_4 al 10%, a un flujo de 0,5ml/min, con un tiempo de retención (TR) de 45 min y con una temperatura de 35°C.

Los aceptores de electrones fueron evaluados por triplicado y se realizaron dos repiques (R_1 y R_2) y en tres series diferentes en MB sin Na_2SO_4 y con extracto de levadura (1 g/L). La primera serie con lactato (20mM), la segunda con formato (20mM) y la tercera con piruvato (20mM)..Estos aceptores fueron: S_2O_3 , y NO_3 a una concentración de (20 mM); SO_3 (2 mM), S_0 y Fe^{+3} (10 g/L) evaluados por triplicado y en dos repiques (R_1 y R_2). Como control negativo se utilizó MB suplementado con extracto de levadura (1g/L) y ningún aceptor de electrones. La determinación de sulfuro de hidrógeno se realizó mediante el método de Cord-Ruwisch (1985), la reducción del Fe^{+3} se determinó

por la técnica de la ferrozina y la reducción del NO_3 a NO_2 por la técnica de la difenilendiamina (Posada *et al.*, 2004; Lovley & Phillips., 1986).

Para la evaluación del crecimiento autotrófico, la cepa fue incubada bajo condiciones normales con $\text{H}_2:\text{CO}_2$ (80:20 %) y $\text{H}_2:\text{CO}_2$ (80:20 %) con SO_4^- (Sievert & Kuever, 2000).

5.2.4.4 Prueba de Catalasa

Se tomaron dos tubos con las cepas en fase exponencial y se centrifugaron a 13000 rpm por 20 minutos, se descartó el sobrenadante e inmediatamente se mezcló con 0.25mL de H_2O_2 al 30%, la prueba se tomaría como positiva si se observaba la formación de burbujas en la mezcla. Se tomó como control positivo *Bacillus licheniformis* (López & Guerra, 2004).

5.2.5 Prueba de resistencia a antibióticos

Para determinar la resistencia a los antibióticos cloranfenicol y penicilina G, se realizó el repique por triplicado de las cepas en las condiciones óptimas de crecimiento, determinadas anteriormente de 57°C, 25 g/L de NaCl y pH 6.75. Se evaluaron concentraciones de cloranfenicol y penicilina G de 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para cada uno. Se realizaron dos controles, uno con etanol sin el antibiótico, debido a que el cloranfenicol es preparado con etanol absoluto y el otro control fue la cepa bajo condiciones normales de crecimiento, sin ningún tipo de antibióticos, para evitar obtener falsos negativos (López & Guerra, 2004).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

6.1.1 Estudios morfológicos y fisiológicos

Las características morfológicas de la cepa USBA 53 incluyen la descripción microscópica de la forma y tamaño celular y macroscópica de la colonia, la coloración de Gram, formación de esporas, movilidad, y formación de agregados celulares. Las células son de forma ovoide o bacilos cortos de 0,3 a 0,6 μm de largo por 0,2 a 0,3 μm de ancho durante la fase exponencial, que puede disponerse sola o en cadenas de 1 μm de largo, forma agregados celulares en forma de l y u después de un largo período de incubación (Fig. 2 y Fig. 3). Las colonias de la cepa USBA 53 son blancas, redondas, cremosas, planas y de borde ondulado con un diámetro de 0,1 mm que después de dos semanas de incubación se tornan café, punctiformes y de borde regular. No es móvil y tampoco forma esporas cuando se somete a temperaturas de 80° y 90°C, es Gram positiva y en medio oxigenado, libre de agentes reductores, no se observó crecimiento.

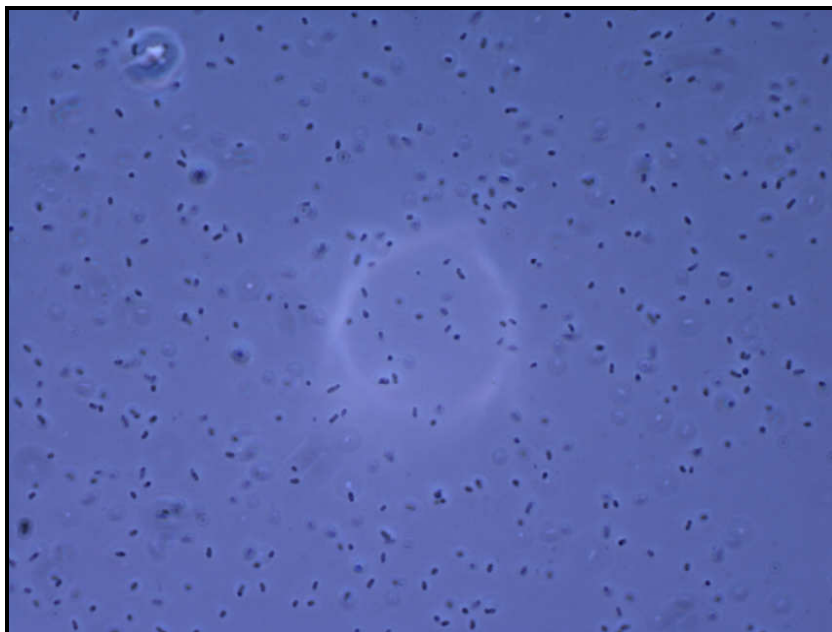


Figura 1 Vista microscópica de la cepa USBA 53 mostrando su morfología típica.

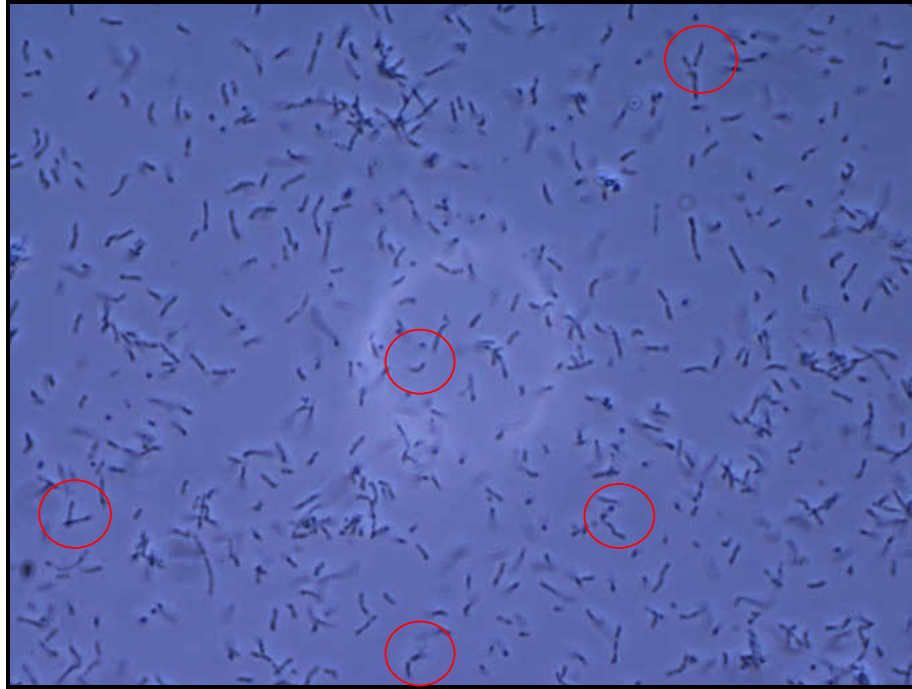


Figura 2 Vista microscópica de la cepa USBA 53 mostrando la formación de agregados celulares en forma de L y U observados después de varias semanas de incubación.

La secuencia del gen 16S rRNA realizada para determinar la ubicación taxonómica de la cepa USBA 53 se llevó a cabo por el análisis de cada secuencia en el BLAST usando la base de datos de la NCBI, mostrando una similitud del 93% con el género *Desulfacinum* por tal razón se consideró como el género más relacionado con la cepa USBA 53. Las características principales de las especies pertenecientes a este género, *Desulfacinum infernum*, *D. hydrothermale* y *D. subterraneum*, se encuentran resumidas en la Tabla 5. Estas características morfológicas muestran una similitud en la forma celular ovoide o de bacilo corto, las células de dos especies, *D. infernum* y *D. subterraneum* no son móviles como la cepa USBA 53 y junto con *D. hydrothermale* no forman esporas (**Sievert & Kuever, 2000; Rees et al., 1995; Rozanova et al., 2001**). La formación de agregados celulares en forma de L y U en la cepa USBA 53 se observaron luego de dos semanas de incubación y bajo condiciones salinidad y pH extremas, como por ejemplo, a un pH de 4.0 y a una concentración de 3 g/L de NaCl. Las condiciones que estuvieron por encima de los rangos de crecimiento de la cepa USBA 53 reflejaron un cambio en la morfología habitual de la bacteria, esto puede deberse a un mecanismo de respuesta a condiciones extremas a las que fue sometida. Este tipo de variaciones morfológicas ha sido observado en *D. hydrothermale* que forma agregados celulares en flóculos a temperaturas cercanas a los 44°C (**Sievert & Kuever, 2000**).

Con respecto a la coloración de Gram, los géneros pertenecientes a la subclase δ -Proteobacteria y las especies *D. infernum*, *D. hydrothermale* y *D. subterraneum* son Gram negativas (**Gupta, 2000; Sievert & Kuever, 2000; Rees et al., 1995; Rozanova et al., 2001**) difiriendo en esta coloración con la cepa USBA 53 que es Gram positiva.

La ausencia de crecimiento en medio oxigenado, libre de agentes reductores, bajo condiciones normales de incubación de la cepa USBA 53 permiten clasificarla como un organismo anaerobio. En hábitats con temperaturas altas y en donde están presentes gases reducidos, como en el MT Ojo del Diablo, el oxígeno es poco soluble y la posibilidad de encontrar microorganismos anaerobios es alta, debido a que estas condiciones favorecen el crecimiento de organismos en ausencia de oxígeno. En las especies *D. hydrothermale*, *D. infernum* y *D. subterraneum* la relación con el O₂ no ha sido evaluada, sin embargo han sido aisladas de hábitats geotermales con condiciones anaerobias (**Sievert & Kuever, 2000; Rees et al., 1995; Rozanova et al., 2001**).

Tabla 6. Principales características de la cepa USBA 53 y de las especies *D. hydrothermale*, *D. infernum infernum* y *D. subterraneum*.

CARACTERÍSTICAS	BACTERIA			
	Cepa USBA 53 ^(a)	<i>D. hydrothermale</i>	<i>D. infernum</i>	<i>D. subterraneum</i>
Morfología y tamaño celular	Célula ovoide o bacilo corto 0,3 a 0,6 µm de largo por 0,2 a 0.3 µm de ancho.	Célula ovoide ó bacilo corto de 0.8-1.0 µm de ancho por 1.5-2.5 µm de largo, puede disponerse sola o en parejas.	Célula ovoide de 1.5 µm de ancho por 2.5-3 µm de largo.	Célula ovoide de 0.4-0.6 µm de ancho por 0.6-1.8 µm de largo. Puede disponerse sola o en parejas.
Movilidad	-	+	-	-
Formación de esporas	-	-	-	-
Coloración de Gram	Gram positiva	Gram negativa	Gram negativa	Gram negativa
Rango de Temperatura (°C)	50-62	37-64	40-65	45-70
Temperatura óptima (°C)	57	60	60	60
Rango de NaCl (g/L)	5-30	15-78	0-50	0-50
NaCl óptima (g/L)	25	32-36	10	5
Rango de pH	5.7-7.7	6.0-7.5	6.6-8.4	6.5-8.4
pH óptimo	6.75	7.0	7.1-7.5	7.2-7.4
Ecosistema de aislamiento	Manantial Termal	Sistema hidrotermal marino	Yacimiento de petróleo marino	Yacimiento de petróleo marino
Donadores de electrones ^(b)				
Galactosa	-	-	nr	nr
Sacarosa	-	-	-	nr
Formato	+	+	+	-
Acetato	-	+	+	+
Propionato	+	+	+	+
Butirato	+	+	+	+
Valerato	+	+	+	+
Isovalerato	+	+	+	nr
Etanol	+	+	+	+
Referencia	Este estudio	(Sievert & Kuever, 2000).	(Rees <i>et al.</i>, 1995).	(Rozanova <i>et al.</i>, 2001).

Tabla 6. (continuación) Principales características de la cepa USBA 53 y de las especies *D. hydrothermale*, *D. infernum infernum* y *D. subterraneum*.

CARACTERÍSTICAS	BACTERIA			
	Cepa USBA 53 ^(a)	<i>D. hydrothermale</i>	<i>D. infernum</i>	<i>D. subterraneum</i>
Metanol	-	nr	nr	-
Glicerol	+	-	+	nr
Succinato	-	-	+	nr
Piruvato	+	+	+	+
Malato	-	-	+	+
Fumarato	-	-	+	+
Citrato	-	-	-	-
Lactato	+	+	+	+
Alanina	-	+	+	+
Serina	+	nr	nr	+
Valina	-	nr	nr	nr
Pepticasa	-	nr	nr	nr
Casaminoácidos	-	nr	nr	nr
Crecimiento autotrófico H₂/CO₂ (80:20 %v/v)	+	+	+	+
Relación con el Oxígeno	Anaerobia	nd	nd	nd
Presencia de Desulfovirdina	nd	-	-	-
Aceptores de electrones^(c)	+ (SO ₄ ⁼ , S ₂ O ₃ , SO ₃)	+ (SO ₄ ⁼ , S ₂ O ₃ , SO ₃)	+ (SO ₃ , S ₂ O ₃)	+ (SO ₃ , S ₀ , SO ₄ ⁼ , S ₂ O ₃)
Referencia	Este estudio	(Sievert & Kuever, 2000).	(Rees <i>et al.</i>, 1995).	(Rozanova <i>et al.</i>, 2001).

^(a): Los resultados fueron leídos después de dos semanas de incubación a 57°C, pH 6.75 y 25 g/L de NaCl de la cepa USBA 53.

^(b): El medio básico contenía sulfato (20mM) y 1 g/L de extracto de levadura

^(c): El medio básico contenía 0.1g/L de extracto de levadura. El MB más el extracto de levadura fue utilizado como control

nr: no reportado

nd: no determinado

Tabla 7. Concentración de productos finales en la evaluación de donadores de electrones con 20mM de SO₄ a 57 °C, pH 6.75 y 25 g/L de NaCl.

Sustrato	Producto final (mM)				
	Acetato	Succinato	Etanol	Propionato	Butirato
Propionato (20 mM)	1.7	1.65	-	11.19	-
Butirato (20mM)	-	-	-	-	5.45
Valerato (20mM)	5.1	-	-	-	-
Isovalerato (20mM)	2.1	-	-	-	-
Etanol (5mM)	3.3	-	-	-	-
Glicerol (5mM)	1.3	-	-	-	-
Piruvato (10mM)	1.4	-	2.2	-	-
Lactato (20mM)	9.5	-	-	-	-
Serina (10mM)			0.41		

6.2 DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS

6.2.1 Evaluación de parámetros de crecimiento

La evaluación de parámetros de crecimiento como temperatura, pH y salinidad realizados a la cepa USBA 53 se muestra en las Figuras 3, 4 y 5. La Temperatura óptima de crecimiento es de 57°C con un rango de crecimiento entre 50 y 62°C, no se observó crecimiento a temperaturas de 36 y 45°C, ni superiores a los 62°C, por lo cual la cepa USBA 53 se considera una cepa termofílica. El pH óptimo de crecimiento es de 6.75 con un rango de crecimiento entre 5.7 y 7.7. La concentración óptima de NaCl es de 25 g/L con un rango de crecimiento entre 5 y 30 g/L de NaCl. A partir del rango de salinidad se determinó que la cepa USBA 53 requiere la presencia de NaCl en concentraciones superiores a 5 g/L, es decir, es una cepa halófila. Las condiciones de crecimiento "*in vitro*" de la cepa USBA 53 aislada del MT Ojo del Diablo son similares a las condiciones encontradas en el hábitat natural encontrando temperaturas alrededor de los 60°C, un pH cercano a la neutralidad y concentraciones de salinidad de 40 g/L de todas las especies disueltas como sulfato, sodio, potasio y cloro, entre otros. Los miembros del

género *Desulfacinum* requieren temperaturas termofílicas de 60°C, concentraciones de NaCl superiores a 5 g/L y cuyos pH óptimos de crecimiento se acercan a la neutralidad. Estas características se encuentran relacionadas con algunas de las propiedades de los hábitats termales de aislamiento (Sievert & Kuever 2000; Rees *et al.*, 1995; Rozanova *et al.*, 2001).

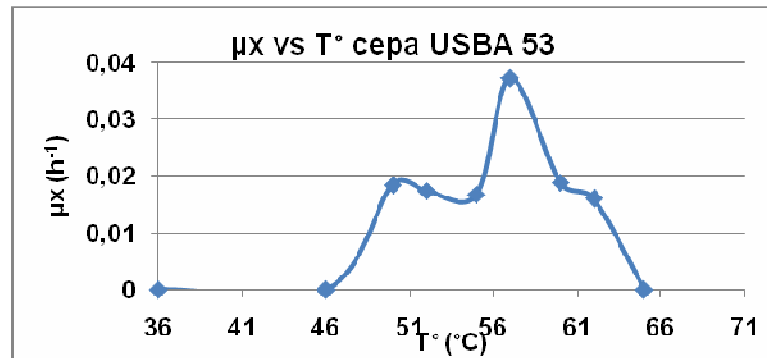


Figura 3. Rango y temperatura óptima de crecimiento de la cepa USBA 53 evaluado a pH de 7.0 +/- 0.2, 23 g/L de NaCl.

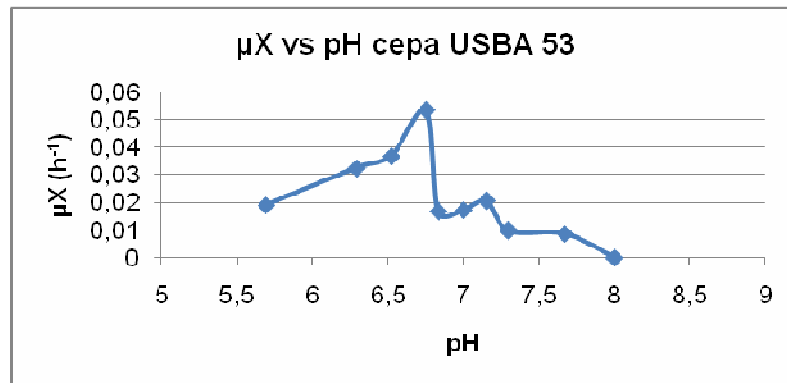


Figura 4. Rango y pH óptimo de crecimiento de la cepa USBA 53 evaluado a 55°C y 23g/L de NaCl.

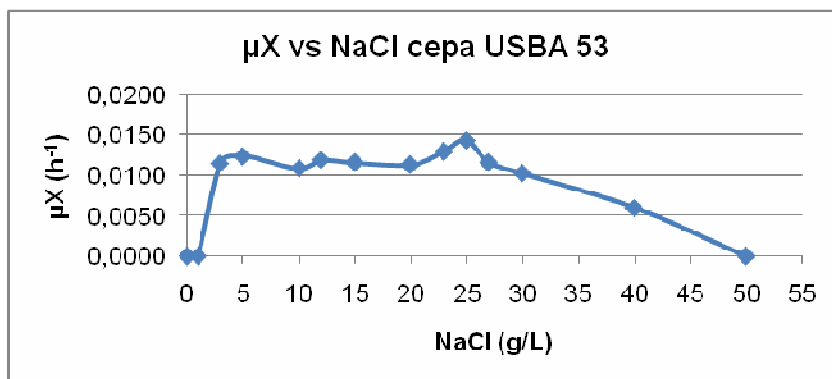


Figura 5 Rango y concentración de NaCl óptima de crecimiento de la cepa USBA 53 evaluado a 55°C y pH 7.0 +/- 0.2.

6.2.2 Establecimiento de una curva de calibración para la determinación de peso seco microbiano

A partir de las soluciones madre y de trabajo se determinó el peso seco bacteriano en una curva de calibración, dando como resultado la siguiente ecuación $Y = 0,0012x + 0,04$ (Ver Figura 6), donde X es la biomasa y Y el valor de la DO_{580nm} obteniendo una biomasa bacteriana de 500 $\mu\text{g/mL}$. Con esta ecuación se reemplazaron los valores de la DO_{580nm} medidas para cada uno de los parámetros cinéticos pH, temperatura y NaCl y se obtuvo el valor de la biomasa en cada uno de los tiempos de medición. A partir de la determinación de los parámetros cinéticos se realizó la curva de crecimiento para la cepa USBA 53 obteniendo un μX de $0,085 \text{ h}^{-1}$ y un T_d de 8.15 h para la cepa USBA 53 (Ver Figuras 7 y 8).

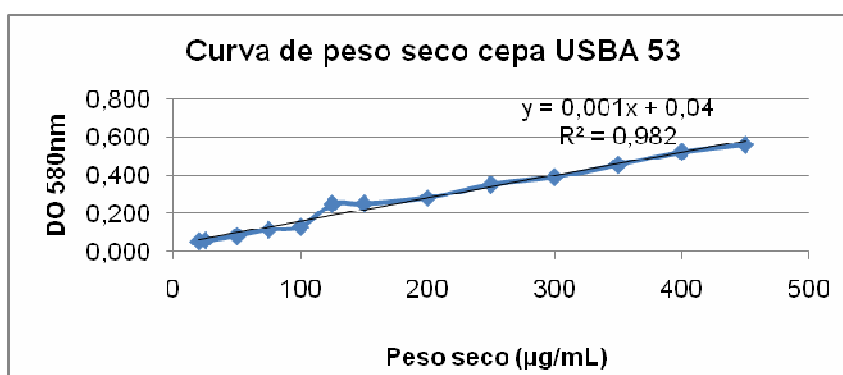


Figura 6. Curva de peso seco. Valor de las DO 580nm vs Peso seco ($\mu\text{g/ml}$) evaluada a 57°C, pH 6.75 y 25 g/L de NaCl

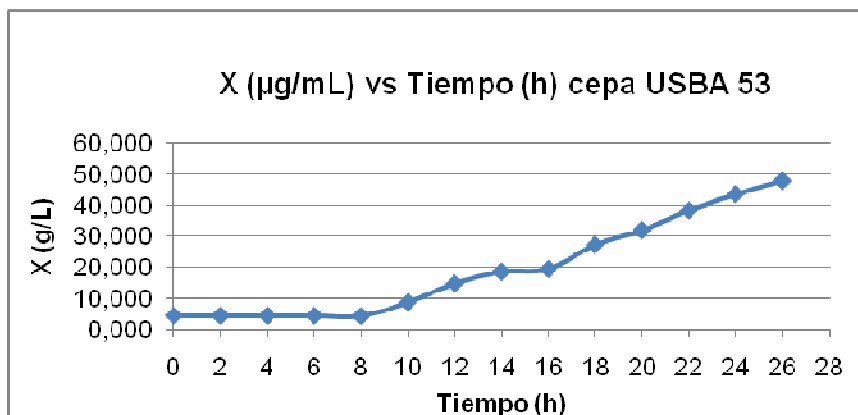


Figura 7. Biomasa vs tiempo del crecimiento de la cepa USBA 53 evaluada a 57°C, pH 6.75 y 25 g/L de NaCl.

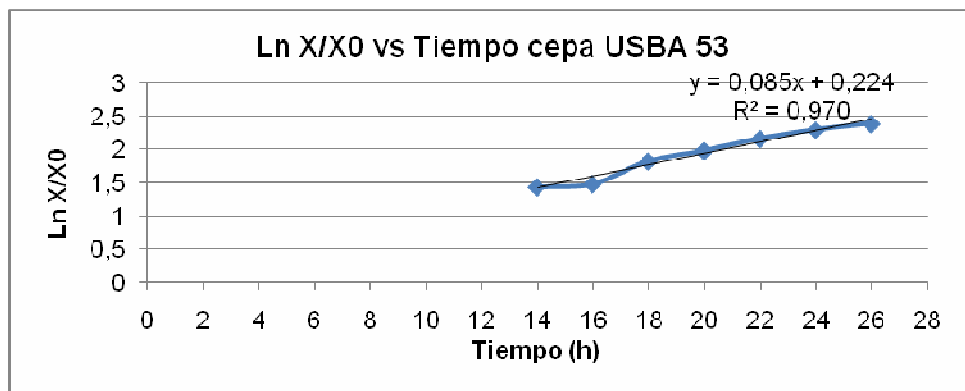


Figura 8. Ln X/X₀ vs tiempo de la cepa USBA 53 para la determinación de μ_X y T_d evaluada a 57°C, pH 6.75 y 25 g/L de NaCl.

6.3 UTILIZACIÓN DE DONADORES Y ACEPTORES DE ELECTRONES

La cepa USBA 53 crece principalmente sobre lactato y también es capaz de crecer sobre sustratos como piruvato, propionato, formato, butirato, valerato e isovalerato. La capacidad de crecer sobre compuestos orgánicos principalmente sobre el lactato que conduce a la producción de acetato, y la incapacidad de crecer en acetato, muestran que esta cepa sulfato reductora realiza una oxidación incompleta de estos compuestos orgánicos en presencia del sulfato lo que podría significar la ausencia metabólica de la vía para la oxidación del acetyl-CoA hasta CO₂ (Hansen, 1993a; Rabus *et al.*, 2006).

La utilización de formato por parte de la cepa USBA 53 puede deberse a la presencia de la enzima formato deshidrogenasa y del citocromo C₅₅₃. Este ácido monocarboxílico es considerado energéticamente como un donador de electrones equivalente al H₂ por tanto, su asimilación puede darse en la mayoría de los géneros de las BSR (**Hansen, 1993a; Rabus et al., 2006**) tal es el caso de las especies *D. hydrothermale* y *D. infernum*.

El propionato fue utilizado por la cepa USBA 53 al igual que por las especies *D. hydrothermale*, *D. infernum* y *D. subterraneum*. En el crecimiento sobre propionato se obtuvo una concentración de succinato de 1.65 mM indicando que posiblemente la cepa USBA 53 realizó la transcarboxilación del propionil-CoA a metilmalonil-CoA con oxalacetato como donador de electrones y en donde el succinato se presenta como intermediario común. El propionato puede ser utilizado por especies oxidadoras completas a acetato y CO₂ (**Hansen, 1993a**). En la cepa USBA 53 se observó la producción de 1.7mM de acetato y una concentración final de propionato de 11.19mM lo cual podría indicar que la cepa USBA 53 realiza probablemente una oxidación lenta del propionato.

La utilización de butirato como donador de electrones se observó en la cepa USBA 53, al igual que en *D. hydrothermale*, *D. infernum* y *D. subterraneum*. La oxidación de butirato es muy común en bacterias sulfato reductoras de oxidación completa e incompleta, sin embargo, no se obtuvo ninguna concentración de acetato, y se obtuvo una concentración de 5.45 mM de butirato al final de la prueba (**Hansen, 1993a**).

El crecimiento de la cepa USBA 53 en valerato fue observado positivo debido a la presencia de H₂S y a la presencia de 5.1 mM de acetato, con lo cual probablemente este organismo realiza una oxidación incompleta.

La capacidad de llevar a cabo la oxidación incompleta del lactato se debe a la presencia de varias enzimas como la lactato deshidrogenasa independiente de NAD(P)⁺ que oxida el lactato a piruvato, luego este es convertido a acetato por la fosfotransacetilasa y la acetato quinasa (**Rabus et al., 2006**). La presencia de acetato en una concentración final de 9.5mM puede indicar la presencia de estas enzimas en la cepa USBA 53.

La cepa USBA 53 difiere metabólicamente de las especies del género *Desulfacinum* en varios aspectos. La cepa USBA 53 es incapaz de crecer en acetato, mientras que *D. hydrothermale*, *D. infernum* y *D. subterraneum* si crecen en acetato, además también tienen la capacidad de crecer en lactato, a pesar de que muchas especies de BSR oxidadoras completas no son capaces de crecer sobre este sustrato (**Sievert & Kuever**

2000; Rees et al., 1995; Rozanova et al., 2001). Estas especies son oxidadoras completas de lactato conduciendo a la formación de acetato y la oxidación de este puede darse muy lentamente por medio de dos vías que han sido anteriormente descritas, la vía del ácido cítrico y la vía de la monóxido carbono deshidrogenasa (**Hansen, 1993a**). En la especie *D. hydrothermale* los sustratos son usualmente oxidados completamente a CO₂, pero en concentraciones altas puede darse la oxidación incompleta de sustratos orgánicos (**Sievert & Kuever 2000**).

Los alcoholes primarios etanol y glicerol fueron usados como donadores de electrones por la cepa USBA 53, mientras que el metanol no fue utilizado en presencia de sulfato. El producto obtenido en la degradación de etanol fue el acetato a una concentración de 3.3 mM, lo que pueden indicar que la cepa USBA 53 llevó a cabo la vía del acetaldehído obteniendo acetato como producto final (**Rabus et al., 2006**). Por otro lado, el glicerol es oxidado por especies de BSR como *Desulfovibrio*, a acetato y CO₂ vía glicerol- 3- fosfato (**Ollivier et al., 1988**). En la vía metabólica del glicerol actúa la glicerol quinasa, una glicerol 3-fosfato deshidrogenasa y enzimas de la ruta glicolítica a piruvato (**Hansen, 1993a**). La producción de 1.3 mM de acetato a partir de glicerol por la cepa USBA 53 podría evidenciar una oxidación de este a través de la vía glicerol-3-fosfato. El metanol es un sustrato menos comúnmente usado por las BSR y su crecimiento sobre este puede ser lento y el mecanismo de oxidación aún es desconocido (**Rabus et al., 2006**). La presencia de sulfato puede ejercer efectos sobre la conversión del metanol en condiciones termofílicas (**Valero et al., 2003**) como bajo las que se realizó este estudio. La utilización de los alcoholes primarios puede llevarse a cabo usualmente, cuando está presente en el medio otra fuente de carbono como el lactato (**Hansen, 1993a**). Lo más probable es que estos alcoholes sean utilizados debido a la poca especificidad de la etanol y la acetaldehído deshidrogenasa (**Hansen, 1993a; Rabus et al., 2006**) que podría estar presente en la cepa USBA 53 para poder utilizarlos como donadores de electrones.

La producción de acetato en una concentración de 1.4mM y de 2.2 mM a partir de piruvato por parte de la cepa USBA 53 indica la utilización de este sustrato como donador de electrones. En la oxidación incompleta de sustratos orgánicos, el acetil-CoA producido del piruvato es convertido a acetato por medio de la fosfotransacetilasa y la acetato quinasa (**Rabus et al., 2006**) enzimas que podrían realizar ésta oxidación incompleta en la cepa USBA 53 y en las especies *D. hydrothermale*, *D. infernum* y *D. subterraneum*.

Por otro lado, ni la cepa USBA 53, ni las especies *D. hydrothermale*, *D. infernum* y *D. subterraneum* utilizaron azúcares como sustratos donadores de electrones. La propiedad de utilizar azúcares es propia sólo en pocas especies representantes del género *Desulfovibrio* y en ausencia o presencia de sulfato se ha observado en *D. fructosovorans*. La utilización de glucosa en *Desulfotomaculum nigrificans* y *D. salexigens* también ha sido reportada (**Rabus et al., 2006**).

Los ácidos dicarboxílicos fumarato, succinato, malato y citrato no fueron utilizados como donadores de electrones por la cepa USBA 53. La incapacidad para utilizar estos compuestos, puede deberse a la ausencia del sistema de transporte o de enzimas implicadas en su degradación (**Rabus et al., 2006**). Al igual que la cepa USBA 53 *D. hydrothermale* tampoco fue capaz de crecer sobre estos sustratos, a diferencia de *D. infernum* y *D. subterraneum* que utilizaron el malato, succinato y fumarato como sustrato donador de electrones. Ninguna de estas especies de *Desulfacinum* y la cepa USBA 53 utilizaron el citrato.

Los aminoácidos alanina y valina no fueron utilizados como fuente de carbono en presencia de sulfato por la cepa USBA 53, mientras la serina si fue utilizada. En las especies *D. infernum*, *D. subterraneun* y *D. hydrothermale* se evidenció la utilización de alanina, difiriendo de la cepa USBA 53. La alanina es utilizada por representantes del género *Desulfacinum*; sin embargo, su habilidad para utilizar otros aminoácidos no ha sido estudiada (**Roanova et al., 2001**). La utilización de la alanina en especies de BSR requiere de la acción de la alanina deshidrogenasa dependiente de NAD^+ (**Rabus et al., 2006**) la cual posiblemente esté ausente en la cepa USBA 53 impidiendo la utilización de este aminoácido como donador de electrones en presencia del sulfato. La serina fue positiva para cepa USBA 53 al igual que para *D. subterraneun*, mientras en *D. Infernum* y *D. hydrothermale* no ha sido reportado. La utilización de valina no fue observado en la cepa USBA 53, y en *D. infernum*, *D. subterraneun* y *D. hydrothermale* no ha sido reportado. La vía de las hexosas difosfato y la vía de la hexosas monofosfato están presentes en la degradación de aminoácidos como, alanina, serina y glicina entre otros, produciendo piruvato y a partir de este etanol (**Madigan et al., 2001**) estas vías podrían estar presentes en la degradación de la serina en la cepa USBA 53.

Empleando el método de Cord-Ruwisch (1985) se determinó la producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S) utilizando el sulfato (SO_4), tiosulfato (S_2O_3) y sulfito (SO_3) como aceptores de electrones (Tabla 6), el NO_3 se evaluó por la técnica de la difenilendiamina. *D. hydrothermale*, *D. infernum* y *D. subterraneum* utilizan el SO_4 , el S_2O_3 y el SO_3 como aceptores de electrones al igual que la cepa USBA 53 (**Roanova et al., 2001**). El NO_3

no fue utilizado como aceptor de electrones al no evidenciar crecimiento, ni tampoco algún producto final en la detección por HPLC.

Con respecto a la capacidad de crecer autotróficamente bajo condiciones normales con $H_2:CO_2$ (80:20 %) y $H_2:CO_2$ (80:20 %) en presencia de SO_4^- , los resultados para la cepa USBA 53 mostraron crecimiento abundante en ambos casos, es decir, la cepa USBA 53 es capaz de reducir el sulfato en presencia de hidrógeno molecular bajo condiciones autotróficas, y bajo condiciones heterotróficas también produce sulfuros, es decir, se podría decir que la cepa USBA 53 tiene un comportamiento mixotrófico al igual que *D. subterraneum* (Roanova et al., 2001) mientras *D. hydrothermale* y *D. infernum* mostraron la capacidad de crecer autotróficamente únicamente.

6.3.1 Prueba de catalasa y resistencia a antibióticos.

La reacción de la prueba de la catalasa fue tomada como resultado negativo para la cepa USBA 53. La razón por la que los anaerobios estrictos son destruidos por el oxígeno, es probablemente porque son incapaces de eliminar algún producto tóxico derivado del metabolismo del oxígeno. Cuando se reduce el oxígeno se producen algunos elementos tóxicos como el peróxido de hidrógeno H_2O_2 , superóxido O_2^- y radicales hidroxilo (HO^\cdot). El superóxido es altamente reactivo y puede oxidar virtualmente cualquier compuesto orgánico dentro de la célula. Los peróxidos pueden dañar los componentes celulares pero no son tan tóxicos como los superóxidos o radicales hidroxilo. Una forma de destruir estos compuestos tóxicos es la producción de la enzima catalasa, que destruye el peróxido de hidrógeno. Otra enzima que actúa sobre el peróxido de hidrógeno es la peroxidasa y la superóxido dismutasa (SOD) que destruye el superóxido. La SOD es indispensable para las células aeróbicas y su ausencia en los anaerobios estrictos es la razón por la que el oxígeno es tóxico para ellos (Madigan et al., 2001). La ausencia de la enzima catalasa y por tanto SOD en la cepa USBA 53 demuestra que es una anaerobia estricta y que el oxígeno podría ser tóxico para ella.

Los resultados de la resistencia a antibióticos de la cepa USBA 53 se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Crecimiento de la cepa USBA 53 en Penicilina G y Cloranfenicol a las concentraciones de 50 y 100 µg/mL.

Antibiótico.	Concentración (µg/mL).	Crecimiento.
Penicilina G.	50	+
	100	-
Cloranfenicol.	50	-
	100	-

Las concentraciones de 50 y 100 µg/mL de cloranfenicol inhibieron el crecimiento de la cepa USBA 53, pero a 50 µg/mL de penicilina G la cepa mostró poco crecimiento y a los 100 µg/mL no se evidenció crecimiento, por tanto, se puede concluir que la concentración necesaria de penicilina G para inhibir a la cepa USBA 53 debe ser superior a los 50 µg/mL probablemente en una concentración inferior o igual a los 100 µg/mL. Por otro lado respecto a la resistencia al cloranfenicol se puede decir que la cepa USBA 53 no resiste este antibiótico en concentraciones de 50 y de 100 µg/mL.

La penicilina G es un antibiótico β-lactámico y que es activo primordialmente frente a bacterias Gram positivas. Los antibióticos β-lactámicos son potentes inhibidores de la síntesis de pared celular, una característica importante de la síntesis de la pared celular es la reacción de transpeptidación que da como resultado la unión, mediante enlaces transversales, de dos cadenas de péptidoglicanos. Las enzimas que cumplen esta tarea son las transpeptidasas, que son capaces de unirse a la penicilina u otros antibióticos con anillo β-lactámico. Las transpeptidasas se unen fuertemente a la penicilina y ya no pueden seguir catalizando la reacción de la transpeptidasa lo cual hace que la síntesis de la pared celular siga llevándose a cabo, pero sin enlaces transversales lo que la debilita y estimula a su vez, la producción de autolisinas que digieren la pared celular hasta que es totalmente degradada y la célula es lisada (**Madigan et al., 2001**). La coloración de Gram de la cepa USBA 53 es Gram positiva por ello puede concluirse que esta cepa es permeable a la penicilina G y que esta inhibe la síntesis de pared celular en esta cepa por medio de la acción del mecanismo anteriormente mencionado.

El cloranfenicol es una sustancia antibiótica que afecta la lisis de proteínas por interacción con el ribosoma, específicamente inhibe la elongación bloqueando la formación del enlace peptídico en el sitio A del ribosoma. El cloranfenicol es específico

para los ribosomas del dominio Bacteria (**Madigan et al., 2001**). Este antibiótico podría actuar sobre el ribosoma de la cepa USBA 53 bloqueando la formación del enlace peptídico en el ribosoma.

La cepa USBA 53 no es resistente al cloranfenicol ni a la penicilina G en concentraciones de 100 µg/mL. La resistencia a un antibiótico puede ser una propiedad inherente a un organismo o puede ser adquirida por varios factores (**Madigan et al., 2001**). La cepa USBA 53 no tiene entonces ningún factor inherente de resistencia a estos antibióticos, pero podría adquirirlos por exposición a estas sustancias.

Comparando la cepa USBA 53 con los organismos pertenecientes al género *Desulfacinum*, *D. hydrothermale*, *D. infernum* y *D. subterraneum*, la cepa sulfato reductora USBA 53 presentó características fenotípicas diferentes a este género, entre estas, la coloración de Gram, Gram positiva, la incapacidad de crecer sobre acetato y alanina como donadores de electrones, crecimiento mixotrófico en H₂:CO₂ que es una característica compartida con *D. subterraneum*. La cepa USBA 53 presentó crecimiento halófilo al igual que especies *D. infernum* y *D. subterraneum*. El análisis y comparación de la secuencia del 16S rRNA de la cepa USBA 53 y un valor de la similitud del 93% con el género *Desulfacinum*, junto con las características fisiológicas anteriormente mencionadas permiten concluir que este grupo podría constituirse en un nuevo género microbiano.

7. CONCLUSIONES

- Este trabajo permite aumentar el conocimiento de la Diversidad Microbiana de las BSR en los Manantiales Termales de Paipa
- Se determinaron los parámetros óptimos de crecimiento y se obtuvo como resultado que la cepa USBA 53 crece óptimamente a condiciones de 57°C, 25g/L de NaCl y un valor de pH de 6.75. Es decir, la cepa USBA 53 es termofílica, halófila y requiere valores de pH cercanos a la neutralidad para crecer óptimamente.
- La comparación de las secuencias parciales del gen 16S rRNA y el valor de similitud más alto obtenido del 93% con el género *Desulfacinum* además de las diferencias fenotípicas determinadas en este estudio, permiten sugerir que la cepa USBA 53 podría constituirse en un nuevo género microbiano de BSR

8. RECOMENDACIONES

- Realizar la secuenciación completa del gen 16S rRNA y la cuantificación del porcentaje de Guanina+Citosina, así como la presencia de *Desulfovirdina* de la cepa USBA 53 para complementar la información de su análisis polifásico.
- Profundizar en el estudio morfológico con microscopía electrónica con el fin de identificar estructuras celulares.
- Evaluar en futuros estudios las posibles aplicaciones biotecnológicas de la cepa USBA 53.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alain, K; Marteinson, V.T; Miroshnichenko, M.L; Bonch-Osmolovskaya, E.A; Prieur, D; Birrien, J.L. (2002a) *Marinitoga piezophila* sp. nov., a rod-shaped, thermo-piezophilic bacterium isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:1331-1339.
- Alain, K; Pignet, P; Zbinden, M; Quillevere, M; Duchiron, F; Donval, J.P; Lesongeur, F; Raguene, G; Crassous, P; Querellou, J; Cambon-Bonavita, M.A. (2002b) *Caminicella sporogenes* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic spore-forming bacterium isolated from an East-Pacific Rise hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:1621-1628.
- Alfaro, C.M. (2002) Geoquímica del sistema geotérmico de Paipa. Ingeominas. Bogotá, Colombia. Pág 2-15.
- Andrews, K.T; Patel, B. K. C. (1996) *Fervidobacterium gondwanense* sp. Nov., a new thermophilic anaerobic bacterium isolated from non volcanically heated geothermal waters of the Great Artesian Basin of Australia. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46:265-269.
- Antoine, E; Cilia, V; Meunier, J.R; Guezennec, J; Lesongeur, F; Barbier, G. (1997) *Thermosipho melanesiensis* sp. nov., a new thermophilic anaerobic bacterium belonging to the order Thermotogales, isolated from deep-sea hydrothermal vents in the southwestern Pacific Ocean. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:1118-1123.
- Atlas, R. M; Bartha, R; (2002) Ecología microbiana y Microbiología Ambiental. Ed. Prentice Hall. Madrid, España. Pág. 430-431.
- Audiffren, C; Cayol, J.L; Joulian, C; Casalot, L; Thomas, P; García, J.L; Ollivier, B. (2003) *Desulfonauticus submarinus* gen. nov., sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1585-1590.
- Ávila, D.L; Sánchez, G.P. (2003) Caracterización de bacterias termofílicas proteolíticas, a partir de aguas termales autóctonas del municipio de Iza, Boyacá. Microbiología

Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de microbiología. Bogotá. Pág. 5-11.

Baena, S., M. L. Fardeau, M Labat, B. Ollivier, J. I. Garcia, and B.K.C. Patel. (1998) *Desulfovibrio aminophilus* sp. Nov., novel amino acid degrading and sulfate reducing bacterium from anaerobic wastewater lagoon. *Syst. Appl. Microbiol.* 21:498-504.

Baena, S. (2005) Informe Colciencias, Estudio de la diversidad microbiana en ambientes extremófilos en agua minerales termales de Boyacá, Colombia. Fase I. USBA. Pontificia Universidad Javeriana-Facultad de Ciencias-Departamento de Biología.

Balch, C.M; Fox, G.E; Magrum, R.J; Wolfe, R.S (1979) Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol Revolution* 430: 260-296.

Balck, M; Altınbaş, M; Rijpstra, I.C; Damsté, J.S.S; Stams, A.J.M. (2008) *Desulfatirhabdium butyrativorans* gen. nov., sp. nov., a butyrate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from an anaerobic bioreactor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 110-115.

Barton, L. Larry; (1995) Sulfate – Reducing Bacteria. Biotechnology Handbook. New York.

Baskaran, V; Nematı, M. (2006). Anaerobic reduction of sulphate in immobilized cell bioreactors, using a microbial culture originated from an oil reservoir. *Biochem. Eng. J.* 31:148-159.

Belduz, A.O; Dulger, S; Demirbag, Z. (2003) *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a moderately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:1315-1320.

Belyakova, E.V; Rozanova, E.P; Borzenkov, I.A; Tourova, T.P; Pusheva, M.A; Lysenko, A.M; Kolganova, T.V. (2007). The new facultatively chemolithoautrophic, moderately halophilic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovermiculus halophilus* gen. nov., sp. nov., isolated from oil field. *Microbiology.*75:161-171.

Bonch-Osmolovskaya, E.A; Sokolova, T.G; Kostrikina, N.A; Zavarzin, G.A. (1990) *Desulfurella acetivorans* gen. nov. and sp. nov.—a new thermophilic sulfur-reducing eubacterium. *Arch. Microbiol.*153:151-155.

Brand, K.K; Patel, B.K.C; Ingvorsen, K. (1999). *Desulfocella halophila* gen. nov., sp. nov., a halophilic, fatty-acid-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from sediments of the Great Salt Lake. . *Int. J. Syst. Microbiol.* 49:193-200.

Burgess, A; Wagner, I; Wiegel, J. (2007) Thermal Environments and Biodiversity. *Physiology and Biochemistry of Extremophiles.* 2:13-29.

Cai, J; Wang, Y; Liu, D; Zeng, Y; Xue, Y; Ma, Y; Feng, Y. (2007) *Fervidobacterium changbaicum* sp. nov., a novel thermophilic anaerobic bacterium isolated from a hot spring of the Changbai Mountains, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2333-2336.

Cann, I.K.O; Stroot, P.G; Mackie, K.R; White, B.A; Mackie, R.I.(2001) Characterization of two novel saccharolytic, anaerobic thermophiles, *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum* sp. nov. and *Thermoanaerobacterium zeeae* sp. nov., and emendation of the genus *Thermoanaerobacterium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 293-302.

Castro, F.H; Williams, N.H; Ogram, A; (2000) Phylogeny of sulphate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31:1-9.

Cayol, J.L; Ducerf, S; Patel, B.K; Garcia, J.L; Thomas, P; Ollivier, B. (2000) *Thermohalobacter berrensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, strictly halophilic bacterium from a solar saltern. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:559-564.

Chrisostomos, S; Patel, B.K.C; Dwivedi, P.P; Denman, S.E. (1996) *Caloramator indicus* sp. nov., a new thermophilic anaerobic bacterium isolated from the deep-seated nonvolcanically heated waters of an Indian artesian aquifer. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:497-501.

Collins, M.D; Lawson, P.A; Willems, A; Cordoba, J.J; Fernández-Garayzabal, J; Garcia, P; Cai, J; Hippe, H; Farrow, J.A.E. (1994) The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:812-826.

Cook, G.M; Rainey, F.A; Patel, B.K.C; Morgan, H.W. (1996) Characterization of a new obligately anaerobic thermophile, *Thermoanaerobacter wiegellii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:123-127.

- Cord-Ruwisch, R. (1985). A quick method of determination dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulphate-reducing bacteria. *J Microbiol Methods*. 4:33-36.
- Cravo-Laureau, C; Matheron, R; Cayol, J.L; Joulian, C; Hirschler-Réa, A. (2004). *Desulfatibacillum aliphaticivorans* gen. nov., sp. nov., an n-alkane- and n-alkene-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:77-83.
- Cravo-Laureau, C; Labat, C; Joulian, C; Matheron, R; Hirschler-Réa, A. (2007). *Desulfatiferula olefinivorans* gen. nov., sp. nov., a long-chain n-alkene-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:2699-2702.
- Da Costa, M.S; Rainey, F.A.; Nobre, F. (2006) The Genus *Thermus* and Relatives. *Prokaryotes* 7:797-812.
- Daumas, S; Cord-Ruwish, R; Garcia, J.L.(1990) *Desulfotomaculum geothermicum* sp. Nov., a thermophilic, fatty acid-degrading, sulphate-reducing bacterium isolated with H₂ from geothermal ground water. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 105-106.
- Davidova, I.A; Duncan, K.E; choi, O.K; Suflita, J.M. (2006). *Desulfoglaeba alkanexedens* gen. Nov., sp. nov., an n-alkane-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:2737-2742.
- Denger, K; Stackebrandt, E; Cook, A.M. (1999). *Desulfonisporea thiosulfatigenes* gen. Nov., sp. Nov., a taurine-fermenting, thiosulfate-producing anaerobic bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* 49:1599-1603.
- Derekova, A; Sjoeholm, C; Mandeva, R; Kambourova, M. (2007) *Anoxybacillus rupiensis* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from Rupi basin, Bulgaria. *Extremophiles* 11:577-583
- Devereux, R; Stahl, A. D; (1993). Industrial and environmental activities of sulfate-reducing bacteria. Ed. Odom and R. Singleton, The sulfate reducing bacteria: contemporary perspectives. Springer-Verlag, New York.
- Dulger, S; Demirbag, Z; Belduz, A.O. (2004) *Anoxybacillus ayderensis* sp. nov. and *Anoxybacillus kestanbolensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1499-1503
- Egorova, K; Antranikian, G. (2005) Industrial Relevance of Thermophilic Archaea. *Curr. Opin. Microbiol.* 8: 649-655.

Fardeau, M.L; Ollivier, B; Patel, B.K.C; Dwivedi, P; Ragot, M; García, J.L. (1995). Isolation and Characterization of Thermophilic Sulfate-Reducing Bacterium, *Desulfotomaculum thermosapovorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 218-221.

Fardeau, M.L; Magot, M; Patel, B.K.C; Thomas, P; Garcia, J.L; Ollivier, B. (2000) *Thermoanaerobacter subterraneus* sp. nov., a novel thermophile isolated from oilfield water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:2141-2149.

Fardeau, M.L; Bonilla, S.M; L'Haridon, S; Jeanthon, C; Verhe, F; Cayol, J.L; Patel, B.K.C; Garcia, J.L; Ollivier, B. (2004) Isolation from oil reservoirs of novel thermophilic anaerobes phylogenetically related to *Thermoanaerobacter subterraneus*: reassignment of *T. subterraneus*, *Thermoanaerobacter yonseiensis*, *Thermoanaerobacter tengcongensis* and *Carboxydobrachium pacificum* to *Caldanaerobacter subterraneus* gen. nov., sp. nov., comb. nov. as four novel subspecies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:467-474

Fauque, G. (1995). Ecology of Sulfate-Reducing Bacteria. Sulfate-Reducing Bacteria. Plenum Press, New York.

Fauque, G; Olliver, B. (2004) Anaerobes: The Sulfate-Reducing Bacteria as an Example Metabolic Diversity. *Microbial Diversity Bioprospecting.*17:169-176.

Finster, K; Liesack, W; tindall, B.J.(1997). *Desulfospira joergensenii*, gen. nov., sp. nov., a new sulfate-reducing bacterium isolated from marine surface sediment. *Syst. Appl. Microbiol.* 20:201-208

Finster, K; Thomsen, T.R; Ramsing, N.B. (2001). *Desulfomusa hansenii* gen. nov., sp. nov., a novel marine propionate-degrading, sulfate-reducing bacterium isolated from *Zostera marina* roots. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:2055-2061.

Friedrich, M; Springer, N; Ludwig, W; Schink, B. (1996). Phylogenetic positions of *Desulfofustis glycolicus* gen. nov., sp. nov., and *Syntrophobotulus glycolicus* gen. nov., sp. nov., two new strict anaerobes growing with glycolic acid. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46(4): 1065-1069

Friedrich, A.B; Antranikian, G. (1999) Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order *Thermotogales*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2875-2882.

Grant, W.D; & Long, P.E; (1989) *Microbiología Ambiental*. Ed. Acribia. Zaragoza, España.

Gupta, R.S. (2000). The phylogeny of proteobacteria:relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiol.* 24:367-402.

Hansen, A. Theo. (1993a). Carbon metabolism of Sulfate-Reducing Bacteria. Ed. Odom and R. Singleton, *The sulfate reducing bacteria: contemporary perspectives*. Springer-Verlag, New York.

Hansen, A. Theo; (1993b). Industrial and environmental activities of sulfate-reducing bacteria. Ed. Odom and R. Singleton, *The sulfate reducing bacteria: contemporary perspectives*. Springer-Verlag, New York.

Hartzell, P; Reed, D.W; (2006) The Genus *Archaeoglobus*. *Prokaryotes* 3:82–100.

Henry, E.A; Deveraux, R; Maki, J.S; Gilmour, C.C; Woese, C.R; Mandelco, L; Schauder, R; Rensen, C.C; Mitchell, R. (1994). Characterization of a new thermophilic sulfate-reducing bacterium *Thermodesulfovibrio yellowstonii*, gen. nov. and sp. nov.: its phylogenetic relationship to *Thermodesulfobacterium commune* and their origins deep within the bacterial domain. *Arch. Microbiol* 161:62-69.

Huber, R; Langworthy, T.A; Konig, H; Thomm, M; Woese, C.R; Sleytr, U.B; Stetter, K.O. (1986) *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C . *Arch. Microbiol.* 144:324-333.

Huber, R; Woese, C.R; Langworthy, T.A; Fricke, H; Stetter, K.O. (1989) *Thermosiphon africanus* gen. nov., represents a new genus of thermophilic eubacteria within the "thermotogales". *Syst. Appl. Microbiol.* 12: 32-37.

Huber, R; Woese, C.R; Langworthy, T.A; Kristjansson, J.K; Stetter, K.O. (1990) *Fervidobacterium islandicum* sp. nov., a new extremely thermophilic eubacterium belonging to the Thermotogales. *Arch. Microbiol.* 154:105-111.

Huber, H; Hohn, M.J; Rachel, R; Fuchs, T; Wimmer, V.C; Stetter, K.O. (2002). A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417:63-67.

Huber, R; Hannig, M. (2006) Thermotogales. *Prokaryotes*. 7:899-922.

Isaksen, M.F; Teske, A.(1999). *Desulforhopalus vacuolatus* gen. nov., sp. nov., a new moderately psychrophilic sulfate-reducing bacterium with gas vacuoles isolated from a temperate estuary. . *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 49:935-936.

Itoh, T; Suzuki, K I; Nakase, T. (1998). *Thermocladium modesticus* gen. nov sp no., a new genus of rod-shaped, extremely thermophilic crenarchaeole. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:879-887

Itoh, T; Suzuki, K.I; Sanchez, P.C; Nakase, T. (1999). *Caldivirga maquilingensis* gen. nov.,sp. Nov., new genus of rod-shaped crenarchaeote isolated from a hot spring in the Philippines. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 49:1157-1163

Jannasch, H.W; Huber, R; Belkins, S; Stetter, K.O. (1989) *Thermotoga neapolitana* sp. nov. of the extremely thermophilic, eubacterial genus *Thermotoga*. *Arch. Microbiol.* 150:103-104.

Janssen, P.H; Schuhmann, A; Bak, F; Liesack, W.(1997) Disproportionation of inorganic sulfur compounds by the sulfate-reducing bacterium *Desulfocapsa thiozymogenes* gen. nov., sp. nov. *Arch. Microbiol.* 166:184-192.

Jeanthon, C; L'Haridon, S; Cueff, V; Banta, A; Reysenbach, A.L; Prieur, D. (2002). *Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent al Guaymas Basin, and emendation of the genus *Thermodesulfobacterium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:765-772.

Kaksonen, A; Plumb, J; Robertson, W; Spring, S; Schumann, P; Franzmann, P; Puhakka, J. (2006a) Novel Thermophilic Sulfate-Reducing Bacteria from a Geothermally Active Underground Mine in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.*72:3759-3762.

Kaksonen, A; Spring, S; Schumann, P; Kroppenstedt, R.M; Puhakka, J. (2006b) *Desulfotomaculum thermosubterraneum* sp. nov., a thermophilic sulfate-reducer isolated from an underground mine located in a geothermally active area. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 56:2603-2608.

Kaksonen, A; Spring, S; Schumann, P; Kroppenstedt, R.M; Puhakka, J.A. (2007a) *Desulfovirgula thermocuniculi* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfate-reducer isolated from a geothermal underground mine in Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 57:98-102.

Kaksonen, A; Spring, S; Schumann, P; Kroppenstedt, R.M; Puhakka, J.A. (2007b) *Desulfurispora thermophila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, spore-forming sulfate-reducer isolated from a sulfidogenic fluidized-bed reactor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:1089-1094.

Kerstens, K; Vos, P; Gillis, M; Swings, J; Vandamme, P; Stackebrandt, E.(2006) Introduction to the Proteobacteria. *Prokaryotes* 5:3-37.

Kjeldsen, K; Loy, A; Jakobsen, T; Thomsen, T; Wagner, M; Ingvorsen, K. (2007) Diversity of sulfate-reducing bacteria from an extreme hypersaline sediment, Great Salt Lake (Utah). *FEMS Microbiol. Ecol* 60:287-298.

Knoblauch, C; Sahm, K; Jørgensen, Bo.B. (1999). Psychrophilic sulfate-reducing bacteria isolated from permanently cold Arctic marine sediments: description of *Desulfofrigus fragile* sp. nov., *Desulfofaba gelida* gen. nov., sp. nov., *Desulfotalea psychrophila* gen. nov., sp. nov. and *Desulfotalea arctica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:1631-1643.

Kozianawski, G; Cangarella, F; Rainey, F.A; Hippe, H; Antranikian, G. (1997) Purification and Characterization of thermostable pectate-lyases from a newly isolated thermophilic bacterium, *Thermoanaerobacter italicus* sp. nov. *Extremophiles.* 1:171-182.

Kublanov, I.V; Prokofeva, M.I; Kostrikina, N.A; Kolganova, T.V; Tourova, T.P; Wiegel, J; Bonch-Osmolovskaya, E.A. (2007). *Thermoanaerobacterium aciditolerans* sp. nov., a moderate thermoacidophile from a Kamchatka hot spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 260-264.

Kuever, J; Rainey, F.A; Widdel, F. (2006) Genus I. *Desulfarculus* gen. nov. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, (The *Proteobacteria*), part C (The *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*-, and *Epsilonproteobacteria*), Springer, New York. 2:1004-1005.

L'Haridon, S; Miroshinichenko, M. L; Hippe, H; Fardeau, M.L; Bonch-Osmolovskaya, E; Stanckebrandt, E; Jeanthans, C. (2001) *Thermosiphon geoleisp.* Nov. thermophilic bacterium isolated from a continental petroleum reservoir in Western Siberia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1327-1334.

L'Haridon, S; Reysenbach, A.L; Tindall, B.J; Schönheit, P; Banta, A.; Schumann, P; Gambacorta, A; Stanckebrandt, E; Jeanthans, C. (2006). *Desulfurobacterium atlanticum* sp. nov., *Desulfurobacterium pacificum* sp. nov. and *Thermodesulfovibrio guaymasensis*

sp. nov., three thermophilic members of the *Desulfurobacteriaceae* fam. Nov., a deep branching lineage within the *Bacteria* *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:2843-2852.

Larsen, L; Nielsen, P; Ahring, B.K. (1998) *Thermoanaerobacter mathranii* sp. nov., an ethanol-producing, extremely thermophilic anaerobic bacterium from a hot spring in Iceland. *Arch. Microbiol.* 168:114-119

Lee, Y.E; Jain, M.K; Lee, C; Lowe, S.E; Zeikus, J.G. (1993) Taxonomic distinction of saccharolytic thermophilic anaerobes: description of *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* gen. nov., sp. nov., and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* gen. nov., sp. nov.; reclassification of *Thermoanaerobium brockii*, *Clostridium thermosulfurogenes*, and *Clostridium thermohydrosulfuricum* E100-69 as *Thermoanaerobacter brockii* comb. nov., *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* comb. nov., and *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* comb. nov., respectively; and transfer of *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E to *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:41-51.

Lee, Y.J; Dashti, M; Prange, A; Rainey, F.A; Rohde, M; Whitman, W.B; Wiegel, J. (2007). *Thermoanaerobacter sulfurigignens* sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium that reduces 1M thiosulfate to elemental sulfur and tolerates 90 mM sulfite. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:1429-1434

Liu, S.Y; Rainey F.A; Morgan H.W; Mayer F; Wiegel, J. (1996). *Thermoanaerobacterium aotearoense* sp. nov., a slightly acidophilic, anaerobic thermophile isolated from various hot springs in New Zealand, and emendation of the genus *Thermoanaerobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46: 388-396.

Liu, Y; Karnauchow, T.M; Jarrel, K.F; Balkwill, D.L; Drake, G.R; Ringelberg, D; Clarno, R; Boone, D.R. (1997). Description of two new thermophilic *Desulfotomaculum* spp., *Desulfotomaculum putei* sp. nov., from a deep terrestrial subsurface, and *Desulfotomaculum luciae* sp. nov., from a hot spring. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:615-621.

López, G; Guerra, H. (2004) Aislamiento y caracterización de microorganismos reductores Fe (III) en manantiales termominerales del municipio de Paipa, Boyacá. *Microbiología Industrial*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de microbiología, Bogotá. Pág. 63-64.

Lovley, D. R.; Phillips, E. J. (1986) Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 683-689.

Marín, R. (1992). Estadísticas sobre el recurso del agua en Colombia. Segunda edición. Ministerio de Agricultura. Instituto Colombiano de Hidrología, Meteorología y Adecuación de tierras. Bogotá, D.C. 80-85.

Mathews, C.K; van Holde, K.E; Ahern, K.G. (2003) Bioquímica. Addison Wesley. 3^{era} edición. Madrid.

Ming So, C; Young, L.Y. (1999) Isolation and characterization of a sulfate-reducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2969-2976.

Mori, K; Kim, H; Kakegawa, T; Hanada, S. (2003) A novel lineage of sulfate-reducing microorganisms: Thermodesulfobiaceae fam. nov., *Thermodesulfobium narugense*, gen. nov., sp. nov., a new thermophilic isolate from a hot spring. *Extremophiles* 7(4):283–290.

Moussard, H; Haridon, S.L; Tindall, B.J; Banta, A; Schumann, P; Stackebrandt, E; Reysenbach, A.L; Jeanthon, C. (2004) *Thermodesulfator indicus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic chemolithoautotrophic sulfate-reducing bacterium isolated from the Central Indian Ridge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 227–233.

Nakagawa, T; Hanada, S; Maruyama, A; Marumo, K; Urabe, T; Fukui, M. (2002) Distribution and diversity of thermophilic sulfate-reducing bacteria within a Cu-Pb-Zn mine (Toyoha, Japan). *FEMS Microbiol. Ecol* 41: 199-209.

Navarro, S; Navarro, G. (2000) Química Agrícola. Ed. Mundi Prensa. Madrid, España.

Nuroura, T; Oida, H; Miyazaki, M; Suzuki, Y; Takai, K; Horikoshi, K. (2006) *Marinitoga okinawensis* sp. Nov., novel thermophilic and anaerobic heterotroph isolated from a deep-sea hydrothermal field, Southern Okinawa through. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:467-471.

Ollivier, B; Cord-Ruwisch, R; Hatchikian, E.C; Garcia, J.L. (1988) Characterization of *Desulfovibrio fructosovorans* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 149: 447-450.

Oude-Elferink, S.J.W.H; Maas, R.N; Harmsen, H.J.M; Stams, A.J.M.(1997). *Desulforhabdus amnigenus* gen. nov., sp. nov., a sulfate reducer isolated from anaerobic granular sludge. *Arch. Microbiol.* 164: 119-124.

Oude-Elferink, S.J.W.H; Akkermans-van Vliet, W.M; Bogte, J.J; Stams, A.J.M.(1999). *Desulfobacca acetoxidans* gen. nov., sp. nov., a novel acetate-degrading sulfate reducer isolated from sulfidogenic granular sludge. *Int. J. Syst. Microbiol.* 49:345-350.

Patel, B.K.C; Morgan, H.W; Daniel, R.M. (1985) *Ferriobacterium nodosum* gen. nov. and spec. nov., a new chemoorganotrophic, caldophilic, anaerobic bacterium. *Arch. Microbiol.* 141: 63-69.

Patel, B.K.C; Monk, C; Littleworth, H; Morgan, H.W; Daniel, R.M. (1987) *Clostridium fervidus* sp. nov., a new chemoorganotrophic acetogenic thermophile. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:123-126.

Pentecost, A. (2005). Hot springs, thermal springs and warm springs. What's the difference?. *Geology Today.* 21(6): 222-224

Pikuta, E.V; Zhilina, T.N; Zavarzin, G.A; Kostrikina, N.A; Osipov, G.A; Rainey, F.A. (1998). *Desulfonatronum lacustre* gen. nov., sp. nov.; a new alkaliphilic sulfate-reducing bacterium utilizing ethanol. *Mikrobiologiya.* 67:123-131.

Pikuta, E; Cleland, D; Tang, J. (2000a) Aerobic growth of *Anoxybacillus pushchinensis* K1T: emended descriptions of *A. pushchinensis* and the genus *Anoxybacillus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:1561-1562.

Plugge, C.M; Zoetendal, E.G; Stams, A.J. (2000) *Caloramator coolhaasii* sp. nov., a glutamate-degrading, moderately thermophilic anaerobe. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:1155-1162.

Poli, A; Esposito, E; Lama, L; Orlando, P; Nicolaus, G; de Appolonia, F; Gambacorta, A; Nicolaus, B. (2006) *Anoxybacillus amylolyticus* sp. nov., a thermophilic amylase producing bacterium isolated from Mount Rittmann (Antarctica). *Syst. Appl. Microbiol.* 29:300-307.

Posada, Y; Pachon, L; Agudelo, A; Alvarez, E; Díaz C; Fardeau, M. L; Joulian, C; Ollivier, B; Baena, S. (2004) Cuantificación, aislamiento e identificación de comunidades anaerobias amilolíticas de un manantial termomineral de Paipa (Boyacá). *Revista Colombiana de Biotecnología.* 6(2): 90-100.

Postec, A; Le Breton, C; Fardeau, M.L; Lesongeur, F; Pignet, P; Querellou, J; Ollivier, B; Godfroy, A. (2005) *Marinitoga hydrogenitolerans* sp. nov., a novel member of the order Thermotogales isolated from a black smoker chimney on the Mid-Atlantic Ridge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:1217-1221.

Rabus, R; Nordhaus, R; Ludwing, W; Widdel, F.(2000) Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1444-1451.

Rabus, R; Hansen, T. A; Widdel, F. (2006) Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. *Prokaryotes*. 2:659–768.

Rainey, F.A; Ward, N.L; Morgan, H.W; Toalster, R; Stackebrandt, E. (1993) Phylogenetic Analysis of Anaerobic Thermophilic Bacteria: Aid for Their Reclassification. *J. Bacteriol.* 175:4772-4779.

Rees, G.N; Grassia, G.S; Sheehy, A.J; Dwivedi, P.P; Patel, B.K.C. (1995) *Desulfacinum infernum* gen. nov., sp. nov., a Thermophilic Sulfate-Reducing Bacterium from a Petroleum Reservoir. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45(1): 85-89.

Rees, G.N; Patel, B.K.C.(2001) *Desulforegula conservatrix* gen. nov., sp. nov., a long-chain fatty acid-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from sediments of a freshwater lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1911-1916.

Reysenbach, A.L; Rising, M. (2001) Thermophiles, origin of. *Encyclopedia of Biodiversity*. 5:647-654

Reysenbach, A.L; Götz, D; Yernool, D. (2002) Microbial diversity of marine and terrestrial thermal springs. *Biodiversity of Microbial Life*.

Roselló-Mora, R; Amann, R. (2005) The species concept for prokaryotes. *FEMS* 25: 39-67.

Rossi, M; Ciaramella, M; Cannio, R; Pisani, F.M; Moracci, M; Bartolucci, S. (2003). Extremophiles. *J. Bacteriol.* 185: 3683 - 3689.

Rozanova, E.P; Nazina, T.N.(1976). A mesophilic, sulfate-reducing, rod-shaped nonspore-forming bacterium. *Mikrobiol.* 45:825-830.

Rozanova, E.P; Nazina, T.N; Galushko, A.S.(1988). Isolation of a new genus of sulfate-reducing bacteria and description of a new species of this genus, *Desulfomicrobium apsheronum* gen. nov., sp. nov. *Mikrobiol* 57:634-641.

Rozanova, E.P; Tourova, T.P; Kolganova, T.V; Lyserenko, A. M; Mityushina, L.L; Yusupov, S.K; Belyaev, S.S. (2001). *Desulfacinum subterraneum* sp. Nov., a New

Thermophilic Sulfate-Reducing Bacterium Isolated from a High-Temperature Oil Field. *Microbiology* 70(2): 466-471.

Schlegel, H.G; Jannasch, H.W. (2006) Prokaryotes and Their Habitats. *Prokaryotes* 1:137–184.

Schleifer, K.H; Truper, H. G. (2006) Prokaryote Characterization and Identification. *Prokaryotes* 1:58-79.

Seyfried, M; Lyon, D; Rainey, F.A; Wiegel, J. (2002) *Caloramator viterbensis* sp. nov., a novel thermophilic, glycerol-fermenting bacterium isolated from a hot spring in Italy. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 52:1177-1184

Sharak, G.B.R; Mundfrom, G; Deveraux, R. (1994). Characterization of *Desulfomicrobium escambium* sp. Nov. and proposal to assign *Desulfovibrio desulfuricans* Norway 4 to the genus *Desulfomicrobium*. *Arch. Microbiol.* 161:215-219.

Sievert, S.M; Kuever, J. (2000) *Desulfacinum hydrotermale* sp.nov, a Thermophilic, sulfate- reducing bacterium from geothermally heated sediments near Milos Island (Greece). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 50: 1239-1246.

Slobodkin, A.I; Tourova, T.P; Kuznetsov, B.B; Kostrikina, N.A; Chernyh, N.A; Bonch-Osmolovskaya, E.A. (1999) *Thermoanaerobacter siderophilus* sp. nov., a novel dissimilatory Fe(III)-reducing, anaerobic, thermophilic bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:1471-1478.

Sonne-Hansen, J; Ahring, B.K.(1999). *Thermodesulfobacterium hveragerdense* sp. nov., and *Thermodesulfovibrio islandicus* sp. nov., two thermophilic sulfate reducing bacteria isolated from a Icelandic hot spring. *Syst. Appl. Microbiol* 4:559-564.

Stackebrandt, E; Schumann, P; Schüler, E, Hippe, H. (2003) Reclassification of *Desulfotomaculum auripigmentum* as *Desulfosporosinus auripigmenti* corrig., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:1439-1443.

Stackebrandt, E; Reysenbach A. L; Jeanthon, C. (2003) *Thermodesulfatator indicus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic chemolithoautotrophic sulfate-reducing bacterium isolated from the Central Indian Ridge. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 54: 227–233.

Stefan, M. Sievert; Kuever, J. (2000). *Desulfacinum hydrothermale* sp. nov., a thermophilic, sulfate-reducing bacterium from geothermally heated sediments near Milos Island. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 50:1239-1246.

Suzuki, D; Ueki, A; Amaishi, A; Ueki, K.(2007) *Desulfopila aestuarii* gen. nov., sp. Nov., a Gram-negative, rod-like, sulphate-reducing bacterium isolated from an estuarine sediment un Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:520-526.

Sylvia, D.M; Fuhrmann, J.J; Hartel, P.G; Zuberere, D.A (1998) Principles and Applications of Soil Microbiology. Ed. Prentice Hall Hispanoamericana, México.

Takal, K; Horikoshi, K. (2000) *Thermosipho japonicus* sp. nov., an extremely thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent in Japan. *Extremophiles.* 4: 9-17.

Tanaka, K; Stackebrandt, E; Tohyama, S; Eguchi, T.(2000). *Desulfovirba adipica* gen. nov., sp. nov., an adipate-degrading, Gram-negative, sulfate-reducing bacterium . *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:639-644.

Tee, W; Dyal, S. M; Woods, W; Eise, D. (1996) Probable New Species of *Desulfovibrio* Isolated from a Pyogenic Liver Abscess. *Journal of Clinical Microbiology.* 34:1760-1764.

Thevenieau, F; Baena, S; Fardeu, M.L; Casalot, L; Ollivier, B; Joulian, C. (2007a) Molecular Phylogenetic Exploration of Sulfate-Reducing Bacterium Diversity in a Colombian Hot Spring.

Thevenieau, F; Fardeau, M. L; Olliver, B; Joulian, C; Baena, S. (2007b) *Desulfomicrobium thermophilum* sp. Nov., a novel thermophilic sulphate-reducing bacterium isolated from a terrestrial hot spring in Colombia. *Extremophiles.* 295-303.

Trüper, H.G. (2003). Valid publication of the genus name *Thermodesulfobacterium* and the species names *Thermodesulfobacterium commune* (Zeikus *et al.*, 1983) and *Thermodesulfobacterium thermophilum* (ex *Desulfovibrio thermophilus* Rozanova and Khudyakova 1974). Opinion 71. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:927- 958

Urios, L; Cuff-Gauchard, V; Pignet, P; Postec, A; Fardeau, M.L; Ollivier, B; Barbier, G. (2004) *Thermosipho atlanticus* sp. nov., a novel member of the Thermotogales isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1953-1957.

Valero, M.V.G; Hulshoff, P; Lettinga, G; Lens, P.N.L. (2003) Effect of NaCl on thermophilic (55°C) methanol degradation in sulfate reducing granular sludge reactors. *Water Research*. 37:2269-2280.

Verbel, J.O; Restrepo, B.J. (2002). El lado gris de la minería del oro: La contaminación con mercurio en el norte de Colombia. Universidad de Cartagena. Alpha Impresores Ltda. Cartagena, Colombia.

Wery, N; Lesongeur, F; Pignet, P; Derennes, V; Cambon-Bonavita, M.A; Godfroy, A; Barbier, G. (2001a) *Marinitoga camini* gen. nov., sp. nov., a rod-shaped bacterium belonging to the order Thermotogales, isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:495-504.

Wery, N; Moricet, J.M; Cueff, V; Jean, J; Pignet, P; Lesongeur, F; Cambon-Bonavita, M.A; Barbier, G. (2001b) *Caloranaerobacter azorensis* gen. nov., sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1789-1796.

Windberger, E; Huber, R; Trincone, A; Fricke, H; and Stetter, K.O. (1992) *Thermotoga thermarum* sp. nov. and *Thermotoga neapolitana* occurring in African continental solfataric springs. *Arch. Microbiol.* 151: 506-512.

Yumoto, I; Hirota, K; Kawahara, T; Nodasaka, Y; Okuyama, H; Matsuyama, H; Yokota, Y; Nakajima, K; Hoshino, T. (2004) *Anoxybacillus vinovskiensis* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium from a hot spring in Kamtchatka. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1239-1242.

Zhilina, T.N; Zavarzin, G.A; Rainey, F.A; Pikuta, E.N; Osipov, G.A; Kostrikina, N.A. (1997). *Desulfonatronovibrio hydrogenovorans* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, sulfate-reducing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol* 47(1):144-149.

Zillig, W.; Stetter, K.O.; Prangishvilli, D.; Schäfer, W.; Wunderl, S.; Janekovic, D.; Holz, I.; Palm, P. (1982) *Desulfurococcaceae*, the second family of the extremely thermophilic, anaerobic, sulfur-respiring *Thermoproteales*. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig.*, 3: 304-317.

Recursos Electrónicos

platea.pntic.mec.es/~cmarti3/CTMA/BIOSFERA/s.htm [Consulta 16 ENE 2007]