

APLICACIÓN DE MÉTODOS DE CULTIVO NO CONVENCIONALES PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS HALÓFILAS Y TERMÓFILAS DE AMBIENTES EXTREMOS



MATEO MUÑOZ ÁNGEL

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para optar al título de:

MICROBIÓLOGO INDUSTRIAL

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL

FACULTAD DE CIENCIAS

Bogotá, D.C.

2018

APLICACIÓN DE MÉTODOS DE CULTIVO NO CONVENCIONALES PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS HALÓFILAS Y TERMÓFILAS DE AMBIENTES EXTREMOS

MATEO MUÑOZ ANGEL

Concepción Judith Puerta B. Ph.D

Decana de Facultad

Marcela Franco Correa Ph.D

Director de Carrera

APLICACIÓN DE MÉTODOS DE CULTIVO NO CONVENCIONALES PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS HALÓFILAS Y TERMÓFILAS DE AMBIENTES EXTREMOS

MATEO MUÑOZ ANGEL

Sandra Baena Garzón Ph.D

Director

Gina López Ph.D

Codirector

María Ximena Rodríguez B. Ph.D

Jurado

NOTA DE ADVERTENCIA

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

Artículo 23 de la Resolución No 13 de Julio de 1946.

AGRACEDIMIENTOS

A mi mamá y a mi abuela por educarme, criarme y darme las fuerzas que necesite para seguir adelante.

A mi familia por confiar en mí y por alentarme cada día a ser mejor.

A mi amigo Juan Pablo por ser mi apoyo durante toda la carrera y por enseñarme el buen trabajo en equipo.

A mis amigos Andrea, Dora, Luisa, Laura Camila y Sebastián por darme ánimos cuando los necesite y por seguir mis locuras.

A mi directora Sandra Baena y mi codirectora Gina López por su confianza, apoyo y seguimiento en este trabajo. Por ser un ejemplo del trabajo arduo y la gran recompensa que conlleva.

Al equipo de anaerobios por su compañía y apoyo durante el desarrollo de mi trabajo.

Al equipo de la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental por su apoyo y buena compañía durante mi trabajo allí.

A la profesora Janeth Arias y Marcela Franco por sus consejos, por siempre apoyarme, ayudarme en mi tiempo en la Facultad de Ciencias y por velar por mi bienestar y formación.

- Dedico este trabajo a mis hermanos menores Mariana y Santiago, por siempre ser mis pilares y lo que me motiva a ser mejor cada día -

“Enamórate, permanece enamorado y eso lo decidirá todo”

Pedro Arrupe S.J.

RESUMEN

El estudio de la biodiversidad es de gran importancia para conocer la variabilidad que existe en el mundo viviente. El análisis de los microorganismos y su papel en diferentes procesos metabólicos es necesario para entender cómo funcionan los ecosistemas; los inventarios biológicos son una herramienta clave para catalogar y estudiar los diferentes elementos de la biodiversidad. Sin embargo, hay problemáticas que interfieren en el desarrollo de estos estudios; la anomalía del conteo en placa limita a que un amplio número de especies microbianas no puedan ser aisladas de manera *in vitro*; algunas de las razones por las que sucede esto son que las células no encuentran las condiciones necesarias en un medio de cultivo para crecer, o que se ven dominadas por otras que presentan mayor facilidad para adaptarse a un medio sintético. El desarrollo de métodos no convencionales diferentes a los usados hasta ahora para el análisis de comunidades microbianas, ha sido una alternativa viable para permitir el crecimiento de estos microorganismos denominados “aún no cultivables”. Desde soportes celulares hasta bajas concentraciones de nutrientes y largos tiempos de incubación son algunas de las técnicas empleadas para favorecer medios que asemejen las condiciones *in situ* donde se encuentran los microorganismos objetivo.

En este trabajo se diseñó y evaluó un medio de cultivo (MC) con base a las características fisicoquímicas del manantial termal “Ojo del Diablo” (P3) ubicado en el municipio de Paipa, Boyacá; como control se utilizó un medio estándar directo (MD) y uno control R₂A (MR). Para el montaje se utilizaron dos fuentes de carbono, trehalosa y un Mix (acetato, formiato y citrato) a diferentes concentraciones (1,5mM, 5mM y 12mM), adicionalmente se realizó la evaluación de dos concentraciones de NaCl (0% y 3% p/v). De igual forma se aplicaron dos métodos no convencionales basados en soporte celular y doble encapsulamiento para favorecer un medio con las condiciones del punto de muestreo. Tanto diseño experimental del medio diseñado como los métodos aplicados incubados a 65°C por 4 semanas. Como resultado se obtuvieron 38 colonias, de los cuales 28 fueron purificados y aislados y 10 se encuentran en proceso debido al crecimiento de nuevas colonias en los pases para su purificación. De los 28 morfotipos aislados, se realizó la secuenciación e identificación basado en el análisis del gen 16S rRNA de 6, estos fueron clasificados como *Geobacillus stearothermophilus*, *Rhodothermus marinus* y *Rubrobacter taiwanensis* con un 99% de similitud. Finalmente, los métodos no convencionales, presentaron crecimiento en ambos casos. La purificación, aislamiento e identificación de los morfotipos que puedan contener, es un buen horizonte para la aplicación de estos métodos en la USBA para la obtención de nuevos morfotipos y la identificación de especies.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Ambientes extremos	3
2.1.1. Ambientes extremos en Colombia	4
2.1.2. Fuentes termales de Paipa	5
2.2. Microorganismos de ambientes extremos	5
2.2.1. Clasificación de microorganismos extremófilos	5
2.2.2. Microorganismos Halófilos	6
2.2.3. Microorganismos Termófilos	7
2.3. Métodos de cultivo	8
2.3.1. Métodos independientes de cultivo	8
2.3.2. Métodos dependientes de cultivo	9
2.4. Microorganismos aún no cultivables	10
3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
4. OBJETIVOS	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS	15
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
6.1. Diseño de Medio de Cultivo	24
6.1.1. Evaluación de Medio de Cultivo	25
6.2. Identificación taxonómica	32
6.3. Cámaras de Difusión	38
6.4. Perlas revestidas con polisulfona	40
6.4.1. Permeabilidad del revestimiento	42
7. CONCLUSIONES	44
8. REFERENCIAS	45
9. ANEXOS	57
9.1. Anexo 1. Análisis fisicoquímicos: Manantial termal “Ojo del Diablo” (P3)	57
9.2. Anexo 2. Reporte del crecimiento total en el esquema de trabajo luego de 4 semanas de incubación.	58

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación general de microorganismos extremófilos.....	6
Figura 2. Manantial salino Ojo del Diablo (P3), pozo principal	15
Figura 3. Recolección del agua P3 y raspado de rocas.....	15
Figura 4. Esquema de diseño experimental para la evaluación de la muestra del manantial termal “Ojo del Diablo” (P3).....	17
Figura 5. Montaje de cámaras de difusión en sedimentos del manantial P3	21
Figura 6. Perlas formadas, sin revestimiento de polisulfona	22
Figura 7. Perla con revestimiento de polisulfona.....	22
Figura 8. a) Medio MC previo a la siembra y b) medio con cristalización de sales por rápida evaporación del agua	26
Figura 9. Morfologías más observadas en las colonias obtenidas en los diferentes agares a) bacilos cortos, individuales, b) bacilos largos, delgados en roseta, c) bacilos gruesos, de varios tamaños, en cadena o parejas, d) bacilos cortos, delgados, individuales.	30
Figura 10. Árbol filogenético basado en el análisis del 16S rRNA, que muestra la ubicación de las cepas OMR1-45 y OMC4-R5 relacionada con la especie <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	32
Figura 11. Microscopia y tinción de Gram de la cepa OMR1-45 y OMC4-R5.....	32
Figura 12. Árbol filogenético basado en el análisis del 16S rRNA, que muestra la ubicación de la cepa 3MR1-312 relacionada con la especie <i>Rubrobacter taiwanensis</i>	34
Figura 13. Microscopia y tinción de Gram de la cepa 3MR1-312	35
Figura 14. Árbol filogenético basado en el análisis del 16S rRNA, que muestra la ubicación de las cepas 3MC1-315, 3MR2-R15 y 3MR4,1-315 relacionadas con la especie <i>Rhodothermus marinus</i>	36
Figura 15. Microscopia y tinción de Gram de las cepas 3MC1-315, 3MR2-R15 y 3MR4,1.315	37
Figura 16. Apertura de cámaras de difusión y extracción de discos de agar.....	38
Figura 17. Discos de agar extraídos y microscopía en fresco. Las flechas rojas muestran bacilos cortos con organización individual.....	38
Figura 18. Biopelícula en los filtros de policarbonato junto con el disco de agar y siembra por adhesión en medio sólido.	39
Figura 19. Corte transversal de las perlas revestidas con concentraciones de a) 10%, b) 15% y c) 20% de polisulfona	41
Figura 20. Tinción de Gram de agar extraído de perlas con revestimiento de polisulfona.	41
Figura 21. Curva de calibración de azul de metileno	42
Figura 22. Velocidad de difusión del azul de metileno en esferas revestidas con diferentes concentraciones de polisulfona.....	43

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de microorganismos halófilos (Weigiel, 1998)	6
Tabla 2. Clasificación de microorganismos termófilos (Weigiel, 1998)	8
Tabla 3. Técnicas de métodos cultivo-independientes.....	9
Tabla 4. Estabilidad de las condiciones fisicoquímicas del agua a través del tiempo	16
Tabla 5. Secuencia de los cebadores utilizados en la amplificación del gen 16S rRNA por reacción de PCR	19
Tabla 6. Composición de medio de cultivo diseñado (MC).....	24
Tabla 7. Resultados del número total de colonias en los diferentes medios evaluados.....	25
Tabla 8. Descripción de morfológica de colonias aisladas del montaje con Mix como fuente de carbono.....	27
Tabla 9. Descripción de morfológica de colonias aisladas del montaje con Trehalosa como fuente de carbono	28
Tabla 10. Descripción de las morfologías aisladas del montaje de cámaras de difusión.	39

ANEXOS

Anexo 1. Análisis fisicoquímicos: Manantial termal “Ojo del Diablo” (P3)	57
Anexo 2. Reporte de crecimiento por dilución y por fuente de carbono del esquema de trabajo luego de 4 semanas de incubación.....	58

1. INTRODUCCIÓN

Colombia es considerado uno de los territorios más biodiversos en el mundo, conteniendo alrededor del 10% de la biota total del planeta, albergada en 114.000.000 hectáreas que representan el 0.7% de la superficie continental mundial (Romero et al., 2008). Dentro de estas consideraciones y pese a los esfuerzos por generar inventarios de la biodiversidad y sus relaciones con los diferentes ecosistemas, no se ha dado relevancia a la diversidad microbiana de ambientes naturales. El estudio de los microorganismos es una de las áreas que debería tener más atención, debido a su papel en los ciclos biogeoquímicos y el ciclaje de nutrientes, igualmente, en procesos importantes como la regulación del cambio climático (DiGregorio, 2013), ya que participan en actividades como la captura de CO₂, la producción de metano u óxido nitroso. Debido a sus características metabólicas y a sus amplios procesos bioquímicos, los microorganismos han logrado colonizar la mayoría de los hábitats en la Tierra (Timmis et al., 2014).

Una de las grandes complicaciones para el estudio de la diversidad microbiana es conocida como “Great Plate Count Anomaly” o la anomalía del conteo en placa (Winterberg, 1898) en la cual se describe que solo una mínima proporción de células viables de las comunidades microbianas pueden crecer en medios de cultivo agarificados (Staley & Konopka, 1985). Del número existente de especies microbianas solo unas miles han sido aisladas (Allsopp et al., 1995). Aquellas que no, son consideradas como “no cultivables” debido a que requieren unas condiciones específicas para su crecimiento, las cuales son difícilmente replicables en un medio de cultivo, por ejemplo, la presencia de nutrientes específicos, o el nivel de oxígeno, la presencia y concentración de sales y micronutrientes, entre otros (Vartoukian et al., 2010). También, lograr aislar un microorganismo puede depender de la presencia de una o varias especies que coexisten en un mismo ambiente y que se están relacionadas por diferentes procesos metabólicos (ej., organismos sintróficos) (Blasco & Castillo, 2014).

A través de aproximaciones moleculares como la metagenómica, se ha obtenido una gran cantidad de información sobre la diversidad microbiana en diferentes ambientes, evidenciando que existe un elevado número de grupos filogenéticos que carecen de representantes aislados. Estos aislamientos son clave para entender tanto la fisiología del organismo como su rol en el ambiente en el cual vive (Tanaka et al., 2014), incluso permiten encontrar nuevas moléculas o procesos biológicos que podrían incidir en diferentes áreas de la biotecnología.

Para sobrepasar este tipo de problemas, la búsqueda y aplicación de nuevos métodos para el aislamiento de bacterias no cultivables o también llamadas “aún no cultivadas” ha aumentado. Enfocando sus esfuerzos en, la evaluación de nuevos sustratos y el desarrollo de soportes de fijación celular que asemejen las condiciones *in vivo* del ambiente donde habitan los aún no cultivados permitiendo el crecimiento de los mismos (Corning, 2010).

Por otro lado, también es necesario tener en cuenta el incremento en los tiempos de incubación combinado con la disminución en la concentración de nutrientes (Lewis et al., 2010), así como el uso y disponibilidad de componentes químicos de sus propios hábitats (Kaeberlein, 2002).

El estudio de los microorganismos cultivables y aún no cultivables es de gran importancia como ya se ha explicado. Particularmente, en Colombia se han hecho varios estudios de diversidad microbiana en diferentes ecosistemas del país, la gran mayoría se ha realizado por técnicas moleculares o cultivo-independiente los cuales han mostrado que existe una fracción no asociada a organismos cultivados o ya aislados (Bohorquez et al., 2012). En estudios previos realizados en la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental, para el análisis de la biodiversidad microbiana en ambientes extremos colombianos (salinas de Zipaquirá, manantiales termales de Risaralda, Calda y Boyacá) se emplearon herramientas moleculares, que permitieron observar la presencia de un gran número de organismos halotolerantes y halófilos que no han sido aislados (Días-Cárdenas, 2011). De igual manera, se reportó una alta diversidad de organismos termófilos e hipertermófilos que se relacionan con diferentes filos, pero que presentan pocos representantes cultivables (López et al., 2017). Por lo tanto, estos sitios han mostrado tener comunidades microbianas de gran interés para la aplicación y uso de nuevas técnicas que permitan recuperar estos microorganismos que aún no se han aislado. De acuerdo con lo anterior, este trabajo busca responder si mediante el uso de metodologías no convencionales es posible aislar un mayor número de microorganismos representantes de halófilos y termófilos cultivables del manantial termomineral “Ojo del Diablo” (Paipa – Boyacá).

2. MARCO TEÓRICO

El estudio de la biodiversidad se entiende como la observación de la variabilidad al interior del mundo viviente y puede expresarse según el nivel de organización biológica desde genes hasta ecosistemas que se encuentren en una porción geográfica de un territorio específico (Rangel - Ch., 2015). Para abordar el estudio de la biodiversidad se parte de los elementos y entidades que la componen, los inventarios biológicos son herramientas clave para llevar a cabo esto. Un inventario biológico está definido como aquel que documenta la distribución espacial de especies, poblaciones, comunidades u otros elementos biológicos (Kremen, 1992).

Dentro de los diversos ambientes presentes en la geografía mundial, se ha tenido un gran interés por los ambientes extremos lugares caracterizados por presentar condiciones hostiles. Debido a que la biodiversidad microbiana de estos ambientes es amplia y que se ha visto que los organismos que allí habitan tienen la capacidad de sintetizar moléculas capaces de funcionar bajo condiciones extremas, han abierto un prometedor panorama en la biotecnología (Martinez et al., 2016; Oliart-Ros et al., 2016). Sin embargo, sus condiciones ambientales extremas conllevan un reto en su intervención para investigar más a fondo su metabolismo y para su aporte a los inventarios biológicos.

2.1. Ambientes extremos

Hasta hace unos años se creía que la vida sólo podía existir en un limitado número de ambientes, sin embargo, con el desarrollo de nuevas tecnologías y la aplicación de nuevos métodos para el análisis de la diversidad biológica, se determinó la presencia de diferentes organismos en lugares inhabitables para el hombre como los denominados ambientes extremos. Los organismos que habitan y crecen de manera óptima bajo estas condiciones son conocidos como *extremófilos*; estas condiciones pueden ser físicas como la temperatura y la presión atmosférica o químicas como el pH, la salinidad y/o compuestos tóxicos, o incluso en altos niveles de radiación (Castillo & Roldán, 2005).

Existe una amplia variedad de ambientes extremos, pueden identificarse lugares con bajas temperaturas como los hielos polares y alpinos, lagos de la Antártida y suelo oceánico. O con altos valores de temperatura como desiertos, lechos volcánicos, aguas termales y fumarolas terrestres o marinas. Y otros con diferentes características como lagos alcalinos, afluentes ácidos (López-Cortés et al., 2015; Ramírez, 2018). Marion y colaboradores (2003) describen que la superficie y hielos explorados en el planeta Marte o los satélites naturales Titán y Europa presentan condiciones extremas que darían esa cualidad a los posibles organismos allí presentes.

Algunos hábitats antropogénicos pueden considerarse también como un tipo de ambiente extremo, entre estos se encuentran lugares con altos niveles de radiación, como los reactores nucleares o los tiraderos de desechos químicos tóxicos, las pilas de compostaje de residuos domiciliarios o efluentes termales de plantas eléctricas entre otros (Burgess et al., 2017; Ramírez, 2018).

2.1.1. Ambientes extremos en Colombia

En Colombia desde 1992 se ha ahondado en la formación de un inventario fundamentado en la creación de bases de datos que permiten dilucidar la situación actual del país en cinco ejes temáticos: la vegetación, la flora, la fauna, el clima y los ecosistemas, dando pie a que se reconozca como un centro de megabiodiversidad que a su vez permite intuir la presencia de un perfil igualmente megadiverso en la población de microorganismos (Rangel-Ch, 2015).

Dentro del territorio colombiano se logran encontrar ambientes extremos con diferentes condiciones climáticas, ambientes secos como el desierto de la Tatacoa (Huila) y el desierto de la Guajira (Guajira); hipersalinos como la caverna del Edén (Tolima) y salinas terrestres como la mina de sal (Zipaquirá) o acuáticas como manantiales (Boyacá); con bajas temperaturas como los nevados (Caldas); entre otros varios (Rangel, 2011). Todos estos presentan características específicas tales como elevadas o bajas temperaturas y concentraciones de sal, bajas concentraciones de oxígeno o incluso elevados niveles de pH, factores que les puede atribuir el nombre de ambiente inhóspito (Castillo-Carvajal & Barragán-Huerta, 2011).

Algunos de los estudios realizados en ambientes extremos colombianos incluyen investigaciones en manantiales salinos de Risaralda y Boyacá donde se logró aislar nuevas especies de bacterias halófilas capaces de sintetizar enzimas hidrolíticas (Díaz-Cárdenas, 2011), otro realizado con muestras provenientes del mar de San Andrés y del humedal Cintura de la Cuenca del río San Jorge en Córdoba donde se encontraron microorganismos capaces de capturar sodio *in vitro* como una alternativa en procesos de biorremediación (Sanchez & Arguello, 2006) y uno más evaluando la producción de biosurfactantes por parte de *Geobacillus* H20VP3 una bacteria termófila aislada de aguas en Villapinzón, Cundinamarca (Niño & Dussan, 2013) entre otros varios.

2.1.2. Fuentes termales de Paipa

El municipio de Paipa se encuentra en el Departamento de Boyacá, en la región central de la Cordillera Oriental, sobre el altiplano Cundiboyacense. Alfaro (2005) determinó que el sistema geotérmico del municipio está integrado por 22 manantiales termales distribuidos al sur del casco urbano, en una línea recta que abarca 7 km. Su ubicación se encuentra concentrada en dos zonas principales: La Playa y el Hotel Lancersos.

Estos manantiales presentan temperaturas de hasta 77°C, tiene un rango de pH entre 3.6 y 7.4 y una concentración de NaCl de entre 0.05 y 56 g/L que junto con otros compuestos les atribuye una elevada concentración de sales comparada con otros en el territorio nacional (Alfaro, 2005) características que los hace de gran interés para su estudio.

2.2. Microorganismos de ambientes extremos

Los microorganismos extremófilos tienen como hábitat natural ambientes que antiguamente se consideraban hostiles para permitir la supervivencia de organismos vivos. Se clasifican en base a la condición física o química extrema del ambiente donde se desarrollan (Oliart-Ros et al., 2016). Estas condiciones son características de varios ambientes terrestres y acuáticos, y se pueden nombrar ambientes inusuales (Stan-Lotter, 2017).

En el caso de Martínez y colaboradores (2016) son extremófilos aquellos microorganismos que para su crecimiento óptimo requieren de valores extremos de factores físicos y químicos que se consideran desfavorables para la mayoría de los organismos. Estos valores pueden ser desde temperaturas por debajo de los 10°C y por encima de los 50°C, a una presión mayor a 1 atm, en pH por debajo de 5.0 y por encima de 8.0 o a concentraciones de sal mayores a 30 g/L. Una gran parte de los extremófilos que han sido identificados pertenecen al dominio de Archaea, sin embargo, recientemente han sido identificados y caracterizados muchos extremófilos del dominio Bacteria (Van den Burg, 2003). La biodiversidad se ve reflejada en la facultad de los microorganismos para adaptarse a ciertas condiciones y así lograr colonizar diversos ambientes (Stetter, 1999).

2.2.1. Clasificación de microorganismos extremófilos

Estos microorganismos se han convertido un grupo importante de estudio debido al gran interés por conocer sus mecanismos de adaptación celular, así como sus posibles usos en la biotecnología ahondando en el campo de las extremozimas (Morozkina et al., 2010).

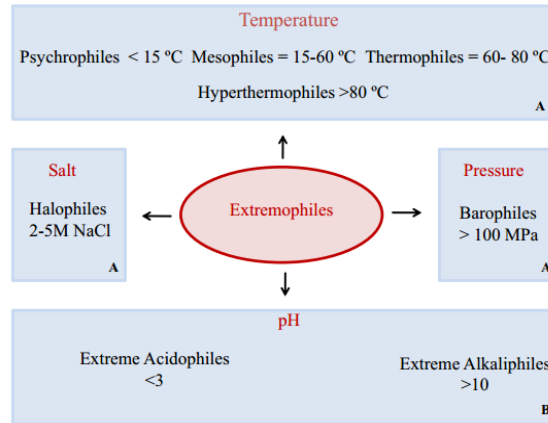


Figura 1. Clasificación general de microorganismos extremófilos (Rothschild & Mancinelli, 2001; Krulwich et al., 2011)

La clasificación de los extremófilos se basa en la condición extrema bajo la cual estén sometidos y de las cuales se constituyen varios grupos fisiológicos incluyendo, pero no limitando a los termófilos, psicrófilos, halófilos, acidófilos, alcalófilos y barófilos (Rampelotto, 2013; Seckbach et al., 2013).

2.2.2. Microorganismos Halófilos

Los microorganismos halófilos son considerados amantes de la sal, el término proviene del griego *hals* (sal) y *phil* (afín), que etimológicamente significa “amigo, amante de la sal”, y se definen técnicamente como aquellos con la capacidad de balancear la presión osmótica del ambiente y de resistir los efectos de la denaturación, como la co-agregación de proteínas, por la elevada concentración de sal en el medio (Kanekar et al., 2012). Estos organismos procariotas son probablemente consecuencia de una adaptación evolutiva de formas bacterianas más convencionales que vivieron bajo las condiciones de la Tierra primitiva, en lugar de ser una rama fundamental del árbol evolutivo (Kates, 1992; Woese, 1993).

Tabla 1. Clasificación de microorganismos halófilos (Weigiel, 1998)

Clasificación	Concentración de NaCl % (p/v)
Halófilos Tolerantes	$2\% \leq \text{NaCl} \leq 5\%$
Halófilos Moderados	$5\% \leq \text{NaCl} \leq 20\%$
Halófilos Extremos	$20\% \leq \text{NaCl} \leq 30\%$

La clasificación para los microorganismos halófilos se basa en la concentración de sal donde presentan un óptimo crecimiento (Schneegurt, 2012), puede variar dependiendo del autor fundamentado en las categorías que se establezcan. Weigel (1998) (Tabla 1) los separa en tres grupos principales

Dentro de los microorganismos procariontes halófilos se encuentran bacterias y arqueas, los cuales presentan varios grupos que han sido objeto de estudio a nivel taxonómico y bioactivo o de potencial biotecnológico (Kanekar et al., 2012). Estos microorganismos tienen unos requerimientos tanto nutricionales como ambientales que deben cumplir para su crecimiento por lo que es difícil encontrar verdaderos halófilos extremos cultivables (Mata, 2006).

2.2.2.1. Mecanismos de adaptación de halófilos

La adaptación consiste en equilibrar la presión osmótica de manera interna y externa manteniendo la estructura celular y sus funciones metabólicas. Actualmente se conocen dos estrategias principales que son utilizadas por los microorganismos con el fin de equilibrar osmóticamente su citoplasma con el medio que les rodea (León et al., 2014):

La primera es conocida como "*Salt-in*", consiste en la acumulación de sales inorgánicas en el citoplasma, principalmente KCl (Deole et al., 2013); es más común halófilas extremas aerobias y algunas bacterias halófilas anaerobias (Madigan & Oren, 1999; Yin et al., 2015; Rekadwad & Khobragade, 2017). La segunda estrategia fue nombrada "*Salt-out*" y consiste en la expulsión de sales desde el citoplasma al exterior celular, y la acumulación en el interior de la célula de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, altamente solubles en agua y cuyas propiedades fisicoquímicas los hacen compatibles con la fisiología y bioquímica celular (Widderich et al., 2014). Algunos de estos son la glicina betaína, la ectoína, la hidroxiectoína, carbohidratos como la trehalosa y la sacarosa (Regev et al., 1990), aminoácidos como prolina, glutamina, polioles como glicerol y arabitol y muchos otros (Edbeib et al., 2016).

2.2.3. Microorganismos Termófilos

Los microorganismos termófilos son un grupo de microorganismos caracterizados por presentar crecimiento a temperaturas que oscilan entre 45°C y 80°C (Oliart-Ros et al., 2016). Un amplio grupo son anaerobios debido a que la solubilidad del oxígeno disminuye con el aumento de temperatura (Brown, 1990). Se les ha brindado diversas clasificaciones; Weigel (1998) (Tabla 2.) los divide en tres grupos:

Tabla 2. Clasificación de microorganismos termófilos (Weigiel, 1998)

Clasificación	Mínimo	Óptimo	Máximo
Termófilos	-	> 50°C	> 60°C
Termófilos Extremos	> 35°C	> 65°C	> 70°C
Hipertermófilos	> 60°C	> 80°C	> 85

Estos microorganismos han ganado importancia debido a sus potenciales aplicaciones en la industria y en el ambiente. En biotecnología, el descubrimiento de biomoléculas resistentes a altas temperaturas, como la *Taq* polimerasa (*Thermus aquaticus*) y las proteínas de unión a cadena sencilla de DNA (SSB) (*Thermus thermophilus*) ambas usadas en la reacción de PCR, han sido de gran ayuda para el estudio del material genético (Dąbrowski et al., 2002). También se ha encontrado que pueden sintetizar biopolímeros fáciles para su biodegradación, regulando la contaminación medio ambiental (Danis et al., 2015).

2.2.3.1. Mecanismos de adaptación de termófilos

Las estrategias empleadas por los termófilos se basan en la estructura, función y metabolismo celular (Stetter, 1999). Su membrana celular es rica en lípidos saturados, poseen proteínas con mayor estabilidad por la gran cantidad de enlaces covalentes e interacciones hidrofóbicas. Además, tienen enzimas termorresistentes, lo que les ayuda a trabajar en condiciones extremas; unas destacadas son las chaperoninas, encargadas del plegamiento de las proteínas luego de posibles desnaturalizaciones para reconstruirlas y restaurar sus funciones (Haki & Rakshit, 2003; Oliart et al., 2016).

2.3. Métodos de cultivo

2.3.1. Métodos independientes de cultivo

Los enfoques moleculares dirigidos a finales de 1990 respondieron a la necesidad de abrir nuevas fronteras para la comprensión de la biodiversidad microbiana, solventando varios de los problemas inherentes presentados por los sistemas de identificación fenotípica. Estos nuevos métodos nombrados independientes de cultivo son capaces de detectar e identificar microorganismos directamente en un ambiente sin necesidad de cultivarlos y aislarlos, ya que se fundamentan en la descripción genotípica de los mismos basada en el análisis de ADN o ARN. (Beldarraín et al, 2011).

Este tipo de metodología consisten en la extracción de los ácidos nucleicos directamente de las muestras para posteriormente ser analizados por técnicas capaces de definir cuántas

y cuáles son las especies microbianas presentes, de igual forma específicamente con el ARN es posible entender cuáles son las partes metabólicamente activas de una población específica (Cocolin et al., 2011).

El principio de la identificación cultivo-independiente es la utilización de genes como dianas moleculares en los distintos géneros y especies, esto se representa en un estudio taxonómico o de la filogenia de los organismos (Stackebrandt & Goebel, 1994; Bou et al., 2011). En la Tabla 3 se describen algunas de las técnicas cultivo-independientes.

Tabla 3. Técnicas de métodos cultivo-independientes

Técnica	Descripción	Referencia
PCR	Amplificación de fragmentos de la secuencia de ADN, con genes específicos de interés.	Mueller & Wold, 1989
Tinción Fluorescente	Uso de colorantes fluorescentes que se unen a estructuras celulares y permite la diferenciación de viables y no viables	Millard et al., 1997
Hibridación Fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	Unión de sondas de ADN marcadas con un fluorocromo con fragmentos de ADN o ARN del microorganismo	Sohier & Lonvaud-Funel, 1998
Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) o (TGGE)	Separación de productos de PCR con igual tamaño pero diferente secuencia, obtención de “huellas digitales”	Huys et al., 2008
Análisis por Impedancia	Medición de la actividad metabólica de manera indirecta por la modificación de la conductividad del medio de cultivo.	Bobet et al., 2004

2.3.2. Métodos dependientes de cultivo

Son los métodos clásicos y más utilizados en la práctica puesto que su realización y coste los hace más accesibles, estos se basan en un medio sintético con agar donde se pueden realizar recuentos de microorganismos y determinar la diversidad de una muestra y su morfotipo (Cocolin et al., 2011). Los medios sintéticos son elaborados a partir de una gran diversidad de sustratos e incubados con condiciones específicas que cumplen los requerimientos básicos para el crecimiento microbiano como: disponibilidad de nutrientes, consistencia del medio (líquido, semisólido y sólido), presencia o ausencia de oxígeno, humedad, luz, pH y temperatura (Koneman & Stephen, 2008). Adicionalmente son clasificados según su composición y utilización.

Algunas de las categorías son medios: nutritivos, enriquecidos, selectivos, inhibidores, diferenciales, de identificación y de multiplicación entre otros. Debido a todas estas características se puede realizar una identificación basados en las características fenotípicas u «observables» de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas (Prince, 2014).

Se han encontrado cada vez más desventajas, una de las principales es la imposibilidad de llegar a tener una visión precisa de la biodiversidad en ecosistemas complejos. Esto puede ser debido a que el crecimiento en medios somete a la microbiota de las muestras a cambios, debido a la capacidad de ciertas especies de dominar el entorno y superar metabólicamente a los otros acompañantes microbianos; esto genera que las poblaciones numéricamente menos importantes, o en condiciones de estrés no puedan ser recuperadas e identificadas en la mayoría de los casos (Hugenholtz et al., 1998; Prince, 2014).

En un caso de cultivo dependiente si se tiene la presencia de células viables, aquellas capaces de replicarse y tener actividad metabólica; es posible generar colonias sobre un medio de cultivo. No obstante, si se presentan condiciones ambientales poco optimas, la célula opta por un mecanismo de supervivencia manteniendo la actividad metabólica, pero evitando la replicación y por lo tanto permaneciendo viable, pero sin crecer y formar colonias, por lo que se considera “no cultivable” (Van Zandycke et al., 2003).

2.4. Microorganismos aún no cultivables

En el estudio de los microorganismos es de gran importancia lograr aislar a los individuos en medios de cultivo para poder realizar un análisis detallado de la fisiología y de las características fenotípicas que estos puedan poseer. Sin embargo, mediante los métodos convencionales como las técnicas tanto dependientes como independientes de cultivo, se ha concluido que lograr tener un representante cultivado es una condición que ha demostrado no poderse ser cumplido por todos los microorganismos.

Actualmente se ha descrito que tan solo el 1% de las bacterias presentes en la Tierra pueden ser cultivadas de manera in vitro. La razón encontrada es principalmente la “Great Plate Count Anomaly” o la anomalía del conteo en placa (Winterberg, 1898); esta dice que al observar una muestra fresca directo al microscopio, solo una pequeña fracción de lo observado es posiblemente recuperada en con medio de cultivo (Hugenholtz et al., 1998; Youssef et al., 2015).

Las razones por las cuales estos microorganismos no pueden crecer en un medio de cultivo son variadas, una de las principales es que los nutrientes que requieren no pueden estar presentes en un medio artificial o que no se encuentran en la forma o estructura en la cual son asimilados in vivo en el ambiente. También se conoce que en algunos casos las bacterias

prefieren vivir naturalmente en biopelículas de múltiples especies donde hay una relación de cooperación y comunicación entre las mismas (sintrofia) (Thompson et al., 2015). Estas, junto con otras condiciones han generado la búsqueda de nuevas metodologías que pueden favorecer el crecimiento de estos microorganismos basándose en asemejar de manera cercana las condiciones de los ambientes que se analizan.

2.5. Métodos de cultivo no convencionales

Los métodos de cultivo no convencionales son las nuevas tecnologías o técnicas para lograr obtener representantes de los aún no cultivados. El principal eje de trabajo de este desarrollo está centrado en simular los ambientes donde se encuentran los microorganismos. Aunque sea difícil replicar un ambiente en su totalidad, si es posible conocer cuál de los parámetros es importante para el crecimiento de un determinado microorganismo de ese entorno (Stewart, 2012).

La mayoría de los medios de cultivo usados son ricos en nutrientes. Ahora se piensa que estas condiciones pueden favorecer el crecimiento de bacterias de crecimiento más rápido a expensas de las especies de crecimiento lento, algunas de las cuales prosperan en ambientes pobres en nutrientes. Es por lo que un primer acercamiento es la reducción de la concentración de nutrientes en los medios. Adicionalmente ya que se busca favorecer las células de lento crecimiento, aumentar los tiempos de incubación ha demostrado ser efectivo en recuperar colonias nuevas, luego de la muerte progresiva de las de rápido crecimiento; esto disminuye la competencia microbiana (Vartoukian et al., 2010).

Los soportes celulares como microgotas, cámaras de difusión o doble encapsulamiento celular; la separación física de las células para evitar la competencia e inhibición por sustrato, incluso realizar el proceso de esterilización en autoclave de los fosfatos y el agar por separado, durante la preparación de un medio de cultivo, son las principales investigaciones en la búsqueda de ambientes artificiales que simulen las condiciones *in vivo* (Nichols et al., 2010; Tanaka et al., 2014).

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3.1. Planteamiento del problema

El estudio de la biodiversidad ha avanzado a través del tiempo, la anomalía del conteo en placa es uno de los grandes inconvenientes en la recuperación y aislamiento de nuevos grupos filogenéticos para su identificación. Esto fue corroborado a través de técnicas independientes de cultivo, mediante las cuales se observó que, dentro de las comunidades microbianas existentes, todavía hay un grupo amplio que no cuenta con representantes aislados en cultivo, denominados microorganismos aún no cultivables.

El uso de nuevas metodologías no convencionales que permitan asemejar las condiciones *in vivo* de los ambientes, han sido desarrolladas y aplicadas en los últimos años. Particularmente, el análisis de los ambientes extremos se ha realizado en diferentes lugares a lo largo del territorio colombiano.

La Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) de la Pontificia Universidad Javeriana ha realizado estudios de la biodiversidad de halófilos y termófilos en manantiales termales del municipio de Paipa, Boyacá. El aislamiento e identificación a través de métodos dependientes e independientes de cultivo ha permitido obtener un amplio número de especies. Sin embargo, se ha reportado que en los resultados obtenidos en las últimas investigaciones se están aislando los mismos grupos filogenéticos ya adscritos, con especies aisladas e identificadas dentro del laboratorio. Adicionalmente de los grupos adscritos se ha podido identificar, mediante técnicas moleculares, una gran variedad de géneros que aún no presentan un aislamiento.

3.2. Justificación

El desarrollo de métodos de cultivo no convencionales es un nuevo aporte a las técnicas previamente utilizadas por la USBA, para el aislamiento y la identificación de halófilos y termófilos de manantiales termales en el municipio de Paipa Boyacá. El diseño de soportes celulares que permitan simular las condiciones nutricionales y naturales de estos ambientes puede favorecer la obtención de representantes aun no aislados o incluso nuevos de filos ya reportados. De igual forma el desarrollo de medios de cultivo que mantengan las condiciones fisicoquímicas del punto de muestreo, combinado con bajas concentraciones de suplementos nutricionales y largos tiempos de incubación, puede permitir encontrar microorganismos de crecimiento lento que no presenten reportes fenotípicos previos.

El estudio de estos extremófilos puede generar un desarrollo en la investigación de sus características fisiológicas y metabólicas, permitiendo confirmar la información obtenida a través de técnicas moleculares. Además, podrá aportar al inventario de la biodiversidad en ambientes extremos presentes a lo largo del territorio nacional, y permitiría ampliar el

estudio del potencial biotecnológico; particularmente para los microorganismos halófilos y termófilos se han demostrado un gran potencial en el tema de las extremozimas y biopolímeros (Eichler, 2001; Margesin & Schinner, 2001).

En este contexto el presente trabajo evaluó el uso de metodologías ya descritas como no convencionales para el aislamiento e identificación de bacterias halófilas y termófilas del manantial salino “Ojo del Diablo” en Paipa, Boyacá.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Aplicar metodologías no convencionales para el aislamiento e identificación de bacterias halófilas y termófilas de un termal salino en Paipa, Boyacá.

4.2. Objetivos específicos

- Diseñar y evaluar un medio de cultivo con base en las características presentes en los ambientes de muestreo para obtener y aislar bacterias halófilas y termófilas del manantial termal “Ojo del Diablo” en Paipa, Boyacá.
- Identificar taxonómicamente las bacterias aisladas usando el marcador molecular 16S rRNA.
- Evaluar el uso de dos métodos no convencionales que simulen las condiciones *in situ* del ambiente de muestreo para favorecer el crecimiento de bacterias halófilas y termófilas del manantial termal “Ojo del Diablo” en Paipa, Boyacá.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Ubicación

Las muestras utilizadas para el desarrollo de este estudio fueron recolectadas en un manantial salino que alimenta el termal del “Hotel Lanceros Colsubsidio” en el municipio de Paipa perteneciente a la provincia de Tundama en el departamento de Boyacá; esta fuente termal es denominada Ojo del Diablo (P3) (Figura 2). Posteriormente fueron transportadas al laboratorio de la Unidad de la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) de la Pontificia Universidad Javeriana para su procesamiento.



Figura 2. Manantial salino Ojo del Diablo (P3), pozo principal

5.1.1. Muestreo

Para la recolección en el manantial Ojo del Diablo (P3) se utilizaron garrafas plásticas que fueron llenadas y selladas, adicionalmente se recolectaron sedimentos del lecho del pozo, y se realizó un raspado de las rocas sumergidas en el termal usando instrumentos estériles (Figura 3), de igual manera se realizó la medición del pH (6.9) y temperatura (70°C) inicial. Todas las muestras fueron marcadas y transportadas a la USBA para su procesamiento.



Figura 3. Recolección del agua P3 y raspado de rocas

Las muestras fueron conservadas en incubadora a 65°C manteniendo de cerca las condiciones *in situ* y el crecimiento del inóculo, el mayor tiempo posible para el desarrollo de las metodologías.

5.1.2. Análisis fisicoquímico

A partir de las mediciones de las características fisicoquímicas del agua proveniente del manantial termal “Ojo del Diablo” (Anexo 1), se tuvieron presentes la cantidad de micro y macronutrientes para el diseño del medio de cultivo. De igual manera, como referencia control sobre la estabilidad del agua, se compararon los resultados del análisis fisicoquímico obtenidos frente a los reportados en estudios previos, observando especialmente el comportamiento de la temperatura, el pH, los sulfatos, el potasio y el sodio, que aumentaron considerablemente (Tabla 4.)

Tabla 4. Estabilidad de las condiciones fisicoquímicas del agua a través del tiempo

Año	1987	1989	2002	2005	2009	2012	2014	2018
T°	72,5	74	68,1	65	70,7	69,4	72,4	70
pH	6.8	6.9	7.0	6.9	6.9	6.8	6.8	6.9
SO₄ (mg/L)	18200	18400	19250	17854	15820	18864	19428	32300
K⁺ (mg/L)	2900	1200	1562	1428	1320	1530	1450	25550
Na⁺ (mg/L)	12500	11000	12375	12560	12400	14320	12000	30954

*Datos obtenidos del Inventario Nacional de Manifestaciones Hidrotermales (SGC)

5.2. Diseño de medio de cultivo por componentes (MC)

Para el diseño del medio de cultivo por componentes (MC) se tuvieron presentes las condiciones del lugar de muestreo de acuerdo con el análisis fisicoquímico, tanto en concentración de los elementos como en la temperatura del ambiente. Mediante relaciones estequiométricas se calculó la cantidad de reactivo necesario para agregar las concentraciones reportadas de cada elemento, evitando la sobresaturación y precipitación de sales que pudiesen conllevar a la inhibición del crecimiento celular.

5.2.1. Evaluación de fuentes de carbono

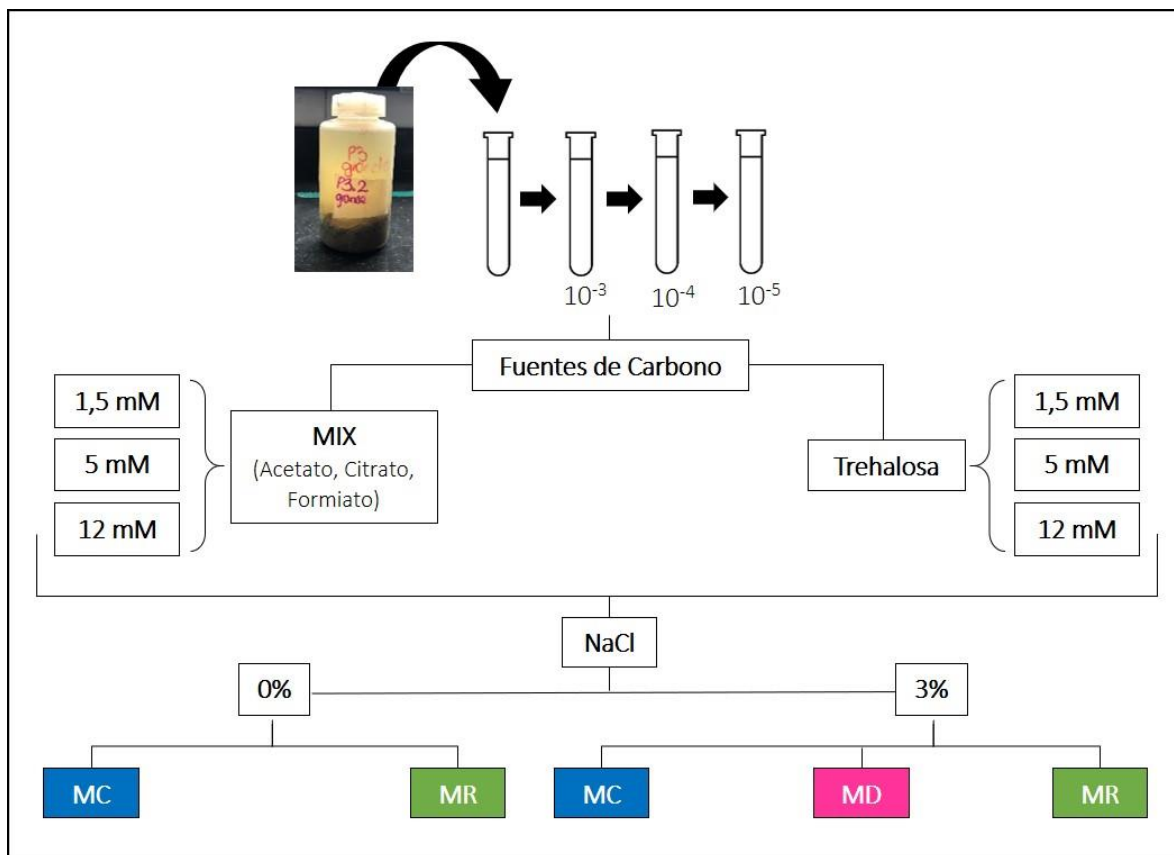
Para la evaluación del medio de cultivo diseñado (MC) se utilizó como fuente de carbono la trehalosa y una mezcla de acetato, citrato y formiato (Mix). Ambas fueron suplementadas en los medios de cultivo a diferentes concentraciones, de 1.5 mM, 5 mM y 12 mM; favoreciendo la baja concentración de nutrientes, de acuerdo con lo reportado para los microorganismos objetivo (Davis et al., 2005).

5.2.2. Medio estándar directo y de control R₂A

Como medios control se utilizaron, un medio directo (MD) evaluado previamente en estudios de la USBA para microorganismos de manantiales termales, y que consiste en la mezcla de agua del manantial P3 y agar noble al 15% (p/v) (Díaz-Cárdenas y Baena, 2015). Y el medio por componentes R₂A (MR) desarrollado para el recuento bacteriano en aguas tratadas, ya que debido a su bajo contenido nutricional y mediante una incubación prolongada, estimula el desarrollo de bacterias estresadas, de crecimiento lento. Ambos medios fueron igualmente suplementados con las dos fuentes de carbono evaluadas, en las diferentes concentraciones.

5.2.3. Diseño experimental

A partir de las muestras se realizaron diluciones seriadas con base 10 hasta 10⁻⁵ en agua esterilizada en autoclave, del manantial P3. Se procedió a sembrar por superficie 0,1 mL de las diluciones 10⁻³ a 10⁻⁵ por triplicado en MC, por duplicado en MD y en un medio R₂A (Figura 4).



*MC: Medio por componentes; MD: Medio estándar directo; MR: Medio R₂A

Figura 4. Esquema de diseño experimental para la evaluación de la muestra del manantial termal “Ojo del Diablo” (P3)

El modelo de diluciones siembra y suplementos de fuentes de carbono; fue evaluado adicionalmente en dos concentraciones de NaCl: al 3% (p/v) y al 0% (p/v) con el fin de reducir la población a microorganismos halófilos tolerantes. Ambos montajes fueron incubados a temperatura de 65°C, con la ayuda de cámaras húmedas para evitar la evaporación rápida del medio, durante 4 semanas. Se realizaron reportes diarios del crecimiento microbiano (Anexo 2.)

En los montajes con 0% de NaCl, no se realizaron pruebas en el medio directo (MD) ya que, a pesar de que en su conformación no presenta adición de sales, al ser preparado con agua del manantial termal P3, se considera que posee una concentración salina innata mayor a 0% lo que afectaría el resultado final.

5.3. Identificación taxonómica

A partir de las colonias obtenidas con los medios de cultivo empleados: MC, MD y MR, se procedió a hacer la descripción macro y microscópica. Posteriormente se realizaron los aislamientos y la purificación de los morfotipos obtenidos, usando pases en medio sólido (agar noble) y en líquido de los medios de cultivos respectivos, suplementados con diferentes sustratos como extracto de levadura, piruvato de sodio, y glucosa, que promovieron el crecimiento para recuperar mayor cantidad de biomasa (Andrei et al., 2012).

5.3.1. Extracción de DNA

Para la extracción del ADN se realizó la obtención de biomasa de las cepas a partir de cultivos sólidos, tomando colonias con ayuda de un asa estéril y suspendiéndolas en un tubo eppendorf (1,5 mL) con solución salina estéril al 0,85% (p/v). De cultivos líquidos, tomando 1 mL y transfiriéndolo a un tubo eppendorf (1,5 mL) estéril para ser centrifugado a 8000 rpm por 5 min a 6°C; este proceso se realizó varias veces hasta obtener un precipitado significativo. Posteriormente se realizaron tres lavados de la biomasa suspendiéndola en solución salina al 0,85% y centrifugando a 8000 rpm por 7 min a 6°C, finalmente se descartó el sobrenadante y se procedió con la extracción.

El ADN fue extraído por medio del kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Fitchburg, U.S.A.) siguiendo el protocolo descrito para bacterias.

La presencia y pureza del ADN fue confirmada por espectrofotometría de microvolumen (260nm/280nm) con espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, U.S.A.)

5.3.2. Amplificación por PCR

Posterior a la extracción se realizó una amplificación del gen 16S ARNr con los cebadores 27f y 1492r (Tabla 5).

Tabla 5. Secuencia de los cebadores utilizados en la amplificación del gen 16S rRNA por reacción de PCR

Cebador	Secuencia (5' - 3')	Referencia
27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Lane, 1991
1492r	GGTTACCTGTTCAGACTT	

Las reacciones de PCR se realizaron en tubos de microcentrifuga de 0.2 mL usando el ADN sin dilución. Cada reacción de PCR (50 µl) consistía en 2 µl de ADN, 1µl de cada iniciador (50 µM), 0.5 µl de dNTPs (25 mM), 5 µl de *Buffer* para *Taq* (10X) más (NH₄)₂SO₄, 4µl de MgCl₂ (50mM), 0.2 µl de *Taq* polimerasa (5U/µl; 1 U por reacción, Fermentans). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Corbett thermal cycler (Corbett Research) realizando una denaturación inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 95°C por 1 minuto, anillado a 50°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 2 minutos y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

5.3.3. Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa fue realizada para visualizar fragmentos de ADN y productos de PCR en geles a concentraciones de 0,8% y 1% (p/v) respectivamente. Los geles se prepararon fundiendo agarosa (Invitrogen) en buffer TAE 0.5X (preparado a partir de TAE 50X que contiene por 500mL: 121 g de Tris base, 28.6 mL de ácido acético y 50 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0) hasta lograr una solución transparente. La solución fue enfriada a 50°C antes de agregar como colorante Syber Safe (Invitrogen) 61 (1X). Posteriormente, la solución fue servida en un molde hasta su gelificación.

La electroforesis se realizó en buffer TAE 0.5 X a 80V durante 45-60 minutos. Las imágenes de los geles se capturaron con el sistema GelDoc™ EQ (Bio-Rad).

Para verificar el tamaño de las bandas de la extracción de ADN y de la reacción de PCR se utilizó como marcador de talla molecular Hyperladder III (500pb-5Kb - Bionline). Para ello, se cargó en el carril intermedio del gel 5 µl del marcador que corresponde a 620 ng de ADN. Este marcador de talla permite la visualización de bandas que corresponden a una cantidad precisa de ADN (variando entre 30, 40, 50 y 100 ng/banda).

5.3.4. Análisis de las secuencias de los genes 16S rRNA

El análisis de las secuencias se inició generando una secuencia consenso (entre secuencias obtenidas por sentido *forward* y *reverse*) con el programa Bioedit, previa revisión manual del electroferograma. La secuencia obtenida fue comparada según el protocolo establecido en el artículo de Díaz-Cárdenas y colaboradores (2015) mediante el algoritmo del BLAST del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Las secuencias de referencia y las de los organismos aislados fueron alineadas utilizando la herramienta Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE por sus siglas en inglés) (<http://ebi.ac.uk/Tools/muscle/>). Se construyó un árbol filogenético usando el método de Neighbour-Joining y el programa MEGA versión 7.

5.4. Métodos de cultivo no convencionales

La aplicación de esta metodología no convencional se realizó siguiendo montajes reportados de manera previa, en estudios que buscaban asemejar *in vitro* las condiciones ambientales *in vivo*, mediante soportes celulares. Estos soportes fueron adaptados utilizando agua y sedimentos del manantial termal P3 para su montaje.

5.4.1. Cámaras de difusión

Como primera metodología se emplearon cámaras de difusión desarrolladas por Ashton y colaboradores (1984), y cuyo diseño esencialmente permite el crecimiento celular proveyendo un entorno similar al natural, mediante la creación de una estrategia de incubación que imita muy de cerca las condiciones del punto de muestreo (Kaeberlein, 2002; Bollmann et al., 2007; Lewis et al., 2010).

Para el montaje se empleó un filtro de policarbonato (Millipore Isopore™, Darmstadt, Alemania) con un tamaño de poro de 0.22 µm, sobre el cual se colocó una arandela de acero con 4.5 cm de diámetro externo, 1.7 cm de diámetro interno y 0,5 cm de altura. Con ayuda de una micropipeta y puntas estériles se procedió a agregar 700 µL del inóculo (agua P3 con raspado de rocas) junto con agar noble al 15% (p/v) a una temperatura aproximada de 40°C (previamente preparado con agua del manantial P3) y se dejó gelificar.

Posteriormente se procedió a sellar la cámara con otro filtro de policarbonato, una vez secas, las cámaras se acomodaron sobre una capa de sedimentos dentro de un acuario de vidrio (previamente lavado y esterilizado) (Figura 5) que fue llenado con agua. Tanto los sedimentos como el agua fueron del manantial termal P3.



Figura 5. Montaje de cámaras de difusión en sedimentos del manantial P3

Se montaron 20 cámaras con la muestra más dos cámaras con agua destilada sin inocular, como control negativo. El acuario fue sellado con plástico vinipel para evitar contaminación, e incubado a 65°C por un total de 4 semanas; se adiciono agua semanalmente para evitar el secamiento del montaje.

5.4.2. Esferas de agar revestidas de polisulfona

Para la segunda metodología no convencional se llevó a cabo la encapsulación de las muestras en esferas de agar revestidas con polisulfona. Esta técnica descrita como doble encapsulamiento, permite brindar a las células un ambiente aislado en una matriz que a su vez es suficientemente permeable para permitir el intercambio de nutrientes. (Ben-Dov et al., 2009).

5.4.2.1. Formación de perlas de agar

Para la formación de las perlas de agar, a partir de la muestra se procedió a realizar diluciones seriadas con base 10 hasta 10^{-4} en agua esterilizada en autoclave, del manantial P3. De cada una se tomaron 10 mL que fueron mezclados con agar noble al 15% (p/v) (previamente preparado con agua del manantial P3) a una temperatura aproximada de 40°C, en relación 1:1 hasta obtener una mezcla homogénea. Seguido a esto con ayuda de una jeringa de 20 mL se tomó la mezcla y se dejó caer gota a gota en un vaso de precipitado con aceite mineral estéril y en constante agitación para favorecer la formación de las perlas. Como control positivo se utilizó una de las cepas aisladas en el diseño de medio de cultivo (3MD1-415) y como control negativo se empleó agua destilada estéril.

Una vez separadas fueron lavadas con agua destilada estéril para retirar el exceso de aceite y se dejaron secar en cabina de flujo laminar sobre papel filtro Whatman estéril (Figura 6).

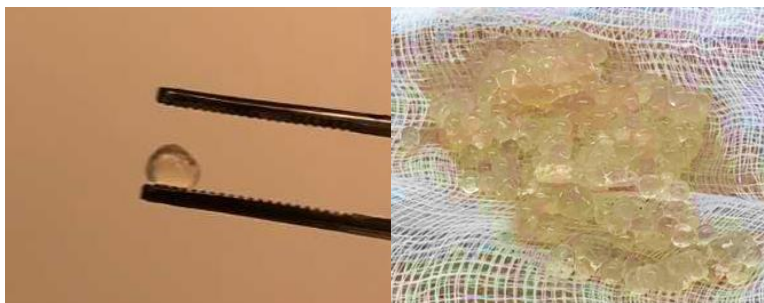


Figura 6. Perlas formadas, sin revestimiento de polisulfona

5.4.2.2. Preparación del revestimiento

Para el revestimiento se prepararon soluciones de polisulfona a diferentes concentraciones. Para esto se pesaron gránulos de polisulfona (Sigma-Aldrich Chemistry, Saint Louis, U.S.A.) y se diluyeron en el solvente N, N -dimetilformamida (DMF) hasta obtener soluciones al 10%, 15% y 20% (p/v). Posteriormente se tomaron las perlas lavadas y secadas por dilución y se sumergieron en las diferentes soluciones por un periodo de 20 a 30 segundos; posteriormente se agregaron a un recipiente con agua destilada estéril para completar la formación de la capa externa (Figura 7). Una vez formadas fueron lavadas para retirar el exceso de solvente y separadas por dilución para ser empaquetadas en gasas estériles e incubadas a 65°C, en frascos schott con agua del manantial P3 por 4 semanas.



Figura 7. Perla con revestimiento de polisulfona

5.4.2.3. Evaluación de permeabilidad

La permeabilidad de las perlas se define por el tamaño de los poros de la doble encapsulación; ésta a su vez es dependiente de la concentración de polisulfona en cada solución (10%, 15% y 20%). Para evaluar este factor en primer lugar se preparó una solución

stock de azul de metileno al 0,01% (p/v) a partir de la cual se preparó una segunda solución stock al 0,001% (p/v), desde la cual se prepararon alícuotas con concentraciones conocidas para realizar una curva de calibración, medida por espectrofotometría, a una longitud de absorción máxima de 660 nm (Ben-Dov et al., 2009; Chaparro et al., 2013). En segundo lugar, se procedió a hacer el montaje control de la misma manera que las muestras, reemplazando el inóculo por una solución de azul de metileno al 0,001% e incubando a 45°C por un periodo de 24 horas. Se realizaron muestreos cada hora para medir la cantidad de color liberado hacia el medio líquido con espectrofotometría a 660 nm en cada una de las concentraciones de polisulfona.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Diseño de Medio de Cultivo

De acuerdo con lo reportado en los resultados fisicoquímicos del agua (Anexo 1), se obtuvo un medio por componentes que imita las condiciones del ambiente de muestreo frente al tipo y cantidad de nutriente que posee (Tabla 6). Se dio importancia a la elevada concentración de algunos compuestos como sulfatos (SO_4) y el potasio (K^+).

Tabla 6. Composición de medio de cultivo diseñado (MC)

Reactivo	Concentración (g/L)
CaCO_3	0,25
NaHCO_3	1,53
MgSO_4	0,160
MnSO_4	0,0046
K_2HPO_4	0,0067
FeSO_4	0,00120
$(\text{NH}_4) (\text{NO}_3)$	8,572
K_2SO_4	20
KCl	11
NaCl	30
S°	10
S_2O_3	3,15
Agar Noble	15

El alto contenido de iones de Ca^{2+} , SO_4^{2-} y K^+ ha sido reportado en diferentes manantiales termales de agua salina en el departamento de Boyacá y a lo largo del valle medio del río Cauca, entre los departamentos del Valle del Cauca y Antioquia (Alfaro, 2005; Cortés & Cardona, 2006). El uso de azufre elemental (S°) y de tiosulfato (S_2O_3) es debido a la asimilación de estos compuestos por parte de microorganismos en manantiales termales salinos, reportado en estudios previos de la USBA ((Días-Cárdenas, 2011)Díaz, 2011); de igual manera Niederberger et al., (2009) detectaron organismos quimiolitotrofos oxidadores de azufre relacionados con especies del género *Thiomicrospira* aisladas en medios ricos en estos compuestos.

6.1.1. Evaluación de Medio de Cultivo

En el diseño evaluado, la variable de respuesta considerada fue el crecimiento en los diferentes medios y el efecto dilución en la concentración de la población celular.

De acuerdo con el crecimiento en los medios de cultivo (MC, MD y MR) y en todas las diluciones para ambas fuentes de carbono, bajo las diferentes condiciones evaluadas, se seleccionaron 38 colonias diferentes, un número mayor al esperado debido a las condiciones evaluadas. A partir de estas, se realizó el proceso de aislamiento y purificación para su posterior identificación taxonómica. En la Tabla 7 se muestra el acumulado total de colonias por fuente de carbono y concentración de NaCl.

Tabla 7. Resultados del número total de colonias en los diferentes medios evaluados

Fuente de Carbono	% NaCl (p/v)	Número de colonias por medio			Total
		MC	MD	MR	
Mix (acetato, citrato, formiato)	0%	0	-	5	13
	3%	1	0	7	
Trehalosa	0%	1	-	0	25
	3%	6	8	10	
				Número de colonias	38

La descripción macro y microscópica de las colonias aisladas en el montaje con el Mix y con trehalosa se describe en la Tabla 8 y Tabla 9 respectivamente.

Los resultados obtenidos confirman crecimiento por el método del medio diseñado por componentes (MC), un total de 8 colonias fueron aisladas. Comparado con los medios control, se obtuvo un número igual en el medio MD y uno menor frente a las 22 colonias en el medio MR. Esto era esperado, ya que los medios MC y MD, al estar limitados a las condiciones del ambiente de muestreo y tener un solo suplemento de fuente de carbono a bajas concentraciones, se buscaba mayor especificidad para bacterias de crecimiento lento. En comparación, el medio R₂A, a pesar de tener una composición diferente a la del ambiente muestreado, es un medio enriquecido que permitió el crecimiento de una mayor cantidad y variabilidad de bacterias. Esto es corroborado en estudios como el de Jenkins y colaboradores (2017), donde al evaluar un medio de cultivo diseñado a partir de características de un suelo, frente a los medios estándar, se obtuvo una mayor variabilidad y número de colonias en el medio estándar R₂A comparado con el medio SMD diseñado.

Debido a la cantidad de morfotipos obtenidos, de las 38 colonias iniciales luego del proceso de aislamiento y purificación, 28 fueron recuperadas con éxito; las 10 colonias restantes presentaron crecimiento de más de un morfotipo luego de realizar los pases para su purificación. Esto puede deberse a que, al suplementar el medio con otras fuentes de

carbono (extracto de levadura, glucosa y piruvato) en concentraciones mayores, células viables de otras especies que fueron arrastradas en el pase, pero que no formaban colonias, tuvieran vía libre para crecer y formar un morfotipo diferente al observado (Van Zandycke et al., 2003; Vartoukian et al., 2010).

De los 28 aislamientos, seis han sido secuenciados siguiendo la metodología descrita. Los 22 faltantes se encuentran en proceso de extracción de ADN y en amplificación del gen 16S rRNA para ser secuenciados.

Algunas de las limitaciones que se presentaron fueron que, debido a la elevada concentración de sales, la disolución y homogenización de éstas, tuvo que realizarse con largos periodos de agitación y con estabilización del pH en un rango entre 6.9 y 7.1. Por esta misma razón y debido a que la baja humedad relativa a 65°C promueve la rápida evaporación del agua, se presentó una sobresaturación que dio paso a un proceso de cristalización de las sales del medio (Figura 8).

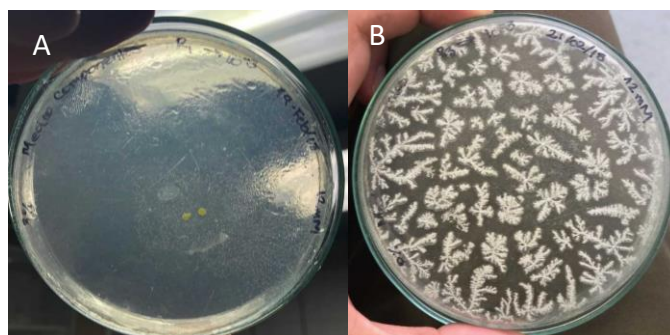


Figura 8. a) Medio MC previo a la siembra y b) medio con cristalización de sales por rápida evaporación del agua

Los medios que presentaron cristalización fueron invalidados debido a que podían alterar los resultados obtenidos. Al reducir el agua del medio se pueden concentrar los componentes, subiendo el porcentaje de salinidad y permitiendo el crecimiento de otro tipo de bacterias. Por otro lado, la desecación total podía inhibir el crecimiento, generando un falso negativo. Finalmente, no se observó un efecto de dilución debido en gran parte a la invalidación de réplicas por cristalización. Otra consecuencia pudo ser errores en la homogenización de las diluciones o una posible baja concentración celular en la muestra inicial.

Las diferentes morfotipos fueron nombrados de acuerdo las condiciones que presentaban en el esquema de trabajo: comenzando con el porcentaje de NaCl (0 ó 3), seguido por el medio de donde se aisló (MC, MD, MR) y el número de colonia que se seleccionó de este, continuando con la dilución que se sembró (-3, -4, -5) y finalizando con la concentración de la fuente de carbono (1.5, 5 y 12).

Tabla 8. Descripción de morfológica de colonias aisladas del montaje con Mix (acetato, citrato, formiato) como fuente de carbono

Cepa	Macroscopía	Microscopía.
3MR1-312	Colonia circular, convexa de borde entero rosada brillante	Bacilos delgados, largos y cortos, no móviles. Organización en parejas o cadenas. (Gram negativos)
OMR1-45	Colonia circular, elevada de borde entero translúcida opaca	Bacilos cortos, esporulados, redondeados, no móviles. Organización individual o en parejas. (Gram positivos)
OMR2-5121	Colonia rizoide, plana de borde lobulado blanca opaca	Bacilos medianos, delgados, no móviles, organización individual y con puntos prominentes. (Gram negativos)
OMR2-512	Colonia granular, plana de borde ondulado translúcida opaca	Bacilos cortos, esporulados, redondeados, no móviles. Organización individual o en parejas. (Gram positivos)
OMR3-312	Colonia circular, convexa de borde entero amarillo brillante	Bacilos cortos, esporulados, redondeados, no móviles. Organización individual o en parejas. (Gram positivos)

Tabla 9. Descripción de morfológica de colonias aisladas del montaje con trehalosa como fuente de carbono

Cepa	Macroscopía	Microscopía.
3MC1-45	Colonia circular, convexa de borde entero rosada clara	Bacilos delgados, no móviles, varios tamaños, organización en cadena o rosetas. Similares a filamentos. (Gram negativos)
3MC1-412	Colonia puntiforme, elevada de borde entero translúcida	Bacilos cortos, móviles. Redondos, varios tamaños, individuales o en parejas. (Gram positivos)
3MC4-515	Colonia granular, plana de borde ondulado translúcida	Bacilos cortos, móviles. Pequeños, organización en roseta. (Gram positivos)
3MC1-315	Colonia puntiforme, convexa de borde entero translúcida	Bacilos de varios tamaños, no esporulados, móviles, redondos, organización individual o en parejas o cadenas. (Gram negativos)
3MD1-415	Colonia circular, umbilicada de borde dentado rosada brillante	Bacilos gruesos en forma de botella, varios tamaños, organizados en parejas o cadenas. (Gram negativos)
3MD1,1-415	Colonia circular, umbilicada de borde dentado rosada opaca	Bacilos grandes en forma de botella, no móviles. Parejas o cadenas. (Gram negativos)
3MD2-35	Colonia puntiforme, convexa de borde entero translúcida	Bacilos cortos redondeados, no móviles, organizados en parejas o cadenas cortas. (Gram negativos)
3MD3-35	Colonia circular, convexa de borde entero blanca	Bacilos gruesos en forma de botella, varios tamaños, esporulados, organizados en parejas o cadenas. (Gram positivos)
3MD4-45	Colonia circular, convexa de borde entero rosado brillante	Bacilos cortos y delgados, esporulados. Organización en letras chinas, varios tamaños. (Gram positivos)
3MD4,1-35	Colonia puntiforme, convexa de borde entero rosado brillante	Bacilos delgados, no móviles, varios tamaños, organización en cadena o rosetas. Similares a filamentos. (Gram negativos)
3MD4,2-35	Colonia circular, convexa de borde entero rosado opaco	Bacilos delgados, no móviles, varios tamaños, organización en cadena o rosetas. Similares a filamentos. (Gram negativos)
3MD5-45	Colonia granular, plana de borde ondulado translúcido opaco	Bacilos delgados, no móviles, varios tamaños, organización en cadena o rosetas. Similares a filamentos. (Gram negativos)
3MD6-315	Colonia circular, convexo de borde entero rosado brillante	Bacilos medios, redondeados, esporulados, móviles. Organización en parejas o cadenas. (Gram positivos)

3MR2-R15	Colonia circular, convexo de borde entero amarilla	Bacilos de varios tamaños, no esporulados, móviles, redondos, organización individual o en parejas o cadenas. (Gram negativos)
3MR3-315	Colonia circular, pulvinada de borde entero translúcida opaca	Bacilos cortos, granulados, móviles, redondos, organización individual o en parejas. (Gram negativos)
3MR4-315	Colonia rizoide, plana de borde lobulado amarilla	Bacilos de varios tamaños, esporulados, móviles, redondos, organización individual o en parejas o cadenas. (Gram negativos)
3MR4,1-315	Colonia circular, convexo de borde entero amarilla translúcida	Bacilos de varios tamaños, no esporulados, móviles, redondos, organización individual o en parejas o cadenas. (Gram negativos)
3MR4-35	Colonia fusiforme, umbilicada de borde entero blanca brillante	Bacilos medianos, delgados, no móviles, organización individual y con puntas prominentes. (Gram negativos)
3MR6-R5	Colonia granular, elevada de borde entero amarillo brillante	Bacilos medianos, delgados, no móviles, organización individual o en cadena. (Gram negativos)
3MR6-55	Colonia puntiforme, convexo de borde entero translúcida	Bacilos medianos, delgados, no móviles, organización individual y con puntos prominentes. (Gram positivos)
3MR7-312	Colonia granular, plana de borde entero amarillo brillante	Bacilos medianos, delgados, no móviles, organización individual o en cadena. (Gram negativos)
3MR8-412	Colonia granular, pulvinada de borde entero amarilla oscura	Bacilos cortos, gruesos, móviles, organización individual o en parejas. (Gram negativos)
OMC4-R5	Colonia circular, elevada de borde entero translúcida	Bacilos cortos, esporulados, redondeados, no móviles. Organización individual o en parejas (Gram positivos)

6.1.1.1.Descripción Macroscópica

Al observar los diferentes morfotipos obtenidos con respecto a su color se puede ver que las colonias en el medio MC, en su mayoría son translúcidas o presentan un color amarillo o rosado, mientras que las obtenidas en MR tienen una amplia variabilidad de colores y tonos que puede ir acorde con la cantidad de especies que crecieron. Por otro lado, en el medio MD solo se presentó crecimiento de colonias rosadas con diferentes descripciones morfológicas, a excepción de dos: 3MD5-45 y 3MD3-35 que presentaron un color translúcido opaco y blanco respectivamente. Con respecto a las características de las colonias, la mayoría fueron circulares, de borde entero o lobulado y convexas.

Colonias de color amarillo, blanco y translúcidas al igual que circulares y convexas, son descritas en estudios previos de la USBA en estos manantiales termales (Rubiano-Labrador, 2006; Baena et al., 2011;). Sin embargo, no se tiene descripción de colonias rosadas pequeña y grandes que hayan sido aisladas e identificadas en el laboratorio; el estudio de Rodríguez (2017), describe colonias similares con diferentes pigmentaciones rosadas en salinas de Sáchica, Boyacá.

6.1.1.2.Descripción Microscópica

Pese al alto número de aislamientos, las morfologías observadas fueron similares, en su mayoría bacilos de diferentes tamaños. En la Figura 9 se muestran las cuatro morfologías más observadas entre las colonias aisladas.

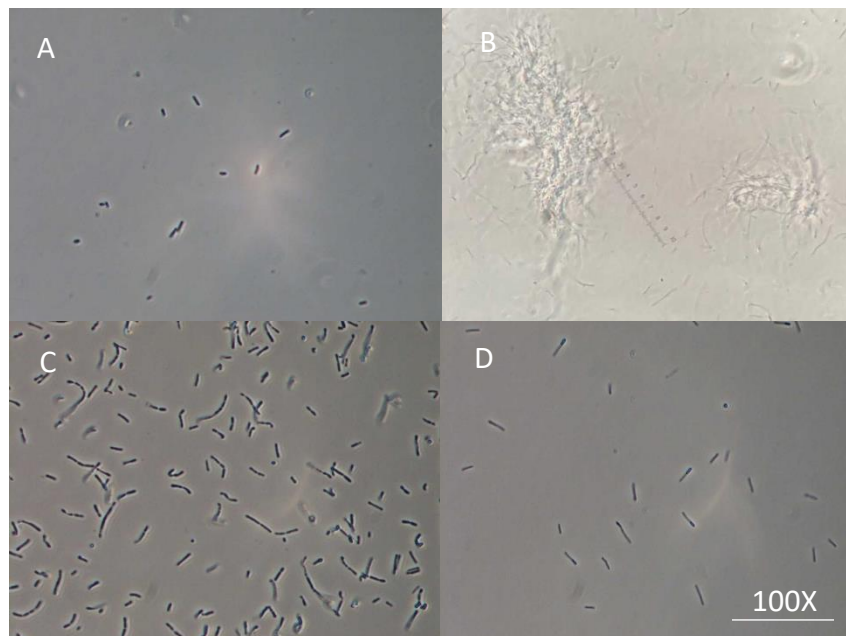


Figura 9. Morfologías más observadas en las colonias obtenidas en los diferentes agares a) bacilos cortos, individuales, b) bacilos largos, delgados en roseta, c) bacilos gruesos, de varios tamaños, en cadena o parejas, d) bacilos cortos, delgados, individuales.

Las morfologías observadas en la mayoría de las colonias aisladas hasta el momento, del medio MC son bacilos cortos, no móviles, redondeados, no esporulados, organizados individuales o en parejas (Figura 9a). Las colonias de color rosado obtenidas en el medio MD presentaron en su mayoría bacilos gruesos, móviles, esporulados, de varios tamaños organizados en parejas o cadenas (Figura 9c), las que no entraron en esta descripción fueron observadas como bacilos delgados, no móviles, varios tamaños, organización en cadena o rosetas (similares a filamentos) (Figura 9b). Finalmente, una gran cantidad de las colonias aisladas en el medio MR fueron descritas como bacilos delgados cortos, no móviles, no esporulados, organización individual o en letras chinas, con puntas bulbosas (Figura 9d).

Las morfologías observadas son similares a las reportadas en los trabajos en los manantiales termales realizados por la USBA (Díaz-Cárdenas, 2011; Baena et al., 2011; Rubiano-Labrador et al., 2013). Sin embargo, también son descritos por varios estudios realizados en diferentes manantiales termales dentro y fuera del país, como el realizado por Arya y colaboradores (2015), quienes reportan una gran variedad de estructuras bacilares de bacterias halófilas y termófilas de manantiales termales en la región central de los Himalaya.

6.1.1.3. Evaluación de la concentración de las fuentes de carbono

Con respecto a las concentraciones de las fuentes de carbono se observó que de los 38 morfotipos, 19 presentaron crecimiento en una concentración de 1,5 mM de las cuales 7 fueron en medios con la mezcla de acetato, formiato y citrato, mientras que los 12 restantes se aislaron de los medios con trehalosa. Además 11 fueron obtenidas de medios con 5 mM de fuentes de carbono (1 con la mezcla y 9 con trehalosa) y 8 en medios con 12 mM de fuentes de carbono (5 con la mezcla y 3 con trehalosa). Esto era deseado ya que las bajas concentraciones de nutrientes son requisito para el aislamiento de posibles aún no cultivados; de igual forma comparado con los estudios realizados por los investigadores de la USBA, estas concentraciones son valores poco utilizados en los medios para evaluar la diversidad en manantiales termales. Rubiano-Labrador (2006) utilizó concentraciones entre 0,25 mM a 5 mM de las fuentes de carbono, para evaluar bacterias termófilas, sin embargo, no se obtuvo un crecimiento abundante comparado con concentraciones de 10 mM y 20 mM usualmente utilizadas en el laboratorio (Díaz-Cárdenas, 2011; Baena et al., 2011; Rubiano-Labrador et al., 2013; Díaz-Cárdenas & Baena, 2015).

6.2. Identificación taxonómica

De acuerdo con la identificación taxonómica realizada hasta el momento, de las 6 cepas aisladas, luego de análisis de la secuencia del gene 16S rRNA, se identificaron tres especies:

6.2.1. Cepas OMR1-45 y OMC4-R5: *Geobacillus stearothermophilus*

Esta cepa fue ubicada en el árbol filogenético dentro del género *Geobacillus*, con una similitud del 99% con el gen 16S rRNA de la especie *Geobacillus stearothermophilus* (Figura 10).

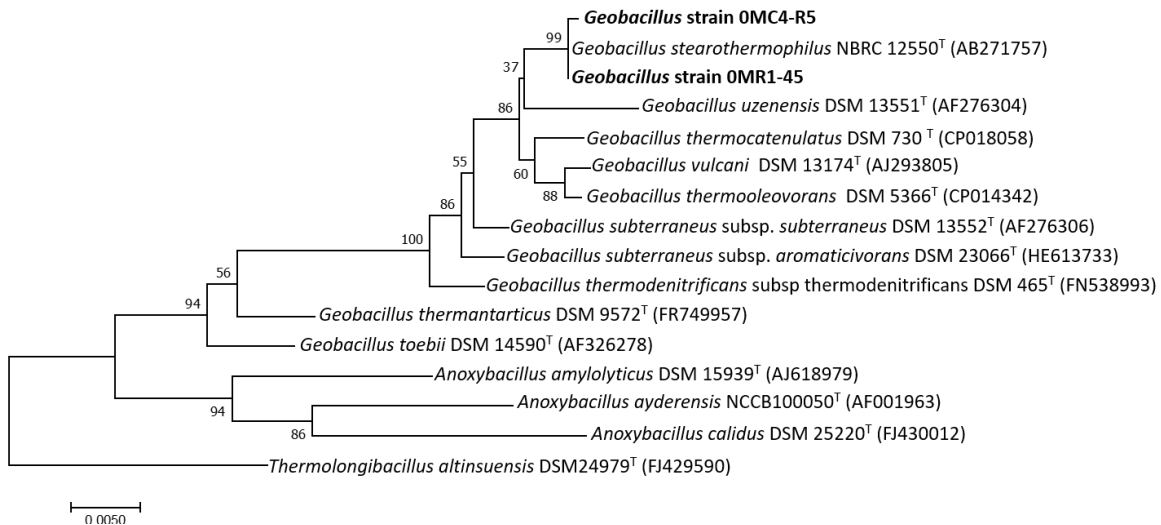


Figura 10. Árbol filogenético basado en el análisis del 16S rRNA, que muestra la ubicación de las cepas OMR1-45 y OMC4-R5 relacionada con la especie *Geobacillus stearothermophilus*

Este morfotipo fue aislado en condición de 0% de NaCl a 65°C. Presentó crecimiento en el medio por componentes y en el medio control R₂A suplementados con Trehalosa, no hubo crecimiento en medio con la mezcla de acetato, formiato y citrato. Son bacilos Gram positivos cortos, esporulados, redondeados, no móviles, con organización individual (Figura 11).

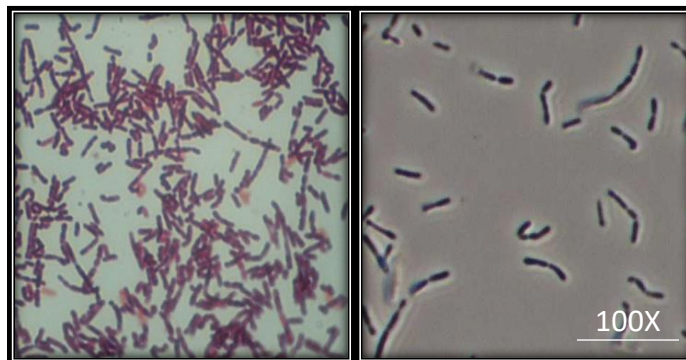


Figura 11. Microscopía y tinción de Gram de la cepa OMR1-45 y OMC4-R5

El género *Geobacillus* contiene bacilos Gram positivos, formadores de espora que tiene crecimiento óptimo a temperaturas entre 55-65°C. Este género fue originalmente clasificado dentro del grupo 5 del género *Bacillus* junto con *G. kaustophilus* y *G. thermoglucosidasius* (Ash et al., 1993; Fortina et al., 2001), basado en el estudio de la secuencia del gen 16S; posteriormente Ivanov y colaboradores (2001) basado en la composición de ácidos grasos y condiciones de crecimiento los reclasificaron en el nuevo género *Geobacillus*, como “bacilos cortos del suelo”. *Geobacillus* spp. ha sido aislado de ambientes templados y cálidos, incluido aguas termales, yacimientos petrolíferos, sedimentos de aguas profundas, refinerías de azúcar, alimentos enlatados, vegetales deshidratados y productos lácteos (Burgess et al., 2017). De acuerdo con *List of prokaryotic names* (bacterio.net, 2017), se tiene reporte de dieciséis especies de *Geobacillus*, algunas de las más estudiadas incluyen a: *G. caldxylosilyticus*, *G. galactosidasius*, *G. icigianus*, *G. jurassicus*, *G. kaustophilus*, *G. lituanicus* y *G. stearothermophilus* (Cordova & Antoniewicz, 2016).

La especie *G. stearothermophilus* fue descrita por primera vez en 1920 y se aisló de una conserva en lata de maíz cremoso. Hasta la década de 1980 *G. stearothermophilus* fue considerado como el único termófilo obligado conocido del género *Bacillus* (Suzuki et al., 1983; Coorevits et al., 2012). Los últimos reportes de aislamiento de esta especie se realizaron en Austria en una muestra de jugo de remolacha azucarera y en Noruega a partir de los sedimentos de un manantial termal profundo (Wissuwa et al., 2016; Egan et al., 2017); en ambas ocasiones se utilizaron métodos convencionales cultivo dependientes e independientes. En el caso de Colombia, el género *Geobacillus* spp. se tiene registrado mediante técnicas moleculares, en los inventarios biológicos como termófilo productor de lipasas y biosurfactantes (Niño & Dussan, 2013). Sin embargo, se presume que no hay reportes de aislamiento e identificación en manantiales termales en el municipio de Paipa, Boyacá ni se tiene aislado en ninguno de los estudios realizado por los investigadores de la USBA.

Esta especie se caracteriza por utilizar glucosa, fructosa y almidón como fuente de carbono (Burgess et al., 2014), igualmente se ha reportado capacidad para hidrolizar la caseína y trehalosa, por lo cual pudo presentar crecimiento en los medios donde fue aislada. Adicionalmente se ha descrito como incapaz de utilizar el citrato y el formiato, razón por la cual no tuvo crecimiento en el medio suplementado con el Mix (Burgess et al., 2017). Bryanskaya y colaboradores (2015) evaluaron el crecimiento de *G. stearothermophilus* bajo diferentes concentraciones de NaCl, recuperando la cepa en 1%, pero no en 5% de NaCl (p/v). Por otro lado, Fortina y colaboradores (2001) describieron un crecimiento casi nulo a una concentración de 3% de NaCl, de acuerdo con esto es posible explicar por qué la cepa aislada de *G. stearothermophilus* en este estudio solo presentó crecimiento a 0% de NaCl (p/v). Sin embargo, fue aislada de un manantial termal con una elevada concentración de sales, esto puede deberse a que las especies del grupo 5 del género *Bacillus*, tienden a presentar adaptaciones en diferentes ambientes, posiblemente mediadas por la expresión

genética diferencial, sin cambios importantes en el genoma como un todo (Burgess et al., 2014; Wissuwa et al., 2016).

Hay un gran interés en el género *Geobacillus* para fines biotecnológicos, algunos como biorremediación, producción de enzimas termoestables, y biocombustibles (Wiegand et al., 2013; Mohtar et al., 2016). Además, son organismos implicados en el deterioro en los alimentos (Lücking et al., 2013). En el caso particular de la especie *G. stearothermophilus*, se han descrito estudios sobre su potencial; uno de los principales es la producción de enzimas lipolíticas termoestables, importantes como biocatalizadores en la industria de aditivos (modificación del sabor), cuero (eliminación de grasa de piel animal) y detergentes (hidrólisis de grasa), entre otras varios. También se ha descrito la producción de α -amilasas, ampliamente utilizadas en la industria farmacéutica, textil, alimentaria y de detergentes (Berekaa et al, 2009; Mehta & Satyanarayana, 2013).

6.2.2. Cepa 3MR1-312: *Rubrobacter taiwanesis*

Esta cepa fue ubicada en el árbol filogenético dentro del género *Rubrobacter*, con una similitud del 100% con el gen 16S rRNA de la especie *Rubrobacter taiwanesis* (Figura 12).

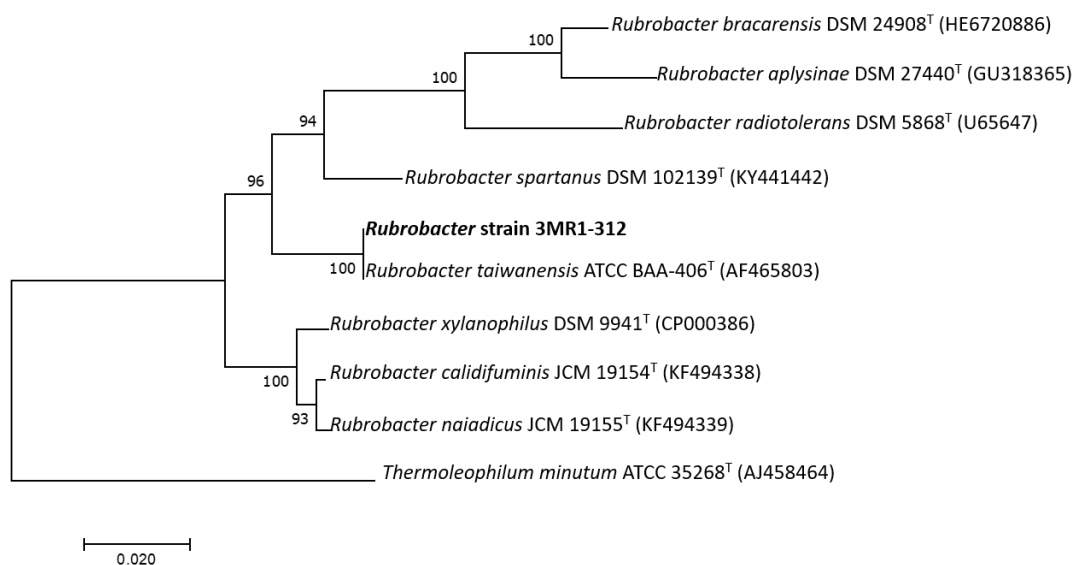


Figura 12. Árbol filogenético basado en el análisis del 16S rRNA, que muestra la ubicación de la cepa 3MR1-312 relacionada con la especie *Rubrobacter taiwanesis*

Este morfotipo fue aislado en condición de 3% de NaCl a 65°C. Presentó crecimiento en el medio control R₂A suplementado con la mezcla de acetato, formiato y citrato. Son bacilos Gram negativos largos, no esporulados, delgados, no móviles, con organización individual o en roseta, similares a filamentos (Figura 13).

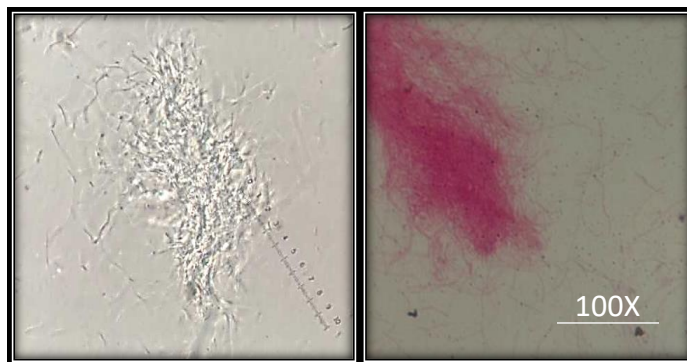


Figura 13. Microscopia y tinción de Gram de la cepa 3MR1-312

En el género *Rubrobacter* se han descrito bacilos cortos o coccidios pleomórficos y en algunos casos filamentosos, Gram positivos, no motiles. Mesófilos, termófilos moderados y extremos con crecimientos entre 28° y 70°C (Jurado et al., 2012). Este género fue originalmente clasificado como *Arthrobacter* (Yoshinaka et al., 1973) dentro de las actinobacterias; posteriormente Suzuki y colaboradores (1988) lo reclasificó como *Rubrobacter* caracterizado por bacterias altamente resistentes a la radiación gamma, aislando por primera vez a *Rubrobacter radiotolerans* de un manantial radiactivo en Japón. Mas adelante se describieron nuevas especies como *Rubrobacter xylanophilus*, *Rubrobacter bracarensis* y *Rubrobacter taiwanensis* aisladas de efluentes contaminados por industria química, cuerpos de agua termales y monumentos deteriorados (Laiz et al., 2009; Kusumi et al., 2013; Kampfer et al., 2014).

La especie *Rubrobacter taiwanensis* fue aislada de una fuente termal en Taiwán, de allí su nombre. Fueron descritos como un bacilo posiblemente micelial Gram positivo y pleomórfico, no motil ni flagelado y con ausencia de endosporas. Colonias circulares, convexas, lisas, de color rosado opaco y brillante. Es considerado termófilo extremo, con un crecimiento óptimo a 60°C y halófilo tolerante con crecimiento en hasta 5% de NaCl (p/v) (Chen et al., 2004). Los últimos reportes de aislamiento de esta especie se realizaron en Hawaii a partir de una muestra de suelo volcánico del Volcan Kilauea y en Arabia Saudita en residuos contaminantes de curtiembres (Norman et al., 2017; Albokari et al., 2018) En ambos estudios se utilizaron métodos cultivo-independientes para su identificación taxonómica. En el caso de Colombia, el género *Rubrobacter* spp no tiene relevancia en los inventarios biológicos dentro de ambientes extremos ya que son microorganismos asociados al deterioro de monumentos. Adicionalmente, se presume que no hay reportes de aislamiento e identificación en manantiales termales en el municipio de Paipa, Boyacá. Sin embargo, en el estudio de Rubiano-Labrador (2006) mediante el uso de métodos convencionales, se logró aislar la cepa IZA-03-2 de un manantial termal en Boyacá, que presentó colonias pequeñas y translúcidas, bacilos largos y delgados Gram negativos, dispuestos en cadenas con semejanza a micelios, características similares a las obtenidas por la cepa 3MR1-312, esta cepa no pudo ser identificada por fallas con la PCR por lo que no se encuentra en el inventario de la USBA.

Esta especie se reconoce por hidrolizar gelatina y ADN, utiliza numerosas fuentes de carbono como celobiosa, fructosa, galactosa, glucosa, maltosa, y trehalosa, entre muchas otras; debido a esto pudo crecer en los medios suplementados MR suplementado con Trehalosa. Los ácidos grasos predominantes en su membrana son 14-metil-18: 0, 12-metil-17: 0, 12-metil-16: 0 y 19: 0 (Jurado et al., 2012; Albuquerque & da Costa, 2014).

Una de sus características más emblemáticas es la resistencia a radiación, que se cree puede estar asociada a la coloración de las colonias. En este estudio se aislaron colonias pequeñas de color rosado opaco y brillante, similares a las obtenidas por Terato y colaboradores (2011) quienes explican que el color es debido a la presencia de carotenoides. Estas moléculas esenciales en procesos de movimiento de iones a través de la membrana por la acción de la luz están además presentes en halófilos y termófilos como protección frente a la irradiación en nichos expuestos directamente a la luz solar (Meseguer, 2004); el principal carotenoide identificado es la Bacterioruberina, considerado el posible agente protector contra la radiación, mediante mecanismos aun estudiados (Terato et al., 2011; Rao et al., 2016).

6.2.3. Cepas 3MC1-315, 3MR2-R15 y 3MR4,1.315: *Rhodothermus marinus*

Esta cepa fue ubicada en el árbol filogenético dentro del género *Rhodothermus*, con una similitud del 74% con el gen 16S rRNA de la especie *Rhodothermus marinus* (Figura 14).

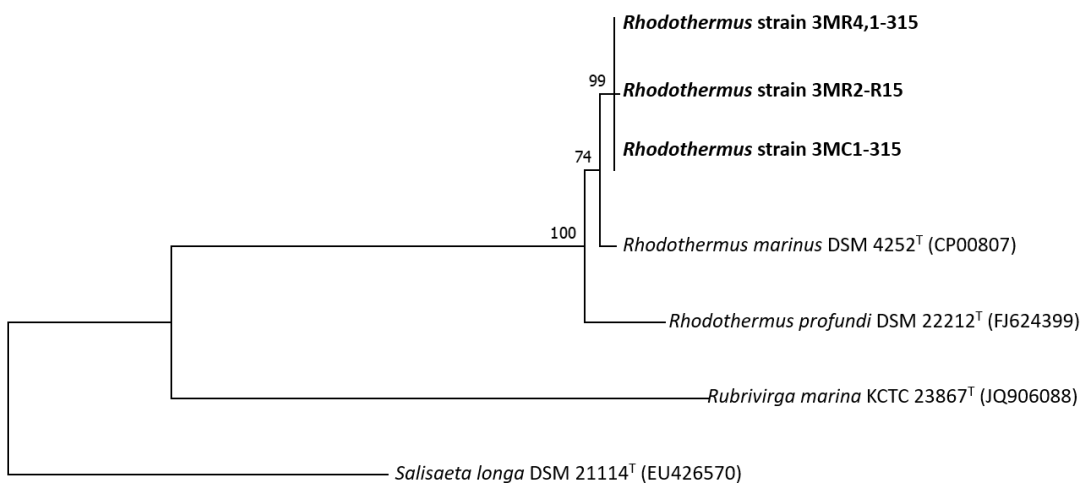


Figura 14. Árbol filogenético basado en el análisis del 16S rRNA, que muestra la ubicación de las cepas 3MC1-315, 3MR2-R15 y 3MR4,1-315 relacionadas con la especie *Rhodothermus marinus*

Este morfotipo fue aislado en condición de 3% de NaCl a 65°C. Presentó crecimiento en el medio por componentes y en el medio control R₂A suplementados con trehalosa, no hubo

crecimiento en medio con la mezcla de acetato, formiato y citrato. Son bacilos Gram negativos cortos, no esporulados, redondeados, no móviles, con organización individual (Figura 15).

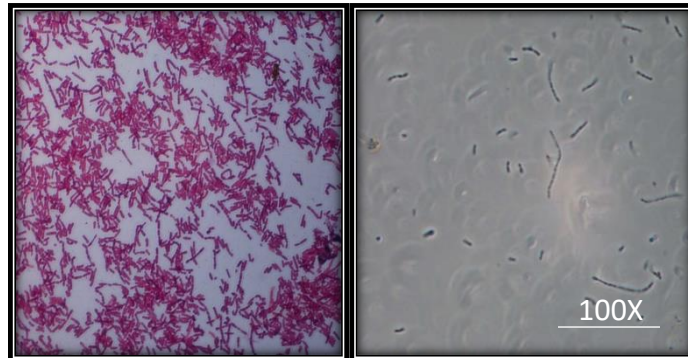


Figura 15. Microscopía y tinción de Gram de las cepas 3MC1-315, 3MR2-R15 y 3MR4,1.315

En el género *Rhodothermus* fue descrito como bacilos cortos Gram negativos, no filamentosos, no motiles ni esporulados. Presentan un crecimiento a temperaturas entre 54° y 77°C, con un óptimo en 65°C, por lo que son considerados termófilos extremos. Además, presentan crecimiento en concentraciones de hasta 6% por lo que se consideran halófilos tolerantes (Alfredson et al., 1988). Fueron descritos inicialmente como extremófilos de termales salinos con crecimiento de colonias amarillas o rosadas dependiendo de la concentración de sal en el medio; además este género se ha descrito como asimilados y productor de diferentes carbohidratos y otros compuesto orgánicos que le permiten contrarrestar la presión osmótica y las altas temperaturas; uno de los cuales es la trehalosa, y razón por la cual pudo haber presentado crecimiento en los medios suplementados con esta fuente de carbono (Lutnaes et al., 2004; Goh et al., 2016).

Si bien la especie no se encuentra aislada en los estudios previos de la USBA, si se realizaron acercamientos moleculares con géneros cercanos, lo que podría significar que hace parte de la fracción de especies que sigue siendo recolectadas, pero no cultivadas. Los investigadores de la USBA han logrado aislar representantes de la clase Alphaproteobacteria, directamente de las familias *Rhodospirillaceae* y *Rhodobacteriaceae*; ambas con géneros y especies característicos de bacterias halófilas y termófilas (Diaz-Cárdenas, 2011; Bohorquez et al., 2012; Delgado-Serrano et al., 2014).

La especie *Rhodothermus marinus* es de gran interés biotecnológico por su producción de carotenoides y de exopolisacáridos termoestables (Sardari et al., 2017).

6.3. Cámaras de Difusión

Posterior a las 4 semanas de incubación se procedió a retirar el agua y abrir las cámaras de difusión (Figura 16). Se recuperaron los discos de agar, algunos fueron dispuestos sobre láminas para ser observados en estereoscopio.

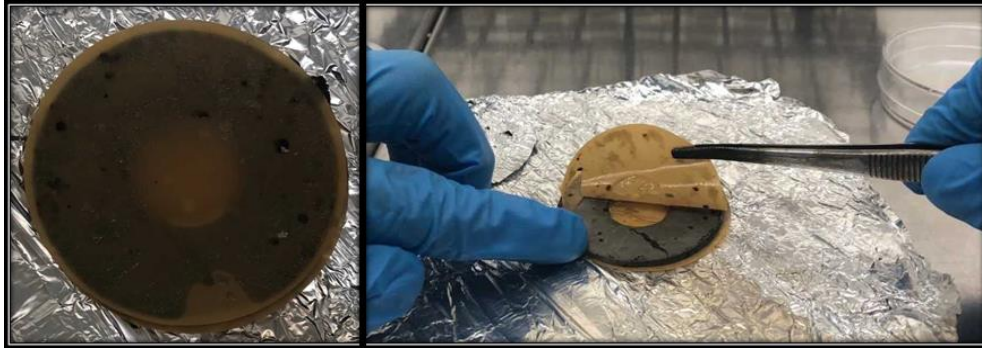


Figura 16. Apertura de cámaras de difusión y extracción de discos de agar.

Una vez retirados y colocados en cajas de Petri estériles, se procedió a hacer cortes longitudinales para la observación al microscopio, evaluando el crecimiento microbiano. Las morfologías más encontradas son bacilos cortos y largos en organización diferente (Figura 17).

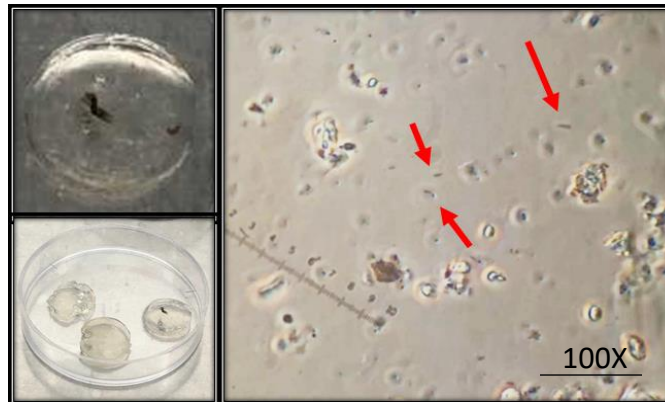


Figura 17. Discos de agar extraídos y microscopía en fresco. Las flechas rojas muestran bacilos cortos con organización individual

Los discos fueron nuevamente sembrados en medio estándar directo (MD) suplementado con glucosa y piruvato al 5 mM y extracto de levadura 0,5 g/L en placa y en tubo.

Se observó presencia de biopelículas en la superficie del agua, en las paredes del acuario y en los filtros de policarbonato; con ayuda de un asa redonda estéril se procedió a recolectar las biopelículas para ser sembradas por agotamiento en el medio estándar directo (MD)

suplementado. Adicionalmente se colocaron los filtros por adhesión, en placas del medio MD (Figura 18).

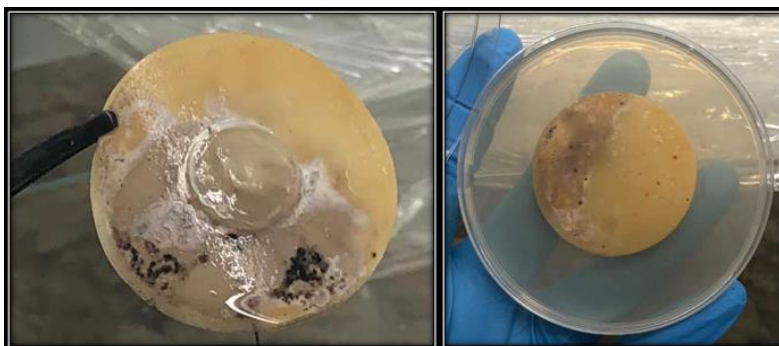


Figura 18. Biopelícula en los filtros de policarbonato junto con el disco de agar y siembra por adhesión en medio sólido.

Un total de ocho colonias fue seleccionado (3CD-1 a 3CD-8), a continuación, se hizo el reporte de las morfologías aisladas y purificadas en el medio MD (Tabla 10). Las seis colonias restantes se encuentran en proceso de purificación.

Tabla 10. Descripción de las morfologías aisladas del montaje de cámaras de difusión

Cepa	Macroscopía	Microscopía
3CD-1	Colonia circular, convexa de borde entero Amarilla	Bacilos medios, redondeados, móviles. Organización en parejas o cadenas cortas
3CD-2	Colonia circular, convexa de borde entero Rosado brillante	Bacilos largos, delgados, móviles. Organización en parejas o cadenas largas

Las morfologías observadas presentan ciertas diferencias con las reportadas en el diseño de medio de cultivo, el tamaño de estos bacilos es mayor y presentan una organización en agrupaciones (empalizada) pero no en cadenas.

Es posible afirmar que el método no convencional de cámaras de difusión permitió el crecimiento abundante de bacterias a partir de la muestra del manantial termal "Ojo del Diablo" (P3). Este método desarrollado por Bollmann y colaboradores (2007) es uno de los

diseñados para semejar las condiciones *in vivo* de manera *in vitro*. El enfoque del método se basa en colocar microorganismos en un espacio separado del ambiente por membranas de 0,22 μm de tamaño de poro, e incubar el montaje en el hábitat natural de los microorganismos objetivo.

Las membranas son permeables por moléculas de diversos tamaños, así como pequeños virus. La difusión proporciona a las células acceso a sus componentes de crecimiento naturales, incluidos nutrientes y posibles compuestos de señalización (Kikuchi et al., 2014). Se cree que algunos microorganismos pueden adquirir la capacidad de crecer en una placa de Petri después del cultivo repetido en una cámara de difusión (Bollmann et al., 2007; Grivalský et al., 2016). Este método ha sido poco utilizado para el aislamiento de microorganismos extremófilos de manantiales termales; sin embargo, su aplicación en la simulación de estos ambientes extremos podría brindar más información sobre la diversidad que poseen, y permitir el aislamiento de las especies no reportadas en estudios previos de la USBA. En el estudio de Vester y colaboradores (2015) fue posible aislar bacterias metanogénicas de ambientes nevados, mediante el ciclo de cultivo primero en cámaras de difusión y luego en medio de cultivo.

6.4. Perlas revestidas con polisulfona

Como resultado se obtuvo que esta metodología no convencional permitió el crecimiento de bacterias a partir de la muestra del manantial termal P3, en un soporte que asemejaba las condiciones *in vivo*. Debido al tamaño de las esferas y al doble encapsulamiento con polisulfona, se redujo el intercambio de nutrientes desde el medio, minimizando la posibilidad de microbiota oportunista y de crecimiento rápido. De igual manera el revestimiento se mantuvo intacto luego del periodo incubación de un mes en el ambiente respectivo, lo que permite la presencia de microorganismos de lento crecimiento (Ben-Dov et al., 2009).

Una vez cumplido el periodo de cultivo se procedió a extraer las perlas para posteriormente ser abiertas realizando cortes transversales con la ayuda de una cuchilla estéril, para observar al microscopio y estereoscopio para evaluar el crecimiento y el grosor del revestimiento respectivamente (Figura 19).

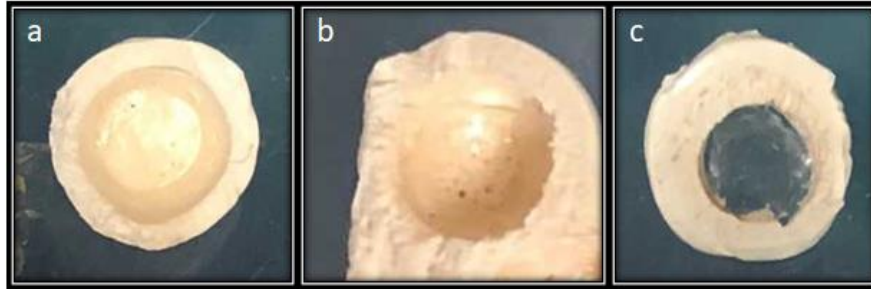


Figura 19. Corte transversal de las perlas revestidas con concentraciones de a) 10%, b) 15% y c) 20% de polisulfona

Una vez retirado el revestimiento se incubaron las perlas en medio líquido estándar directo (MD) suplementado, para su posterior identificación taxonómica. El efecto dilución no tuvo influencia ya que se presentó un crecimiento parecido en todas las diluciones. Por medio de la tinción de Gram (Figura 20) se observaron poblaciones similares en todas las diluciones y concentraciones de polisulfona. Aunque se presentan algunas parecidas a las obtenidas por las otras metodologías hay algunas que presentan diferencias. Frente al resultado de los controles, mediante siembra en agar MD de las esferas de control positivo, se logró recuperar la cepa 3MD1-415 sin presencia de ningún contaminante, esto fue confirmado por microscopía; las esferas de control negativo con agua destilada estéril no presentaron crecimiento.

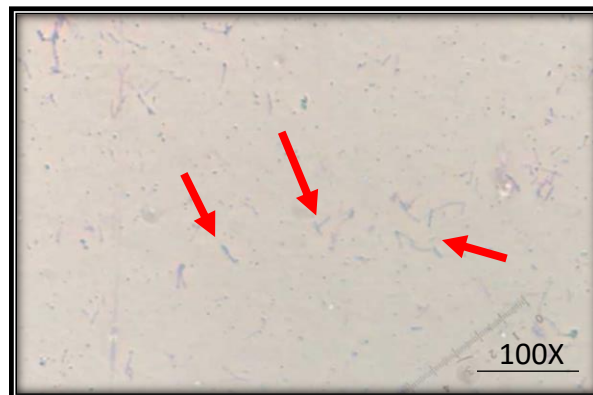


Figura 20. Tinción de Gram de agar extraído de perlas con revestimiento de polisulfona.

Los métodos de inmovilización activa incluyen diversas técnicas como el ataque químico, atrapamiento en geles de polímeros naturales o sintéticos, y el uso de agentes floclantes. (Moreno-Garrido, 2008). Dentro del segundo se encuentra el atrapamiento en matriz porosa, como son las perlas de agar y la membrana de polisulfona; este consiste en la inmovilización dentro de una matriz, que impide la difusión de las células en el medio, pero permite el paso de metabolitos y nutrientes (Kourkoutas et al., 2004).

La presencia de una doble capa genera una modificación en la técnica brindando más ventajas como una alta resistencia a sustancias tóxicas presentes en el medio, la inmovilización de diferentes especies de microorganismos, separados físicamente unos de otros, la resistencia a largos periodos de incubación e impedir que células libres en el medio se ubiquen sobre la superficie de la esfera y la degraden permitiendo la liberación de la biomasa inmovilizada (Kourkoutas et al., 2004; Mousavi et al., 2012).

6.4.1. Permeabilidad del revestimiento

A partir de una solución stock 0,1% (p/v) de azul de metileno se obtuvieron diferentes diluciones con concentraciones conocidas para construir una curva de calibración (Figura 21), posterior a esto se realizó el montaje para evaluar la permeabilidad sustituyendo la muestra con una solución de 0,01 mg/mL de azul de metileno y se tomaron alícuotas cada hora para medir densidad óptica por espectrofotometría a una longitud de onda de 660nm.

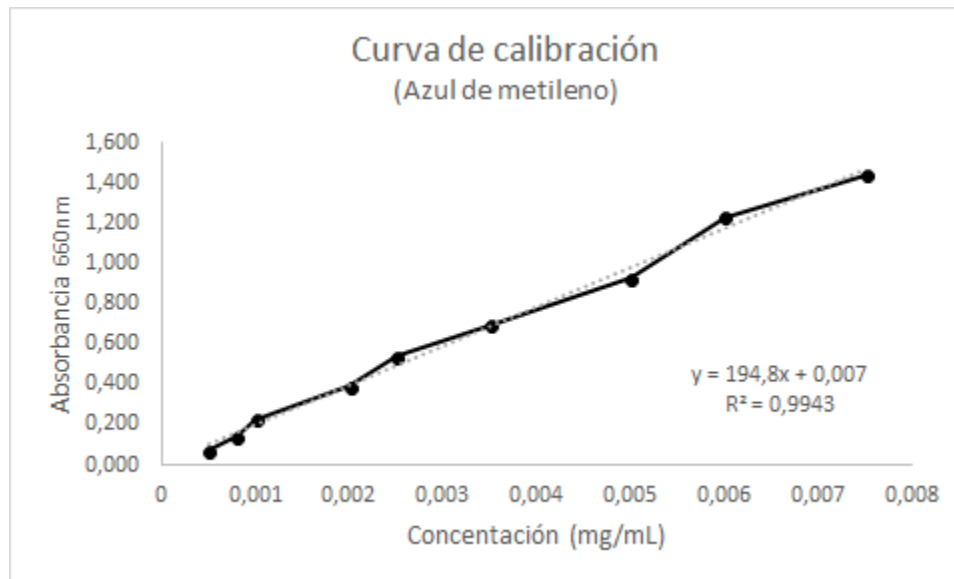


Figura 21. Curva de calibración de azul de metileno

En la Figura 22 se observa la velocidad de difusión para cada uno de los revestimientos. Mediante esto se demostró que la concentración de polisulfona en el revestimiento es inversamente proporcional al tamaño de los poros, lo que a su vez significa un aumento o disminución de la permeabilidad. Este factor influye en el flujo interno y externo de nutrientes y excreciones celulares (Kourkoutas et al., 2004); a pesar de que las diluciones no afectaron la concentración celular en un mismo montaje, se observó una mayor cantidad de células en la microscopía del montaje al 10% comparado con el montaje al 20% de polisulfona.

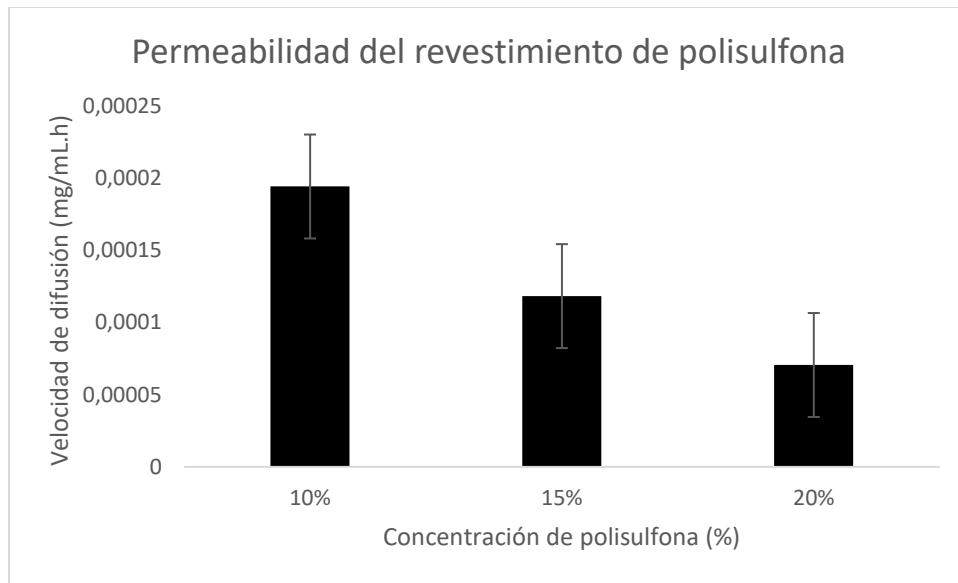


Figura 22. Velocidad de difusión del azul de metileno en esferas revestidas con diferentes concentraciones de polisulfona

Estos resultados muestran una velocidad de difusión menor a la obtenía por Ben-Dov y colaboradores (2009), ya que a una concentración de 10% de polisulfona es mayor a 0,4 mg/mL.h, mientras que el obtenido en este estudio es de cerca de 0,0002 mg/mL.h. Esto puede significar que la difusión de nutrientes hacia la perla fue mas baja, lo que hace una condición aún más limitante para el crecimiento microbiano.

7. CONCLUSIONES

Mediante el uso de un medio de cultivo diseñado con base a las características fisicoquímicas del manantial “Ojo del Diablo” (P3) del municipio de Paipa, Boyacá, se lograron obtener ocho morfotipos; de los cuales dos fueron secuenciados e identificado y seis se encuentran en proceso. Igualmente se consiguió lo esperado al obtener un mayor número de colonias en el medio control R₂A por sus características nutricionales; sin embargo, la obtención de un total de 38 colonias en todo el montaje no fue esperado ya que las condiciones como periodos largos de incubación, bajas concentraciones de fuentes de carbono y especificidad de nutrientes, eran considerados limitantes en el crecimiento celular; esto además causó un atraso en el proceso de aislamiento y purificación de todas las colonias y por lo tanto en su identificación.

El tiempo prolongado de incubación, la baja concentración de nutrientes y la composición balanceada de micro y macroelementos permitieron aislar e identificar tres especies halófilas y termófilas del manantial termal “Ojo del Diablo”; según el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA se identificó a *Geobacillus stearothermophilus*, *Rubrobacter taiwanesis* y *Rhodothermus marinus* con una similitud del 99%, 100% y 74% respectivamente. Estas especies, aunque se encuentran previamente reportadas por métodos convencionales dependientes e independientes de cultivo, no figuran dentro de las cepas aisladas por investigadores de la USBA.

Por otro lado, la aplicación de métodos no convencionales como cámaras de difusión y perlas revestidas con polisulfona cumplieron su función como soportes celulares ya que permitieron replicar de cerca las condiciones ambientales a *in vitro*, esto se evidenció por el crecimiento en ambos montajes. La obtención de un bajo número de colonias luego de la siembra de las biopelículas y los filtros del montaje de cámaras de difusión es prometedor, ya que se redujo la variabilidad debido a las condiciones de cultivo, dando vía libre a los microorganismos de crecimiento lento. De igual manera, los cultivos líquidos realizados a partir de las perlas extraídas luego del periodo de incubación han presentado poca turbidez, lo que podría significar una baja cantidad de células recuperadas debido a la reducción de la variabilidad por las condiciones limitantes del montaje.

Se logró aportar nuevos protocolos de aislamiento, diferentes a los utilizados por la USBA, dándole espacio a las metodologías no convencionales que pueden permitir la recuperación de diferentes morfotipos no descritos previamente en ambientes extremos y abriendo una nueva área de interés para la aplicación de otros métodos reportados con estas características.

8. REFERENCIAS

- Albokari, M., Arishi, A., & Essa, A. (2018). Molecular Analysis of the Bacterial Communities from Tannery Contaminated Sites in Riyadh, Saudi Arabia. *Res. J. Biotech*, 13(2), 46–53.
- Albuquerque, L., & da Costa, M. S. (2014). The Family Rubrobacteraceae. En *The Prokaryotes* (pp. 861–866). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30138-4_202
- Alfaro, C. (2005). *Modelo Conceptual Preliminar del Sistema Geotérmico de Paipa*. Bogotá, Colombia.
- Alfredson, G. A., Kristjansson, J. K., Sigridur, H., & Stetter, K. O. (1988). Bacterium from Submarine Hot Springs in Iceland. *Journal of General Microbiology*, 134(1988), 299–306.
- Allsopp, D., Colwell, R., & Hawksworth, D. (1995). *Microbial Diversity and Ecosystem Function* (6ta ed.). Wallingford, Oxon, UK: CAB International in association with United Nations Environment Programme.
- Andrei, A. Ş., Banciu, H. L., & Oren, A. (2012). Living with salt: Metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. *FEMS Microbiology Letters*, 330(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02526.x>
- Arya, M., Joshi, G. K., Gupta, A. K., Kumar, A., & Raturi, A. (2015). Isolation and characterization of thermophilic bacterial strains from Soldhar (Tapovan) hot spring in Central Himalayan Region, India. *Annals of Microbiology*, 65(3), 1457–1464. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0984-y>
- Ash, C., Priest, F. G., & Collins, M. D. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus Paenibacillus. *Antonie van Leeuwenhoek*, 64(3–4), 253–260. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8085788>
- Ashton, B. A., Eaglesom, C. C., Bab, I., & Owen, M. E. (1984). Distribution of fibroblastic colony-forming cells in rabbit bone marrow and assay of their osteogenic potential by an in vivo diffusion chamber method. *Calcified Tissue International*, 36(1), 83–86. <https://doi.org/10.1007/BF02405298>
- Baena, S., Perdomo, N., Carvajal, C., Díaz, C., & Patel, B. K. C. (2011). Desulfosoma caldarium gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfate-reducing bacterium from a terrestrial hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(4), 732–736. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.020586-0>
- Beldarraín, T., González, A., & Kala, D. (2011). Métodos de identificación de cepas productoras de ácido láctico aisladas a partir de matrices alimentarias. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 21(1), 72–79.

- Ben-Dov, E., Kramarsky-Winter, E., & Kushmaro, A. (2009). An in situ method for cultivating microorganisms using a double encapsulation technique. *FEMS Microbiology Ecology*, 68(3), 363–371. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00682.x>
- Berekaa, M. M., Zaghoul, T. I., Abdel-Fattah, Y. R., Saeed, H. M., & Sifour, M. (2009). Production of a novel glycerol-inducible lipase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(2), 287–294. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9891-3>
- Blasco Pla, R., & Castillo Rodríguez, F. (2014). Acerca de la biotecnología ambiental. *Arbor*, 190(768), a157. <https://doi.org/10.3989/arbor.2014.768n4011>
- Bobet, R., Martínez, M., Yuste, M., Esteve, B., Álvarez, J. ., Cantarero, J., & Rubires, X. (2004). Application de l'impédance électrique pour le contrôle microbiologique des vins embouteillés. *Revue française d'oenologie*, 205, 34–36.
- Bohorquez, L. C., Delgado-Serrano, L., López, G., Osorio-Forero, C., Klepac-Ceraj, V., Kolter, R., ... Zambrano, M. M. (2012). In-depth Characterization via Complementing Culture-Independent Approaches of the Microbial Community in an Acidic Hot Spring of the Colombian Andes. *Microbial Ecology*, 63(1), 103–115. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9943-3>
- Bollmann, A., Lewis, K., & Epstein, S. S. (2007). Incubation of Environmental Samples in a Diffusion Chamber Increases the Diversity of Recovered Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20), 6386–6390. <https://doi.org/10.1128/AEM.01309-07>
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Brown, J. W. (1990). Microbiology of extreme environments. Environmental biotechnology series. *Cell*, 62(3), 411–412. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90005-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90005-Y)
- Bryanskaya, A. V., Rozanov, A. S., Slynko, N. M., Shekhovtsov, S. V., & Peltek, S. E. (2015). *Geobacillus icigianus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(3), 864–869. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000029>
- Burgess, S. A., Flint, S. H., & Lindsay, D. (2014). Characterization of thermophilic bacilli from a milk powder processing plant. *Journal of Applied Microbiology*, 116(2), 350–359. <https://doi.org/10.1111/jam.12366>
- Burgess, S. A., Flint, S. H., Lindsay, D., Cox, M. P., & Biggs, P. J. (2017). Insights into the *Geobacillus stearothermophilus* species based on phylogenomic principles. *BMC Microbiology*, 17(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1047-x>
- Castillo-Carvajal, L., & Barragán-Huerta, B. (2011). Aplicaciones Biotecnológicas de

Microorganismos Halófilos. *Revista Sistemas Ambientales*, 4(2), 45–54.

Castillo, F., & Roldán, M. D. (2005). *Biotecnología ambiental* (4ta ed.). Madrid, España: Tebar, S.L.

Chaparro, Cithia V.; Cabanzo, Rafael; Mejia-Ospino, E. (2013). Estudio De La Adsorción De Azul De Metileno Sobre Oxido De Grafeno. *Revista Colombiana de materiales*, 33(5), 131–139.

Chen, M.-Y. (2004). *Rubrobacter taiwanensis* sp. nov., a novel thermophilic, radiation-resistant species isolated from hot springs. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 54(5), 1849–1855. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.63109-0>

Cocolin, L., Campolongo, S., Alessandria, V., Dolci, P., & Rantsiou, K. (2011). Culture independent analyses and wine fermentation: an overview of achievements 10 years after first application. *Annals of Microbiology*, 61(1), 17–23. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0076-6>

Coorevits, A., Dinsdale, A. E., Halket, G., Lebbe, L., De Vos, P., Van Landschoot, A., & Logan, N. A. (2012). Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly “*thermoglucosidasius*”); transfer of *Bacillus thermantarcticus*. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 62(Pt 7), 1470–1485. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.030346-0>

Cordova, L. T., & Antoniewicz, M. R. (2016). ¹³C metabolic flux analysis of the extremely thermophilic, fast growing, xylose-utilizing *Geobacillus* strain LC300. *Metabolic Engineering*, 33, 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.06.004>

Corning Incorporated. (2010). *Transwell permeable support selection and use guide*. One Riverfront Plaza, Corning, NY.

Cortés, L., & Cardona, J. J. (2006). *Cartografía geológica detallada para el salado de Consotá y sus alrededores*. Universidad Tecnológica de Pereira-Sociedad Colombiana de Arqueología, Pereira.

Dąbrowski, S., Olszewski, M., Piątek, R., & Kur, J. (2002). Novel thermostable ssDNA-binding proteins from *Thermus thermophilus* and *T. aquaticus* - Expression and purification. *Protein Expression and Purification*, 26(1), 131–138. [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(02\)00504-1](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(02)00504-1)

Danis, O., Ogan, A., Tatlıcan, P., Attar, A., Cakmakci, E., Mertoglu, B., & Birbir, M. (2015). Preparation of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) films from halophilic archaea and their potential use in drug delivery. *Extremophiles*, 19(2), 515–524. <https://doi.org/10.1007/s00792-015-0735-4>

Davis, K. E. R., Joseph, S. J., & Janssen, P. H. (2005). Effects of Growth Medium, Inoculum Size, and Incubation Time on Culturability and Isolation of Soil Bacteria. *Applied and*

Environmental Microbiology, 71(2), 826–834. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.826-834.2005>

- Delgado-Serrano, L., López, G., Bohorquez, L. C., Bustos, J. R., Rubiano, C., Osorio-Forero, C., ... Zambrano, M. M. (2014). Neotropical Andes hot springs harbor diverse and distinct planktonic microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 89(1), 56–66. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12333>
- Deole, R., Challacombe, J., Raiford, D. W., & Hoff, W. D. (2013). An Extremely Halophilic Proteobacterium Combines a Highly Acidic Proteome with a Low Cytoplasmic Potassium Content. *Journal of Biological Chemistry*, 288(1), 581–588. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.420505>
- Días-Cárdenas, C. (2011). *Estudio de la diversidad microbiana en manantiales salinos en Risaralda y Boyacá (Colombia)*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Díaz-Cárdenas, C., & Baena, S. (2015). Manantiales salinos: inventarios de la diversidad metabólica y filogenética de microorganismos de ambientes salinos. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat*, 39(152), 358–373. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.199>
- DiGregorio, B. E. (2013). Climate Change Affecting Microbes in North America Soils. *Microbe Magazine*, 8(11), 436–437. <https://doi.org/10.1128/microbe.8.436.1>
- Edbeib, M. F., Wahab, R. A., & Huyop, F. (2016). Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(8), 135. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2081-9>
- Egan, K., Kelleher, P., Field, D., Rea, M. C., Ross, R. P., Cotter, P. D., & Hill, C. (2017). Genome Sequence of *Geobacillus stearothermophilus* DSM 458, an Antimicrobial-Producing Thermophilic Bacterium, Isolated from a Sugar Beet Factory. *Genome Announcements*, 5(43), e01172-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01172-17>
- Eichler, J. (2001). Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnology Advances*, 19(4), 261–278. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(01\)00061-1](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(01)00061-1)
- Fortina, M. G., Mora, D., Schumann, P., Parini, C., Manachini, P. L., & Stackebrandt, E. (2001). Reclassification of *Saccharococcus caldxylosilyticus* as *Geobacillus caldxylosilyticus* (Ahmad et al. 2000) comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(6), 2063–2071. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2063>
- Goh, K. M., Chan, K.-G., Lim, S. W., Liew, K. J., Chan, C. S., Shamsir, M. S., ... Adrian, T.-G.-S. (2016). Genome Analysis of a New Rhodothermaceae Strain Isolated from a Hot Spring. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01109>
- Grivalský, T., Bučková, M., Puškárová, A., Kraková, L., & Pangallo, D. (2016). Water-related environments: a multistep procedure to assess the diversity and enzymatic properties of cultivable bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(3), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1997-9>

- Haki, G. D., & Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource technology*, *89*(1), 17–34. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12676497>
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M., & Pace, N. R. (1998). Erratum: Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity (*Journal of Bacteriology* (1998) 180:18 (4765-4774)). *Journal of Bacteriology*, *180*(24), 6793. [https://doi.org/0021-9193/98/\\$04.00+0](https://doi.org/0021-9193/98/$04.00+0)
- Huys, G., Vanhoutte, T., & Vandamme, P. (2008). Application of Sequence-Dependent Electrophoresis Fingerprinting in Exploring Biodiversity and Population Dynamics of Human Intestinal Microbiota: What Can Be Revealed? *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, *2008*, 1–26. <https://doi.org/10.1155/2008/597603>
- Ivanov, M. V., Lysenko, A. M., Petrunyaka, V. V., Ivanova, A. E., Nazina, T. N., Poltarau, A. B., ... Osipov, G. A. (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus th.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *51*(2), 433–446. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-2-433>
- Jenkins, S., Swenson, T. L., Lau, R., Rocha, A., Aaring, A., Hazen, T. C., ... Northen, T. R. (2017). Construction of soil defined media using quantitative exometabolomic analysis of soil metabolites. *bioRxiv*, *8*(December), 1–12. <https://doi.org/10.1101/151282>
- Jurado, V., Miller, A. Z., Alias-Villegas, C., Laiz, L., & Saiz-Jimenez, C. (2012). *Rubrobacter bracarensis* sp. nov., a novel member of the genus *Rubrobacter* isolated from a biodeteriorated monument. *Systematic and Applied Microbiology*, *35*(5), 306–309. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.04.007>
- Kaeberlein, T. (2002). Isolating “Uncultivable” Microorganisms in Pure Culture in a Simulated Natural Environment. *Science*, *296*(5570), 1127–1129. <https://doi.org/10.1126/science.1070633>
- Kampfer, P., Glaeser, S. P., Busse, H.-J., Abdelmohsen, U. R., & Hentschel, U. (2014). *Rubrobacter aplysinae* sp. nov., isolated from the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, *64*(Pt 3), 705–709. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.055152-0>
- Kanekar, P. P., Kanekar, S. P., Kelkar, A. S., & Dhakephalkar, P. K. (2012). Halophiles – Taxonomy, Diversity, Physiology and Applications. En *Microorganisms in Environmental Management* (pp. 1–34). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2229-3_1
- Kates, M. (1992). Archaeobacterial lipids: structure, biosynthesis and function. *Biochemical Society symposium*, *58*, 51–72. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1445410>

- Kikuchi, S., Makita, H., Takai, K., Yamaguchi, N., & Takahashi, Y. (2014). Characterization of biogenic iron oxides collected by the newly designed liquid culture method using diffusion chambers. *Geobiology*, 12(2), 133–145. <https://doi.org/10.1111/gbi.12073>
- Koneman, E., & Stephen, A. (2008). *Koneman. Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/ Text and Color Atlas* (6ta ed.). Buenos Aires, Argentina: Ed. Médica Panamericana.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I. ., Marchant, R., & Koutinas, A. . (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*, 21(4), 377–397. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.10.005>
- Kremen, C. (1992). Assessing the Indicator Properties of Species Assemblages for Natural Areas Monitoring. *Ecological Applications*, 2(2), 203–217.
- Krulwich, T. A., Sachs, G., & Padan, E. (2011). Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, 9(5), 330–343. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2549>
- Kusumi, A., Li, X., Osuga, Y., Kawashima, A., Gu, J.-D., Nasu, M., & Katayama, Y. (2013). Bacterial Communities in Pigmented Biofilms Formed on the Sandstone Bas-Relief Walls of the Bayon Temple, Angkor Thom, Cambodia. *Microbes and Environments*, 28(4), 422–431. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME13033>
- Laiz, L., Miller, A. Z., Jurado, V., Akatova, E., Sanchez-Moral, S., Gonzalez, J. M., ... Saiz-Jimenez, C. (2009). Isolation of five *Rubrobacter* strains from biodeteriorated monuments. *Naturwissenschaften*, 96(1), 71–79. <https://doi.org/10.1007/s00114-008-0452-2>
- Lane, D. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (Editors), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: John Wiley and Sons, 115–175.
- León, M. J., Fernández, A. B., Ghai, R., Sánchez-Porro, C., Rodríguez-Valera, F., & Ventosa, A. (2014). From Metagenomics to Pure Culture: Isolation and Characterization of the Moderately Halophilic Bacterium *Spiribacter salinus* gen. nov., sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(13), 3850–3857. <https://doi.org/10.1128/AEM.00430-14>
- Lewis, K., Epstein, S., D’Onofrio, A., & Ling, L. L. (2010). Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites. *Journal of Antibiotics*, 63(8), 468–476. <https://doi.org/10.1038/ja.2010.87>
- López-Cortés, A., De-Bashan, L. E., Jiménez, M. B., & Bashan, Y. (2015). La Investigación en Microbiología Ambiental en Baja California: Importancia y Usos. *Recursos Naturales y Sociedad*, 1(7), 83–98.
- López, G., Cañas-Duarte, S. J., Pinzón-Velasco, A. M., Vega-Vela, N. E., Rodríguez, M.,

- Restrepo, S., & Baena, S. (2017). Description of a new anaerobic thermophilic bacterium, *Thermoanaerobacterium butyriciformans* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, *40*(2), 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.11.006>
- Lücking, G., Stoeckel, M., Atamer, Z., Hinrichs, J., & Ehling-Schulz, M. (2013). Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, *166*(2), 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.004>
- Lutnaes, B. F., Strand, Å., Pétursdóttir, S. K., & Liaaen-Jensen, S. (2004). Carotenoids of thermophilic bacteria - *Rhodothermus marinus* from submarine Icelandic hot springs. *Biochemical Systematics and Ecology*, *32*(5), 455–468. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2003.09.005>
- Madigan, M. T., & Oren, A. (1999). Thermophilic and halophilic extremophiles. *Current Opinion in Microbiology*, *2*(3), 265–269. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)80046-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80046-0)
- Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, *5*(2), 73–83. <https://doi.org/10.1007/s007920100184>
- Marion, G. M., Fritsen, C. H., Eicken, H., & Payne, M. C. (2003). The Search for Life on Europa: Limiting Environmental Factors, Potential Habitats, and Earth Analogues. *Astrobiology*, *3*(4), 785–811. <https://doi.org/10.1089/153110703322736105>
- Martinez, J. V., García, A., & Martinez, V. (2016). Identificación de tardígrados en cenotes ubicados en Yucatán. *Kuxulkab*, *22*(43), 5–12.
- Mata, J. (2006). *Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros Halomonas, Alteromonas, Idiomarina, Palleronia y Salipiger*. Universidad de Granada.
- Mehta, D., & Satyanarayana, T. (2013). Biochemical and molecular characterization of recombinant acidic and thermostable raw-starch hydrolysing α -amylase from an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *85–86*, 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.08.017>
- Meseguer, I. (2004). Los microorganismos halófilos y su potencial aplicado en biotecnología. *Ciencia e Investigación*, *VII*(2), 13–17.
- Millard, P. J., Roth, B. L., Thi, H. P. T., Yue, S. T., & Haugland, R. P. (1997). Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*(7), 2897–2905.
- Mohtar, N. S., Abdul Rahman, M. B., Raja Abd Rahman, R. N. Z., Leow, T. C., Salleh, A. B., & Mat Isa, M. N. (2016). Expression and characterization of thermostable glycogen branching enzyme from *Geobacillus mahadia* Geo-05. *PeerJ*, *4*, e2714. <https://doi.org/10.7717/peerj.2714>

- Moreno-Garrido, I. (2008). Microalgae immobilization: Current techniques and uses. *Bioresource Technology*, 99(10), 3949–3964. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.040>
- Morozkina, E. V., Slutskaia, E. S., Fedorova, T. V., Tugay, T. I., Golubeva, L. I., & Koroleva, O. V. (2010). Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46(1), 1–14. <https://doi.org/10.1134/S0003683810010011>
- Mousavi, S. M., Saljoughi, E., Ghasemipour, Z., & Hosseini, S. A. (2012). Preparation and characterization of modified polysulfone membranes with high hydrophilic property using variation in coagulation bath temperature and addition of surfactant. *Polymer Engineering & Science*, 52(10), 2196–2205. <https://doi.org/10.1002/pen.23179>
- Mueller, P. R., & Wold, B. (1989). In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR. *Science*, 246(4931), 780–786. <https://doi.org/10.1126/science.2814500>
- Nichols, D., Cahoon, N., Trakhtenberg, E. M., Pham, L., Mehta, A., Belanger, A., ... Epstein, S. S. (2010). Use of Ichip for High-Throughput In Situ Cultivation of “Uncultivable” Microbial Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(8), 2445–2450. <https://doi.org/10.1128/AEM.01754-09>
- Niño, J., & Dussan, J. (2013). *Biosurfactant production by Geobacillus sp in different types of crude oil obtained from Orinoquía region, Colombia* Juliana Niño, Jenny Dussan. Universidad de los Andes.
- Norman, J. S., King, G. M., & Friesen, M. L. (2017). *Rubrobacter spartanus* sp. nov., a moderately thermophilic oligotrophic bacterium isolated from volcanic soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(9), 3597–3602. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002175>
- Oliart-Ros, R. M., Manresa-Presas, Á., & Sánchez-Otero, M. G. (2016). Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *CienciaUAT*, 11(1), 79–90. Recuperado a partir de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-78582016000200079#B44
- Prince, C. (2014). *Técnicas De Cultivo Y Moleculares Para El Estudio De Las Comunidades Microbianas En Aguas Hospitalarias*. Universitat de les Illes Balears.
- Ramírez, S. (2018). Las fronteras de la vida desde la perspectiva de los extremófilos. *Inventio*, 11(6), 66.
- Rampelotto, P. (2013). Extremophiles and Extreme Environments. *Life*, 3(3), 482–485. <https://doi.org/10.3390/life3030482>
- Rangel, O. (2011). *Colombia Diversidad Biótica I*. Bogota, Colombia.

- Rangel - Ch., J. O. (2015). La biodiversidad de Colombia: significado y distribución regional. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 39(51), 176. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.136>
- Rao, S., Chan, O. W., Lacap-Bugler, D. C., & Pointing, S. B. (2016). Radiation-Tolerant Bacteria Isolated from High Altitude Soil in Tibet. *Indian Journal of Microbiology*, 56(4), 508–512. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0604-6>
- Regev, R., Peri, I., Gilboa, H., & Avi-Dor, Y. (1990). ¹³C NMR study of the interrelation between synthesis and uptake of compatible solutes in two moderately halophilic eubacteria. Bacterium Ba1 and Vibro costicola. *Archives of biochemistry and biophysics*, 278(1), 106–112. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2321951>
- Rekadwad, B. N., & Khobragade, C. N. (2017). Morphotypes and pigment profiles of halophilic bacteria: Practical data useful for novelty, taxonomic categorization and for describing novel species or new taxa. *Data in Brief*, 13, 609–619. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.06.039>
- Rodríguez, M. (2017). *Aportes desde el enfoque agroecológico para el manejo de la salinidad del suelo con bacterias halófilas en Sáchica, Boyacá*. UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES U.D.C.A.
- Romero, M., Cabrera, E., & Ortiz, N. (2008). *Informe sobre el estado de la biodiversidad en Colombia 2006-2007*. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Rothschild, L. J., & Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature*, 409(6823), 1092–1101. <https://doi.org/10.1038/35059215>
- Rubiano-Labrador, C. (2006). *Aislamiento y caracterización de microorganismos termófilos anaeróbios lipolíticos, proteolíticos y amilolíticos de manantiales termominerales de Paipa e Iza (Boyacá)*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Rubiano-Labrador, C., Baena, S., Díaz-Cárdenas, C., & Patel, B. K. C. (2013). Caloramator quimbayensis sp. nov., an anaerobic, moderately thermophilic bacterium isolated from a terrestrial hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART4), 1396–1402. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.037937-0>
- Sanchez, L. C., & Arguello, H. (2006). Capacidad de Bacterias Halofilas para Capturar Sodio in Vitro y su Posible Aplicacion en Biorremediacion en Suelos Salinos-Sodicos. *NOVA*, 4(6), 19–32. Recuperado a partir de http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA6_ARTORIG1.pdf
- Sardari, R. R. R., Kulcinskaja, E., Ron, E. Y. C., Björnsdóttir, S., Friðjónsson, Ó. H., Hreggviðsson, G. Ó., & Karlsson, E. N. (2017). Evaluation of the production of exopolysaccharides by two strains of the thermophilic bacterium *Rhodothermus marinus*. *Carbohydrate Polymers*, 156, 1–8.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.062>

- Schneegurt, M. A. (2012). Media and Conditions for the Growth of Halophilic and Halotolerant Bacteria and Archaea. En *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms* (pp. 35–58). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5539-0_2
- Seckbach, J., Oren, A., & Stan-Lotter, H. (2013). *Polyextremophiles*. (J. Seckbach, A. Oren, & H. Stan-Lotter, Eds.) (Vol. 27). Dordrecht: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6488-0>
- Sohier, D., & Lonvaud-Funel, A. (1998). Rapid and sensitive in situ hybridization method for detecting and identifying lactic acid bacteria in wine. *Food Microbiology*, 15(4), 391–397. <https://doi.org/10.1006/fmic.1998.0189>
- Stackebrandt, E., & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(4), 846–849. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-846>
- Staley, J. T., & Konopka, A. (1985). Measurement of in Situ Activities of Nonphotosynthetic Microorganisms in Aquatic and Terrestrial Habitats. *Annual Review of Microbiology*, 39(1), 321–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.39.100185.001541>
- Stan-Lotter, H. (2017). *Adaption of Microbial Life to Environmental Extremes*. (H. Stan-Lotter & S. Fendrihan, Eds.). Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-48327-6>
- Stetter, K. O. (1999). Extremeophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Letters*, 452, 22–25. Recuperado a partir de [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00663-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00663-8)
- Stewart, E. J. (2012). Growing Unculturable Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 194(16), 4151–4160. <https://doi.org/10.1128/JB.00345-12>
- Suzuki, K., Collins, M., Iijima, E., & Komagata, K. (1988). Chemotaxonomic characterization of a radiotolerant bacterium, *Arthrobacter radiotolerans*: Description of *Rubrobacter radiotolerans* gen. nov., comb. nov. *FEMS Microbiology Letters*, 52(1–2), 33–39.
- Suzuki, Y., Kishigami, T., Inoue, K., Mizoguchi, Y., Eto, N., Takagi, M., & Abe, S. (1983). *Bacillus thermoglucosidasius* sp. nov., a New Species of Obligately Thermophilic Bacilli. *Systematic and Applied Microbiology*, 4(4), 487–495. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(83\)80006-X](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(83)80006-X)
- Tanaka, T., Kawasaki, K., Daimon, S., Kitagawa, W., Yamamoto, K., Tamaki, H., ... Kamagata, Y. (2014). A Hidden Pitfall in the Preparation of Agar Media Undermines Microorganism Cultivability. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(24), 7659–7666. <https://doi.org/10.1128/AEM.02741-14>

- Terato, H., SUZUKI, K., NISHIOKA, N., OKAMOTO, A., SHIMAZAKI-TOKUYAMA, Y., INOUE, Y., & SAITO, T. (2011). Characterization and Radio-resistant Function of Manganese Superoxide Dismutase of *Rubrobacter radiotolerans*. *Journal of Radiation Research*, *52*(6), 735–742. <https://doi.org/10.1269/jrr.11105>
- Thompson, H., Rybalka, A., Moazzez, R., Dewhirst, F. E., & Wade, W. G. (2015). In Vitro Culture of Previously Uncultured Oral Bacterial Phylotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(24), 8307–8314. <https://doi.org/10.1128/AEM.02156-15>
- Timmis, K., de Lorenzo, V., Verstraete, W., Garcia, J. L., Ramos, J. L., Santos, H., ... Dixon, B. (2014). Pipelines for New Chemicals : a strategy to create new value chains and stimulate innovation-based economic revival in Southern European countries. *Environmental Microbiology*, *16*(1), 9–18. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12337>
- Van den Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, *6*(3), 213–218. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00060-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00060-2)
- Van Zandycke, S. M., Simal, O., Gualdoni, S., & Smart, K. A. (2003). Determination of Yeast Viability Using Fluorophores. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *61*(1), 15–22. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-61-0015>
- Vartoukian, S. R., Palmer, R. M., & Wade, W. G. (2010). Strategies for culture of “unculturable” bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02000.x>
- Vester, J. K., Glaring, M. A., & Stougaard, P. (2015). Improved cultivation and metagenomics as new tools for bioprospecting in cold environments. *Extremophiles*, *19*(1), 17–29. <https://doi.org/10.1007/s00792-014-0704-3>
- Widderich, N., Höppner, A., Pittelkow, M., Heider, J., Smits, S. H. J., & Bremer, E. (2014). Biochemical Properties of Ectoine Hydroxylases from Extremophiles and Their Wider Taxonomic Distribution among Microorganisms. *PLoS ONE*, *9*(4), e93809. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093809>
- Wiegand, S., Rabausch, U., Chow, J., Daniel, R., Streit, W. R., & Liesegang, H. (2013). Complete Genome Sequence of *Geobacillus* sp. Strain GHH01, a Thermophilic Lipase-Secreting Bacterium. *Genome Announcements*, *1*(2), e00092-13-e00092-13. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00092-13>
- Winterberg, H. (1898). Sobre la Metodología del Conteo Bacteriano. *Zeitschr. f. Hyg*, *29*, 75–93.
- Wissuwa, J., Stokke, R., Fedøy, A.-E., Lian, K., Smalås, A. O., & Steen, I. H. (2016). Isolation and complete genome sequence of the thermophilic *Geobacillus* sp. 12AMOR1 from an Arctic deep-sea hydrothermal vent site. *Standards in Genomic Sciences*, *11*(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s40793-016-0137-y>
- Woese, C. R. (1993). Introduction The archaea: Their history and significance. *New Comprehensive Biochemistry*, *26*, 7–29. <https://doi.org/10.1016/S0167->

7306(08)60248-3

- Yin, J., Chen, J.-C., Wu, Q., & Chen, G.-Q. (2015). Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnology Advances*, 33(7), 1433–1442. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.008>
- Yoshinaka, T., Yano, K., & Yamaguchi, H. (1973). Isolation of Highly Radioresistant Bacterium, *Arthrobacter radiotolerans* nov. sp. *Agricultural and Biological Chemistry*, 37(10), 2269–2275. <https://doi.org/10.1080/00021369.1973.10861003>
- Youssef, N. H., Couger, M. B., McCully, A. L., Criado, A. E. G., & Elshahed, M. S. (2015). Assessing the global phylum level diversity within the bacterial domain: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(3), 269–282. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2014.10.005>

9. ANEXOS

9.1. Anexo 1. Análisis fisicoquímicos: Manantial termal "Ojo del Diablo" (P3)

Informe de Laboratorio	
Lugar de toma de muestra:	Manantial termal P3
Ensayo:	Resultado:
Alcalinidad total	2073 mg/L CaCO ₃
Calcio	102,1 mg/L Ca
Carbono orgánico total	28,91 mg/L COT
Cloruros	5556,1 mg/L Cl ⁻
Fosforo total	1,2 mg/L P
Hierro	0,44 mg/L Fe
Magnesio	32,1 mg/L Mg
Manganeso	1,70 mg/L Mn
Nitratos	< 0,22 mg/L N
Nitrógeno amoniacal - amonio	1,96 mg/L N
Nitrógeno total KJELDAHL	< 3,3 mg/L N
Potasio	25550 mg/L K
Salinidad	27,6 PSS*
Sodio	30954 mg/L Na
Sulfatos	32300 mg/L SO ₄
Sulfitos	< 1 mg/L SO ₃

*Porcentaje de Sodio Soluble

Los estudios fueron realizados por una empresa externa (ANALQUIM LTDA.) y se reporta como referencia (SM): Estándar Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22d Edition, 2012.

9.2. Anexo 1. Reporte de crecimiento por dilución y por fuente de carbono del esquema de trabajo luego de 4 semanas de incubación.

% NaCl	Medio	Dilución	Réplica	Concentración (mM)			% NaCl	Medio	Dilución	Réplica	Concentración (mM)		
				1.5	5	12					1.5	5	12
0%	MC	10 ⁻³	R ₁	-	/	-	3%	MC	10 ⁻³	R ₁	/	-	-
			R ₂	-	/	/				R ₂	-	-	/
			R ₃	/	-	-				R ₃	+	-	-
		10 ⁻⁴	R ₁	-	-	-			R ₁	-	-	-	
			R ₂	/	-	/			R ₂	-	/	-	
			R ₃	-	-	-			R ₃	/	-	-	
		10 ⁻⁵	R ₁	-	-	/			R ₁	-	/	/	
			R ₂	-	-	-			R ₂	-	/	/	
			R ₃	/	/	-			R ₃	/	-	-	
	MR	10 ⁻³	R ₁	+	+	+		MD	10 ⁻³	R ₁	-	/	/
		10 ⁻⁴	R ₁	/	+	/				R ₂	-	-	-
		10 ⁻⁵	R ₁	-	-	+				10 ⁻⁴	R ₁	-	-
					R ₂	-	-		-				
					10 ⁻⁵	R ₁	/		-	-			
						R ₂	/		-	/			
					10 ⁻³	R ₁	+		+	+			
					10 ⁻⁴	R ₁	+		+	+			
					10 ⁻⁵	R ₁	+		+	+			

MIX
(acetato, citrato y formiato)

% NaCl	Medio	Dilución	Réplica	Concentración (mM)			% NaCl	Medio	Dilución	Réplica	Concentración (mM)		
				1.5	5	12					1.5	5	12
0%	MC	10 ⁻³	R ₁	-	-	-	3%	MC	10 ⁻³	R ₁	-	-	/
			R ₂	-	/	/				R ₂	-	-	-
			R ₃	-	-	-				R ₃	-	-	-
		10 ⁻⁴	R ₁	-	-	-			10 ⁻⁴	R ₁	-	+	/
			R ₂	-	/	/				R ₂	-	+	+
			R ₃	/	/	-				R ₃	-	-	-
		10 ⁻⁵	R ₁	-	+	/			10 ⁻⁵	R ₁	+	+	+
			R ₂	-	+	-				R ₂	+	+	+
			R ₃	/	/	-				R ₃	/	/	+
	MR	10 ⁻³	R ₁	-	-	-		10 ⁻³	R ₁	+	+	+	
			R ₁	/	/	-			R ₂	+	+	+	
			R ₁	-	/	/			10 ⁻⁴	R ₁	+	+	+
10 ⁻⁴	R ₁	-	/	/	R ₂	+	+	+					
	10 ⁻⁵	R ₁	-	/	/	10 ⁻⁵	R ₁	+	+	+			
R ₂		+	+	+	R ₂		+	+	+				
MR	10 ⁻³	R ₁	+	+	+	10 ⁻³	R ₁	+	+	+			
		R ₁	+	+	+		10 ⁻⁴	R ₁	+	+	+		
		R ₁	+	+	+			R ₂	+	+	+		
MR	10 ⁻⁴	R ₁	+	+	+	10 ⁻⁴	R ₁	+	+	+			
		R ₁	+	+	+		10 ⁻⁵	R ₁	+	+	+		
MR	10 ⁻⁵	R ₁	+	+	+	10 ⁻⁵		R ₁	+	+	+		
		R ₁	+	+	+		R ₁	+	+	+			

Trehalosa

+: Crecimiento

-: No crecimiento

/: Cristalización de la caja (invalidación)