

**BACTERIAS FOTOTRÓFICAS ANOXIGÉNICAS PÚRPURAS NO-SULFUROSAS EN
LA FITOTELMATA DE BROMELIAS EN DIVERSOS BOSQUES DE PUERTO RICO**

Por

Juan Antonio Vega Sepúlveda

Tesis sometida en cumplimiento parcial
de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

Biología

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2009

Aprobado por:

Carlos A. Muñoz, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Carlos J. Santos Flores, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Carlos Ríos Velázquez, Ph.D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Carmen A. Vega Olivencia, Ph.D.
Representante de Escuela Graduada

Fecha

Nannette Difffoot Carlo, Ph.D.
Directora, Departamento de Biología

Fecha

Abstract

Due to the special arrangement of their leaves, plants of the Bromeliaceae family like bromeliad are capable of forming special structures that create an environment called phytotelmata. This aquatic microhabitat serves as home for a rich biota that plays an important role in tropical forests. This biota includes a variety of organisms, being the bacteria at the bottom of the food chain. The anoxyphototroph purple non-sulfur bacteria (APNB) are known by their capabilities of growing in diverse environments and are recognized by their ecological and biotechnological importance. Here, we present the first report of APNB in bromeliad's phytotelmata, specifically in rain, dry and moist subtropical forests of Puerto Rico. The bromeliad used on this study belong to the genera *Guzmania*, *Vriesea* and *Tillandsia*, and where sampled by collecting the water from the phytotelmata, enriching it for APBN using selective media, and by incubated them in the presence of light under anoxic conditions. The colonies with the characteristic reddish pigment were isolated and characterized microbiologically, by absorption spectra and by scanning electron microscopy. A total of twenty six gram-negative rod-shaped bacteria of variable size were isolated and the presence of bacterial photosynthetic pigments was confirmed by a whole cell absorption spectra. Genomic DNA was extracted from the isolates in order to complete the molecular analyses which included the PCR amplification of the *16S rDNA* and the *pufM* genes for further *in silico* analysis. The data obtained suggest the presence of the genera *Rhodomicrobium* and *Rhodospseudomonas*, being the latter the most abundant genus in all the analyzed samples. Also, the molecular analyses suggest the isolation of as many as 9 isolates that belong to new genera. The data confirm the ubiquity of the isolates and their presence as part of the microflora of this habitat in nature. Finally, the biotechnological potential of the isolated APNB was explored by testing their ability of using diesel and biodiesel as the sole carbon source aerobically, anaerobically and by photosynthesis. The results indicated that only two of the isolates were able to use biodiesel only under photosynthetic conditions.

Resumen

Las bromelias son plantas de la familia Bromeliaceae las cuales forman con sus hojas una estructura que permite la recolección de agua de lluvia, creando un microhábitat acuático conocido como fitotelmata. Este contenedor biológico posee una rica fauna con un rol importante en el sistema de reciclaje de nutrientes en bosques subtropicales. En la fitotelmata se han encontrado una gran diversidad organismos incluyendo copépodos, diatomeas, rotíferos, larvas de insectos, algas y bacterias. Éste estudio representa el primer reporte de bacterias fototróficas anoxigénicas púrpuras no sulfurosas en tanques de bromelias encontradas en diferentes bosques de Puerto Rico. *Guzmania sp.*, *Vriesea sp.* y *Tillandsia sp.* son los géneros de bromelias estudiados en cinco bosques con diferente localización e incluyendo bosques subtropicales lluvioso, seco y húmedo. El agua acumulada en la fitotelmata fue colocada en un medio selectivo para este grupo de bacterias e incubada en condiciones anoxigénicas en presencia de luz. Los candidatos que presentaron pigmentación rojiza fueron caracterizados con técnicas microbiológicas mediante espectrofotometría y microscopía electrónica de rastreo. Actualmente se han aislado un total de veintiséis bacilos gram-negativos. El espectro total de absorción confirmó la presencia de pigmentos fotosintéticos bacterianos. Se extrajo ADN genómico de los organismos aislados con el propósito de completar un análisis molecular que incluye la amplificación de los genes *16S rADN* y *pufM* mediante reacción de polimerasa en cadena seguido de análisis *insilico*. La información obtenida indica que de los veintiséis candidatos tres pertenecen al género *Rhodomicrobium*, catorce a *Rhodopseudomonas* y nueve pueden ser clasificados como nuevos géneros. Por lo tanto, varias especies del grupo de las bacterias fototróficas anoxigénicas púrpuras no sulfurosas pueden ser parte de la microflora de este ambiente, demostrando la ubicuidad de este grupo de bacterias en la naturaleza. Para explorar el potencial biotecnológico de los candidatos se determinó la habilidad de estas bacterias para utilizar diesel o biodiesel como única fuente de carbono en ambientes aerobios y anaerobios en condiciones lumínicas. Según los resultados, dos de los candidatos mostraron utilizar el biodiesel mediante fotosíntesis anaeróbica.

Dedicatoria

Quiero dedicar mi trabajo de maestría a la persona que me dio la vida, me guió y sin ella no hubiese logrado nada de lo que he podido realizar. A mi madre María Del C. Sepúlveda. Gracias por haberme servido de inspiración y dejarme seguir adelante para cumplir todos mis sueños.

Agradecimientos

Quiero agradecer a las siguientes personas por toda la ayuda brindada para la realización de esta investigación:

- A Dios por darme la fortaleza, salud y sabiduría para realizar todo en mi vida.
- Al Dr. Carlos Ríos-Velázquez, por darme la oportunidad desde estudios subgraduados de ser parte de su familia y de su laboratorio. Gracias por su amistad, paciencia, comprensión y apoyo durante todo este tiempo.
- A los miembros de mi comité graduado por su conocimiento y ayuda en la revisión de la tesis.
- A la Srta. Amarilis Bayón, Srta. Lizmarie Candelaria, Srta. Jessica Morales y Srta. Yelixa Santos por haber sido parte importante de este trabajo como estudiantes subgraduadas.
- A la Sra. Magaly Zapata por su amistad, apoyo y asistencia con el material y equipo de laboratorio.
- A la Sra. Vanessa Cardona, Sra. Keyla Flores, Srta. Yaliz Loperena y Sr. Josué Malavé por su amistad y asistencia en muchos de los aspectos de este trabajo.
- A Sr. Juan Luis Vega, Sr. Christian Torres y Sr. Yoel Sepúlveda por su ayuda en la toma de muestras y parámetros físico químicos.
- A la Dra. Vivian Navas y al Sr. José Almodóvar por su asistencia técnica y por permitirme utilizar las facilidades del Centro de Microscopía del Recinto Universitario de Mayagüez.
- Al Departamento de Biología y al programa Promise Reto.

Tabla de Contenido

Abstract	ii
Resumen.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Tabla de Contenido.....	vi
Lista de Tablas	viii
Lista de Figuras	ix
Capítulo I Introducción y Revisión de Literatura	
Introducción.....	1
Revisión de Literatura.....	5
Capítulo II Aislamiento y caracterización de bacterias FAPNS en la fitotelmata de bromelias de diversos bosques de Puerto Rico.....	21
Introducción	22
Materiales y Métodos	25
Resultados	36
Discusión	48
Conclusiones.....	56
Capítulo III Caracterización molecular de bacterias FAPNS aisladas de la fitotelmata de bromelias de diversos bosques de Puerto Rico	57
Introducción.....	58
Materiales y Métodos.....	60
Resultados	64
Discusión.....	69
Conclusiones.....	73
Capítulo IV Potencial biotecnológico de bacterias FAPNS aisladas de la fitotelmata de diversos bosques de Puerto Rico.....	74
Introducción	75
Materiales y Métodos.....	79
Resultados.....	81

Discusión.....83
Conclusiones.....85
Literatura Citada.....86

Lista de Tablas

Capítulo II

Tabla 2.1: Valores promedio de los parámetros físico-químicos de la fitotelmata de bromelias en diversos bosques de Puerto Rico.....	39
Tabla 2.2: Características microscópicas y pigmentación de las colonias de los candidatos aislados de la fitotelmata de bromelias del bosque seco de Guánica.....	40
Tabla 2.3: Características microscópicas y pigmentación de las colonias de los candidatos aislados de la fitotelmata de bromelias del bosque del Yunque.....	40
Tabla 2.4: Características microscópicas y pigmentación de las colonias de los candidatos aislados de la fitotelmata de bromelias del bosque de Maricao.....	41
Tabla 2.5: Características microscópicas y pigmentación de las colonias de los candidatos aislados de la fitotelmata de bromelias del bosque de Carite.....	41
Tabla 2.6: Características microscópicas y pigmentación de las colonias de los candidatos aislados de la fitotelmata de bromelias del bosque de Guajataca.....	42
Tabla 2.7: Resultado de pruebas de fermentación de azúcares de los candidatos aislados de la fitotelmata de bromelias de diversos bosques de Puerto Rico.....	47

Capítulo III

Tabla 3.1: Número de acceso y procedencia de las secuencias del 16S rDNA colocadas en la base de datos de GenBank ...	65
---	----

Lista de Figuras

Capítulo I

Figura 1.1 Bromelias y su fitotelmata.....	2
Figura 1.2 Membrana citoplasmática de bacterias FAPNS.....	20

Capítulo II

Figura 2.1. Áreas de muestreo.....	29
Figura 2.2. Cajón de iluminación y ambiente anaerobio bajo luz.....	32
Figura 2.3. Géneros de bromelias muestreadas.....	38
Figura 2.4 Tipos de pigmentación mediante la comparación de coloración.....	39
Figura 2.5. Microscopía de luz.....	43
Figura 2.6. Imágenes de microscopía electrónica de rastreo (MER)	44
Figura 2.7. Ensayo espectrofotométrico.....	45

Capítulo III

Figura 3.1. Amplificación mediante PCR del 16S rDNA.....	67
Figura 3.2. Amplificación mediante PCR del gen pufM.....	67
Figura 3.3. Árbol filogenético del 16S rDNA de los 26 candidatos aislados de la fitotelmata de bromelias de diversos bosques de Puerto Rico.....	68

Capítulo IV

Figura 4.1. Capacidad de crecimiento en Bushnell-Hass con biodiesel; enrojecimiento del medio luego de 7 días.....	82
--	----

Introducción

Las bromelias, plantas de la familia Bromeliaceae, poseen una filotaxis alterna espiralada que les permite recolectar agua de lluvia. Debido a este arreglo foliar se crea un microhábitat acuático que sirve de refugio a una gran variedad de organismos. Este ambiente se conoce como fitotelmata (Figura 1.1).

La fitotelmata de las bromelias es rica en nutrientes debido a los organismos que allí se encuentran y a la materia orgánica que éstos descomponen. Se ha encontrado en este ambiente una gran variedad de organismos, incluyendo cianobacterias, hongos, algas verdes, protozoarios, ciliados, larvas de insectos, insectos acuáticos, anfibios e incluso bacterias coliformes fecales (Fish, 1983). Las bromelias, al igual que otras plantas, poseen un metabolismo de ácido crasuláceo que se caracteriza por la fijación de CO_2 durante la noche y fotosíntesis durante el día. Por consiguiente, las bromelias no requieren una alta concentración de nutrientes y agua, y pueden crecer en una gran variedad de condiciones. Se distribuyen por todo el trópico del continente americano, desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina y también por el centro oeste de África.

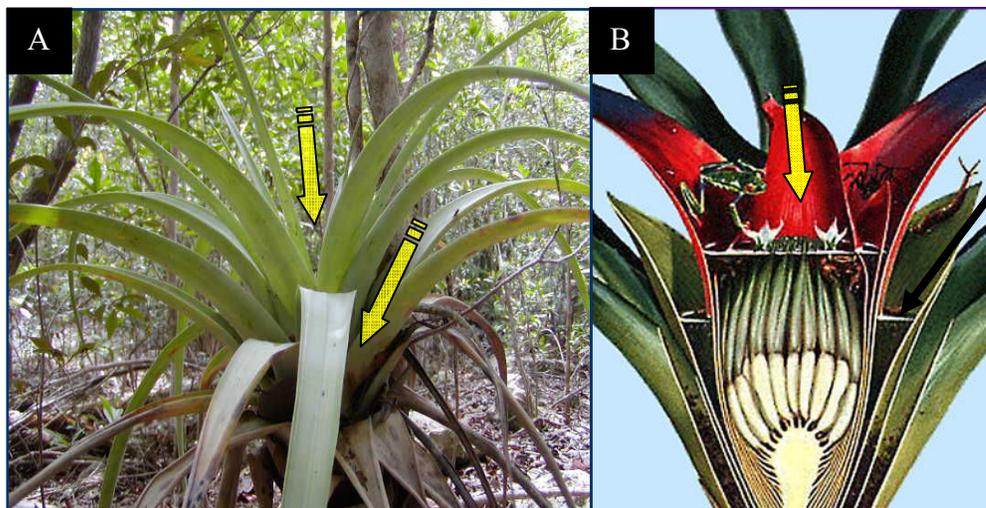


Figura 1.1. **Las bromelias forman entre sus hojas tanques que recolectan agua, creando una isla geográfica conocida como fitotelmata.** A. El género *Tillandsia* es común en el bosque seco de Guánica. Las flechas indican el lugar donde el agua de lluvia es almacenada y forma lo que se conoce como fitotelmata. B. La fitotelmata forma un ambiente acuático que sirve de refugio a una gran diversidad de organismos. La figura B fue tomada de <http://bromeliadbiota.ifas.ufl.edu>.

El microhábitat de la fitotelmata de bromelias juega un papel importante en la ecología de un ambiente, ya que provee un hábitat acuático donde las larvas de insectos se desarrollan y luego sirven de alimento a aves y anfibios. El alimento de estas larvas es la microbiota, que a su vez se alimenta de bacterias, haciéndolas la parte inicial de su cadena alimentaria. Se han aislado bacterias de la fitotelmata en bromelias, las cuales pertenecen a diversos grupos incluyendo coliformes fecales y cianobacterias (Rivera et al., 1988).

Las plantas no son los únicos organismos que llevan a cabo fotosíntesis, pues también existen bacterias capaces de utilizar energía lumínica para la producción de alimento (Oosterhelt, 1975; & Yurkov & Beatty, 1998). El proceso de fotosíntesis puede llevarse a cabo bajo condiciones oxigénicas, específicamente en plantas, cianobacterias y algas (Jones & Fife, 2001); mientras que otros microorganismos, como

bacterias púrpuras y verdes sulfurosas, púrpuras y verdes no sulfurosas y miembros de la familia Heliobacteriaceae llevan a cabo fotosíntesis anoxigénica (Sasikala & Ramana, 1998). Entre los grupos que realizan fotosíntesis anoxigénica, uno muy conocido es el de las bacterias fototróficas anoxigénicas púrpuras no sulfurosas (FAPNS). Éstas son capaces de crecer en diversos ambientes, no solamente en cuerpos de agua, sino que también en aguas tratadas, sedimentos y humedales donde participan en los ciclos de carbono, nitrógeno y azufre (Imhoff & Truper, 1989; Wang et al., 1993; Madigan et al., 2002). Las bacterias FAPNS pueden llevar a cabo fotosíntesis anoxigénica eficientemente gracias a la bacterioclorofila, y además poseen pigmentos carotenoides los cuales le imparten el color rojo, castaño o verde distintivo del grupo. También, este grupo se caracteriza por su morfología de bacilos y cocobacilos gram-negativo. Las bacterias FAPNS han adquirido importancia en estudios recientes en la biotecnología y biorremediación debido a su versatilidad fisiológica en la utilización de diversas fuentes de carbono (McGrath & Harfoot, 1997; Rajasekhar et al., 1998; Huang et al., 2001; Sasaki et al., 2002;).

Conocer qué grupo de bacterias habita en el ambiente fitotélmico de la bromelia, especialmente en el trópico, aportará información valiosa para comprender la ecología de un sistema acuático y de un bosque. Entre las bacterias, el grupo de las FAPNS está siendo ampliamente estudiado (Oda et al., 2002); pero no se ha realizado ningún trabajo investigativo donde se hayan aislado estas bacterias de los microhábitats acuáticos en las bromelias. Se ha identificado una gran cantidad de especies de organismos que viven en estos ambientes; pero muy poco se conoce de las bacterias que allí habitan, creando la posibilidad de encontrar nuevos géneros y especies de bacterias con aplicabilidad biotecnológica.

El propósito de esta investigación fue caracterizar las FAPNS en fitotelmatas de bromelias localizadas en distintos bosques de Puerto Rico. Para su identificación utilizamos técnicas generales de microbiología, bioquímica y fisiología, así como técnicas moleculares como extracción de DNA genómico, amplificación de rDNA, secuenciación, y bioinformática.

Revisión de literatura

Las plantas que pertenecen al grupo de las epífitas vasculares, incluyendo las que viven en bosques húmedos tropicales, se encuentran en un ambiente propenso a sequías. En este grupo de plantas se encuentran las bromelias. Varias bromelias que viven ancladas en árboles han ganado cierta independencia por el suplido intermitente de agua mediante la producción de tanques especiales. Debido a que muchas no tienen acceso al suelo, los tanques compensan la ausencia de agua. Éstos consisten de una cámara central formada por un espiral de hojas hacia arriba o de varios cuerpos de agua separados en la base de cada hoja (Zotz & Thomas, 1999).

Las bromelias pertenecen a la familia Bromeliaceae, la cual se compone de aproximadamente 50 géneros con más de 2,500 especies de plantas monocotiledóneas, las que se encuentran en su mayoría restringidas a vivir en la región neotropical, incluyendo México, la mayor parte del sur de los Estados Unidos y también el centro oeste de África (Frank, 1983). El intervalo de altitud donde estas plantas pueden crecer varía desde 0 a > 4,267m sobre el nivel del mar. En tamaño, las bromelias pueden alcanzar desde 3cm hasta 11m o más en altura. Las bromelias son una de las epífitas más abundantes en un bosque lluvioso y son nativas en todas las regiones tropicales de América (Padilla, 1975), siendo *Guzmania berteroniana* una de las especies más abundantes en los bosques lluviosos de Puerto Rico (Zar, 1984).

Obtención de nutrientes por las bromelias

Muchas especies de bromelias poseen una morfología especial (Figura 1.1) la cual le permite atrapar nutrientes que no provienen del suelo (Richardson, 1999).

Algunos científicos han demostrado que el follaje, más que las raíces, aparenta ser el lugar primario de la adquisición de nutrientes (Richardson et al., 2000). Los nutrientes son absorbidos por la planta a través de tricomas foliares, lo que le permite a la planta usar su fitotelmata como fuente de nutrientes. El agua de lluvia carga con nutrientes de la vegetación del bosque mientras desciende por el dosel. El agua escurrida que alcanza la bromelia ha demostrado tener mayores concentraciones de sal que el agua de lluvia (McColl, 1970). En estudios en los que se han medido los parámetros fisicoquímicos del agua de las axilas de las bromelias, científicos han demostrado que esta agua es rica en nutrientes, lo que posibilita la creación de un ambiente adecuado para el desarrollo de una comunidad microbiana compleja (Rivera et al., 1988).

Fitotelmata en bromelias

Algunas bromelias no tienen fitotelmata debido a su geometría, edad, o localización física; pero esto no impide la utilización de éstas plantas por varios animales como su refugio. Además de beneficiarse de la bromelia como un hábitat, varias especies de organismos utilizan sus hojas como fuente de comida (Wittman, 2000). La compleja arquitectura de algunas especies atrapa agua entre sus axilas formando la fitotelmata y constituyendo el hábitat de muchas especies de animales invertebrados (Frank, 1983). Existen tres tipos de asociaciones de invertebrados en estas plantas: (a) invertebrados que se alimentan de la planta, (b) organismos acuáticos al menos en sus etapas inmaduras y (c) organismos terrestres que encuentran en la bromelia protección, humedad y presas (Frank, 1983). Anfibios, mosquitos, gusanos planos, caracoles, salamandras y hasta cangrejos, completan sus ciclos de vida en el hábitat acuático que les provee la fitotelmata de las bromelias. Algunas aves pequeñas

también utilizan bromelias como nidos (Kricher, 1997). El rol que tienen las bromelias como microhábitat es evidente (Wittman, 2000), por lo que sus habitantes animales han atraído la atención de muchos biólogos (Frank, 1983).

Las bromelias son plantas que junto a sus contenidos totales (materia orgánica, agua acumulada y comunidades animales), forman un microcosmo cuyos parámetros físicos, químicos y bióticos pueden ser medidos (Richardson, 1999). Las bromelias proveen una variedad de compartimientos y gradientes ecológicos para sus comunidades de animales. Algunos autores mencionan que éstos son un verdadero microcosmo y no son simplemente una fitotelmata (Richardson et al., 2000).

Los animales son los que tienen una mayor contribución en la descomposición de hojarasca en todas las etapas, desde guiar la hojarasca recolectada por la superficie de las hojas hasta formar particulado de materia orgánica, que es lavado de las hojas hasta la base de la fitotelmata. Es allí donde existe una transferencia de nutrientes a las poblaciones de animales, algunos de éstos siendo larvas acuáticas y terrestres que al pasar a adultos pueden pasar a formar parte del ecosistema de un bosque (Richardson et al., 2000).

Características del hábitat fitotelmico

Algunas investigaciones muestran que la microflora eucarionte en el agua de las bromelias se compone de más de 200 especies y se presume que las bacterias son la base en el alimento para las especies presentes (Rivera et al., 1988). Estudios realizados por Rivera et al. (1988), en el Bosque Nacional del Caribe (el Yunque), demuestran la presencia de bacterias del grupo de las coliformes fecales en estos ambientes. Se han documentado más de 1,500 especies de animales que utilizan la

fitotelmata (Fish, 1983), y se cree que existe un mayor número. También se han realizado estudios extrayendo DNA total de este ambiente lo que tuvo como resultado el descubrimiento de un nuevo antibiótico llamado palmitoilputrescina (Braun & Scherz, 1990).

Las fitotelmatas ofrecen una opción potencial para el estudio de procesos ecológicos en comunidades tropicales manipuladas o naturales (Kitching, 2000, & 2001). Ecológicamente, las bromelias son componentes importantes en los biomas tropicales y subtropicales del nuevo mundo por ser una fuente de agua dulce y confiable, especialmente en el dosel de bosques, ya que provee un hábitat para una colección diversa de animales. Algunas bromelias poseen en sus tanques especies que son endémicas (Richardson, 1999). Los tanques de las bromelias contienen muchas especies de ciliados que no han sido descritos (Foissner, 2003). No se sabe cuántos; pero el número debe ser considerable, tomando en cuenta que hay más de 2,500 especies de bromelias. Muchas bromelias viven estilos de vida especiales y crecen en ambientes peculiares, Algunas, liberan sustancias específicas en el agua del tanque, las que proveen propiedades químicas y físicas y muestran grandes diferencias locales y temporales, proveyendo en la bromelia un sinnúmero de nichos para el mundo protista (Maguire 1971; Martinelli, 2000). Los protozoarios de agua dulce y salada son considerados importantes depredadores de bacterias y de pequeños miembros del fitoplancton, además de ser presas del zooplancton y mediadores del reciclaje de nutrientes esenciales para el fitoplancton y el crecimiento microbiano (Sanders & Wickman, 1993; Sherr & Sherr, 1988).

Ecología de la fitotelmata en bromelias

Los constituyentes de estructura y cadena alimenticia de contenedores artificiales son similares a los de la fitotelmata de bromelias, axilas entre hojas y plantas carnívoras (Maguire, 1971, & Kitching, 2001). Los habitantes de contenedores artificiales y naturales pueden variar en términos de recursos, depredadores y disturbios y esta variación es usualmente guiada por el tamaño, posición y localización de cada uno de los ambientes acuáticos (Richardson, 1999). Las hojas que caen de los árboles y los insectos sumergidos son la primera fuente de recursos alimenticios en este sistema. De esa manera se forma una cadena alimentaria basada en descomposición. Este detrito es primeramente descompuesto por bacterias, que son consumidas por el nivel trófico medio, principalmente protozoarios y rotíferos. Gran cantidad de larvas de insectos consumen estos protozoarios y rotíferos, como también a las bacterias (Kitching, 2000, & 2001). La comunidad de insectos ha sido bien estudiada especialmente sobre los efectos de los recursos y los disturbios (secado) en los depredadores más comunes (larvas de mosquito). Se conoce menos acerca de la comunidad de protozoarios y los rotíferos (Kneitel & Chase, 2004).

Entender los factores que tienen influencia en la diversidad de una comunidad es un objetivo importante para estudios ecológicos. También tiene importantes implicaciones para la conservación y la diversidad, ante altas cifras de destrucción de hábitat en la actualidad (Bowless et al., 1998). Un atractivo para el estudio de las comunidades que habitan los tanques de las bromelias es la física discreta natural de este hábitat, ya que provee una definición natural de lo que es una comunidad completa compuesta de una gran variedad de fauna. Además se puede realizar una

caracterización de la estructura física del hábitat y enumerar completamente todos los individuos que allí se encuentran (Arbruster et al., 2002).

Los sistemas acuáticos en los bosques del trópico desafortunadamente han sido poco estudiados, considerando la inmensidad y complejidad de estos bosques en términos de su macro y microflora (Richardson, 1999). Las comunidades acuáticas que se encuentran en el agua de epífitas juegan un papel muy importante en el sistema de reciclaje de nutrientes. Los suelos de los bosques tropicales son pesadamente penetrantes, saturados y anaeróbicos, lo que pone un mayor énfasis en especies de epífitas para la retención y transferencia de nutrientes a otros componentes del ecosistema de un bosque (Nadkarni, 1981).

Bacterias fototróficas púrpuras no sulfurosas (FAPNS)

La importancia ecológica y biogeoquímica de las bacterias FAPNS ha sido reconocida por muchos científicos. Estos organismos suplen carbono mediante fijación y también son excelentes fijadores de nitrógeno (Madigan, 1995), contribuyendo a la productividad del ecosistema en que residen (Madigan, 1998; Pfennig, 1989). Estas bacterias también juegan un papel importante en los ciclos de carbono y azufre (Pfennig, 1989). En ecosistemas acuáticos, la oxidación de sulfuro a azufre o a sulfato es una actividad biogeoquímica de gran importancia; debido a esto, a este grupo comúnmente se le considera responsable de estas actividades en lagos estratificados (Pfennig, 1989).

Las bacterias FAPNS muestran diferencias en su morfología y fisiología, lo que puede ser utilizado como una herramienta taxonómica para su identificación y caracterización (Oda et al., 2002). La propiedad más importante de estas bacterias es la

presencia de pigmentos fotosintéticos, con un espectro de absorción de luz entre un intervalo de 625 y 1040nm (Glaeser & Overmann, 1999). En adición, las bacterias FAPNS poseen un aparato fotosintético que genera energía mediante un sistema dependiente de luz (Glaeser & Overmann, 1999). Generalmente la biosíntesis de los pigmentos y la activación del aparato fotosintético son suprimidos por oxígeno y regulados por la intensidad de luz (Inhoff & Caumette, 2004).

Las bacterias FAPNS son un grupo fisiológicamente versátil de bacterias que crecen en ambientes anaeróbicos en presencia de luz o respiran aeróbica y anaeróticamente en oscuridad con diferentes fuentes de carbono, donantes de electrones y fuentes de nitrógeno (Hougardy et al., 2000). Todos los géneros de este grupo, al crecer bajo condiciones anaerobias en presencia de luz, son capaces de realizar la fotosíntesis de manera fotoautotrófica o fotoheterotróficamente (Pappas et al., 2004). En un estado de fototrofia, éstas utilizan hidrógeno molecular como donante de electrones y también utilizan bajos niveles de azufre, sulfato o azufre elemental (Imhoff & Truper, 2005). Otra ventaja de este grupo microbiano es que puede crecer en condiciones microaeróbicas en oscuridad, como quimioheterótrofos o quimioautótrofos mediante respiración o fermentación (Van Niel, 1941).

Características taxonómicas de las FAPNS

La distribución taxonómica de las bacterias FAPNS ha variado grandemente en los últimos años, debido a descubrimientos de nuevas especies y a la redistribución de géneros. Las herramientas moleculares han permitido que científicos puedan diferenciar genéticamente a géneros de bacterias FAPNS y han surgido nuevos géneros de esta manera. Al momento de esta investigación han sido reportadas alrededor de 60

especies de bacterias FAPNS. Éstas se distribuyen en cinco órdenes: *Rhodospirillales*, *Rhodobacterales*, *Rhizobiales* en las Alpha proteobacterias y *Burkholderiales*, *Rhodocyclales* en las Beta proteobacterias. La mayoría de las bacterias de este grupo se encuentran en los ordenes *Rhodospirillales* (familia *Rhodospirillaceae*) y *Rhodobacterales* (familia *Rhodobacteraceae*) (Imhoff & Trüper, 2005).

Hasta el 1989 sólo se conocían seis géneros dentro del grupo de bacterias FAPNS: *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodocyclus*, *Rhodophila*, *Rhodomicrobium* y *Rhodospirillum*. Imhoff et al. (1998) reclasificaron varias especies bajo los géneros *Phaeospirillum*, *Rhodovibrio* y *Rhoseospira* (Imhoff et al., 1998). En 1995, *Hiraiishi et al.* reportaron por primera vez el género *Rhodobium* aislado ambientes marinos de Japón. En 1998, Imhoff y colaboradores reportaron por primera vez el género *Rhodothalassium*, aislado de estanques hipersalinos en las costas de Oregon. Un año más tarde el género *Roseospirillum* fue aislado por primera vez de un tapete microbiológico en Woods Hole, Massachussets. En el año 2000, Milford *et al.* reportaron por primera vez el género *Rhodobaca* en el lago Bogoria, localizado en Kenya, África. Hasta el momento, 21 géneros han sido descritos como miembros del grupo de las bacterias FAPNS y este número sigue en aumento.

Familia *Rhodospirillaceae*

Las bacterias FAPNS se componen de 8 familias y 21 géneros, siendo la familia *Rhodospirillaceae* donde se encuentran la mayor cantidad de éstos. Esta familia tiene entre sus géneros a *Rhodospirillum*, *Phaeospirillum*, *Rhodocista*, *Rhodospira*, *Rhodovibrio* y *Roseospira*. Hasta el 1998 el género *Rhodospirillum* consistía de ocho especies, pero estudios en comparación genética realizados por J. Imhoff y sus

colegas, indicaron que seis especies adscritas al género *Rhodospirillum* mostraban diferencias significativas, suficientes para la reclasificación de éstas en seis nuevos géneros nombrados como *Phaeospirillum*, *Roseospira*, *Rhodotalassium*, *Rhodovibrio*, *Rhodocista* y *Rhodocyclus* (Imhoff *et al.*, 1998). Los miembros de esta familia se caracterizan por células con morfología de bacilos y en espiral. El hábitat de las especies de esta familia comprende cuerpos de agua dulce, aguas usadas, agua de mar, lagos salados, salinas y tapetes microbianos. La especie *Rhodospira trueperi* fue aislada en el 1997 de tapetes microbianos y es la única especie de esta familia que posee bacterioclorofila b. Además, existen géneros cuyas especies crecen en altas concentraciones de sal, como *Roseospira*, *Roseospirillum*, *Rhodovibrio* y *Rodospira*; mientras que los géneros *Rhodospirillum* y *Phaeospirillum* son comunes en ambientes mesofílicos de agua dulce. Un dato característico del género *Phaeospirillum* es que no puede crecer en la oscuridad bajo condiciones oxigénicas; mientras tanto el género *Rhodocista* es resistente a altas temperaturas siendo su temperatura óptima de 40 a 45°C. El género *Rhodovibrio* se compone de dos especies halofílicas que crecen en hasta 10% de NaCl. Éstas han sido reportadas en ambientes hipersalinos. Entre las especies del género *Roseospira* se encuentran halofílicas que se caracterizan por crecer a un pH de 8.2, temperatura de 43 a 51 °C y 5% de NaCl como condiciones óptimas de crecimiento (Imhoff & Trüper, 2005).

Familia *Acetobacteraceae*

La familia *Acetobacteraceae* se caracteriza por tener una sola especie, *Rhodopila globiformis*. Esta bacteria fue reportada por primera vez en el 1984, aislada de una capa roja de un manantial de ácido sulfúrico en el Parque Nacional de Yellowstone. Esta bacteria se caracteriza por ser acidófila, prefiriendo un pH entre 3 y 4, resistiendo hasta 2.7, y su temperatura óptima de crecimiento es de 40 °C. Su morfología microscópica es de esférica a ovalada (Imhoff & Trüper, 2005).

Familia *Rhodobacteraceae*

La familia con mayor número de especies de FAPNS es la *Rhodobacteraceae* con 21 especies reportadas hasta el 2007. En esta familia se encuentran los géneros *Rhodobacter*, *Rhodobaca*, *Rhodovulum*, *Rhodothermalassium*. Éstas han sido mayormente aisladas de cuerpos de agua dulce y salada; pero también han sido reportadas de las montañas de los Himalayas, narices de pacientes con neumonía, lagos alcalino-salinos, charcas para agricultura, sedimentos costeros y ambientes hipersalinos. El género *Rhodothermalassium* es el único de esta familia en tener una morfología espiral o vibrio. Crece a una temperatura óptima de 40 °C y de 6 a 8% de NaCl. La mayoría de las especies de esta familia posee una morfología de coco bacilos (Imhoff & Trüper, 2005).

Familia *Bradyrhizobiaceae*

Una de las familias más fisiológicamente versátiles es la Familia *Bradyrhizobiaceae*. Ésta incluye los géneros *Rhodoblastus* y *Rhodopseudomonas*. *Rhodopseudomonas palustris* es una de las especies de mayor estudio en esta familia por sus importantes aplicaciones en la ciencia, habiendo sido secuenciado su genoma

en su totalidad. Muchas de las especies de esta familia pueden crecer en cualquiera de las cuatro formas metabólicas existentes (fotoautotróficas - energía lumínica y carbono del CO₂; fotoheterotróficas - energía lumínica y carbono de compuestos orgánicos; quimioheterotróficas - carbono y energía de compuestos orgánicos; y quimioautotróficas - energía de compuestos inorgánicos y carbono de CO₂). Su hábitat incluye cuerpos de agua dulce, aguas usadas, ambientes marinos, tapetes microbianos, sedimentos y musgos (Imhoff & Trüper, 2005).

Familia *Hyphomicrobiaceae*

La familia *Hyphomicrobiaceae* posee géneros de bacterias como *Blastochloris*, *Rhodomicrobium*, *Rhodoplanes* y *Rhodobiaceae*. Son comunes en cuerpos de agua dulce, salobres y salados, aguas usadas o contaminadas y en sedimentos o lodo. Se caracterizan por ser mesofílicas, prefiriendo un pH neutral. El género *Blastochloris* se caracteriza por poseer bacterioclorofila b. El género *Rhodomicrobium* se compone de una sola especie (*R. vannielli*) la cual posee una morfología ovalada o en forma de limón y puede utilizar hierro como única fuente de energía (Imhoff & Trüper, 2005).

Familia *Rhodobiaceae*

El género *Rhodobium* es el único en la familia *Rhodobiaceae*. Sus cuatro especies reportadas hasta el 2007 prefieren lugares salinos para vivir, tales como agua de mar, salinas y tapetes microbianos. Son mesofílicas con intervalo de crecimiento de 2 a 8 % de NaCl (Imhoff & Trüper, 2005).

Familia Comamonadaceae

Una de las dos familias de las bacterias FAPNS dentro de las beta proteobacterias es la familia *Comamonadaceae*. Los dos géneros de esta familia son *Rhodoferax* y *Rubrivivax*. Éstos han sido reportados en agua dulce, tapetes microbianos del antártico, sedimentos marinos y lodo. Tiene importancia en la biorremediación ya que especies de *Rubrivivax* han sido aisladas de aguas usadas de matadero de aves en Brasil (Posano *et al.*, 2007), y *Rhodoferax* de acuíferos contaminados por vertedero y del intestino de salmones (Röling *et al.*, 2001, Romero & Navarrete, 2006).

Familia Rhodocyclaceae

El género *Rhodocyclus* es el único en la familia *Rhodocyclaceae*. Sus dos especies son comunes en cuerpos de agua dulce y lagunas de aguas usadas. Bajo el microscopio se caracterizan por ser bacilos con una extensión anular que lleva a los dos extremos de la célula hasta casi tocarse (a lo cual debe su nombre). (Imhoff & Trüper, 2005).

Potencial biotecnológico de las bacterias fototróficas púrpuras no sulfurosas

Miembros de este grupo han sido identificados como organismos con gran potencial en la naturaleza y por consiguiente, han sido escogidos para la secuenciación y análisis completo de su genoma en el programa “Genomes to Life” auspiciado por el Departamento de Energía de los Estados Unidos (www.doegenomestolife.org). Las bacterias FAPNS que forman parte de este programa son *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas palustris* y *Rhodobacter sphaeroides*. Estos tres organismos han

demostrado ser útiles en la bioenergética, biorremediación y en la reducción de CO₂ atmosférico (Mehrabi *et al.*, 2001).

Rhodovulum sulfidophilum se ha estudiado como biosensor para la detección de arsenita y sulfuro de dimetilo mediante la manipulación de los genes encargados de la codificación para la producción de pigmentos carotenoides (Fujimoto *et al.*, 2006, Maeda *et al.* 2006). Esta bacteria ha sido utilizada para el tratamiento aguas usadas de la industria de la sardina (Azad *et al.*, 2004).

Las bacterias FAPNS han sido utilizadas para procesos de tratamiento de aguas usadas, para la reducción de olor de lagunas de almacenaje de desperdicios vacunos, industrias de sardinas y procesadora de aves (Do *et al.*, 2003), y para la producción de biomasa (Glaeser & Overmann, 1999), hidrógeno molecular (Imhoff & Truper, 1989) y vitaminas (Imhoff & Caumette, 2004). Este grupo bacteriano ha mostrado resistencia a metales pesados, dando a la célula la habilidad de crecer en presencia de metales raros en la tierra (Mehrabi *et al.*, 2001).

Este grupo bacteriano ha demostrado, además, su capacidad de crecimiento en ambientes contaminados con compuestos halogenados, sugiriendo que posiblemente estas bacterias pueden removerlos de cuerpos de agua o sedimentos, lo que es un gran aporte para el área de la biotecnología ambiental (McGrath & Harfoot, 1997). Miembros de este grupo poseen la capacidad de biorremediar lugares contaminados ya que científicos han probado su potencial de degradación de compuestos como herbicidas (Muller *et al.*, 2001), hidrocarburos de aceite mineral (Popp *et al.*, 2006), latex (Kantachote *et al.*, 2005), nitrofenoles (Blasco & Carillo, 1992), fenol (Watanabe *et al.*, 1998), diesel (Vrdoljak *et al.*, 2005), tolueno (Zengler *et al.*, 1999), benceno (Fahy *et*

al., 2006) y metales pesados peligrosos para la salud (tales como Co^{2+} , Fe^{2+} and MoO_4^{2-}) (Giotto et al., 2006).

Algunas especies bacterianas de este grupo poseen la capacidad de producir hidrógeno gaseoso (el cual puede ser utilizado como combustible no contaminante) utilizando la energía más abundante en la naturaleza, la luz solar (Zurrer & Achofen, 1979). Esto ha despertado el interés del Departamento de Energía de los Estados Unidos, científicos y otras agencias que intentan buscar nuevas fuentes de energía alterna y renovable. En 2004, Franchi y colaboradores reportaron mediante mutaciones realizadas a *Rhodobacter sphaeroides*, un aumento en la producción de biohidrógeno combinado con desperdicios de comida. También pueden servir como reductores de nitrato y ser útiles en la disimilación de compuestos aromáticos (Hougardy et al., 2000). La bacteria *Rhodospirillum rubrum* ha sido de gran interés desde que fue descubierta, ya que posee la capacidad de oxidar monóxido de carbono (Kerby et al., 1992).

Genes *puf* en las bacterias fototróficas púrpuras no sulfurosas

Los genes involucrados en fotosíntesis están organizados en grupos y han sido identificados y caracterizados extensamente (Kiley & Kaplan, 1988). Este grupo de genes ocupan alrededor de 46 kb del cromosoma y están mayormente compuestos de genes que codifican para bacterioclorofila, carotenoides, complejos de recolección de luz y centro de reacción (Bauer & Bird, 1996). La luz es capturada por el complejo recolección de luz y los electrones son transferidos a los pigmentos de bacterioclorofila localizados en el centro de reacción como podemos observar en la figura 1.2 (Zeilstra et al., 1998). Cada uno de los complejos recolección de luz tiene un largo de onda característico en el espectro de absorción que puede ser medido por un

espectrofotómetro. Estos largos de onda corresponden a bacterioclorofila a y b (805-1040nm) y pigmentos carotenoides (492-685nm) (Braun & Scherz, 1990, Glaeser & Overmann, 1999).

Los genes *puf* codifican para las proteínas que componen estructuralmente el centro de reacción. En la actualidad existen herramientas moleculares las cuales posibilitan la amplificación del gen *pufM*. Mediante diseño y uso de iniciadores específicos para este gen, que codifica para la proteína PufM (ilustrada en azul en la figura 1.2), Dicha proteína cumple un papel esencial para completar el proceso de fotosíntesis en este grupo bacteriano (Achenbach et al., 2001).

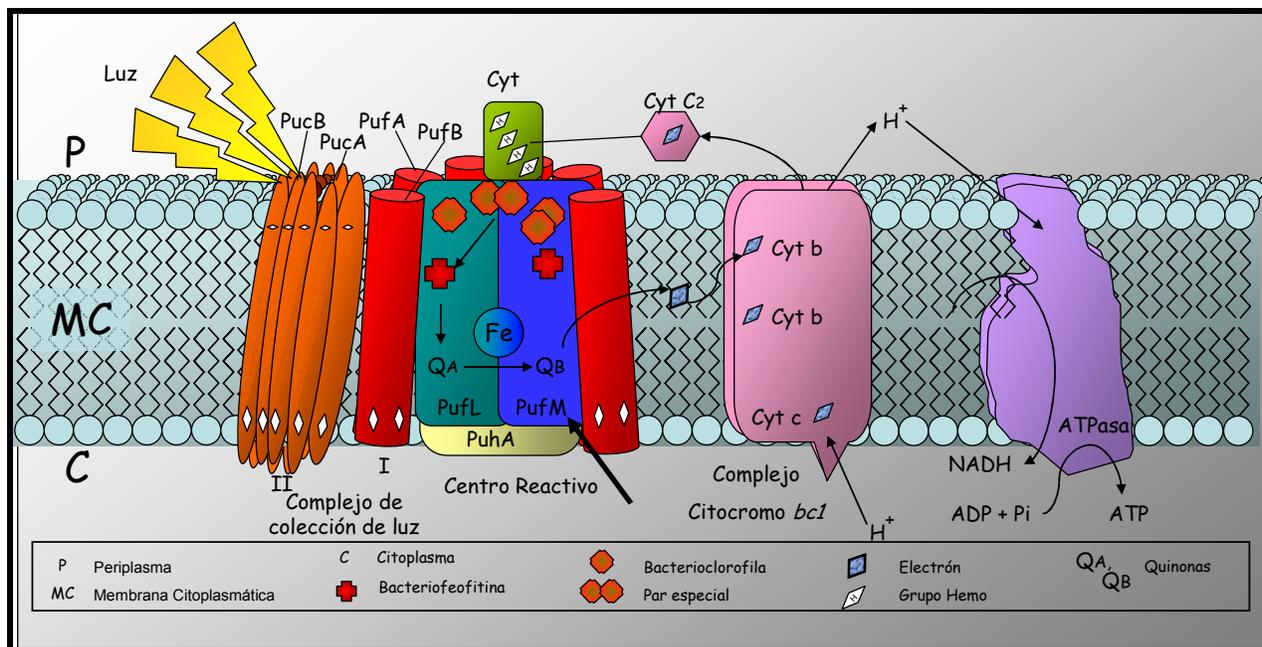


Figura 1.2. Las bacterias FAPNS poseen la habilidad de realizar fotosíntesis gracias a una maquinaria especial localizada en la membrana citoplasmática. El proceso comienza cuando la luz es dirigida al centro de reacción por los complejos de captación de luz y luego absorbida por dos moléculas de bacterioclorofila que se encuentran en la membrana citoplasmática cerca del periplasma. Este par de clorofilas se le conoce como el par especial. Una vez es absorbido el fotón, el electrón es liberado y transferido a través de otra molécula de bacterioclorofila a la bacteriofeofitina en la subunidad L del centro de reacción. El electrón es transferido a la quinona A y luego a la quinona B. Se necesitan dos electrones de alta energía para reducir completamente la quinona B a QH_2 . La quinona reducida se difunde a través de la membrana a otro complejo de proteínas llamado complejo de citocromo bc_1 donde es oxidada. En el proceso el poder de reducción de QH_2 es utilizado para bombear protones al espacio periplásmico a través de la membrana. Los electrones de complejo citocromo bc_1 son transferidos al citocromo c_2 en el periplasma que sirve de intermediario y transporta estos electrones de nuevo a una subunidad del citocromo en el centro de reacción provocando que el sistema sea uno cíclico. El protón producido es guiado a la cadena de transporte de electrones para la producción de energía en forma de ATP. La flecha indica la proteína producto de la traducción del gen *pufM*.

Capítulo II

Aislamiento y Caracterización de Bacterias Fototróficas Anoxigénicas Púrpuras No Sulfurosas en la Fitotelmata de Bromelias de Diversos Bosques de Puerto Rico

Introducción

Las bacterias FAPNS han sido aisladas de una gran diversidad de ambientes, incluyendo ambientes terrestres, agua dulce, marinos y aguas residuales, tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Estas características les dan una mayor importancia dentro de la comunidad científica ya que pueden aportar al entendimiento de diversos procesos fisiológicos y de supervivencia.

Las bacterias FAPNS se dividen en 8 familias distribuidas entre las proteobacterias alpha y beta, contando con 21 géneros descritos hasta el momento (Imhoff & Trüper, 2005), y con aproximadamente 60 especies que siguen en ascenso. Todos estos géneros tienen la capacidad de realizar fotosíntesis utilizando succinato como fuente de carbono en un ambiente anaerobio con la presencia de alguna fuente lumínica. Es por esto que se utiliza el medio Siström (Siström, 1960) bajo condiciones anaerobias, en presencia de luz, con el propósito de favorecer el crecimiento de este grupo bacteriano sobre otros aislados de la fitotelmata de bromelias de diversos bosques de Puerto Rico.

La capacidad de realizar fotosíntesis anaeróbica de estas bacterias más la utilización de succinato en este ambiente nos ha permitido aislar este grupo de bacterias caracterizadas por una pigmentación rojiza debido a pigmentos carotenoides y bacterioclorofila. A pesar de que las FAPNS pertenecen al mismo grupo, se diferencian en varios aspectos generales, incluyendo tamaño, morfología, fisiología y composición de pigmentos. La pigmentación de las colonias, forma y textura son características macroscópicas útiles para la diferenciación entre sus géneros. En condiciones anaerobias bajo luz, la mayoría de las especies dentro del grupo de las

bacterias FAPNS tienen varias tonalidades de rojo, desde rosado hasta castaño y algunas pueden formar colonias amarillas. En presencia de oxígeno en oscuridad la mayoría de éstas bacterias FAPNS no producen pigmentación (Imhoff & Trüper, 2005). Pero las características microscópicas son las que tienen mayor importancia ya que son una herramienta de mayor certeza en la descripción y distinción entre los distintos géneros de las bacterias FAPNS. El ancho y largo de las células, morfología, clasificación mediante la tinción Gram y la presencia de estructuras externas fueron las técnicas de caracterización microscópica utilizadas en esta investigación. El grupo de bacterias FAPNS tiene una variedad de morfologías, incluyendo espirales, vibrios, bacilos y cocobacilos de tamaños y arreglos variables (Imhoff & Trüper, 2005).

Estudios científicos han demostrado que las bacterias FAPNS son un grupo muy versátil específicamente en términos fisiológicos (McGrath & Harfoot, 1997) y en general, juegan un papel importante en los ciclos de carbono, nitrógeno y azufre en lagos y otros cuerpos de agua (Imhoff & Trüper, 2005; Wang et al., 1993; Madigan et al., 2002). Además, gracias al potencial de utilización de una gran variedad de fuentes de carbono y donantes de electrones este grupo de bacterias tiene la habilidad de crecer en una diversidad de ambientes adquiriendo un rol importante en la biorremediación (Huang et al., 2001), biodegradación (McGrath & Harfoot, 1997) y biotecnología (Cantera et al., 2004). La ubicuidad de este grupo de bacterias ha despertado un gran interés en los científicos en la búsqueda de bioprospectos con potencial biotecnológico y la fitotelmata es uno de los ambientes ideales para realizar tales estudios. El conocer la fisiología de las bacterias FAPNS nos ayudaría a entender parte de su rol en la fitotelmata de bromelias presentes en los bosques.

El propósito de este proyecto, en su objetivo inicial, fue determinar la presencia de bacterias FAPNS en la fitotelmata de bromelias encontradas en diversos bosques de Puerto Rico. Una vez aislados los candidatos, se les realizaron varias pruebas estandarizadas con el propósito de establecer diferencias y realizar una caracterización morfológica y fisiológica mediante el uso de microscopía electrónica de rastreo y técnicas de microbiología general.

Materiales y Métodos

Áreas de Muestreo

Se recolectaron muestras de agua en tres bromelias seleccionadas al azar en cinco Bosques de Puerto Rico. Se recolectó en su totalidad el líquido contenido entre las hojas de las plantas el cual fluctuó entre 10 y 50ml aproximadamente. Los géneros de bromelias muestreadas en este estudio fueron *Tillandsia sp.*, *Vriesea sp.* y *Guzmania sp.*, debido a la gran abundancia de éstas en los bosques de Puerto Rico (Figura 2.3). La selección de una misma especie de bromelia por bosque fue al azar tomando muestras de la fitotelmata de las plantas más accesibles. La localización de estas plantas en cada bosque fue tanto en el suelo, como anclada a los árboles, siendo aproximadamente tres metros la altura máxima de las bromelias muestreadas. Las áreas de muestreo comprendieron el Bosque Seco de Guánica, el Bosque de Maricao, el Bosque Guajataca, el Bosque Nacional del Caribe (El Yunque) y el Bosque de Carite (Figura 2.1). El Bosque de Guánica es un bosque seco localizado cercano a la costa sur de Puerto Rico. Los bosques de Maricao, Guajataca y Carite son bosques húmedos distribuidos en la Cordillera Central de Puerto Rico. El Bosque Nacional del Caribe (El Yunque) es un bosque lluvioso localizado en la región noreste de Puerto Rico.

Bosque Nacional del Caribe El Yunque

El Bosque Nacional del Caribe, conocido como el Yunque, está localizado en la Sierra de Luquillo ocupando aproximadamente 11.2 hectáreas. Sus elevaciones fluctúan de 100 a 1,075 metros sobre el nivel del mar. Las temperaturas diarias promedio son de 25.5°C en las partes más bajas, y 18.5°C sobre los 1,000m. Las nubes

por lo general cubren la parte más alta del bosque y la radiación solar promedio es de 60% en comparación con la costa. La precipitación pluvial es casi diaria con un promedio de 5000mm al año en los picos más altos. La precipitación es mayor entre los meses de primavera y otoño. El Yunque está formado por cuatro tipos de bosques claramente definidos: el Bosque Pluvial o de Bajuras, el cual comienza desde el nivel del mar hasta los 610m; el Bosque de Palo Colorado, el cual se desarrolla entre los 600 a 900 metros en valles y pendientes; el Bosque de Palma de Sierra localizado en las partes más elevadas de las montañas de Luquillo y en los arroyos, sobre los 600 metros sobre el nivel del mar; y por último, el Bosque Enano, con vegetación de menos de 4 metros de altura y limitado a las crestas de las montañas y picos más altos. La fauna general del bosque está dominada por reptiles y aves en el día y por los anfibios en la noche (Padrón *et al.*, 1998).

Bosque de Guajataca

El Bosque de Guajataca está localizado en la región noroeste de Puerto Rico en el municipio de Isabela, y comprende unas 3.01 hectáreas (2,357 cuerdas) en elevaciones que fluctúan entre los 152 y 304 metros sobre el nivel del mar. Está clasificado como bosque húmedo subtropical. La precipitación pluvial promedio anual es de 1905mm; la temperatura varía desde 23.3°C durante los meses de enero y febrero, hasta 26.1°C durante el mes de julio, con un promedio anual de 24.7°C. El suelo está formado por afloraciones de piedra caliza típicas de la topografía cárstica tropical y caracterizado por grupo de colinas subcónicas con pendientes laterales o mogotes separados por depresiones redondeadas o en forma de embudo llamadas sumideros. En este lugar se han identificado dos asociaciones de vegetación: una en las laderas de

los mogotes y otra en los valles o sumideros. La primera asociación comprende el 76% del área total de bosques, dominada por suelos calcáreos y porosos, de desagüe excesivo, en las laderas y cimas de las colinas, quienes crean un ambiente xerofítico. La segunda comprende el restante 24% y se encuentra en las áreas protegidas entre los mogotes donde se forman los valles, prevaleciendo condiciones de mayor humedad (Padrón *et al.*, 1998).

Bosque seco de Guánica

Una de las reservas forestales más importante de Puerto Rico es el Bosque Seco de Guánica. La peculiaridad de su estado natural hace de éste un lugar de gran belleza escénica e importancia científica. Esto ha sido reconocido por la Organización de las Naciones Unidas (ONU), la cual lo ha designando como *Reserva Biosférica Internacional de Puerto Rico*. Anteriormente, este reconocimiento se le otorgó al Bosque del Yunque. El Bosque Estatal de Guánica está localizado en la costa suroeste de Puerto Rico, a poca distancia del pueblo de Guánica, entre los pueblos de Guayanilla, Peñuelas, Yauco y Ponce. El bosque, localizado en la zona más seca y árida de la isla, es un bosque xerofítico (seco) con una precipitación anual de 762mm. Esta zona es la de mayor radiación solar en Puerto Rico. Se registran temperaturas altas que fluctúan entre 26.6°C en las áreas de sombra y 37.7°C en áreas más expuestas. La topografía se denomina como ondulante, observándose que la parte oeste es más llana que la parte este. El área de este bosque se encuentra separada en dos segmentos, cubriendo 7.19 hectáreas (9,878 cuerdas). El bosque estatal de Guánica, cae bajo la clasificación de bosque seco subtropical. En este lugar los efectos del viento, salitre y escasez de agua resultan en condiciones adversas limitando el

crecimiento de la vegetación. Por esta razón encontramos una flora adaptada a esta zona, que incluye numerosas plantas suculentas, árboles y arbustos espinosos. La vegetación de este bosque se compone de mangles (1%), salinas naturales con vegetación resistente a altas concentraciones de sal (23%), bosque deciduo (61%) y bosque siempre verde (18.6%) (Padrón *et al.*, 1998).

Bosque de Maricao

El Bosque Estatal de Maricao cubre una extensión territorial de 7.5 hectáreas (10,569 cuerdas) y se encuentra en la porción oeste de la cordillera central, en una zona de alta pluviosidad. Está ubicado entre los municipios de Sabana Grande, Maricao y San Germán, en dos segmentos separados. La elevación varía desde 150 hasta 900 metros sobre el nivel del mar. La precipitación promedio en el bosque es alta, alcanzando 2,396mm. Los meses de mayor precipitación durante el año son agosto, septiembre y octubre, siendo enero y febrero los meses más secos. La temperatura promedio del Bosque es de 22°C, y se han distinguido cinco asociaciones de vegetación agrupadas en tres zonas bioclimáticas de vida: bosque húmedo subtropical (32.9%), bosque muy húmedo subtropical (65%) y bosque montano bajo (1.9%) (Padrón *et al.*, 1998).

Bosque de Carite

El Bosque de Carite está localizado en la Sierra de de Cayey al sureste de Puerto Rico, y es compartido por los municipio de Cayey, Guayama, San Lorenzo, Caguas y Patillas. El bosque de Carite está compuesto de 1.06 hectáreas (6,680 cuerdas) y tiene elevaciones que van de 250 a 903 metros sobre el nivel del mar. El bosque ha tenido usos de importancia como refugio de vida silvestre, área recreativa y área de investigación científica. El clima es regularmente húmedo y fresco, con precipitación frecuente que promedia 2,235mm anuales. La temperatura promedio anual es de 22°C. Los meses más húmedos se extienden desde mayo hasta octubre y los más secos desde enero hasta marzo (Padrón *et al.*, 1998).

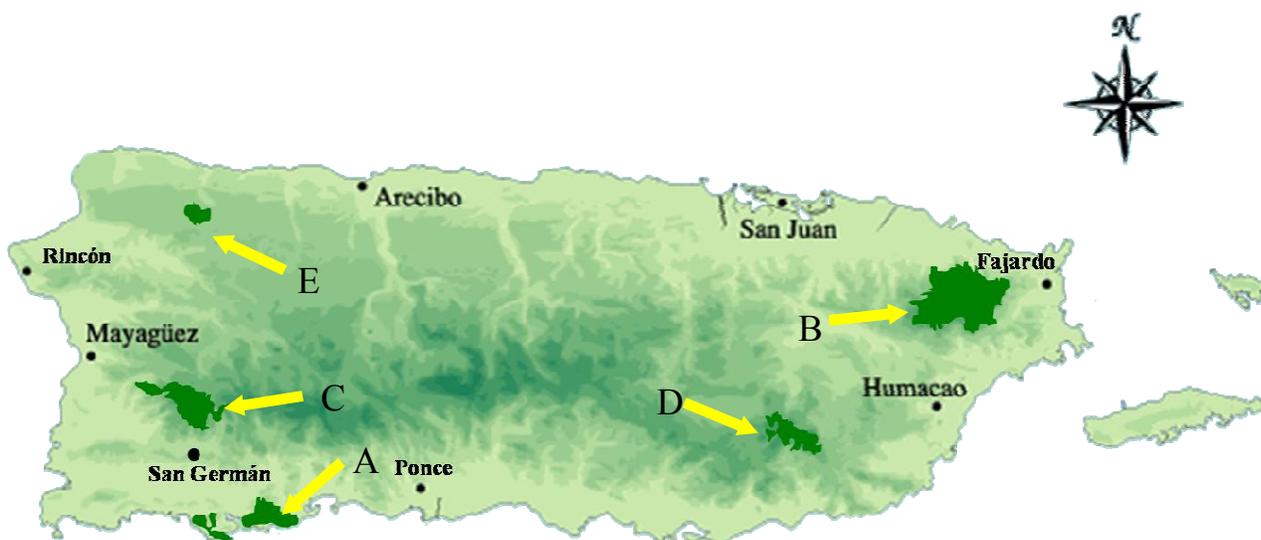


Figura 2.1. Las áreas de muestreo en este estudio comprenderán cinco bosques de Puerto Rico. Las áreas de muestreo, representadas con letras y señalados con flechas, corresponden a los siguientes bosques: **A.** Bosque Seco de Guánica (58°13.10" N, 52°11.53" O), **B.** Bosque El Yunque (18°28.44" N, 46°34.92" O), **C.** Bosque de Maricao (08°57.79" N, 59°35.81" O), **D.** Bosque de Carite (06°10.61" N, 01°25.09" O) y **E.** Bosque de Guajataca (25°27.66" N, 58°27.66" O).

Identificación de especies de las bromelias muestreadas

Se identificó cada especie de bromelia mediante comparación de fotos con especímenes recolectados y preservados en la colección de plantas del Herbario del Departamento de Biología del Recinto Universitario de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico. Como requisito taxonómico las especies de las bromelias muestreadas fueron fotografiadas florecidas, ya que la flor es un criterio esencial en la identificación.

Recolección y procesamiento de la muestra

En el ambiente estudiado se encontró gran cantidad de hojarasca anclada entre las hojas de la bromelia, la cual tuvo que ser removida para propósitos del muestreo. Las muestras del líquido almacenado entre las hojas de la bromelia fueron recolectadas utilizando pipetas desechables estériles. A cada bromelia se le extrajo el líquido en su totalidad, el cual variaba dependiendo de la precipitación y tamaño de la planta, y éste fue colocado en envases plásticos estériles de 25 mililitros. Todas las bromelias muestreadas tenían un tamaño similar pero diferían en el volumen de agua almacenada. A cada ambiente fitotelmico se le determinaron parámetros físicos-químicos, como temperatura, pH y oxígeno disuelto. Para medir la temperatura y el oxígeno disuelto de la fitotelmata se utilizó un medidor YSI modelo 55/50 y para determinar el pH se utilizó un medidor de pH marca Oakton, ("Acorn Series"). Un medidor de luz Sper Scientific (modelo 840006) fue utilizado para medir la cantidad de luz irradiada sobre la bromelia en unidades lux (unidad del sistema internacional del nivel de iluminación).

Aislamiento y purificación de fototróficas anoxigénicas púrpuras no sulfurosas

Las muestras de líquido obtenidas de la fitotelmata de bromelias de cinco bosques de Puerto Rico se colocaron utilizando una pipeta estéril, en botellas de 4ml con tapa de rosca que contenían medio Sistrom 2X líquido (Sistrom, 1960), un medio muy utilizado para el crecimiento bacterias FAPNS. Las muestras con el medio fueron colocadas en condiciones anaeróbicas y en presencia de luz. Para generar estas condiciones se construyó un cajón de iluminación cuadrado hecho en madera con 2 bombillas de tungsteno de 60 watts a cada lado y una fuente de ventilación en la parte superior (Figura 2.2). La ventilación se logró usando un abanico eléctrico colocado sobre el cajón, con el propósito de liberar el exceso de calor generado por las bombillas y mantener la temperatura entre los 28 y 32°C. Este ambiente fue creado con el propósito de promover el crecimiento de bacterias FAPNS, lo que se evidenció con la producción de un “bloom” rojizo en la botella. Este fenómeno ocurre debido al incremento en la cantidad de pigmentos fotosintéticos presentes en este grupo de bacterias dado al aumento en la biomasa celular de este grupo. Las muestras que presentaron este “bloom” fueron estriadas en platos Petri con medio Sistrom sólido e incubadas en condiciones anaeróbicas en presencia de luz en una jarra anaeróbica de policarbonato BBL[®], un sobre de gas (el cual generaba una atmósfera de H₂ y CO₂) con catalítico de paladio BBL[®] y un indicador de oxígeno BBL[®] (el cual se torna blanco en condiciones anaeróbicas). Las colonias que presentaron pigmentación rojiza a castaño fueron subcultivadas para su purificación y estudio en medio Sistrom.

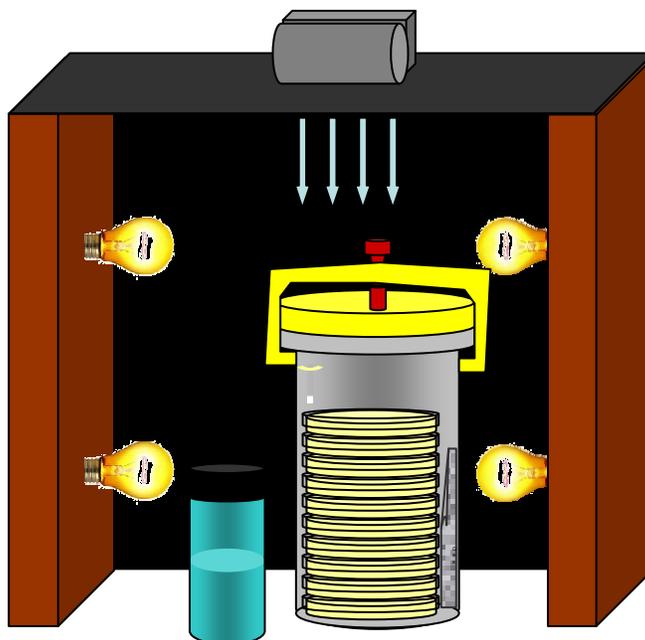


Figura 2.2. Para aislar las bacterias FAPNS se desarrolló un cajón de iluminación y ambiente anaerobio bajo luz. La figura ilustra el sistema construido para el crecimiento anaerobio de las bacterias estudiadas, el cual consistía de dos tablas de madera con 2 bombillas de tungsteno insertadas en cada una. Esto permitió iluminación total en cuatro direcciones asegurando la abundancia de ésta. La superficie y la parte de atrás fueron cubiertas con cartón negro y en el centro superior fue colocado un ventilador para minimizar el efecto del calor generado. Las flechas indican la dirección de la corriente de aire generada por el ventilador, la cual mantuvo la temperatura entre 28 y 32 °C. La jarra anaerobia o las botellas fueron colocadas en el área iluminada, rotándolas 90° cada 24 horas.

Caracterización morfológica, microscópica y macroscópica.

La morfología de los candidatos seleccionados fue estudiada macroscópicamente determinando el tamaño y color de sus colonias (Harley & Prescott, 2003). Se realizaron tinciones diferenciales para determinar la forma, arreglo y dimensiones (largo y ancho) de las células bacterianas (Harley & Prescott 2003). Para realizar estas tinciones, las bacterias fueron inoculadas en medio Sistrom líquido en botellas selladas y colocadas en condiciones anaerobias en presencia de luz. Luego de observado el “bloom” (aproximadamente de 24 a 48 horas), cada candidato fue fijado en laminilla con el propósito de aplicarle los tintes de acuerdo al tipo de tinción correspondiente (Madigan

et al., 2002). Las medidas de sus células fueron tomadas mediante microscopía de luz bajo el objetivo de 100x a una magnificación final de 1000x.

Microscopía Electrónica de Rastreo (MER)

Para la obtención de las imágenes, se desarrolló un método optimizado con el propósito de obtener una mejor calidad en la observación de organismos microscópicos bajo el MER. Los métodos propuestos por la literatura están diseñados para el procesamiento de organismos de gran tamaño, por lo que se realizaron algunos cambios. Para estudiar en detalle la morfología de las bacterias aisladas y determinar la presencia de estructuras externas, se utilizó un microscopio electrónico de rastreo JEOL JSM-5410 LV a 15kv (Centro de Microscopía del Departamento de Biología del Recinto Universitario de Mayagüez). Los candidatos fueron inoculados en medio Sistrom líquido en botellas de 4ml con rosca en condiciones anaerobias en presencia de luz. Luego de 48 horas, las células fueron centrifugadas en microtubos de 1.5 microlítros a 1610 xg y luego fijadas con glutaraldehído al 4% por 24 hrs a 4°C. El sedimento celular formado fue lavado realizando tres cambios de amortiguador de fosfato (0.1M Na_2HPO_4 , pH 7.2). Las muestras fueron deshidratadas mediante diluciones en serie de etanol desde 10% hasta 100%. El tiempo de deshidratación en cada alcohol lo fue de 10min, con incrementos sucesivos a intervalos de 10% en concentración de etanol, repitiendo en tres ocasiones la deshidratación final en alcohol absoluto. Una vez la muestra fue completamente deshidratada, se procedió al secado a punto crítico utilizando un Critical Point Drying Apparatus Polaron E3000 (modelo EMS 850). El sedimento deshidratado y secado fue adherido con cinta adhesiva de carbón

en cilindros de aluminio, seguido de una cobertura de oro-paladio. Los cilindros de aluminio con el sedimento ya listos fueron colocados en el microscopio electrónico de rastreo y observados a magnificaciones de 5,000x a 10,000x.

Caracterización fisiológica de las bacterias FAPNS

Para determinar qué características fisiológicas poseen las bacterias candidatas a FAPNS, se realizaron pruebas bioquímicas sobre la utilización de diferentes fuentes de carbono. Las bacterias fueron inoculadas en platos Petri conteniendo medio Sistro. Con una aguja de inocular se tomó una porción de las colonias de cada candidato y se suspendió en solución salina (0.85% NaCl) en microtubos de 1.5ml. Las muestras fueron centrifugadas a 1610 xg y luego, lavadas con 3 cambios de esta solución con el propósito de excluir elementos nutricionales del medio de inoculación previo (Sistro). En el tercer cambio, las células sedimentadas en el microtubo se resuspendieron en lo que pasó a ser la fuente de inóculo para las diferentes pruebas. La mayoría de las pruebas fueron realizadas de una manera miniaturizada en duplicado utilizando platos de ensayo de 96 fosas Costar[®], donde se inoculó cada candidato en cada una de las fosas con 200µl del medio de cultivo correspondiente para cada prueba. Cada fosa fue inoculada con 20µl de los candidatos y se realizaron los controles correspondientes a cada prueba. Las pruebas realizadas fueron colocadas en una jarra anaeróbica en presencia de luz e incubadas por 24 a 48 horas a 32°C, para luego realizar las lecturas mediante las observaciones colorimétricas correspondientes. Las pruebas miniaturizadas realizadas fueron: fermentación de glucosa, manitol, arabinosa, galactosa, lactosa, maltosa, fructosa, sacarosa, xilosa y manosa, la presencia de las

enzimas amilasa, gelatinasa, ureasa, oxidasa y catalasa, y la reducción de citrato y nitrato, utilizando protocolos descritos por Madigan et al. (2002).

Aislamiento y ensayo espectrofotométrico de complejos de pigmentos fotosintéticos.

Los pigmentos fotosintéticos de los candidatos se analizaron realizando espectros de absorción individuales mediante el uso de un espectrofotómetro (Génesis 2 Thermospectronic®). Luego de crecer las muestras en medio Sistrost líquido, se determinaron los picos de absorción y sus respectivos largos de onda. Se realizó un espectro de absorción de célula completa diluida en albúmina de suero bovino (BSA) 380 - 1100nm (Kiley & Kaplan, 1988). Se utilizaron picos característicos como indicadores de la presencia de pigmentos característicos de las bacterias FAPNS. Aquellos candidatos que presentaron largos de onda correspondientes a bacterioclorofila a y b (805-1040nm) y a pigmentos carotenoides (625-685nm) fueron clasificados como organismos con potencial fotosintético y posiblemente pertenecientes al grupo de las bacterias FAPNS.

Resultados

De 30 bromelias muestreadas, 26 resultaron positivas a la presencia de bacterias FAPNS. Estas 30 bromelias corresponden a tres géneros comunes en la flora de los bosques Puerto Rico. Los parámetros físico-químicos de cada fitotelmata se muestran en la tabla 2.1. El pH de las fitotelmatas muestreadas fluctuó entre 4.42 y 5.14. El intervalo de temperatura del agua fue de 24.4°C a 29.7°C. El oxígeno disuelto fluctuó entre 2.6 mg/L y 4.2 mg/L. La cantidad de luz irradiada sobre la planta fue de 304 a 543 lux (Tabla 2.1).

Se aisló un total de 26 colonias de la fitotelmata de distintas especies de bromelias encontradas en 5 bosques alrededor de toda la Isla. La mayoría de los organismos aislados mostraron una morfología macroscópica con 4 diferentes tonalidades de rojo: “Light Brown” (Castaño claro), “Red” (Rojo), “Brown” (Castaño) y “Dark Red” (Rojo oscuro) (figura 2.1) (Munsell® Color Chart).

Utilizando las técnicas clásicas de caracterización propuestas por Harley & Prescott (2003), se pudo determinar el color, forma, arreglo y dimensión de los candidatos. La caracterización microscópica mediante tinción Gram, mostró que todas las muestras fueron gram-negativas (tablas 2.2 a la 2.6). Análisis con microscopía electrónica de rastreo (MER), reveló que todos los candidatos son bacilos de longitud variable (tablas 2.2 a la 2.6).

La mayoría de los candidatos aislados crecieron a pH entre 6 y 8.5, entre 20 y 37°C, y con una salinidad de hasta 1%. Varios de los candidatos demostraron resistir un pH de hasta 5.5 y dos de éstos crecieron a una temperatura de 40°C.

Espectrofotométricamente, se observaron picos de absorción de célula completa desde los 300nm hasta los 1,100nm, mostrando picos en 805 y 865nm característicos de bacterioclorofila a y pigmentos carotenoides de la serie espiriloxantina con picos de absorbancia en 492, 515, y 549 nm (figura 2.7) (característicos de las bacterias FAPNS). Las pruebas bioquímicas demostraron que todos los candidatos demostraron poseer las enzimas amilasa, ureasa y catalasa, y lograron fermentar xilosa, manosa y ribosa (tabla 2.7). Por otro lado, ninguno posee la enzima gelatinasa, pero sí son capaces de utilizar citrato y nitrato como fuentes de carbono. Sólo ocho de los todos los candidatos pudieron fermentar lactosa y sólo doce fermentaron sacarosa (tabla 2.7).

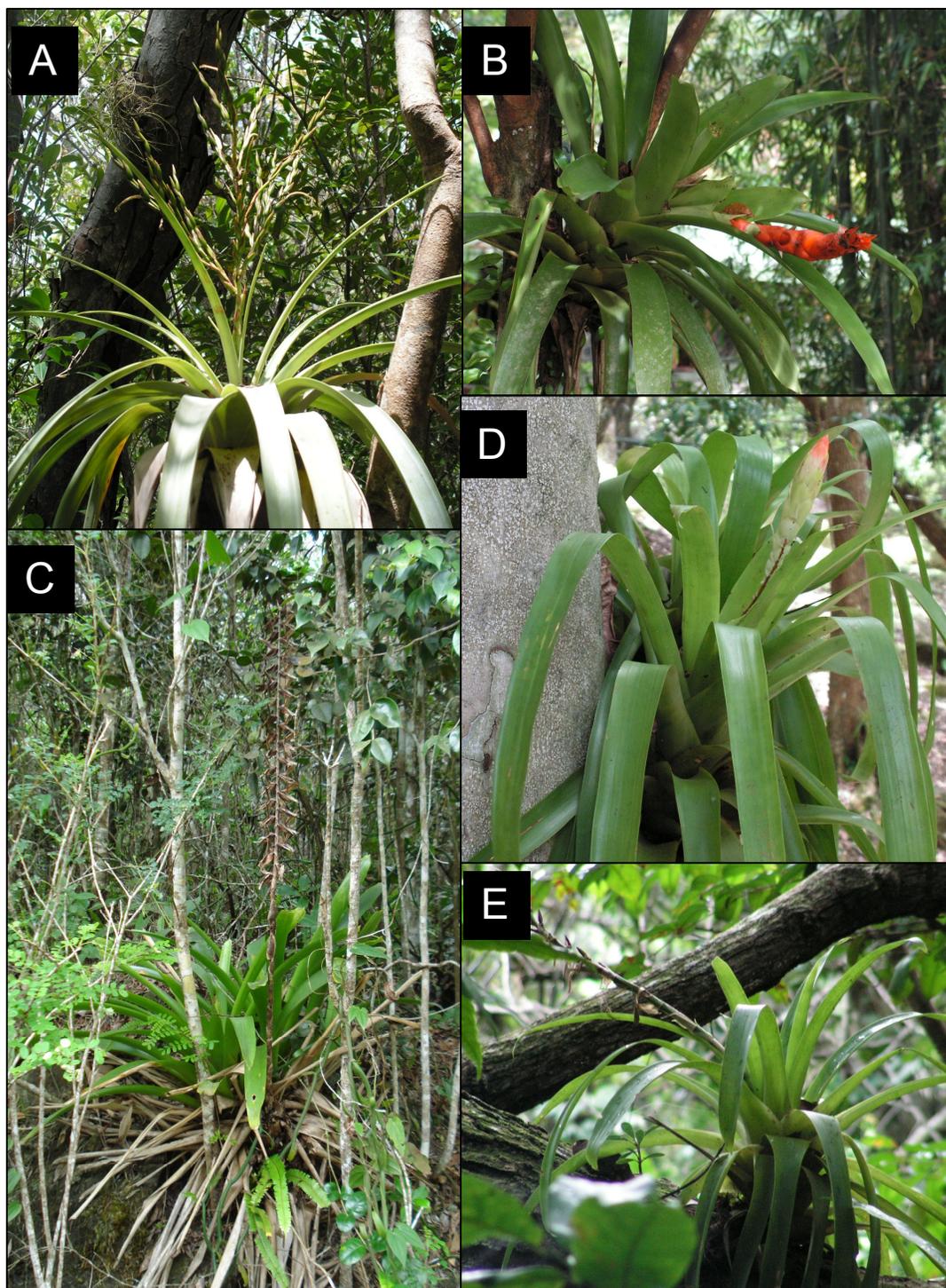


Figura 2.3. Las bromelias muestreadas pertenecen a 4 géneros distintos. A, *Tillandsia utricularia*; B, *Guzmania berteroniana*; C, *Vriesia macrostachia*; D, *Guzmania berteroniana*; E, *Guzmania* sp.

Tabla 2.1. Valores promedio de los parámetros físico-químicos de la fitotelmata de bromelias en diversos bosques de Puerto Rico.

Bosque	pH	Temperatura (°C)	Oxígeno Disuelto (mg/L)	Iluminación (lux)
A	4.84	29.7	4.1	543
B	4.82	24.4	2.6	365
C	4.42	26.1	4.2	304
D	4.78	27.0	3.1	382
E	5.14	25.5	3.9	399

*Valores correspondientes al promedio de tres bromelias por bosque

A=Bosque de Guánica, B= Bosque del Yunque, C=Bosque de Maricao, D=Bosque de Carite, E=Bosque de Guajacata.

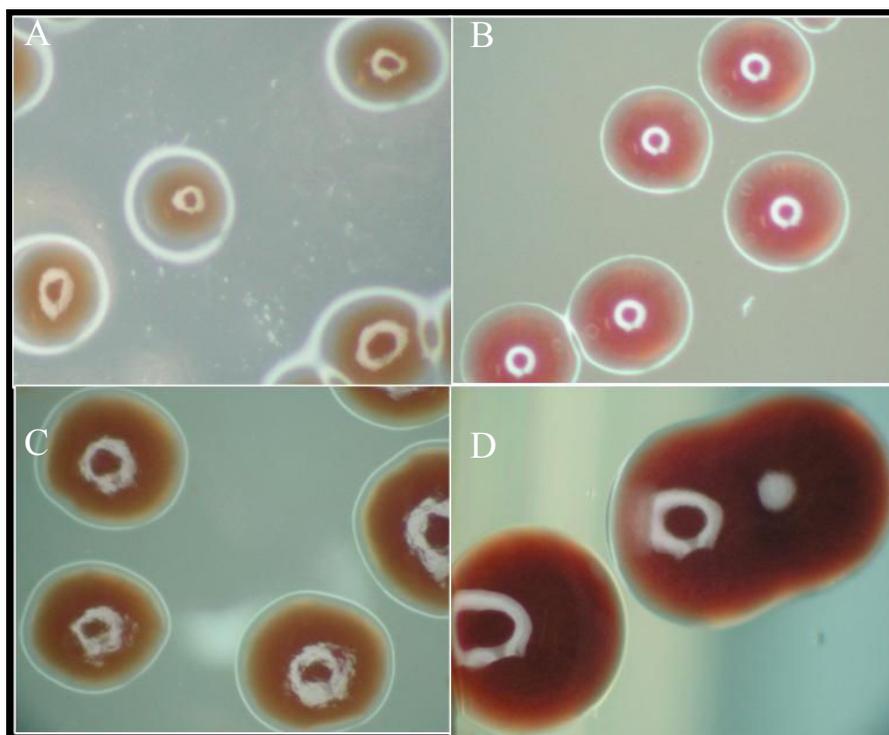


Figura 2.4 Se identificaron cuatro tipos de pigmentación mediante la comparación de coloración entre los candidatos aislados. Los colores son A(C11)(“Light Brown”), B(G17)(“Red”), C(M23)(“Brown”), D(G16)(“Dark Red”).

Tabla 2.2. Características microscópicas y pigmentación de las colonias de los candidatos aislados de la fitotelmata de bromelias del bosque seco de Guánica.

Muestra	Color de la colonia	Tinción Gram	Forma y arreglo a nivel microscópico	Dimensiones (μm) Largo x Ancho *	
G2	"Light Brown"	Negativa	Bacilo largo	2.12	0.63
G3	"Dark Red"	Negativa	Bacilo largo	5.66	0.65
G16	"Dark Red"	Negativa	Bacilo largo	2.29	0.68
G17	"Red"	Negativa	Bacilo largo	2.52	0.67
G18	"Brown"	Negativa	Bacilo largo	2.12	0.57

* Promedio de la medición de 50 células

Tabla 2.3. Características microscópicas y pigmentación de las colonias de los candidatos aislados de la fitotelmata de bromelias del bosque del Yunque.

Muestra	Color de la colonia	Tinción Gram	Forma y arreglo a nivel microscópico	Dimensiones (μm) Largo x Ancho*	
Y4	"Dark Red"	Negativa	Bacilo corto	1.09	0.78
Y6	"Red"	Negativa	Bacilo corto	1.54	0.52
Y19	"Dark Red"	Negativa	Bacilo largo	2.15	0.59
Y21	"Light Brown"	Negativa	Bacilo largo	2.11	0.53

* Promedio de la medición de 50 células

Tabla 2.4. Características microscópicas y pigmentación de las colonias de los candidatos aislados de la fitotelmata de bromelias del bosque de Maricao.

Muestra	Color de la colonia	Tinción Gram	Forma y arreglo a nivel microscópico	Dimensiones (μm) largo x ancho*	
M7	“Dark Red”	Negativa	Bacilo largo	1.91	0.55
M8	“Red”	Negativa	Bacilo largo	1.94	0.57
M9	“Dark Red”	Negativa	Bacilo largo	1.91	0.64
M22	“Red”	Negativa	Bacilo largo	2.38	0.59
M23	“Brown”	Negativa	Bacilo largo	1.99	0.51
M24	“Dark Red”	Negativa	Bacilo largo	2.38	0.48

* Promedio de la medición de 50 células

Tabla 2.5. Características microscópicas y pigmentación de las colonias de los candidatos aislados de la fitotelmata de bromelias del bosque de Carite.

Muestra	Color de la colonia	Tinción Gram	Forma y arreglo a nivel microscópico	Dimensiones (μm) largo x ancho*	
C10	“Brown”	Negativa	Bacilo largo	2.17	0.51
C11	“Light Brown”	Negativa	Bacilo largo	2.10	0.55
C12	“Red”	Negativa	Bacilo largo	2.24	0.63
C25	“Brown”	Negativa	Bacilo largo	2.86	0.87
C26	“Dark Red”	Negativa	Bacilo corto	1.11	0.65
C27	“Dark Red”	Negativa	Bacilo corto	1.16	0.93

* Promedio de la medición de 50 células

Tabla 2.6. Características microscópicas y pigmentación de las colonias de los candidatos aislados de la fitotelmata de bromelias del bosque de Guajataca.

Muestra	Color de la colonia	Tinción Gram	Forma y arreglo a nivel microscópico	Dimensiones (μm) largo x ancho*	
Gj13	"Brown"	Negativa	Bacilo corto	1.20	0.85
Gj15	"Dark Red"	Negativa	Bacilo largo	2.16	0.52
Gj28	"Dark Red"	Negativa	Bacilo corto	1.10	0.73
Gj29	"Dark Red"	Negativa	Bacilo largo	2.09	0.59
Gj30	"Brown"	Negativa	Bacilo largo	3.46	0.53

* Promedio de la medición de 50 células

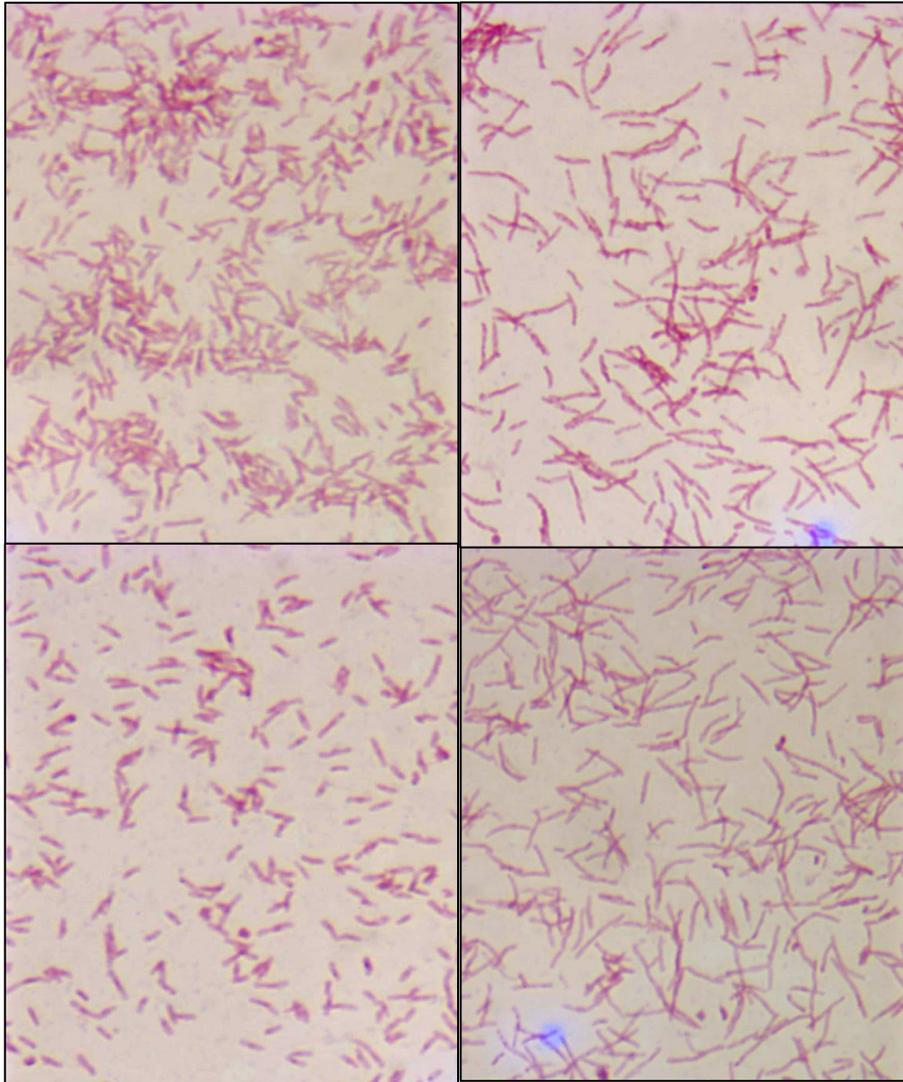


Figura 2.5. Las bacterias FAPNS aisladas mostraron morfología de bacilos de longitud variable, gram-negativo. Las letras en esta figura corresponden a la pigmentación designada en la figura 2.4 A(C11)= "Light Brown", B(G17)= "Red", C(M23)= "Brown", D(G16)= "Dark Red".

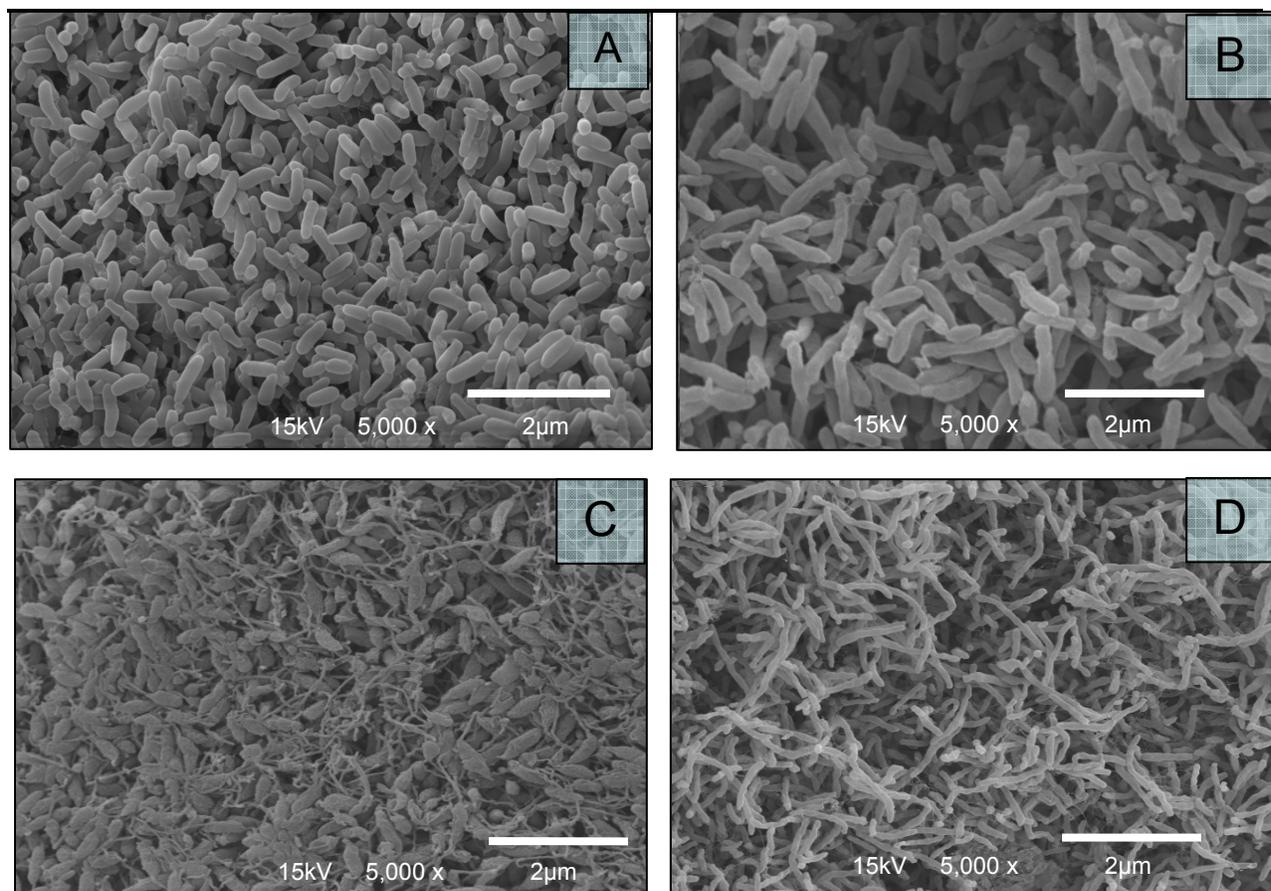


Figura 2.6. Imágenes de microscopía electrónica de rastreo (MER) realizada a los candidatos donde se muestra la morfología celular a una alta magnificación. Mediante MER se identificaron varias morfologías, cada una representada una letra: A. bacilos cortos y gruesos, B. bacilos largos y gruesos, C. bacilos cortos y ovalados con estructuras externas, D. bacilos largos y finos.

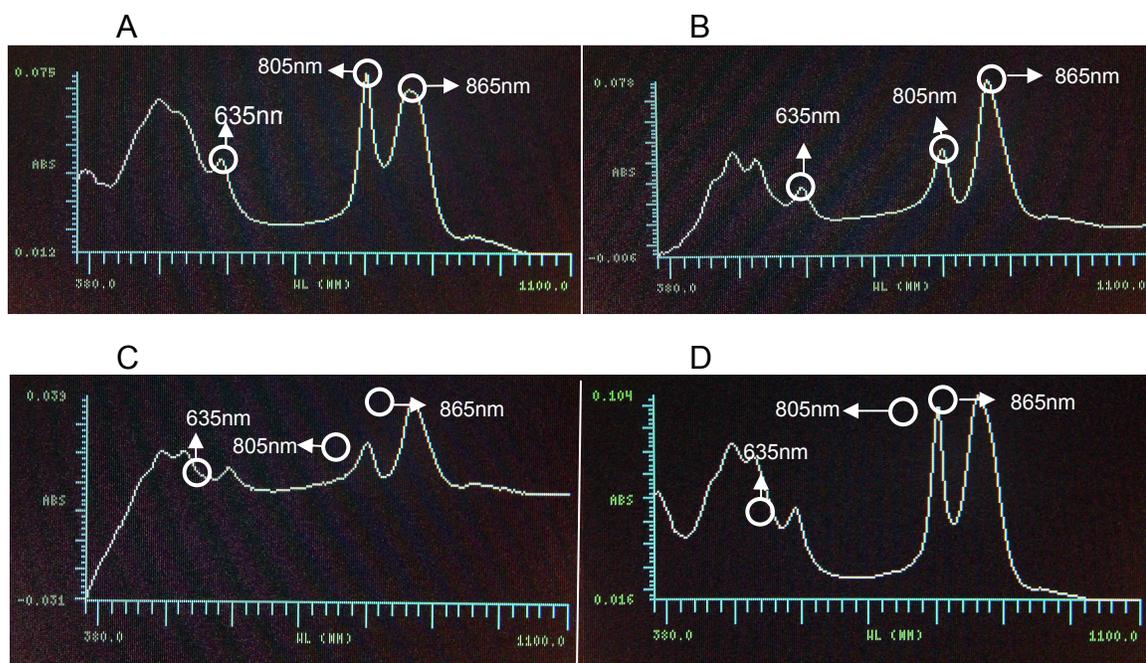


Figura 2.7. En el ensayo espectrofotométrico, los candidatos mostraron picos indicativos de largos de onda característicos de pigmentos fotosintéticos. Se les realizó un espectro de absorción de célula completa desde los 300nm a 1,100nm a los cuatro grupos según la pigmentación de su colonia. Las letras A, B, C y D representan las muestras C11, G17, M23 y G16, respectivamente. Los círculos indican los picos máximos de cada candidato.

Tabla 2.7. Resultados de las pruebas de fermentación de azúcares de los candidatos aislados de la fitotelmata de bromelias de diversos bosques de Puerto Rico.

Muestra	Lugar	Arabinosa	Fructosa	Galactosa	Glucosa	Lactosa	Maltosa	Manosa	Ribosa	Sacarosa	Xilosa
2	Guánica	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
3	Guánica	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	Guánica	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
17	Guánica	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
18	Guánica	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
4	Yunque	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
6	Yunque	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
19	Yunque	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
21	Yunque	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
7	Maricao	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	Maricao	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
9	Maricao	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
22	Maricao	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
23	Maricao	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	Maricao	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
10	Carite	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
11	Carite	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
12	Carite	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
25	Carite	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
26	Carite	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
27	Carite	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	Guajataca	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
15	Guajataca	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
28	Guajataca	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29	Guajataca	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
30	Guajataca	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

Los candidatos capaces de fermentar cada azúcar están representados con un símbolo positivo (+).

Discusión

El propósito principal de esta investigación es el aislamiento y caracterización de bacterias FAPNS de la fitotelmata de bromelias en diversos bosques de Puerto Rico. Los resultados indican la presencia de este grupo de bacterias en la fitotelmata de la mayoría de las bromelias muestreadas. Veintiséis de las muestras tomadas en treinta fitotelmatas de distintas bromelias mostraron un crecimiento rojizo en condiciones anaerobias utilizando Sistrom, medio utilizado para el crecimiento del grupo de bacterias en estudio (Sistrom, 1960). Este enrojecimiento es común en las bacterias FAPNS y es producido por los pigmentos carotenoides y la bacterioclorofila necesarios para fotosíntesis (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007). En cuatro bromelias no se encontraron bacterias FAPNS en el muestreo inicial, pero si pudieron ser aisladas en la repetición del muestreo. Esto demuestra que este grupo de bacterias FAPNS están presentes en todas las bromelias muestreadas y su resultado negativo en varios de los muestreos pudo haber sido causado por una baja concentración de células.

Las bromelias variaron en la cantidad de agua acumulada. Esto fue dependiente de la precipitación y la temperatura del lugar, que varió de 18.5 a 25.4 °C en los lugares de menor temperatura, como el Bosques del Yunque; y en lugares de mayor temperatura entre 26.6 °C, en las áreas de sombra, y 37.7 °C, en áreas más expuestas (Bosque Seco de Guánica). Lugares con mayor precipitación y menor temperatura como el Bosque del Yunque presentaron bromelias con mayor cantidad de agua, mientras que en lugares más secos con mayores temperaturas como el Bosque Seco de Guánica se encontró menor cantidad de agua. Sin embargo, la cantidad de agua no fue un factor para obtener un resultado positivo a la presencia de las bacterias FAPNS.

Los lugares con menor precipitación presentaron un color amarillento en el agua, mientras que en los lugares con mayor precipitación el agua fue más clara. Las bromelias muestreadas se encontraban a distintas alturas con respecto al suelo (entre >0 y 3 metros de altura). Esto tampoco fue un factor que afectó la presencia de estas bacterias en la fitotelmata. Este grupo de bacterias han demostrado poseer el potencial de crecimiento en una gran diversidad de ambientes y han demostrado la capacidad de crecimiento en un intervalo amplio de cada uno de los parámetros físico-químicos examinados (Pappas, 2004).

El pH promedio de las bromelias muestreadas fue de 4.80, mientras que los estudios realizados por Eterovick en 1999 promediaron un pH de 4.94. El intervalo de pH en las bromelias muestreadas fue desde 4.42 hasta 5.14. A pesar de que los candidatos en la pruebas de crecimiento a distintos pH, estos no crecieron a un pH menor que 5.5. Esto demuestra que los candidatos aislados logran resistir el pH de la fitotelmata de bromelias, ya que con este estudio demostramos la presencia de bacterias del grupo de las FAPNS en este ambiente. Estudios realizados por Eterovick en 1999 y por Kitching en 2001 demuestran que el agua en la fitotelmata de las bromelias es ligeramente ácida con un pH menor al agua de lluvia. Esto se debe a la descomposición de la materia orgánica cuyos desechos bajan el pH del agua almacenada.

El oxígeno disuelto de las fitotelmatas de bromelias muestreadas fluctuó entre 2.6 mg/L y 4.2 mg/L con un promedio de 3.58 mg/L. Estudios microbiológicos en bromelias realizados por Rivera y colaboradores en 1988 en el bosque del Yunque obtuvieron un promedio de 5.9 mg/L. El oxígeno disuelto puede ser afectado por varios factores; uno de éstos es la hora del día en que se toma la muestra. Durante el día la

luz permitirá la producción de oxígeno de las algas en la superficie y en la noche éste disminuye debido a que la fotosíntesis se detiene pero no la respiración y la descomposición de materia orgánica por los organismos que habitan en este ambiente acuático. El oxígeno producido por las algas disminuye la oportunidad de nuestros candidatos a llevar a cabo fotosíntesis anoxigénica en este ambiente a menos que en el fondo del tanque en la planta el oxígeno sea poco. Las bacterias pueden llevar a cabo fotosíntesis con poco o ningún oxígeno en presencia de luz (< 1.0 mg/L). Esto establece el potencial de realizar fotosíntesis en las partes profundas de la fitotelmata donde lleguen los rayos del sol.

La luz irradiada sobre la planta tuvo un promedio de 399 lux. Este valor es afectado por la cubierta vegetal que rodeaba las bromelias, la posición del sol y por la cantidad de nubes al momento de muestreo. Las bromelias del Bosque Seco de Guánica reciben mayor cantidad de luz con un promedio de 543 lux. Esto está relacionado con un menor follaje en comparación con los otros lugares de muestreo que caracteriza a este bosque seco permitiendo el paso de mayor luz solar hasta las plantas alrededor. El aumento en la cantidad de luz irradiada sobre la planta, provee una mayor disponibilidad de esta energía lumínica, la cual puede ser utilizada por las bacterias FAPNS presentes en la fitotelmata.

Uno de los objetivos principales de esta investigación es el aislamiento y caracterización de bacterias FAPNS de la fitotelmata de bromelias en diversos Bosques de Puerto Rico. Luego de un periodo de 72 horas fue notable el crecimiento en las botellas con Sistrom en caldo. El medio Sistrom en condiciones anaerobias bajo luz permitió el enriquecimiento de los organismos fotoheterótrofos presentes en la fitotelmatas muestreadas. Este método fue utilizado para crear una doble selección, ya

que crecerían solamente bacterias que utilizan succinato como fuente de carbono en condiciones anaerobias bajo luz dando así mayor oportunidad de crecimiento a las bacterias FAPNS (Pappas *et al.* 2004). Las colonias de los organismos capaces de realizar fotosíntesis anoxigénica produjeron una pigmentación rojiza lo que pudo ser observado en las botellas inoculadas con los candidatos formando un “bloom”.

La fitotelmata de las cuatro especies de bromelias muestreadas demostró ser hábitat para las bacterias FAPNS. Los 30 muestreos realizados corresponden a 15 bromelias que fueron muestreadas en dos ocasiones. De éstos, cuatro bromelias no mostraron crecimiento en uno de los dos intentos, pero demostraron la presencia de este grupo bacteriano en su repetición. En la fitotelmata de estas cuatro bromelias el número de unidades formadoras de colonias podría ser limitado.

Las muestras de todos los bosques y de todas las especies muestreadas mostraron cuatro tonalidades en la coloración de las colonias de los candidatos. Esta característica fenotípica pudo ser observada y fotografiada con mayor detenimiento luego de que los candidatos fueron aislados y estriados en platos Petri con medio Sistrom sólido. Esta característica permitió agrupar los candidatos en cuatro grupos basados en el color de sus colonias (“Light Brown”, “Red”, “Brown” y “Dark Red”) (figura 2.1). El nombre y el color les fue asignado a los candidatos utilizando como referencia la carta de colores de Munsell®. La variabilidad en color se debe a la presencia de distintas combinaciones e intensidades de los pigmentos carotenoides con bacterioclorofila a o b, que pueden ser medidos y estudiados en un espectro de absorción de luz entre un intervalo de 625 a 1040 nm (Glaeser & Overmann, 1999). Los carotenoides presentes en la mayoría de los géneros del grupo de bacterias FAPNS son espiriloxantina y esferoidenona (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007). Sólo los géneros

Rhodocyclus y *Rhodopila* poseen rodopinal (púrpura-violeta) y Keto-carotenoides (púrpura-rojo) respectivamente (Imhoff & Trüper, 2005). El color de la colonia dependerá de varios factores, como la cantidad de pigmento producido, mutaciones en los genes que producen el pigmento y el tipo de pigmento producido. Estos pigmentos son identificados en la actualidad utilizando técnicas avanzadas como la cromatografía líquida de alto rendimiento (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007).

Las bacterias FAPNS tienen una pigmentación rojiza gracias a pigmentos carotenoides y bacterioclorofila, que son parte importante en que estas tengan la habilidad de llevar a cabo fotosíntesis en condiciones anaerobias en presencia de luz. La presencia de pigmentos es una de las características más importantes de este grupo de bacterias, ya que son visibles en el espectro de absorción de luz. Picos máximos de estos pigmentos pueden ser observados con un espectro de célula completa en un intervalo de 380 a 1,100 nm. En la figura 2.7 se puede observar un espectro de célula completa realizado a los candidatos donde podemos ver picos máximos en A. 495, 535, 590, 805 y 865; B. 490, 525, 590, 805 y 865; C. 495, 530, 595, 805 y 870; y D. 495, 525, 595, 805 y 865. Estos largos de onda corresponden a bacterioclorofila a con picos máximos entre los 805-1040nm (Braun & Scherz, 1990) y pigmentos carotenoides específicamente de la serie espiriloxantin con picos máximos en los 492, 515, y 549nm (Glaeser & Overmann, 1999). Dos de las especies de bacterias que presentan mayor similitud a estos espectros son *Rhodopseudomonas palustris*, con picos máximos en 375, 468, 493, 520-545, 589, 802 y 860-875nm, y *Rhodomicrobium vannielli*, con picos máximos en 378, 461, 488-490, 522-525, 800-807 y 869-872 nm (Imhoff y Trüper 2005).

Según Oda y colaboradores (2002), los géneros de bacterias FAPNS pueden mostrar diferencias en morfología lo que puede ser utilizado como una herramienta

taxonómica para su identificación y caracterización. Las células de las colonias aisladas de cada candidato fueron comparadas mediante microscopía de luz determinando su morfología, dimensión y tinción Gram. Los candidatos variaron en tamaño y morfología; pero no en el resultado de la tinción. En la figura 2.5 podemos observar que las células de los candidatos son bacilos gruesos, ovalados o finos, gram-negativo de longitud variable. En la literatura todos los miembros de este grupo son clasificados gram-negativo y sus tamaños y morfologías varían.

Debido el reducido tamaño de la mayoría de las células de los candidatos aislados, su observación en el objetivo de inmersión en aceite (100x) no fue clara (figura 2.5). Es por esto que utilizamos una herramienta de mayor magnificación y profundidad de enfoque: el microscopio electrónico de rastreo (MER) (figura 2.6). En estas imágenes tridimensionales pudimos observar cuatro morfologías distintas entre los candidatos con diferente pigmentación, algo que no pudo ser observado en el microscopio de luz. Además, en la figura 2.6c pudimos observar estructuras externas características de *Rhodospirillum vannielli*. El diseño de este método resultó ser eficiente, ya que se obtuvieron imágenes de alta calidad donde las células de los candidatos pudieron ser observadas en detalle (figura 2.6).

Cada género de grupo de bacterias FAPNS posee o no ciertas enzimas, que permiten utilizar fuentes específicas de carbono y/o fermentar distintas azúcares, lo cual permite realizar una caracterización fisiológica de los candidatos. Las bacterias aisladas fueron crecidas en medios utilizados para la determinación de la fermentación de varias azúcares (tabla 2.7), la utilización de diversas fuentes de carbono, como el citrato y el nitrato, y la detectación de enzimas, como gelatinasa, catalasa, amilasa y ureasa.

Mediante estas pruebas los candidatos pudieron ser caracterizados, diferenciados y divididos en seis grupos.

Mediante las pruebas de intervalos de crecimiento la prueba de temperatura permitió clasificar a los candidatos en dos grupos. La mayoría de las bacterias aisladas crecieron entre 20 y 37°C mientras que dos de los candidatos (G17 y G18) crecieron entre 20 y 40°C. Esta característica permitió clasificar a todas las bacterias aisladas como mesofílicas. Un dato importante es que los dos candidatos que presentaron un intervalo mayor de temperatura de crecimiento fueron aislados de la fitotelmata de bromelias del Bosque Seco de Guánica. Este lugar de muestreo presentó un promedio de temperatura más alto que el de los otros bosques muestreados (tabla 2.3). Los candidatos fueron capaces de tolerar un ambiente de crecimiento en medio Sistrom desde 0.33% hasta 1% de NaCl. Esto significa que estos organismos están destinados a vivir en ambientes con una salinidad similar al de los cuerpos de agua dulce. Tomando en cuenta el crecimiento según intervalos de pH, pudieron ser observados tres grupos o patrones. La mayoría de los candidatos crecieron en un intervalo de 5.5 a 8.5, siendo éstos los que presentaron un intervalo con mayor amplitud. Los otros dos patrones de crecimiento de los candidatos fueron en intervalos de 6.0 a 8.5 y de 6.5 a 8.5.

Dentro del grupo de las bacterias FAPNS podemos encontrar una gran variedad de especies que son capaces de crecer en estos parámetros. En el capítulo tres se presenta que la mayoría de los candidatos mostraron similitud en la genética de su 16S rDNA con las especies *Rhodopseudomonas palustris* y *Rhodomicrobium vannielli*, ambas bacterias FAPNS. *R. palustris* es una bacteria mesofílica de agua dulce capaz de crecer en un intervalo de pH de 5.5 a 8.5 y una temperatura entre 30 y 37°C. *R.*

vannielli es una bacteria acídica mesofílica de agua dulce capaz de crecer en un intervalo de 5.2 a 7.5 y a una temperatura óptima de 30°C. Al comparar los candidatos con las especies sugeridas se observó gran similitud. Sin embargo, todas los candidatos relacionados con *R. vannielli* mostraron un intervalo de pH mayor al de esta especie ya que demostraron crecimiento hasta un pH de 8.5.

La ubicuidad del grupo de bacterias FAPNS les ha permitido ser aisladas de una gran variedad de ambientes. La fitotelmata de bromelias provee un microhábitat de agua dulce con una gran disponibilidad de nutrientes. Según Richardson en el 1999, las bromelias poseen en sus tanques especies de organismos que son endémicas y muchos de éstos no han sido descritos (Foissner, 2003). Los candidatos aislados en este estudio pueden ser nuevas especies de bacterias FAPNS descritas de este lugar. Este experimento demuestra la presencia de bacterias FAPNS en la fitotelmata de bromelias formando así parte de la comunidad que habita en el agua que se acumula entre las hojas de esta planta. Este ambiente se suma a la variedad de ambientes en que este grupo de bacterias ha sido aislado, demostrando la variabilidad de condiciones al que este grupo de bacterias pueden adaptarse.

Conclusiones

- Es posible aislar bacterias fototróficas anoxigénicas púrpuras no sulfurosas de la fitotelmata de diversas bromelias en diversos bosques de Puerto Rico.
- Todas las bacterias aisladas fueron bacilos gram-negativos de tamaño variable.
- Basado en la morfología observada en imágenes de MER, los candidatos pudieron ser caracterizados y uno de éstos relacionado a la especie *Rhodospirillum rubrum*, según sus estructuras externas.
- Según el análisis espectrofotométrico, los candidatos poseen pigmentos carotenoides de la serie espiriloxantina y bacterioclorofila a.

Capítulo III

Caracterización molecular de bacterias FAPNS aisladas de la fitotelmata de bromelias de diversos bosques de Puerto Rico

Introducción

Además de las pruebas morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y serológicas utilizadas para la clasificación de microorganismos, se han desarrollado pruebas moleculares las cuales se han convertido en las más utilizadas y confiables para la caracterización y diferenciación genética de especies microbianas. Estos avances en la biología molecular han logrado complementar las técnicas de clasificación clásicas de la microbiología general (Pace, 1986). En la actualidad, las técnicas moleculares se encuentran al alcance de los laboratorios de investigación por lo que la descripción actual de bacterias requiere la utilización de técnicas tales como el análisis de ácidos nucleicos, incluyendo la Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR), contenido de G+C, secuenciación del gen que codifica para *16S rRNA*, hibridación de DNA y Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP); (Imhoff *et al.*, 1998), entre otros.

La secuencia de nucleótidos del *16S rDNA* es considerada una de las herramientas más importantes en la identificación, caracterización y descubrimiento de nuevos organismos. Este gen es relativamente grande, de distribución universal, de función constante y no se puede transferir horizontalmente. Posee secuencias altamente conservadas, codifica para uno de los componentes estructurales del ribosoma, organelo esencial para el mecanismo celular de síntesis de proteínas (traducción); (Woese, 2004). El gen *16S rDNA* mediante técnicas de ingeniería genética como PCR, puede ser secuenciado y esta información puede ser utilizada para establecer las relaciones filogenéticas (Woese, 2004). Gracias a esto las bacterias FAPNS han experimentado una redistribución taxonómica en los últimos años

permitiendo el descubrimiento de nuevas especies y la re-localización de varios de sus géneros en distintas familias (Imhoff *et al.*, 1998).

En estudios de identificación se recomienda utilizar métodos moleculares alternos para demostrar la identidad y heterogeneidad entre especies (Imhoff & Caumette, 2004). Uno de estos métodos es la amplificación mediante PCR de los genes *puf* y su posterior secuenciación. Además del *16S rDNA*, las secuencias de nucleótidos de los genes *puf* pueden proveer información filogenética importante adicional y pueden ser incluidas en consideraciones cuando sea posible. Los genes *puf* codifican para las proteínas que componen estructuralmente el centro de reacción. En la actualidad existen iniciadores específicos que posibilitan la amplificación del gen *pufM*, el cual codifica para la proteína PufM. Dicha proteína cumple un papel esencial en completar el proceso de fotosíntesis en este grupo bacteriano (Achenbach *et al.*, 2001). En esta sección, se describirán diversos métodos moleculares utilizados para completar la identificación de los candidatos de las bacterias FAPNS aisladas de la fitotelmata de bromelias en PR. En este capítulo se presentan el uso de la amplificación de los genes *16S rDNA* y *pufM* mediante la técnica de PCR, y el análisis *insilico* con el propósito de establecer una comparación filogenética entre los candidatos aislados de la fitotelmata de diversos bosques de Puerto Rico.

Materiales y Métodos

Extracción de DNA

El DNA genómico de los candidatos fue extraído siguiendo el método descrito por Wen-ping y Tsong (1993). En resumen, los organismos fueron inoculados en platos Petri conteniendo medio Sistro e incubados por 48 horas en condiciones anaerobias en presencia de luz a 30°C. Se transfirió 1.5 µl del cultivo a un microtubo estéril y se centrifugó a 12,879 Xg por 3 minutos. El sobrenadante fue descartado y el sedimento conteniendo las células fue resuspendido en 200 µl de amortiguador de lisis y 66 µl de NaCl 5M. El lisado se centrifugó a 15,115 Xg, y el sobrenadante se transfirió a un microtubo estéril de 1.5 µl. Luego, se realizó una extracción orgánica añadiendo un volumen de cloroformo al sobrenadante. La solución fue centrifugada a 15,115 Xg por 3 minutos, y la fase acuosa fue transferida a un nuevo microtubo estéril. Este proceso se repitió hasta observar una interfase clara y limpia (libre de impurezas). El DNA genómico fue precipitado añadiendo dos volúmenes de etanol absoluto frío seguido de una incubación a -20°C por un mínimo de una hora. Luego de la precipitación, el DNA genómico fue sedimentado a 15,115 Xg por 10 minutos y el sobrenadante descartado. El DNA sedimentado se lavó con 500 µl de etanol al 70% frío y, luego de sedimentado a 15,115 Xg por 15 minutos, el sobrenadante se descartó nuevamente y el sedimento se dejó secar por no más de 5 minutos a temperatura ambiente. El DNA genómico fue resuspendido en 50 µl de Tris (10mM) EDTA (1mM), TE (1X) y almacenado a -20°C para su uso más adelante.

La extracción de DNA fue corroborada mediante electroforesis en gel de agarosa 1% a 80 voltios en amortiguador ácido Tris-EDTA 1X (0.04M de acetato de Tris, 0.001M

de EDTA, pH 8.0). Las muestras fueron luego teñidas con bromuro de etidio 1µg/ml por 10 minutos y desteñidas en agua destilada.

Reacción de polimerasa en cadena (PCR) del 16S *rDNA*

El DNA genómico extraído de los candidatos fue utilizado para realizar la técnica de PCR con el propósito de amplificar el gen que codifica para la subunidad 16S rRNA del ribosoma bacteriano. Se utilizaron los iniciadores oligo 14-F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') y BAD1492-R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT3') (Willmote & Wachter, 1993). La reacción de PCR consistió de 0.5 pmol de cada iniciador, y GoTaq® Green Mastter Mix de Promega®, la cual es una mezcla con reactivos para el PCR como: GoTaq® DNA Polymerase 2X, Green GoTaq® Reaction Buffer (pH 8.5), 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP y 3mM de MgCl₂. Cada reacción de PCR se realizó en un “thermocycler” GeneAmp® PCR system 2700 de “Applied Biosystem Company”. Los parámetros de amplificación del 16S *rDNA* fueron los siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C por 3 minutos y 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineamiento a 48 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 1.5 minutos, y para finalizar un último periodo de extensión se llevó a cabo a 72 °C por 10 minutos.

La amplificación del gen de 16s *rDNA* fue corroborada mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% a 80 voltios en amortiguador ácido Tris-EDTA 1X (0.04M de acetato de tris, 0.001M de EDTA, pH 8.0), y luego fue teñido y desteñido como se describe anteriormente. Según la literatura, las bandas esperadas fueron de aproximadamente 1,500 pb.

Reacción de polimerasa en cadena (PCR) de *pufM*

La amplificación del gen de *pufM* se realizó a todos los candidatos mediante el uso de los iniciadores específicos *pufM*-557-F (5'CGCACCTGGACTGGAC3') y *pufM*-750-R (5'CCCATGGTC CAGCGCCAGAA3') (Achenbach et al., 2001). La concentración de los reactivos en cada reacción de PCR fue igual a la descrita anteriormente. Cada reacción de PCR se realizó en un "thermocycler" GeneAmp® PCR system 2700 de "Applied Biosystem Company". Los parámetros de amplificación usados lo fueron: desnaturalización inicial a 94 °C por 3 minutos y 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, alineamiento a 55 °C por 1 minuto y extensión a 72 °C por 1 minuto. Se realizó una extensión final a 72 °C por 10 minutos.

La amplificación del gen *pufM* fue corroborada mediante electroforesis en gel de agarosa, según descrita anteriormente. El peso molecular esperado de las bandas amplificadas fue de 229 pb, es por esto que se usó el marcador molecular 100pb (Promega®).

Secuenciación de DNA y análisis *in silico*

El DNA producto de la amplificación del gen *16s rDNA* y *pufM* de todos los candidatos fue enviado a secuenciar a la compañía MacroGen (www.macrogenusa.com). Una vez obtenidas las secuencias se les realizó un análisis *in silico* usando diversas bases de datos disponibles en internet como lo es Blast de Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI).

Análisis filogenético

Las regiones amplificadas del gen *16S rDNA* de los candidatos colectados en diversos bosques de Puerto Rico fueron editadas mediante el programa Chromas lite 2.01 y BioEdit 7.05.3 y alineadas con el servidor Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>). Las secuencias alineadas del *16S rDNA* de los candidatos sirvieron para generar el árbol filogenético mediante la utilización del programa MEGA 3 Tree Explorer utilizando secuencias con un tamaño de 700 bases. El modelo de distancia utilizado fue el de distancia p y el examen de “bootstrap” para filogenia fue calculado para mil réplicas. La creación del árbol consenso fue hecho por el método NJ- vecino más cercano (“Neighbour-Joining”). Para determinar la presencia de quimeras, las secuencias fueron colocadas en el programa Pintail 1.1.

Resultados

La reacción de PCR de *16S rDNA* a partir de DNA genómico de los candidatos mostró bandas con pesos de aproximadamente 1,500 pares de bases. En la amplificación mediante PCR del gen *pufM* a partir de DNA genómico, todos los candidatos obtuvieron una amplificación positiva, mostrando bandas con tamaños de aproximadamente 229 pares de bases (Figura 3.2).

Mediante la construcción del árbol filogenético se logró observar la relación basada en el *16S rDNA* de los candidatos con especies de bacterias FAPNS y otras especies de bacterias conocidas (Figura 3.3). La rama filogenética con el mayor número de especies relacionadas a las bacterias FAPNS comprende 14 candidatos con una gran similitud con el género *Rhodopseudomonas* (G18, G17, Gj15, M9, M7 G3, Y19, G16, C12, C10, M8, Gj29, G2 y C25); y en la misma rama filogenética que el género *Rhodomicrobium* se encuentran 3 candidatos (M24, Y4, C26). Un total de cinco candidatos fueron colocados en ramas filogenéticas distantes a los géneros de bacterias FAPNS pertenecientes a las α -proteobacterias, pero colocados cercano a bacterias FAPNS del grupo de las β -proteobacterias, como *Rhodocyclus sp.* Otro grupo de cuatro candidatos parece estar relacionados filogenéticamente con enterobacterias y presentan notables diferencias filogenéticas respecto a las bacterias FAPNS descritas hasta el momento.

Tabla 3.1 Número de acceso y procedencia de las secuencias del 16S rDNA colocadas en la base de datos de GenBank.

Candidato	Procedencia	Número de acceso en GenBank	Pares de bases depositadas en GenBank
G1	<i>Tillandsia utricularia</i> de Guánica	FJ036904	566
G3	<i>Tillandsia utricularia</i> de Guánica	FJ036905	920
Y4	<i>Guzmania berteroniana</i> del Yunque	FJ036906	953
Y6	<i>Guzmania berteroniana</i> del Yunque	FJ036907	700
M7	<i>Vrisea macrostachia</i> de Maricao	FJ036908	757
M8	<i>Vrisea macrostachia</i> de Maricao	FJ036909	781
M9	<i>Vrisea macrostachia</i> de Maricao	FJ036910	732
C10	<i>Guzmania berteroniana</i> de Carite	FJ036911	992
C11	<i>Guzmania berteroniana</i> de Carite	FJ036912	700
C12	<i>Guzmania berteroniana</i> de Carite	FJ036913	1052
Gj13	<i>Guzmania</i> sp. de Guajataca	FJ036914	900
Gj15	<i>Guzmania</i> sp. de Guajataca	FJ036915	845
G16	<i>Tillandsia utricularia</i> de Guánica	FJ036916	1096
G17	<i>Tillandsia utricularia</i> de Guánica	FJ036917	700
G18	<i>Tillandsia utricularia</i> de Guánica	FJ036918	823

Tabla 3.1 (Cont.)

Y19	<i>Guzmania berteroniana</i> del Yunque	FJ036919	977
Y21	<i>Guzmania berteroniana</i> del Yunque	FJ036920	1090
M22	<i>Vrisea macrostachia</i> de Maricao	FJ036921	786
M23	<i>Vrisea macrostachia</i> de Maricao	FJ036922	816
M24	<i>Vrisea macrostachia</i> de Maricao	FJ036923	917
C25	<i>Guzmania berteroniana</i> de Carite	FJ036924	590
C26	<i>Guzmania berteroniana</i> de Carite	FJ036925	751
C27	<i>Guzmania berteroniana</i> de Carite	FJ036926	700
Gj28	<i>Guzmania</i> sp. de Guajataca	FJ036927	700
Gj29	<i>Guzmania</i> sp. de Guajataca	FJ036928	668
Gj30	<i>Guzmania</i> sp. de Guajataca	FJ036929	700

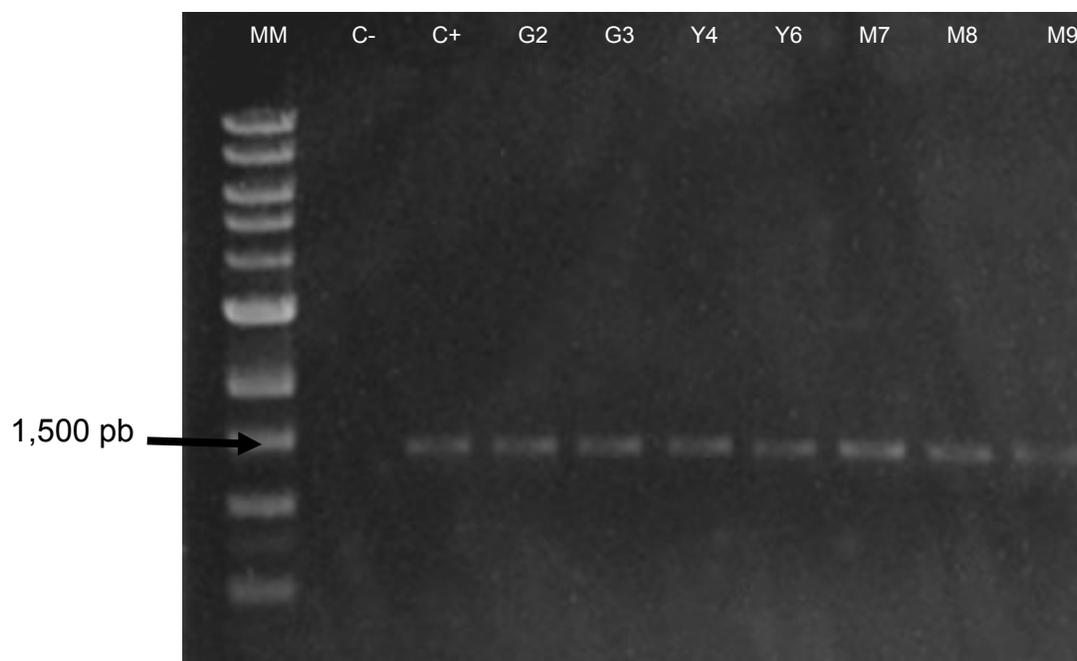


Figura 3.1. **Amplificación mediante PCR del 16S rDNA de los candidatos aislados de la fitotelmata de bromelias en diversos bosques de Puerto Rico.** La flecha indica la banda de 1,500 pb del marcador molecular 1kb, utilizada para aproximar el peso de la amplificación. De acuerdo a la literatura el tamaño del gen 16S rDNA es de aproximadamente 1,500 pb. De izquierda a derecha: Marcador molecular (MM), Control negativo (C-), control positivo (C+) y la letra junto al número corresponde a la identificación de las muestras tomadas.

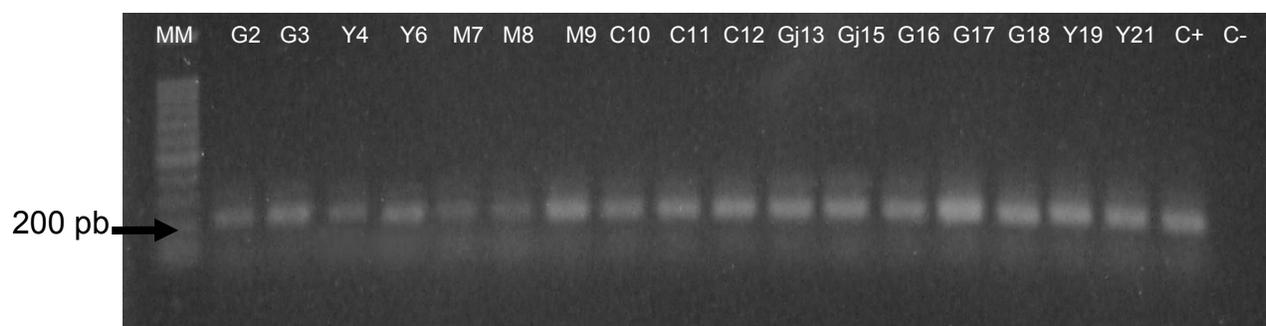


Figura 3.2. **Amplificación mediante PCR del gen *pufM* de los candidatos aislados de la fitotelmata de bromelias en diversos bosques de Puerto Rico.** La flecha indica la banda de 200 pb del marcador molecular 100bp utilizada para aproximar el peso de la amplificación. De acuerdo a la literatura el tamaño del gen *pufM* es de 229 pb. De izquierda a derecha: Marcador molecular (MM), la letra junto al número corresponde a la identificación de las muestras tomadas (G2-Y21), control positivo (C+) y control negativo (C-).

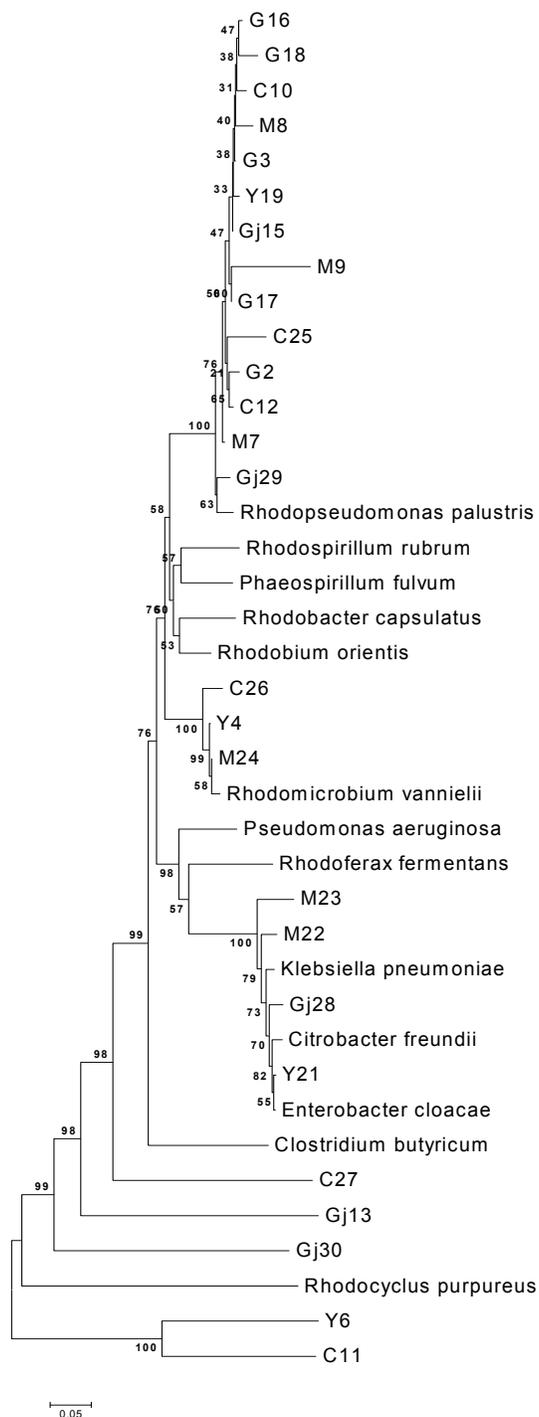


Figura 3.3. **Árbol filogenético del 16S rDNA de los 26 candidatos aislados de la fitotelmata de bromelias de diversos bosques de Puerto Rico.** Para generar el árbol se utilizó el método de NJ-vecino más cercano (“Neighbour-Joining”) y el árbol fue construido mediante el programa Mega 3 Tree Explorer. La barra representa 5 sustituciones por 100 nucleótidos. Los valores “bootstrap” se indican en el árbol.

Discusión

En el 2001 Achenbach y sus colaboradores diseñaron iniciadores específicos para la amplificación del gen *pufM*. Este gen codifica para la proteína PufM (subunidad M del centro de reacción del aparato fotosintético) y está presente en bacterias con la capacidad de realizar fotosíntesis anoxigénica (Achenbach *et al.*, 2001). En la figura 3.2 podemos observar que la amplificación del gen *pufM* mediante PCR fue positiva en todos los candidatos. Esto fue comprobado al obtener bandas de aproximadamente 229 pb, observadas en el gel de electroforesis de la figura 3.2, y mediante la secuenciación del DNA amplificado con los iniciadores específicos para el gen *pufM*. Además, los resultados obtenidos en el capítulo II muestran que todos los candidatos poseen pigmentos carotenoides y bacterioclorofila, presentes en bacterias capaces de realizar fotosíntesis anoxigénica (Figura 2.4). Esto significa que todos los candidatos obtenidos en este estudio poseen la capacidad de realizar fotosíntesis anoxigénica.

En el árbol filogenético (figura 3.3) podemos observar que los candidatos Gj28, Y21, M23 y M22 están ubicados en una posición filogenética distante a las bacterias FAPNS reportadas. Estos cuatro candidatos son cercanos filogenéticamente a enterobacterias, grupo en el que no se ha reportado la capacidad de realizar fotosíntesis anoxigénica. Achenbach y sus colaboradores en el 2001 demostraron la especificidad de estos iniciadores al no obtener amplificaciones positivas en bacterias cercanas a especies de bacterias anoxifototróficas, muchas de estas parte de la familia Enterobacteriaceae. Entre las especies que demostraron ser *pufM* negativas utilizadas por Achenbach y sus colaboradores se encuentran: *Bradyrhizobium japonicum*, *Dechloromonas agitata*, *Dechlorosoma suillum*, *Nitrosomonas europaea*, *E. coli*, *K.*

pneumoniae, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Methylobacterium extorquens*, *Serratia marcesans*, *Azotobacter choococcum*, *Thiobacillus neapolitanus*, *Shewanella putrefaciens*, *Pelobacter carbinolicus* y *Campylobacter foetus*. Debido a la especificidad de estos iniciadores, se demuestra que los candidatos Gj28, Y21, M23 y M22 poseen la potencialidad de realizar fotosíntesis a pesar de que se relacionan en su secuencia del *16S rDNA* al grupo de las enterobacterias. Basados en esto podemos sugerir el descubrimiento de al menos 4 nuevas especies capaces de realizar fotosíntesis anoxigénica. Estos 4 candidatos, basándonos en los resultados del capítulo II y III, cuentan con la posibilidad de ser especies o géneros nuevos de bacterias FAPNS que pueden ser aislados de la fitotelmata de bromelias en diversos bosques de Puerto Rico.

El análisis *insilico* del *16S rDNA* relacionó a los candidatos G18, G17, Gj15, M9, M7 G3, Y19, G16, C12, C10, Gj29, C25, G2 y M8 con la bacteria *Rhodopseudomonas palustris*. Esto indica que este género puede ser encontrado específicamente en la fitotelmata de todas las especies de bromelias y en cada uno los bosques muestreados. Entonces en la fitotelmata de las bromelias en bosques de Puerto Rico el género de bacteria FAPNS más abundante es *Rhodopseudomonas*. Estudios realizados por Bradshaw y Creelman en el 1984, además, reportaron este género en la fitotelmata de plantas carnívoras. Basado en esto y en nuestros resultados, podemos indicar que este género puede ser aislado de la fitotelmata de varios tipos de plantas y fue el más frecuentemente observado en estos ambientes en comparación con el resto de las bacterias FAPNS. La mayoría de estos candidatos (14) se relacionan filogenéticamente a la especie *R. palustris*, pero a pesar de que poseen características morfológicas parecidas, varios poseen características fisiológicas distintas mostradas en los

resultados de las pruebas bioquímicas descritas en el capítulo II. A pesar de que 14 candidatos se encuentran en la misma rama filogenética que la especie *R. palustris*, varios de éstos se encuentran distantes en el árbol filogenético. Esto muestra alguna diferencia filogenética entre varios candidatos y la especie *R. palustris*. Por lo tanto, podemos sugerir que en nuestro estudio poseemos especies nuevas para el género *Rhodopseudomonas*.

Imágenes de MER en la parte de resultados del capítulo II (Figura 2.4-C) muestran células con proyecciones externas característica del género *Rhodomicrobium*, miembro de las bacterias FAPNS y descrito por Duchow y Douglas en 1949. El análisis *insilico* con los candidatos M24, Y4 y C26 estableció una gran similitud filogenética con este género. Esto puede ser confirmado en el árbol filogenético (figura 3.3), el cual muestra a estos candidatos en posiciones cercanas con el género *Rhodomicrobium*. Por lo tanto mediante esta caracterización molecular y según las imágenes del MER se comprueba la similitud de estos candidatos primeramente relacionados morfológicamente con este género en el capítulo II. Los candidatos M24, Y4 y C26 fueron aislados de la fitotelmata de bromelias muestreadas en los 3 bosques con mayor precipitación. Estos bosques fueron el Bosque de Maricao, Bosques del Yunque y Bosque de Carite, por lo que se puede sugerir que en la fitotelmata de bromelias en estos tres bosques podemos encontrar bacterias FAPNS relacionadas al género *Rhodomicrobium*.

Los candidatos Gj13, C27, Gj30, C11 y Y6 se encuentran en ramas filogenéticas distantes a los géneros de bacterias FAPNS α -proteobacterias, según las descritas en la actualidad. Estos 5 candidatos poseen una mayor similitud con *Rhodocyclus purpureus*. Sin embargo, se encuentran colocados en distintas ramas y en posiciones

distantes a esta especie. *Rhodocyclus*, es uno de los tres géneros de bacterias FAPNS miembros del grupo de las β -proteobacterias. Basado en esto, podemos sugerir que los candidatos anteriores al menos pueden ser géneros nuevos de bacterias FAPNS pertenecientes a las β -proteobacterias. Esto puede ser comprobado alineando las secuencias de los genes *pufM* y *16S rDNA* de estos candidatos con bacterias FAPNS conocidas que son miembros de las α y β -proteobacterias para identificar el grupo con mayor similitud. Los candidatos Y6 y C11 poseen un interés especial, ya que como indicaremos en el capítulo 4, éstos poseen la capacidad de utilizar biodiesel como única fuente de carbono. La posición en el árbol filogenético de estos candidatos aumenta la posibilidad de descubrir nuevos géneros o especies con capacidades biotecnológicas importantes. Las diferencias filogenéticas entre los candidatos apoyan la teoría de que cada planta representa una isla y que es capaz de producir nuevos individuos.

Conclusiones

- Pruebas fisiológicas y moleculares confirmaron que todos los candidatos aislados de la fitotelmata de bromelias en diversos bosques de Puerto Rico son capaces de realizar fotosíntesis anoxygenic.
- El análisis *insilico* del *16S rDNA* de los organismos aislados de la fitotelmata de diversos bosques de Puerto Rico relacionó a 14 de los candidatos con el género *Rhodopseudomonas* y 3 candidatos con el género *Rhodomicrobium*.
- El árbol filogenético basados en el *16S rDNA* de los candidatos ubica a varios de éstos en posiciones distantes a las bacterias FAPNS reportadas en la actualidad, resultando en un grupo polifilético y aumentando la posibilidad de descubrimiento de géneros o especies nuevas.

Capítulo IV

Potencial Biotecnológico de Bacterias FAPNS aisladas de la fitotelmata de diversos Bosques de Puerto Rico

Introducción

La contaminación por combustibles es una gran amenaza para la naturaleza y la salud. Éstos ocurren frecuentemente en ambientes marinos, suelo, acuíferos y otros ambientes acuáticos. La insolubilidad de los hidrocarburos hace de su limpieza una sumamente difícil y los métodos físicos y químicos convencionales para su biorremediación son usualmente caros, trabajosos y requieren del uso de solventes peligrosos (Lin *et al.*, 2005). Con la creciente atención dirigida a la preservación del ambiente, las tecnologías aplicadas han ganado interés. El beneficio en explotar organismos degradadores de combustibles para limpiezas ambientales se ha convertido en eje central de la microbiología ambiental y se han realizado una gran cantidad de estudios de biotransformación, biodegradación y biorremediación de combustibles (Van Hamme *et al.*, 2003). La biodegradación de suelos contaminados, ha explotado la habilidad de microorganismos capaces de degradar o detoxificar contaminantes orgánicos y se han establecido como tratamientos eficientes, económicos, versátiles y a tono con el ambiente. Sin embargo, en la actualidad, existe una gran necesidad de aislar cepas de organismos con mayor eficiencia degradando combustibles y que produzcan bioagentes activos en la superficie que estimulen la utilización de estos sustratos para poder realizar una mejor biodegradación (Lin *et al.*, 2005).

Trabajos con consorcios microbianos mediante cultivos enriquecidos han ilustrado que los hidrocarburos como el tolueno, alquibencenos, benceno, naftaleno, metilnaftaleno, n-alcanos, compuestos aromáticos y mezclas de hidrocarburos pueden ser metabolizados bajo condiciones anaerobias. Estas reacciones pueden llevarse a cabo bajo condiciones de reducción de hierro (III), desnitrificación y reducción de sulfato

mediante bacterias (Lin *et al.*, 2005). El metabolismo anaeróbico es un proceso vital con respecto a la biodegradación y biorremediación de combustibles, dejando al descubierto la información única sobre la bioquímica de estos procesos (Van Hamme *et al.*, 2003). El conocimiento en esta área ha quedado rezagado por los sistemas aerobios debido a que la investigación en la degradación anaeróbica de combustibles involucra métodos de mayor reto. Por lo tanto, la diversidad y propiedades únicas en la utilización anaeróbica de combustibles por bacterias son áreas en las cuales se necesita mayor investigación (Van Hamme *et al.*, 2003). Recientemente el número de cultivos puros mostrando metabolizar varios hidrocarburos con diferentes aceptadores de electrones ha aumentado. La diversidad de estas bacterias incluye miembros de las α , β , γ , y δ proteobacterias.

En este estudio utilizamos diesel y biodiesel debido a su extensa aplicación como combustibles industriales y fuentes de energía en la transportación. Diesel es un complejo con una combinación de hidrocarburos, derivados de la destilación de petróleo crudo, teniendo aproximadamente un intervalo entre 9 y 20 carbonos. Entre estos compuestos se encuentran una diversidad de compuestos halogenados. Miembros del grupo de las bacterias FAPNS han demostrado su capacidad de crecer en ambientes contaminados con compuestos halogenados, sugiriendo que posiblemente estas especies pueden removerlos de cuerpos de agua o sedimentos, lo que es un gran aporte para el área de la biotecnología ambiental (McGrath & Harfoot, 1997). La importancia del aislamiento e identificación de microorganismos responsables de la transformación de combustibles ha sido reconocida por el tiempo desde un punto de vista fundamental y de aplicación, y una lista de organismos (bacterias, hongos y algas) con esta capacidad se encuentra disponible. En esta lista se incluyen a *Blastochloris*

sulfovirdis (Zengler *et al.* 1999) capaz de degradar tolueno, mientras que *Rhodobacter sp.* ha sido aislada de lugares contaminados con diesel (Vrdoljak *et al.*, 2005). Esta lista, además, incluye bacterias mesofílicas y termofílicas reductoras de sulfato, metanógenos, bacterias fermentadoras mesofílicas y termofílicas, y bacterias reductoras de hierro (Van Hamme *et al.*, 2003).

El biodiesel es un biocombustible sintético que se obtiene a partir de lípidos naturales como aceites vegetales o grasas animales, nuevos o usados, mediante procesos industriales de esterificación y transesterificación. El biodiesel ha llamado la atención recientemente debido a que es una alternativa a combustibles derivados del petróleo, es un combustible renovable y no tóxico contribuyendo a un balance energético favorable produciendo menos emisiones peligrosas que otros. Aunque el biodiesel es producido por reacciones químicas y enzimáticas, glicerol es generado como el producto principal. Sin embargo, si hay un aumento en la producción de biodiesel en el mundo, entonces el problema de tratar eficientemente sus desperdicios conteniendo glicerol es un área que necesita ser estudiada (Nishio & Nakashimada, 2006). Se ha probado que bacterias como *E. aerogenes* son capaces de degradar glicerol de desperdicios de biodiesel y producir otras fuentes de energía como el hidrógeno y etanol (Ito *et al.*, 2005), pero no se conoce de ninguna bacteria FAPNS que puedan utilizar este combustible como fuente de carbono.

Se han desarrollado métodos basados en cultivo e independientes de cultivo implementados para entender más acerca de estas comunidades microbianas que degraden combustibles. Sin embargo, ambos métodos deben incluir técnicas de caracterización genética (Van Hamme *et al.*, 2003). Una las técnicas de crecimiento para estudiar la degradación de combustibles como única fuente de carbono puede

realizarse mediante el medio Bushnell-Hass (BH) (Lin *et al.*, 2005). Este medio está diseñado con el propósito de realizar pruebas de degradación de hidrocarburos. En esta investigación, las bacterias FAPNS aisladas de la fitotelmata de bromelias fueron estudiadas para determinar su capacidad en utilizar diesel o biodiesel como única fuente de carbono.

Materiales y métodos

Preparación de inóculo bacteriano para crecimiento de las bacterias FAPNS

Cada candidato fue inoculado en medio Sistrom (Sistrom, 1960) líquido e incubado a 30 °C por 72 horas. Luego de mostrar el “bloom”, se transfirió 1.5ml del cultivo a microtubos de este volumen. Las células fueron sedimentadas mediante centrifugación a 0.54 x g (3,000 rpm) por 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y se realizaron 3 lavados con 1ml de solución salina estéril (0.85% de cloruro de sodio), eliminando así la presencia de elementos del medio original para que éstos no interfieran en el crecimiento de los candidatos. Entre lavados, las células fueron centrifugadas nuevamente para evitar la pérdida de las células sedimentadas mientras se descartaban las soluciones.

Determinación del crecimiento en diesel y biodiesel como única fuente de carbono

La utilización de diesel y biodiesel como única fuente de carbono fue observada mediante crecimiento de cada candidato en caldo Bushnell-Hass (BH) suplementado con cada combustible por separado. El medio Bushnell-Hass es un medio mínimo compuesto de minerales sin fuentes de carbono, donde la misma debe ser suplementada para el aislamiento y cultivo de bacterias capaces de utilizar hidrocarburos.

Se prepararon tres soluciones con 100ml de BH. La primera solución fue utilizada como control y no se le añadió ningún hidrocarburo. Los otros dos frascos con

BH se les añadió 1ml de diesel y biodiesel, respectivamente (1%) (Lin *et al.*, 2005).

Cada tratamiento se realizó en duplicado.

Cada botella fue identificada e inoculada con 10µm de las células bacterianas luego de ser lavadas, incluyendo el medio BH sin hidrocarburo el cual sirvió de control. Los tubos fueron incubados a 30°C en condiciones anaerobias en presencia de luz. Luego de una semana, se midió la turbidez del medio de cultivo utilizando un espectrofotómetro (Génesis 2 Thermospectronic®) a 600nm. Para determinar el crecimiento en las botellas se utilizó como blanco en el espectrofotómetro el medio BH inoculado con las células lavadas sin ninguna fuente de carbono. Medidas de turbidez mayores al control fueron consideradas como respuestas positivas al crecimiento en el hidrocarburo.

Resultados

Luego de 7 días de incubación, el crecimiento de dos candidatos se hizo evidente con la turbidez y enrojecimiento del medio, fenómeno conocido como “bloom” (figura 4.1). Los resultados fueron verificados y confirmados utilizando un espectrofotómetro (Génesis 2 Thermospectronic[®]) a 600nm. De todos los candidatos estudiados solo dos mostraron crecimiento en BH con biodiesel mientras que no hubo crecimiento de ninguno de los candidatos en BH con diesel. Estos dos organismos fueron Y6 y C11, aislados de la fitotelmata de *Guzmania sp.* del Bosques del Yunque y del Bosque de Carite, respectivamente. En un largo de onda de 600nm, Y6 mostró una absorbancia de 1.52, y C11 una de 1.37, mientras que los demás candidatos no mostraron diferencia al ser comparados con el control. La figura 4.1 muestra el aumento de turbidez en el medio BH con biodiesel. Sin embargo, medio el BH con diesel no presento ninguna característica visual que indicara crecimiento en las botellas.

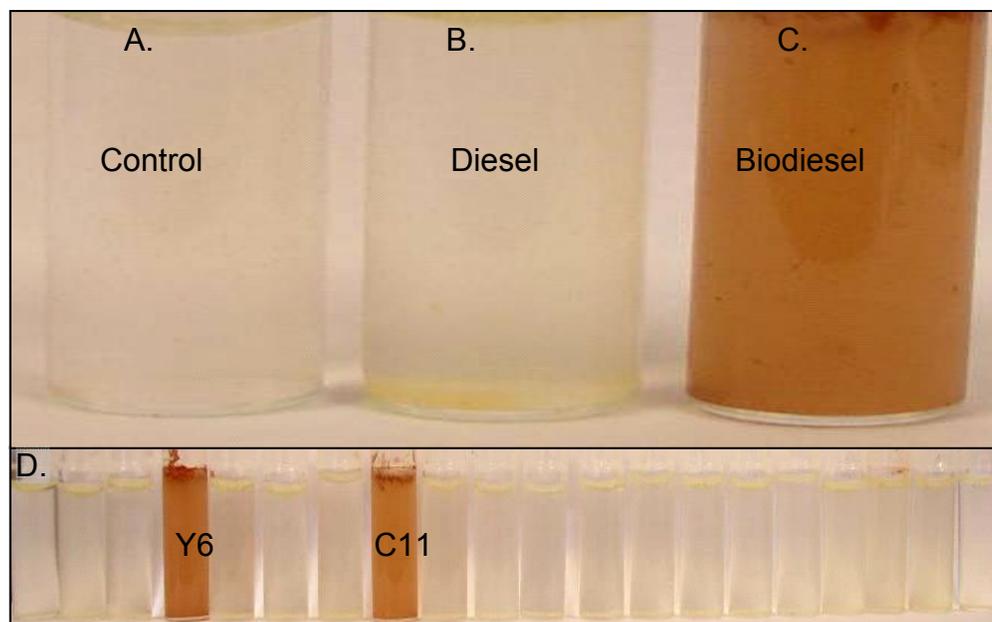


Figura 4.1. Las bacterias FAPNS aisladas de la fitotelmata de bromelias demostraron su capacidad de crecimiento en BH con biodiesel, evento observado mediante la turbidez del medio luego de 7 días. Las bacterias en estudio mostraron ser capaces de realizar fotosíntesis anoxigénica utilizando biodiesel como única fuente de carbono. Esto se debe al aumento celular acompañado de la producción de bacterioclorofila y pigmentos carotenoides, lo que pudo ser observado mediante la presencia de turbidez, acompañado de enrojecimiento del medio, evento conocido como “bloom”. A. El medio BH inoculado con el candidato sin fuente de carbono y utilizado como control. B. El medio BH con diesel no mostró crecimiento en ninguno de los candidatos. C. Enrojecimiento y turbidez en el medio BH con biodiesel como única fuente de carbono. D. Al comparar los candidatos los resultados entre todos candidatos, Y6 y C11 mostraron ser capaces de crecer en BH con biodiesel.

Discusión

Los dos combustibles estudiados cumplen con un mismo propósito, el de servir de fuente de energía en la transportación e industria. Sin embargo, poseen varias diferencias basadas en sus componentes e implicaciones sobre el ambiente, diferencias capaces de tener efecto en nuestro estudio. El combustible diesel es un complejo con una combinación de hidrocarburos derivados de la destilación de petróleo crudo extraído de fuentes naturales que han tardado millones de años en formarse. Entre estos se encuentran una diversidad de compuestos halogenados. Miembros del grupo de las bacterias FAPNS han demostrado su capacidad de crecer en ambientes contaminados sugiriendo que posiblemente éstas pueden removerlos de cuerpos de agua o sedimentos, lo que es un gran aporte para el área de la biotecnología ambiental (McGrath & Harfoot, 1997). En esta lista se incluyen a *Blastochloris sulfovirdis* (Zengler *et al.* 1999) capaz de crecer en tolueno un hidrocarburo aromático presente en el diesel. Zengler y sus colaboradores en 1999 estudiaron la degradación de tolueno entre cinco especies de bacterias FAPNS y sólo *Blastochloris sulfovirdis* logró utilizarlo. Vrdoljak *et al.* (2005) reportaron haber aislado a *Rhodobacter sp.* de lugares contaminados con diesel, pero no se ha probado que lo degraden ya que en este estudio sólo se identificaron bacterias presentes en lugares contaminados con el combustible. Además, la diversidad de estas bacterias degradadoras de compuestos de diesel incluye miembros de las α , β , γ , y δ proteobacterias

El biodiesel es un combustible hecho de aceites de plantas o grasas de animales. El aceite vegetal o grasa animal es primero reaccionada con alcohol mediante un proceso llamado esterificación o transesterificación, luego es preparado

para su utilización como combustible. El biodiesel, al ser menos tóxico para organismos vivos aumenta la probabilidad de ser degradado por una mayor diversidad de organismos. Su componente primario es glicerol lo que aumenta la posibilidad de ser utilizado por bacterias capaces de degradar este compuesto como fuente de carbono (Nishio & Nakashimada, 2006). Estudios han probado que varios miembros de las bacterias FAPNS son capaces de utilizar glicerol como única fuente de carbono (Imhoff & Truper, 2005). Por lo tanto, si el glicerol es el componente mayoritario en combustibles de biodiesel, sugerimos que una de las fuentes de carbono utilizada nuestros C6 y Y11 es el glicerol. Para confirmar esto, se debe determinar el crecimiento de los candidatos en medio BH con glicerol como única fuente de carbono. El descubrimiento de organismos capaces de degradar biodiesel, y no diesel, refuerza la tendencia del biodiesel como fuente de combustible con menor oportunidad de contaminación (Ito *et al.*, 2005)

En 2004, Franchi y colaboradores reportaron que mediante mutaciones realizadas a *Rhodobacter sphaeroides* se observó un aumento en la producción de biohidrógeno mediante un combinado de desperdicios de comida. Mientras, los desperdicios de aceites pueden ser utilizados como fuente de biodiesel. Por lo tanto, se pueden producir dos biocombustibles a partir de desperdicios de aceites y comida lo cuales pueden ser desechados en grandes cantidades en lugares de comida. Además, en caso de contaminación por biodiesel, los candidatos Y6 y C11 pueden utilizado para su crecimiento y tal vez degradarlo a componentes no tóxicos.

Uno de los mayores retos en la biorremediación de estos combustibles lo es la precipitación de las células microbianas en ambientes acuáticos cuando no hay agitación mecánica, reduciendo su contacto con los contaminantes que usualmente se

encuentran flotando en las superficies acuosas. Es por esto que se necesitan organismos que sean capaces de flotar o moverse en ambientes acuáticos (Van Hamme *et al.*, 2003). La mayoría de las bacterias FAPNS poseen la habilidad de locomoción por flagelos y vacuolas (Imhoff & trupper, 2005), dándole una ventaja a poder llegar a un lugar donde llegue los rayos del sol para realizar fotosíntesis y donde puedan utilizar el contaminante degradándolo a compuestos menos tóxicos. Esto podría beneficiar a las bromelias, ya que si son afectadas en su fitotelmata por algún contaminante capaz de ser utilizado por los candidatos aislados en este estudio, éstos no tendría problema en llegar al contaminante y tal vez disminuir la toxicidad de éste.

Conclusiones

- Dos de los candidatos (Y6, C11) aislados de la fitotelmata de bromelias en diversos bosques de Puerto Rico fueron capaces de utilizar biodiesel como única fuente de carbono.
- Los candidatos Y6 y C11 fueron aislados del mismo género de bromelia (*Guzmania*) pero en distintos bosques.
- Ninguno de los candidatos aislados de la fitotelmata de bromelias en diversos bosques de Puerto Rico demostró crecimiento en BH con diesel bajo las condiciones de estudio.
- Luego del análisis *insilico* del *16S rDNA* de los dos organismos positivos al crecimiento en biodiesel, éstos no mostraron similitud con organismos conocidos hasta el momento.

Literatura citada

- Acevedo P. & Strong M. 2005. Monocotyledons and Gymnosperms of Puerto Rico and the Virgin Islands. *Contributions from the United States National Herbarium*, 52: 1-415
- Achenbach, L. A., Carey, J. & Madigan, M. T. 2001. Photosynthetic and Phylogenetic Primers for Detection of Anoxygenic Phototrophs in Natural Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2922–2926.
- Armbruster, P., Hutchinson, R. A. & Cotgreave, P. 2002. Factors influencing community structure in a South American tank bromeliad fauna. *Oikos*, 96: 225–234.
- Azad S.A., Vikineswary S., Chong V.C. & Ramachandran K.B. 2004. *Rhodovulum sulfidophilum* in the treatment and utilization of sardine processing wastewater. *Lett Appl Microbiol.*, 38(1):13-8.
- Bauer, C. & Bird, T. 1996. Regulatory Circuits Controlling Photosynthesis Gene Expression. *Cell*. 85:5-8.
- Blasco R., & Castillo, F. 1992. Light-dependent degradation of nitrophenols by the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(2):690-5.
- Bowles, I. A., Rice R. E., Mittermeir R. A., & Fonseca G. A. 1998. Logging and tropical forest conservation. *Science*, 280: 1899–1900.
- Bradshaw W. & Creelman R. 1984. Mutualism between the Carnivorous Purple Pitcher Plant and its Inhabitants. *American Midland Naturalist*, 112(2):294-304.
- Brady, S.F. & Clardy, J. 2004. Palmitoylputrescine, an antibiotic isolated from the heterologous expression of DNA extracted from bromeliad tank water. *Journal Natural Production*, 67:1283-1286.
- Braun, P. & Scherz, A. 1990. Polypeptides and Bacteriochlorophyll Organization in the Light-Harvesting Complex B850 of *Rhodobacter sphaeroides* R-26.1. *Biochemistry*, 30:5177-5184.
- Cantera, J. J., Kawasaki, H., & Seki, T. 2004. The nitrogen-fixing gene (nifH) of *Rhodopseudomonas palustris*: a case of lateral gene transfer? *Microbiology*, 150:2237–2246.
- Chen, W.P, & Kuo, T.T. 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 21:2260.
- Eterovick, P. C. 1999. Use and sharing of calling and retreat sites by *Phyllodytes luteolus* in a modified environment. *Journal of Herpetology*, 33:17-22

Fahy A., McGenity T.J., Timmis K.N. & Ball A.S. 2006. Heterogeneous aerobic benzene-degrading communities in oxygen-depleted groundwaters. *FEMS Microbiol Ecol.*, 58(2):260-70.

Fish, D., 1983. Phytotelmata: flora and fauna. En Frank, J. H. & Lounibos L. P. (eds). Phytotelmata: terrestrial plants as hosts for aquatic insect communities, pp. 1–25. Plexus Publishing Inc., Medford, New Jersey.

Foissner, W. 2003. Morphology and Ontogenesis of *Bromeliophrya brasiliensis* gen. n., sp. n., a New Ciliate (Protozoa: Ciliophora) from Brazilian Tank Bromeliads (Bromeliaceae). *Acta protozoologica*, 42: 55 – 70.

Franchi E., Tosi, C., Scolla, G., Penna, G. D., Rodriguez, F., & Pedroni, P. M. 2004. Metabolically engineered *Rhodobacter sphaeroides* RV strains for improved biohydrogen photoproduction combined with disposal of food wastes. *Marine Biotechnology*, 6(6):552-65.

Frank, J. H. 1983. Bromeliad phytotelmata and their biota, especially mosquitoes. – In: Frank, J. H. and Lounibos, L.P. (eds), Phytotelmata: terrestrial plants as hosts for aquatic insect communities, pp. 101–128. Plexus Publishing Inc., Medford, New Jersey.

Fujimoto H., Wakabayashi M., Yamashiro H., Maeda I., Isoda K., Kondoh M., Kawase M., Miyasaka H. & Yagi K. 2006. Whole-cell arsenite biosensor using photosynthetic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*. *Rhodovulum sulfidophilum* as an arsenite biosensor. *Appl Microbiol Biotechnol*, 73(2):332-8.

Giotto L., Agostiano, A., Italiano, F., Milano, F., & Trotta, M. 2006. Heavy metal ion influence on the photosynthetic growth of *Rhodobacter sphaeroides*. *Chemosphere*, 62(9):1490-9.

Glaeser, J. & Overmann, J. 1999. Selective enrichment and characterization of *Roseospirillum parvum*, gen. nov. and sp. nov., a new purple nonsulfur bacterium with unusual light absorption properties. *Arch Microbiol*, 171: 405–416.

Harley & Prescott. Laboratory Experiments in Microbiology sixth edition 2003.

Huang, J.S., Wu, C.S., Jih, C.G. & Chen, C.T. 2001. Effect of addition of *Rhodobacter* sp. to activated-sludge reactors treating piggery wastewater. *Water Research*, 35: 3867-3875.

Hougardy, A., Tindall, B. J. & Klemme, J. H. 2000. *Rhodopseudomonas henobacensis* sp. nov., a new nitrate-reducing purple non-sulfur bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 985–992.

Imhoff, J. F. & Caumette, P. 2004. Recommended standards for the description of new species of anoxygenic phototrophic bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54:1415–1421.

Imhoff, J.F. & Trüper, H. G. 2005. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.

Ito T, Nakashimada Y, Senba K, Matsui T, Nishio N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process *J Biosci Bioeng*. 2005 Sep;100(3):260-5.

Imhoff J., Petri R. & Sulling J. 1998. Reclassification of species of the spiral-shaped phototrophic purple non-sulfur bacteria of the *α-Proteobacteria*: description of the new genera *Phaeospirillum* gen. nov., *Rhodovibrio* gen. nov., *Rhodotalassium* gen. nov. and *Roseospira* gen. nov. as well as transfer of *Rhodospirillum fulvum* to *Phaeospirillum fulvum* comb. nov., of *Rhodospirillum molischianum* to *Phaeospirillum molischianum* comb. nov., of *Rhodospirillum salinarum* to *Rhodovibrio salinarum* comb. nov., of *Rhodospirillum sodomense* to *Rhodovibrio sodomensis* comb. nov., of *Rhodospirillum salexigens* to *Rhodotalassium salexigens* comb. nov. and of *Rhodospirillum mediosalinum* to *Roseospira mediosalina* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 793–798.

Jones, M. R. & Fyfe, P. K. 2001. Photosynthesis: new light on biological oxygen production. *Current Biology*, 11:318-21.

Kantachote D., Torpee S. & Umsakul K. 2005. The potential use of anoxygenic phototrophic bacteria for treating latex rubber sheet wastewater. *Electronic Journal of Biotechnology*, 8(3):1-10.

Kerby R.L., Hong S.S., Ensing S.A., Coppoc L.J., Ludden P.W. & Robertsi G.P. 1992. Genetic and Physiological Characterization of the *Rhodospirillum rubrum* Carbon Monoxide Dehydrogenase System. *Journal of Bacteriology*, 174: 5284-5294.

Kiley, P.J. & Kaplan, S. 1988. Molecular Genetics of Photosynthetic Membrane Biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiological Reviews*, 52:50-69.

Kitching, R. L. 2000. *Food webs and container habitats: the natural history and ecology of phytotelmata*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

Kitching, R. L. 2001. Food webs in phytotelmata: “Bottomup” and “top-down” explanations for community structure. *Annu. Rev. Entomol*, 46: 729–760.

Kneitel, J. M. & Chase, J. M. 2004. Disturbance, Predator, and resource interactions alter container community composition. *Ecology*, 85: 2088–2093.

Kricher, J.C. 1997. *A Neotropical Companion*. Princeton Univ. Press, Princeton. New Jersey.

Lin, T. C., Young, C.C., Ho, M. J., Yeh, M.S., Chou, C.L. Wei, Y.H. & Chang J.S. 2005. Characterization of floating activity of indigenous diesel-assimilating bacterial isolates. *Journal of bioscience and bioengineering*, 99(5): 466-472.

Madigan, M. T. 1988. Microbiology, physiology, and ecology of phototrophic bacteria, p. 39–111. In A. J. B. Zehner (ed.), *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley & Sons, New York, N.Y.

Madigan, M. T. 1995. Microbiology of nitrogen fixation in photosynthetic bacteria, p. 915–928. In R. E. Blankenship, M. T. Madigan, and C. E. Bauer(ed.), *Anoxygenic photosynthetic bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J. 2002. *Brock Biology of Microorganism*. 10th ed. Pearson Education, Inc. NJ, 355-356: 547-612

Maeda I., Yamashiro H., Yoshioka D., Onodera M., Ueda S., Kawase M., Miyasaka H. & Yagi Y. 2006. Colorimetric dimethyl sulfide sensor using *Rhodovulum sulfidophilum* cells based on intrinsic pigment conversion by CrtA. *Appl Microbiol Biotechnol*, 70(4):397-402.

Maguire, B. 1971. Phytotelmata: biota and community structure determination in plant-held waters. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 2:439–464.

Martinelli, G. 2000.. Bromelien im atlantischen Regenwald. *Spektrum der Wissenschaft. Gefährdete Raritäten*,6: 66-73.

McColl, J. G. 1970. Properties of some natural waters in a tropical wet forest of Costa Rica. *Bioscience*, 214: 1023-1028.

McGrath, J.E. & Harfoot, C.G. 1997. reductive Dehalogenation of Halocarboxylic Acids by the Phototrophic Genera *Rhodospirillum* and *Rhodopseudomonas*. *Apply Environmental Microbiology*, 63: 3333-3335.

Mehrabi S., Ekanemesang, U. M., Aikhionbare, F. O., Kimbro, K. S., & Bender, J. 2001. Identification and characterization of *Rhodopseudomonas* spp., a purple, non-sulfur bacterium from microbial mats. *Biomolecular Engineering*, 18: 49–56.

Meléndez-Martínez A. , Vicario I. & Heredia F. 2007. Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 57: 2.

Mimuro M. & Katoh T. 1991. Carotenoids in photosynthesis: absorption, transfer and dissipation of light energy. *Pure & Appl. Chem.*, 63 (1):123-130.

Müller R.H., Kleinstauber S. & Babel W. 2001. Physiological and genetic characteristics of two bacterial strains utilizing phenoxypropionate and phenoxyacetate herbicides. *Microbiol Res.*, 156(2):121-31.

Nadkarni, N. M. 1981. Canopy roots: convergent evolution in rain forest nutrient cycles. *Science*, 214:1023-1028.

Nishio N., Nakashimada Y. 2007. Recent development of anaerobic digestion processes for energy recovery from wastes. *J Biosci Bioeng*, 103(2):105-112.

Oda, Y., Wanders, W., Huisman, L. A., Meijer, W. G., Gottschal, J.C. & Forney, L.J. 2002. Genotypic and Phenotypic Diversity within Species of Purple Nonsulfur Bacteria Isolated from Aquatic Sediments. *Apply Environmental Microbiology*, 68:3467-3477.

Oesterhelt, D. 1975. The purple membrane of *Halobacterium halobium*: a new system for light energy conversion. *Ciba Found Symposium*, 31:147-167

Pace, N. R., D. A. Stahl, D. J. Lane, & G. J. Olsen. 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol.*, 9:1-55.

Padilla, V. 1975. Bromeliads. Crown Publishers, Inc., New York.

Padron P., N Reyes & Videl R. 1998. Guia informativa del departamento de Recursos Naturales de Puerto Rico. Departamento de Recursos Naturales y Ambientales-Negociado del Servicio Forestal Oriental.

Pappas C.T., Sram J., Moskvina O. V., Ivanov P. S., Mackenzie C., Choudhary M., Land M. L., Larimer F. W., Kaplan S. & Gomelsky* M. 2004. Construction and Validation of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 DNA Microarray: Transcriptome Flexibility at Diverse Growth Modes. *Journal of Bacteriology*, 186(14): 4748-4758.

Pfennig, N. 1989. Ecology of phototrophic purple and green sulfur bacteria, p. 81–96. In H. G. Schlegel and B. Bowien (ed.), *Autotrophic bacteria*. Springer-Verlag, New York, N.Y.

Popp N., Shlomann M. & Mau M. 2006. Bacterial diversity in the active stage of a bioremediation system for mineral oil hydrocarbon-contaminated soils. *Microbiology*, 152: 3291–3304.

Ponsano E. H., Paulino C.Z. & Pinto M.F. 2008. Phototrophic growth of *Rubrivivax gelatinosus* in poultry slaughterhouse wastewater. *Bioresour Technol.*, 99(9):3836-42.

Rajasekhar, N., Sasikala, C., & Ramana, C. V. 1998. Photobiotransformation of indole to its value-added derivatives by *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20: 177-179.

Rivera, S. C., Hazen, T. C., & Toranzos, G. A. 1988. Isolation of Fecal Coliforms from Pristine Sites in a Tropical Rain Forest. *Applied and environmental microbiology*, 54: 513-517.

Richardson, B. A. 1999. The bromeliad microcosm and the assessment of faunal diversity in a neotropical forest. *Biotropica*, 31:321-336.

Richardson, B. A., Richardson, M. J., Scatena, F. N. & McDowells, W. H. 2000. Effects of nutrient availability and other elevational changes on bromeliad populations and their invertebrate communities in a humid tropical forest in Puerto Rico. *Journal of Tropical Ecology*, 16:167-188.

Roldán M. D., Blasco, R., Caballero, F. J., & Castillo F. 1998. Degradation of p-nitrophenol by the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Archives of Microbiology*, 169(1):36-42.

Rolling W., Van Breukelen B., Braster M., Lin B. & Van Verseveld H. 2001. Relationships between Microbial Community Structure and Hydrochemistry in a Landfill Leachate-Polluted Aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10): 4619–4629.

Romero J. & Navarrete P. 2006. 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Microb Ecol.*, 51(4):422-30.

Sanders, R. W. & Wickham, S. A. 1993. Planktonic protozoa and metazoa: predation, food quality and population control. *Marine Microbial Food Webs*, 7:197–223.

Sasikala C., Ramana C. & Raghuveer P. 1994. Photometabolism of Heterocyclic Aromatic Compounds by *Rhodopseudomonas palustris* OU 11. *Appl Environ Microbiol.*, 60(6):2187-2190.

Sasikala, C., & Ramana, C. V. 1998. Biodegradation and metabolism of unusual carbon compounds by anoxygenic phototrophic bacteria. *Advance Microbiology Physiology*, 39:339-377.

Sherr, E. B. & Sherr, B. F. 1988. Role of microbes in pelagic food webs: a revised concept. *Limnology and Oceanography*, 33:1225–1227.

Sistrom, W. R. 1960. A requirement for sodium in the growth of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Journal of General Microbiology* 22:778-785.

Sophia, M. G. 1998. Desmídias de ambientes fitotélmicos bromelecolas. *Rev. Brasil. Biol.*, 59: 141-150.

Tavano C., Podevels A., & Donohue T. 2005. Identification of Genes Required for Recycling reducing Power during Photosynthetic Growth. *Journal of Bacteriology*, 187(15):5249-5258.

Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L., Tjernberg, I., Elaichouni, A., De Vos, P., Caleys, G., & Verschraegen, G. 1995. Identification of *Acinetobacter* Genomic Species by Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis. *Journal Of Clinical Microbiology* 33: 11–15.

Van Hamme, J.D., Singh, A. & Ward O.P. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4):503-549.

Van Niel, C.B. 1941. The culture, general physiology, morphology and classification of non-sulfur purple and “Brown” bacteria. *Bacteriology Reviews*, 8: 1-118

Vrdoljak G., Feil, W. S., Feil, H., Detter, J.C., & Fields, P. 2005. Characterization of a diesel sludge microbial consortia for bioremediation. *Scanning*. 27(1):8-14.

Wang X., Falcone, D.L., & Tabita, F.R. 1993. Reductive pentose phosphate-independent CO₂ fixation in *Rhodobacter sphaeroides* and evidence that ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activity serves to maintain the redox balance of the cell. *Journal of Bacteriology*, 175: 3372-3379.

Watanabe K., Teramoto, M., Futamata, H., & Harayama, S. 1998. Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Apply Environmental Microbiology*, 64(11):4396-402.

Wen-ping C., and K. Tsong-the. 1993. A simple and rapid method for the preparation of Gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Research*, 21:2260-2269.

Willmote, A. & Wachter, R. 1993. Structure of the 16S Ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium chlorogloeopsis HTF (*Mastigocladus laminosus* HTF) strain PCC 7518, and phylogenetic analysis. *FEBS Lett.* 317:96-110.

Wittman, P. K. 2000. The animal community associated with canopy bromeliads of the lowland Peruvian amazon rain forest. *Selbyana*, 21: 48-51.

Wright G. & Madigan M. 1991. Photocatabolism of Aromatic Compounds by the Phototrophic Purple Bacterium *Rhodomicrobium vannielii*. *Appl Environ Microbiol*, 57(7):2069-2073.

Woese C.R. 2004. A New Biology for a New Century. *Microbiology and molecular biology reviews*, 28(2):173-186.

Yurkov, V & Beatty, T. 1998. Aerobic Anoxygenic Phototrophic Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 695-724.

Zar, J. H. 1984. Biostatistical analyses, 2nd ed. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J.

Zeilstra-Ryalls, J., Gomelsky, M., Eraso, J.M., Yeliseev, A., O'Gara, J. & Kaplan, S. 1998. Minireview: Control of Photosystem formation in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, 180: 2801-2809.

Zengler, K., J. Heider, R. Rosello'-Mora, and F. Widdel. 1999. Phototrophic utilization of toluene under anoxic conditions by a new strain of *Blastochloris sulfovirdis*. *Arch. Microbiol.* 172:204–212.

Zotz, G. & Thomas, V. 1999. How Much Water is in the Tank? Model Calculations for Two Epiphytic Bromeliads *Annals of Botany* 83:183-192.

Zurrer H. & Bachofen R. 1979. Hydrogen Production by the Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Applied and environmental microbiology*, 37(5):789-793.