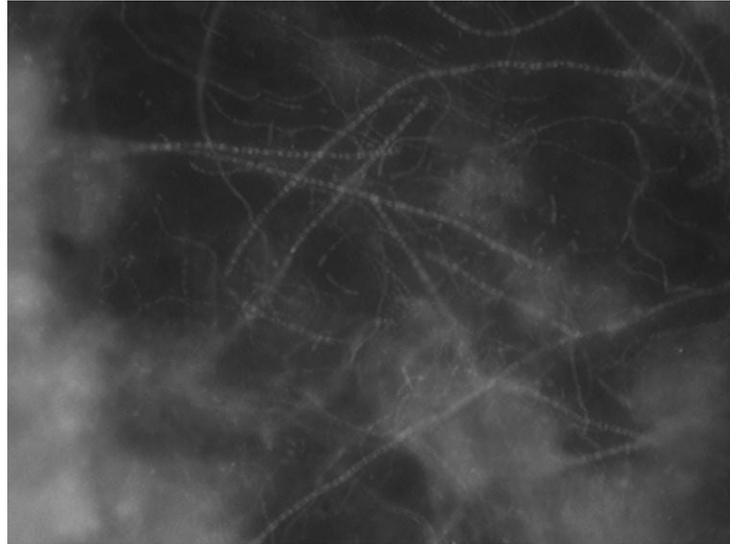


“Caracterización, aislamiento y filogenética de organismos del filo *Chloroflexi*”



Ana María Cantera Fonseca

Trabajo especial 1

Licenciatura en Bioquímica

Tutora: Dra. Claudia Etchebehere

Laboratorio de Ecología Microbiana

Cátedra de Microbiología

Facultad de Química/Facultad de Ciencias/IIBCE

Octubre 2014

ÍNDICE	1
RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Taxonomía	5
Organización jerárquica.....	5
Cepa tipo.....	5
Taxonomía convencional.....	6
Taxonomía molecular.....	7
1.2 Filogenia	8
ARNr como cronómetros evolutivos.....	8
Árboles filogenéticos.....	12
1.3 Técnicas moleculares	14
Amplificación del ADN: PCR.....	14
Hibridación in situ fluorescente: FISH.....	15
1.4 Sistemas de tratamientos de efluentes	16
Tipos de bioreactores.....	16
2. FILO <i>Chloroflexi</i>	21
2.1 SUBFILO I	26
2.1.1 Clase <i>Anaerolinea</i>	32
<i>Anaerolinea thermophila</i> UNI-1 ^T	32
<i>Anaerolinea thermolimos</i> a IMO-1 ^T , <i>Levilinea saccharolytica</i> YMTK-2 ^T , <i>Leptolinea tardivilis</i> KIBI-1 ^T	33
<i>Bellilinea caldifistulae</i> GOMI-1 ^T , <i>Longilinea arvoyzae</i> KOME-1 ^T	36
<i>Thermanaerotherix daxensis</i> GNS-1 ^T	38
2.1.2 Clase <i>Caldilinea</i>	41
<i>Caldilinea aerophila</i> SLT-6-01 ^T	41
<i>Caldilinea Tarbellica</i> D1-25-104 ^T	42
<i>Litoralines aerophila</i> PRI-4131 ^T	43
2.2. SUBFILO II Organismos Dehalorespiradores	46
2.2.1 Género <i>Dehalococcoides</i>	52
<i>Dehalococcoides mccartyi</i> 195 ^T	52
. Cepa <i>D. ethenogenes</i> 195.....	53
. Cepa CBDCB1.....	54
. Cepa FL2.....	54
. Cepa BAV1.....	55
. Cepa GT.....	56
. Cepa MB.....	57
. Cepas ANAS1 y ANAS2.....	58

Cepa VS.....	59
2.2.2 Género <i>Dehalogeminosas</i>	60
<i>Dehalogeminosas lykanthroporepellens</i> BL-DC-9 ^T	60
<i>Dehalogeminosas alkenigignens</i> IP3-3 ^T	62
2.2.3 <i>Dehalobium chlorocoercia</i> DF-1	64
2.3. SUBFILO III	67
2.3.1 Orden <i>Chloroflexales</i>	72
Géneros con clorosomas: <i>Chloroflexus</i> , <i>Chloronema</i> , <i>Oscillochloris</i>	73
Género <i>Chloroflexus</i>	73
Género <i>Chloronema</i>	79
Género <i>Oscillochloris</i>	80
Géneros sin clorosomas: <i>Heliothrix</i> , <i>Roseiflexus</i>	81
Género <i>Heliothrix</i>	82
Género <i>Roseiflexus</i>	83
2.3.2 Orden <i>Herpetosiphonales</i>	84
Género <i>Herpetosiphon</i>	84
2.4. SUBFILO IV	88
2.5 Clase <i>THERMOMICROBIALES</i>	92
<i>Thermomicrobium roseum</i> P-2 ^T	93
<i>Sphaerobacter thermophilus</i> S 60022 ^T	94
<i>Thermobaculum terrenum</i> YNP1 ^T	94
<i>Nitrolancetus hollandicus</i> Lb ^T	95
2.6. Clase <i>KTEDENOBACTERIA</i>	98
2.6.1 Orden <i>Ktedenobacterales</i>	99
<i>Ktedenobacter racemifer</i> SOSPI-21 ^T	99
<i>Thermosporotrix hazakensis</i> SK20-1 ^T	101
2.6.2 Orden <i>Thermogemmatisporales</i>	102
<i>Thermogemmatispora onikobensis</i> ONI-1 ^T	103
<i>Thermogemmatispora foliorum</i> ONI-5 ^T	103
2.7. Clase <i>ARDENTICATENIA</i>	105
<i>Ardenticatena marítima</i> 110S ^T	105
3. METODOS DE AISLAMIENTO	109
4. CONCLUSIONES	113
ANEXO I	115

ANEXO II	117
BIBLIOGRAFÍA	120

RESUMEN

Existe una gran proporción de microorganismos del Dominio Bacteria que no han podido ser aislados. Los estudios basados en el análisis del ADN han permitido el descubrimiento de una gran variedad de estos microorganismos en sus ecosistemas naturales, sorteando la necesidad de obtenerlos en cultivo puro.

Las bacterias del filo *Chloroflexi* es uno de estos grupos de bacterias con gran proporción de organismos “no cultivables”. En las bases de datos de secuencias existen un gran número de secuencias de microorganismos de este filo provenientes de clones ambientales y solo unas pocas de estas secuencias corresponden a representantes cultivados. Metabólicamente es un grupo muy diverso y está distribuido en una gran variedad de hábitat como: fuentes termales, agua dulce, ambientes marinos e hipersalinos, suelos, y sistemas de tratamiento de aguas residuales, entre otros. Particularmente organismos de este filo pertenecientes a las clases *Anaerolineae* y *Caldilineae*, han sido frecuentemente detectados en sistemas de tratamiento de aguas residuales. Dichos microorganismos son de gran interés en estos sistemas, aunque se desconoce su función se postula que puedan tener un papel importante ya que las variaciones en su proporción frente al resto de los microorganismos, se corresponden con problemas en el funcionamiento de estos sistemas de tratamientos de efluentes.

Microorganismos agrupados en este filo fueron detectados por el equipo de trabajo de la Dra. C. Etchebere en el Laboratorio de Ecología Microbiana de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química en muestras de lodos de sistemas de tratamiento de aguas residuales, tanto a escala real como de laboratorio. En particular, se detectó una gran proporción de estos microorganismos en muestras de un reactor metanogénico a escala real que presentaba el fenómeno de “bulking” (sobrecrecimiento de bacterias filamentosas).

El objetivo de esta búsqueda fue recopilar información sobre los organismos que pertenecen al filo *Chloroflexi* para poder diseñar luego estrategias experimentales para su estudio. En el desarrollo de este trabajo se hará previamente una introducción general sobre taxonomía, filogenia, técnicas moleculares y los diferentes tipos de reactores de tratamiento de aguas residuales. Estos conocimientos permitirán comprender mejor las bases de las posteriores caracterizaciones así como los sistemas en los cuales se detectaron estos microorganismos. Posteriormente se profundizará en las características

de los organismos que conforman el filo, y se hará hincapié en las distintas estrategias utilizadas para el aislamiento en particular de los microorganismos pertenecientes a los subfilos I y II.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 TAXONOMÍA²

La **taxonomía** es la ciencia de la biología que estudia la clasificación de los organismos, encargándose de la identificación y la nomenclatura de los mismos.

La palabra taxonomía proviene del griego y está formada por *taxis* que significa ordenamiento más *nomos* cuyo significado es norma, con lo que obtendríamos entonces que taxonomía se corresponde con “normas de ordenamiento”.

Organización jerárquica

La unidad taxonómica básica, es la **especie** que agrupa organismos estrechamente relacionados. Cada especie es una colección de individuos (o poblaciones clonales), que presentan un grado elevado de caracteres similares (permitiéndose sin embargo cierta desviación a causa de la variación génica), y se diferencian lo suficiente de otros, para su reconocimiento como una unidad.

En un modelo ideal, las especies deberían clasificarse por la descripción completa de sus fenotipos (características visibles) y genotipos (secuencia genética) pero para la mayoría de los seres, esta descripción es fragmentaria e incompleta. Los caracteres fenotípicos más ampliamente utilizados son estructurales y anatómicos, que son directamente observables, sin embargo en el caso de las bacterias dada su extrema simplicidad estructural, a las propiedades estructurales se debe añadir otro tipo de propiedades para su caracterización como propiedades bioquímicas, fisiológicas y ecológicas, entre otras.

Las especies en base a sus características, se agrupan en una serie de categorías de órdenes superiores, que jerárquicamente son; **género, familia, orden, clase, filo, reino y dominio**. Cada categoría jerárquica a su vez puede subdividirse, de esta forma podemos encontrar subespecies, dentro de la categoría especie, subfilo, dentro de filo y así sucesivamente.

Concepto de cepa tipo

Existen colecciones de cultivos, como la ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo), y la DMS (Colección Alemana de Microorganismos), donde están depositados cultivos puros de cada especie aislada e identificada. Cuando un microorganismo es descrito como una nueva especie o género se depositan cultivos de estas cepas en dichas

² Basado en Brock and Madigan, 1991, capítulo 18

colecciones de cultivos. Dichos cultivos puros, son los que se definen como **cepa tipo**, contra los que se compara cada nuevo cultivo aislado encontrado en la naturaleza.

A su vez, las secuencias del gen ARNr de 16S de estos nuevos cultivos aislados (que como se verá más adelante se utilizan para la caracterización), se depositan en bancos de datos de secuencias como el National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) o el Ribosomal Database Project (RDP, <http://www.rdb.cme.msu.edu>) y se le asigna un número de acceso (ej., AB046413 para *Anaerolinea thermophila* y AB067647 para *Caldilinea aerophila*).

Cuando se aísla un organismo, se debe considerar si es lo suficientemente diferente de otras especies para ser considerada como una nueva especie, o si dichas diferencias justifican la consideración de un nuevo género. Se debe publicar una descripción del aislamiento (ver taxonomía convencional), con el nombre propuesto para el mismo, y depositar un cultivo puro del mismo en una colección de cultivos aprobada.

Taxonomía convencional

La **taxonomía bacteriana convencional** como ya se mencionó, ha tenido que basarse además de en los caracteres morfológicos, en caracteres bioquímicos, fisiológicos y ecológicos.

La mayor parte de las bacterias se clasifican más que por su apariencia (fenotipo), por sus características funcionales. Se debe analizar que tan extensa debe ser la comparación de datos a recopilar, para poder clasificar adecuadamente la descripción de un organismo dado.

Dentro de las características ampliamente utilizadas, se incluyen:

- morfología (esporas, filamentos, tipos de desplazamientos, presencia de vainas, etc.)
- tinción de Gram
- tipo de nutrición (fotótrofo, organótrofo, litótrofo)
- química de la pared celular
- productos de almacenamiento
- presencia de pigmentos
- requerimientos de nutrientes
- capacidad para utilizar fuentes de carbono, nitrógeno y azufre
- requerimientos de temperatura y pH
- sensibilidad a antibióticos

- Hábitat

Taxonomía molecular

Una nueva alternativa para la caracterización de bacterias surge con el advenimiento de las técnicas moleculares. Estas técnicas con las que se puede realizar varios tipos de análisis sobre los ácidos nucleicos aislados, permitieron desarrollar la **taxonomía molecular** complementando así las caracterizaciones de los organismos.

Proporciona información acerca del genotipo del organismo, como la composición de guaninas más citosinas del ADN (G+C), así como estudios de hibridación entre ácidos nucleicos de diferentes organismos.

Porcentaje de guaninas más citosinas: % G+C

Para la descripción formal de un género o una especie, se requiere la relación de bases del ADN (% G+C). Sin embargo esta característica es en realidad un determinante evolutivo y no es concluyente, porque dos organismos que tengan porcentajes similares de G+C, no tienen porque tener secuencias de ADN parecidas.

Hibridación de ácidos nucleicos

Se utiliza para determinar similitudes entre organismos estrechamente relacionados, a nivel de especies o a niveles inferiores (subespecie, variedad, raza).

El porcentaje de similitud en el ADN de géneros no relacionados, tiene valores de hibridación generalmente menores al 10 %, mientras que para incluir dos especies dentro del mismo género, se requieren valores de como mínimo un 20 % y para diferentes razas dentro de una misma especie, se necesitan valores de homología superiores a 70 % (fig. 1).

1.2 FILOGENIA

La **filogenética** estudia las relaciones evolutivas entre moléculas y/o organismos. Dado que el estudio del fenotipo de las bacterias proporciona muy poca información de la evolución de las bacterias, ha sido necesario el desarrollo del estudio genotípico de las mismas para reconocer sus relaciones evolutivas o filogenéticas (Baxevanis and Ouellette, 2001).

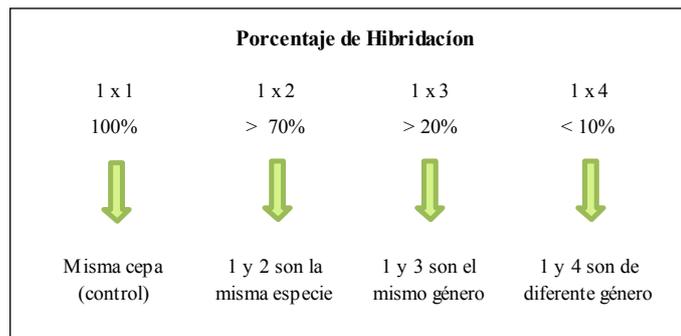


Fig. 1 Esquema del análisis de 4 diferentes organismos (denominados como 1, 2, 3 y 4) según sus % de hibridación del ADN. Modificado de www.icb.uncu.edu.ar/upload/2c-taxonomiamolecular.ppt.

Los ARN ribosómicos como cronómetros evolutivos (ARNr)

Zuckerlandl and Pauling (1965), desarrollaron la idea que la distancia evolutiva entre dos organismos que divergieron de un ancestro común, se puede medir por las diferencias en la secuencia de nucleótidos o aminoácidos de macromoléculas homólogas que se encuentren en ambas especies.

Para ello es esencial seleccionar la molécula correcta para la comparación, por lo que ésta debe llenar ciertos requisitos:

- estar universalmente distribuida
- ser funcionalmente homóloga entre el grupo en estudio
- su secuencia debe poder alinearse apropiadamente con otras secuencias, para encontrar regiones de homología y de heterogeneidad.
- debe cambiar a una velocidad conmensurada con la distancia evolutiva que se mide, cuanto mayor sea la distancia más lenta debe ser esta velocidad, ya que una molécula que ha sufrido muchos cambios podría estar fortuitamente entre los valores evolutivos que se consideran existen en el universo bacteriano.

Dada la antigüedad del proceso de síntesis de proteínas los ARNr parecen ser excelentes cronómetros evolutivos dentro de las bacterias. Son moléculas antiguas, distribuidas en

forma universal, funcionalmente constantes, y moderadamente bien conservadas entre grandes distancias filogenéticas, siendo por otro lado fácilmente purificados de extractos celulares.

Existen tres moléculas de ARNr, que en procariotas tienen magnitudes de 5S, 16S y 23S (S es el coeficiente de sedimentación, expresado en unidades Svedberg), correspondiendo aproximadamente a 120, 1500 y 3000 nucleótidos respectivamente (fig. 2). Contienen varias regiones con secuencias muy bien conservadas y suficiente variabilidad en otras, para servir como cronómetros evolutivos.

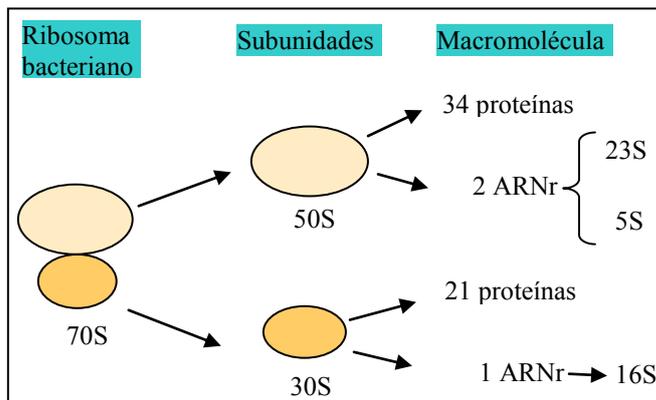


Fig. 2 Ribosoma bacteriano, estructuras y macromoléculas que lo componen. Tomado de Rodicio and Mendoza, 2004.

El más ampliamente utilizado es el **ARNr 16S**, ya que su tamaño relativamente largo minimiza las fluctuaciones estadísticas, además en la vía experimental es más fácilmente manejable que el 23S. La información que puede obtenerse a partir del 5S es limitada debido a su pequeño tamaño (Brock and Madigan, 1991).

La aplicación del ARNr 16S como cronómetro evolutivo, fue propuesta por Carl Woese en la década de los 70. Desde entonces, el análisis de los ARNr 16S ha sido ampliamente utilizado para establecer las relaciones filogenéticas o evolutivas dentro de las procariotas, así como también en la clasificación e identificación bacteriana (Olsen and Woese, 1993).

Para establecer entonces la relación evolutiva entre dos bacterias, se debe determinar y alinear las secuencias nucleotídicas de sus ARNr 16S y es el porcentaje de similitud entre éstas, el que indicará su grado de relacionamiento (Fig. 3).

Stackebrandt and Goebel (1994) demostraron que para que dos organismos se relacionaran a nivel de especie, se necesitaba un porcentaje de similitud mayor al 97 % en sus ADNr 16S (genes que codifican para el ARNr 16S), lo que se corresponde con un 70 % de similitud en experimentos de hibridación ADN-ADN.

Sin embargo, existen cepas con una similitud inferior al 50 % en experimentos de reasociación ADN-ADN, que presentan una identidad del 99-100 % a nivel del gen del ARNr 16S. Es por ello que en taxonomía se recomienda la identificación utilizando criterios fenotípicos junto con los datos de secuenciación (Rodicio and Mendoza, 2004).

Estructura secundaria de los ARNr 16S

El ARNr 16S es codificado por el gen *rrs*, al que también se denomina ADNr 16S. Como cualquier secuencia nucleotídica de cadena sencilla, se pliega en una estructura secundaria, que contiene segmentos de doble cadena intercalados con regiones de cadena sencilla (fig. 4). Presenta regiones comunes a todos los organismos, y **regiones variables (V)** en regiones específicas de la secuencia en los diferentes organismos.

La comparación de las secuencias de los ARNr de diferentes grupos filogenéticos mediante el análisis por computadora, reveló un hecho adicional que en la práctica es de gran importancia, y es la presencia de una o más secuencias características llamadas oligonucleótidos firmas o **secuencias de identidad** (Woese *et al.*, 1985).

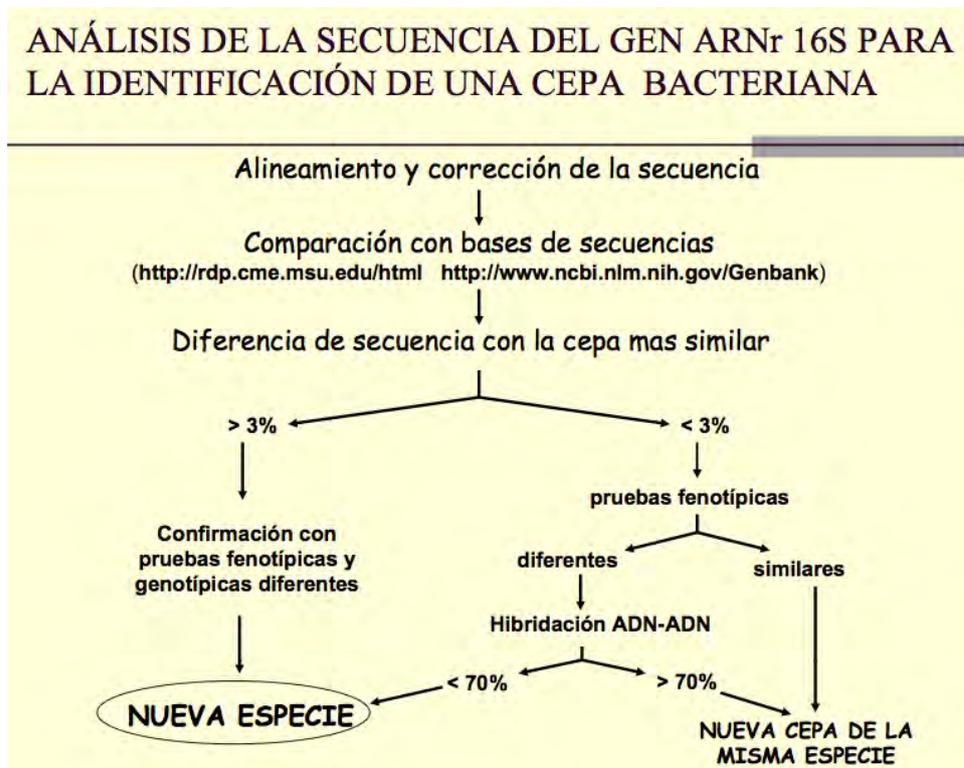


Fig. 3 Identificación de una cepa bacteriana basada en el análisis de la hibridación de las secuencias de sus A Nr 1 S. Tomado de .icb.uncu.edu.ar upload 2c-taxonomiamolecular.ppt

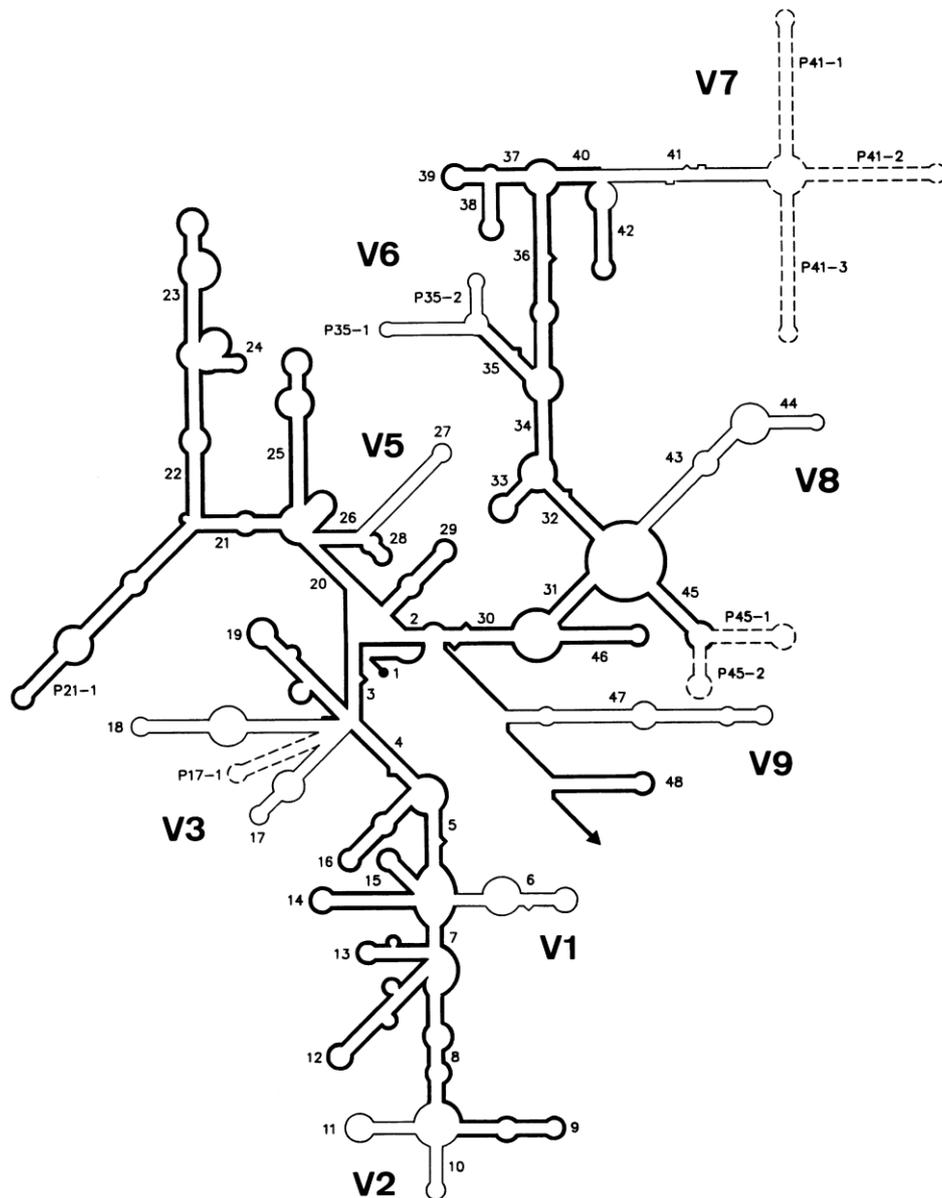


Fig. 4 Estructura secundaria del ARNr 16S procariótico. El extremo 5' está simbolizado con un círculo negro, mientras que el 3' lo está con una flecha. Las hélices comunes a todos los seres vivos, denominadas hélices universales, se numeran del 1 al 48, en orden de aparición a partir del extremo 5'. Las hélices específicas de procariotas se indican como **Pa-b**, donde **a** es el número de la hélice universal precedente y **b** el número de serie. Las regiones relativamente conservadas se presentan en negrilla. Las regiones variables, en líneas finas se designan **V1-V9**, teniendo en cuenta que **V4** es exclusiva de eucariotas. Las regiones que se presentan en forma discontinua, solo están presentes en un número limitado de estructuras. Rodicio and Mendoza, 2004; Neefs, *et al.*, 1990.

Secuencias de identidad

Son secuencias específicas cortas, que se encuentran en regiones definidas de la molécula de ARNr y se detectan cuando se comparan secuencias nucleotídicas alineadas mediante programas de computadora. Aparecen en todos los miembros de un determinado grupo filogenético (o en la mayoría) y nunca o solo raramente, están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos.

Se han encontrado secuencias de identidad que definen o identifican cada uno de los tres dominios (*Bacteria*, *Archaea*, y *Eukarya*), y bajando un nivel dentro de la clasificación (de dominio a reino), también se han detectado secuencias que definen las diferentes taxas dentro de cada reino. Es por esta razón, que se utilizan para ubicar a las bacterias aisladas, dentro del grupo filogenético al que pertenece (Brock and Madigan, 1991, Rodicio and Mendoza, 2004).

El ARNr 16S en la identificación bacteriana

La identificación basada en la secuenciación del ARNr 16S, es fundamental en cepas en las que la identificación fenotípica resulte imposible, dificultosa o requiera mucho tiempo como en;

- bacterias no cultivables
- bacterias cuyas características bioquímicas, no se adaptan a las de ningún género o especie conocida
- bacterias para las que la caracterización fenotípica sea sustancialmente incompleta
- bacterias fastidiosas debido a sus requerimientos nutricionales
- bacterias de crecimiento lento

Aunque esta identificación bacteriana es una técnica directa y sumamente eficaz, carece de algunas ventajas que ofrece el cultivo, como por ejemplo la caracterización de las vías metabólicas del organismo y la determinación de susceptibilidades a los agentes antimicrobianos. Sin embargo es una técnica muy importante cuando fracasa el cultivo (Brock and Madigan, 1991, Rodicio and Mendoza, 2004).

Árboles filogenéticos³

La información evolutiva a partir de un cronómetro evolutivo (por ejemplo el ARNr 16S), usualmente es esquematizada en diagramas ramificados llamados **árboles filogenéticos** que muestran el grado de parentesco entre los organismos comparados. El largo de las ramas se corresponde con el tiempo de divergencia de los organismos en estudio. Se definen los nodos como los puntos de bifurcación de las ramas mientras que un clúster agrupa los organismos o genes más relacionados entre los organismos estudiados (fig. 5).

³ Resumido de Baxevanis and Ouellette, 2001

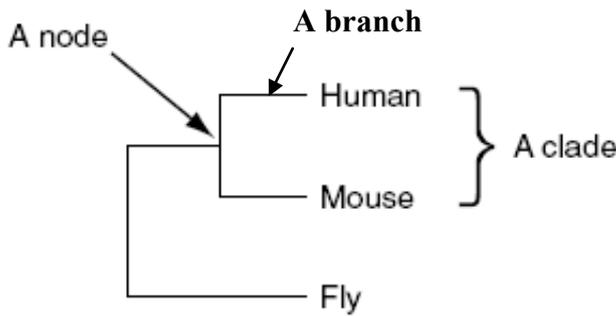


Fig. 5 Árbol filogenético que muestra el grado de parentesco entre los humanos, ratones y moscas. Se representan un nodo (node), las ramas (branch), y un clúster monofilético (clade) entre los organismos más relacionados. Modificado de Baxevanis and Ouellette, 2001.

La construcción de estos árboles implica cuatro pasos: alineación de las secuencias, determinación del modelo a utilizar, construcción del árbol por dicho modelo y finalmente evaluación del árbol obtenido.

El **alineamiento** es el procedimiento por el cual se comparan base a base dos o múltiples secuencias (este último caso se denomina alineamiento múltiple) preservando el orden de las bases en cada secuencia. Para considerar cual es el mejor alineamiento se establece un criterio con un puntaje diferente (matrices de puntuación) para los “gaps” (huecos) introducidos y los desapareamientos de bases, considerando el largo de las secuencias así como las diferentes mutaciones (fig. 6). Si dos secuencias de diferentes organismos son muy similares, es muy probable que tengan un ancestro común.

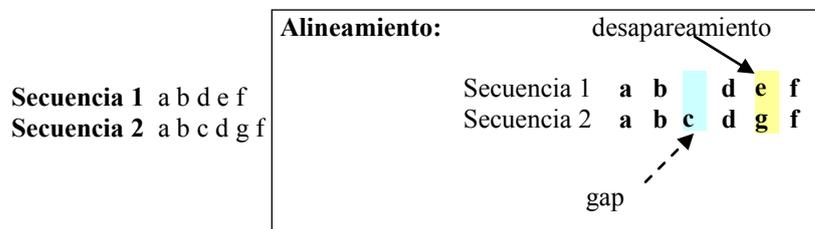


Fig. 6 Esquema de un alineamiento entre las secuencias 1 y 2, donde se observa un desapareamiento y un gap.

Al comparar las secuencias en estudio contra una base de datos, se puede obtener además de la información evolutiva, información sobre su función, estructura, hábitat, etc.

Los **modelos** para las construcciones de árboles (inferencias filogenéticas) pueden ser basados en métodos de distancia (ej. UPGA, Neighbor Joining-NJ, mínimos evolutivos-ME, mínimos cuadrados-LS) o en caracteres (ej. máxima verosimilitud-MV, máxima parsimonia-MP, bayesianos). La elección del modelo depende de las características de las secuencias en estudio, existiendo una gran variedad de programas computacionales que aplican estos modelos y permiten la elaboración del árbol. Por otro lado luego de construido el árbol, existen a su vez varios test para la **evaluación** de los mismos, como por ejemplo los test Skewness, Permutation, Bootstrap y Likelihood Ratio.

1.3 TÉCNICAS MOLECULARES

Las técnicas moleculares son uno de los avances más notorios para el estudio de comunidades microbianas. Dentro de ellas encontramos por ejemplo la **amplificación del ADN** por PCR así como su aplicación la PCR-cuantitativa (PCRq), también llamada PCR a tiempo real (RT-PCR). Otra técnica muy utilizada en ecología microbiana es la **hibridación *in situ* fluorescente** (FISH, del inglés: Fluorescent *in situ* Hybridization), que permite la detección y el estudio de los ácidos nucleicos que hay en una muestra.

Amplificación del ADN: PCR

(Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés: Polymerase Chain Reaction-PCR)

Por esta técnica se puede amplificar o multiplicar más de mil millones de veces una secuencia de ADN, siempre y cuando previamente se conozca al menos una parte de su secuencia nucleotídica para poder diseñar los cebadores de oligonucleótidos (primers). Los primers son secuencias de oligonucleótidos complementarias a los extremos de la secuencia a amplificar. La reacción es catalizada por una polimerasa que generalmente es la *taq*-polimerasa, ya que al ser aislada de una bacteria termófila es resistente a las altas temperaturas.

La técnica consta de tres pasos que se repiten aproximadamente de 20 a 40 ciclos. Estos pasos son; desnaturalización, hibridación o “annealing” y finalmente elongación.

- **Desnaturalización;** consiste en la separación por calentamiento (habitualmente 95 °C durante 1 minuto) de las hebras complementarias de la doble hélice de ADN a amplificar.
- **Annealing;** es una etapa de enfriamiento en presencia de un exceso de primers, en la cual se da la hibridación específica de estos con su secuencia complementaria en el ADN. La temperatura a utilizar se calcula en cada caso.
- **Elongación;** en esta etapa reaccionan la ADN-polimerasa, los primers requeridos por esta y los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato. Se incuban a 72 °C durante 30 seg-1min (según la longitud del fragmento a amplificar) de modo que se sinteticen selectivamente las regiones de ADN que se encuentren en dirección 3' de los primers (Brock and Madigan, 1991; Travers, 2003).

En la PCRq o RT-PCR, se cuantifica la cantidad de un fragmento de ADN en particular que hay en una muestra. El fundamento básico de la técnica es que la cantidad de ADN amplificado de una muestra, es proporcional al material inicial. Para saber la

concentración inicial es necesario construir primero una curva de calibración partiendo de concentraciones conocidas dentro del rango de concentraciones en estudio, para luego extrapolar de dicha curva el valor desconocido (Sung *et al.*, 2006; Smits *et al.*, 2004).

Hibridación *in situ* fluorescente: FISH

Consiste en la detección de microorganismos a partir de células morfológicamente intactas, basándose en su secuencia del ARNr. Para ello se utilizan sondas fluorescentes complementarias al ARNr 16S o 23S que se unirán al ribosoma y marcarán la célula.

Esta técnica permite;

- identificar y cuantificar en una muestra tanto organismos cultivables así como no cultivables, como por ejemplo la mayoría de los microorganismos del filo *Chloroflexi*.
- visualizar las relaciones espaciales de microorganismos en comunidades como flóculos en lodos activados, gránulos de lodo, biofilms, etc.
- el monitoreo de las dinámicas de poblaciones
- la posible identificación morfológica de los diferentes tipos de organismos en el medio ambiente y/o los enriquecimientos (Travers, 2003, Amann *et al.*, 2001).

1.4 SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE EFLUENTES

El agua es un compuesto esencial para la vida en nuestro planeta, ya que todas las reacciones bioquímicas ocurren en medio acuoso. A pesar que 2/3 del planeta está compuesto por agua, solo el 30 % de dicha sustancia, presente en aguas subterráneas de baja profundidad, ríos y lagos, puede ser utilizada para el consumo humano directo, por lo que es necesario mantenerla impoluta. Las aguas residuales productos de desecho de la actividad humana (ya sea de desperdicios domésticos o industriales) no pueden ser desechadas al medio ambiente sin previo tratamiento, existiendo normativas que regulan dichas descargas.

En este punto es de considerar que los sistemas naturales o ecosistemas, tienen una capacidad intrínseca de recuperarse por recursos propios (o sea de mantener el equilibrio), proceso conocido como **autodepuración**. En dicho proceso interviene una población de organismos variada, compleja y en constante competición, que depende del impacto (composición química, cantidad y como de la velocidad a la que son vertidas) de las aguas residuales en estos ecosistemas naturales.

Los sistemas de tratamiento de efluentes siguen en general las mismas secuencias para la degradación de los contaminantes que los sistemas naturales. El trabajar en condiciones “controladas”, permite minimizar los tiempos de tratamiento y aumentar la carga inicial del sistema, sin que estos sistemas pierdan la condición de retornar al equilibrio (Lippel, 2005).

En la elección de un sistema de tratamiento, debe tenerse en cuenta, además de la tecnología adecuada y los costos, las características de las aguas a tratar (Moreira, 2005). Generalmente son procesos múltiples, que incluyen tratamientos físicos y biológicos. En los **procesos primarios**, se separan físicamente los sólidos suspendidos, permitiendo su decantación. Le siguen los **procesos secundarios** que están asociados generalmente a procesos biológicos, pudiendo darse también procesos fisicoquímicos terciarios (Brock and Madigan, 1991).

Tipos de Biorreactores⁴

Reactores aerobios y anaerobios

La diferencia principal entre ambos tipos de reactores, es la exclusión en los últimos del oxígeno. Esto se logra con ambientes cerrados o en sistemas donde existe estratificación del agua, con el consiguiente agotamiento del oxígeno (dada la baja solubilidad de éste en

⁴ Basado en Schmidell et al., 2005. capítulos III y IV.

agua), como por ejemplo en las lagunas anaerobias y en el fondo de las lagunas facultativas.

Otra razón por la que los reactores anaeróbicos deben ser cerrados, es el olor producido en las reacciones fermentativas, necesitando de un sistema adecuado de ventilación. En estos sistemas la población microbiana se reproduce lentamente, requiriendo mayores tiempos de residencia de la masa de agua a tratar (que es el tiempo promedio que un fluido está en el reactor) y mayor tiempo para la puesta en marcha para colonizar el reactor (fig. 7 y 10 A).

Los reactores aerobios que contienen biomasa suspendida, requieren del suministro de oxígeno (aireadores), por lo que se debe tener una interface de agua-aire grande para mantener al sistema funcionando. Obtienen un alto grado de eliminación de materia orgánica, nitrógeno y fósforo, permitiendo además el tratamiento de una gran variedad de aguas residuales (fig. 8 y 10 B) (Bertola *et al.*, 1999).

Reactores con biomasa suspendida y biomasa inmovilizada

En los **reactores de biomasa suspendida**, los microorganismos encargados de la degradación están suspendidos en el líquido. Para evitar su pérdida con el agua tratada se deben recuperar y reincorporar al reactor, en general se utiliza para esto un **sedimentador externo**. En este tipo de reactores, es importante la formación de masas densas de agregados de microorganismos de mayor tamaño llamados **flóculos**, tanto para aumentar la superficie de contacto del ecosistema (formando numerosos “microecosistemas”) como para favorecer la sedimentación.

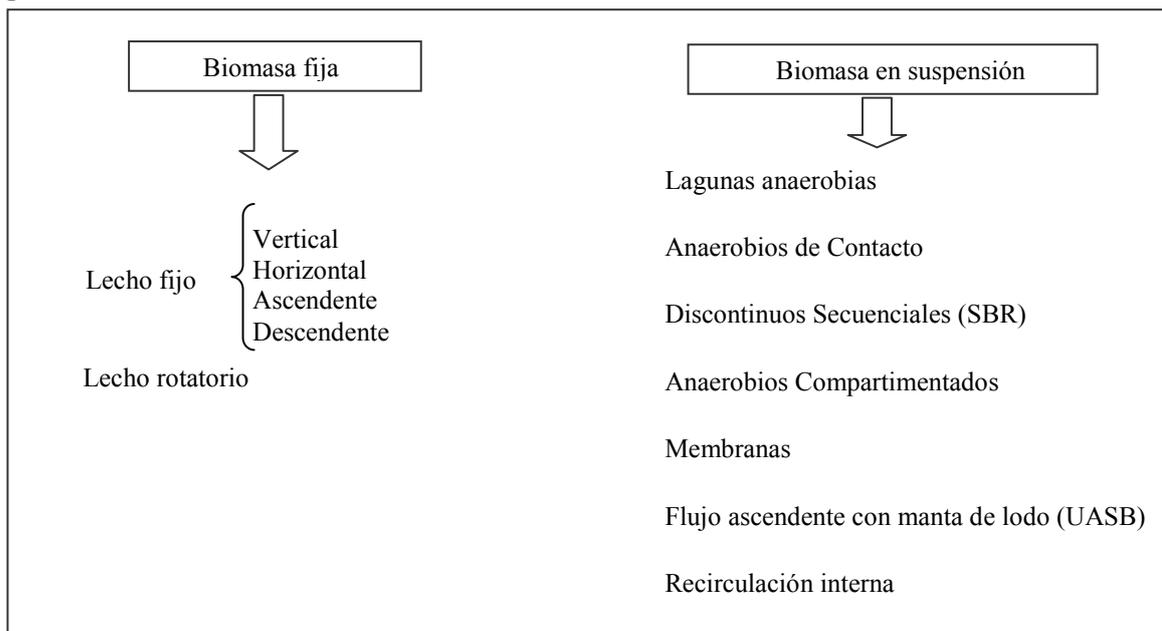


Fig. 7 Diferentes reactores utilizados en el **tratamiento anaerobio de efluentes**. SB “sequencing batch reactor”, UASB “upflo anaerobic sludge blanket”, EGSB “expanded granular sludge bed”. Tomado de Schmidell *et al.*, 2005.

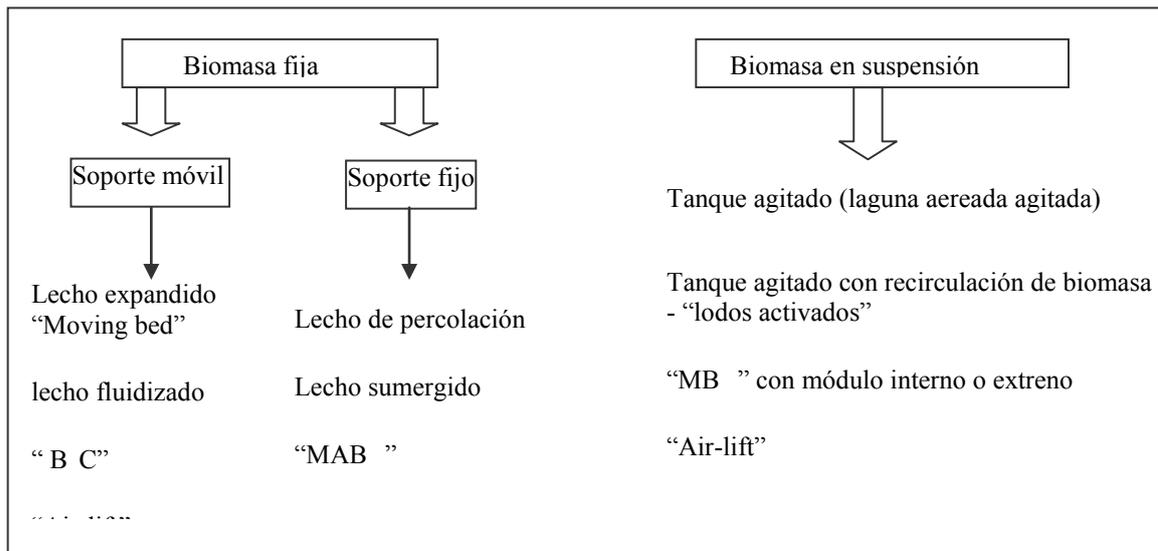


Fig. 8 Diferentes reactores utilizados en el **tratamiento aerobio de efluentes**. RBC- "Rotating Biological Contactor"; MAB – "Membrane Aerated Bioreactor"; MB – "Membrane Bioreactor". Tomado Schmidell *et al.*, 2005.

En la formación de los flóculos así como en la de los **biofilms**, son importantes los exopolímeros (polisacáridos) secretados por las células, al igual que las proteínas y ácidos nucleicos que se encuentren en la matriz extracelular (estos pueden provenir de la lisis celular o ser secretadas por las células para modificar sustancias para su posterior asimilación), ya que proveen del entramado donde se ubicaran las poblaciones bacterianas.

Los flóculos, según Sezgin (Sezgin *et al.*, 1978), presentan dos niveles de estructura, por un lado los microorganismos filamentosos agregados por sus polímeros extracelulares, forman el "esqueleto" (**macroestructura**), donde se agregan los organismos formadores de flóculos (**microestructura**), siendo las fallas en dichas estructuras, las que generan problemas de floculación. Ante una falla en la macroestructura, se forman flóculos pequeños (microflóculos o Pin Floc), que presentan generalmente problemas de sedimentación. Un exceso de microorganismos filamentosos, también causa problemas de sedimentación, al impedir mecánicamente la agregación, formando grandes agregados que tienden a fluctuar en el medio, fenómeno conocido como "**bulking**". Una alta producción de exopolímeros forma una masa gelatinosa o viscosa de reducida sedimentación, fenómeno conocido como "**bulking no filamentoso**".

En los biofilms, los agregados microbianos están adheridos a un soporte, colonizándolo de modo relativamente uniforme, alternando en forma de clúster (capas poco espesas con zonas de mayor acumulación de exopolímeros (fig. 9).

Otra alternativa es usar **reactores con biomasa inmovilizada** que utilizan un soporte para prevenir que la biomasa salga del reactor. La biomasa se puede inmovilizar o adherir a un soporte sólido, que no sea eliminado con el efluente, pero que sea lo suficientemente liviano para permitir su suspensión.

Reactores discontinuos (Bach)

Estos reactores se llenan con el agua residual a tratar y se espera el tiempo necesario para obtener las condiciones del efluente requeridas.

Se utilizan para el tratamiento de pequeños volúmenes de agua, sólidos (compostaje), y cuando el tiempo de residencia es muy alto.

Reactores continuos

Una corriente de agua residual es continuamente alimentada al reactor, mientras que otra corriente es continuamente eliminada por la salida.

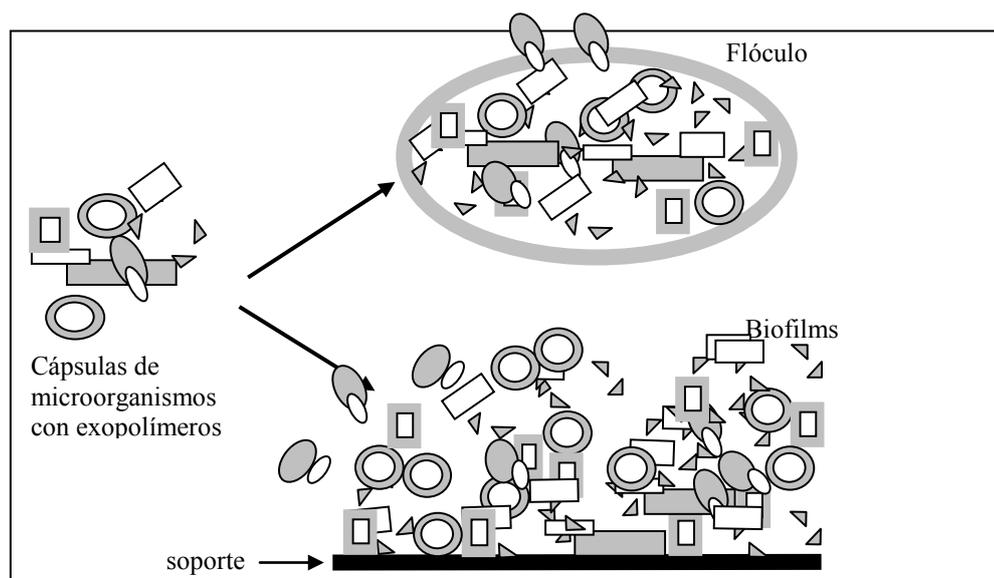


Fig. 9 Representación esquemática de la formación de cápsulas y agregación microbiana en la formación de flóculos y biofilms. Modificado de Schmidell *et al.*, 2005.

Reactores discontinuos secuenciales: SBR

Es un modo intermedio entre los reactores discontinuos y los continuos. El agua residual es continuamente alimentada a un reactor operando en bach. Operan en una serie de períodos (llenado, reacción, sedimentación y extracción) que constituyen un ciclo, pudiendo además existir una fase inactiva. La manipulación de estos períodos es la que varía la condición del efluente.

Son reactores aireados, con o sin agitación y sistemas de decantación, que pueden acomodar los grandes cambios en los líquidos, en cada ciclo del proceso.

A Esquema de Reactor **UASB**

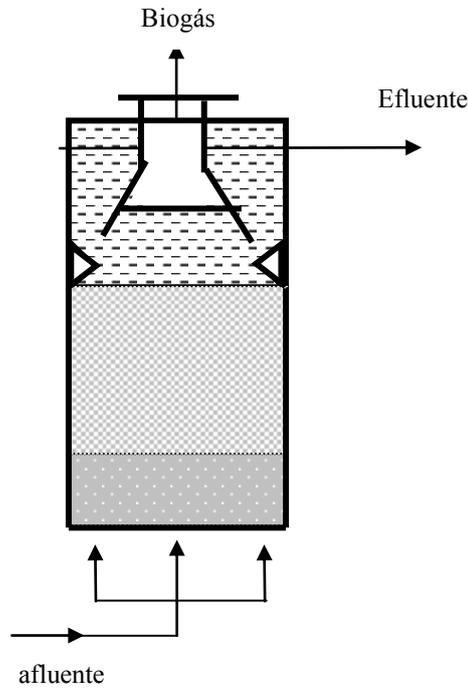
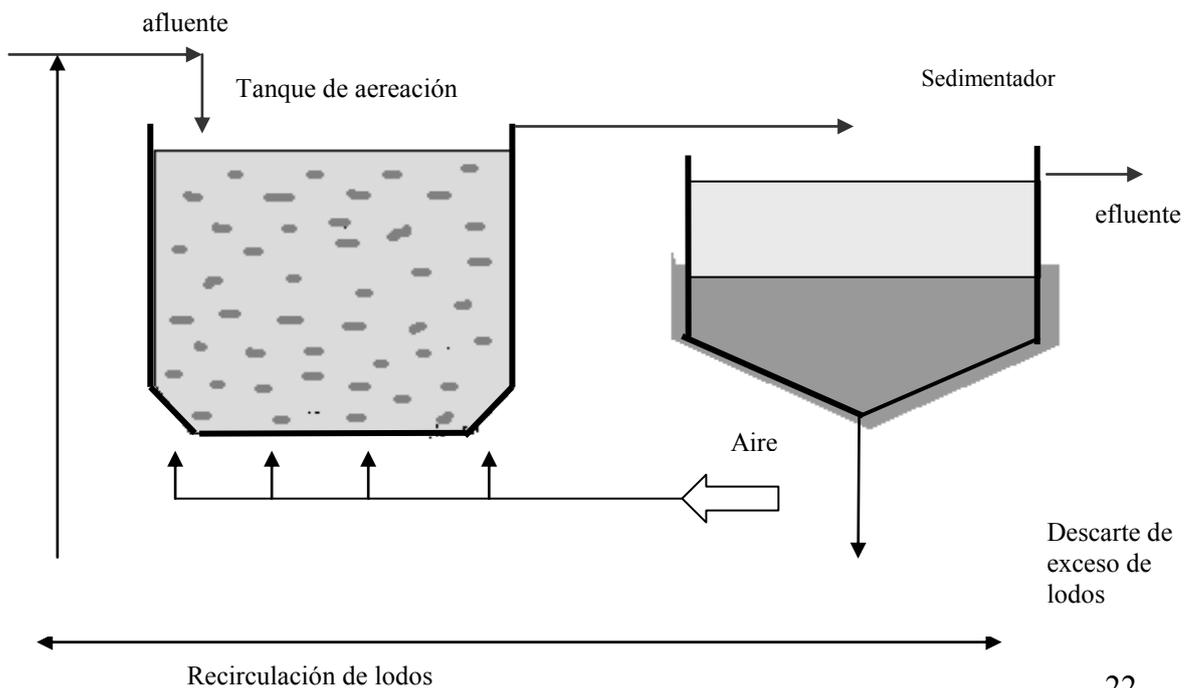


Fig. 10. **A** Esquema de un reactor anaerobio de flujo ascendente con manta de lodo (UASB). **B** Esquema de un reactor aerobio de lodos activados. Tomado de V Curso de Tratamientos Biológico de Residuos - capítulos IV.2 y V.2, Florianópolis 2005.

B Esquema de Reactor de **Lodos Activados**



2. FILO *Chloroflexi*

Con los métodos de cultivos tradicionales, se ha subestimado la gran diversidad de microorganismos existentes en la naturaleza, porque muchos de estos no han podido ser cultivados con técnicas estándar. Se ha logrado identificar una gran diversidad de microorganismos que no son cultivables utilizando métodos de biología molecular independientes de cultivo. Dentro de estos grupos, las bacterias del filo *Chloroflexi* (formalmente conocidas como bacteria verdes no sulfurosas GNSB), han sido reconocidas como un típico grupo de bacterias “no cultivables” (Hugenholtz *et al.*, 1998).

Han sido identificadas en diversos hábitats como; suelos, sedimentos (de océanos, ríos y lagunas), ríos, lagos, acuíferos, fuentes termales, acuíferos termales, ambientes marinos e hipersalinos (Yamada and Sekiguchi, 2009; Yamada *et al.*, 2005). También ha sido reportada su presencia en numerosos sistemas de tratamientos de efluentes (Kragelund *et al.*, 2007, Etchebehere *et al.*, 2002; Björnsson *et al.*, 2002; Sekiguchi *et al.*, 2001).

Los pocos microorganismos cultivables del filo, presentan una gran variedad fisiológica, incluyendo organismos fotosintéticos anoxigénicos (géneros *Chloroflexus* y *Oscillochloris*), termofilicos organotróficos (género *Thermomicrobium*), reductores de hidrocarburos clorados (*Dehalococcoides ethenogenes*), fermentadores anaerobios (*Anaerolinea thermophila*, *Levilinea saccharolytica*), fermentadores aerobios facultativos (*Caldilinea aerophila*), y microorganismos aerobios (dentro de las clases *Caldilineae*, *Chloroflexi*, *Thermomicrobiales*, *Ktedonobacteria* y *Ardenticatenia*).

Hugenholtz *et al.* (1998) basándose en la secuencia del ARNr 16S, propusieron la división del filo *Chloroflexi* en cuatro clases o subfilos denominados subfilos I, II, III y IV. Luego se incorporaron las clases *Thermomicrobia* (al reclasificar a los género *Thermomicrobium* y *Sphaerobacter*)(Björnsson *et al.*, 2002), *Ktedonobacteria* (Cavaletti *et al.*, 2006) y *Ardenticatenia* (Kawaichi *et al.*, 2013) (tabla 1).

Identificación del filo: estructura secundaria del ARNr 16S

Alineando todas las secuencias posibles de los genes ARNr 16S del filo, Gich *et al.*, (2001) encontraron cinco regiones que eran altamente específicas de *Chloroflexi*. Estas eran las posiciones; 538-555, 941-957, 948-964, 1328-1344, y 1340-1365 de acuerdo con la numeración de *E. coli*. Como esperaban para grupos de bacterias filogenéticamente divergentes, las diferencias en la secuencias de genes ARNr 16S no se reducían a las regiones hipervariables V6, V7 y V8, sino que eran también frecuentemente encontradas en otras partes de la molécula.

Un rasgo característico de todos los miembros, es que perdieron el elemento helicoidal dentro de la región hipervariable V7, entre las posiciones 1123 y 1147 según *E. coli.*, y la presencia de un loop entre las posiciones 607 y 630 (Giovannoni *et al.*, 1996; Oyaizu *et al.*, 1987). Además, Gich *et al.* (2001) confirmaron la existencia de una guanina característica en la posición 1202 según *E. coli.* (Woese, 1987) y encontraron que la guanina en la posición 1224 según *E. coli.*, que hasta la fecha se consideraba un rasgo característico, era remplazada por uracilo en más del 50% de las secuencias por ellos estudiadas. Woese, (1987), también describió la presencia de G, A, y G en la posiciones 53, 96 y 1410 según *E. coli* respectivamente.

Sondas descriptas para FISH

En el trabajo de Björnsson *et al.*, 2002, se presentó el diseño y la evaluación de sondas para el filo *Chloroflexi*, y para los subfilos I y III.

Estos autores demostraron además, que los oligonucleótidos GNSB-941, diseñados para ser usados como cebadores para PCR del filo *Chloroflexi* (Gich *et al.*, 2001), eran aplicables directamente como sondas, con un desapareamiento central con la mayoría de los genes del ARNr 16S que no son blanco. En la tabla. 2a y b se detallan algunos primers y sondas del filo.

Sonda	Grupo blanco	Posic. en <i>E. coli</i>	Secuencia nucleotídica de 5' a 3'	Referencia
GNSB633	algunos clones del subphylum I	633-652	TAGCCCGCCAGTCTTGAACG	Sekiguchi <i>et al.</i> , 1999
CFX784	subphylum I	784-801	ACCGGGGTCTCTAATCCC	Björnsson <i>et al.</i> , 2002
CFX197	Filotipos no cultivados de la clase <i>Anaerolineae</i>	197-214	TCCCGGAGCGCCTGAACT	Speirs <i>et al</i> 2009
CFX1A331	<i>Candelinae</i>		CCCCGTAGGAGTCGGGAC	Yoon <i>et al.</i> , 2010
Dhe1259c	algunos <i>Dehalococcoides</i>	1259-1278	AGCTCCAGTTCGCACTGTTG	Yang y Zeyer, 2003
Dhe1259t	algunos <i>Dehalococcoides</i>	1259-1278	AGCTCCAGTTCACACTGTTG	Yang y Zeyer, 2003
CFX109	subphylum III s/ <i>Roseiflexus</i>	109-126	CACGTGTTCTCAGCCGT	Björnsson <i>et al.</i> , 2002
CFX1238	<i>Chloroflexus</i>	1238-1255	CGCATTGTCGTCGCCATT	Nübel <i>et al.</i> , 2002
RFX1238	clones <i>Roseiflexus</i>	1238-1255	CGCATTGTCGGCGCCATT	Nübel <i>et al.</i> , 2002
CHL1851	bact filam. Eikelboom Type 1851	592-611	AATTCACGAACCTCTGCCA	Beer, <i>et al.</i> , 2002
EU25-1238	filamentos <i>Chloroflexi</i>	1238-1253	CTGCG ATTGCCACCGACAT	Kragelund <i>et al.</i> , 2006
CFX1223	phylum <i>Chloroflexi</i>	1223-1242	CCATTGTAGCGTGTGTGTMG	Björnsson <i>et al.</i> , 2002
GNSB941	phylum <i>Chloroflexi</i>	941-957	AAACCACACGCTCCGCT	Gich <i>et al.</i> , 2001

Tabla 2b. Sondas dirigidas al gen del ARNr 16S de organismos del filo *Chloroflexi*. Los detalles de las sondas están disponibles en probeBased (Loy *et al.*, 2007).

2. SUBFILO I

Entre todos los subfilos descritos dentro del filo *Chloroflexi*, en este es en el que se encuentran la mayor diversidad de secuencias de clones ambientales (Yamada and Sekiguchi, 2009; Sekiguchi *et al.*, 2001). Hasta el momento contiene solo unas pocas cepas caracterizadas, todas con morfología filamentosa multicelular. Presentan crecimiento lento y metabolismo heterotrófico. Los miembros de la clase *Anaerolineae* tienen requerimientos de extracto de levadura para su crecimiento, siendo anaerobios estrictos y el co-cultivo con bacterias metanogénicas generalmente estimula su crecimiento (Grégoire *et al.*, 2011b, Yamada *et al.*, 2007, Yamada *et al.*, 2006, Sekiguchi *et al.* 2003). La clase *Caldilineae* contiene microorganismos aerobios, anaerobios facultativos y anaerobios estrictos (Sekiguchi *et al.*, 2003, Grégoire *et al.*, 2011a, Kale *et al.*, 2013). Dos de los tres microorganismos de esta clase requieren extracto de levadura para su crecimiento.

Hábitat

Se encontraron secuencias de clones pertenecientes a este subfilo en sedimentos (Wise *et al.*, 1997), aguas termales (Sekiguchi *et al.*, 2003; Hugenholtz *et al.*, 1998), muestras de acuíferos (Dojka *et al.*, 1998), consorcios sulfato reductores (Phelps *et al.*, 1998), consorcios de dechloración anaerobios (Schlotelburg *et al.*, 2000; von Wintzingerode *et al.*, 1999), lodos anaerobios (Yamada *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2001; Delbes *et al.*, 2000; Sekiguchi *et al.*, 1998), ambientes “aerobios” como lagunas aireadas (Yu and Mohn, 2001), lodos activados (Björnsson *et al.*, 2002; Snaidr *et al.*, 1997) y lagos ultraoligotróficos de agua dulce (Urbach *et al.*, 2001).

En las investigaciones de Yamada *et al.* (2005), se reportó que la población de microorganismos relacionadas con *Chloroflexi* encontradas en lodos de reactores UASB (termófilos y mesófilos) pertenecían fundamentalmente a este subfilo.

Posibles roles en los diferentes hábitat

Esta ubicuidad en los diversos hábitats, muestra una gran amplitud ecológica y fisiológica, sugiriendo un rol muy importante dentro de dichos ambientes (Yamada *et al.*, 2005; Björnsson *et al.*, 2002; Juretschko *et al.*, 2002; Sekiguchi *et al.*, 1999; Hugenholtz *et al.*, 1998).

Trabajando en sistemas de tratamiento de aguas residuales del tipo lodos activados que no sufrían el fenómeno de “bulking”, se planteó que un posible rol de estos filamentos sería

el favorecer la floculación a nivel de la macroestructura. Para ello se basaron en su localización en el interior de los flóculos y a su relativa abundancia, sugiriendo además que se debía estudiar su rol en la degradación de macromoléculas (Björnsson *et al.*, 2002; Bossier and Verstraete, 1996).

Se ha planteado que la función fisiológica *in situ* de los filamentos del subfilo I en los lodos anaeróbicos de reactores UASB, sería la degradación de carbohidratos y materiales celulares (es decir como metabolizadores de sustratos primarios) y su morfología filamentosa sería muy importante para la granulación así como para su retención dentro de los gránulos (Yamada *et al.*, 2005).

En los reactores UASB termófilos, estos organismos filamentosos serían fundamentales para la granulación de los lodos con un buen proceso de sedimentación (crecerían y formarían una masa densa y bien acomodada de flóculos, que contribuiría a la formación y mantenimiento de los gránulos), así como en la descomposición de los compuestos orgánicos, ubicándose en la superficie de los gránulos (Sekiguchi *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2005). Sin embargo estos microorganismos también son los causantes de la flotación “bulking” de los gránulos en el medio líquido si se encuentran en exceso. Es necesario un control del crecimiento de los filamentos, no solo para promover la granulación, sino también para prevenir el fenómeno de “bulking” (Sekiguchi *et al.* 2001).

No ocurre lo mismo en los reactores UASB mesófilos. A pesar que todos los filamentos del filo *Chloroflexi* detectados pertenecían a este subfilo y que además eran uno de los constituyentes fundamentales en varios de los reactores mesófilos estudiados, no parecían ser esenciales para la granulación (Yamada *et al.*, 2005). Llegaron a esta conclusión dado que por un lado en algunos de los lodos mesófilos encontraban que dentro de sus gránulos las células de *Chloroflexi* eran menos abundantes y por otro lado existían reportes de lodos mesófilos que sedimentaban bien (Guiot *et al.*, 1992; Macleod *et al.*, 1990), cuyos gránulos no estaban recubiertos de células filamentosas.

En la superficie anóxica de sedimentos del lago Kaiike se ha propuesto un tipo de sintrofismo entre bacterias sulfato reductoras (pertenecientes a las δ -*Proteobacterias*), y bacterias pertenecientes al subfilo I de *Chloroflexi*. En este sistema estas últimas crecerían como heterótrofas, degradadoras iniciales de macromoléculas (como azúcares y almidón de restos celulares), produciendo ácidos grasos e H₂ que serían utilizados como donadores de electrones por las bacterias reductoras de sulfato. Esto estaría apoyado por el hecho que no se encontraron clones del subfilo I en lodos de sedimentos enriquecidos

con varios ácidos orgánicos o H_2 / CO_2 , donde no sería necesaria su presencia como productores de dichos ácidos (Koizumi *et al.*, 2004).

Esta teoría de degradadores iniciales de macromoléculas fue apoyada por estudios en 126 plantas de tratamiento de efluentes de diferentes industrias (Kragelund *et al.*, 2007). Utilizando las técnicas de FISH-ELF (hibridación *in situ* fluorescente - marcador de enzimas fluorescente) se determinó que en todas las plantas de tratamientos, los filamentos del filo detectados mostraron en mayor o menor medida actividad exoenzimática para todas las enzimas ensayadas (lipasa, estearasa, glucoronidasa, galactosidasa, y quitinasa). A su vez utilizando la técnica de FISH-MAR (hibridación *in situ* fluorescente-microautoradiografía) se demostró que podían utilizar sustratos como N-acetilglucosamina (NAG). El NAG es un monosacárido que forma polisacáridos de carácter estructural, por ej. el peptidoglicano constituyente de la pared celular de las bacterias (Brock and Madigan, 1991). Estas bacterias serían capaces de hidrolizar el peptidoglicano y de utilizar como sustrato el NAG producido, es decir metabolizar compuestos provenientes de restos celulares (Kragelund *et al.*, 2007).

La aparición de estos filamentos podría deberse al decaimiento de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), aumento de lisis celular, junto con el incremento del contenido de carbohidratos en las aguas a tratar. Debido a esto algunos investigadores proponen que el control de la concentración de carbohidratos, y la separación de fases acidogénica y metanogénica podría prevenir el fenómeno de “bulking”, así como favorecer la granulación de los lodos (Alphenaar, 1994; Sekiguchi *et al.*, 2001).

Especies descritas dentro del subfilo I

De sus estudios filogenéticos, Yamada *et al.* (2006) concluyeron que el subfilo I no era monofilético como propusieron Hugenholtz and Stackebrandt (2004), sino que debía subdividirse en dos clases, que denominaron *Anaerolineae* y *Caldilineae*, claramente diferenciadas por la utilización de oxígeno. Mientras que los miembros de la clase *Anaerolineae*, eran estrictamente anaeróbicos, la especie hasta ese momento descrita dentro de los *Caldilineae*, era aerobia facultativa (Yamada *et al.*, 2006). También propusieron las nuevas taxas subordinadas de orden y familia para las que plantearon las nominaciones de *Anaerolineales*, *Caldilineales* y *Anaerolineaceae*, *Caldilineaceae* respectivamente para las clases *Anaerolineae* y *Caldilineae* por ellos definidas (fig. 13).

Esta diferenciación fenotípica planteada en referencia a la utilización de oxígeno, fue luego en parte apoyada posteriormente con los hallazgos realizados, ya que no se han

aislado hasta el momento microorganismos de la clase *Anaerolineae* que sean aerobios o aerobios facultativos. Sin embargo si se aisló en la clase *Caldilineae* una cepa *Caldilinea tarbellica* (D1-25-10-4^T) (Grégoire *et al.*, 2011a) que es anaerobia y otra *Litorilinea aerophila* (PRI-431^T) que es aerobia (Kale *et al.*, 2013). Por lo que se podía concluir que las todas cepas de la clase *Anaerolineae* son anaerobias estrictas, mientras que las de la clase *Caldilinea* no, ya que contiene cepas anaerobias, aerobias facultativas, y aerobias.

Las dos primeras cepas caracterizadas del subfilo fueron aisladas de un reactor UASB termófilo de una planta procesadora de soja (UNI-1^T) y de una fuente termal del Japón (SLT-6-O1^T) (fig. 11). Presentaron entre ellas un porcentaje de similitud del gen del ARNr 16S de 81.1 %, por lo que fueron clasificadas en dos géneros diferentes, denominadas como *Anaerolinea thermophila* (UNI-1^T) y *Caldilinea aerophila* (SLT-6-O1^T) respectivamente (Sekiguchi *et al.*, 2001 y 2003).

En el 2006, fueron aisladas tres cepas IMO-1^T, KIBI-1^T, e YMTK-2^T (fig. 12). La cepa IMO-1^T fue aislada de los gránulos de lodo de un reactor termófilo, alimentado con aguas residuales de una planta de tratamientos de efluentes de una fábrica de “shochu” (licor japonés, destilado a partir de papas dulce). La cepa KIBI-1^T fue aislada de un reactor UASB mesófilo alimentado con aguas residuales de una planta procesadora de azúcar e YMTK-2^T de otro UASB mesófilo alimentado con agua residual “artificial”, compuesta principalmente de sacarosa y ácidos grasos volátiles. Dichas cepas fueron denominadas *Anaerolinea thermolimosa*, *Levilinea saccharolytica*, y *Leptolinea tardivitalis*, respectivamente (Yamada *et al.*, 2005 y 2006).

En el 2007 se detectaron dos nuevas cepas GOMI-1 y KOME-1 de un digestor de lodo termofílico y del suelo inundado de una plantación de arroz respectivamente. Sus rasgos fenotípicos y genéticos (92% de similitud entre las secuencias de los genes ARNr 16S) sustentaron su inclusión como dos taxas independientes dentro de la clase *Anaerolineae* y se asignaron los nombres de *Bellilinea caldifistulae* (GOMI-1^T) y *Longilineae arvoryzae* (KOME-1^T) (Yamada *et al.*, 2007).

En el 2011 se aisló a *Thermanaerotherix daxensis* (GNS-1^T) de un acuífero termal profundo en Francia. Los análisis filogenéticos mostraron un 92.5% de similitud en los genes de ARNr 16S con *Bellilinea caldifistulae*. Basados además en las características genotípicas y fenotípicas propusieron la asignación de una nueva especie dentro de un nuevo género *Thermanaerotherix* en la clase *Anaerolineae* (Grégoire *et al.*, 2011b). Del mismo acuífero termal fue aislada *Caldilinea tarbellica* (D1-25-10-4^T) perteneciente al género *Caldilinea* y a la clase *Caldilineae* (Grégoire *et al.*, 2011a).

En el 2013 fue aislada una cepa aerobia de la clase *Caldilineae*, *Litorilinea aerophila* (PRI-431^T) de una fuente termal intertidal (franja costera donde se produce la interface agua-tierra y que está sometida a los efectos de las mareas) en Isafjardadjup, Islandia (Kale *et al.*, 2013).

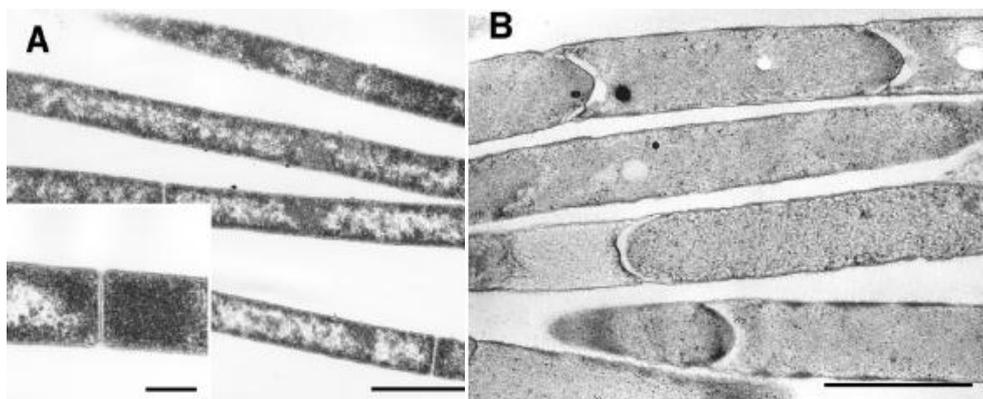


Fig 11 Microfotografía de transmisión electrónica de una sección ultrafina de: (A) cepa UNI-1^T (barra, 1 μm ; barra en el recuadro, 0,1 μm) y (B) cepa STL-6-O1^T (barra, 1 μm). Tomado de Sekiguchi *et al.*, 2003.

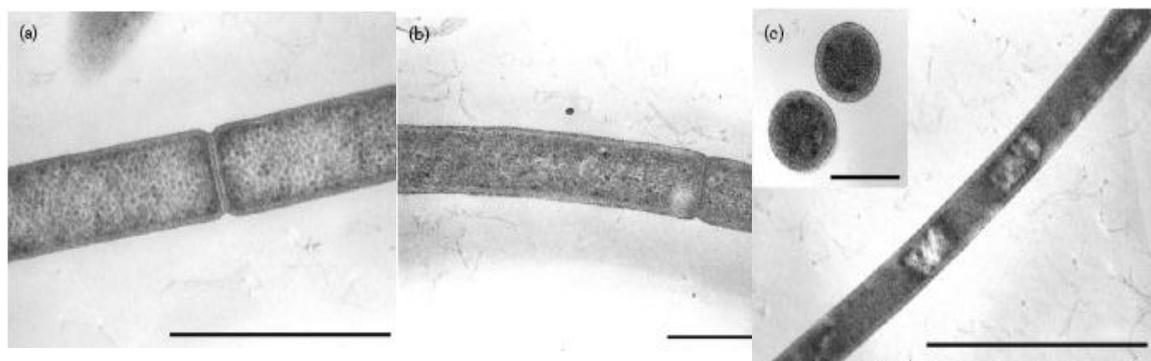


Fig. 12 Micrografía de transmisión electrónica de una sección ultrafina de células de las cepas IMO-1^T (a), KIBI-1 (b) y YMTK-2^T (c). Barra, 1 μm . El recuadro en (c) (barra, 0,2 μm) muestra una sección transversal de células filamentosas de la cepa YMTK-2^T. Tomado de Yamada *et al.*, 2006.

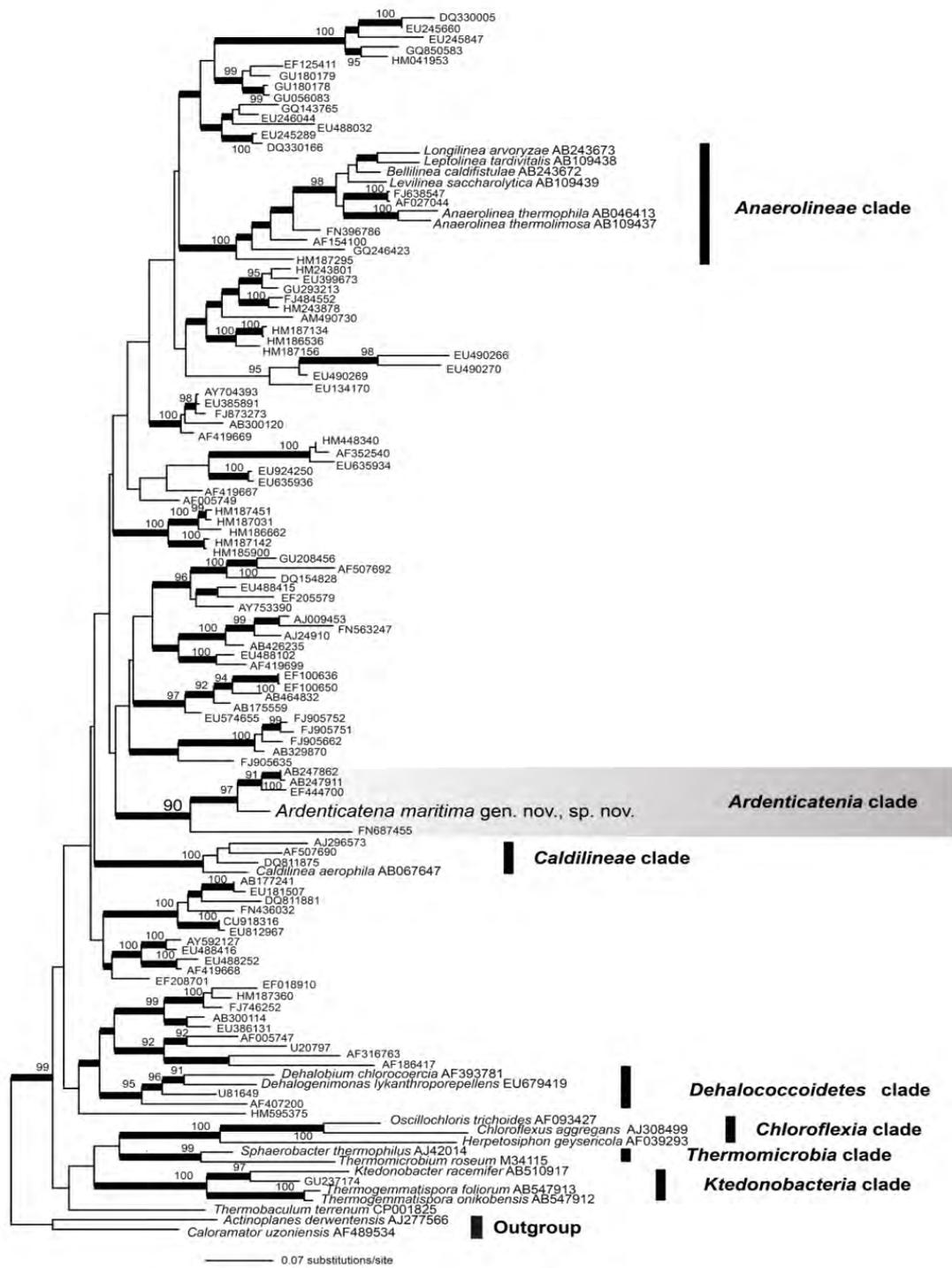


Fig. 13. Árbol filogenético inferido del gen 16S ARNr del filo *Chloroflexi*. Construido por el método de Maximun-likelihood (ML). Se muestran en cada nodo los valores de bootstrap mayores o iguales a 90 %. Las ramas internas con valores de Bayesian posterior mayores o iguales a 0.95 se muestran en líneas gruesas. Tomado de Kawaichi *et al.*, 2013. La clase informal “*Dehalococcoidetes*” fue definida como *Dehalococcoidia* por Löffler *et al.*, 2013.

2.1.1 Clase *Anaerolinea*

Anaerolinea thermophila UNI-1^T

Este organismo fue detectado por FISH, con la sonda GNSB633 dirigida al gen ARNr 16S diseñada por Sekiguchi *et al.*, en 1999.

Aislamiento

Un reactor UASB termófilo de una planta procesadora de soja, sufrió el fenómeno de bulking luego de 100 días de operación. Sus gránulos adquirieron un aspecto plumoso con proyecciones como las de un erizo de mar. Utilizando la técnica de FISH con la sonda GNSB633 dirigida al gen ARNr 16S (Sekiguchi *et al.*, en 1999) encontraron en los extremos de estas proyecciones abundantes filamentos relacionados con el subfilo I e intentaron cultivarlos. Para ello lavaron los gránulos, observaron con un microscopio binocular y utilizando un micromanipulador, cortaron cuidadosamente los extremos de las proyecciones. Luego dispersaron las células por ultrasonido (sonificación), hicieron diluciones seriadas e inocularon en medio líquido suplementado con diferentes sustratos (Sekiguchi *et al.*, 2001).

Encontraron que un medio con sacarosa o glucosa (20 mM) suplementado con extracto de levadura (0,1 %) luego de 2 semanas de incubación a 55 °C, permitía el crecimiento de células filamentosas. En dicho medio líquido a altas diluciones observaron el crecimiento muy lento de agregados densos como algodón de microorganismos filamentosos del subfilo I así como de *Methanothermobacter*.

Con el propósito de aislar los filamentos del subfilo I utilizaron la técnica de “roll-tube” agregado sulfonato de bromoetano para inhibir las bacterias metanogénicas. Después de un mes de incubación observaron la aparición de pequeñas colonias blancas de 0,1 a 0,2 mm de diámetro, las que contenían finos filamentos de 0,2 a 0,3 µm de ancho, a los que designados como cepa UNI-1 (Sekiguchi *et al.*, 2001). Esta cepa fue denominada *Anaerolinea thermophila*, definiéndola como la cepa tipo (UNI-1^T) del género *Anaerolinea* (fig. 11 a) (Sekiguchi *et al.*, 2003).

Características

Son microorganismos de crecimiento muy lento, termófilos, con una temperatura y pH óptimos de 55 °C y 7,0 respectivamente, estrictamente anaerobios, fermentativos, en los que no se observó crecimiento fotosintético, ni la presencia de quinonas. Requieren para su crecimiento extracto de levadura al 0,01 %, que no puede ser remplazado por una

mezcla de vitaminas.

De los sustratos estudiados a una concentración de 20 mM, se observa crecimiento en medios con glucosa, fructosa, galactosa, manosa, rafinosa, sacarosa, almidón y el propio extracto de levadura (a una concentración de 0,5 %).

En un medio con sacarosa y extracto de levadura, no utilizaron ninguno de los aceptores de electrones estudiados (sulfato, nitrato, sulfito, tiosulfato, fumarato en concentración 20 mM, nitrilotriacetato férrico (Fe(III)-NTA) en concentración 5 mM, ni PCE, y TCE en concentración 100 μ M).

Los principales productos de fermentación obtenidos en un medio de glucosa suplementado con extracto de levadura, son el acetato e hidrógeno, con pequeñas cantidades de lactato, succinato y formato. El crecimiento se estanca después de cierta acumulación de H₂, por lo que el co-cultivo con *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (metanogénica que utiliza H₂) favorece el crecimiento, pudiendo tener la necesidad de asociarse (sintrofismo) con otros organismos consumidores de H₂ para crecer (Sekiguchi *et al.*, 2001).

El contenido de G+C del ADN es de 54.9 % (Sekiguchi *et al.*, 2003; Sekiguchi *et al.*, 2001). Los mayores ácidos grasos detectados son C_{16:0}, C_{15:0}, C_{14:0} y C_{18:0}.

***Anaerolinea thermolimosa* IMO-1^T, *Leptolinea tardivitalis* YMTK-2^T y *Levilinea saccharolytica* KIBI-1^T**

Aislamiento

Para obtener un buen inóculo de células de *Chloroflexi*, Yamada *et al.* (2005) observaron por FISH cinco lodos de reactores UASB, tres termófilos y dos mesófilos, utilizando la sonda GNSB941 para dicho filo. Encontraron que ciertos tipos de pequeños flóculos (de aproximadamente 0,5 mm de diámetro) contenían una cantidad muy abundante de células filamentosas que reaccionaban positivamente con la sonda.

Dichos flóculos fueron colectados en buffer fosfato y sometidos a tratamiento por ultrasonido (sonicado) para dispersarlos. Luego de preparar diluciones seriadas en medio líquido (según Sekiguchi *et al.*, 2000, suplementado con 0,01% de extracto de levadura) fueron sembrados y cultivados anaeróticamente a la temperatura de 55 °C o 37 °C según la procedencia de cada lodo.

Para prevenir la acumulación de H₂, agregaron a los cultivos microorganismos metanogénicos hidrogenotróficos, *M. hungatei* para las condiciones mesofílicas y *M. thermoautotrophicus* para las termofílicas.

El resultado de los enriquecimientos fueron los siguientes:

- de los enriquecimientos provenientes de las diluciones mayores de uno de los reactores termófilos, obtuvieron al cabo de 1 o 2 semanas de incubación, el crecimiento de agregados de *M. thermoautotrophicus* y filamentos del filo (que hibridaban con la sonda GNSB941).
- dos de los enriquecimientos provenientes de los lodos mesófilos a las diluciones mayores, dieron a su vez agregados de filamentos del filo y *M. hungatei*.
- de los enriquecimientos provenientes de las diluciones menores, se obtuvieron microorganismos irrelevantes a los 1 o 2 días de inoculación.

Los tres enriquecimientos exitosos fueron entonces purificados, transfiriéndolos sucesivamente a medio fresco, cultivados en un medio con sacarosa y extracto de levadura, suplementado con sulfonato de 2-bromoetano (con una concentración final de 5 mM) para eliminar los microorganismos metanogénicos. Finalmente se realizó el aislamiento por la técnica de “roll tube”, en el mismo medio anterior.

De los enriquecimientos termófilos se obtuvo luego de 2 semanas de incubación, pequeñas colonias de 0,1 a 0,2 mm de diámetro. El mismo tipo de colonias fueron obtenidas de los mesófilos tras 1 mes de incubación (Yamada *et al.*, 2005).

De estas colonias se aisló una cepa termófila denominada como IMO-1 y dos cepas mesófilas KIBI-1 y YMTK-2. Los análisis fisiológicos, quimiotaxomómicos y genéticos de las tres cepas indicaron claras diferencias entre sí, y entre los demás microorganismos. Con *A. thermophila* (el microorganismo más cercano), presentaron un porcentaje de similitud en las secuencias genéticas de sus genes de ARNr 16S, de 93, 88, y 88 % respectivamente. Mientras que entre ellas, dicho porcentaje era menor de 89 %, lo que justificó su inclusión en al menos tres nuevas especies con la descripción de dos géneros nuevos (Yamada *et al.*, 2005). Las cepas IMO-1, KIBI-1 y YMTK-2 fueron denominadas *Anaerolinea thermolimosa*, *Levilinea saccharolytica*, y *Leptolinea tardivitalis*, respectivamente (Yamada *et al.*, 2006).

Características

Los tres aislamientos estaban constituidos por células filamentosas anaerobias de entre 0,15 y 0,5 μm de ancho y longitud indefinida, sin que se haya observado en ninguna de las condiciones de cultivo, movimiento deslizante, formación de esporas o metabolismo fototrófico (no detectándose ninguna quinona en las tres cepas) (fig. 12). Las tres cepas tienen requerimiento de extracto de levadura para su crecimiento.

El agregado de NaCl con una concentración de 2,5 g/L inhibe ligeramente el crecimiento de las tres cepas. Para KIBI-1^T esta pequeña inhibición se mantiene a una concentración de 30 g/L, mientras que para IMO-1^T e YMTK-2^T una concentración de 15 g/L inhibe completamente el crecimiento (Yamada *et al.*, 2006).

Para *Anaerolinea thermolimos*, el contenido de G+C en el ADN es de 53,3 %, conteniendo fundamentalmente ácidos grasos saturados de cadena lineal (ej. C_{16:0} C_{18:0}) y ácidos grasos de cadena ramificada (ej. anteiso-C_{17:0}). Filogenéticamente pertenece al género *Anaerolinea*, de la familia *Anaerolineaceae*, siendo IMO-1^T la cepa tipo.

Para *Levilinea saccharolytica* el contenido de G+C es de 59,5 %, conteniendo principalmente ácidos grasos de cadena ramificada C_{14:0} e iso-C_{15:0} y C_{16:0} también C_{17:0}. Filogenéticamente pertenece a la familia *Anaerolineaceae* siendo KIBI-1^T la cepa tipo del género *Levilinea*.

El contenido de G+C en el ADN para *Leptolinea tardivitalis* es de 48,2 %, conteniendo principalmente ácidos grasos de cadena ramificada C_{17:0}, C_{16:0} y C_{14:0}. Filogenéticamente pertenece a la familia *Anaerolineaceae* siendo YMTK-2^T la cepa tipo del género *Leptolinea*.

Ninguna de las tres cepas utilizó durante 4 semanas de incubación, en un medio con glucosa y extracto de levadura los siguientes aceptores de electrones: sulfato (20 mM), nitrato (20 mM), sulfito (1 mM), tiosulfato (20 mM), fumarato (20 mM), Fe(III) NTA (5 mM) y azufre elemental (20 mM).

En presencia de extracto de levadura (0,01%), las tres cepas pueden utilizar como sustratos glucosa, fructosa, ribosa, sacarosa, rafinosa, xilosa y triptona a una concentración de 20mM. *Anaerolinea thermolimos* puede utilizar además manosa, galactosa, arabinosa y piruvato, *Levilinea saccharolytica* piruvato, y *Leptolinea tardivitalis* manosa, xilano, pectina y betaína.

Ninguna de las cepas utiliza crotonato, H₂/CO₂ (1 atm) más acetato (10 mM), lactato, glicerol, fumarato, acetato, propionato, butirato, malato succinato, etanol, metanol, 1-propanol, etilenglicol, hidroquinona, (1 mM), benzoato (5 mM) o formato más acetato (10 mM). La cepa IMO-1^T, no utiliza betaína.

Los mayores productos de fermentación en un medio con glucosa (20 mM) y extracto de levadura (0,01 %) son:

- *Anaerolinea thermolimos*: acetato, lactato e hidrógeno, pudiendo estancarse el crecimiento luego de la acumulación de este último (aprox. 10 kPA), por lo que el co-cultivo con metanogénicas hidrogenotróficas estimula el crecimiento, con una

temperatura y pH óptimos de crecimiento de 50 °C y 7,0 respectivamente.

- *Levilinea saccharolytica*: acetato, formato e hidrógeno con pequeñas cantidades de lactato, sin que el co-cultivo con metanogénicas estimule el crecimiento, con una temperatura y pH óptimos de crecimiento de 37 °C y 7,0 respectivamente.
- *Leptolinea tardivitalis*: acetato, lactato, piruvato e hidrógeno con pequeñas cantidades de succinato y formato. Al igual que *Levilinea saccharolytica*, el co-cultivo con metanogénicas no estimula el crecimiento, presentando ambas las mismas condiciones de temperatura y pH óptimos (Yamada *et al.*, 2006).

***Bellilinea caldifistulae* GOMI-1^T y *Longilinea arvoyzae* KOME-1^T**

Estos dos microorganismos fueron aislados de enriquecimientos termofílicos (55 °C para la cepa GOMI-1^T) y mesofílicos (37 °C, para la cepa Kome-1^T) de consorcios metanogénicos degradadores de propionato. Las muestras se obtuvieron de un digestor de lodos termófilo de una depuradora de residuos domésticos y suelos de cáscara de arroz respectivamente (Yamada *et al.*, 2007). Ambos consorcios contenían la bacteria *Pelotomaculum spp.* degradadora de propionato y metanógenos hidrogenotróficos (Imaichi *et al.*, 2006).

Aislamiento

Se detectaron por FISH utilizando la sonda específica del filo GNSB941 junto a otros organismos de diferentes morfologías. Para su aislamiento primero se cultivaron a 55 °C y 37 °C en condiciones anaerobias, en un medio fresco suplementado con sacarosa (20 mM) y extracto de levadura (0,1 %) ya que las especies de *Anaerolineae* son comúnmente anaerobias sacarolíticas y requieren extracto de levadura para su crecimiento (Sekiguchi *et al.*, 2000; Yamada *et al.*, 2005). Con las sucesivas transferencias a dichos medios frescos se obtuvieron cultivos estables constituídos fundamentalmente por filamentos. El aislamiento de las 2 cepas (GOMI-1^T y KOME-1^T) se llevó a cabo por el método del “roll-tube” en un medio sacarosa-extracto de levadura suplementado con agar purificado (20 g/L de agar noble, Difco), incubando a 55 °C y 37 °C respectivamente. Al cabo de un mes de incubación se detectaron colonias incoloras, con forma de lente, de 0,1-0,2 mm de diámetro (Yamada *et al.*, 2007).

Características

***Bellilinea caldifistulae* GOMI-1^T**

Esta cepa presenta morfología de filamento multicelular, crece en condiciones termofílicas, estrictamente anaerobia, no presenta movilidad y da negativo a la tinción de

Gram. No presenta formación de esporas ni crecimiento en condiciones fotosintéticas (no se ha detectado la presencia de ningún tipo de quinona).

Las células poseen largos mayores a 100 μm y 0,2-0,4 μm de ancho, creciendo a temperaturas entre 45 °C y 65 °C (siendo la óptima 55 °C) y pH entre 6,0-7,5 (siendo 7,0 el pH óptimo). Su tiempo de duplicación en condiciones óptimas es de 45 h. El crecimiento se estimula con el co-cultivo con bacterias metanogénicas hidrogenotróficas (reduciéndose el tiempo de duplicación a 29 h cuando se co-cultivó con *Methanothermobacter thermautotrophicus* DSM 1053^T). La cepa requiere para su crecimiento de pequeñas cantidades de extracto de levadura (0,01 %), pudiendo utilizar en su presencia los siguientes sustratos: ribosa, arabinosa, fructosa, glucosa, galactosa, manosa, sacarosa, rafinosa y pectina. Presenta un crecimiento lento con; Casamino ácidos, triptona, peptona, xilosa y xilano y en las condiciones de cultivo no presentó crecimiento en presencia de los sustratos: crotonato, H₂/CO₂ mas acetato, betaína, lactato, glicerol, fumarato, acetato, propionato, butirato, malato, succinato, etanol, metanol, 1-propanol, almidón, etilenglicol, hidroquinona, fenol, benzoato de metilo y formiato de etilo.

No se evidencia la utilización como aceptores de electrones de los siguientes compuestos: sulfato, sulfito, tiosulfato, azufre elemental, nitrato, fumarato ni Fe(III)NTA (complejo de Fe III-ácido nitrilotriacético) (Yamada *et al.*, 2007). Los mayores ácidos grasos de membrana detectados son C_{16:0}, C_{14:0} e iso-C_{15:0}. Presenta un contenido de G+C de 54,7 %. Filogenéticamente GOMI-1^T pertenece a la familia *Anaerolineaceae*, orden *Anaerolineales*, clase *Anaerolineae*, del filo *Chloroflexi*, siendo la especie tipo del género *Bellilinea* (Yamada *et al.*, 2007).

***Longilinea arvoyzae* KOMI-1^T**

La cepa se caracteriza como un microorganismo mesofílico, estrictamente anaerobio multicelular, filamentoso, con células no móviles que dan negativo a la tinción de Gram. No se observa formación de esporas ni crecimiento fotosintético.

Las células miden más de 100 μm de largo, con un ancho entre 0,4-0,6 μm , pudiendo crecer entre 30-40 °C (presentando un crecimiento óptimo a 30 °C), y un pH entre 5,0 y 8,5 siendo el pH óptimo 7,0. El tiempo de duplicación en condiciones óptimas es de 92 h pudiendo reducirse a 38 h con el co-cultivo con *Methanospirillum hungatei* DSM 864^T. Tienen requerimiento de pequeñas cantidades de extracto de levadura para su crecimiento (0,01 %) y en su presencia se observó crecimiento con los siguientes sustratos: xilosa,

rafinosa, sacarosa, xilano, pectina y peptona. Presenta un crecimiento lento con Casamino ácidos y fructosa, no presentando crecimiento con: piruvato, glucosa, ribosa, arabinosa, galactosa, manosa, crotonato, H₂/CO₂ mas acetato, lactato, glicerol, fumarato, acetato, propionato, butirato, malato, succinato, etanol, metanol, 1-propanol, etilenglicol, hidroquinona, fenol, benzoato, formiato más acetato, betaína y almidón.

Ningunos de los siguientes compuestos son utilizados como aceptores de electrones: sulfato, sulfito, tiosulfato, azufre elemental, nitrato, fumarato y Fe (III) (Yamada *et al.*, 2007). El contenido de G+C del ADN es de 57,6 %. Los principales ácidos grasos detectados en la membrana son C_{15:0}, anteiso-C_{15:0} y C_{14:0}. No se detecta la presencia ningún tipo de quinona. Filogenéticamente pertenece a la familia *Anaerolineaceae*, orden *Anaerolineales*, clase *Anaerolineae*, del filo *Chloroflexi*, siendo la especie tipo del género *Longilinea* (Yamada *et al.*, 2007).

***Thermanaerotherix daxensis* GNS-1^T**

La cepa GNS-1^T fue el primer organismo cultivado de la clase *Anaerolineae* aislado de un ambiente termal subterráneo. Posteriormente otra cepa de la misma fuente termal se clasificó dentro de la clase *Caldilineae*. Esto sugiere que los miembros del filo *Chloroflexi* puedan tener una relevancia ecológica en estos ambientes subterráneos (Grégoire *et al.*, 2011a; Grégoire *et al.*, 2011b).

Aislamiento

La muestra fue colectada del manantial de un acuífero termal profundo a 149 m de profundidad (termas de Saint-Christophe, Dax, al suroeste de Francia). La temperatura de la muestra era de 60 °C, pH 7,3 y la conductibilidad de 1458 µS/cm (a 25 °C). El agua del acuífero contenía (en mg/L); 147 de cloruro, 381 de sulfato, 158,3 de carbonato ácido 1,6 de fluoruro, 125 de sodio, 123 de calcio, 31 de magnesio, 26 de potasio, 0,07 de Fe(II), 0,15 de amonio.

El cultivo se realizó a 60 °C en viales previamente gaseados con N₂ (atmósfera libre de O₂), con 500 mL del agua del acuífero con 0,2 g de acetato, 0,5 g de NH₄Cl, 1,8 g de glucosa, 0,05 g de extracto de levadura, 0,04 % (p/v) de una solución estéril de Na₂S.9H₂O.

Se traspararon al mismo medio fresco varias veces antes de lograr su aislamiento. El cultivo fue purificado usando el método de “roll- tube” solidificando el medio con 2.5 % (p/v) de agar Noble. Las colonias que se observaron fueron repicadas en el mismo medio, repitiendo el procedimiento de aislamiento varias veces hasta obtener un cultivo puro.

Los cultivos fueron rutinariamente examinados mediante examen microscópico, clonación y secuenciación de los genes ARNr 16S para comprobar la ausencia de otras bacterias.

Para los cultivos de rutina se utilizó el medio de cultivo descrito en Grégoire *et al.*, 2011b. Luego de un mes de incubación a 60 °C se obtuvieron colonias redondeadas de aproximadamente 1 mm de diámetro, blancuzcas y cremosas. Se aislaron tres cepas filogenéticamente similares (99-100 %), que utilizaron el mismo patrón de azúcares, con el mismo perfil metabólico de fermentación de la glucosa. Las cepas se denominaron GNS-2, GNS-3 y GNS-1^T (Grégoire *et al.*, 2011b).

Caracterización

La cepa GNS-1^T es estrictamente anaerobia, quimiorganótrofa, fermentadora, con morfología de filamentos de más de 100 µm de largo y entre 0,2-0,3 µm de diámetro. La tinción de Gram es negativa, no presenta movilidad ni formación de esporas. Para su crecimiento requiere de extracto de levadura o BioTripsina (0,1 %), y no requiere NaCl. La microscopía electrónica reveló una estructura de pared celular en multicapas (dos capas electro-densas y una transparente) y la presencia de septos.

Presenta un crecimiento óptimo a 65 °C, pH 7,0 y 2 g/L de NaCl. La cepa puede crecer mediante la fermentación de ribosa, glucosa, galactosa, arabinosa, fructosa, manosa, maltosa, sacarosa, xilosa, rafinosa, piruvato y xilano. Los productos finales de la fermentación de la glucosa son: lactato, acetato, CO₂ e H₂. Los principales ácidos grasos detectados son C_{16:0}, C_{18:0}, iso-C_{17:0} y C_{20:0}. El tiempo mínimo de duplicación es de 100 h, a 65 °C, pH 7,2, 1 g/L de NaCl, y 3,6 g/L de glucosa. El contenido de G+C del ADN es de 57,6 %, siendo filogenéticamente su pariente más cercano *Bellilinea caldifistulae* con 92,5 % de similitud en la secuencia del gen del ARNr de 16S. Basándose en las características filogenéticas, genotípicas y fenotípicas de la cepa GNS-1^T, se propuso la creación de una nueva especie *Thermanaerotherix daxensis*, dentro de un nuevo género *Thermanaerotherix*, en la clase *Anaerolineae* del filo *Chloroflexi* (Grégoire *et al.*, 2011b). En la tabla 3 se resumen las características de las cepas descriptas.

2.1.2 Clase *Caldilineae*

Caldilinea aerophila SLT-6-01^T

Este microorganismo fue aislado en Japón de una fuente termal natural con depósitos de azufre (Sekiguchi *et al.*, 2003).

Aislamiento

Parte de la biomasa colectada fue homogeneizada suavemente y usada como inóculo para los enriquecimientos realizados. En la búsqueda de quimiolitótrofos termófilos, realizaron un enriquecimiento aerobio primario con tiosulfato como fuente de energía y HCO_3^- como fuente de carbono, transfiriéndolo sucesivamente durante 6 meses a medio fresco, con lo que obtuvieron una comunidad estable y variada de microorganismos.

Intentaron entonces aislar los microorganismos que utilizaban tiosulfato/ HCO_3^- , inoculando una placa con agar-tiosulfato/ HCO_3^- sin obtener un crecimiento visible, el que sí obtuvieron al inocular dicho enriquecimiento en una placa de agar con medio PE (Hanada *et al.*, 1995b; ANEXO I). A la semana de incubación se obtuvieron colonias entre naranjas y ligeramente rosadas, brillantes e irregulares. De una de estas colonias repicadas se aisló la cepa STL-6O1^T, posteriormente denominada *Caldilinea aerophila* (Sekiguchi *et al.*, 2003).

Características

Presenta morfología de filamento multicelulare, de más de 100 μm de largo, de 0,7-0,8 μm de ancho (fig.11 b). La temperatura y pH óptimos de crecimiento es de 55 °C y 7,5-8,0 respectivamente. En las condiciones estudiadas no se observa la formación de esporas, movimiento deslizante, crecimiento fotosintético ni una estructura de pared tipo vaina. Presenta al microscopio electrónico, tinción y estructura de pared como la de las células Gram negativas. El tiempo de duplicación en condiciones aerobias óptimas (55 °C, pH 7,5) en medio PE líquido es de 5 h. La adición de NaCl a 5 g/L ligeramente inhibe su crecimiento mientras que a 15-20 g/L lo inhibe completamente.

Es un organismo aerobio facultativo, pudiendo crecer en condiciones anaerobias de forma fermentativa sin la producción de H_2 . El extracto de levadura es el mejor sustrato para el crecimiento tanto aerobio como anaerobio y requerido en ambas condiciones en 0,01 % y 0,05 % respectivamente. En medio aerobio utiliza como sustrato glucosa, triptona, sacarosa, maltosa, rafinosa, almidón, glicerol, acetato, piruvato, lactato, succinato, fumarato y glutamato. No utiliza manosa, fructosa, arabinosa, xilosa, ribosa, etanol, malato, alanina, serina y Casamino ácidos. En condiciones anaerobias, crecer en medio

PE así como en el medio con sacarosa utilizado por la cepa UNI-1^T. No se observa la utilización de $S_2O_3^{2-}/HCO_3^-$ como aceptor de electrones y fuente de carbono, concluyendo que en los enriquecimientos primarios realizados debían sobrevivir con algunos de los remanentes de la comunidad microbiana.

No utiliza ninguno de los aceptores de electrones testeados que fueron: sulfato, nitrato, sulfito, tiosulfato, fumarato (todos a 20 mM), Fe(III)-NTA (a 5 mM), ni PCE, y TCE a 100 μ M.

Presenta un contenido de G+C de 59,0 %. Los principales ácidos grasos detectados son C_{18:0}, C_{16:0}, C_{17:0} e iso-C_{17:0}, no detectándose ácidos grasos insaturados. En condiciones aerobias presenta MK-10 como la quinona mayoritaria (Sekiguchi *et al.*, 2003).

***Caldilinea tarbellica* D1-25-104^T**

Aislamiento

Se partió de una muestra de un acuífero de origen meteórico (es decir con agua provenientes de precipitaciones, lluvia o nieve) con temperaturas por arriba de 68 °C. Las muestras fueron tomadas en condiciones anaerobias, del manantial de la fuente termal de Saint-Christophe, a 149 m de profundidad. El agua contenía 147 mg/L de cloruro, 381 mg/L de sulfato, 158,3 mg/L de bicarbonato, 1,6 mg/L de fluoruro, 125 mg/L de sodio, 123 mg/L de calcio, 31 mg/L magnesio, 26 mg/L de potasio, 0,07 mg/L Fe(II) y 0,15 mg/L de amonio. El enriquecimiento fue realizado en tubos Hungate conteniendo 500 mL de agua del acuífero, 5 mM acetato, 1 g/L NH₄Cl, 20 mM glucosa, 0,1 g/L extracto de levadura y 0,04 % (m/v) Na₂S.9H₂O (agregados de soluciones stock estériles) a 60 °C con una fase gaseosa de N₂ y libre de oxígeno.

Se obtuvo un crecimiento positivo luego de 6 meses de incubación a 60 °C. Se realizaron enriquecimientos sucesivos en tubos Hungate conteniendo 450 mL de agua del acuífero bajo las mismas condiciones. Los cultivos fueron purificados por el método de “roll tube” en medio suplementado con 2,5 % de agar. Luego de 2 meses de incubación se obtuvieron colonias blancas redondeadas, de aproximadamente 1mm de diámetro. Las colonias aisladas se subcultivaron por el método de diluciones seriadas hasta obtener cultivos puro. Se aislaron varias cepas filamentosas similares en la filogenia, morfología y el perfil metabólico a partir de la fermentación de glucosa. Las características morfológicas y la pureza se analizaron con microscopio de contraste de fases. Las posteriores caracterizaciones se realizaron sobre la cepa, D1-25-10-4^T (Grégoire *et al.*, 2011a).

Características

La cepa D1-25-10-4^T presenta morfología filamentosa (0,45 µm por menos de 100 µm de largo), crecimiento anaerobio (tolerando hasta un 1,5 % de oxígeno en la fase gaseosa) y termófilo. Sus células no presentan movilidad y dan negativo a la tinción de Gram. Se observa crecimiento entre 43-65 °C, a pH entre 6,8-7,8 y una concentración de NaCl entre 0-5 g/L. Las condiciones óptimas de crecimiento son a 55 °C y 7,0 de pH no presentando requerimiento de NaCl. La cepa quimiorganotrofa es capaz de fermentar: ribosa, maltosa, glucosa, galactosa, arabinosa, fructosa, manosa, sacarosa, rafinosa, xilosa, glicerol, fumarato, peptona, almidón y xilano. No utiliza lactato, acetato, malato, succinato, piruvato, formiato, etanol, Casamino ácidos o H₂. La glucosa es fermentada a succinato, lactato, acetato, CO₂ y trazas de H₂. Presenta requerimientos de extracto de levadura para su crecimiento y no se detecta la utilización de sulfato, tiosulfato, sulfito, azufre elemental, nitrato, nitrito y fumarato como aceptores finales de electrones.

Los principales ácidos grasos de membrana detectados son C_{17:0}, C_{18:0}, C_{16:0} e iso-C_{17:0}. Presenta un contenido de G+C de 61,9 %. Filogenéticamente, la cepa más cercana es *Caldilinea aerophila* (STL-6-O1^T) con un 97,9 % de similitud entre los genes ARNr 16S. En base a las características filogenéticas, genotípicas y fenotípicas, la cepa D1-25-10-4^T constituye una nueva especie del filo *Chloroflexi*, dentro de la clase *Caldilineae*, del género *Caldilinea*, para la cual se propuso el nombre de *Caldilinea tarbellica* sp. nov. (Grégoire *et al.*, 2011a).

***Litorilinea aerophila* PRI-4131^T**

Aislamiento

La cepa PRI-4131^T se aisló durante la búsqueda de cepas bacterianas que degradaran fucosa-condroitín sulfato ramificada. Se preparó un soporte artificial para la colonización, encerrando cartílago de pepino de mar fresco (una gran fuente del polisacárido sulfato de condroitina) dentro de un saco de lana y una malla de alambre. Este soporte fue colocado en una fuente termal inter-mareales o interdial (franja costera donde se produce la interface agua-tierra y que está sometida a los efectos de las mareas) en la costa de la península de Reykjanes en Isafjardardjup, Noroeste de Islandia. La fuente termal contenía agua dulce mezclada con agua de mar (alrededor de 0,6 % de NaCl), que estaba sujeta a las fluctuaciones en los factores ambientales debidos a las mareas, como salinidad y temperaturas entre otros. El soporte se sujetó en la orilla entre las piedras, donde el líquido emanaba a unos 72 °C y se dejó en el lugar durante 5 semanas.

En el laboratorio el saco se sumergió en una solución al 0,9 % de NaCl con agitación durante 4 h. El agua de lavado fue utilizada para inocular el medio líquido 166 (Hjorleifsdottir *et al.*, 2001) con 1 % de NaCl (m/v). El cultivo se incubó con agitación a 50 °C durante cuatro semanas. Al mirar el cultivo al microscopio, detectaron la presencia de filamentos largos y delgados. Se sembró entonces en placa de agar con el mismo medio, repicando colonias aisladas sucesivamente, hasta confirmar su pureza al examen microscópico. Los esfuerzos de muestreo dieron como resultado el aislamiento de un centenar de cepas y la secuenciación genética de los genes del ARNr 16S reveló que la cepa PRI-4131^T era la única representante del filo *Chloroflexi* (Kale *et al.*, 2013).

Caracterización

Son células filamentosas, termófilas, que crecen aeróbica y quimiorganotróficamente con varios carbohidratos. Son oxidasa y catalasa positivas, dando negativas a la coloración de Gram. En los estudios realizados no se observó movilidad ni formación de esporas. Los filamentos presentan entre 0,45-0,55 µm de ancho y más de 100 µm de largo. Después de 4 días de incubación en placas R2A, forman colonias circulares, opacas y planas de color amarillo pálido.

Muestran crecimiento en un rango de temperatura entre 40-62 °C (óptima a 55 °C), un rango de pH entre 6,5-9,0 (óptimo 7,0) y un rango de concentración de NaCl de 0-3 % (m/v) (óptimo a 0,5 %).

La cepa no presenta crecimiento fermentativo ni requerimiento de extracto de levadura para su crecimiento, y puede crecer utilizando: glucosa, sacarosa, fructosa, galactosa, maltosa, manosa, rafinosa, arabinosa, fucosa, ribosa, xilosa, manitol, almidón, peptona, triptona, y extracto de levadura. No utiliza para su crecimiento: lactato, succinato, piruvato, glutamina, serina, alanina, casamino ácidos, glicerol, etanol, alginato y xilano. Los ácidos grasos mayoritarios son ácidos 3-hidroxi y 10-metilados (C_{15:0}3-OH, 10-metilC_{16:0}). El contenido de G+C del ADN es de 64,7 % siendo la Mk-10 la quinona mayoritaria.

La ausencia de crecimiento fermentativo y de requerimientos de extracto de levadura distingue a este organismo de las otras bacterias de la clase *Caldilineae*, con las que también se diferencia en la utilización de azúcares, % de G+C y la composición de los ácidos grasos. Sin embargo, a pesar de provenir de un ambiente salino no difiere significativamente de las demás especies de *Caldilinea* respecto a la concentración óptima de NaCl requerida para su crecimiento.

Los análisis fenotípicos y filogenéticos basados en la secuencias de los genes ARNr 16S, revelaron que se trataba de una nueva especie de la clase *Caldilineae* dentro de un nuevo género, el género *Litorilinea*. (Kale *et al*, 2013).

En la tabla 4 se resumen algunas de las características de las cepas tipo de la clase *Caldilineae*.

Características	<i>Caldilinea aerophila</i> (1) SLT-6-O1 ^T	<i>Caldilinea tarbellica</i> (2) D1-25-10-4 ^T	<i>Litorilinea aerophila</i> (3) PRI-431 ^T
Diámetro cel. (µm)	0,7-0,8	0,45	0,45-0,55
Rango de Temp. (°C)	37-65	43-65	40-65
Temp. Óptima de crecim. (°C)	55	55	40-65 (55)
Rango de pH (pH óptimo)	7,0-9,0 (7,5-8,0)	6,8-7,8 (7,0)	6,5-9,0 (7,0)
Tiempo de duplicación (h)	5	21	5
Ácidos grasos mayoritarios	C _{18:0} , C _{16:0} , C _{17:0}	C _{17:0} , C _{18:0} , C _{16:0} , iso-C _{17:0}	C _{15:0} 3-OH, 10-metil-C _{16:0}
Contenido G+C DNA (mol%)	59	61,9	64,7
Utilizan los sig. sustratos en presencia (si) o ausencia (no) de extrac. de levadura			
	(si)	(si)	(no)
Triptona	+	ND	+
Piruvato	+	-	-
Glucosa	+	+	+
Manosa	-	+	+
Galactosa	ND	+	+
Fructosa	-	+	+
Arabinosa	-	+	+
Xilosa	-	±	+
Ribosa	-	+	+
Pectina	ND	ND	ND
Almidón	+	±	+
Metabolismo	F/O	F	O
Fuente de aislamiento	Fuente termal	Acuífero termal	Fuente termal intermareal

Tabla 4. Características diferenciales entre las especies cultivables de la clase *Caldilineae*. Todas las cepas muestran características de filamentos multicelulares y crecimiento termofílicos. F fermentativo; O respiración con O₂. - negativo; ± variable; + positivo; ND no determinado. Referencias, (1) Yamada *et al.*, 2007 (2) Grégoire *et al.*, 2011, (3) Kale *et al.*, 2013. Basado en Yamada and Sekiguchi, 2009; Grégoire *et al.*, 2011, y Kale *et al.*, 2013.

2.2 SUBFILO II Organismos Dehalorespiradores

En este subfillo se encuentran microorganismos degradadores de compuestos clorados que probablemente participen de los procesos de descontaminación naturales en la naturaleza. Los compuestos clorados como tetracloroeteno (PCE), tricloroeteno (TCE), cloruro de vinilo (VC), tetracloroetano (TeCE), y bifenilos policlorados (PCBs), son comúnmente usados como solventes orgánicos desengrasantes y en la producción de plásticos (cloruro de polivinilo, PVC). Están ampliamente distribuidos en el medio ambiente, como resultado de la actividad humana, del mal almacenamiento o manejo de estos compuestos, así como de los procesos bióticos y abióticos de degradación en la naturaleza de los PCE, TCE y PCBs (fig. 14).

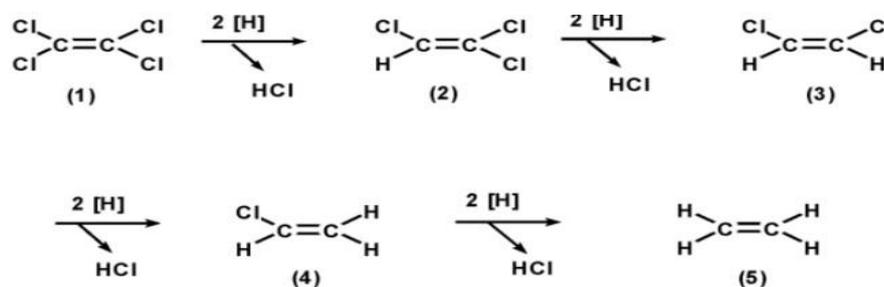


Figure 8. Anaerobic reductive dechlorination of tetrachloroethene (1) to ethene (5). (2) Trichloroethene; (3) *cis*-dichloroethene; (4) vinyl chloride.

Fig. 14 Dehalogenación reductiva de tetracloroeteno a eteno. (1) PCE tetracloroeteno; (2) TCE tricloroeteno; (3) DCEs isómeros del dicloroeteno; (4) VC cloruro de vinilo; (5) eteno. Tomado de Maymó-Gatell *et al.*, 1997.

Debido a su bajo potencial de degradación en condiciones aerobias, se acumulan en las aguas profundas y son encontrados como contaminantes en muchos sedimentos y acuíferos subterráneos. Esta acumulación en altas concentraciones en los acuíferos, es de gran importancia para la salud pública, debido a su posible acción como agentes tóxicos y/o cancerígenos. En particular, es de especial interés la acumulación de cloruro de vinilo (VC), ya que es un agente cancerígeno probado, así como causante de desórdenes nerviosos y reacciones inmunes (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaq.html>) (Duhamet *et al.*, 2004).

Las técnicas convencionales han demostrado ser costosas e inefectivas para el tratamiento de las aguas contaminadas (Löffler *et al.*, 2000; Beeman *et al.*, 1994). Las técnicas de bioremediación transforman los compuestos clorados tóxicos en productos inocuos para la

salud, utilizando el potencial de ciertos microorganismos de llevar a cabo la deshalogenación (Hendrickson *et al.*, 2002).

Se ha determinado que en los sitios contaminados con cloroetenos los microorganismos agrupados dentro del género *Dehalococcoides*, están estrechamente asociados con los procesos de decloración total (es decir con la producción de eteno), donde probablemente jueguen un importante rol en los procesos naturales de descontaminación. Estos organismos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, en diferentes localidades geográficas y condiciones atmosféricas (Aulenta *et al.*, 2005) y obtienen su energía por un mecanismo conocido como **dehalorespiración**. En este proceso los cloroetenos funcionan como aceptores de electrones, que son cedidos por un donador, como por ejemplo el H₂, lactato, butirato, etc. (Maymó-Gatell *et al.*, 1997). Son organismos de crecimiento lento, estrictamente anaerobios, que requieren condiciones anóxicas y reductoras para crecer. Una característica de las poblaciones de *Dehalococcoides* es que la decloración puede ocurrir en presencia de ampicilina, en un proceso estrictamente dependiente de H₂ como donador de electrones (He *et al.*, 2003b; Löffler *et al.*, 2013).

Existen varios artículos que estudiaron la biorremediación *in situ*, de aguas contaminadas con hidrocarburos clorados alifáticos y aromáticos (Fennell *et al.*, 2004; Lendvay *et al.*, 2003; Major *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2002a y b; Cutter *et al.*, 2001). Aulenta., *et al.*, (2005). Se valoró la biorremediación natural y la bioaumentación *in situ* (adición de un inóculo de un microorganismo que no se encuentra naturalmente en el sitio) de un acuífero contaminado con solventes clorados como tetracloroetano (PCE), tricloroetano (TCE), tetracloroetanos (TeCE). Concluyeron que existía la posibilidad de aumentar la decloración total en los sitios de contaminación, suministrando los donadores de electrones adecuados (bioestimulación), ya que todos los microcosmos estudiados indicaron la presencia de poblaciones decloradoras nativas. Estas poblaciones permitieron una decloración muy lenta con acumulación de TCE, que se veía favorecida con la adición de factores de crecimiento como extracto de levadura y vitamina B₁₂ y que fue altamente estimulada por la adición de un inóculo de *Dehalococcoides spp.* (bioaumentación o bioestimulación si ya se encontraba en el medio).

Debido a que las distintas poblaciones de *Dehalococcoides* tienen diferentes sustratos aceptores de electrones, los procesos de decloración reductivos son más eficientes si son llevados a cabo por más de una cepa, evitando la acumulación de intermediarios. Así, tanto los requerimientos nutricionales de las poblaciones de *Dehalococcoides*, como los

diferentes sustratos clorados, hacen que los co-cultivos entre *Dehalococcoides* y otras especies sean un medio más eficiente para la biorremediación de sitios contaminados (Grostern and Edwards, 2006; Fagervold *et al.*, 2005; He *et al.* 2003a y 2003b). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que para algunas cepas el tener la capacidad de declorar ciertos compuestos no siempre implica la capacidad de crecer a expensas de ese compuesto (Löffler *et al.*, 2013).

La capacidad de crecer con la reducción declorativa de PCBs se reportó sólo en algunas de las cepas estudiadas: DF-1 (“*Dehalobium chlorocoercia*”), *o*-17, *Dehalococcoides ethenogenes* 195, y CBDB1 (Fennell *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2002a; Cutter *et al.*, 2001; Watts *et al.*, 2001; Adrian *et al.*, 2000; Pulliam *et al.*, 1998).

Los análisis filogenéticos muestran que el porcentaje de similitud de las secuencias del gen ARNr de 16S entre las cepas del grupo *o*-17/DF-1 (que decloran PCBs) y las demás cepas *Dehalococcoides* es menor a 90 %. Mientras que el resto de las cepas forman un grupo monofiletico dentro del filo *Chloroflexi*, siendo los porcentajes de similitud entre ellas mayor a 98 % (Fagervold *et al.*, 2005) (fig. 15).

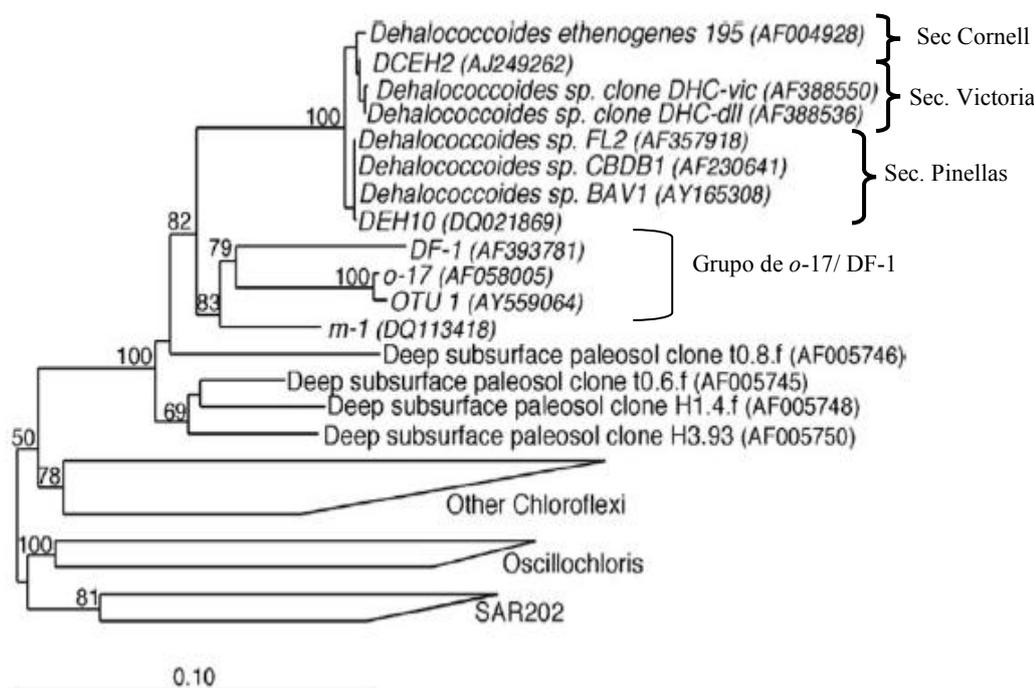


Fig. 15 Análisis filogenético de los genes ARNr 16S de organismos descritos como decloradores del filo *Chloroflexi*. El árbol se realizó por Neighbor Joining basado en secuencias publicadas en 998 posiciones (entre la posición 44 y 1232 de *E. coli*). *Bacillus subtilis* (AB016721) fue utilizado como outgroup. Los bootstrap fueron realizados con el software PHYLIP, los valores mayores a 50 % se indican en los nodos. Barra 10 sustituciones por 100 nucleótidos. Los microorganismos que son decloradores confirmados están con letra itálica. Modificada de Fagervold *et al.*(2005), para mostrar los grupos de secuencias Cornell, Victoria y Pinellas descritas por Hendrickson *et al.*, 2002.

Hendrickson *et al.* (2002), estudiando dos cultivos que decloraban el PCE a eteno (pero no PCBs), encontraron que el gen del ARNr 16S de los *Dehalococcoides* contiene una secuencia única o característica en la región V9, que incluye 8 regiones hipervariables. Con esta información, diseñaron juegos de **primers** para PCR, con los que obtuvieron productos amplificados entre 266 y 1377 pb (tabla 2a).

Por otro lado en el 2005, Fagervold *et al.*, diseñaron un set de primers (Chl348F y Dehal884R) que amplificaban los genes de ARNr 16S tanto de las poblaciones que decloraban cloroetenos como PCBs. Estos primers no amplificaban los genes de ARNr 16S de *C. aurantiacus* ni de ninguna de las especies analizadas que no pertenecían al filo *Chloroflexi*, donde se tuvieron en cuenta microorganismos de los filo *Bacteria* y *Archaea* (Tabla 2a). Por estudios de alineamiento de las secuencias de los genes del ARNr 16S de *Dehalococcoides*, Hendrickson *et al.* (2002) encontraron sustituciones de bases únicas consistentes, en posiciones específicas de las regiones variables 2 y 6, que les permitieron concluir que podrían tratarse de **secuencias de identidad**.

Con las relaciones filogenéticas basadas en dichas sustituciones observaron la formación de tres ramas dentro del árbol filogenético de los *Dehalococcoides*, y definieron tres subgrupos de secuencias que llamaron: “Pinellas”, “Victoria” y “Cornell” (fig. 15). El subgrupo “Cornell” incluía las cepas 195 y MB (Cheng and He, 2009), el subgrupo “Victoria” incluía la cepa VS mientras que el subgrupo “Pinellas” comprendía las cepas CBDB1 y FL2, así como la mayoría las cepas *Dehalococcoides* identificados en cultivos mixtos y la mayoría de las secuencias de los clones ambientales (Löffler *et al.*, 2013). Los miembros del subgrupo “Pinellas” presentan entre sí en los genes del A Nr 1 S una secuencia idéntica o altamente similar, con 1 a 3 nt de diferencia, mientras que con los miembros de los subgrupos “Victoria” y “Cornell” presentan una diferencia de 14 a 1 nt y 23 a 24 nt respectivamente (Löffler *et al.*, 2013).

Debido a la muy alta similitud que exhibían las secuencias de los genes ARNr 16S, para poder distinguir estas cepas, era insuficiente enfocar el análisis exclusivamente en estos genes, además por ejemplo dentro del subgrupo Pinellas, se encontraban agrupadas cepas que degradaban diferentes sustratos. El enfocar el análisis en otra áreas del genoma como los genes de las dehalogenasas reductivas (RDasa), podría ofrecer una mayor resolución como marcadores filogenéticos o funcionales (Sung *et al.*, 2006; Cupples *et al.*, 2004; Duhamel *et al.*, 2004; He *et al.*, 2003a).

De dichas RDAsas han sido identificadas algunas secuencias como; *tceA* que codifica para la TCE-RDasa de la cepa 195 y FL2 (Magnuson *et al.*, 2000), *verA* que codifica para la (DCEs-VC)-RDasa de la cepa VS (Müller *et al.*, 2004, Löffler *et al.*, 2013), *bvcA* que codifica para la (DCEs-VC)-RDasa de la cepa BAV1 (Krajmalnik-Brown *et al.*, 2004, Löffler *et al.*, 2013), *pceA* que codifica para la PCE-RDasa en la cepa 195 (Magnuson *et al.*, 1998) y *cbrA* que codifica para la clorobenceno dehalogenasa reductiva de la cepa CBDB1 (Adrian *et al.*, 2000) (tabla 5).

Los miembros del grupo “*Dehalococcoides*” recién fueron formalmente definidos taxonómicamente por Löffler *et al.* en el 2013. En base a estudios comparativos de las secuencias genéticas de los genes del ARNr 16S, a los porcentajes de identidad nucleotídicas de todo el genoma y a las características fenotípicas, propusieron y definieron la creación de la clase *Dehalococcoidia* (dentro del filo *Chloroflexi*), el orden *Dehalococcoidales*, la familia *Dehalococcoidaceae*, que abarca a los géneros *Dehalococcoides*, *Dehalogenimonas* y en un rama separada, la informalmente definida cepa '*Dehalobium chlorocoercia*' DF-1 (Wu *et al.*, 2002b).

El género *Dehalococcoides* contiene a la especie *Dehalococcoides mccartyi*. Dentro de dicha especie agruparon las cepas CBDB1, BAV1, VS, GT, FL2, y 195^T, definiendo a esta última como la cepa tipo. También plantearon la posible inclusión de las cepas MB (Cheng and He, 2009), ANAS1 y ANAS2 (Lee *et al.*, 2011) a la especie *D. mccartyi* a pesar de solo tener las secuencias parciales de las mismas, porque los análisis por “microarray” así lo indicaban.

El género *Dehalogenimonas*, está representado por *Dehalogenimonas lykanthroporepellens* (Moen *et al.*, 2009) y *Dehalogenimonas alkenigignens* (Bowman *et al.*, 2013).

2.2.1 Genero *Dehalococcoides*

Dehalococcoides mccartyi 195^T

Las cepas aisladas de esta especie son estrictamente anaerobias y presentan un rango catabólico altamente restringido. Utilizan solamente ciertos compuestos clorados y bromados como aceptores de electrones en la cadena respiratoria, requiriendo estrictamente de H₂ como donador de electrones. No se identificaron otros pares redox donador/aceptor de electrones de sostuvieran el crecimiento. No se detectó la presencia de citocromo y utilizan acetato como fuente de carbono (Löffler *et al.*, 2013). En el análisis comparativo del genoma de las cepas 195^T, CBDB1, BAV1, GT y VS no se identificaron otras vías respiratorias o fermentativas de conservación de la energía, corroborando así los resultados de la estudios fisiológicos, que mostraban a los miembros de este grupo bacteriano como bacterias estrictamente respiradoras de compuestos orgánicos halogenados (Kube *et al.*, 2005, Seshadri *et al.*, 2005, McMurdie *et al.*, 2009). El análisis por microscopía de contraste de fases de las suspensiones celulares reveló que las células eran pequeñas y visibles solamente durante breves momentos debido a su morfología en forma de disco con un espesor de menos de 0,2 µm, que es el límite de resolución del microscopio óptico.

Por microscopía de escaneo electrónico y transmisión se confirmó que las células son redondeadas, con forma de disco, de no más de 1 µm de ancho y 0,1-0,2 µm de espesor, con muescas bicóncavas características sobre los lados planos opuestos de la célula. También se puso de manifiesto unos “apéndices” filamentosos características e inusuales de la superficie celular. Su función es poco clara, pero podrían desempeñar un papel en la adhesión de las células entre sí o a las superficies que se ha observado en estudios de laboratorio y de campo (Löffler *et al.*, 2013).

Todas las cepas son mesofílicas, indiferentes a la tinción de Gram y no presentan peptidoglicano en la paredes celulares por lo que son resistentes a los antibióticos que interfieren con la síntesis de éste (por ej. ampicilina).

Se observan procesos declorativos con temperaturas de incubación entre 15-35 °C, perdiéndose la actividad a 4 y 40 °C. Esta actividad se recupera tras el almacenamiento a temperatura ambiente o superiores a 4 °C e incubando en condiciones óptimas, luego de un tiempo de latencia de entre 2-6 semanas (dependiendo del medio reductor utilizado y de la edad del inóculo). Tanto la viabilidad como la actividad declorativa se pierden al incubar a 45 °C (Löffler *et al.*, 2013).

La exposición al oxígeno inhibe irreversiblemente la dechloración, el crecimiento y la viabilidad, siendo necesarias técnicas estrictamente anóxicas para las manipulaciones de los cultivos (Amos *et al.*, 2008). A su vez el potencial redox del medio también afecta a la dechloración y la viabilidad. El éxito en la obtención de un cultivo requiere de la adición de agentes reductores (Löffler *et al.*, 2013).

Cepa *D. ethenogenes* 195

Esta cepa fue aislada de un enriquecimiento que dechloraba PCE a eteno con H₂ como donador de electrones (Maymó-Gatell *et al.*, 1997) siendo posteriormente designada por Löffler *et al.*, (2013) como la cepa tipo de la especie *Dehalococcoides mccartyi*. El medio de aislamiento contenía H₂ y PCE suplementado con una mezcla que incluía acetato (2 mM), vitamina B12 (0,05 mg/L) y el sobrenadante filtrado del lodo de un digester anaerobio (25 % v/v).

Al microscopio electrónico se observa una bacteria pequeña de forma cocoide aplanada e irregular, con una inusual ultraestructura de pared que recuerda a la capa S de las *archaea*, no reacciona con las lectinas peptidoglicano específicas, siendo resistente a la ampicilina y vancomicina. Sus requerimientos nutricionales no son muy conocidos, requiriendo un medio de composición indefinida para crecer y mantenerse.

Tiene la capacidad de dechlorar completamente el PCE, TCE, *cis*-DCE y 1,1-DCE a eteno, y de degradar lenta y co-metabólicamente el VC a eteno durante la degradación de altas concentraciones de etenos clorados, aunque este último proceso no sostenga el crecimiento de la célula (Maymó-Gatell *et al.*, 1997, 1999). Se reportó además su capacidad de dechlorar clorobenzenos (PCBs) como 2,3,4,5,6-pentaclorobifenil y otros compuestos aromáticos. La proporción de estas dehalogenaciones tanto de compuestos alifáticos como aromáticos es más eficiente en cultivos mixtos que en cultivos puros (Fennel *et al.*, 2004, Adrian, *et al.*, 2007).

Su genoma se secuenció completamente encontrándose más de 17 genes que codifican para posibles dehalogenasas y una sola copia del gen ARNr 16S (Löffler *et al.*, 2013, Seshadri *et al.*, 2005; Villemur *et al.*, 2002). Una de estas dehalogenasas que fue aislada y caracterizada es codificada por el gen *tceA*, siendo la responsable de la dehalogenación de TCE, DCE y VC, mientras que la dehalogenasa *pceA* es responsable de la dehalogenación del PCE (Magnuson *et al.*, 2000 y 1998, Löffler *et al.*, 2013) (tabla 5).

Cepa CBDB1

Fue obtenida de un microcosmos estabilizado de sedimentos del lago Saa de Alemania con la capacidad de declorar tetraclorobenzenos (TeCB) y triclorobenzenos (TCB) a tri y diclorobenzenos (DCB) (Adrian *et al.*, 2000).

Se obtuvo en un medio de sales minerales sintético, con acetato, clorobenceno, vitaminas y citrato de titanio (III) como agente reductor (Adrian *et al.*, 2000).

Presenta un porcentaje de similitud en su secuencia del gen ARNr 16S con *D. ethenogenes* 195 de 98 %, agrupándose dentro del subgrupo Pinellas (Hendrickson *et al.*, 2002). Dicha secuencia se diferencia de la secuencia del gen de ARNr de 16S de FL2 por una sustitución de bases (A/G) en la posición 148 respecto a *E. coli* (He, *et al.*, 2005).

La cepa utiliza como sustratos clorobenzenos, dibenzo p-dioxinas policloradas (PCDDs), PCBs, pudiendo co-metabilizar PCE y TCE, declorandolos fundamentalmente a *trans*-DCB y en menor medida a *cis*-DCB, (Adrian *et al.*, 2000). Se ha reportado su capacidad de declorar otros compuestos aromáticos como hexaclorobenceno (HCB) y pentaclorobenceno (QCB), aunque no se ha confirmado su capacidad de crecer con dichos sustratos (Bunge *et al.*, 2003, Hölscher *et al.*, 2003).

Cepa FL2

Fue aislada de un cultivo mixto a partir de un microcosmos inoculado con sedimentos de un río (Red Cedar River, Okemos, USA), altamente enriquecido en la capacidad de declorar PCE a eteno. Tiene la particularidad de ser la única cepa caracterizada que provino de sedimentos de un río que no presentaba contaminación con solventes clorados (He *et al.*, 2005).

Para aislarla se utilizó un medio mineral, suplementado con TCE, acetato e hidrógeno, por el método de las diluciones sucesivas. Previamente el procedimiento incluyó la adición de 2-bromo-etanosulfonato (1-2 % v/v) para la inhibición de las bacterias metanogénicas (He *et al.*, 2005).

Es un microorganismo estrictamente anaerobio, con forma de disco, capaz de crecer con TCE, *cis*-DCE o *trans*-DCE como aceptores de electrones, acetato como fuente de carbono e H₂ como donador de electrones en un medio definido y completamente sintético, siendo los mayores productos finales VC y eteno (He *et al.*, 2005).

La cepa puede degradar PCE y VC a eteno lenta y co-metabólicamente, durante la degradación de altas concentraciones de etenos clorados. La decloración cesa luego de la adición de sulfuro (0,5 mM), mientras que el sulfato (10 mM) y el nitrato (5 mM) no

tienen efectos inhibitorios (Löffler *et al.*, 2000; He *et al.*, 2005). Tampoco se observó inhibición por nitrato o sulfato en estudios *in situ* de bioremediación con especies relacionadas con *Dehalococcoides* en un acuífero contaminado en Italia (Aulenta *et al.*, 2005).

Filogenéticamente pertenece al subgrupo Pinellas con el que presenta más de 99 % de similitud en la secuencia del gen ARNr 16S (He *et al.*, 2005).

Cepa BAV1

Esta cepa puede obtener toda la energía requerida para el crecimiento de la dechloración del VC a eteno, por lo que es capaz de transformar este compuesto cancerígeno en eteno y cloruro inorgánico (He *et al.*, 2003a, 2003b).

Fue aislada a partir de un microcosmos que presentó la capacidad de dechlorar el PCE a eteno. Utilizaron el método de las diluciones sucesivas en un medio mineral (He *et al.*, 2003b) suplementado con VC (0,47-1033 mM), H₂ (8,5-17 kPa) y acetato (5 mM). El cultivo también presentó crecimiento con lactato y piruvato, pero estos compuestos no fueron utilizados como donadores directos de electrones, sino que primero sufrieron una rápida fermentación con producción de H₂ que fue posteriormente utilizado como donador de electrones (el piruvato y lactato fueron completamente consumidos, detectándose cantidades sustanciales de H₂ antes que comenzara la dechloración reductiva del VC) (He *et al.*, 2003a).

El crecimiento depende estrictamente de la dechloración reductiva y de la presencia de H₂ como donador de electrones que no pudo ser reemplazado por ninguno de los otros sustratos orgánicos utilizados (formiato, acetato, lactato, piruvato, propionato, glucosa, etanol, y extracto de levadura). Utiliza como aceptores de electrones (siendo el eteno el producto final), todos los isómeros DCE (*cis*-DCE, *trans*-DCE, 1,1-DCE, 1,2-DCE) y bromuro de vinilo, mientras que el crecimiento en PCE y TCE se da solo co-metabólicamente durante la dechloración de cloroetenos. No utiliza nitrato, fumarato, ión férrico, sulfito, sulfato, tiosulfato, sulfuro u oxígeno. No se observa crecimiento fermentativo y al igual que *D. ethenogenes* 195 puede crecer en presencia de ampicilina (He *et al.*, 2003b).

Es un microorganismo estrictamente anaerobio, no móvil, pequeño, de no más de 0,8 µm de diámetro. Al microscopio electrónico se observa con forma de disco y con peculiares apéndices filamentosos en la superficie de las células, formando en medio semisólido

diminutas colonias opacas. Los análisis filogenéticos ubican la secuencia del ARNr 16S dentro del grupo Pinellas.

Cepa GT

Fue aislada a partir de un acuífero contaminado con cloroetenos en un medio mineral suplementado con lactato y TCE. Se mantuvo en un medio mineral suplementado con acetato (5 mM), H₂-CO₂ (80/20 % vol/vol) y TCE (0,32mM) (Sung *et al.*, 2006). Al igual que las demás cepas de *Dehalococcoides* también es resistente a la ampicilina y tiene un metabolismo altamente restrictivo, requiriendo para su crecimiento de acetato como fuente de carbono, H₂ como donador de electrones y cloroetenos (TCE, cDEC, 1,1-DCE o VC) como aceptores de electrones. Puede obtener la energía para su crecimiento de cada paso de la dehalogenación de TCE a eteno, lo que lleva a que exista muy poca acumulación de VC.

Se obtuvo de un cultivo que por análisis del gen ARNr 16S se consideraba puro, sin embargo al hacer un cuidadoso análisis del número de copias de los genes ARNr 16S y los genes de las cloroetano dehalogenasas reductivas (RDasa) como *vcrA*, *tceA* y *bvcA*, demostró contener varios organismos *Dehalococcoides* distintos. Subsecuentes transferencias junto con un monitoreo por qPCR permitió el aislamiento de la cepa GT, que finalmente contenía solamente el gen *vcrA*.

Por microfotografía de escaneo electrónico (fig. 21) se observan células en forma de disco y otras con forma oval. Las de forma de disco, presentan un diámetro entre 0,7-1,2 μm y un ancho de alrededor de 0,2-0,6 μm, mientras que las de forma esférica u oval son más gruesas, con un diámetro de 1,1-1,5 μm y probablemente representen un estado previo a la división celular. Se puede observar además diferentes apéndices; algunos como exclusiones en forma de cordón de función desconocida (fig. 16 C), otros cortos y delgados conectando células adyacentes (fig. 16 B), así como vesículas pequeñas y redondas en las proximidades o adheridas a la superficie celular (al igual que muescas en dichas superficies) que podrían representar exclusiones celulares (fig. 16 D) (Sung *et al.*, 2006).

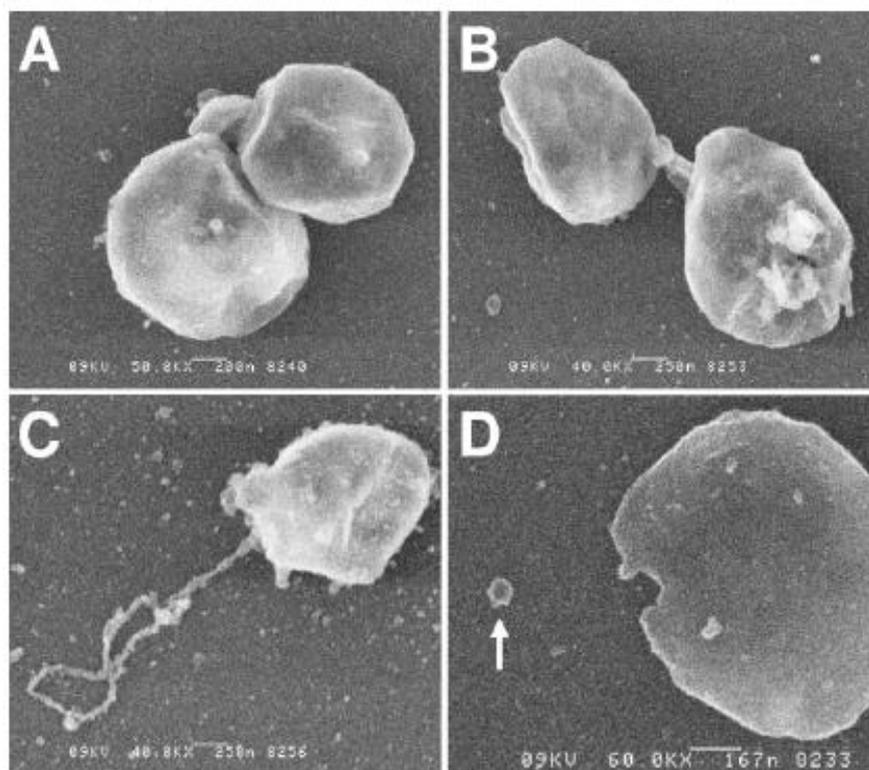


Fig. 16 Microfotografía de escaneo electrónico de la cepa GT de *Dehalococcoides* sp. células aplanadas con forma oval (A), dos células aparentemente conectadas (B), célula con un apéndice de función desconocida (C) y célula con una mueca y una vesícula (flecha), que podrían representar exclusiones celulares. Tomado de Sung *et al.*, 2006.

Cepa MB

Fue aislada de un cultivo realizado con sedimentos del área de la bahía a San Francisco (California, USA), con la capacidad de producir *trans*-DCE y *cis*-DCE en una proporción de 7,3 (\pm 0,4):1 tras la dechloración reductiva de PCE. Creció por un proceso de respiración anaerobia que utilizó H₂ como donador de electrones, PCE o TCE como aceptor, acetato como fuente de carbono siendo también resistente a la ampicilina.

Durante el cultivo la ampicilina jugó un importante rol, aumentando el rango *trans/cis*-DCE e inhibiendo otras cepas productoras de *cis*-DCE. El bajo rango *trans/cis*-DCE observado en los sitios contaminados puede ser provocado por la co-existencia de MB con otras cepas productoras de *cis*-DCE. Los diferentes productos finales encontrados en dichos sitios pueden deberse a la competencia entre las diferentes cepas dechloradoras presentes (Cheng and He, 2009).

La bacteria presenta forma de disco, no móvil, que en un microscopio de fuerza atómica de alta resolución (AFM "atomic force microscopic") se observa como células simples o en pares de alrededor de 1,0 μ m de diámetro y 150 nm de profundidad. El tamaño

ligeramente mas grande de esta cepa frente a las demás reportadas de *Dehalococcoides* puede deberse a las diferentes técnicas empleadas (Cheng and He, 2009).

Los análisis por “microarray” sugieren que puede tener la capacidad de fijar N₂.

Los genes entre MB y 195 estaban altamente conservados, compartiendo el 100 % de identidad con el gen del ARNr 16S de *D. ethenogenes* 195 (contiene 10 de los más de 17 genes para RDasa de *D. ethenogenes* 195) con la que también comparte la morfología, la fuente de carbono y el donador de electrones, perteneciendo al subgrupo Cornell.

Presenta la capacidad de desbromar la mezcla comercial octa-BDC a penta o tetra-BDCs en presencia de TCE. Mientras que los diferentes sustratos utilizados por las diferentes cepas o cultivos de *Dehalococcoides* se pueden explicar por los diferentes genes para RDAsas que contienen (*pceA*, *tceA*, *bvcA*, *vcrA* y *cbrA*), ninguna de estas RDasa descritas son responsables de la producción de *trans*-DCE y además ninguno de dichos genes fueron detectados en la cepa MB, en la que si se aisló un supuesto gen de RDasa al que llamaron *dceA1*. Por lo tanto son necesarios más estudios para comprender los procesos metabólicos de las cepa MB (Cheng and He, 2009).

Cepas ANAS1 y ANAS2

Estas dos cepas fueron obtenidas de un cultivo (ANAS) con la habilidad de declorar tricloroetenos a eteno, obtenido de suelos contaminados de la estación naval aérea de Alameda, USA (Richardson *et al.*, 2002).

Algunas cepas acoplaron para su crecimiento la reducción de TCE, *cis*-DCE y 1,1-DCE a VC, pero no utilizaron PCE o *trans*-DCE. Solo la cepa ANAS2 puede utilizar VC para su crecimiento, presentando además un rango de decloración relativamente más lento.

Los análisis comparativos mostraron que los genomas de ambas son muy similares entre sí y con la cepa 195 excepto por los genes que se encuentran entre las regiones denominadas elementos integrales (IE_s) o las regiones de alta plasticidad (HPR_s). En las cepas ANAS, un gran número de los genes que se sabe o supone que codifican para RDNasas se encuentran en estas regiones, lo que sugiere que la transferencia horizontal de genes podría ser una explicación para la adquisición de nuevas RDasa con las diferentes habilidades decloradoras.

Al secuenciar la cepa ANAS1 se detectaron 7 de los 101 genes propuestos de RDAsas de los cuales 6 de ellos están asociados con la cepa 195 (entre ellos *tceA*) y uno con la cepa VS. Mientras que en la cepa ANAS2 se detectaron 5 de los genes de RDAsas y solamente

el gen *vcrA* (detectado en la cepa VS) difiere de los encontrados en la cepa ANAS1. El gen *tceA* presente en ANAS1 le confiere la capacidad de la dechloración de TCE y los isómeros de DCE pero tiene poca actividad sobre VC, mientras que el gen *vcrA* presente solamente en ANAS2 le proporciona la capacidad de la dechloración de VC, sin embargo no se ha identificado el gen que le confiera a esta última la capacidad de dechlorar TCE. De lo que se desprende que las capacidades dechlorativas de los cultivos de *Dehalococcoides* son independientes de su afiliación filogenética y están determinadas por un pequeño número de genes que codifican para las diferentes RDasa (Lee *et. al.*, 2011).

Como las otras cepas de *Dehalococcoides*, son células que tienen forma de disco no móviles de aproximadamente 1 μm de diámetro con un tiempo de duplicación en condiciones óptimas (pH 7,2 y 30 °C) de 20 h. Requieren para su crecimiento de H_2 como fuente de electrones y CO_2 como fuente de carbonos. Ninguna de las dos cepas pueden usar 1,1-dicloroetano, cloroformo, tetracloruro de carbono, PCBs, 2,4,6-triclorofenol, pentaclorofenol, sulfato, sulfito, nitrato o nitrito como aceptores de electrones, así como tampoco usan lactato, piruvato, propionato o formato como fuente de carbonos (Lee *et. al.*, 2011).

Cepa VS

El cultivo se obtuvo a partir de un acuífero contaminado con PCE en Victoria Texas, USA. La cepa presenta la capacidad de obtener energía para su crecimiento en todos los pasos de la reducción de TCE (TCE, *cis*-1,2-dicloroetano y VC) a eteno, utilizando el hidrógeno como donador de electrones.

Al igual que para el cultivo KB-1/VC, la tasa de crecimiento es similar en DCE y VC, siendo algo menor en TCE (Cupples *et al.*, 2003, 2004).

Cepas	Nº de acceso	Sustratos	Subgrupo	Referencia
195 ¹	AF004928	PCE, TCE, cDCE, 1,1-DCE, PCB	Cornell	Hendrickson <i>et al.</i> , 2002 Fennell <i>et al.</i> , 2004
FL2 ²	AF357918	TCE, cDCE, t-DCE	Pinellas	Hendrickson <i>et al.</i> , 2002 He <i>et al.</i> , 2005
CBDB1	AF230641	TCB, TeCB, PCDD, HCB, QCB	Pinellas	Hendrickson <i>et al.</i> , 2002 Adrian <i>et al.</i> , 2000
BAV1 ³	AY165308	cDCE, t-DCE, 1,1-DCE, VC	Pinellas	He <i>et al.</i> , 2003
GT	AY914178	TCE, DCE, VC	Pinellas	Sung <i>et al.</i> , 2006
SF1	DQ21870	PCB	-----	Fagervold <i>et al.</i> , 2005
DF-1	AF393781	PCB	-----	Cutter <i>et al.</i> , 2001; May <i>et al.</i> , 2008
o-17	AF058005	PCB	-----	Pulliam <i>et al.</i> , 1998; Fagervold <i>et al.</i> , 2005
VS	CP001827	TCE, c-DCE, 1,1-DCE, VC	Cornell	McMurdie <i>et al.</i> , 2011; Müller <i>et al.</i> , 2004
MB	EU073964	TCE, PCE	Cornell	Cheng and He, 2009
ANAS1	HM241729	TCE, c-DCE, 1,1-DCE, TCE, c-DCE, 1,1-DCE, VC	Cornell	Lee <i>et al.</i> , 2011
ANAS2	HM241730	TCE, c-DCE, 1,1-DCE, VC	Cornell	

Tabla 6 Esquema de las diferentes cepas de la clase *Dehalococcoidia* con sus diferentes aceptores de electrones que presentan dehalogenación reductiva en las posiciones *meta*. De acuerdo a la clasificación de Hendrickson *et al.*, 2002 y basados en las diferencias genéticas del gen ARNr 16S se muestran los diferentes subgrupos a los que pertenecen. Los números de acceso corresponden a las secuencias depositadas en los bancos de datos.

1. *Dehalococcoides ethenogenes* 195 puede metabolizar VC solo co-metabólicamente con altas concentraciones de cloroetenos.
2. FL2 puede metabolizar PCE y VC solo co-metabólicamente con altas concentraciones de cloroetenos.
3. BAV1 puede metabolizar TCE y PCE solo co-metabólicamente con altas concentraciones de cloroetenos. Construido en base a datos de las referencias citadas.

2.2.2 Género *Dehalogenimonas*

Dehalogenimonas lykanthroporepellens BL-DC-9^T

Las cepas BL-DC-8 y BL-DC-9^T fueron aisladas de una muestra de agua subterránea obtenida de un pozo de recuperación de residuos en una industria petrolera de Luisiana, USA, en un área altamente contaminada con solventes clorados (Bowman *et al.*, 2006).

Estas cepas son capaces de crecer en condiciones anaerobias (en presencia de H₂) en base a la dehalogenación reductiva de alcanos alifáticos policlorados como por ejemplo 1,2,3-

tricloropropano (1,2,3-TCP) (Moe *et al.*, 2009). El compuesto 1,2,3-TCP es identificado como un agente tóxico y probablemente cancerígeno por la Organización Mundial de la Salud en 2003. Desde que comenzó su pesquisa, ha sido detectado como contaminante en aguas subterráneas y pozos de abastecimiento público de agua potable de varios países (Moe *et al.*, 2009).

Aislamiento

La muestra de agua subterránea contaminada con solventes clorados se filtró para volatilizar los solventes clorados antes de la transferencia de 30 mL de la muestra en frascos de suero de 550 mL que contenían 300 mL de medio basal anaerobio según Kuever *et al.*, 2005. El pH se ajustó a 7,0-7,5 con HCl 2,4 M. El espacio libre de las botellas se gaseó abundantemente con una mezcla de gas H₂/CO₂/N₂ esterilizada por filtración (10 % / 10 % / 80 %, v/v/v). Cada botella se suplementó con 14 µL de 1,1,2-TCA (puro) esterilizado por filtración para alcanzar una concentración final en la fase acuosa de aproximadamente 0,5 mM. Los viales fueron incubados en condición estática en la oscuridad a 30 °C.

Los viales se analizaron por cromatografía de gases y al final de la tercera semana más del 60 % del 1,1,2-TCA se había transformado a eteno sin la producción de metano. El cultivo se transfirió 2 veces y en la segunda transferencia se omitió en el medio el piruvato y el lactato adicionándose ampicilina y vancomicina en una concentración de 1,0 y 0,1 g/L respectivamente. La dechloración de 1,1,2-TCA a eteno (en ausencia de la metanogénesis) se mantuvo en ambas transferencias.

Para su aislamiento se utilizó el método de dilución hasta extinción (diluciones de 10² hasta 10⁸), transfiriendo los cultivos secuencialmente en el último medio basal líquido con antibióticos utilizado, pero en viales de 25 mL con 15 mL de medio. Las cepas BL-DC-9^T y BL-DC-8 se recuperaron luego de 2 meses de incubación. No tuvieron éxito los intentos de hacer crecer las cepas en medio basal solidificado con agar o gelatina (Yan *et al.*, 2009).

Caracterización

Las células de la cepa BL-DC-9^T presentan forma cocoide irregular, con un diámetro de entre 0,3-0,6 µm con un metabolismo quimiotrófico, mesófilo, y estrictamente anaerobio. No presentan movilidad ni formación de esporas, dando negativo a la tinción de Gram. Son capaces de dehalogenar reductivamente alcanos clorados, utilizando el H₂ como donador de electrones. Todas las reacciones de dechloración presentan exclusivamente el

mecanismo de dicloroeliminación, que involucra la remoción simultánea de 2 cloruros de átomos de carbonos adyacentes, con la formación de un doble enlace.

En ausencia de H₂ no presentan crecimiento con acetato, butirato, citrato, etanol, fructosa, fumarato, glucosa, lactato, lactosa, malato, metanol, metil,etil-cetona, propionato, piruvato, succinato o extracto de levadura. Mostran resistencia a la ampicilina y la vancomicina. El rango de temperatura y pH para su crecimiento es de 20-34 °C y 6,0-8,0 respectivamente, siendo a su vez las condiciones óptimas de 28-34 °C y pH entre 7,0 a 7,5. Presentan crecimiento a concentraciones de NaCl hasta al menos 2 % (p/v). Los principales ácidos grasos de membrana detectados son C_{18:1} ω9c, C_{16:1} ω9c, C_{16:0} y C_{14:0}. El contenido de G+C del ADN genómico de la cepa tipo es 54,0 %. Ambas cepas presentan una homología de 99,93 % en la secuencias de los genes ARNr 16S (lo que se corresponde con un nucleótido de diferencia). En un árbol filogenético construido por el método de Neighbour-Joining, se ubicaron en una rama profunda del filo *Chloroflexi* alejadas de los demás géneros reconocidos (fig. 17). Sus parientes más cercanos cultivados son cepas del género *Dehalococcoides*, pero con sólo el 90 % similitud en la secuencia del gen del ARNr 16S. La agrupación en un clúster de ambas cepas dentro de “*Dehalococcoides*” (la clase “*Dehalococcoides*” fue posteriormente definieron como *Dehalococcoidia* por Löffler *et al.*, 2013) fue apoyada por un valor de bootstrap del 94 %. Se propuso y describió el género *Dehalogenimonas* gen. nov. para dar cabida a las cepas de BL-DC-8 y BL-DC-9^T denominando a esta última como la cepa tipo del género (Moe *et al.*, 2009).

***Dehalogenimonas alkenigignens* IP3-3^T**

Las cepas IP3-3^T y SBR-1 fueron obtenidas al analizar la población microbiana de varias muestras de agua subterránea obtenida de pozos de recuperación de residuos en una industria petrolera de Luisiana, USA. De una área altamente contaminada con solventes clorados (alcanos y alquenos clorados), de donde ya se había aislado anteriormente las cepas clasificadas como *Dehalogenimonas lykanthroporepellens*.

Se analizaron muestras de aguas subterráneas recogidas de varios pozos, entre enero y diciembre de 2009 mediante pirosecuenciación del gen ARNr 16S. Dos de las muestras de los pozos contenían grandes porcentajes de secuencias que se agruparon en la clase *Dehalococcoidia* (definida por Löffler *et al.*, 2013) dentro del filo *Chloroflexi* pero que tenían menos del 97 % de similitud con las demás secuencias depositadas en las bases de datos. De estas muestras se aislaron las cepas IP3-3^T y SBR-1 que fueron obtenidas de

diferentes pozos. En base a las características genotípicas, fenotípicas, y quimiotaxonómicas estas cepas aisladas fueron claramente distintas de otras especies del filo *Chloroflexi*, por lo que se propuso su inclusión en una nueva especie dentro del género *Dehalogenimonas* asignándoles el nombre *Dehalogenimonas alkenigignens* sp. nov., siendo IP3-3^T la cepa tipo (Bowman *et al.*, 2013).

Aislamiento

Las muestras fueron recogidas en botellas de vidrio estériles, llenándolas o dejando poco a ningún espacio de cabeza de gas. Para mantener las condiciones anaeróbicas durante el transporte al laboratorio, el agua subterránea fue modificado con solución de citrato de titanio a una concentración final de 1 mM de Ti (III) y citrato de 2 mM (Zehnder and Wuhrmann, 1976).

El cultivo de enriquecimiento constaba de 10 mL de agua subterránea en una botella de suero de 160 mL que contenía 90 mL de medio basal según Yan *et al.*, 2009a modificado. El citrato de titanio fue remplazado por el sulfuro de sodio como agente reductor y el acetato 5 mM se sustituyó por acetato, piruvato y lactato, 5 mM de cada uno. Se le adicionó además 1,1,2-tricloroetano (1,1,2-TCA) a una concentración final en la fase acuosa de 0,5 mM.

Tras cuatro meses de incubación a 30 °C, bajo condiciones estáticas y en la oscuridad, el enriquecimiento se diluyó hasta 10⁻¹⁰ utilizando el mismo medio con 1,1,2-TCA preparado para el enriquecimiento. Luego de incubarlo por dos meses, a 30 °C y en la oscuridad, todo el 1,1,2-TCA se había transformado a cloruro de vinilo.

Las cepas SBP-1 y IP3-3^T se recuperaron de diferentes muestras después de siete transferencias consecutivas del cultivo con 2 % (v/v) de inóculo y diluyendo hasta la extinción en la concentración de 10⁻¹⁰. Se conservaron en medio anaerobio modificado con 5% (v/v) DMSO esterilizado por filtración, y se almacenaron a -80 °C. La pureza de los cultivos fue comprobada por microscopía y por DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) (Bowman *et al.*, 2013).

Caracterización

Los organismos aislados presentan crecimiento anaerobio, con morfología de cocos irregular, y un diámetro de 0,4 a 1,1 µm. No muestran movilidad ni formación de esporas, reaccionaron negativamente a la tinción de Gram, siendo resistentes a la ampicilina (1,0 g/L) y a la vancomicina (0,1 g/L).

Presentan la capacidad de dehalogenar reductivamente alcanos alifáticos policlorados utilizando H₂ como un donador de electrones.

Crecen en un intervalo de temperaturas entre 18-42 °C y un pH entre 6,0-8,0, siendo las condiciones óptimas 30-34 °C, y pH de 6,5 a 7,5. No presentan crecimiento a concentraciones de NaCl mayores a 2% (p/v). Los principales ácidos grasos de membrana detectados son C_{18:1}ω₉c, C_{16:0}, C_{14:0} y C_{16:1} ω₁₉c. El contenido G+C del ADN genómico determinado por HPLC es de 55,5 y 56,2 % para IP3-3^T y SBR-1 respectivamente (Bowman *et al.*, 2013).

2.2.3 *Dehalobium chlorocoercia* DF-1

Se obtuvo de un co-cultivo con la cepa *Desulfovibrio* sp. (Wu *et al.*, 2002), en el medio definido E-Cl, preparado según Berkaw *et al.*, (1996) y libre de sedimentos. El inóculo provino de los sedimentos de un estuario en Charleston, (Carolina del Sur, USA) con la capacidad de declorar policloro bifenilos (PCBs) (Cutter *et al.*, 1998).

El cultivo de la cepa DF-1 presenta la capacidad de declorar estos PCBs doblemente flanqueados por cloros, y acoplar esta reacción al crecimiento bacteriano. Se obtuvo a partir de una comunidad no metanogénica que se limitaba a la decloración de PCBs. Presenta la capacidad de *meta* declorar 2,3,4-clorobifenilos (2,3,4-CB) y 2,3,4,6-CB y a su vez *para* declorar 3,4,5-CB y 2,3,4,5-CB, no así por ejemplo 3-CB o 2,5-CB (Wu *et al.*, 2002).

Al igual que en los *Dehalococcoides* spp, los sustratos para el crecimiento de la cepa DF-1 están restringidos a donantes de electrones muy simples (hidrógeno y formiato) y a los compuestos halogenados como receptores de electrones. Esto podría indicar que en los ambientes naturales la cepa DF-1 sea dependiente de los consorcios acetógenos y/o de las bacterias fermentadoras productoras de H₂ y formiato respectivamente (May *et al.*, 2008).

Aislamiento

El cultivo se realizó en condiciones estrictamente anaerobias en medio E-Cl, con 10 mM de formiato de sodio y 173 μM de 2,3,4,5-PCB adicionado en acetona, con una concentración final de la acetona en el medio de cultivo de 0,1 % v/v (Wu *et al.*, 2002; Berkaw *et al.*, 1996). Para eliminar el oxígeno del medio se utilizó como reductor químico L-cisteína-HCl monohidratado (1,5 mM) o 0,5 mM de titanio (III) nitrilotriacetato (TiNTA), que fue preparado según Moench *et al.*, 1983. Los viales cerrados con tapones de butilo, se incubaron estáticamente en la oscuridad a 30 °C.

Se realizaron diluciones seriadas y en la tercer tanda de diluciones, en la que no se observaba microscópicamente a *Desulfovibrio* sp (ni aun cuando esta dilución fue inoculada en un medio lactato-sulfato DIM) se perdió la capacidad de dechloración del 2,3,4,5-PCB.

La capacidad era recuperada cuando se agregaba extracto celular de células de *Desulfovibrio* sp. que habían sido sometidas al tratamiento por autoclave (May *et al.*, 2008). Una asociación entre la dechloración microbiana del PCB y la reducción del sulfato no fué sorprendente, ya que varias publicaciones apoyaban la posibilidad de que en los hábitat naturales existiera una relación entre las bacterias dechloradoras de PCB y las reductoras de sulfato (Wu *et al.*, 2002; Cutter *et al.*, 2001).

Característica

En cultivos puros, DF-1 crece formando aglomerados y rara vez se observan células individuales. Éstas se visualizaron con un tratamiento suave con ultrasonido seguido de tinción con DAPI, que revelan la presencia de pequeños cocos apenas visibles con el microscopio de fluorescencia.

Al microscopio electrónico se observan como grupos o racimos de pequeños cocos, algunos de ellos con los extremos ligeramente cónicos. Estas ultramicrobacterias presentan un largo de 137 ± 51 nm y 75 a 339 nm de diámetro, lo que las hace significativamente más pequeñas que las células de *Dehalococcoides*. Este pequeño volumen podría ser ventajoso para acceder a compuestos hidrofóbicos como los PCB necesarios para su crecimiento. Las micrografías también revelan una estructura que rodea las células semejante a una vaina o cápsula, que no había sido observada con *Dehalococcoides* spp. Una mariz extracelular potencialmente adhesiva (posiblemente de naturaleza hidrófoba) sería consistente con la tendencia de los organismos a agruparse en racimo. Esto podría ser otra de las características del microorganismo que facilitaría su capacidad para absorber y acumular compuestos hidrófobos tales como los PCB.

No se observa la formación de colonias en medio solido o semisólido (con 0,5 a 2,0 % de agar noble).

La dechloración es máxima entre 30-33 °C, dejándose de observar a 10 °C o 35 °C, luego de 12 semanas de incubación. El rango de NaCl es de 0,05-0,75 M (óptimo a 0,1-0,5 M) y el rango de pH de 6,5-8 (óptimo a 6,8), presentando un tiempo de duplicación de 2,0 días (May *et al.*, 2008).

Filogenéticamente esta cepa se encuentra estrechamente relacionada con la clase *Dehalococcoidia* pero su secuencia sólo presenta 89 % de similitud con las demás secuencia del gen ARNr 16S (fig. 17). Estando a su vez relacionada con varios filotipos hallados que correspondían a bacterias de cloración de PCB (Fagervold *et al.*, 2005).

Esta cepa fue el primer miembro de ese grupo aislado en cultivo puro, que además presenta un amplio rango de tolerancia a solutos extracelulares. Otras características fenotípicas distintivas de DF-1 incluyen su pequeño tamaño así como la síntesis de un polímero extracelular (May *et al.*, 2008).

Se demostró la capacidad de utilizar la cepa DF-1 para la bioaumentación en un suelo contaminado con residuos comerciales de PCB, al lograr la de cloración reductiva del 8,9 % del PCB doblemente flanqueados por cloro, dentro de los 145 días de inoculado (May *et al.*, 2008).

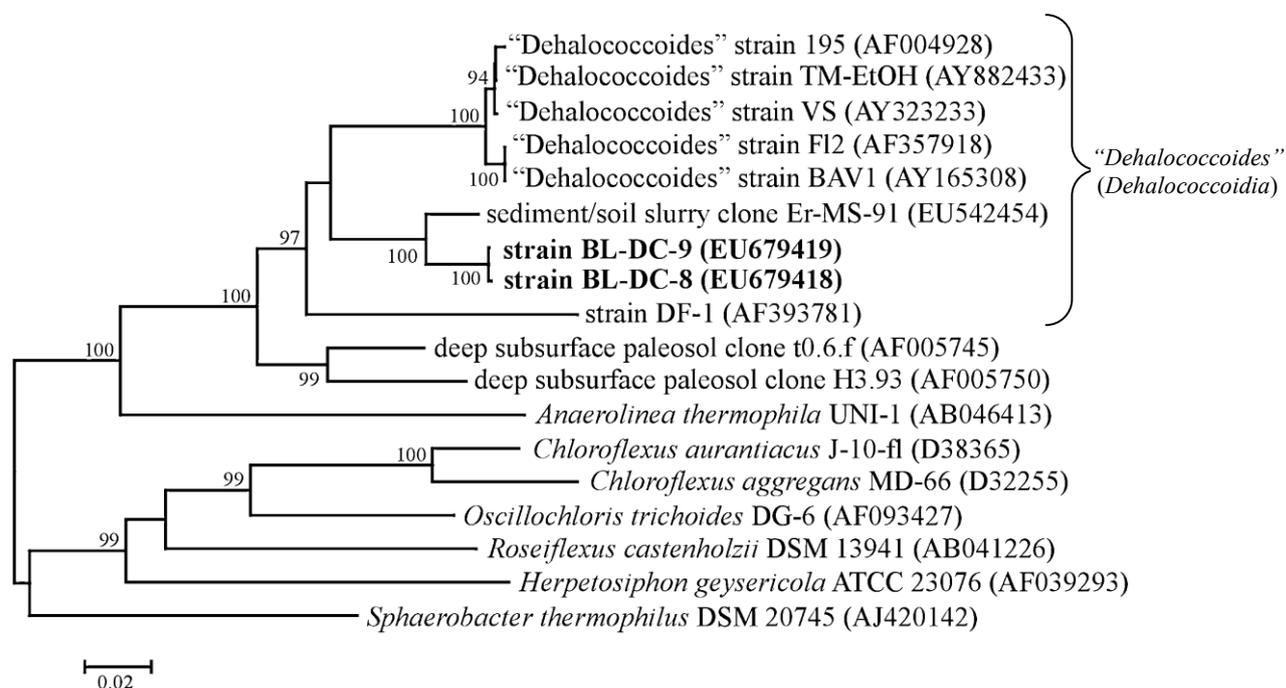


Fig. 17 Relaciones filogenéticas determinadas por el método de Neighbour-joining de las cepas BL-DC-8 y BL-DC-9^T (*Dehalogenimonas lykanthroporepellens*) en el filo *Chloroflexi* (Hugenholtz and Stackebrandt, 2004) basada a las secuencias de los genes ARNr 16S. Los valores Bootstrap en base a 1000 repeticiones se muestra en los puntos de ramificación. Se observa también la ubicación dentro del filo de la cepa "*Dehalobium chlorocoercia*" DF-1. Modificado de Yan *et al.*, 2009.

2.3. SUBFILO III

Introducción

Es el subfilo más ampliamente estudiado. Contiene organismos con morfología filamentosa con una significativa diversidad fisiológica, morfológica y taxonómica. Se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes hábitat como: ambientes termales (Hanada *et al.*, 1995a; Pierson *et al.*, 1985b), lagos de agua dulce (Keppen *et al.*, 1994; Gorlenko, 1976), ríos (tanto en agua como en sedimentos), sistemas de lodos activados (Beer *et al.*, 2002), y en ambientes tanto marinos (Mack y Pierson, 1988) como hipersalinos (Nübel *et al.*, 2001).

La morfología filamentosa y la movilidad deslizante son caracteres típicos de los organismos pertenecientes a este subfilo. Estas características son raramente observadas en otras bacterias fotótrofas anoxigénicas como por ej. bacterias púrpuras, bacteria verdes del azufre y heliobacterias.

Fueron los primeros filamentos del filo *Chloroflexi* identificados y por los que aún se identifica el filo con el nombre de **bacterias verdes no sulfurosas** (del inglés **GNSB**), ya que estos primeros filamentos descubiertos presentaban clorosomas, un rasgo típico de las bacterias verdes del azufre. Sin embargo, el filo *Chloroflexi* es claramente distante de las bacterias verdes del azufre.

Contiene dos órdenes (tabla 1), el orden fototrófico *Chloroflexales* (que incluye a las familias *Chloroflexaceae* y *Oscillochloridaceae*), el orden quimiótrofico *Herpetosiphonales* (con la familia *Herpetosiphonaceae*). Los fotótrofos y los filamentos quimiótrofos del subfilo tienen propiedades similares tanto morfológicas como de deslizamiento, así como en la estructura de la paredes en las dos especies que fueron analizadas: *C. aurantiacus* (fotótrofa) y *H. aurantiacus* (quimiótrofa) (Meissner *et al.*, 1988; Jürgens *et al.*, 1989).

Dos de los géneros fototróficos que integran al subfilo III, no presentan clorosomas (por lo que no son de color verde sino de una coloración de rojo a naranja). Debido a esto, se propusieron dos nuevos términos para designar al orden fototrófico: “bacterias verdes filamentosas multicelulares” (Pfennig, 1989) y **filamentos anoxigénicos fototróficos** (del inglés **FAPs**) (Pierson and Castenholz, 1995).

Otra discrepancia entre los miembros del orden fototrófico del subfilo, es también encontrada en la vía de asimilación del dióxido de carbono (CO₂). *C. aurantiacus*, usa el ciclo del **3-hidroxipropionato** para la fijación del dióxido de carbono (Holo, 1989;

Strauss and Fuchs, 1993), o el **ciclo reductivo del dicarbonato** (Ivanosky *et al.*, 1993), como lo hacen las bacterias primitivas y quimiotróficas del Dominio Archaea. Mientras que *O. trichoides* usa el **ciclo de Calvin-Bassham-Benson** (Ivanosky *et al.*, 1999) el cual es encontrado generalmente en autótrofos que pertenecen a *Proteobacteria* y *Cyanobacteria*.

Los filamentos de *C. aurantiacus* a su vez, son llamados “organismos quiméricos” entre el sistema fotoquímico de las bacteria púrpuras y el sistema cosechador de luz de las bacterias verdes. Esto es debido a que por un lado son filogenéticamente y fenotípicamente distantes de las bacterias púrpuras y sin embargo estos dos grupos se asemejan en el centro de reacción fotoquímico. Por otro lado, al igual que las bacteria verdes del azufre *C. aurantiacus* contiene clorosomas como antenas cosechadores de luz, a pesar de la distancia filogenética que existe entre ambas bacterias. Estas interesantes peculiaridades entre los miembros del orden fototrófico hace que sean organismos clave para resolver la evolución tanto de las vías de asimilación del dióxido de carbono, así como de los sistemas fotosintéticos.

En la tabla 7 se describen los microorganismos del orden fototrófico (FAPs), al igual que algunas de sus características.

Filogenia¹

Hasta el comienzo de los años 1990, solamente estaba disponible para análisis filogenéticos en la familia *Chloroflexaceae* la secuencia del ARNr 16S de *Chloroflexus aurantiacus*. Sin embargo debido a la aplicación de las técnicas moleculares ha sido posible la determinación de las secuencias genéticas de los ARNr 16S de otros organismos de esta familia.

La figura 18 muestra un árbol filogenético basado en las secuencias del ARNr 16S de miembros del subfilo, con secuencias de clones obtenidos de cultivos y ambientes microbianos naturales.

Teniendo en cuenta mayormente las diferencias en el gen del ARNr 16S, la especie mesofílica de agua dulce *Oscillochloris trichoides*, fue separada de la familia *Chloroflexaceae*, definiéndose para ella una nueva familia, para la que se propuso el nombre de *Oscillochloridaceae*. Desde el punto de vista filogenético, más familias podrían separarse a medida que comiencen a aislarse nuevas especies.

¹ Resumido Hanada and Pierson, 2006.

El árbol muestra que cada uno de los cuatro fenotipos (termofílico, mesofílico, halofílico o filamentos sin clorosomas), forman un clúster filogenético y que no se mezclan unos con otros. A pesar que el clúster de los FAPs (fototrofos) contiene solo cinco géneros descriptos, filogenéticamente es tan diverso y extenso taxonómicamente como las *Proteobacterias* y las bacterias Gram-positivas. La divergencia en las secuencias de los genes ARNr 16S entre los miembros de la familia *Chloroflexaceae* es relativamente grande (más del 22 %).

Dentro del subfilo los fotótrofos forman un grupo cohesivo. Los géneros “verdes” fototróficos que contienen clorosomas junto con los accesorios cosechadores de luz Bchl *a*, *c* y *d*, aparecen formando un rama distinta del género “rojo” fototrófico que perdieron los clorosomas y contienen solo bactericlorofila *a* (la Bchl *a* emite a 795-878 nm de ahí el término “rojo”). La única excepción es el género *Heliothrix* que filogenéticamente se ubica dentro del grupo verde, pero pertenece al rojo, esto pudo deberse a que la secuencia estudiada del gen ARNr 16S de *Heliothrix* no era completa (Pierson, 2001). El género “rojo” (microorganismos fototróficos pero que no tienen clorosomas) aparece como distante tanto del género quimiótrofo *Herpetosiphon*, como del género “verde” fototrófico. Incluye además del género *Heliothrix*, a las secuencias del género *Roseiflexus* y a las de los mantos rojos descritas por Boomer *et al.* (2002), que a pesar de aparecer juntas en un grupo, no muestran tener mucha cercanía (fig. 18).

***Chloroflexus aurantiacus* en el estudio del origen de la fotosíntesis**

La posición de *Chloroflexus* en una ramificación temprana del árbol filogenético en la evolución de los fotótrofos, estudiándola a partir del gen ARNr 16S, no se corresponde con los patrones de evolución de los genes fotosintéticos (Gruber *et al.*, 1998b; Gupta *et al.*, 1999; Gruber and Bryant, 1997, 1998a).

Xiong *et al.*, (2000) compararon detalladamente los árboles filogenéticos de los genes ARNr 16S, con los árboles de los genes relacionados con la fotosíntesis (genes de la biosíntesis de Mg-tetrapirroles) entre *Chlorobium tepidum* (pertenecientes a las bacterias verdes sulfurosas) y *Chloroflexus aurantiacus*. Al encontrar incongruencias en las ramas profundas, sugirieron que pudo haber ocurrido transferencia horizontal de los genes de la fotosíntesis, durante la evolución de Bacterias.

Dado que las bacterias púrpuras, tienen todos sus genes fotosintéticos agrupados, y que la transferencia lateral u horizontal de genes entre organismos procariotas ha sido

ampliamente demostrada (Ochman *et al.*, 2000; Doolittle, 1999), sugirieron que probablemente, los genes fotosintéticos de *C. aurantiacus* hayan sido transferidos como una entidad (transferencia horizontal), desde una bacteria púrpura ancestral. La filogenia de los genes ARNr 16S, no necesariamente reflejaría la filogenia de los genes de vías metabólicas específicas.

2.3.1 Orden *Chloroflexales*²

Identificación

Dentro de este orden que incluye a las familias *Chloroflexaceae* y *Oscillochloridaceae* (tabla 1), se clasificaron a los filamentos fototróficos con las siguientes características:

- morfología de filamento multicelular no ramificado
- desplazamiento deslizante
- actividad fotosintética anoxygenica

El modo de movimiento en una superficie sólida o semisólida de los integrantes del orden es el desplazamiento deslizante (sin órganos propulsores) que es una característica común de todos los FAPs (Castenholz, 1982). La velocidad de desplazamiento varía entre los distintos filamentos. Es un movimiento suave, observado típicamente entre otras bacterias filamentosas multicelulares (ej.; *Cyanobacterias* y *Flexibacterias*) y algunas veces en organismos unicelulares (ej. *Citofaga*). La movilidad deslizante en los ambientes naturales les permite a los organismos, formar mantos microbianos junto a las cianobacterias y otras bacterias.

Las características diferenciales para validarlos dentro de un género o especie del orden están resumidas en la tabla 4. Los cinco géneros pueden ser diferenciados unos de otros por variaciones en la pigmentación, morfología y temperatura de crecimiento.

Tres de los géneros presentan clorosomas, y pueden a su vez subdividirse en dos; el género *Chloroflexus* por un lado y las formas mesofílicas de agua dulce por otro (que contiene a los géneros *Oscillochloris* y *Chloronema*). Presentan como fotopigmentos Bchl *c* (o *d* en el caso de *Chloronema*) y un carotenoide típico, el β -caroteno.

El género *Chloroflexus* por su lado consiste en organismos termófilos que crecen bien a 55 °C, con la sola excepción de las cepas mesófilas KN-4 and BR-1 de *Chloroflexus aurantiacus* var. "*mesophilus*" (nom. prof.) (Dubinina and Gorlenko, 1975; Pivovarova and Gorlenko, 1977). A pesar de esta diferencia en la temperatura de crecimiento, son

² Resumido de Hanada and Pierson, 2006

más similares fisiológica y morfológicamente a las formas termófilas de *Chloroflexus* que a los géneros mesófilos de agua dulce. Ambas formas de *Chloroflexus*, las termófilas y las mesófilas, consisten en delgados filamentos que responden similarmente ante el oxígeno y no presentan vesículas de gas. Mientras que los géneros mesófilos son filamentos relativamente más gruesos, con vesículas de gas intracelulares y en general no son muy tolerantes al oxígeno. Por otro lado los géneros que no presentan clorosomas (*Roseiflexus* y *Heliiothrix*), tampoco contienen β -caroteno.

Géneros con clorosomas: *Chloroflexus*, *Chloronema*, *Oscillochloris*

Género *Chloroflexus*

Este género contiene dos especies, *Chloroflexus aurantiacus* (J-10-fl^T) la especie tipo de este género (Pierson and Castenholz, 1974a), y *Chloroflexus aggregans* (MD-66^T) (Hanada *et al.*, 1995a), ambas aisladas de fuentes termales, como monocultivos axénicos o como cultivos mixtos con bacterias no fototróficas.

Los organismos de este género están ampliamente distribuidos y la mayoría de las cepas son filamentos bacterianos no ramificados y termofílicos, con un diámetro de alrededor de 1 μm . *Chloroflexus aurantiacus* presenta un desplazamiento deslizante entre 0,01-0,04 $\mu\text{m/s}$ en una superficie con 1,5 % de agar (Pierson and Castenholz, 1974a), mientras que *Chloroflexus aggregans* es 100 veces más rápida (1,0-3,0 $\mu\text{m/s}$) (Hanada *et al.*, 1995a).

La variedad mesofílica de *Chloroflexus aurantiacus*, llamada *Chloroflexus aurantiacus* var. "*mesophilus*" (cepas KN-4 y BR-1) (Gorlenko, 1976; Pivovarova and Gorlenko, 1977) crece en un rango de temperaturas de 10-40 °C, siendo la óptima entre 20 y 25 °C. Fueron aislada de los sedimentos de un lago de agua dulce, donde se observaron en las zonas anoxigénicas (Gorlenko, 1976).

Hábitat

Generalmente son encontrados en ambientes termales neutros o alcalinos donde forman mantos microbianos con o sin cianobacterias. No hay evidencias que reporten su crecimiento en medios ácidos con pH menores a 6,0, o fuentes termales salobres (Hanada *et al.*, 1995a).

Frecuentemente se encuentran asociados con cianobacterias, formando películas delgadas naranjas o amarillo-naranja en la superficie de los mantos verde oscuros de las cianobacterias, que varían en la morfología, color, así como en la dependencia con la temperatura, pH, y concentración de sulfuro (fig. 19). Estas asociaciones se han encontrado en ambientes con temperaturas desde 72 °C, hasta límites inferiores de 30 °C,

con pH entre 5,5 y 10,0 (Hanada *et al.*, 1995b; Pentecost, 1995; Pierson and Castenholz, 1995; Keppen *et al.*, 1994; Jørgensen and Nelson, 1988; Castenholz, 1984).



Fig. 19 Manto microbiano creciendo en una corriente de agua lenta a 60 °C y pH 8. Incluye la cianobacteria *Synechococcus* y a *Chloroflexus sp.*, corriente abajo de una fuente termal sulfurosa en el Parque Yellowstone, USA. Tomado de sitio *web* <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Chloroflexus>.

Metabolismo

Casi todas las cepas de *Chloroflexus*, son bacterias termófilas fototróficas que pueden crecer quimioheterotróficamente en aerobiosis y en la oscuridad, usando varios compuestos orgánicos (azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos), o fotoheterotróficamente en anaerobiosis. Precisan de ácido fólico y tiamina como factores de crecimiento así como de carbono inorgánico (Hanada *et al.*, 1995a; Madigan *et al.*, 1974; Pierson and Castenholz, 1974a; Pierson and Castenholz, 1974b).

En fuentes termales naturales, las especies de *Chloroflexus spp.* parecen tener la capacidad de crecer usando sustratos derivados de las cianobacterias. Se ha reportado en una fuente termal con depósitos de hierro, una cepa de *Chloroflexus* asociada con una cianobacteria con la capacidad de oxidar el Fe II como donador de electrones para la fotosíntesis (Pierson and Parenteau 2000).

Varios investigadores reportaron a su vez la existencia de una cepa de *Chloroflexus*, designada GCF, creciendo independientemente de cianobacterias (Sugiura *et al.*, 2001; Castenholz, 1988b). Dicha cepa es capaz de crecer en las fuentes termales fotoautotróficamente, usando sulfuro como donador de electrones, sin presentar crecimiento respiratorio en presencia de oxígeno. Esto las hace claramente diferentes de cualquier otra cepa conocida de *Chloroflexus aurantiacus* o *Chloroflexus aggregans*. La inhabilidad de la cepa GCF de respirar podría ser debida a su adaptación a ambientes anaerobios sin cianobacterias oxigénicas. Alternativamente las otras cepas de *Chloroflexus*, podrían haber adquirido la habilidad respiratoria, y una alta tolerancia al oxígeno, por adaptación a ambientes aerobios con presencia de cianobacterias.

Envoltura celular

La composición bioquímica de la envoltura celular y la composición de los lípidos celulares en *C. aurantiacus* exhibe algunas propiedades características. Los lípidos polares consisten fundamentalmente de fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, monogalactosildiglicerido y diglicosildiglicerido (Knudsen *et al.*, 1982; Kenyon and Gray, 1974), siendo la predominancia de fosfatidilinositol, raramente encontrada en otras bacterias fototróficas. El extracto lipídico de *C. aurantiacus* contiene una gran variedad de ésteres de cera (ésteres de ácidos grasos con alcoholes de peso molecular elevado) C₂₈-C₃₈, infrecuentemente observados en otras bacterias. Su rol no está muy claro y probablemente esté relacionado con el carácter termofílico de dicha bacteria.

Los ácidos grasos celulares son predominantemente de cadenas no ramificadas saturadas y monoinsaturadas con un largo de cadena entre C₁₆₋₂₀ (los mayores componentes de estos ácidos son C_{18:0}, C_{16:0}, y C_{18:1}) y no se detectan cadenas sustituidas de hidroxilato o ciclopropano (Knudsen *et al.*, 1982). La presencia de cadenas de ácidos grasos altamente saturados y largos, es consistente con su naturaleza termofílica.

La inusual composición bioquímica de la envoltura de *C. aurantiacus*, es particularmente interesante. La cepa presenta tinción Gran-negativa pero la organización estructural fuertemente recuerda los caracteres encontrados en las paredes de las bacterias Gram positivas. La envoltura aparentemente perdió los lipopolisacaridos (LPS) típicos de las bacterias Gram-negativas (Knudsen *et al.*, 1982), y por otro lado la presencia de L-ornitina en lugar de ácido diaminopimelico en la capa de peptidoglicano, la distingue de otras bacteria Gram-negativas y apoyan la sustancial similitud de las paredes con las bacteria Gram-positivas (Jürgens *et al.*, 1987).

Pigmentos

Las especies de *Chloroflexus* contienen bacterioclorofila (Bchl) *a* y *c* como pigmentos fotosintéticos. En *C. aurantiacus*, las Bchl son sintetizadas por la vía del glutamato-C₅ (Avissar *et al.*, 1989; Kern and Klemme, 1989). Las moléculas de Bchl *c* están presentes en vesículas intracelulares denominadas clorosomas, mientras que las de Bchl *a* se localizan fundamentalmente en las membranas citoplasmáticas.

Las bacterioclorofilas están generalmente esterificadas con alguna cadena larga de alcohol, como fitol en la Bchl *a*, o fitil, estearil, geranilgeranil y cetil/oleilesteres en la Bchl *c*, dependiendo el rango de mezcla de estos últimos esterres, de la intensidad de luz a la que crecen (Takaichi *et al.*, 1995).

C. aurantiacus contiene también grandes cantidades de carotenoides, como β y γ -caroteno, así como derivados de γ -carotenos (Takaichi *et al.*, 1995). La mayoría de los β - y γ -carotenos están en los clorosomas, mientras que los derivados de γ -carotenos (OH- γ -caroteno glucósido esteres y sus intermediarios) son predominantes en la membrana, aunque allí también se encuentran algunos β - y γ -carotenos (Schmidt *et al.*, 1980).

En células creciendo con altas intensidades de luz, estos derivados γ -carotenos presentes en las membranas aumentan relativamente respecto a otros carotenoides y pueden tener un rol en la protección del daño producido por las altas intensidades de luz, en el sistema fotoquímico unido a membrana (Schmidt *et al.*, 1980).

Centro de reacción Fotoquímico y aparato cosechador de luz

El centro de reacción fotoquímico y el aparato primario cosechador de luz de *C. aurantiacus*, tienen similitudes con los componentes de dos diversos grupos de fototrofos, las bacterias púrpuras y las bacterias verdes sulfurosas.

El **centro de reacción fotoquímico**, es muy similar funcional y estructuralmente a los centros de reacción de las bacterias púrpuras, a pesar de algunas diferencias significativas (tabla 8). Comparadas con las altamente conservadas características de los sitios directamente involucrados con los procesos fotoquímicos primarios, estas diferencias son muy pocas (Shiozawa *et al.*, 1987; Vasmel *et al.*, 1986; Blankenship *et al.*, 1984; Pierson and Thornber, 1983).

La organización molecular en *C. aurantiacus* del **sistema primario de recolección (o cosechador) de luz** es particularmente interesante. Por un lado, presenta clorosomas al igual que las bacterias verdes sulfurosas, aunque el tamaño, la composición y la ultraestructura de los clorosomas en *C. aurantiacus*, es algo diferente (Van Dorssen and Amesz, 1988; Feick *et al.*, 1982; Sprague *et al.*, 1981; Schmidt, 1980), y por otro lado también tienen un sistema de membranas intracitoplasmático cosechador de luz, como el encontrado en las bacterias púrpuras, aunque con una organización transcripcional diferente (Watanabe *et al.*, 1995).

	Bact. púrpuras	<i>C. aurantiacus</i>
Polipéptidos	L, M, H	L, M
Par especial	2 Bchl <i>a</i>	2 Bchl <i>a</i>
Bchl visores	2 Bchl <i>a</i>	1 Bchl <i>a</i>
Bacteriofeofitina	2 molec.	3 molec.
Carotenoides	si	no
Quinonas	Ubiquinona	Menaquinona (Mk-10)

Tabla 8 Cuadro comparativo de los centros de reacción fotoquímico de las bacterias púrpuras y *C. aurantiacus*. Construido a partir de Bock, T. D., Maldigan, 1991, cap. 19 y de Hamada and Piernos, 2006.

Transporte de electrones

La cadena de transporte de electrones del crecimiento fototrófico y quimiotrófico en *C. aurantiacus* fue estudiado por Zannoni (1995). Las células contienen dos tipos de una proteína de cobre de transferencia de electrones designada como **auracianina** (McManus *et al.*, 1992), cuya estructura cristalina (Bond *et al.*, 2001) está más relacionada con azurina, una proteína de cobre encontrada en algunas Proteobacterias (Baker, 1988) que con la plastocianina encontrada en algunas cianobacterias y cloroplastos.

El proceso cíclico del electrón en la fotosíntesis de *C. aurantiacus*, debe ser como sigue (fig. 20): debido a la excitación por fotones, un electrón del “par especial” de una molécula de Bchl *a* es transferido a una molécula de bacteriofeofitina y entonces pasado a una quinona (MK-10) dentro del complejo del “core” del centro de reacción, la quinona reducida difunde entonces desde el centro de reacción hacia el lado interno de la membrana, y entrega el electrón a un supuesto complejo citocromo *bc*₁ unido a membrana: un electrón retorna por la proteína azul de cobre (auracianina) al centro de reacción, vía un citocromo *c*₅₅₄, que está unido directamente al centro de reacción (McManus *et al.*, 1992; Becker *et al.*, 1991; Mulkidjanian *et al.*, 1998; Zannoni and Ingledew, 1985; Vasmel and Amesz, 1983).

Las células con crecimiento quimiotrófico, perdieron el centro de reacción fotoquímico, el citocromo tetrahemo *c*₅₅₄ que se une estrechamente a este complejo del core (Wynn *et al.*, 1987), así como la auracianina. Para la respiración aerobia han sido reportados dos tipos de citocromo oxidasa terminal; la citocromo *aa*₃ que generalmente opera en células que crecen con niveles no saturados de oxígeno (Zannini, 1995 y 1986; Pierson, 1985), y la citocromo *a* (Knaff *et al.*, 1988; Wynn *et al.*, 1987) que está presente con altos niveles de oxígeno (Zannoni, 1995).

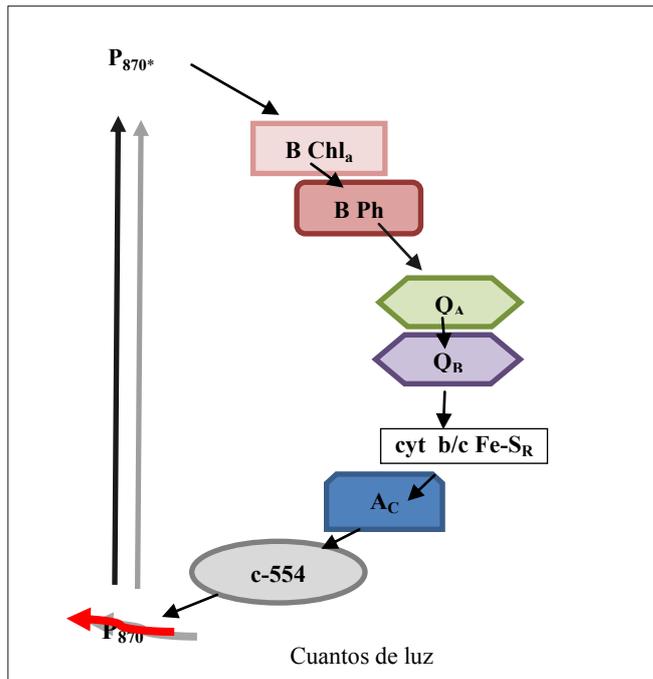


Fig. 20 Esquema propuesto para la transferencia de electrones en la fotosíntesis en *C. aurantiacus*. BChl_a; bacterioclorofila *a*, B Ph; Bactereofeofitina; Q_A y Q_B quinonas oxidada y reducida (Mk-10); cyt b/cFe-S_R complejo citocromo b/c; A_c aurocianina; c-554 citocromo c₅₅₄. Construido basado en McManus *et al.*, 1992

Chloroflexus aggregans MD-66^T

Forma densos agregados celulares y es capaz de formarlos nueva y rápidamente a los 20 o 30 min que son dispersadas por agitación (fig. 21). La formación de estos agregados parece estar ligada a su rápida velocidad de deslizamiento de 1 a 3 $\mu\text{m/s}$ determinada por microscopio sobre una superficie de vidrio a 55 °C (Hanada *et al.*, 2002a; Hanada *et al.*, 1995a). Esta velocidad es 100 veces más rápida que la de *C. aurantiacus* (0,01-0,04 $\mu\text{m/s}$) y 10 veces más que la de *Heliothrix oregonensis* (0,1-0,4 $\mu\text{m/s}$).

Fenotípicamente es muy similar a la especie tipo *C. aurantiacus*, sin embargo hay claras diferencias entre ambas:

- las células de *C. aggregans* son más grandes que las de *C. aurantiacus*
- *C. aggregans*, a diferencia de *C. aurantiacus*, no utiliza acetato, citrato, etanol ni glicilglicina
- *C. aggregans* contiene mayormente γ caroteno y sus derivados con solo trazas de β , sin embargo el β caroteno es el mayor componente en *C. aurantiacus*
- *C. aggregans* incluye pequeñas pero significativas cantidades de menaquinona 4 (MK-4), sumándose al homólogo dominante MK-10.

Además de estas diferencias fenotípicas, la similitud de secuencias del gen ARNr 16S entre estas dos especies es muy baja (92,8 %), garantizando la clasificación en dos especies distintas.

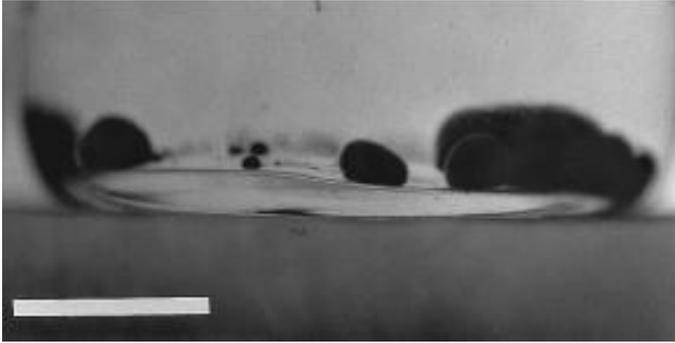


Fig. 21 Agregados de una cepa de *C. aggregans* (MD-66^T), creciendo en el fondo de un vial con tapa de rosca, en medio PE bajo condiciones fototróficas. Barra = 2 cm. Tomado de Hanada *et al.*, 1995a.

Género *Chloronema*

Estas especies mesófilas de agua dulce (al igual que los géneros *Oscillochloris*), han sido observadas principalmente en ambientes anaerobios que contienen cantidades significativas de sulfuro, como los mantos alga-bacterianos formados en las zonas anoxigénicas de las superficies de los sedimentos de los lagos de agua dulce (hipolimno-metalimno de lagos estratificados). En estos hábitats, están usualmente asociados con las bacterias púrpuras del azufre y a las bacterias verdes del azufre, *Beggiatoa* y *Oscillatoria*.

El género contiene dos especies *Chloronema giganteum* (Gnsb-1) y *Chloronema spiroideum* *nov. sp.* La primera fue encontrada en el metalimno e hipolimno superior de lagos de agua dulce poco profundos y estratificados (Gorlenko and Lokk, 1979; Dubinina and Gorlenko, 1975). El agua del lago contenía hierro ferroso en altas concentraciones y poco o nada de sulfuro de hidrógeno.

Ya que ninguna especie ha sido aislada o cultivada exitosamente, su clasificación está basada en la morfología. *C. giganteum* tiene una morfología filamentosa con un diámetro de 2,0-2,5 μm , mientras que el diámetro de *C. spiroideum* es ligeramente más pequeña (1,5-2,0 μm) con morfología de filamentos derechos o en forma de espiral retorcido, densamente envainados, con vesículas de gas, y con rápidos deslizamientos, adjudicándoseles velocidades de alrededor de 10 $\mu\text{m/s}$ (Gorlenko and Pierson 2001).

El rasgo notable de los filamentos de este género es la presencia de Bchl *d*, como pigmento fotosintético, que no es encontrada en ningún otro filamento, por lo que el espectro de absorción *in vivo* de los clorosomas de este grupo, esta desplazado al azul (720 nm).

Género *Oscillochloris*

Organismos de este género fueron aislados de mantos alga-bacterianos de un lago de agua dulce (Gorlenko and Korotkov, 1979).

De las formas mesófilas de agua dulce, *Oscillochloris trichoides* (DG-6^T) fue la única especie cuya descripción estuvo basada en cultivos axénicos, y para la cual fue creada la familia *Oscillochloridaceae* dentro del orden *Chloroflexales* (Keppen *et al.*, 2000; Keppen *et al.*, 1994).

A pesar de ser una forma básicamente de agua dulce, estos organismos han sido hallados en varios ambientes acuáticos, pudiéndolos encontrar por ej. en mantos microbianos de fuentes termales que contenían sulfuro, ríos poco profundos, estuarios litorales y en lagos salobres y alcalinos.

Características

Con morfología filamentosa, presentan entre 0,8-1,4 μm de ancho, pudiendo tener o no delgadas vainas, y forman vesículas intracelulares de gas a lo largo del septo celular. El % de G+C del DNA de *O. trichoides* es de 59,2 % (por el método de temperatura de fusión), teniendo un crecimiento mesófilo óptimo a 28-30 °C, con un límite superior de temperatura a 45 °C y un rango de pH óptimo entre 6,8-9,0. En medio sólido o semisólido presenta un desplazamiento deslizante con una velocidad de 0,2 $\mu\text{m/s}$ (Keppen *et al.*, 1993; Castenholz, 1982).

Metabolismo

La cepa tipo (DG-6^T) es anaerobia estricta, fotótrofa obligada, y puede crecer fotolitoautotróficamente usando sulfuro o hidrogeno como donador de electrones (Keppen *et al.*, 1993). El producto de oxidación final del sulfuro, es el azufre elemental, no ocurren oxidaciones posteriores del azufre. El organismo utiliza también sulfuro, cistina y cisteína como fuente de azufre, mientras que no crece con el sulfato (Keppen *et al.*, 2000).

Se postula que fija el dióxido de carbono por el ciclo Calvin-Bassham-Benson (Ivanovsky *et al.*, 1999), que es generalmente encontrado en organismos autótrofos que pertenecen al filo *Proteobacteria* y *Cyanobacteria*.

Sin embargo, preferentemente crece en condiciones fotolithoheterótrofa en presencia de sulfuro y bicarbonato con un número limitado de compuestos orgánicos como por ej. acetato, piruvato, hidrolizado de caseína, o extracto de levadura. Esto se debe a que no poseen el ciclo completo de TCA (Keppen *et al.*, 2000).

Metabolismo de nitrógeno

A pesar que el metabolismo del nitrógeno ha sido poco estudiado en otros FAPS, se ha detectado actividad nitrogenasa en *O. trichoides* (Keppen *et al.*, 1989). Este hallazgo sugiere que las bacterias mesófilas de agua dulce, fijan nitrógeno molecular para su crecimiento. Los organismos pueden también usar sales de amonio, urea, glicina, glutamato, glutamina, asparagina e hidrolizado de caseína como fuente de nitrógeno.

Lípidos y envoltura celular

El perfil de ácidos grasos, fue algo similar al de *C. aurantiacus*, no presenta cadenas de ácidos grasos largos (C₁₉₋₂₀) y contiene cantidades significativas de ácidos grasos insaturados. El rango de ácidos grasos insaturados/saturados es de 3,3-3,8 (Keppen *et al.*, 2000). A pesar que las células presentan la típica pared Gram-negativa, su coloración al Gram es variable.

Pigmentos

El espectro de absorción “*in vivo*” de las células en suspensión, presenta máximos a 748 y 852 nm en la región del IR. Los pigmentos fotosintéticos son Bchl *c*, y una pequeña cantidad de Bchl *a*. Al igual que en *C. aurantiacus*, la luz y el oxígeno afectaran la síntesis de las bacterioclorofilas (Gorlenko and Pierson, 2001). *O. trichoides* también contiene β -caroteno y γ -caroteno y la quinona predominante fue MK-10.

Dentro de este género ha sido descripta una especie diferente, *Oscillochloris chrysea*, encontrada en la superficie de los sedimentos de cursos de agua dulce, con alto contenido de compuestos orgánicos de aguas residuales domesticas (Gorlenko, 1988; Gorlenko and Pivovarova, 1977). El organismo presenta morfología de filamento grueso con 4,5-5,5 μ m de ancho. La pared celular no tiene membrana externa y posee una capa muy fina de peptidoglicano, presentando tinción positiva al Gram (Gorlenko, 1989; 1988). Posee crecimiento fototrófico y probablemente quimiotrófico, presentando Bchl *a*, así como algunos carotenoides. El organismo crece entre 10-20 °C de temperatura, y a pH 7,5-8,5. Como no se ha aislado ningún cultivo puro de esta especie, se conoce poco de sus propiedades fisiológicas y quimiotaxonómicas.

- **Géneros sin clorosomas: *Heliothrix* y *Roseiflexus***

Los filamentos sin clorosomas consisten en dos géneros *Heliothrix* y *Roseiflexus*, que están filogenéticamente distantes uno del otro (con una similitud de secuencias del gen ARNr 16S de 78,6 %).

A pesar de las diferencias filogenéticas, ambos géneros contienen Bchl *a* como el único pigmento fotosintético y no presentan ninguna de las otras bacterioclorofilas. Presentan principalmente derivados γ -caroteno como el mayor carotenoide, y a diferencia de los filamentos con clorosomas, no contienen β -caroteno (esto se podría deber a que estos β -carotenos estaban localizados en las especies con clorosomas principalmente en los clorosomas) (Takaichi *et al* 2001; Pierson *et al.*, 1984a).

Género *Heliothrix*

Hábitat

Los filamentos termófilos rojo-naranja de *Heliothrix oregonensis* (IS/F-1), fueron aislados de mantos microbianos de una fuente termal en USA (Pierson *et al.*, 1985; 1984a). Se observan como una masa naranja brillante sobre la capa de cianobacterias, formando a menudo “flecós o penachos” sobre la superficie de estos mantos, donde estaban expuestos al oxígeno (Castenholtz, 1988b). También se encontraron filamentos de este género en una laguna alcalina en Oregon (USA) así como en varias fuentes termales alcalinas del Parque Nacional Yellowstone (USA) (Hanada and Pierson, 2006).

Aislamiento

Fueron aislados de mantos microbianos de una fuente termal en una reserva indígena en Oregón (USA), con temperaturas superiores a 55 °C, pH aproximado a 8,5 y sin sulfuro de hidrógeno, estrechamente asociados con una bacteria aerobia no fotosintética, *Isosphaera pallida* (Pierson *et al.*, 1985; Pierson *et al.*, 1984a).

Los enriquecimientos y aislamientos se realizaron en medio IMC, suplementado con glucosa (0,025 %) y Casamino ácidos (0,025 %) como fuente de energía, además de vitaminas (Pierson *et al.*, 1984a). Fueron co-cultivados con un cultivo puro de *I. pallida* e incubados aeróbicamente a 45 °C y a la luz.

Características

El diámetro de los filamentos es de 1,5 μm , y el septo entre células puede verse con un microscopio de contraste de fases. Las células frecuentemente contienen grandes cantidades de gránulos de polihidroxibutirato y presentan “*in vivo*” un espectro de absorción con picos a 795 y 865 nm en la región del infrarrojo cercano, debido a la Bchl *a*. Presenta un metabolismo fotoheterotrófico y un desplazamiento deslizante rápido (1-3 $\mu\text{m/s}$) (Pierson *et al.*, 1985), 100 veces más rápido que las cepas de *C. aurantiacus*. Las células en suspensión muestran una rápida y característica agregación similar a *C. aggregans* (Pierson *et al.*, 1984a), que parece ser debida a esta velocidad de

deslizamiento. El rango de agregación aumenta con el incremento en las células del AMP cíclico (Hanada *et al.*, 2002a).

Género *Roseiflexus*

Hábitat

Dentro de este género se aisló la bacteria facultativa *Roseiflexus castenholzii* (HLO8^T) (Hanada *et al.*, 2002b). Fue encontrada por primera vez en aguas termales de Japón, a una temperatura entre 45,5-68,5 °C y pH entre 7,8 y 8,2. Constituía una capa roja o roja-amarronada característica y predominantemente, por debajo del manto de cianobacterias y *Chloroflexus spp.* (Hanada *et al.*, 2002b; Sugiura *et al.*, 2001). Parece estar ampliamente distribuida en las fuentes termales tanto neutras como alcalinas (Boomer *et al.*, 2002; Pierson and Castenholtz, 1995).

Aislamiento

La muestra fue inoculada e incubada anaeróbicamente a 50 °C, con luz incandescente, en medio PE sólido y con pH 8,0 (Hanada *et al.*, 1995). A las pocas semanas de incubación se observaron en las placas colonias rojas a rojas-amarronadas con algunos contaminantes no fototróficos, que se eliminaron con sucesivas incubaciones en condiciones aerobias y anaerobias alternadas (Hanada *et al.*, 2002b).

Características

Son filamentos no ramificados de largo indefinido, y 0,8-1,0 µm de diámetro (fig. 22). Presentan desplazamiento deslizante y un porcentaje de G+C del ADN de 62,0 % (por HPLC), que es significativamente más alto que el resto de las especies del subfilo. Estos microorganismos termófilos se tiñen negativamente al Gram, crecen entre 45-55 °C y a un pH entre 6-9, siendo la temperatura y pH óptimo 50 °C y 7,5-8,0 respectivamente.

Envoltura celular

Contienen en sus membranas solamente ácidos grasos saturados. El crecimiento termofílico de *R. castenholzii*, a temperaturas ligeramente menores que *C. aurantiacus*, puede ser explicado por el hecho que presenta en sus membranas ácidos grasos de cadenas más cortas que esta última, así como pequeñas cantidades de ácidos grasos iso-ramificados que no han sido detectados en otros filamentos relacionados del filo. La quinona predominante es la menaquinona MK-11 (Hanada *et al.*, 2002b).

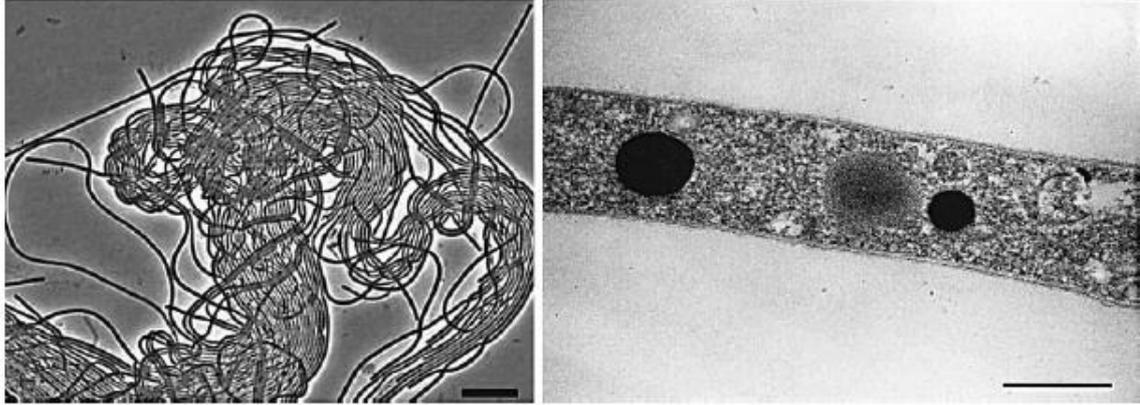


Fig. 22 Microfotografía de células de la cepa HLO8^T de *R. castenholzii*. Izquierda; microfotografía de contraste de fase (barra 10 µm). Derecha; micrografía electrónica de sección ultrafina (barra 0,5 µm). Ambas células fueron crecidas por una semana anaerobiamente en medio PE mínimo bajo luz incandescente (30 W m⁻²). Tomado de Hanada *et al.*, 2002b.

Metabolismo

No se observa crecimiento fotoautótrofo ni fermentativo, pudiendo crecer fotoheterotróficamente, bajo luz y condiciones anaerobias o quimioheterotróficamente en forma aerobia en la oscuridad a presión de oxígeno atmosférica. El extracto de levadura es un buen sustrato para el crecimiento tanto en condiciones aerobias como anaerobias, mientras que citrato, glucosa, y Casamino ácidos, son usados como fuente de carbono solamente bajo condiciones fototróficas (es decir, luz y anaerobiosis), siendo la producción de células, claramente inferior a la obtenida con extracto de levadura. No presenta crecimiento en compuestos orgánicos simples como acetato, butirato, malato, piruvato, succinato, aspartato, glutamato, glicina, manosa, etanol, glicerol y manitol (Hanada *et al.*, 2002b).

Pigmentos

Presenta Bchl *a* probablemente unida a proteínas de membranas y derivados γ -carotenos, dándose la pigmentación tanto en condiciones aerobias como anaerobias. No se detecta la presencia de Bchl *c*, clorosomas, vesículas intracelulares, ni invaginaciones de membranas intracitoplasmáticas (fig. 21derecha) (Hanada *et al.*, 2002b).

2.3.2 Orden *Herpetosiphonales*

Género *Herpetosiphon*

El género *Herpetosiphon* contiene dos especies (tabla 3), la especie tipo *Herpetosiphon aurantiacus* (114-95^T) o sinónimamente *H. giganteus* (Reichenbach and Golecki, 1975;

Holt and Lewin, 1968) y la especie termotolerante de agua dulce *Herpetosiphon geysericola* (Hp gyl^T) (Lewin, 1970) transferida el género por Lewin (fig. 23). Otras cepas de ambientes marinos que fueron inicialmente incluidas dentro del mismo género, fueron reclasificadas como pertenecientes el género *Lewinella* dentro del filo *Flexibacter-Bacteriodes-Cytophaga* (Sly *et al.*, 1998) (tabla 1).

Presenta morfología de bacteria filamentosa multicelulare no ramificada, de largo indefinido, con un desplazamiento deslizante lento sobre superficies sólidas, y se tiñen negativamente al Gram (Nowroozi *et al.*, 2004; Sly *et al.*, 1998).

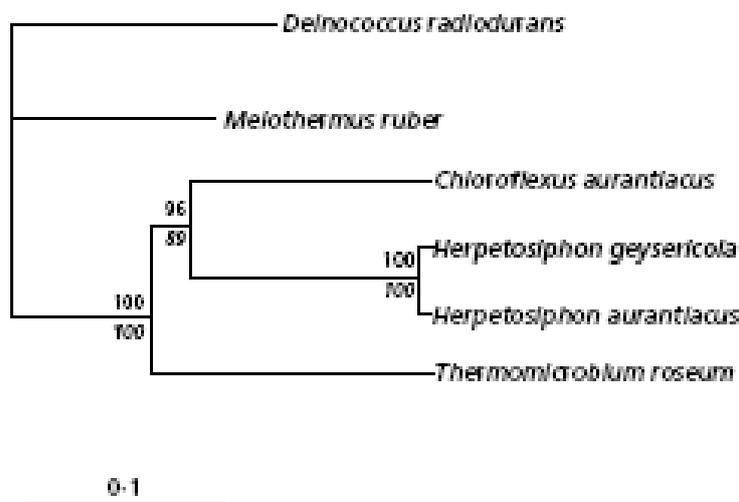


Fig. 23 Árbol filogenético construido por el método de NJ (Neighbor Joining) que muestra las relaciones de las especies *Herpetosiphon* en el filo *Chloroflexi*. La secuencia de *Deinococcus radiodurans* fue usada como outgroup. Los valores de Bootstrap de 100 repeticiones se muestran en cada nodo, los de la parte superior corresponden al método NJ y los de la inferior al método de MP (Maximum parsimony). La barra representa 10 sustituciones de nucleótidos por 100 nucleótidos de la secuencia del gen ARNr 16S. Tomado de Sly *et al.*, 1998

***H. aurantiacus* (114-95T)**

Se aisló de una muestra de un lago en Minnesota (USA), como una bacteria filamentosa no ramificada, estrictamente aerobia y no fotótrofa (Holt and Lewin, 1968).

Características

Holt and Lewin, (1968) describieron este organismo como células cilíndricas de 1,0-1,5 μm por 5-10 μm que forma filamentos multicelulares, septados transversalmente, de 500 μ o más de largo, con desplazamientos deslizantes lentos en superficies sólidas (describieron también la presencia de vainas que fueron finalmente descartadas por Nowroozi, *et al.* en 2004).

En un medio agar diluido (por ej. leche peptonada al 0,3 %), forma colonias planas rugosas y difusas con producción de pigmentos naranjas. Presenta reacción de catalasa

positiva y de citocromo oxidasa, indol, y Voges-Proskauer negativas. No presenta crecimiento en caldo de leche peptonada al 0,3 %, e hidroliza almidón, gelatina y caseína pero no celulosa, ni tampoco reduce nitrato.

Presenta un porcentaje de G+C del ADN de 48,1 % (por buoyant-density). Una característica de *H. aurantiacus*, es el color naranja causado por los pigmentos carotenoides (derivados γ -glucosidos-carotenos) en la membrana citoplasmática, la cual esta fuertemente empaquetada, las únicas quinonas encontradas fueron las MK 6 y 7 (Kleining and Reichenbach, 1977).

Frecuentemente se observa membranas intracitoplasmáticas (mesosomas) dentro de las células y no se observó la presencia de esporas o algún otro estado vegetativo (Nowroozi *et al.*, 2004; Reichenbach and Golecki, 1975).

Pared y envoltura celular

No se conoce mucho de la composición de la membrana celular. No se observa la presencia de membrana externa como una estructura separada, probablemente porque se encuentre fusionada con la capa subyacente de peptidoglicano, existiendo una capa adicional por fuera de este complejo peptidoglicano-membrana externa, que diferente a la clásica vaina que se definió originariamente para el género (Nowroozi *et al.*, 2004; Reichenbach and Golecki, 1975).

La pared celular carece de la capa de LPS, conteniendo L-ornitina en lugar de ácido meso-diaminopimelico, ambas características de la pared celular de células Gram positivas (Jürgens *et al.*, 1989). Se observa la presencia de un canal proteico que podría sugerir que *H. aurantiacus* tuviera una barrera permeable en su superficie, similar a cualquier otra bacteria Gram-negativa (aunque también se conoce la existencia de bacterias Gram-positivas con barreras permeables en la superficie de su capa de peptidoglicano) (Harwardt *et al.*, 2004).

Desplazamiento celular

Todas las cepas estudiadas presentan una estructura tipo anillo localizadas en la superficie de la célula y solo en una de ellas se observó que dicha estructura parecía estar asociada con una red de fibras (Nowroozi *et al.*, 2004; Reichenbach and Golecki, 1975). Esto podría deberse a que en las distintas cepas existieran diferentes tipos y diámetros de fibras que dificultaran la observación. Nowroozi *et al.* (2004) propusieron a dicha estructura, conectada con la red de fibras en la superficie celular, como la responsable del

movimiento deslizando y la secreción de esa “baba” de fibras serían necesarias para la adhesión a la superficie sólida, así como para facilitar el movimiento.

2.4. SUBFILO IV

En este subfilo se ubicaron solamente secuencias de clones ambientales. Estas secuencias fueron obtenidas de ambientes marinos profundos (Inagaki *et al.*, 2006; Chandler *et al.*, 1998; Giovannoni *et al.*, 1996), esponjas marinas (Hentschel *et al.*, 2002), ambientes de agua dulce (Urbach, *et al.*, 2001) y suelos (Dunbar *et al.*, 2002).

Los estudios independiente de cultivo como el clonado y la secuenciación de los genes ARNr 16S sugirieron que los miembros de este subfilo eran ubicuos y potencialmente abundantes en los ambientes marinos, debiendo por tanto jugar un rol importante en la biogeoquímica tanto de las superficies, como de las profundidades marinas (Morris *et al.*, 2004).

Muchos factores impidieron una adecuada cuantificación de la población microbial de las muestras marinas, a partir de librerías de clones (variabilidad de la lisis celular, diferencia en el número de copias de los genes ARNr 16S, etc.) y en general los microorganismos pequeños, de crecimiento lento como los del plancton marino son difíciles de detectar por FISH.

Con los miembros de este subfilo, se debe agregar el hecho que no se han obtenido sondas adecuadas para detectarlos, por lo que Morris *et al.* (2004), usaron la estrategia de utilizar múltiples sondas contra diferentes regiones del gen ARNr 16S. De este modo amplificaban la señal obtenida y se aseguraban de detectarlos con al menos una las sondas.

Para ello construyeron las sondas SAR202-104R y SAR202-312R dirigidas contra el clúster SAR202. Los 19 clones marinos del clúster hibridan con al menos una de las sondas. Solo dos de los miembros del clúster no pudieron ser detectados por al menos una de ellas, el clon CL500-9 encontrado en el bacterioplancton de un lago y el clon FTL276 de un terreno contaminado (tabla 9).

Sonda SAR202-104R; fue diseñada contra la región comprendida entre las posiciones 104 y 121 del clúster (referidas al gen ARNr 16S de *E. coli*). Detectó 20 de los 30 miembros del clúster SAR202 (de los que se tiene la secuencia completa de sus genes ARNr 16S) y 15 de los 19 clones de ambientes marinos. Por fuera del clúster, también detectó los genes ARNr 16S de *Sulfolobus solfataricus* y los clones ambientales relacionados, conteniendo un desapareamiento con varias secuencias, como por ejemplo con los miembros del clúster marino SAR11. Sin embargo a la temperatura de trabajo, los

miembros de clúster SAR11 perdieron la fluorescencia por lo que no fueron detectados durante el estudio.

Sonda SAR202-312R; fue diseñada contra las regiones comprendidas entre 312 y 329 del clúster (referidas al gen ARNr 16S de *E. coli*). Detectó 25 de los 30 miembros del clúster SAR202 (de los que se tiene la secuencia completa del gen ARNr 16S) y 17 de los 19 clones de ambientes marinos. También detectó por fuera del clúster varios miembros de los candidatos a división OP11 y tuvo un mínimo de dos desapareamientos con los genes ARNr 16S fuera del clúster.

Filogenéticamente el clúster está dividido en cuatro subgrupos (fig. 24) en los que siempre se encuentran clones marinos y solo el subgrupo 2 estaba constituido exclusivamente por ellos (tabla 9). No todos los clones se agrupan dentro de estos subgrupos sino que algunos forman líneas independientes de descendencia dentro del clúster SAR202 (ej. clones SAR269, FTL276 en fig. 24).

Los trabajos de Giovannoni *et al.* (1996) propusieron que los organismos del clúster SAR202 eran miembros significativos de las comunidades microbianas del mar abierto y que estaban adaptadas a crecer en una zona determinada de la columna de agua, que era justo por debajo de la zona de máxima clorofila profunda (DCM-deep chlorophyll maximum). Esto fue reafirmado por Morris *et al.* (2004), confirmando que se extendían además a través de la zona mesopelágica y al océano profundo. En la zona mesopelágica constituían alrededor del 10 % de la población microbiana detectadas por DAPI, donde debido a su mayor tamaño comparado con las demás células del bacterioplancton, contribuyen probablemente en una buena proporción con la biomasa microbiana en la profundidad del océano (Morris *et al.*, 2004).

CLONES	FUENTE	CANTIDAD DE DESAPAREAMIENTOS		REF.
		SAR202-104R	SAR202-312R	
Subgrupo 1				
SAR272	agua del Mar del Sargaso a 250 m	0	0	1
SAR256	agua del Mar del Sargaso a 250 m	0	0	1
SAR188	agua del Mar del Sargaso a 250 m	1	0	1
D92-36	agua del Mar del Sargaso a 200 m	0	0	1
AEGEAN_116	agua del Norte del Mar Egeo a 200m	0	0	s/publicar
Artic 95A-18	agua del Oceano Ártico a 500 m	2	0	2
PAWS52f	agua de ambientes simbios de esponjas a 20-30 m en el Oceano Pacífico	0	0	3
CL500-9	agua dulce del Lago Crater a 500 m	3	3	4
CL500-10	agua dulce del Lago Crater a 500 m	0	1	4
Subgrupo 2				
SAR261	agua del Mar del Sargaso a 250 m	1	0	1
SAR292	agua del Mar del Sargaso a 250 m	0	0	1
SAR319	agua del Mar del Sargaso a 250 m	0	0	1
SAR317	agua del Mar del Sargaso a 250 m	0	0	1
SAR250	agua del Mar del Sargaso a 250 m	0	0	1
SAR194	agua del Mar del Sargaso a 250 m	0	1	1
Subgrupo 3				
SAR307	agua del Mar del Sargaso a 250 m	0	0	55
SAR202	agua del Mar del Sargaso a 250 m	0	0	5
D92-22	agua del Mar del Sargaso a 200 m	1	0	1
Arctic96BD-6	agua del Oceano Ártico a 500 m	0	0	2
TK04	agua de ambientes simbios de esponjas a 7-15 m en el Mar Mediterraneo	0	0	3
MBAE74	sedimentos marinos del Océano Pacífico	3	0	s/publicar
MBMPE46	sedimentos marinos del Océano Pacífico	0	0	s/publicar
CO83	suelos de bosques de Arizona	0	0	6
Subgrupo 4				
SAR259	agua del Mar del Sargaso a 250 m	0	0	1
MBMPE42	sedimentos marinos del Océano Pacífico	4	0	s/publicar
SAR269	agua del Mar del Sargaso a 250 m	0	0	1
SAR242	agua del Mar del Sargaso a 250 m	0	1	1
H1.2.f	subsuelo profundo paleozoico	2	0	7
MBAE68	sedimentos marinos del Océano Pacífico	2	0	s/publicar
FTL276	tierras contaminadas con tricloroetano	1	1	s/publicar

Tabla 9. Muestra los desapareamientos con las sondas específicas para miembros del cluster SAR202. Los clones coloreados no son detectados por las sondas, ya que presentan desapareamientos con ambas. Referencias: (2)-Bano and Hollibaugh, 2002. (4)-Chandler *et al.*, 1998, (7)-Dunbar *et al.*, 2002, (13)-Giovannoni *et al.*, 1996, (18)-Hentschel *et al.*, 2002, (41)-Urbach *et al.*, 2001. Modificado de Morris *et al.*, 2004.

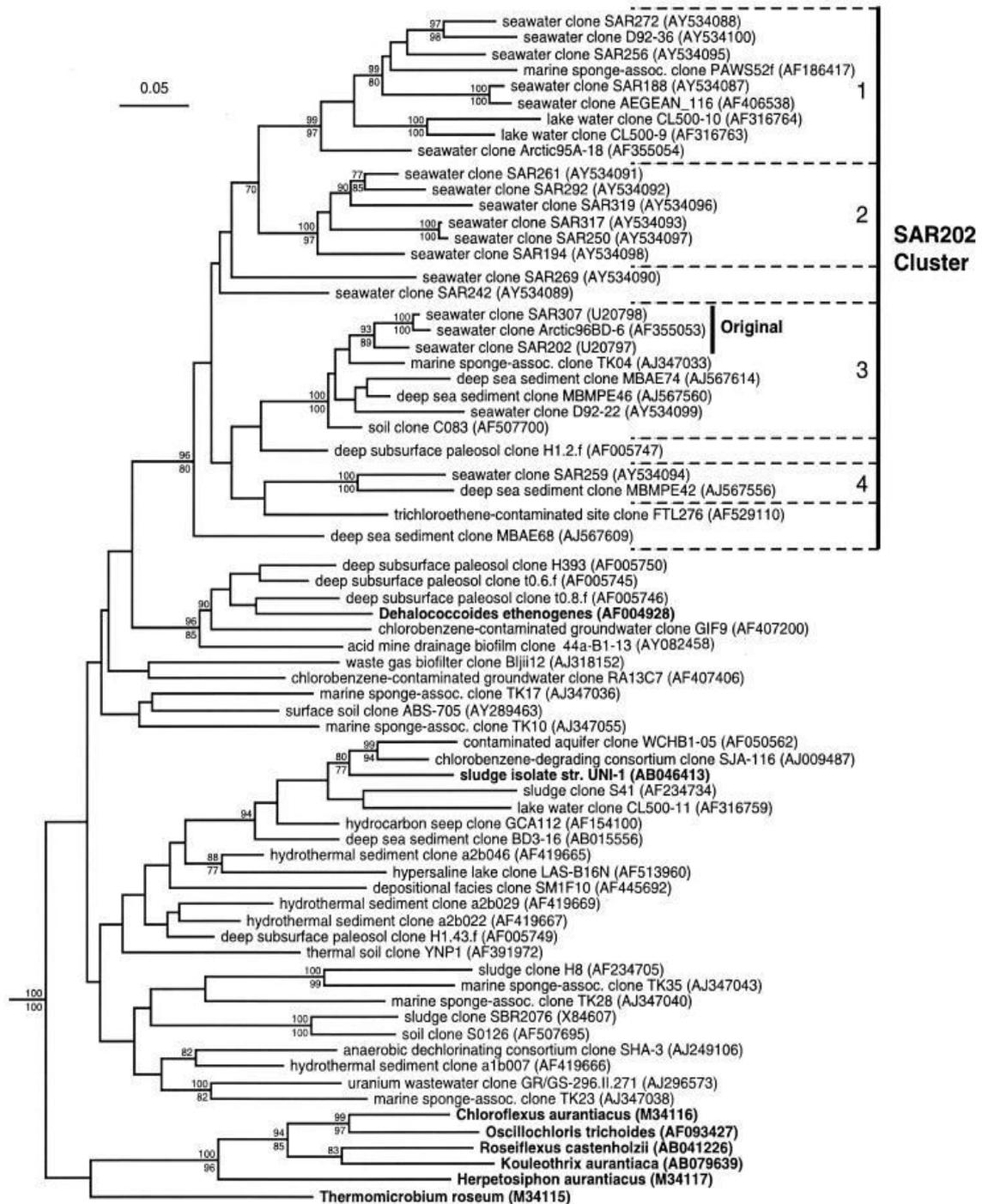


Fig. 24 Árbol filogenético basados en los genes ARNr 16S del cluster SAR202 y miembros del filo *Chloroflexi*. Las secuencias de los genes ARNr 16S de los microorganismos cultivables están en negrilla, mientras que en las de estudios independientes de cultivo, se indica el ambiente de donde provienen los clones. Los números de acceso al GenBank se indican entre paréntesis. En los nodos se indican los Bootstrap mayores a 70 %, los valores superiores corresponden a análisis de distancia evolutiva y los de abajo a parsimonia. La barra vertical indica los subcluster (del 1 al 4). "Original" indica la profundidad filogenética del cluster SAR202 original descrito en Givaninni *et al.*, 1996. Barra =0.05 sustituciones por posición nucleotídica. Tomado de Morris *et al.*, 2004.

2.5. Clase *THERMOMICROBIALES*

Este subfilo estaba constituido inicialmente por las especies *Thermomicrobium roseum* (P-2^T) y *Sphaerobacter thermophilus* (S 6022^T). Ambas especies fueron originariamente clasificadas dentro del subfilo III del filo *Chloroflexi* (Woese, 1987). Con nuevos análisis filogenéticos, la inclusión de nuevas secuencias, más secuencias de referencia (outgroups), y luego de varias reclasificaciones (Garrity and Holt, 2001b; Stackebrandt *et al.*, 1997; Demharter *et al.*, 1989), se los agrupó nuevamente como miembros del filo *Chloroflexi*, en una nueva clase denominada *Thermomicrobia* (fig. 25) (Hugenholtz and Stackebrandt, 2004).

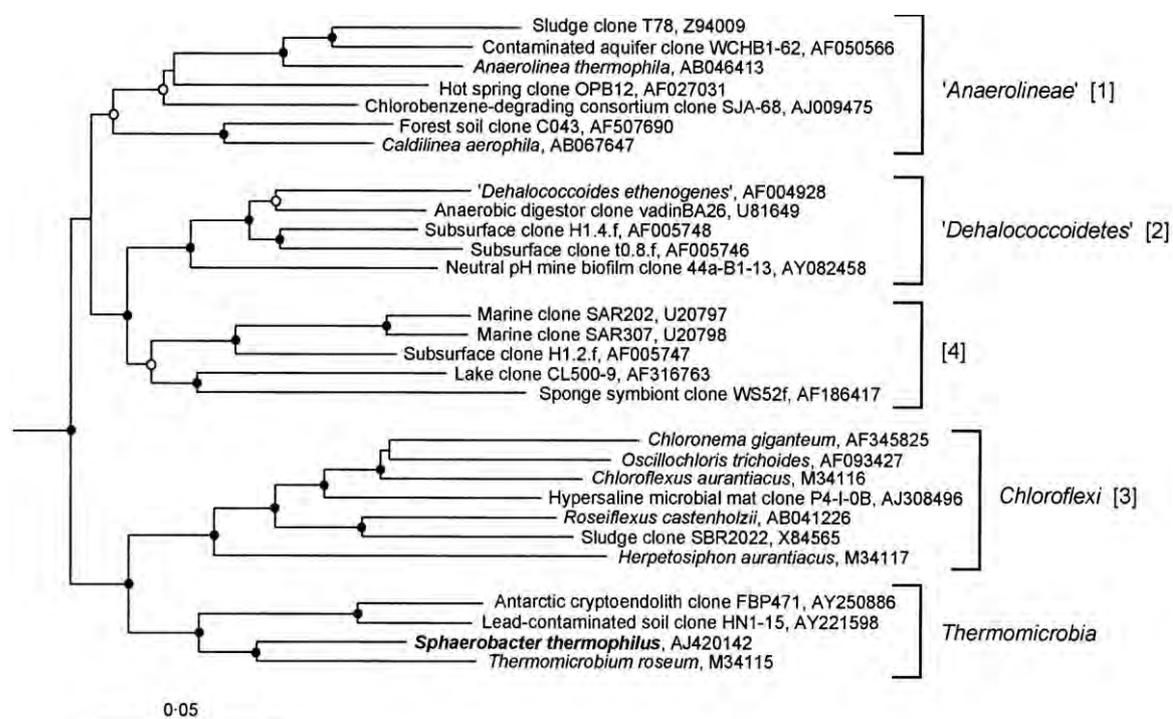


Fig. 25 Árbol de distancias evolutivas del filo *Chloroflexi* basado en análisis comparativos de las secuencias de los genes del ARNr 16S, que muestra la afiliación filogenética de *Sphaerobacter thermophilus*. En los puntos de ramificación se indican con círculos los bootstrap de distancias evolutivas y probabilidades Bayesianas, con círculos rellenos, valores mayores a 90 % y círculos blancos, valores mayores a 75 %. Fueron usados como outgroups (no se muestran) *Escherichia coli* (X80725), *Bacillus subtilis* (D26185) y *Corynebacterium diphtheriae* (X84248). Los subfilos están indicados con paréntesis rectos a la derecha de la figura. Los nombres de clases según Garrity and Holt (2001a, b) y los nombres informales basados en las especies representativas entre comillas. Los números entre paréntesis rectos que siguen a los nombres, corresponden a los subfilos según Hugenholtz *et al.*, (1998). Barra = 0.05 cambios por nucleótido. Tomado de Hugenholtz and Stackebrandt, 2004.

La clase "Anaerolineae" aquí definida como informal, fue formalmente definida como *Anaerolineae* por Sekiguchi *et al.*, 2003 y la clase "Dehalococcoidetes" fue formalmente definida como *Dehalococcoidia* por Löffler *et al.*, 2013).

En el 2004, Botero *et al.*, propusieron la inclusión en esta clase de la cepa *Thermobaculum terrenum* (YNP1^T) y en 2012 luego de los análisis filogenéticos también se incluyó a la bacteria *Nitrolancetus hollandicus* (Lb^T), el primer organismo nitrificante reconocido dentro del filo *Chloroflexi* (Sorokin *et al.*, 2012) (tabla 1).

***Thermomicrobium roseum* P-2^T**

Aislamiento

Esta cepa fue aislada de un manto microbial de una fuente termal del Parque Yellowstone en USA (Jackson *et al.*, 1973). La muestra fue tomada cerca de donde emanaba la fuente termal, con un pH de 8,9 y una temperatura de 74 °C. Se realizó el aislamiento en placa incubando a 70 °C, en un medio con extracto de levadura (0,1 %), triptona (0,1 %) y una mezcla de sales minerales. Al cabo de una semana de incubación, se obtuvo una población compacta de colonias rosadas (Perry, 1984).

Características

Las células de esta cepa son bastones cortos, simples o en pares, de forma irregular, con un diámetro de 1,3-1,8 µm y 6,0 µm de largo. Son aerobios obligados, catalasa positivos, no móviles ni formadores de esporas. Presentan temperatura y pH óptimo de crecimiento entre 70-75 °C y 8,2-8,5 respectivamente, con un porcentaje de G+C en el ADN de 64 %. Son microorganismos quimiorganotrofos, respiradores estrictos, siendo el oxígeno el aceptor final de electrones. Se observa un crecimiento máximo en un medio con extracto de levadura, peptona (ambos al 0,5 %) y sales minerales (Perry, 1984).

Contienen una peculiar estructura de membrana celular con lípidos con dioles de cadena larga (sin ramificar o metil-ramificados) en lugar del clásico glicerol, lo que se postula es la base de su estabilidad a las altas temperaturas. Al aumentar la temperatura de crecimiento, se observa que baja la relación de cadenas metil-ramificadas/sin ramificar, así como un pequeño aumento en el largo de las cadenas, tanto en lípidos como en ácidos grasos (Pond and Langworthy, 1987; Pond *et al.*, 1986).

Presentan reacción negativa a la tinción de Gram, con una pared celular que no contiene cantidades significativas de peptidoglicano, y que por otro lado esta compuesta principalmente por una proteína con un peso molecular monomérico de 75000 Dalton, con una alta proporción de los amino ácidos prolina, ácido glutámico, glicina y alanina (Merkel *et al.*, 1980).

***Sphaerobacter thermophilus* S 6022^T**

Fue aislada de muestras de lodos termófilos aerobios de un fermentador a escala de laboratorio y de varias plantas estabilizadoras municipales, como una bacteria fenotípicamente muy parecida a *T. roseum* que es la especie relacionada más cercana (Hensel *et al.*, 1989).

Características

Presenta morfología de bastones irregulares, reacción de catalasa y tinción de Gram positivos. No forman esporas, son aerobias estrictas, con un metabolismo quimioheterótrofo, y el contenido de G+C en el ADN es similar al de *T. roseum* (64 %) (Hensel *et al.*, 1989; Demharter *et al.*, 1989; Garrity and Holt, 2001b).

No se ha estudiado la estructura de la membrana de *S. thermophilus*. Hugenholtz and Stackebrandt, (2004) proponen que podría contener también una estructura de membrana celular similar a *T. roseum*, dado el hecho de que ambas son termofilicos y a su cercana relación filogenética.

***Thermobaculum terrenum* (YNP1^T)**

Fue aislada de suelo termal con condiciones extremas, que al momento de toma de la muestra presentaba un pH 3,9 y un rango de temperaturas entre 62 °C en la superficie y 92 °C a 12 cm de profundidad en el Parque Yellowstone en USA. Los análisis filogenéticos de la secuencias del gen ARNr 16S ubican a esta cepa en un clúster con secuencias de clones ambientales del filo *Chloroflexi* dentro de la clase *Thermomicrobia*.

Aislamiento

Las muestras de suelo se suspendieron en buffer (NH₄)₃PO₄ 0,1 M a 65 °C, se agitaron durante 30 min, y se realizaron diluciones sucesivas que fueron repartidas en agar con extracto de levadura 0,1 %. Después de 4 días de incubación a 65 °C se visualizaron colonias rosadas de las que se aisló la cepa YNP1^T. Estudios posteriores demostraron que la cepa crecía mucho mejor en el medio R2A (Difco, conteniendo 0,5 g/L de almidón, glucosa, extracto de levadura, peptona proteasa, Casamino ácidos, y 0,3 g/L de piruvato de sodio). Este último medio fue usado para mantener el cultivo y para los test de crecimiento (Botero *et al.*, 2004).

Características

Son bastones aerobios estrictos, no formadores de esporas, que por microscopía de transmisión electrónica muestran una gruesa capa de peptidoglicano (aproximadamente de

34 nm de ancho) exterior a la membrana citoplasmática, similar a las de las bacterias Gram-positivas.

En las condiciones estudiadas no presentan movilidad y por microscopía electrónica no muestran evidencias de presentar flagelos. Son capaces de crecer heterotróficamente con varios compuestos carbonados (por ej. fructosa, glucosa, ribosa, sorbitol, sacarosa y xilosa) con el requerimiento de una baja concentración de extracto de levadura. Sólo utilizan oxígeno como aceptor de electrones y no son afectados por la presencia de luz. Este metabolismo heterotrófico es consistente a las condiciones del ambiente en que fue detectado este microorganismo.

Presenta un contenido de G+C de 56,4 %, y crecimiento entre 41-75 °C, con un pH entre 6-8, siendo las condiciones óptimas de crecimiento a 67 °C, pH 7,0, en un medio complejo con 0,5 % de NaCl. La membrana se compone principalmente por ácidos grasos de cadena recta y ramificada consistente con la gruesa pared celular con mureína presente en grandes cantidades.

Esta bacteria fue aislada de una muestra que tenía un pH 3,9 que no es su pH óptimo de crecimiento, no presenta formación de esporas que la podrían proteger del medio ambiente en que se encontraba y estaba presente en muy baja proporción en la muestra de suelo (100 colonias/g de suelo). Con estas observaciones los investigadores concluyeron que se trataba de una bacteria que había sido de algún modo introducida en ese ambiente y que se mantenía viable en él (Botero *et al.*, 2004).

***Nitrolancetus hollandicus* Lb^T**

La cepa tipo fue aislada del lodo un bioreactor nitrificante, que mostraba una alta actividad nitrito-oxidante pero que no contenía cantidades funcionalmente significativas de bacterias nitrito oxidantes (NOB). Al mirar el lodo al microscopio observaron una alta densidad de células, cuya morfología se parecía a la punta de una lanza. Se realizaron enriquecimientos con diluciones seriadas de alícuotas de los lodos, en un medio que contenía nitritos y buffer $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{CO}_2$ que condujeron al enriquecimiento en la cepa posteriormente denominada *Nitrolancetus hollandicus* Lb^T.

Aislamiento

Los cultivos se incubaron a 37 °C en un agitador rotatorio (100-120 rpm). El medio líquido mineral contenía KH_2PO_4 (1,1 mM) y CaCl_2 (0,3 mM) disuelto en agua destilada, colocado en botellas de suero (con una relación líquido-aire de 1:5). En la fase gaseosa se inyectó CO_2 a una concentración final de 10% (v/v) y fue suplementado con 1 mL/L de

medio de solución traza de metales (Pfennig and Lippert, 1966), 1 mM MgSO₄, 5 mM NH₄HCO₃ y 20 mM KNO₂. El medio para cultivos mixotróficos fue además suplementado con 40 mM NaHCO₃. El pH se mantuvo entre 6,9-7,4 con el agregado de NH₄HCO₃ o CO₂. Las bacterias oxidadoras de amonio (AOB) que residían en los flóculos fueron eliminadas intercalando sucesivas etapas de cortas centrifugaciones durante los enriquecimientos (Sorokin *et al.*, 2012).

El medio sólido fue preparado con una mezcla 1:1 de medio líquido y agar Noble lavado al 4% a 50 °C (Sorokin *et al.*, 2012).

Características

Presenta tolerancia a un amplio rango de temperatura (25-63 °C) siendo la óptima para el crecimiento 40 °C y la máxima 46 °C. Muestra crecimiento en un rango de pH de 6,2-8,3, siendo el pH óptimo entre 6,8-7,5 y se observa una baja afinidad por el nitrito ($K_s = 1\text{mM}$). El rango de concentración óptima de NO₂⁻ es de 5-20 mM, pero mostró una alta tolerancia al NO₂⁻ (por encima de 75 mM) y al amonio (más de 200 mM) a un pH de 7,5. Reacciona positivamente a la tinción de Gram. Su envoltura celular comprende una estructura en multicapas, con una fina capa electrodensa de peptidoglicano y varias capas externas que podían consistir en hidratos de carbono o proteínas. El análisis químico no revela la presencia de ácido meso-diaminopimélico en la capa de peptidoglicano, característico de la pared celular de las bacterias Gram-negativas. En lugar de ello se detecta ornitina y lisina, lo que sugiere que la composición de peptidoglicano de *N. hollandicus* se asemeja a la de las bacterias Gram-positivas (fig. 26). Se detecta la presencia de lípidos no comunes en las membranas (1,2-dioles) que la distingue de las otras NOB conocidas. Crece en un medio con nitrito y CO₂ siendo capaz de usar formiato como fuente de energía y de carbono. Las células son relativamente grandes (1 a 1,2 × 2 a 4 μm), no móviles, con forma de bastones simples, en pares o cadenas cortas que se unen por los polos (fig. 26).

Crece aeróbicamente como quimiolitotrofa nitrato oxidante, en un medio de cultivo con NO₂⁻ como única fuente de energía y HCO₃⁻/ CO₂ como única fuente de carbonos, siendo el primer organismo nitrificante reportado dentro del filo. La capacidad de obtener energía de la oxidación de nitrito a nitrato es el segundo paso en la nitrificación, que representa el mayor proceso biogeoquímico en los sistemas acuáticos y terrestres. Sin embargo no es capaz de asimilar nitrito como las otras NOB conocidas y requiere de amonio para su crecimiento.

Cuando se incubaba en medio con nitrito y formiato empieza a consumir el formiato cuando la mayoría del nitrito se ha acabado (el uso secuencial de nitrito y formiato recuerda el crecimiento diaúxico), pero la capacidad del uso del formiato requiere la pre-incubación en nitrito. Esto podría explicarse si se necesitara la expresión de los genes nitrito oxidante para la respiración de formiato.

No se observa crecimiento con otras fuentes inorgánicas donadoras de electrones como H_2 o tiosulfato. Bajo condiciones anoxicas pequeñas cantidades de nitrato son reducidas a nitrito en presencia de formiato pero no se observa crecimiento.

El análisis de la secuencia de su genoma revela la presencia de todos los genes necesarios para la fijación del CO_2 por el ciclo de Calvin y una nitrito oxido reductasa (NXR) similar a la que presentan la proteobacterias nitrito oxidantes. Los análisis genéticos comparativos sugirieron la posibilidad de que la transferencia genética horizontal de los módulos de las NXR, sea la responsable de la propagación de la capacidad de obtener energía a partir de la oxidación de nitrito durante la evolución bacteriana (Sorokin *et al.*, 2012).

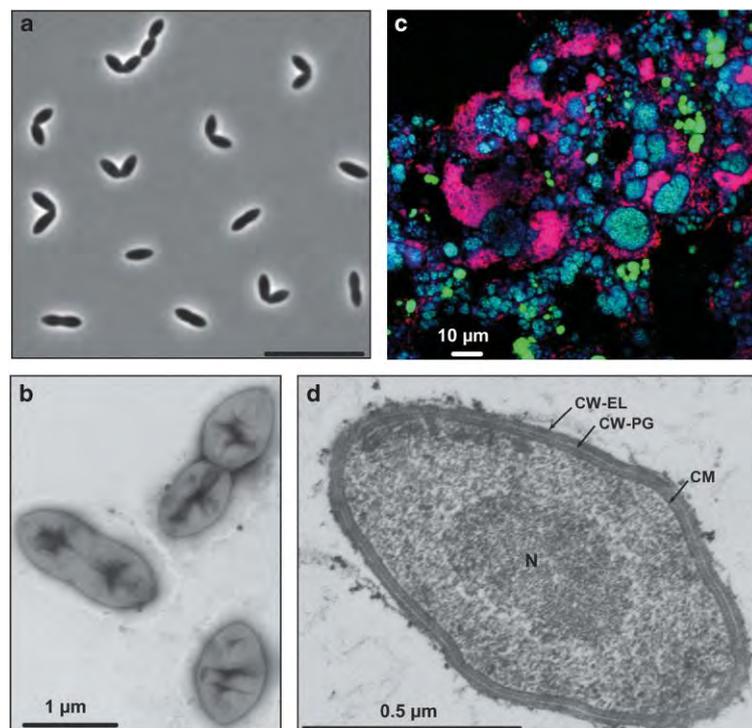


Fig. 26 Morfología y detección *in situ* de *N. hollandicus*. (a) Micrografía de contraste de fase de un cultivo puro creciendo autotróficamente. (b) Micrografía de transmisión de electrones de las células del cultivo del panel a. (c) La detección *in situ* de *N. hollandicus* y AOB en el lodo activado. Las poblaciones se detectaron por FISH utilizando las sondas Ntlc804 (específicos para *N. hollandicus*), Cluster6a192 (específico para AOB del linaje de *N. oligotropha*) y la mezcla de sondas EUB338 dirigido la mayoría de las *Bacterias*. Las células de *N. hollandicus* aparecen magenta, AOB-verde-azuladas y las otras bacterias de color azul oscuro. (d) Micrografía electrónica de una sección ultrafina de una célula de un cultivo creciendo mixotróficamente en un medio que contiene NO_2^- , HCO_3^-/CO_2 y formiato. Se observa la envoltura celular en capas. N, nucleóide; CW-EL, capa externa de la pared celular; CW-PG, peptidoglicano; CM, membrana.citoplásmica. Tomado de Sorokin *et al.*, 2012.

2.6. Clase **KTEDONOBACTERIA**

El primer aislamiento de la clase fue *Ktedonobacter racemifer* (SOSP1-21^T) originalmente denominada *Ktedobacter racemifer* y corregida en el 2007 (validation list No. 114, 2007).

La clase *Ktedonobacteria* hasta el 2010 no había sido asignada a ningún filo, Yabe *et al.*, (2010, 2011) trabajando con una nueva secuencia del gen ARNr 16 S más larga de *K. racemifer* obtuvieron valores de bootstrap mayores de 89 % para el clúster *Chloroflexi*. Basándose en sus estudios filogenéticos propusieron la inclusión de la cepa dentro del filo *Chloroflexi*, así como la división de la clase *Ktedonobacteria* en dos clústeres, el orden *Ktedonobacterales* y el orden *Thermogemmatissporales* (clúster GS) (fig. 27, tabla 1).

A su vez el orden *Ktedonobacterales* lo subdividen al menos en 4 clústeres o familias a los que denominan clústeres 1, 2 (que contiene a *K. racemifer*), 3 y la familia *Thermosporotrichacea*. Esta última contiene a la cepa SK20-1, obtenida de un compost maduro de un compostador que se utilizaba para el tratamiento de excremento de ganado, para la que proponen la denominación de *Thermosporotrix hazakensis* (SK20-1^T) (Yabe *et al.*, 2010).

Por otro lado al orden *Thermogemmatissporales* (clúster GS) contiene 4 cepas de cultivos aislados de suelos geotérmicos de Nueva Zelanda cuyos nombres no han sido validados (Stott *et al.*, 2008) y se incluyeron dos cepas nuevas ONI-1 y ONI-5 aisladas por Yabe *et al.*, (2011) de hojas caídas en suelos geotérmicos (60-90 °C a 10-15 cm de profundidad) en el área de la prefectura de Miyagi en Japón, para las que propusieron los nombres de *Thermogemmatisspora onikobensis* (ONI-1^T) y *Thermogemmatisspora foliorum* (ONI-5^T) respectivamente.

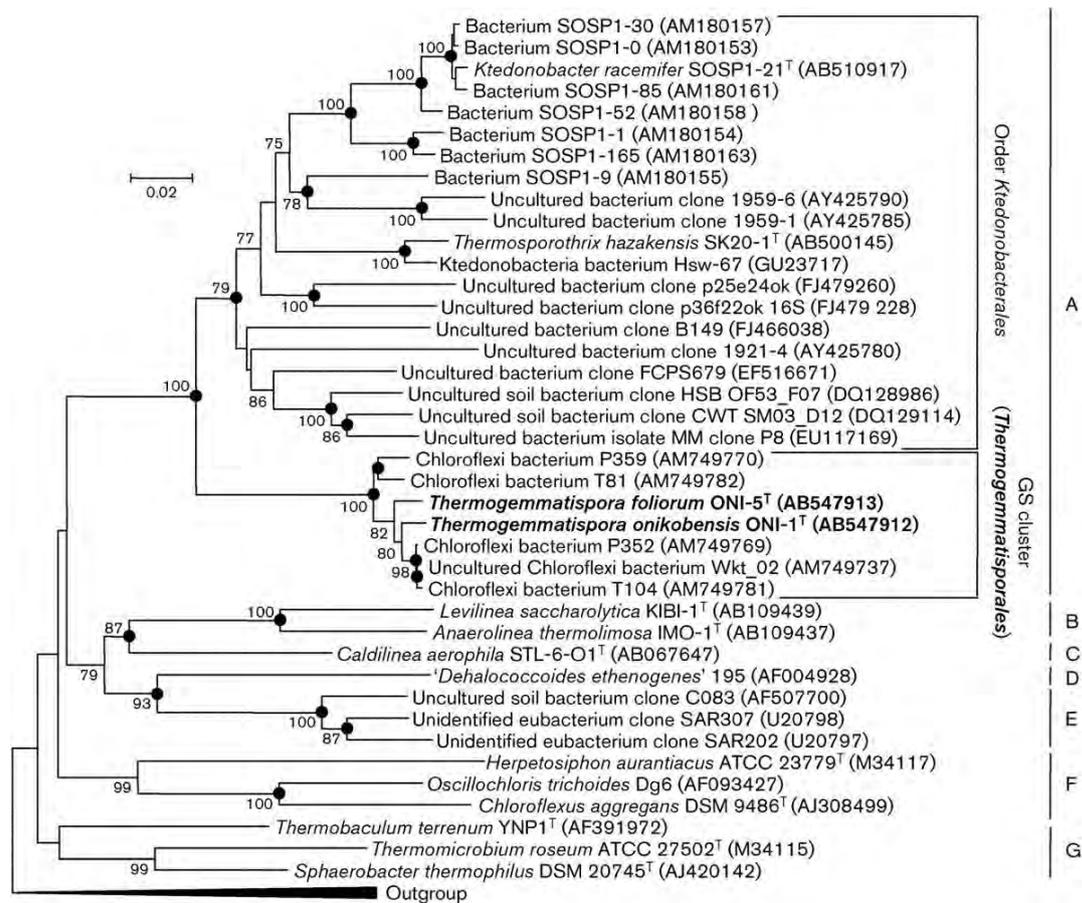


Fig. 27 Árbol filogenético utilizando el método de Neighbour-joining basado en 1.172 posiciones alineadas de la secuencia del gen ARNr 16S. Se indican en los nodos los valores de bootstrap superiores a 70 % sobre la base de 1.000 replicas. Barra, 2% de disimilitud de secuencia. El outgroup consistió en secuencias de *Bacillus subtilis* Lactipan (GenBank adhesión no. AJ277905), *Streptomyces arenae* ISP 5293^T (AJ399485), *Thermus thermophilus* HB8T (X07998), *Thermotoga maritima* MSB-8^T (M21774) y *Aquifex pyrophilus* Kol5a^T (M83548). Los números de acceso DDBJ / EMBL / GenBank se muestran entre paréntesis. Los círculos rellenos indican nodos con por valores bootstrap superiores a 70 % por el método de Neighbour-joining (Saitou and Nei, 1987), de máxima verosimilitud (Felsenstein, 1981) y de máxima parsimonia (Fitch, 1971). Clases: A, *Ktedonobacteria*; B, *Anaerolineae*; C, *Caldilineae*; D, *Dehalococcoidia*; E, clúster SAR; F, *Chloroflexi*; G, *Thermomicrobia*. Tomado de Yabe *et al.*, 2011.

2.6.1 Orden *Ktedonobacterales*

Ktedonobacter racemifer SOSP1-21^T

La cepa SOSP1-21^T fue aislada de una muestra de suelo de un bosque de algarrobos negros en Gerenzano al norte de Italia. Fue mantenida desecada en un recipiente de plástico sellado a temperatura ambiente (Cavaletti *et al.*, 2006).

Aislamiento

Alícuotas de la muestra fueron secadas en un horno con vacío por 7 días a 30 °C y finalmente molidas con mortero. Con una punta estéril se depositaron unos pocos mg

directamente en placas HSA5 (Busti *et al.*, 2006). Después de 8 semanas de incubación a 28 °C, las colonias se transfirieron individualmente a placas de agar ISP3 (Shirling and Gottlieb, 1966), con un pH 5,5-6,0 acidificando con HCl. Se incubó durante 3 a 4 semanas a 28 °C. Las cepas obtenidas en ISP3 agar se mantuvieron en caldo nutriente con glicerol (3 g/L de extracto de buey, 5 g/L de peptona en 20 % de glicerol) a -80 °C.

El crecimiento en medio líquido se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 y 50 mL que contenían 100 y 20 mL respectivamente de medio ATSB (Busti *et al.*, 2006), incubado durante 5 a 8 días a 28 °C en un agitador rotatorio a 200 rpm. Las células recogidas, se lavaron tres veces con agua estéril, y se utilizaron como inóculos para los cultivos y la caracterización fisiológica o fueron liofilizadas para los análisis químico-taxonómicos (Cavaletti *et al.*, 2006)

Características

La cepa SOSPI-21^T en medio sólido o líquido exhibe un micelio ramificado y morfología filamentosa similar a la de algunos géneros pertenecientes a *Actinobacteria*. Presenta crecimiento mesófilo, heterótrofo y aerobio, pudiendo crecer en condiciones de microaerobiosis, dando positivo a la tinción de Gram. Las células presentan forma de varilla filamentosa, y en medio sólido crecen tanto en micelio vegetativo como aéreo. Las grandes hifas aéreas producen esporas esféricas que no muestran movilidad y se agrupan con la apariencia de un racimo de uva. Produce pigmentos que van del color crema al naranja rosáceo en todos los medios. Tolerancia un rango de temperatura de 17-40 °C, siendo la óptima entre 28-33 °C y no se observa crecimiento a 14 °C y 45 °C. El rango de pH es de 4,8-6,8 siendo el óptimo 6,0, no detectándose crecimiento a pH 3,9 y 7,5. 100 µg/mL de lisozima y 10 g/L NaCl no inhiben el crecimiento, mientras que si se inhibe por arriba de 30 g/L de NaCl. Hidroliza almidón, caseína, gelatina y en menor medida queratina, pero no celulosa, xilano, o quitina. Presenta reacción de catalasa positiva, produce H₂S y no reduce nitrato. Es sensible a 5 µg/mL de novobiocina o ramoplanina, a 20 mg/mL de apramicina y al glicopéptido A40926. Contiene ornitina, alanina, ácido glutámico, serina y glicina como aminoácidos del peptidoglicano. El ácido graso celular mayoritario es C_{16:1}2OH y MK-9(H₂) es la menaquinoma predominante. El contenido de G+C del genoma es de 53,8 %. Filogenéticamente pertenece al filo *Chloroflexi*, clase *Ktedonobacteria*, orden *Ktedonobacterales*, familia *Ktedonobacteraceae*, género *Ktedonobacter*, siendo SOSPI-21^T la cepa tipo (Cavaletti *et al.*, 2006, Chang *et al.*, 2011).

***Thermosporotrix hazakensis* SK20-1^T**

Aislamiento

La muestra se obtuvo de un compost maduro a escala de campo utilizado para el tratamiento de excrementos de ganado. El medio de aislamiento utilizado contenía 1 g/L de extracto de levadura, 2 g/L de triptona, 1 g/L de NaCl, 1 g/L de MgSO₄·7H₂O, 5 g/L de polvo de Compost y 20 g/L de agar. El medio se suplementó con 20 mg/L de trimetoprim, 10 mg/L de ácido nalidíxico y 20 mg /L de kanamicina. El pH de las placas de aislamiento se ajustó a 7,0 con NaOH a temperatura ambiente. Se disolvió 1 g de la muestra (peso húmedo) en solución salina, se hicieron diluciones en series y alícuotas de estas diluciones se sembraron en placa, incubándose a 50 °C durante 7 días. Una de las colonias de las placas de 3-5 cm de diámetro, que formaba micelio aéreo, fue recogida, cultivada y se purificó repicándola en placa tres veces (Yabe *et al.*, 2010).

Características

Son bacterias filamentosas, termófilas, aerobias y formadoras de esporas. Presentan ácido glutámico, serina, alanina y ornitina como aminoácidos de los peptidoglicanos. Los azúcares de la pared celular son ramnosa y manosa, el iso-C_{17:0} es el principal ácido graso y MK-9(H₂) la principal menaquinona. Forman micelio vegetativo y un grueso micelio aéreo, ambos irregularmente ramificados y similares morfológicamente a los de *Actinomycetes*. Las esporas no móviles, sensibles al calor, de 1,0-2,0 µm de largo y 0,7-1,0 µm de ancho, no contienen ácido dipicolínico, se agrupan en racimos y refractan la luz al observarlas con un microscopio de contraste de fases. Presenta una cubierta con una doble membrana, rodeadas por paredes gruesas, que claramente separa las células del micelio por membranas y paredes (fig. 28).

Crecen entre 31 y 58 °C con una temperatura óptima de 50 °C, mientras que el rango de pH es de 5,4-8,7 siendo el óptimo a 7,0. Dan reacción positiva a la catalasa y a la tinción de Gram y no tienen requerimientos de NaCl para su crecimiento, a su vez éste se inhibe a concentraciones de NaCl superiores al 3 %. El contenido de G+C es de 54 %, e hidrolizan polisacáridos tales como celulosa, xilano y quitina, mientras que no hidrolizan almidón o gelatina. Utilizan D-xilosa, D-glucosa, sacarosa, L-ramnosa, inositol o manitol como única fuente de carbono.

Los análisis filogenéticos basados en la secuencia de los genes ARNr 16S de la cepa SK20-1^T indicaron que pertenece al filo *Chloroflexi* dentro de la clase *Ktedonobacteria*. Se propuso la creación de un nuevo género *Thermosporothrix* dentro de la nueva familia

Thermosporotrichaceae, designando a la cepa *Thermosporothrix hazakensis* y a SK20-1^T como cepa tipo (Yabe *et al.*, 2010).

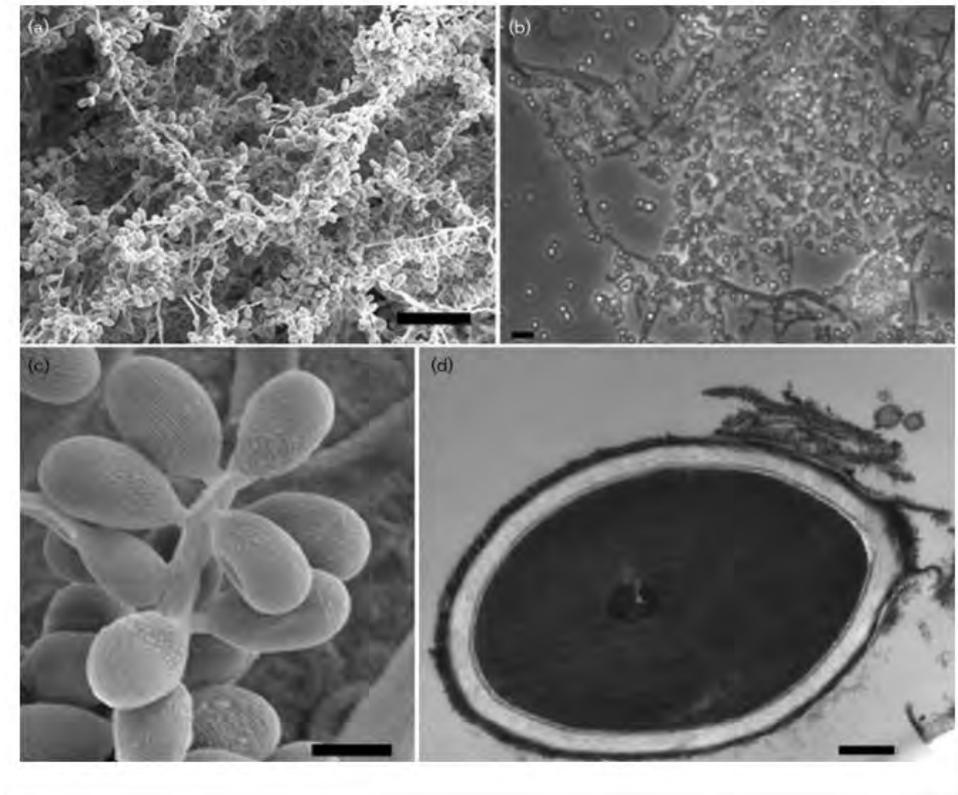


Fig 28 Fotomicrografías de células de la cepa SK20-1^T (*Thermosporothrix hazakensis*).
a, c) microfotografía de escaneo electrónico. Barra 10 μm en (a) y 1 μm en (c).
b) microfotografía de contraste de fase de la cepa crecida en agar ISP3 a 50°C por 7 días. Barra 10 μm .
d) microfotografía de transmisión electrónica de una sección ultrafina de una espora. Barra 200 nm.
Tomado de Yaba *et al.*, 2010.

2.6.2 Orden *Thermogemmatisporales*

Las cepa ONI-1^T y ONI-5 fueron aisladas de una muestra de hojas caídas en suelos geotérmicos (60-90 °C a 10-15cm de profundidad) en el área de la prefectura de Miyagi en Japón.

Los análisis filogenéticos basados en el estudio de los genes ARNr 16S indicaron que pertenecían al filo *Chloroflexi*, dentro de la clase *Ktedonobacteria*. En base a las características fenotípicas y la posición filogenética, se propone que las cepas ONI-1^T y ONI-5^T constituyen un nuevo género (*Thermogemmatispora*) que contiene dos nuevas especies, para las cuales se proponen los nombres *Thermogemmatispora onikobensis* y *Thermogemmatispora foliorum*, siendo ONI-1^T y ONI-5^T respectivamente las cepas tipo. Se creó a su vez la familia *Thermogemmatisporaceae*, dentro del nuevo orden *Thermogemmatisporales* (Yabe *et al.*, 2011).

Aislamiento

Para el aislamiento se utilizó un medio FS1V modificado, suplementándolo con 100 mg/L de kanamicina y 1 % (p/v) de celulosa microcristalina (Stott *et al.*, 2008), ajustándose el pH 7,0 con NaOH a temperatura ambiente. Las hojas caídas se extendieron sobre las placas y se incubaron a 65 °C por 3 semanas. Se seleccionaron dos colonias formadoras de micelio aéreo, se prepararon y sembraron diluciones seriadas en solución salina. Cada colonia individual se purificó en placas tres veces, obteniéndose los aislamientos que se designaron cepas ONI-1^T y ONI-5^T (Yabe *et al.*, 2011).

***Thermogemmatispora onikobensis* ONI-1^T**

Características

La cepa presenta tinción de Gram positiva, crecimiento en condiciones termofílicas, aerobias, heterótrofas, morfología filamentosa y formación de esporas. Los aminoácidos del peptidoglicano detectados son ácido glutámico, serina, glicina, histidina, alanina y ornitina siendo ramnosa la azúcar de la pared celular. Los principales ácidos grasos de membrana son iso-C_{17:0}, iso-C_{19:0} y C_{20:0}, siendo MK-9(H₂) la principal menaquinona. Los lípidos polares determinados son fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol y un glicolípido. Produce un micelio ramificado vegetativo y aéreo. Las esporas no móviles se agrupan en racimos, presentando superficie rugosa y forma oval de 1,0-2,0 µm de largo y 0,5-1,5 µm de ancho.

Se observa crecimiento entre 50-74 °C con un pH entre 4.6-8.0 y las condiciones óptimas son a 60-65 °C y pH de 7,0. No presenta requerimientos de NaCl para crecer y el crecimiento es inhibido completamente a concentraciones de NaCl del 2 %. Hidroliza CM-celulosa, xilano, quitina y la gelatina, mientras que no hidroliza el almidón y la caseína. Presenta reacción Catalasa-positiva y utiliza D-xilosa, D-glucosa, sacarosa, L-ramnosa y D-manitol como únicas fuentes de carbono. El contenido de G+C de su genoma es de 60,2 % (Yabe *et al.*, 2011).

***Thermogemmatispora foliorum* ONI-5^T**

Características

La cepa comparte con ONI-1^T las características del género *Thermogemmatispora*. Con morfología filamentosa, presenta crecimiento en condiciones aerobias y termófilas, reacciona positivamente a la tinción de Gram. Produce un micelio ramificado vegetativo y aéreo. Las esporas no móviles de 1,0-2,0 µm de largo y 0,5-1,5 µm de ancho, se agrupan en racimos, presentando una superficie rugosa y forma oval.

Se observa crecimiento entre 45-74 °C a pH entre 4,6-8,0 y las condiciones óptimas son a 60-65 °C y un pH de 7,0. No requiere NaCl para crecer y el crecimiento se inhibe completamente a concentraciones de NaCl mayores del 1 %. Hidroliza CM-celulosa, xilano, quitina, mientras que no hidroliza almidón, gelatina ni caseína. Presenta reacción Catalasa-positiva y utiliza D-Manitol como única fuente de carbono. El contenido de G+C de su genoma es de 58,1% (Yabe *et al.*, 2011).

2.7. Clase *ARDENTICATENIA*

En las últimas dos décadas han sido extensamente estudiados los organismos con la capacidad de la reducción desasimilativa del Fe (III). Están ampliamente distribuidos en el linaje de las *Bacterias* y las *Arqueas*, lo que es compatible con el hecho que el hierro sea el cuarto elemento más abundante en la Tierra (Vargas *et al.*, 1998, Weber *et al.*, 2006).

Estos organismos se han reportado en ambientes hidrotermales marinos, sedimentos de subsuelos geotérmicos (Slobodkin and Wiegel, 1997, Sievert *et al.*, 1999, Slobodkin *et al.*, 1999, Slobodkin *et al.*, 2001, Reysenbach *et al.*, 2006) y entornos hidrotermales terrestres (Slobodkina *et al.*, 2012, Yoneda *et al.*, 2012). En estos ambientes naturales donde el acceso al oxígeno molecular es limitado, el hierro tiene el potencial de servir como un aceptor de electrones alternativo para la conservación de energía de los microorganismos. La reducción desasimilativa del Fe (III) se reconoce como una forma clave del metabolismo de la energía entre los microorganismos termófilos e hipertermofílicos en sus hábitats termales (Lovley and Phillips, 1988).

La bacteria *Ardenticatena marítima* cepa 110S^T, aislada por Kawaichi *et al.*, (2013) fue la primera bacteria conocida del filo *Chloroflexi* con la capacidad de la reducción desasimilativa del Fe (III) y que además también era capaz de crecer de la reducción desasimilativa del nitrato. Ambas capacidades no habían sido reportadas en el filo antes del año 2013 (Kawaichi *et al.*, 2013).

Ardenticatena marítima 110S^T

Es una bacteria reductora de hierro y nitrato aislada de una zona hidrotermal costera rica en hierro en Japón. Presenta crecimiento aerobio facultativo, en anaerobiosis tiene la capacidad de crecer a partir de la reducción desasimilativa del hierro y nitrato. Tolera para su crecimiento un alto rango de temperaturas y concentraciones de NaCl.

Los datos filogenéticos así como las características fenotípicas apoyaron su inclusión en una nueva clase del filo *Chloroflexi* a la que denominaron *Ardenticatenia*. Para los taxones subordinados orden, familia y género propusieron los términos de *Ardenticatenales*, *Ardenticatenaceae*, y *Ardenticatena marítima* respectivamente (fig. 13) (Kawaichi *et al.*, 2013).

Aislamiento

Se aisló a partir de muestras de sedimentos de un suelo hidrotermal costero en Yamagawa, una bahía de arena de grano grueso en el cinturón volcánico Kirishima, del suroeste de Japón. La temperatura media en el centro de la salida de vapor más activo era de 101 °C. Las muestras de sedimentos utilizados en el aislamiento se obtuvieron a 15 cm debajo de la superficie, y 100 cm desde el centro de ventilación donde la temperatura es relativamente baja (aprox. 70 °C). La muestra de sedimento utilizado consistió en rocas volcánicas ricas en hierro, como el basalto, piroxeno, olivino y piedra pómez. Por el método ferrozina (Lovley and Phillips, 1987) se demostró que el sedimento contenía aproximadamente 5,6 mmol/g de Fe (III) reducible por hidroxilamina.

Inmediatamente fueron transferidos 40 g de sedimento (peso húmedo) a un vial de vidrio de 50 mL, se lavó abundantemente con N₂ 100 % (100 kPa) y se cerró herméticamente. No se añadió agente reductor. Las muestras fueron almacenadas a 4 °C en la oscuridad hasta su uso.

Se tomaron 5 g de la muestra de sedimento y se mezclaron con 45 mL de agua de mar sintética MJ (Sako *et al.*, 1996) esterilizada por filtración. Se utilizó MJYAFI como medio de enriquecimiento. El medio MJYAFI está compuesto de 0,1 % extracto de levadura (Difco), 10 mM de acetato, 40 mM de fumarato y 10 mmoles de ferrihidrita amorfa [Fe (III) oxihidróxido] en 1 L de agua de mar sintética MJ. La ferrihidrita amorfa fue sintetizada utilizando el método de Lovley and Phillips (1986).

El pH del medio se ajustó a 7,0 antes de la esterilización en autoclave. Se inocularon en el medio 50 µL del sobrenadante de la muestra y se incubaron durante al menos 1 semana a 20, 37, 55, 70, 80 y 90 °C. Durante el procedimiento de enriquecimiento, se observó en los enriquecimientos a 55 °C que el color del precipitado de hierro cambiaba de color marrón rojizo a negro o marrón oscuro, lo que era un indicador que el Fe (III), de la ferrihidrita se reducía a Fe (II).

Uno de estos enriquecimientos fue sometido a procedimientos de purificación, utilizando la técnica de dilución seriada en el mismo medio MJYAFI líquido. El procedimiento de purificación se repitió al menos tres veces antes de que el cultivo se considerara puro, lo que se confirmó mediante la observación del cultivo por microscópica epifluorescente y por la secuenciación directa del gen ARNr de 16S utilizando varios cebadores. Se obtuvieron bacterias filamentosas, flexibles, no móviles, que midieron más de 100 µm (Kawaichi *et al.*, 2013).

Características

La cepa presenta morfología de filamentos multicelulares incoloros, no móviles ni formadores de esporas, de menos de 100 μm de largo y 0,2-0,3 μm de ancho, donde cada célula mide alrededor de 2 μm . Se observa la separación en septos, no así la formación de flagelos o pili. Dan negativo a la tinción de Gram, observándose en secciones ultra finas de la membrana citoplásmica, que ésta se rodea por una capa superficial en multicapas y que no posee estructuras tipo vaina. La organización en multicapas consiste en dos capas electro densas y dos capas electro transparentes (fig. 29).

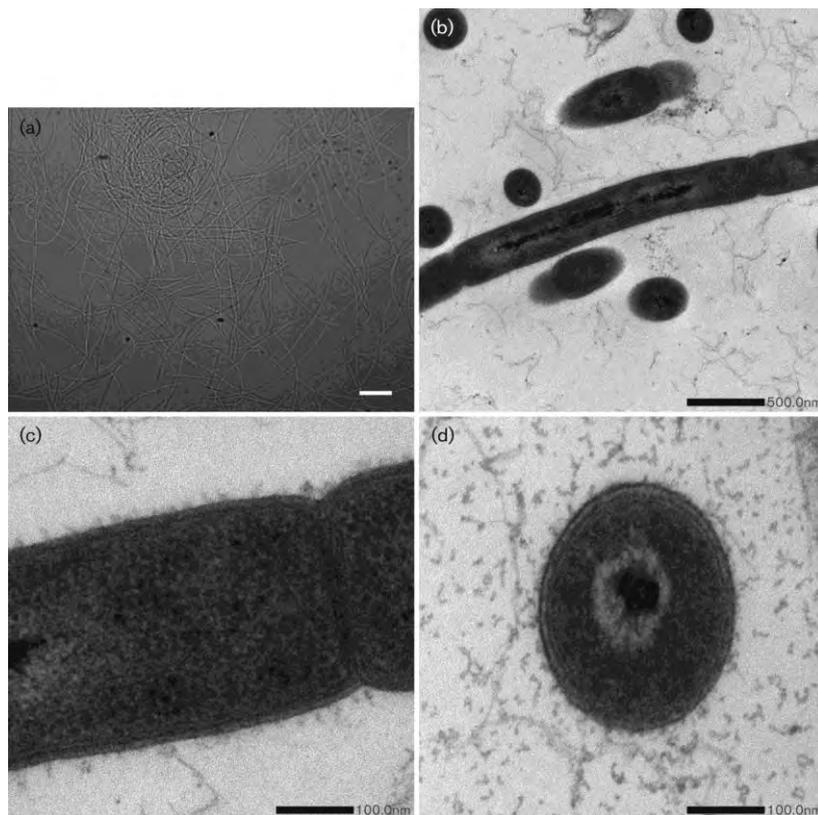


Fig. 29 Fotomicrografía y micrografías de transmisión electrónica de la cepa 110S^T. Las células se obtuvieron a partir de cultivos en fase de crecimiento exponencial. (a) Microfotografía de los filamentos de la cepa 110S^T. Barra, 10 micras. (b hasta d) Secciones ultrafinas de las células. Barras; 500 nm (b), 100 nm (c) y 100 nm (d). Tomado de Kawaichi *et al.*, 2013

Presenta crecimiento en condiciones quimiorganotróficas y termófilas. En la fase estacionaria y sin agitación se observa a menudo la formación de agregados.

Crece en condiciones aerobias usando O₂ como aceptor de electrones o anaerobias con nitrato, ferrihidrita, o citrato férrico como receptores de electrones. No se observó crecimiento fotosintético ni fermentativo.

Presenta crecimiento entre 30 y 75 °C, a un pH de 5,5 a 8,0 y con concentraciones de NaCl entre 0,0 a 6,0 % siendo las condiciones óptimas entre 55-70 °C, a pH 6,5-7,0 y

con 1,0-2,0 % de NaCl. Los ácidos grasos mayoritarios de membrana detectados son C_{22:0}, C_{19:0}, C_{23:0} y C_{21:0}. El contenido de G+C del ADN genómico es de 51,5 %. Las principales menaquinonas son MK-9, MK-10 y MK-8.

En condiciones aerobias se observa crecimiento con trehalosa, sacarosa, rafinosa, almidón, piruvato, extracto de levadura y triptona como donadores de electrones y fuente de carbonos. Se observa poco crecimiento con asparagina, glutamina, acetato, succinato, butirato, malato, crotonato y Casamino ácidos. Mientras que no presenta crecimiento con arginina, aspartato, fenilalanina, prolina, serina, valina, fructosa, glucosa, arabinosa, galactosa, xilosa, celobiosa, maltosa, manosa, ribosa, betaína, fumarato, citrato, formiato, lactosa, ácido láctico, ácido propiónico, metanol, etanol, propanol y glicerol.

Bajo condiciones anaerobias utiliza ferrihidrita, citrato férrico y nitrato como aceptores de electrones, mientras que el nitrito, sulfato, sulfito, tiosulfato, azufre elemental, y fumarato no son utilizados como aceptores de electrones. En los ensayos realizados se demostró que en las condiciones anaerobias, la cepa 110S^T podía crecer de la reducción desasimilativa de Fe (III) y de la reducción de nitrato, siendo el amonio el único producto de la reducción de nitrato.

Los análisis filogenético de las secuencias del gen ARNr de 16S indicaron que la cepa 110S^T pertenece a un nuevo linaje en el phylum *Chloroflexi* (fig. 13). La similitud de secuencia del gen ARNr 16S entre la cepa 110S^T y de otros aislamientos de este filo fue menor o igual a 84 %, mientras que los mayores porcentajes de homología los presenta con secuencias de clones no cultivados del filo (por ejemplo JQ183092 y JN881657), obtenidos a partir de entornos hidrotermales de todo el mundo, con los que presenta un máximo de identidad de 98 % (Kawaichi *et al.*, 2013).

3. MÉTODOS DE AISLAMIENTO

A continuación se describirán las distintas estrategias utilizadas para el aislamiento de los microorganismos de los Subfilo I y II.

Métodos de aislamiento y cultivos de microorganismos del Subfilo I:

Aislamientos

Para el aislamiento de *Anaerolinea thermophila* (UNI-1^T) se colectaron por micro manipulación las proyecciones de los gránulos de aspecto plumoso de un reactor UASB termófilo que sufría el fenómeno de “bulking”. Mientras que para los aislamiento de *Anaerolinea thermolimosa* (IMO-1^T), *Levilinea saccharolytica* (YMTK-2^T) y *Leptolinea tardivitalis* (KIBI-1^T) se colectaron ciertos flóculos pequeños (aproximadamente de 0,5 mm de diámetro) de los sedimentos de los reactores UASB en estudio (mesófilos y termófilos) que por FISH habían demostrado tener una cantidad abundante de filamentos del filo (Sekeguchi *et al.* 2003, Yamada *et al.*, 2006).

En la búsqueda de microorganismos de la clase *Anaerolineae* en ambientes anaerobios diferentes al de los lodos de reactores UASB Yamada *et al.*, (2007) aislaron a *Bellilinea caldifistulae* (GOMI-1^T) y a *Longilinea arvoyzae* (KOME-1^T), de dos diferentes cultivos de consorcios degradadores de propionato, que fueron obtenidos de un digestor de lodo termofílico y suelos de cáscara de arroz respectivamente. Se realizaron enriquecimientos termófilos (55 °C) y mesófilos (37 °C) de consorcios metanogénicos degradadores de propionato que contenían la bacteria *Pelotomaculum spp.* y metanógenos hidrogenotróficos (Imachi *et al.*, 2006). Dos de los enriquecimientos contenían fundamentalmente células filamentosas que por FISH hibridaban con la sonda GNSB941 del filo *Chloroflexi* (Yamada *et al.*, 2007).

Thermanaerotherix daxensis (GNS-1^T) fue aislada de un acuífero termal profundo en la cuenca de Aquitania, Francia, al igual que la cepa D1-25-104^T (*Caldilinea tarbellica*). El cultivo se realizó utilizando directamente 500 mL del agua del acuífero en medio anaerobio, a lo que se le adicionaron los sustratos (Grégoire *et al.*, 2011b; Grégoire *et al.*, 2011a).

La muestra de la que se aisló la cepa STL-6^T (*Caldilinea aerophila*) provino de una fuente termal a 60 °C, pH neutro y con depósitos de azufre de Japón (termas de Nakao, prefectura de Giju). Fue un hallazgo casual en la búsqueda microorganismos quimiolitotrofos termófilos. Realizaron enriquecimientos primarios aerobios con

tiosulfato/ HCO_3^- como fuente de energía y carbono, con lo que tuvieron una comunidad estable y variada de microorganismos. La biomasa colectada (compuesta de haces de filamentos blancos, que podrían consistir en bacterias de azufre incoloros y partículas de azufre elementales similares a los descritos por Yamamoto *et al.*, en 1998) se homogeneizó suavemente y se usó como inóculo para los diferentes enriquecimientos y cultivos (Sekeguchi *et al.* 2003).

La bacteria aerobia *Litorilinea aerophila* (PRI 4131^T), se obtuvo de una muestra de una fuente termal intertidal en Islandia. Para la toma se preparó un soporte artificial para la colonización, encerrando cartílago fresco de pepino de mar dentro en un saco de lana, que estaba envuelto con una malla de alambre. Dicho soporte se sujetó entre las piedras durante 5 semanas, a la orilla de la fuente termal intertidal. La fuente termal, de la que emanaba agua a 72 °C estaba expuesta a los efectos de las mareas y contenía una mezcla de agua dulce y salada (Kale *et al.*, 2013).

Cultivos

Para el cultivo de las cepas termofílicas anaerobias *A. thermophila* y *A. thermolimosa* se dispersaron las células por tratamiento con ultrasonido (sonificación) y se realizaron diluciones seriadas en medio líquido. El medio basal utilizado fue el propuesto por Sekiguchi *et al.*, en el 2000 (anexo I) el cual fue suplementado con sacarosa o glucosa (20 mM) y extracto de levadura (0,1 %). Las condiciones de cultivo fueron a 55 °C (sin embargo luego se determinó que la temperatura óptima de crecimiento para *A. thermolimosa* era de 50 °C) en viales de 50 mL con 20 mL de medio, a un $\text{pH}_{25^\circ\text{C}}$ 7,0 a 7,2, en una atmósfera de N_2/CO_2 (80/20 v/v) y sin agitación. Los sustratos utilizados fueron agregados a los viales con medio basal, previo a la inoculación. Los medios sólidos se prepararon agregándoles agar purificado al medio basal anterior hasta una concentración final de 20 g/L. El crecimiento de las cepas cesó luego de cierta acumulación de H_2 por lo que se co-cultivaron con la bacteria metanogénica *Methanothermobacter thermautotrophicus* (5 % de inóculo en cada cepa) inoculadas en el medio basal, suplementado con sacarosa o glucosa (20 mM) y extracto de levadura (0,1 %). Las cepas fueron aisladas de el método del “roll-tube” (Sekiguchi *et al.*, 2003, Yamada *et al.*, 2006).

Para las cepas mesófilas anaerobias *L. saccharolytica* y *L. tardivitalis* los flóculos colectados se sometieron también al tratamiento con ultrasonido en buffer fosfato para dispersarlos. Se prepararon diluciones seriadas en medio líquido basal (Sekiguchi *et al.*,

2000) igualmente suplementado que para *A. thermophila* y *A. thermolimos* (con sacarosa o glucosa 20 mM y extracto de levadura 0,1 %), incubándolas a 37 °C y co-cultivándolas con la bacteria metanogénica *Methanospirillum hungatei* (5 %)

Posteriormente de los enriquecimientos positivos se realizaron nuevos enriquecimientos con el agregado de sulfonato de 2-bromoetano con una concentración final de 5 mM para inhibir las metanogénicas. Es de destacar que estudios posteriores demostraron que el co-cultivo con las metanogénicas no estimulaba su crecimiento. Los aislamientos se realizaron por el método del “roll-tube” (Yamada *et al.*, 2006).

Para el caso de los cultivos de *Bellilinea caldifistulae* y *Longilinea arvozyae*, se partió de dos consorcios metanogénicos degradadores de propionato (Imachi *et al.*, 2006), que por FISH mostraron tener una considerable proporción de células filamentosas que hibridaban con la sonda GNSB941, se cultivaron anaeróbicamente a 55 °C (enriquecimientos termófilos) y 37 °C (enriquecimientos mesófilos) en medio fresco (Sekiguchi *et al.*, 2000) suplementado con sacarosa (20 mM) y extracto de levadura (0,1 %). Las cepas GOMI-1^T Y KOME-1^T fueron finalmente aisladas de dichos cultivos por el método del “roll-tube” (Yamada *et al.*, 2007).

Para los cultivos de rutina *Thermanaerotherix daxensis* se usó el medio descrito en Grégoire *et al.*, 2011 b. El pH fue ajustado a 7,2 (a 25 °C) con una solución de KOH 10 M. Se inyectó previo a la inoculación del cultivo; 0,1 mL de Na₂S.9H₂O al 2 % (p/v), 0,1 mL de NaHCO₃ al 10 % (p/v) y 3,6 g/L de glucosa.

Se pasaron al mismo medio fresco varias veces antes de lograr su aislamiento. El cultivo fue purificado usando el método de “roll- tube” solidificando el medio con 2.5 % (p/v) de agar Noble (Grégoire *et al.*, 2011 b).

Para el aislamiento de la cepa aerobia facultativa *Caldilinea aerophila* en la búsqueda de quimiolitotrófos termófilos, se homogeneizó la biomasa colectada de una fuente termal con la que se inoculó los diferentes enriquecimientos y cultivos. Realizaron un enriquecimiento aerobio primario en tiosulfato/HCO₃⁻ como fuente de energía y carbono. Sucesivas transferencias a medio fresco de tiosulfato/HCO₃⁻ condujo al enriquecimiento en la comunidad microbiana de la que posteriormente se aisló la cepa STL-6^T. Al inocular el enriquecimiento en placa con medio PE (Hanada *et al.*, 1995b), en condiciones de aerobiosis, a 55 °C y pH 7,5, se obtuvieron colonias que condujeron al aislamiento de *C. aerophila* (Sekiguchi *et al.*, 2003).

Para el aislamiento de la cepa anaerobia *Caldilinea tarbellica*, se realizaron enriquecimientos sucesivos en tubos de Hungate con 550 mL del acuífero, suplementada

con 5 mM acetato, 1 g/L NH_4Cl , 20 mM glucosa, 0,1 g/L extracto de levadura y 0,04 % (m/v) $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ a 60 °C en una fase gaseosa de N_2 y libre de oxígeno. Los cultivos fueron purificados por diluciones seriadas con el método del “roll-tube” con medio suplementado con 2,5% de agar. Luego de 2 meses de incubación se obtuvieron colonias blancas redondeadas de alrededor de 1 mm de diámetro. Se subcultivaron y se realizaron diluciones seriadas hasta obtener un cultivo axénico, del que se aisló la cepa D1-25-10-4^T posteriormente denominada *Caldilinea tarbellica* (Grégoire *et al.*, 2011a).

Litorilinea aerophila fue aislada durante la búsqueda de bacterias que degradaran fucosacondroitín sulfato ramificado. Para la obtención de la cepa PRI-4131^T de la que se obtuvo *L. aerophila*, el saco con el que se obtuvo la muestra se sumergió con agitación en una solución con 0,9 % de NaCl durante 4 h. El medio líquido 166 (Hjorleifsdottir *et al.*, 2001), se inoculó con el agua de lavado, incubándose con agitación a 50 °C durante 4 semanas. Al microscopio se observaron filamentos finos y delgados, que se sembraron directamente en placa de agar con el mismo medio. Las colonias aisladas fueron repicadas repetidamente hasta confirmar al examinarlas al microscópico la pureza del cultivo (Kale *et al.*, 2013).

4. CONCLUSIONES

De acuerdo a la bibliografía consultada, el filo *Chloroflexi* es un grupo metabólicamente muy diverso, distribuido en una gran variedad de hábitat. Esta constituido por microorganismos que pueden ser de interés para el Hombre, particularmente los miembros de los subfilo I y II. Debido a las dificultades en sus cultivos, la inclusión de nuevos microorganismos dentro del filo, o la exclusión de algunos de los ya existentes, dependerá de nuevos estudios así como de la aplicación de herramientas moleculares que permitan estudiar organismos no incluidos o verificar los ahora presentes.

Subfilo I

En los sistemas de tratamiento de efluentes anaerobios se han encontrado microorganismos del subfilo I fundamentalmente de la clase *Anaerolineae*. En los reactores anaerobios termofílicos, su aumento esta generalmente asociado a problemas en la sedimentación y por lo tanto es importante mantenerlos controlados para obtener los efluentes en las condiciones requeridas (Yamada *et al.*, 2005).

Son organismos muy difíciles de cultivar, cuantificar y aislar. Esto es debido entre otras cosas a las condiciones de cultivo necesarias, a sus requerimientos nutricionales, a la baja proporción en la que se encuentran en las muestras, así como a sus localizaciones en los diferentes microcosmos bacterianos (por ejemplo en el interior de los gránulos de los reactores UASB termofílicos), por lo que su estudio ha sido muy dificultoso. El aislamiento así como el enriquecimiento de estos microorganismos se ha visto favorecida partiendo de muestras enriquecidas en donde estos organismos se encuentran en una proporción importante (encima del 30 %) y en donde sea menor la competencia con los organismos de rápido crecimiento (Yamada and Sekiguchi 2009). La aplicación de nuevas técnicas moleculares como la pirosecuenciación, ensayos de hibridación *in situ* fluorescentes (como por ej. FISH-MAR y FISH-ELF) entre otros, pueden aumentar los hallazgos realizados, así como la comprensión de sus interrelaciones con los microorganismos de la comunidad.

Subfilo II

Los microorganismos integrantes del subfilo II tienen la capacidad de dehalogenar diferentes sustratos halogenados como por ejemplo PCE, PCB y VC a eteno, un compuesto inócuo para la salud. El control de estos compuestos halogenados en el medio ambiente es de gran interés, debido entre otras cosas a su acción como agentes

cancerígenos. La capacidad de dehalogenación de los organismos de la clase *Dehalococcoidia* puede ser usada en los sitios contaminados con estos compuestos halogenados, para la bioremediación tanto sea por bioestimulación como por bioaumentación. El conocimiento del comportamiento de las comunidades dehalogenantes es de gran relevancia ecológica.

En este sentido las condiciones anaerobias, el requerimiento estricto de H₂ como donador de electrones, resistencia a los antibióticos inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana, los diferentes potenciales redox de los agentes reductores en los medios de cultivo, así como la competencia entre las diferentes especies de la clase *Dehalococcoidia* presentes en el medio, han sido de importancia en los diferentes aislamientos realizados y en las proporciones de los distintos procesos de cloración.

ANEXO 1

Medio propuesto por Sekiguchi *et al.*, 2000 (subfilo I)

KH₂PO₄ 0.15 g/L

NH₄Cl 0.5 g/L

MgCl₂.6H₂O 0.2 g/L

CaCl₂.2H₂O 0.15 g/L

NaHCO₃ 2.5 g/L

Na₂S.9H₂O 0.3 g/L

cisteína.HCl 0.3 g/L

Solución de elementos traza 1 mL (solución 318 de DSMZ-1983, reemplazando el NaCl por Na₂WO₄.H₂O 3mg/L)

Solución de vitaminas 1 mL (141 de DSMZ-1983, donde todos los componentes fueron mezclados a una conc. de 20µmol L)

Solución de resazurina 1 mL (1mg/mL)

Medio PE propuesto por Hanada *et al.*, 1995b (subfilo I)

Glutamato de sodio 0.5 g/L

Sucinato de sodio 0.5 g/L

Acetato de sodio 0.5 g/L

Extracto de levadura 0.5 g/L

Casamino ácido 0.5 g/L

Na₂S₂O₃.5H₂O 0.5 g/L

KH₂PO₄ 0.38 g/L

K₂HPO₄ 0.39

(NH₄)₂SO₄ 0.5 g/L

Solución de vitaminas 1 mL

Solución basal de sales 5 mL

La solución de vitaminas contenía (por 100 mL):

Ácido nicotínico 100 mg

Hidrocloruro de tiamina 100 mg

Biotina 5 mg

Ácido *p*-aminobenzoico 50 mg

Vitamina B12 1 mg
Pantotenato de calcio 50 mg
Hidrocloruro de piridoxina 50 mg
Ácido fólico 50 mg.

La solución basal de sales contenía:

FeSO₄.7H₂O 1.11 g/L
MgSO₄.7H₂O 24.65 g/L
CaCl₂.2H₂O 2.94 g/L
NaCl 23.4 g/L
MnSO₄.4H₂O 111 mg/L
ZnSO₄.7H₂O 28.8 mg/L
Co(NO₃)₂.6H₂O 29.2 mg/L
CuSO₄.5H₂O 25.2 mg/L
Na₂MoO₄.2H₂O 24.2 mg/L
H₃BO₃ 31.0 mg/L
trisodio EDTA. 4.53 g/L.

ANEXO II

Medio propuesto por Maymó-Gatell *et al.*, 1995 (subfilo II)

NH₄Cl, 0.5 g/L

K₂HPO₄, 0.4 g/L

MgCl₂ z 6H₂O, 0.1 g/L

CaCl₂ z 2H₂O, 0.05 g/L

Resazurina, 0.001 g/L;

Solución de metales traza (Zeikus 1977) 10 mL/L, modificada con la adición de
NiCl₃.6H₂O 0.01 g/L.

Solución de metales trazas según Zeikus 1977

ácido nitrilotriacético 4.5 g/L

FeCl₂.4H₂O, 0.4 g/L

MnCl₂.4H₂O, 0.1 g/L

CoCl₂.6H₂O, 0.17 g/L

ZnCl₂, 0.1 g/L

CaCl₂, 0.02 g/L

H₃BO₃, 0.019 g/L

Molibdato de sodio 0.01 g/L

El medio fue purgado con N₂ en una cámara anaerobia en tubos de rosca de 27 mL. Los tubos fueron tapados con tapones de goma, sellados con tapas de aluminio y esterilizados por autoclave a 121 °C por 55 min. Los tubos se rellenaron con N₂/CO₂ (70 % / 30 %) estéril y se adicionaron estéril y anaeróticamente (hasta un volumen final de 10 mL por tubo), previo a la inoculación; Na₂S.9H₂O 2 mM; NaHCO₃ 12 mM; sobrenadante filtrado y esterilizado de un lodo de un digestor anaerobio (SS) 25% (vol/vol); extracto de levadura 0.2 g/L; acetato de sodio; 2 mM; 0.5% (vol/vol) solución de vitaminas (Balch *et al.*, 1979) concentrada al 10. Esta última mezcla es llamada ABSS.

El lodo para la preparación del SS fue tomado en una sola toma para asegurar uniformidad. Inicialmente fue clarificado por centrifugación por 30 min a 8000 rpm y se almacenaron las muestras a -20 °C hasta su uso. Fueron entonces nuevamente centrifugadas por 30 min a 18000 rpm. El líquido supernadante se neutralizó a un pH 7.0

con HCl 1 M y luego fue pre filtrado con una membrana de 0.8 mm de poro. El SS se purgó entonces con N₂ y se filtró estérilmente en una cámara anaerobia a través de un filtro de doble membrana de 0.8-0.2 mm de poro dentro de viales estériles. En algunas circunstancias el SS fue lipolizado, presentando este lipolizado el mismo comportamiento que el SS. El SS contenía 75 mg/L de carbono orgánico y 0.05 mM de acetato u otro ácido graso volátil.

Medio propuesto por Löffler *et al.*, 1996 (subfilo II)

NaCl, 1.0 g/L

MgCl₂.6H₂O, 0.5 g/L

KH₂PO₄, 0.2 g/L

NH₄Cl, 0.3 g/L

KCl, 0.3 g/L

CaCl₂.2H₂O, 0.015 g/L

Resazurina, 1 mg/L

Solución de elementos traza A, 1 mL/L

Solución de elementos traza B, 1 mL/L

Na₂S.9H₂O, 0.048 g/L

L-cisteína, 0.035 g/L

NaHCO₃, 2.52 g/L

Solución de vitaminas, 10mL/L (Sanford *et al.*, 1996; Wolin *et al.*, 1963)

Piruvato, 20 mmol/L

3 Cl-4-HBA, 1 mmol/L

Solución de elementos traza A

HCl (solución 25% m/m), 10 mL/L

FeCl₂.4H₂O, 1.5 g/L

CoCl₂.6H₂O, 0.19 g/L

MnCl₂. 4H₂O, 0.1 g/L

ZnCl₂, 70 mg/L

H₃BO₃, 6 mg/L

Na₂MoO₄.2H₂O, 36 mg/L

NiCl₂.6H₂O, 24 mg/L

CuCl₂·2H₂O, 2 mg/L

Solución de elementos traza B

Na₂SeO₃, 6 mg/L

Na₂WO₄·2H₂O 8 mg/L

NaOH, 0.5 mg/L

Solución de vitaminas Wolin *et al.*, 1963 (pH 7 con KOH)

Biotina 2 mg/L

Ácido fólico 2 mg/L

Cloruro de pirodoxina 10 mg/L

Rivoflavina 5 mg/L

Tiamina 5 mg/L

Ácido nicotínico 5 mg/L

Ácido pantoténico 5 mg/L

Vitamina BE 0.1 mg/L

Ácido p-aminobenzoico 5 mg/L

Ácido tióctico 5 mg/L

Las sustancias reductoras fueron adicionadas al medio luego de ser hervidas y llevadas a temperatura ambiente. El espacio libre del tubo fue gaseado con N₂/CO₂ (80 % / 20 %) libre de oxígeno y el pH ajustado a 7.2-7.3, variando el flujo de CO₂. El medio fue dispensado en viales gaseados con N₂/CO₂ y esterilizados por autoclave. Las vitaminas, piruvato y 3 Cl-4-HBA fueron adicionados de un stock de soluciones anoxias después del tratamiento con autoclave.

NOTA: La fotografía de la carátula corresponde a un lodo anaerobio tomado de una laguna de tratamiento de efluentes de una curtiembre del departamento de San José (Uruguay). Para realizarla se utilizó la técnica de FISH utilizando las sondas cfx 1223 y GNSB-941 para el filo *Chloroflexi*. La muestra fue tomada de la entrada a la laguna el 27 de julio de 2005.

BIBLIOGRAFÍA

Adrian, L., Szewzyk, U., Wecke, J., Görisch, J., 2000. Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes. *Nature*, vol. 408, pp. 580–583.

Alphenaar, P.A., 1994. Anaerobic granular sludge: characterization and factors affecting its functioning. Ph.D. thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.

Amann, R., Fuchs, B.M., Behrens, S., 2001. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridisation. *Curr. Opinion Biotechnol.*, vol. 12, pp. 231-236.

Amos, B. K., Ritalahti, K. M., Cruz-Garcia, C., Padilla-Crespo, E., Löffler, F. E., 2008. Oxygen effect on *Dehalococcoides* viability and biomarker quantification. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, pp. 5718–5726.

Aulenta, F., Bianchi, A., Mayone, M., Papini, M. P., Potalivo, M., Tandoi, V., 2005. Assessment of natural or enhanced *in situ* bioremediation at a chlorinated solvent-contaminated aquifer in Italy: a microcosm study. *Environment. International*, vol. 31, pp. 185-190.

Avissar, Y.J., Ormerod, J.G., Beale, S.I., 1989. Distribution of δ -aminolevulinic acid biosynthetic pathways among phototrophic bacterial groups. *Arch. Microbiol.*, vol. 151, pp. 513–519.

Baker, E.N., 1988. Structure of azurin from *Alcaligenes denitrificans*: Refinement at 1.8 Å resolution and comparison of the two crystallographically independent molecules. *J. Molec. Biol.*, vol. 203, pp. 1071–1095.

Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum, L.J., Woese, C.R., Wolfe, R.S., 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.*, vol 43, pp. 260–296.

Bano, N., and Hollibaugh, J.T., 2002. Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68: pp. 505–518.

Baxevanis, A. D., and Ouellette B.F.F, 2001. Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Second Edition. Copyright © 2001 John Wiley & Sons, Inc.

Becker, M., Middendorf, V., Nagarajan, V., Parson, W.W., Martin, J.E., Blankenship, R.E., 1991. Temperature-dependence of the initial electron-transfer kinetic photosynthetic reaction center of *Chloroflexus aurantiacus*. **Biochim. Biophys. Acta**, vol. 1057, pp. 299-312.

Beeman, R.E., Howell, J.E., Shoemaker, S.H., Salazar, E.A., Buttram, J.R., 1994. A field evaluation on *in situ* microbial reductive dehalogenation by biotransformation of chlorinated ethylenes. In: R. E. Hinchee, A. Leeson, L. Semprini, and S.K. Ong (Eds.) Bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbon compounds. Lewis Publishers, Boca Raton, Fla., pp. 14–27.

Beer, M., Seviour, E.M., Kong, Y., Cunningham, M., Blackall, L.L., Seviour, R.J., 2002. Phylogeny of the filamentous bacterium Eikelboom Type 1851 and design and application of a 16S rRNA targeted oligonucleotide probe for its fluorescence *in situ* identification in activated sludge. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 207, pp. 179-183.

Berkaw, M., K. R. Sowers, and H. D. May. 1996. Anaerobic ortho dechlorination of polychlorinated biphenyls by estuarine sediments from Baltimore Harbor. **Appl. Environ. Microbiol.** vol. 62, pp. 2534–2539.

Bertola, N. Palladino, L, Bevilacqua, A., Zaritzky, N., 1999. Optimization of the design parameters in an activated sludge system for the wastewater treatment of a potato processing plant. **J. Food Eng.**, vol. 40, pp. 27-33.

Björnsson, L., Hugenholtz, P., Tyson, G.B., Blackall, L.L., 2002. Filamentous *Chloroflexi* (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. **Microbiology**, vol. 148, pp. 2309-2318.

Blackall, L.L., 1994. Molecular identification of activated sludge foaming bacteria. **Water Sci. Technol.**, vol. 29, pp. 35-42.

Blankenship, R.E., Feick, R., Bruce, B.C., Kirmaier, C., Holten, D., Fuller, R.C., 1983. Primary photochemistry in the facultative green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. **J. Cell. Biol.**, vol. 22, pp. 251–261.

Blankenship, R.E., Mancino, L.J., Feick, R., Fuller, R.C., Machnicki, J., Frank, H.A., Kirmaier, C., Holten, D., 1984. Primary photochemistry and pigment composition of reaction centers isolated from the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. In: C. Sybesma (Ed.) *Advances in Photosynthesis Research* M. Nijhoff/Dr. W. Junk The Hague, The Netherlands, pp. 203–206.

Blankenship, R.E., 1991. Temperature-dependence of the initial electron-transfer kinetics in photosynthetic reaction centers of *Chloroflexus aurantiacus*. **Biochem. Biophys. Acta**, vol. 1057, pp. 299–312.

Blankenship, R. E., 1992. Origin and early evolution of photosynthesis. **Photosynth. Res.**, vol. 33, pp. 91–111.

Bond, C.S., Blankenship, R.E., Freeman, H.C., Guss, J.M., Maher, M.J., Selvaraj, F.M., Wilce, M.C., Willingham, K.M., 2001. Crystal structure of auracyanin, a "blue" copper protein from the green thermophilic photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. **J. Molec. Biol.**, vol. 306, pp. 47–67.

Boomer, S.M., Pierson, B.K., Austinhirst, R., Castenholz, R.W., 2000. Characterization of novel bacteriochlorophyll-a-containing red filaments from alkaline hot springs in Yellowstone National Park. **Arch. Microbiol.**, vol. 174, pp. 152–161.

Boomer, S.M., Lodge, D.P., Dutton, B.E., Pierson, B.K., 2002. Molecular characterization of novel red green nonsulfur bacteria from five distinct hot spring communities in Yellowstone National Park. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 68, pp. 346–355.

Borrego, C.M., Garcia-Gil, J., Cristina, X.P., Vila, X., Abella, C.A., 1998. Occurrence of new bacteriochlorophyll d forms in natural populations of green photosynthetic sulfur bacteria. **FEMS Microbiol. Ecol.**, vol. 26, pp. 257–267.

Bossier, P. y Verstraete, W., 1996. Triggers for microbial aggregation in activated sludge. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, vol 45, pp. 1-6.

Botero, L.M., Brown, K.B., Brumefield, S., Burr, M., Castenholz, R.W., Young, M., and McDermott, T.R., 2004. "Thermobaculum terrenum gen. nov., sp. nov.: a non-phototrophic Gram-positive thermophile representing an environmental clone group related to the Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) and Thermomicrobia." **Arch. Microbiol.**, vol. 181, pp. 269-277.

Bowman, K. S., Moe, W. M., Rash, B. A., Bae, H. S., Rainey, F. A. 2006. Bacterial diversity of an acidic Louisiana groundwater contaminated by dense non aqueous-phase liquid containing chloroethanes and other solvents. **FEMS Microbiol. Ecol.**, vol. 58, pp. 120–133.

Bowman, K.S. Nobre, M. F. da Costa, M. S. Rainey, F.A., Moe, W., 2013. Dehalogenimonas alkenigignens sp. nov., a chlorinated-alkane-dehalogenating bacterium isolated from groundwater. **Int.. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 63, pp. 1492–1498.

Bradford, D., Hugenholtz, P., Seviour, E.M., Cunningham, M., Stratton, H., Seviour, R.J., Blackall, L.L., 1996. 16S rRNA analysis of isolates obtained from Gram-negative, filamentous bacteria micromanipulated from activated sludge. **Sist. Appl. Microbiol.**, vol. 19, pp. 334-343.

Brock, T.D., 1978. Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures Springer-Verlag New York, NY.

Brock, T.D., and Madigan, M.T., 1991. Microbiología, Sexta Edición. Copyright © 1991 by Prentice Hall Hispanoamericana S.A.

Brune, D.C., King, G.H., Infosino, A., Steiner, T., Thewalt, M.L.W., Blankenship, R.E., 1987. Antenna organization in green photosynthetic bacteria. 2: Excitation transfer in detached and membrane-bound chlorosomes from *Chloroflexus aurantiacus*. **Biochemistry**, vol. 26, pp. 8652–8658.

Bunge, M, Adrian, L., Kraus, A., Opel, M., Lorenz, W.G., Andreesen, J.R., Görisch, H, Lechner, U., 2003. Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium. *Nature*, vol. 421, pp. 357-360.

Busti, E., L. Cavaletti, P. Monciardini, P. Schumann, M. Rohde, M. Sosio, and S. Donadio, 2006. *Catenulispora acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel mycelium-forming actinomycete and proposal of *Catenulisporaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 56, pp.1741-1746.

Castenholz, R.W., 1973. The possible photosynthetic use of sulfide by the filamentous phototrophic bacteria of hot springs. *Limnol. Oceanogr.*, vol. 18, pp. 863–876.

Castenholz, R.W., 1982. Motility and taxes In: N. G. Carr and B. A. Whitton (Eds.) *The Biology of Cyanobacteria*. University of California Press Los Angeles, CA, pp. 413–439.

Castenholz, R.W., 1984. Composition of hot spring microbial mats: A summary In: Y. Cohen, R. W. Castenholz, and H. O. Halvorson (Eds.) *Microbial Mats: Stromatolites* Alan R. Liss New York, NY, pp. 101–119.

Castenholz, R.W., 1988a. Culturing methods (*cyanobacteria*) In: L. Packer and A. N. Glazer (Eds.) *Methods in Enzymology: Cyanobacteria*. Academic Press San Diego, CA, pp. 68–93.

Castenholz, R.W., 1988b. The green sulfur and nonsulfur bacteria of hot springs In: J. M. Olson, J. G. Ormerod, J. Amesz, E. Stackebrandt, and H. G. Trüper (Eds.) *Green Photosynthetic Bacteria*. Plenum Press New York, NY, pp. 243–25.

Castenholz, R.W., and Pierson, B.K., 1995. Ecology of thermophilic anoxygenic phototrophs In: R. E. Blankenship, M. T. Madigan, and C. E. Bauer (Eds.) *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, The Netherlands, pp. 87–103.

Castenholz, R.W., 2001. Class I: "*Chloroflexi*" In: D. R. Boone, R. W. Castenholz, and G. M. Garrity (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Springer-Verlag New York, NY vol. 1, pp. 427.

Cavaletti L, Monciardini P, Bamonte R, Schumann P, Rohde M, Sosio M, Donadio S., 2006. New lineage of filamentous, spore-forming, Gram-positive bacteria from Soil. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 72, pp. 4360-4369.

Chandler, D.P., Brockman, F. J., Bailey, T. J., Fredrickson, J.K., 1998. Phylogenetic diversity of *Archaea* and *Bacteria* in a deep subsurface paleosol. **Microb. Ecol.**, vol. 36, pp. 37–50.

Chang, Y., Land, M., Hauser, L., Chertkov, O., Glavina Del Rio, T., Nolan, M., Copeland, A., Tice, H., Cheng, J., Lucas, S., Han, C., Goodwin, L., Pitluck, S., Ivanova, N., Ovchinnikova, G., Pati, A., Chen, A., Palaniappa, K., Mavromatis, K., Liolios, K., Brettin, T., Fiebig, A., Rohde, M., Abt, B., Göker, M., Detter, J., Woyke, T., Bristow, J., Eisen, J., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N., Klenk, H., Lapidus, A., 2011. Non-contiguous finished genome sequence and contextual data of the filamentous soil bacterium *Ktedonobacter racemifer* type strain (SOSP1-21^T). **Standards in Genomic Sciences**, vol. 5, pp. 97-111.

Cheng D., and He J., 2009. Isolation and characterization of “Dehalococcoides” sp. Stain MB, which dechlorinates tetrachloroethene to *trans*-1,2-dichloroethene. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 75, pp. 5910-5918

Cupples, A.M., Spormann, A.M., McCarty, P.L., 2003. Growth of a *Dehalococcoides*-Like Microorganism on Vinyl Chloride and *cis*-Dichloroethene as Electron Acceptors as Determined by Competitive PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol.69, pp. 953–959.

Cupples, A.M., Spormann, A.M., McCarty, P.L., 2004. Comparative Evaluation of Chloroethene Dechlorination to Ethene by *Dehalococcoides*-like Microorganisms. **Environ. Sci. Technol.**, vol. 38, pp., 4768-4774.

Cutter, L. A., K. R. Sowers, May, H. D., 1998. Microbial dechlorination of 2,3,5,6-tetrachlorobiphenyl under anaerobic conditions in the absence of soil or sediment. **Appl. Environ. Microbiol.** vol. 64, pp. 2966–2969.

Cutter, L.A., Watts, J.E.M., Sowers, K.R., May, H.D., 2001. Identification of a microorganism that links its growth to the reductive dechlorination of 2,3,5,6-chlorobiphenyl. **Environ. Microbiol.**, vol. 3, pp. 699–709.

D'Amelio, E.D., Cohen, Y., Des Marais, D.J., 1987. Association of a new type of gliding, filamentous, purple phototrophic bacterium inside bundles of *Microcoleus chthonoplastes* in hypersaline cyanobacterial mats. **Arch. Microbiol.**, vol. 147, pp. 213–220.

D'Amelio, E.D., Cohen, Y., Des Marais, D.J., 1989. Comparative functional ultrastructure of two hypersaline submerged cyanobacterial mats: Gueerrero Negro, Baja California Sur, Mexico, and Solar Lake, Sinai, Egypt In: Y. Cohen and E. Rosenberg (Eds.) *Microbial Mats: Physiological Ecology of Benthic Microbial Communities*. American Society for Microbiology Washington, DC, pp. 97–113.

Delbes, C., Moletta R., Godon, J.J., 2000. Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16SrRNA polymerase chain reaction-single-strand conformations polymorphism analysis. **Environ. Microbiol.**, vol. 2, pp. 506-515.

DeLong, E.F., Wickham, G.S., Pace, N.R., 1989. Phylogenetic stains : ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. **Science**, vol. 243, pp. 1360-1363.

Demharter, W., Hensel, R., Smida, J., Stackebrandt, E., 1989 *Sphaerobacter thermophilus* gen. Nov., sp.nov., a deeply rooting member of the actinomycetes subdivision isolated from thermophilically treated sewage sludge. **Syst. Appl. Microbiol.**, vol. 11, pp. 261-266.

Dojka, M. A., Hugenholtz, P., Haack, S.K., Pace N.R., 1998. Microbial diversity in a hydrocarbon and chlorinated solvent contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 64, pp. 3869-3877.

Doolittle W.F., 1999. Phylogenetic Classification and the Universal Tree. **Science**, vol. 284, pp. 2124-2128.

Dubinina, G.A., and Gorlenko, V.M., 1975. New filamentous photosynthetic green bacteria containing gas vacuoles. **Microbiology**, vol. 44, pp. 452–458.

Duhamel, M., Wehr, S., Yu, L.Y., Rizvi, H., Seepersad, D., Dworatzek, S., Cox, E.E., Edwards, E.A. 2002. Comparison of anaerobic dechlorinating enrichment cultures maintained on tetrachloroethene, trichloroethene, *cis*-1,2-dichloroethene and vinyl chloride. **Water Res.**, vol. 36, pp. 4193–4202.

Duhamel, M., Mo, K., Edwards, E.A., 2004. Characterization of a highly enriched *Dehalococcoides*-containing culture that grows on vinyl chloride and trichloroethene. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 70, pp. 5538–5545.

Dunbar, J., Barns, B.M., Lawrence, T.O., Cheryl, K.R., 2002. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 68, pp. 3035–3045.

Etchebehere, C., Errazquin, M.I., Dabert, P., Muxí, L., 2002. Community análisis of a denitrifying reactor treating landfill leachate. **FEMS Microbiol. Ecol.**, vol 40, pp. 97-106.

Erhart, R., Bradford, D., Seviour, R.J., Amann, R.I., Blackall, L.L., 1997. Development and use of fluorescent *in situ* hybridization probes for the detection and identification of ‘*Microthrix parvicella*’ in activated sludge. **Sist. Appl. Microbiol.**, vol. 20, pp. 310-318.

Fagervold, S.K., Watts, J.E.M., May, H.D., Sowers, K.R., 2005. Sequential Reductive Dechlorination of *meta*-Chlorinated Polychlorinated Biphenyl Congeners in Sediment Microcosms by Two Different *Chloroflexi* Phylotypes. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 71, pp. 8085-8090.

Feick, R.G., Fitzpatrick, M., Fuller, R.C., 1982. Isolation and characterization of cytoplasmic membranes and chlorosomes from the green bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. **J. Bacteriol.**, vol. 150, pp. 905–915.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* vol. 39, pp. 783–791.

Fennell, D.E., Nijenhuis, I., Wilson, S.F., Zinder, S.H., Häggblom, M.M., 2004. *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 reductively dechlorinates diverse chlorinated aromatic pollutants. *Environ. Sci. Technol.*, vol 38, pp. 2075-2081.

Garcia-Pichel, F., Mechling, M., Castenholz, R.W., 1994. Diel migrations of microorganisms within a benthic, hypersaline mat community. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 60, pp. 1500–1511.

Garcia-Pichel, F., Nübel, U., Muyzer, G., 1998. The phylogeny of unicellular, extremely halotolerant *Cyanobacteria*. *Arch. Microbiol.*, vol. 169, pp. 469–482.

Garrity, G.M., and Holt, J.G., 2001a. Filo BVI. *Chloroflexi* phy. nov. In: D. R. Boone, R. W. Castenholz and G. M. Garrity. (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*. 2nd edn, New York, Springer, vol. 1, pp. 427.

Garrity, G.M., and Holt, J.G., 2001b. Filo BVII. *Thermomicrobia* phy. nov. In: D. R. Boone, . W. Castenholz and G. M. Garrity (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*. 2nd edn, New York, Springer, vol. 1, pp. 447.

Gieh, F., Garcia-Gil, J., Overmann, J., 2001. Previously unknown and phylogenetically diverse members of the green nonsulfur bacteria are indigenous to freshwater lakes. *Arch. Mikrobiol.*, vol. 177, pp. 1–10.

Giovannoni, S.J., Revsbech, N.P., Ward, D.M., Castenholz, R.W., 1987. Obligately phototrophic *Chloroflexus*: primary production in anaerobic hot spring microbial mats. *Arch. Microbiol.*, vol. 147, pp. 80–87.

Giovannoni, S.J., Rappé, M.S., Vergin, K.L., Adair, N.L., 1996. 16S rRNA genes reveal stratified open ocean bacterioplankton populations related to the Green Non-Sulfur bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* vol. 9, pp. 7979-7984.

Gorlenko, V.M., 1976. Characteristics of filamentous phototrophic bacteria from freshwater lakes. **Microbiology**, vol. 44, pp. 682–684.

Gorlenko, V.M., and Pivovarova, T.A., 1977. On the belonging of bluegreen alga *Oscillatoria coerulea* Gicklhorn, 1921 to a new genus of *Chlorobacteria* *Oscillochloris* nov. gen. **Izv. Akad. Nauk. SSSR, Ser. Biol.**, vol. 3, pp. 396–409.

Gorlenko, V.M., and Korotkov, S.A., 1979a. Morphological and physiological features of the new filamentous gliding green bacterium *Oscillochloris trichoides* nov. comb. **Izv. Acad. Nauk. Uzb. SSSR, Ser. Biol.**, vol. 5, pp. 848–857.

Gorlenko, V.M., and Lokk, S.I., 1979b. Vertical distribution and characteristics of the species composition of microorganisms from some stratified Estonian lakes. **Mikrobiologiya**, vol. 48, pp. 351–359.

Gorlenko, V.M., 1988. Ecological niches of green sulfur and gliding bacteria In: J. M. Olson, J. G. Ormerod, J. Amesz, E. Stackebrandt, and H. G. Trüper (Eds.) *Green Photosynthetic Bacteria*. Plenum Press New York, NY, pp. 257–267.

Gorlenko, V.M., 1989. Genus "*Oscillochloris*" In: J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig, and J. G. Holt (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins Baltimore, MD, pp. 1703–1706.

Gorlenko, V.M., and Pierson, B.K., 2001. Genus II: *Chloronema* In: D. R. Boone, R. W. Castenholz, and G. M. Garrity (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Springer-Verlag New York, NY vol. 1, pp. 437–438.

Grégoire, P., Bohli, M., Cayol, J.-L., Joseph, M., Guasco, S., Dubourg, K., Cambar, J., Michotey, V., Bonin, P., Fardeau, M.-L., and Ollivier, B. 2011a. *Caldilinea tarbellica* sp. nov., a novel filamentous thermophilic anaerobic bacterium, isolated from a deep hot aquifer in the Aquitaine Basin (South-West, France). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 61, pp. 1436-1441.

Grégoire, P., Fardeau, M.-L., Joseph, M., Guasco, S., Hamaide, F., Biasutti, S., Michotey, V., Bonin, P., Ollivier, B., 2011b. Isolation and characterization of *Thermanaerotherix daxensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic anaerobic bacterium

pertaining to the phylum “Chloroflexi”, isolated from a deep hot aquifer in the Aquitaine Basin. **Syst. Appl. Microbiol.**, vol. 34, pp. 494-497.

Groster, A., and Edwards, E.A., 2006. A 1,1,1-Trichloroethane-Degrading Anaerobic Mixed Microbial Culture Enhances Biotransformation of Mixtures of Chlorinated Ethenes and Ethanes. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 72, pp. 7849-7856.

Gruber, T.M., and Bryant, D.A., 1997. Molecular systematic studies of *Eubacteria*, using 70-type sigma factors of group 1 and group 2. **J. Bacteriol.**, vol. 179, pp. 1734–1747.

Gruber, T.M., and Bryant, D.A., 1998a. Characterization of the group 1 and group 2 sigma factors of the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* and the green non-sulfur bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. **Arch. Microbiol.**, vol. 170, pp. 285–296.

Gruber, T.M., Eisen, J.A., Gish, K., Bryant, D.A., 1998b. Phylogenetic relationships of *Chlorobium tepidum* and *Chloroflexus aurantiacus* based upon their RecA sequences. **FEMS Microbiol. Lett.**, vol. 162, pp. 53–60.

Guiot, S.R., Pauss, A., Costerton, J.W., 1992. A structured model of the anaerobic granule consortium. **Water Sci. Technol.**, vol 25, pp. 1–10.

Gupta, R.S., Mukhtar, T., Singh, B., 1999. Evolutionary relationships among photosynthetic prokaryotes (*Heliobacterium chlorum*, *Chloroflexus aurantiacus*, cyanobacteria, *Chlorobium tepidum*, and proteobacteria): Implications regarding the origin of photosynthesis. **Molec. Microbiol.**, vol. 32, pp. 893–906.

Halfen, L.N., Pierson, B.K., Francis, G.W., 1972. Carotenoids of a gliding organism containing bacteriochlorophylls. **Arch. Mikrobiol.**, vol. 82, pp. 240–246.

Hanada, S. and Pierson, B.K., 2006. “The family Chloroflexaceae”. **Prokaryotes** vol. 7, chapter 10.1 pp. 815–842.

Hanada, S., Hiraishi, A., Shimada, K., Matsuura, K., 1995a. *Chloroflexus aggregans* sp. nov., a filamentous phototrophic bacterium which forms dense cell aggregates by active gliding movement. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, vol. 45, pp. 676–681.

Hanada, S., Hiraishi, A., Shimada, K., Matsuura, K., 1995b. Isolation of *Chloroflexus* sp. and related thermophilic photosynthetic bacteria from hot springs using an improved isolation procedure. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, vol. 41, pp. 119–130.

Hanada, S., Shimada, K., Matsuura, K., 2002a. Active and energy-dependent rapid formation of cell aggregates in the thermophilic photosynthetic bacterium *Chloroflexus aggregans*. **FEMS Microbiol. Lett.**, vol. 208, pp. 275–279.

Hanada, S., S. Takaichi, Matsuura, K., Nakamura, K., 2002b. *Roseiflexus castenholzii* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, filamentous, photosynthetic bacterium which lacks chlorosomes. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 52, pp. 187–193.

Harwardt, R., Maier, E., Reichenbach, H., Weckesser, J., Benz R., 2004. Channel-Forming (Porin) Activity in *Herpetosiphon aurantiacus* Hp a2. **Journal of Bacteriology**, vol. 186, pp. 6667–6670.

He, J., Sung, Y., Dollhopf, M.E., Fathepure, B.Z., Tiedje, J.M., Löffler, F.E., 2002. Acetate versus hydrogen as direct electron donors to stimulate the microbial reductive dechlorination process at chloroethene-contaminated site. **Environ. Sci. Technol.**, vol. 36, pp. 3945-3952.

He, J., Ritalahti, K.M., Aiello, M.R., Löffler, F.E., 2003a. Complete detoxification of vinyl chloride by an anaerobic enrichment culture and identification of the reductively dechlorinating population as a *Dehalococcoides* species. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 69, pp. 996-1003.

He, J., Ritalahti, K.M., Yang, K.L., Koenigsberg, S.S., Löffler, F.E., 2003b. Detoxification of vinyl chloride to ethene coupled to growth of an anaerobic bacterium. **Nature**, vol. 424, pp. 62–65.

He J., Sung Y., Krajmalnik-Brown R., Ritalahti K.M., Löffler F.E., 2005. Isolation and characterization of *Dehalococcoides* sp. strain FL2, a trichloroethene (TCE)- and 1,2-dichloroethene-respiring anaerobe. **Environ. Microbiol.**, vol. 7, pp. 1442-1450.

Heda, G.D., and Madigan, M.T., 1986. Utilization of amino acids and lack of diazotrophy in the thermophilic anoxygenic phototroph *Chloroflexus aurantiacus*. **J. Gen. Microbiol.**, vol. 132, pp. 2469–2473.

Hendrickson, E., Payne, J.A., Young, R.M., Starr, M.G., Perry, M. P., Fahnestock, S., Ellis, D.E., Ebersole, R.C., 2002. Molecular Analysis of *Dehalococcoides* 16S Ribosomal DNA from Chloroethene-Contaminated Sites throughout North America and Europe. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 68, pp. 485-495.

Hensel, R., Demharter, W., Hilpert, R., 1989. The microflora involved in aerobic-thermophilic sludge stabilization. **Syst. Appl. Microbiol.**, vol. 11, pp. 312–319.

Hentschel, U., Hopke, J., Horn, M., Friedrich, A.B., Wagner, M., Hacker, J., Moore, B.S., 2002. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 68, pp. 4431–4440.

Hjorleifsdottir, S., Skirnisdottir, S., Hreggvidsson, G. O., Holst, O. & Kristjansson, J. K., 2001. Species composition of cultivated and non-cultivated bacteria from short filaments in an Icelandic hot spring at 88°C. **Mircob. Ecol.**, vol. 42, pp. 117-125.

Holo, H., 1989. *Chloroflexus aurantiacus* secretes 3-hydroxypropionate, a possible intermediate in the assimilation of CO₂ and acetate. **Arch. Microbiol.**, vol. 151, pp. 252–256.

Hölscher, T., Görisch, H., Adrian, L., 2003. Reductive Dehalogenation of Chlorobenzene Congeners in Cell Extracts of *Dehalococcoides* sp. Strain CBDB1. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol 69, pp 2999-3001.

Holt, J.G., and Lewin, R.A., 1968. *Herpetosiphon aurantiacus* gen. et sp. n., a new filamentous gliding organism. **J. Bacteriol.**, vol. 95, pp. 2407–2408.

Hugenholtz, P., Goebel, B.M., Pace, N.R., 1998. Impact of cultured-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **J. Bactetiol.**, vol. 180, pp. 4765-4774.

Hugenholtz, P., 2002. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. **Genome Biol** vol. 3, reviews0003.1–0003.8.

Hugenholtz, P. and Stackebrandt, E., 2004. Reclassification of *Sphaerobacter thermophilus* from the subclass *Sphaerobacteridae* in the filo *Actinobacteria* to the class *Thermomicrobia* (emended description) in the filo Chloroflexi (emended description). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 54, pp. 2049–2051.

Imachi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Loy, A., Qiu, Y.-L., Hugenholtz, P., Kimura, N., Wagner, M., Ohashi, A., Harada, H. 2006. Non-sulfate-reducing, syntrophic bacteria affiliated with the *Desulfotomaculum* cluster I are widely distributed in methanogenic environments. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 72, pp. 2080–2091.

Inagaki, F., Nunoura, T., Nakagawa, S., Teske, A., Lever, M., Lauer, A., Suzuki, M., Takai, K., Delwiche, M., Colwell, F., Nealson, K.H., Horikoshi, K., D'Hondt, S., 2006. Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. **PNAS**, vol. 103, pp. 2815-2820; www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0511033103.

Ivanovsky, R.N., Krasil'nikova, E.N., Fal, Y.G., 1993. A pathway of the autotrophic CO₂ fixation in *Chloroflexus aurantiacus*. **Arch. Microbiol.**, vol. 159, pp. 257–264.

Ivanovsky, R.N., Fal, Y.I., Berg, I.A., Ugol'kova, N.V., Krasilnikova, E.N., Keppen, O.I., Zakharchuc, L.M., Zyakun, A.M., 1999. Evidence for the presence of the reductive pentose phosphate cycle in a filamentous anoxygenic photosynthetic bacterium, *Oscillochloris trichoides* strain DG-6. **Microbiology**, vol. 145, pp. 1743–1748.

Jackson, T.J., Ramaley, R.F., Meinschein, W.G., 1973. *Thermomicrobium*, a new genus of extremely thermophilic bacteria. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, vol. 23, pp. 28-36.

Jobb, G. 2007. TREEFINDER, version of February 2007. Distributed by the author, Munich, Germany. <http://www.treefinder.de>

Jørgensen, B.B., and Nelson, D.C., 1988. Bacterial zonation, photosynthesis, and spectral light distribution in hot spring microbial mats of Iceland. **Microb. Ecol.**, vol. 16, pp. 133–147.

Jürgens, U.J., Meiszner, J., Fischer, U., König, W.A., Weckesser, J., 1987. Ornithine as a constituent of the peptidoglycan of *Chloroflexus aurantiacus*, diaminopimelic acid in that of *Chlorobium vibrioforme f. thiosulfatophilum*. **Arch. Microbiol.**, vol. 148, pp. 72–76.

Jürgens, U.J., Meissner, J., Reichenbach, H., Weckesser, J., 1989. L-Ornithin containing peptidoglycan-polysaccharide complex from the cell wall of the gliding bacterium *Herpetosiphon aurantiacus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, vol. 60, pp. 247–250.

Juretschko, S., Loy, A., Lehner, A., Wagner, M., 2002. The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. **Syst. Appl. Microbiol.**, vol. 25, pp. 84-99.

Kale, V., Bjornsdottir, S.H., Fridjonsson, O.H., Petursdottir, S.K., Omarsdottir, S., and Hreggvidsson, G.O., in press 2013. *Litorilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., an aerobic member of class *Caldilineae*, filo *Chloroflexi*, isolated from an intertidal hot spring". **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 63, pp. 1149-54.

Kanagawa, T., Kamagata, Y., Aruga, S., Kohno, T., Horn, M., Wagner, M., 2000. Phylogenetic analysis of and oligonucleotide probe development for Eikelboom Type 021N filamentous bacteria isolated from bulking activated sludge. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 66, pp. 5043-5052.

Kaulen, H., and Klemme, J.H., 1983. No evidence of covalent modification of glutamine synthetase in the thermophilic phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, vol. 20, pp. 75–79.

Kawaichi, S., Ito, N., Kamikawa, R., Sugawara, T., Yoshida, T., Sako, Y. 2013. *Ardenticatena maritima* gen. nov., sp. nov., a ferric iron- and nitrate-reducing bacterium of the phylum 'Chloroflexi' isolated from an iron-rich coastal hydrothermal field, and

description of *Ardenticatenia* classis nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol 63, pp. 2992-3002.

Kenyon, C.N., and Gray, A.M., 1974. Preliminary analysis of lipids and fatty acids of green bacteria and *Chloroflexus aurantiacus*. **J. Bacteriol.**, vol. 120, pp. 131–138.

Keppen, O.I., Lebedeva, N.V., Troshina, O.Y., Rodionov, Y.V., 1989. The nitrogenase activity of a filamentous phototrophic green bacterium. **Mikrobiologiya**, vol. 58, pp. 520–521.

Keppen, O.I., Baulina, O.I., Lysenko, A.M., Kondrat'eva, E.N., 1993. New green bacterium belonging to family *Chloroflexaceae*. **Mikrobiologiya**, vol. 62, pp. 179–185.

Keppen, O.I., Baulina, O.I., Kondratieva, E.N., 1994. *Oscillochloris trichoides* neotype strain DG-6. **Photosynth. Res.**, vol. 41, pp. 29–33.

Keppen, O.I., Tourova, T.P., Kuznetsov, B.B., Ivanovsky, R.N., Gorlenko, V.M., 2000. Proposal of *Oscillochloridaceae* fam. nov. on the basis of a phylogenetic analysis of the filamentous anoxygenic phototrophic bacteria, and emended description of *Oscillochloris* and *Oscillochloris trichoides* in comparison with further new isolates. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 50, pp. 1529–1537.

Kern, M., and Klemme, J.H., 1989. Inhibition of bacteriochlorophyll biosynthesis by gabaculin (3-amino,2,3-dihydrobenzoic acid) and presence of an enzyme of the C5-pathway of d-amin-levulinate synthesis in *Chloroflexus aurantiacus*. **Z. Naturforsch.**, vol. 44c, pp. 77–80.

Kirmaier, C., Holten, D., Feick, R., Blankenship, R.E., 1983. Picosecond measurements of the primary photochemical events in reaction centers isolated from the facultative green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*: Comparison with the purple bacterium *Rhodospseudomonas sphaeroides*. **FEBS Lett.**, vol. 158, pp. 73-78.

Kleinig, H. and Reichenbach, H., 1977. Carotenoid glucosides and menaquinones from the gliding bacterium *Herpetosiphon giganteus* Hp a2. **Arch. Microbiol.**, vol. 112, pp. 307-310.

Klemme, J.H., Laakmann-Ditges, G., Mertschuweit, J., 1988. Ammonia assimilation and amino acid metabolism in *Chloroflexus aurantiacus* In: J. M. Olson, J. G. Ormerod, J. Amesz, E. Stackebrandt, and H. G. Trüper (Eds.) Green Photosynthetic Bacteria. Plenum Press New York, NY, pp. 173-174.

Klemme, J.H., 1989. Organic nitrogen metabolism of phototrophic bacteria. **Ant. v. Leeuwenhoek**, vol. 55, pp. 197–219.

Knaff, D.B., Wynn, R.M., Redlinger, T.E., Blankenship, R.E., Foster, J.M., Shaw, R.W., Fuller, R.C., 1988. Electron transport chains of phototrophically and chemotrophically grown *Chloroflexus aurantiacus* In: J. M. Olson, J. G. Ormerod, J. Amesz, E. Stackebrandt, and H. G. Trüper (Eds.) Green Photosynthetic Bacteria. Plenum Press New York, NY, pp. 145–147.

Knudsen, E., Jantzen, E., Bryn, K., Ormerod, J.G., Sirevåg, R., 1982. Quantitative and structural characteristics of lipids in *Chlorobium* and *Chloroflexus*. **Arch. Microbiol.**, vol. 132, pp. 149–154.

Koizumi, Y., Kojima, H., Fukui, M., 2004. Dominant microbial composition and its vertical distribution in saline meromictic lake Kaiike (Japan) as revealed by quantitative oligonucleotide probe membrane hybridization. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 70, pp. 4930-4940.

Kondrat'eva, E.N., and Krasil'nikova, E.N., 1988. Utilization of thiosulfate by *Chloroflexus aurantiacus*. **Microbiology**, vol. 57, pp. 291–294.

Kragelund, C., Levantesi, C., Borger, A., Thelen, K., Tandoi, V., Eikelboom, D., 2006. Identity, abundance and ecophysiology of different filamentous *Chloroflexi* species from activated sludge treatment plants. **FEMS Microbiol. Ecol.**, vol. 59, pp. 671-682.

Krajmalnik-Brown, R., Hölscher, T Thomson, I.N., Saunders, F.M., Ritalahti, K.M., Löffler, F.E., 2004. Genetic identification of a putative vinyl chloride reductase in *Dehalococcoides* sp. strain BAV1. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 70, pp 6347–6351.

Kuever, J., Rainey, F.A., Widdel, F. 2005. Genus I. Desulfobacter Widdel 1981, 382VP (Effective publication: Widdel 1980, 376). **In Bergey's Manual of Systematic**

Bacteriology, Vol. 2C. Brenner, D., Krieg, N.R., Staley, J.T., and Garrity, G.M. (eds). New York, NY, USA: Springer, pp. 961–964.

Laakmann-Ditges, G., and Klemme, J.H., 1986. Occurrence of two L-threonine (L-serine) dehydratases in the thermophile *Chloroflexus aurantiacus*. **Arch. Microbiol.**, vol. 144, pp. 219–221.

Laakmann-Ditges, G., and Klemme, J.H., 1988. Amino acid metabolism in the thermophilic phototroph, *Chloroflexus aurantiacus*: properties and metabolic role of two L-threonine (L-serine) dehydratases. **Arch. Microbiol.**, vol. 149, pp. 249–254.

Lee, P.K.H., Cheng, D., Hu, P., West, K.A., Dick, G.J., Brodie, E.L., Andersen, G.L., Zinder, S.H., He, J., Alvarez-Cohen L., 2011 Comparative genomics of two newly isolated *Dehalococcoides* strains and an enrichment using a genus microarray. **ISME J.** vol. 5, pp. 1014–1024.

Lendvay, J.M., Löffler, F.E., Dollhopf, M., Aiello, M.R., Daniels, G., Fathepure, B.Z., Gebhard, M., Heine, R., Helton, R., Shi, J., Krajmalnik-Brown, R., Major, C.L., Jr., Barcelona, M.J., Petrovskis, E., Hickey, R., Tiedje, J. M., Adriaens, P., 2003. Bioreactive Barriers: A Comparison of Bioaugmentation and Biostimulation for Chlorinated Solvent Remediation. **Environ. Sci. Technol.**, vol. 37, pp. 1422-1431.

Lewin, R. A., 1970. New *Herpetosiphon* species (*Flexibacterales*). **Can. J. Microbiol.**, vol. 16, pp. 517-520.

Lewin, Benjamin, 2001. Lewin's Genes VII, Copyright © 2001 by Marbán Libros, S.L.

Lippel, G., 2005. V Curso de Tratamentos Biológico de Resíduos, capítulo IV.2, Florianópolis 2005.

Löffler, F. E., Sanford, R. A., Tiedje, J. M., 1996. Initial characterization of a reductive dehalogenase from *Desulfitobacterium chlororespirans* Co23. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 62, pp. 3809–3813.

Löffler, F.E., Champine, J.E., Ritalahti, K.M., Sprague, S.J., Tiedje, J.M., 1997. Complete reductive dechlorination of 1,2-dichloropropane by anaerobic bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 63, pp. 2870–2875.

Löffler, F.E., Tiedje, J.M., Sanford, R. A., 1999. Fractions of electrons consumed in electron acceptor reduction and hydrogen thresholds as indicators of halorespiratory physiology. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol 65, pp. 4049–4056.

Löffler, F.E., Sun, Q., Li, J., Tiedje, J.M., 2000. 16S rRNA gene-based detection of tetrachloroethene-dechlorinating *Desulfuromonas* and *Dehalococcoides* species. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 66, pp. 1369–1374.

Löffler, F.E. Yan, J., Ritalahti, K.M., Adrian, L., Edwards, E.A., Konstantinidis, K.T., Müller, J.A., Fullerton, ,H. Zinder, S.H. and Spormann A.M., 2013. *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidia* classis nov., order *Dehalococcoidales* ord. nov. and family *Dehalococcoidaceae* fam. nov., within the phylum *Chloroflexi*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 63, pp. 625–635.

Loffer, F.E. Ritalahti, K.M., Zinder, S.H., 2013. Bioaugmentation for Groundwater Remediation. (capitulo II *Dehalococcoides* and reductive dechlorination of chlorinated solvent) Edited by Hans Frederik Stroo, Andrea Leeson, Calvin Herbert Ward.

Løken, Ø., and Sirevåg, R., 1982. Evidence for the presence of the glyoxylate cycle in *Chloroflexus*. **Arch. Microbiol.**, vol. 132, pp. 276–279.

Lovley, D. and Phillips, E., 1986. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 51, pp. 683-689.

Lovley, D. and Phillips, E., 1987. Rapid assay for microbially reducible ferric iron in aquatic sediments. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 53, pp. 1536-1540.

Loy A, Maixner F, Wagner M, Horn M. 2007. probeBase - an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. **Nucleic. Acids. Res.**, vol. 35, pp. 800-804.

Mack, E.E., and Pierson, B.K., 1988. Preliminary characterization of a temperate marine member of the *Chloroflexaceae* In: J. M. Olson, J. G. Ormerod, J. Amesz, E. Stackebrandt, and H. G. Trüper (Eds.) Green Photosynthetic Bacteria. Plenum Publishing New York, NY, pp. 237–241.

Macleod, F.A., Guiot, S.R., Costerton, J.W., 1990. Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 56, pp. 1598-1607.

Madigan, M.T., Petersen, S.R., Brock, T.D., 1974. Nutritional studies on *Chloroflexus*, a filamentous photosynthetic, gliding bacterium. **Arch. Microbiol.**, vol. 100, pp. 97–103.

Madigan, M.T., and Brock, T.D., 1975. Photosynthetic sulfide oxidation by *Chloroflexus aurantiacus*, a filamentous, photosynthetic gliding bacterium. **J. Bacteriol.**, vol. 122, pp. 782–784.

Madigan, M.T., and Brock, T.D., 1977. CO₂ fixation in photosynthetically-grown *Chloroflexus aurantiacus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, vol. 1, pp. 301–304.

Madigan, M. T., Martinko, J.M., Parker, J., 2000. Brock biology of microorganisms, 9th ed. Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, N.J.

Magnuson, J.K., Stern, R.V., Gossett, J.M., Zinder, S.H., Burris, D.R., 1998. Reductive Dechlorination of Tetrachloroethene to Ethene by a Two-Component Enzyme Pathway. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol 64, pp. 1270-1275.

Magnuson, J.K., Romine, M.F., Burris, D.R., Kingsley, M.T., 2000. Trichloroethene reductive dehalogenase from *Dehalococcoides ethenogenes*: sequence of *tceA* and substrate range characterization. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol 66, pp. 5141–5147.

Major, D.W., McMaster, M.L., Cox, E.E., Edwards, E.A., Dworatzek, S.M., Hendrickson, E.R., Starr, M.G., Payne, J.A., Buonamici, L.W., 2002. Field demonstration of successful bioaugmentation to achieve dechlorination of tetrachloroethene to ethene. **Environ. Sci. Technol.**, vol.36, pp. 5106-5116.

Malik, K.A., 1998. Preservation of *Chloroflexus* by deep-freezing and liquid-drying methods. **J. Microbiol. Meth.**, vol. 32, pp. 73–77.

Maymo-Gatell, X., Tandoi, V., Gossett, J.M., Zinder, S.H., 1995. Characterization of an H₂-utilizing enrichment culture that reductively dechlorinates tetrachloroethene to vinyl chloride and ethene in the absence of methanogenesis and acetogenesis. **Appl. Environ. Microbiol.** vol. 61, pp. 3928–3933

Maymo-Gatell, X., Chien, Y., Gossett, J.M., Zinder, S.H., 1997. Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. **Science**, vol. 276, pp. 1568-1571.

McManus, J.D., Brune, D.C., Han, J., Sanders-Loehr, J., Meyer, T.E., Cusanovich, M.A., Tollin, G., Blankenship, R.E., 1992. Isolation, characterization, and amino acid sequences of auracyanins, blue copper proteins from the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. **J. Biol. Chem.**, vol. 267, pp. 6531–6540.

McMurdie, P.J., Hug, L.A., Edwards, E.A., Holmes, S., Spormann, A.M., 2011. Site-Specific Mobilization of Vinyl Chloride Respiration Islands by a Mechanism Common in Dehalococcoides. **Genomics**, vol. 12 pp. 287-302

Meissner, J., Krauss, J.H., Jürgens, U.J., Weckesser, J., 1988. Absence of a characteristic cell wall lipopolysaccharide in the phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. **J. Bacteriol.**, vol. 170, pp. 3213–3216.

Menendez, C., Bauer, Z., Huber, H., Gadón, N., Stetter, K.O., Fuchs, G., 1999. Presence of acetyl coenzyme A (CoA) carboxylase and propionyl-CoA carboxylase in autotrophic *Crenarchaeota* and indication for operation of a 3-hydroxypropionate cycle in autotrophic carbon fixation. **J. Bacteriol.**, vol. 181, pp. 1088–1098.

Merkel, G.J., Durham, D.R., Perr, J.J., 1980. The atypical cell wall composition of *Thermomicrobium roseum*. **Can. J Microbiol.**, vol. 26, pp. 556-559.

Moe, W.M., Yan, J., Nobre, M.F., da Costa, M., Rainey, F., 2009. Dehalogenimonas lykanthroporepellens gen. nov., sp. nov., a reductively dehalogenating bacterium isolated from chlorinated solvent-contaminated groundwater. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 59, pp. 2692–2697.

Moench, T. T., and J. G. Zeikus. 1983. An improved preparation method for a titanium (III) media reductant. **J. Microbiol. Methods**, vol. 1, pp. 199–202.

Moreira H., 2005. V Curso de Tratamentos Biológico de Resíduos, capítulo 1.1, Florianópolis 2005.

Morris, R.M., Rappé, M.S., Urbach, E., Connon, S.A., Giovannoni, S.J., 2004. Prevalence of the *Chloroflexi*-Related SAR202 Bacterioplankton Cluster throughout the Mesopelagic Zone and Deep Ocean. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 70, pp. 2836-2842.

Mulkiđjanian, A., Venturoli, G., Hochkoepler, A., Zannoni, D., Melandri, B.A., Drachev, L., 1998. Photosynthetic electrogenic events in native membranes of *Chloroflexus-aurantiacus*—flash-induced charge displacements within the reaction-center cytochrome c(554) complex. **Photosynth. Res.**, vol. 41, pp. 35–143.

Müller, J.A., Rosner, B.M., von Abendroth, G., Meshulam-Simon, G., McCarty, P.L., Spormann, A.M., 2004. Molecular identification of the catabolic vinyl chloride reductase from *Dehalococcoides* sp. strain VS and its environmental distribution. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 70, pp. 4880–4888.

Neefs, J.M., Van de Peer, Y., Hendriks, L., De Wachter, R., 1990. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. **Nucleic. Acids Res.**, vol. 18, pp. 2237-2330.

Neefs, J.M., Van de Peer, Y., De Rijk, P., Chapelle, S., De Wachter, R., 1993. The ribosomal database project. **Nucleic. Acids Res.**, vol. 21, pp. 3025-3049.

Nowroozi, J., Mirzaii, M., Tabatabai, P., 2004. Isolation of *Herpetosiphon giganteus* and Ultrastructure Analysis by Electron Microscopy. **Iranian Biomedical Journal**, vol. 8, pp. 19-23.

Nozawa, T., and y Madigan, M.T., 1991. Temperature and solvent effects on reaction centers from *Chloroflexus aurantiacus* and *Chromatium tepidum*. **J. Bacteriol.**, vol. 110, pp. 588–594.

Nübel, U., Bateson, M.M., Madigan, M.T., Kuhl, M., Ward, D.M., 2001. Diversity and distribution in hypersaline microbial mats of bacteria related to *Chloroflexus spp.* **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 67, pp. 4365–4371.

Nübel, U., Bateson, M.M., Vandieken, V., Wieland, A., Kühl, M., Ward, D.M., 2002. Microscopic Examination of Distribution and Phenotypic Properties of Phylogenetically Diverse *Chloroflexaceae*-Related Bacteria in Hot Spring Microbial Mats. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 68, pp. 4593–4603.

Ochman, H., Lawrence, J.G., Groisman, E.A., 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, vol. 405, pp. 299-304. Review.

Ohmori, K., Hirose, M., Ohmori, M., 1992. Function of cAMP as a mat-forming factor in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Plant. Cell Physiol.**, vol. 33, pp. 21–25.

Olsen, G.J., and Woese, C.R., 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. **FASEB J.**, vol. 7, pp.113-123.

Olsen, G.J., Woese, C.R., Overbeek, R., 1994. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. **J. Bacteriol.**, vol. 176, pp. 1-6.

Ovchinnikov, Y.A., Abdulaev, N.G., Shmukler, B.E., Zargarov, A.A., Kutuzov, M.A., Telezhinskaya, I.N., Levina, N.B., Zolotarev, A.S., 1988a. Photosynthetic reaction centre of *Chloroflexus aurantiacus*. II: Primary structure of M-subunit. **FEBS Lett.**, vol. 232, pp. 364–368.

Ovchinnikov, Y.A., Abdulaev, N.G., Zolotarev, A.S., Shmukler, B.E., Zargarov, A.A. Kutuzov, M.A., Telezhinskaya, I.N., Levina, N.B., 1988b. Photosynthetic reaction centre of *Chloroflexus aurantiacus*. I: Primary structure of L-subunit. **FEBS Lett.**, vol. 231, pp. 237–242.

Oyaizu, H., Devrunner-Vossbrinck, B., Mandelko, L., Studier, J.A., Woese, C.R., 1987. The green non-sulfur bacteria: a deep branching in the eubacterial line of descent. **System. Appl. Microbiol.**, vol. 9, pp. 47–53.

Palmisano, A.C., Cronin, S.E., D'Amelio, E.D., Munoz, E., Des Marais, D.J., 1989. Distribution and survival of lipophilic pigments in a laminated microbial mat community near Guerrero Negro, Mexico In: Y. Cohen and E. Rosenberg (Eds.) *Microbial Mats: Physiological Ecology of Benthic Microbial Communities*. American Society for Microbiology Washington, DC, pp. 138–152.

Pentecost, A., 1995. The microbial ecology of some Italian hot-spring travertines. **Microbios**, vol. 81, pp. 45–58.

Perry, J. 1984. Genus *Thermomicrobium* In: Bergey, D. H., Krieg, N., Holt, J. G. (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, MD., vol. 1, pp. 338-339.

Pfennig, N., 1989. Multicellular filamentous green bacteria In: J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig, and J. G. Holt (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins Baltimore, MD vol. 3, pp. 1697–1707.

Pfennig, N., and Trüper, H.G., 1992. The family *Chloimatiaceae* In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (Eds.) *The Prokaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag New York, NY, pp. 3200–3221.

Phelps, C.D., Kerkhof, L.J., Young, L.Y., 1998. Molecular characterization of a sulfate-reducing consortium which mineralizes benzene. **FEMS Microbiol. Ecol.**, vol. 27, pp. 269-279.

Pierson, B.K., and Castenholz, R.W., 1971. Bacteriochlorophylls in gliding filamentous prokaryotes from hot springs. **Nature**, vol. 223, pp. 25–27.

Pierson, B.K., and Castenholz, R.W., 1974a. A phototrophic gliding filamentous bacterium of hot springs, *Chloroflexus aurantiacus*, gen. and sp. nov. **Arch. Microbiol.**, vol. 100, pp. 5–24.

Pierson, B.K., and Castenholz, R.W., 1974b. Studies of pigments and growth in *Chloroflexus aurantiacus*, a phototrophic filamentous bacterium. **Arch. Microbiol.**, vol. 100, pp. 283–305.

Pierson, B.K., and Thornber, J.P., 1983. Isolation and spectral characterization of photochemical reaction centers from the thermophilic green bacterium *Chloroflexus aurantiacus* strain J-10-fl. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol. 80, pp. 80–84.

Pierson, B.K., Giovannoni S.J., Castenholz, R.W., 1984a. Physiological ecology of a gliding bacterium containing bacteriochlorophyll *a*. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 47, pp. 576–584.

Pierson, B.K., Keith, L.M., Leovy, J.G., 1984b. Isolation of pigmentation mutants of the green filamentous photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. **J. Bacteriol.**, vol. 159, pp. 576–584.

Pierson, B.K., 1985. Cytochromes in *Chloroflexus aurantiacus* grown with and without oxygen. **Arch. Microbiol.**, vol. 143, pp. 260–265.

Pierson, B.K., Giovannoni, S.J., Stahl, D.A., Castenholz, R.W., 1985. *Heliothrix oregonensis*, gen. nov., sp. nov., a phototrophic filamentous gliding bacterium containing bacteriochlorophyll *a*. **Arch. Microbiol.**, vol. 142, pp. 164–167.

Pierson, B.K., Valdez, D., Larsen, M., Morgan, E., Mack, E.E., 1994. *Chloroflexus*-like organisms from marine and hypersaline environments: Distribution and diversity. **Photo. Res.**, vol. 41, pp. 35–52.

Pierson, B.K., and Castenholz, R.W., 1995. Taxonomy and physiology of filamentous anoxygenic phototrophs In: R. E. Blankenship, M. T. Madigan, and C. E. Bauer (Eds.) *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, The Netherlands, pp. 31–47.

Pierson, B.K., and Parenteau, M.T., 2000. Phototrophs in high iron microbial mats: microstructure of mats in iron-depositing hot springs. **FEMS Microbiol. Lett.**, vol. 32, pp. 181–196.

Pierson, B.K., 2001. Family I: "*Chloroflexaceae*," filamentous anoxygenic phototrophic bacteria In: D. R. Boone, R. W. Castenholz, and G. M. Garrity (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Springer-Verlag New York, NY vol. 1, pp. 427–444.

Pivovarova, T.A., and Gorlenko, V.M., 1977. Fine structure of *Chloroflexus aurantiacus* var. *mesophilus* (Nom. prof.) grown in light under aerobic and anaerobic conditions. **Microbiology**, vol. 46, pp. 276–282.

Pond, J.L., Langworthy, T.A., Holzer, G., 1986. Long-chain diols: a new class of membrane lipids from a thermophilic bacterium. **Science** vol. 231, pp. 1134–1136.

Pond, J.L., and Langworthy, T.A., 1987. Effect of growth temperature on the long-chain diols and fatty acids of *Thermomicrobium roseum*. **J. Bacteriol.**, vol. 169, pp. 1328–1330.

Pulliam Holoman, T.R., Elberson, M.A., Cutter, L.A., May, H.D., Sowers, K.R., 1998. Characterization of a defined 2,3,5,6-tetrachlorobiphenyl-*ortho*-dechlorinating microbial community by comparative sequence analysis of genes coding for 16S rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 64, pp. 3359–3367.

Reichenbach, H., and Golecki, J.R., 1975. The fine structure of *Herpetosiphon*, and a note on the taxonomy of the genus. **Arch. Microbiol.**, vol. 102, pp. 281-291.

Reysenbach, A. L., Liu, Y., Banta, A. B., Beveridge, T. J., Kirshtein, J. D., Schouten, S., Tivey, M. K., Von Damm, K. L., Voytek, M. A. 2006. A ubiquitous thermoacidophilic archaeon from deep-sea hydrothermal vents. **Nature**, vol. 442, pp. 444-447.

Richardson, R.E., Bhupathiraju, V.K., Song, D.L., Goulet, T.A., Alvarez-Cohen, L., 2002. Phylogenetic characterization of microbial communities that reductively

dechlorinate TCE based upon a combination of molecular techniques. **Environ. Sci. Technol.**, vol.36, pp. 2652–2662.

Rodicio, M.R., and Mendoza, M.R., 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, vol. 22, pp. 238-45.

Sanford, R. A., Cole, J. R., Löffler, F. E., Tiedje, J. M., 1996. Characterization of *Desulfitobacterium chlororespirans* sp. nov., which grows by coupling the oxidation of lactate to the reductive dechlorination of 3-chloro-4-hydroxybenzoate. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 62, pp. 3800–3808.

Schlotelburg, C., von Wintzingerode, F., Hauck, R., Hegemann, W., Gobel, U.B., 2000. Bacteria of an anaerobic 1,2 dichloropropene-dechlorinating mixed culture are phylogenetically related to those of other anaerobic dechlorinating consortia. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol 50, pp. 1505-1511.

Schmidt, K., 1980. A comparative study on the composition of chlorosomes (*chlorobium* vesicles) and cytoplasmic membranes from *Chloroflexus aurantiacus* strain OK-70-fl and *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* strain 6230. **Arch. Microbiol.**, vol. 124, pp. 21–31.

Schmidt, K., Maarzahl, M., Mayer, F. 1980. Development and pigmentation of chlorosomes in *Chloroflexus aurantiacus* strain Ok-70-fl. **Arch. Microbiol.**, vol. 127, pp. 87–97.

Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi, A., Harada, H. 1999. Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in methophilic and thermophilic sludge granules. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 65, pp. 1280-1288.

Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi, A., Harada, H., 2000. *Syntrophothermus lipocalidus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, syntrophic, fatty

acid oxidizing anaerobes which utilizes isobutyrate. **Int. J. Syst. Environ. Microbiol.**, vol. 50, pp. 771-779.

Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi, A., Harada, H., 2001. In situ detection, isolation, and physiological properties of a thin filamentous microorganism abundant in methanogenic granular sludges: a novel isolate affiliated with a clone cluster, the green non-sulfur bacteria, subdivision. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 67, pp. 5740-5749.

Sekiguchi, Y., Yamada, T., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H., Kamagata, Y. 2003. *Anaerolines thermophila* gen. nov., sp. nov. and *Candilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., novel filamentous thermophiles that represent a previously uncultured lineage of the domain *Bacteria* at the subfilo level. **Int. J. Syst. Environ. Microbiol.**, vol. 53, pp. 1843-1851.

Seshadri, R., Adrian, L., Fouts, D. E., Eisen, J. A., Phillippy, A. M., Methe, B. A., Ward, N. L., Nelson, W. C., Deboy, R. T., Khouri, H. M., Kolonay, J. F., Dodson, R. J., Daugherty, S. C., Brinkac, L. M., Sullivan, S. A., Madupu, R., Nelson, K. E., Kang, K. H., Impraim, M., Tran, K., Robinson, J. M., Forberger, H. A., Fraser, C. M., Zinder, S. H., Heidelberg, J. F., 2005. Genome Sequence of the PCE-dechlorinating Bacterium *Dehalococcoides ethenogenes*. **Science**, vol. 307, pp. 105-108.

Sezgin, M., Jenkins, D., Parker, D.S., 1978. A unified theory of filamentous activated sludge bulking. **J. Water Pollut. Control Fed.**, vol, 50, pp. 362–381.

Shiozawa, J.A., Lottspeich, F., Feick, R., 1987. The photochemical reaction center of *Chloroflexus aurantiacus* is composed of two structurally similar polypeptides. **Eur. J. Biochem.**, vol. 167, pp. 595–600.

Shiozawa, J.A., Lottspeich, F., Oesterhelt, D., Feick, R., 1989. The primary structure of the *Chloroflexus aurantiacus* reaction-center polypeptides. **Eur. J. Biochem.**, vol. 180, pp. 75–84.

Shiozawa, J.A., 1995. A foundation for the genetic analysis of green sulfur, green filamentous and heliobacteria In: R. E. Blankenship, M. T. Madigan, and C. E. Bauer (Eds.) *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, The Netherlands, pp. 1159–1173.

Shirling, E. B., and Gottlieb, D., 1966. Methods of characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 16, pp. 313–340.

Sievert, S. M., Brinkhoff, T., Muyzer, G., Ziebis, W., Kuever, J., 1999. Spatial heterogeneity of bacterial populations along an environmental gradient at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos Island (Greece). *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 65, pp. 3834-3842.

Slobodkin, A. I. and Wiegel, J. 1997. Fe (III) as an electron acceptor for H₂ oxidation in thermophilic anaerobic enrichment cultures from geothermal areas. *Extremophiles*, vol. 1, pp. 106-109.

Slobodkin, A. I., Jeanthon, C., L'Haridon, S., Nazina, T., Miroshnichenko, M., Bonch-Osmolovskaya, E. 1999. Dissimilatory reduction of Fe(III) by thermophilic bacteria and archaea in deep subsurface petroleum reservoirs of western siberia. *Curr. Microbiol.*, vol. 39, pp. 99-102.

Slobodkin, A. I., Campbell, B., Cary, S. C., Bonch-Osmolovskaya, E., Jeanthon, C. 2001. Evidence for the presence of thermophilic Fe(III)-reducing microorganisms in deep-sea hydrothermal vents at 13 degrees N (East Pacific Rise). *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 36, pp. 235-243.

Slobodkina, G. B., Panteleeva, A. N., Sokolova, T. G., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Slobodkin, A. I. 2012. *Carboxydocella manganica* sp. nov., a thermophilic, dissimilatory Mn (IV) and Fe (III)-reducing bacterium from a Kamchatka hot spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 62, pp. 890-894.

Sly, L.I., Taghavi, M., Fegan, M., 1998. Phylogenetic heterogeneity within the genus *Herpetosiphon*: transfer of the marine species *Herpetosiphon cohaerens*, *Herpetosiphon*

nigricans and *Herpetosiphon persicus* to the genus *Lewinella* gen. nov. in the *Flexibacter Bacteroides Cytophaga* filo. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, vol. 48, pp. 731–737.

Smits, T.H.M., Devenoges, C., Szynalski, .K., Maillard, J., Holliger, C., 2004. Development of a real-time PCR method for quantification of the three genera *Dehalobacter*, *Dehalococcoides*, and *Desulfitobacterium* in microbial communities. **J Microbiol. Methods**, vol 57 pp. 369– 378.

Snidr, J., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., 1997. Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. **Appl. Environ. Microbiol.** vol. 63, pp. 2884-2896.

Sorokin, D., Lu"cker, S., Vejmelkova, D., Kostrikina, N., Kleerebezem, R., Rijpstra, W I., Damsté', J., Paslier6, D., Muyzer, G., Wagner, M., van Loosdrecht M., Daims, H., 2012. Nitrification expanded: discovery, physiology and genomics of a nitrite-oxidizing bacterium from the filo *Chloroflexi*. **ISME Journal**, vol. 6, pp. 2245–2256.

Speelmans, G., Hillenga, D., Poolman, B., Konings, W.N., 1993. Application of thermostable reaction centers from *Chloroflexus aurantiacus* as a proton motive force generating system. **Biochim. Biophys. Acta**, vol. 1142, pp. 269–276.

Speirs, L, Nittami, T, McIlroy, S, Schroeder, S., and Seviour, R.J., 2009. Filamentous bacterium Eikelboom type 0092 in activated sludge plants in Australia is a member of the filo *Chloroflexi*. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 75, pp. 2446-2452.

Sprague, S.G., Staehelin, L.A., DiBartolomeis, M.J., Fuller, R.C., 1981. Isolation and development of chlorosomes in the green bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. **J. Bacteriol.**, vol. 147, pp. 1021–1031.

Stackebrandt E, and Goebel, B.M., 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, vol. 44, pp. 846-849.

Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N. L., 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, vol. 47, pp. 479–491.

Staehein, L.A., Golecki, J.R., Fuller, R.C., Drews, G., 1978. Visualization of the supramolecular architecture of chlorosomes (*Chlorobium* type Vesicles) in freeze-fractured cells of *Chloroflexus aurantiacus*. **Arch. Microbiol.**, vol. 119, pp. 269–277.

Stolz, J.F., 1983. Fine structure of the stratified microbial community at Laguna Figueroa, Baja California, Mexico. I: Methods of *in situ* study of the laminated sediments. **Precambrian Res.**, vol. 20, pp. 479–492.

Stolz, J.F., 1984. Fine structure of the stratified microbial community at Laguna Figueroa, Baja California, Mexico. II: Transmission electron microscopy as a diagnostic tool in studying microbial community in situ In: Y. Cohen, R. W. Castenholz, and H. O. Halvorson (Eds.) *Microbial Mat: Stromatolites*. Alan R. Liss New York, NY, pp. 23–38.

Stolz, J.F., 1990. Distribution of phototrophic microbes in the flat laminated microbial mat at Laguna Figueroa, Baja, California, Mexico. **Biosystems**, vol. 23, pp. 345–357.

Stott, M. B., Crowe, M. A., Mountain, B. W., Smirnova, A. V., Hou, S., Alam, M. & Dunfield, P. F., 2008. Isolation of novel bacteria, including a candidate division, from geothermal soils in New Zealand. **Environ. Microbiol.**, vol. 10, pp. 2030–2041.

Strauss, G., Eisenreich, W., Bacher, A., G Fuchs,, 1992. ¹³C-NMR study of autotrophic CO₂ fixation pathways in the sulfur-reducing *Archaeobacterium Thermoproteus neutrophilus* and in the phototrophic *Eubacterium Chloroflexus aurantiacus*. **Eur. J. Biochem.**, vol. 205, pp. 853–866.

Strauss, G., and Fuchs, G., 1993. Enzymes of a novel autotrophic CO₂ fixation pathway in the phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*, the 3-hydroxypropionate cycle. **FEBS Eur. J. Biochem.**, vol. 215, pp. 633–643.

Sugiura, M., Takano, M., Kawakami, S., Hanada, S., 2001. Application of a portable spectrophotometer to microbial mat studies: Temperature dependence of the distribution

of *cyanobacteria* and photosynthetic bacteria in hot spring water. **Microb. Environ.**, vol. 16, pp. 255–261.

Sung, Y., Ritalahti, K.M., Sanford, R.A., Urbance, J.W., Flynn, S.J., Tiedje, J.M., Löffler, F.E., 2003. Characterization of two tetrachloroethenereducing, acetate-oxidizing anaerobic bacteria and their description as *Desulfuromonas michiganensis* sp. nov. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 69, pp. 2964–2974.

Sung, Y., Ritalahti, K.M., Apkarian, R.P., Löffler, F.E., 2006. Quantitative PCR confirms purity of strain GT, a novel trichloroethene-to-ethene-respiring *Dehalococcoides* isolate. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 72, pp. 1980-1987.

Swofford, D. L. 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4. Sunderland, MA: Sinauer Associates

Takaichi, S., Tsuji, K., Matsuura, K., Shimada, K., 1995. A monocyclic carotenoid glucoside ester is a major carotenoid in the green filamentous bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. **Plant Cell Physiol.**, vol. 36, pp. 773–778.

Takaichi, S., Maoka, T., Yamada, M., Matsuura, K., Haikawa, Y., Hanada, S., 2001. Absence of carotenes and presence of a tertiary methoxy group in a carotenoid from a thermophilic filamentous photosynthetic bacterium *Roseiflexus castenholzii* **Plant Cell Physiol.**, vol. 42, pp. 1355–1362.

Travers, D., 2003. Aplicación de la herramienta molecular FISH (Fluorescent *in situ* Hibridization) para la caracterización de comunidades microbianas. Trabajo especial 1 Licenciatura de Bioquímica. Tutor: Dr Rodolfo Javier Menes.

Trost, J.T., McManus, J.D., Freeman, J.C., Ramakrishna, B.L., Blankenship, R.E., 1988. Auracyanin, a blue copper protein from the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. **Biochemistry**, vol. 27, pp. 7858–7863.

Trüper, H.G., 1976. Higher taxa of the phototrophic bacteria: *Chloroflexaceae* fam. nov., a family for the gliding, filamentous, phototrophic "green" bacteria. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, vol. 26, pp. 74–75.

- Tvermyr, M., Kristiansen, B.E., Kristensen, T., 1998.** Cloning, sequence analysis and expression in *E. coli* of the DNA polymerase I gene from *Chloroflexus aurantiacus*, a green nonsulfur eubacterium. **Genet. Anal. Tech. Appl.**, vol. 14, pp. 75–83.
- Urbach, E., Vergin, K.L., Young, L., Morse, A., Larson, G.L., Giovannoni, S.J., 2001.** Unusual bacterioplankton community structure in ultraoligotrophic Crater Lake. **Limnol. Oceanogr.**, vol. 46, pp. 557–572.
- Van Dorssen, R.J., and Amesz, J., 1988.** Pigment organization and energy transfer in the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. III: Energy transfer in whole cells. **Photosynth. Res.**, vol. 15, pp. 177–189.
- Vargas, M., Kashefi, K., Blunt-Harris, E., Lovley, D. 1998.** Microbiological evidence for Fe (III) reduction on early Earth. **Nature**, vol. 395, pp. 65-67.
- Vasmel, H., and Amesz, J., 1983.** Photoreduction of menaquinone in the reaction center of the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. **Biochim. Biophys. Acta**, vol. 724, pp. 118–122.
- Vasmel, H., Amesz, J., Hoff, A.J., 1986.** Analysis by exciton theory of the optical properties of the reaction center of *Chloroflexus aurantiacus*. **Biochim. Biophys. Acta**, vol. 852, pp. 159–168.
- Venetskaya, S.L., and Gerasimenko, L.M., 1988.** Electron-microscopic study of microorganisms in a halophilic *cyanobacterial* community. **Microbiology**, vol. 57, pp. 377–383.
- Villemur, R., Saucier, M., Gauthier, A., Beaudet, R., 2002.** Occurrence of several genes encoding putative reductive dehalogenases in *Desulfitobacterium hafniense/frappieri* and *Dehalococcoides ethenogenes*. **Can. J. Microbiol.**, vol 48, pp. 697-706.

von Wintzingerode, F., Selent, B., Hegemann, W., Göbel, U.B., 1999. Phylogenetic analysis of an anaerobic, trichlorobenzene-transforming microbial consortium. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 65, pp. 283–286.

Wagner-Huber, R., Brunisholz, R., Frank, G., Zuber, H., 1988. The Bchl *c/e*-binding polypeptides from chlorosomes of green photosynthetic bacteria. **FEBS Lett.**, vol. 239, pp. 8–12.

Wagner, M., Amann, R., Kämpfer, P., Assmun, B., Hartmann, A., Hutzler, P., Springer, N., Schleifer, K.H., 1994. Identification and *in situ* detection of Gram-negative filamentous bacteria in activated sludge. **Syst. Appl. Microbiol.**, vol. 17, pp. 405–417.

Ward, D.M., Ferris, M.J., Nold, S.C., Bateson, M.M., 1998. Natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. **Microbiol. Molec. Biol. Rev.**, vol. 62, pp. 1353–1370.

Watanabe, Y., Feick, R.G., Shiozawa, J.A., 1995. Cloning and sequencing of the genes encoding the light-harvesting B₈₀₆₋₈₆₆ polypeptides and initial studies on the transcriptional organization of *puf2B*, *puf2A* and *puf2C* in *Chloroflexus aurantiacus*. **Arch. Microbiol.**, vol. 163, pp. 124–130.

Watts, J.E.M., Wu, Q., Schreier, S.B., May, H.D., Sowers, K.R., 2001. Comparative analyses of PCB dechlorinating communities in enrichment cultures using three different molecular screening techniques. **Environ. Microbiol.**, vol. 2, pp. 710–719.

Wechsler, T., Brunisholz, R., Suter, F., Fuller, R.C., Zuber, H., 1985a. The complete amino acid sequence of a bacteriochlorophyll *a* binding polypeptide isolated from the cytoplasmic membrane of the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. **FEBS Lett.**, vol. 191, pp. 34–38.

Wechsler, T., Suter, F., Fuller, R.C., Zuber, H., 1985b. The complete amino acid sequence of the bacteriochlorophyll *c* binding polypeptide from chlorosomes of the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. **FEBS Lett.**, vol. 181, pp. 173–178.

- Wechsler, T.D., Brunisholz, R.A., Frank, G., Suter, F., Zuber, H., 1987.** The complete amino acid sequence of the antenna polypeptide B806-866- from the cytoplasmic membrane of the green bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. **FEBS Lett.**, vol. 210, pp. 189–194.
- Weller, R., Bateson, M.M., Heimbuch, B.K., Kopczynski, E.D., Ward, D.M., 1992.** Uncultivated cyanobacteria, *Chloroflexus*-like inhabitants, and spirochete-like inhabitants of a hot spring microbial mat. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 58, pp. 3964–3969.
- Widdel, F., and Bak, F., 1992.** Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (Eds.) *The Prokaryotes*, 2nd ed. Springer Verlag New York, NY, pp. 3352–3378.
- Wise, M.G., McArthur, J.V., Shimkets, L.J., 1997.** Bacterial diversity of a Carolina bay as determined by 16S rRNA gene analysis: confirmation of novel taxa. **Appl. Environ. Microbiol.** vol. 63, pp. 1505–1514.
- Wittmershaus, B.P., Brune, D.C., Blankenship, R.E., 1988.** Energy transfer in *Chloroflexus aurantiacus*: Effects of temperature and anaerobic conditions In: In: H. Scheer and S. Schneider(Eds.) *Photosynthetic Light-harvesting Systems*. Walter de Gruyter Press Berlin, Germany, pp. 543–554.
- Woese CR, Stackebrandt, E., Macke, T.J., Fox, G.E., 1985.** A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. **Syst. Appl. Microbiol.**, vol. 6, pp. 143-151.
- Woese CR., 1987.** Bacterial evolution. **Microbiol. Rev.**, vol. 51, pp. 221-271.
- Wolin, E. A., Wolin, M. J., Wolfe, R. S., 1963.** Formation of methane by bacterial extracts. **J. Biol. Chem.**, vol. 238, pp.2882–2886.
- Wu, J.H., Liu, W.T., Tseng, L.C., Cheng, S.S., 2001.** Characterization of microbial consortia in a terephthalate-degrading anaerobic granular sludge system. **Microbiology**, vol. 147, pp. 373-382.

Wu, Q., Watts, J.E.M., Sowers, K.R., May, H.D., 2002a. Identification of a bacterium that specifically catalyzes the reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls with doubly linked chlorines. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 68, pp. 807-812.

Wu, Q., Milliken, C.E., Meier, G.P., Watts, J.E.M., Sowers, K.R., May, H.D., 2002b. Dechlorination of Chlorobenzenes by a Culture Containing Bacterium DF-1, a PCB Dechlorinating Microorganism. **Environ. Sci. Technol.**, vol 36, pp. 3290-3294.

Wynn, R.M., Redlinger, T.E., Foster, J.M., Blankenship, R.E., Fuller, R.C., Shaw, R.W., Knaff, D.B., 1987. Electron-transport chains of phototrophically and chemotrophically grown *Chloroflexus aurantiacus*. **Biochim. Biophys. Acta**, vol. 891, pp. 216–226.

Xiong, J., Fischer, W.M., Inoue, K., Nakahara, M., Bauer, C.E., 2000. Molecular evidence for the early evolution of photosynthesis. **Science**, vol. 289, pp. 724–1730.

Yabe, S., Aiba, Y., Sakai, Y., Hazaka, M., Yokota, A., 2010. *Thermosporothrix hazakensis* gen. nov., sp. nov., isolated from compost, description of *Thermosporotrichaceae* fam. nov. within the class *Ktedonobacteria* Cavaletti et al. 2007 and emended description of the class *Ktedonobacteria*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 60, pp. 1794–1801

Yabe, S., Aiba, Y., Sakai, Y., Hazaka, M., Yokota, A., 2011. *Thermogemmatispora onikobensis* gen. nov., sp. nov. and *Thermogemmatispora foliorum* sp. nov., isolated from fallen leaves on geothermal soils, and description of *Thermogemmatisporaceae* fam. nov. and *Thermogemmatisporales* ord. nov. within the class *Ktedonobacteria*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 61, pp. 903-910.

Yamada, T., Sekiguchi, Y., Imachi, H., Kamagata, Y., Ohashi, A., Harada, H., 2005. Diversity, localization, and physiological properties of filamentous microbes belonging to *Chloroflexi* subfilo I in mesophilic and thermophilic methanogenic sludge granules. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 71, pp. 7493–7503.

Yamada, T., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Imachi, H., Ohashi, A., Harada, H., Kamagata, Y., 2006. *Anaerolinea thermolimosa* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen.

nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae* classis nov. and *Caldilineae* classis nov. in the bacterial filo *Chloroflexi*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 56, pp. 1331–1340.

Yamada, T., Imachi, H., Ohashi, A., Harada, H., Hanada, S., Kamagata, Y., Sekiguchi, Y., 2007. *Bellilinea caldifistulae* gen. nov., sp. nov. and *Longilinea arvoryzae* gen. nov., sp. nov., strictly anaerobic, filamentous bacteria of the filo *Chloroflexi* isolated from methanogenic propionate-degrading consortia. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 57, pp. 2299–2306.

Yamada, T. and Sekiguchi, Y. 2009. Cultivation of uncultured *Chloroflexi* subphyla: significance and ecophysiology of formerly uncultured *Chloroflexi* “subphylum I” with natural and biotechnical relevance. **Microbes Environ.** vol. 24, pp. 205-216.

Yamamoto, H., Hiraishi, A., Kato, K., Chiura, H. X., Maki, Y., Shimizu, A., 1998. Phylogenetic evidence for the existence of novel thermophilic bacteria in hot spring sulfur-turf microbial mats in Japan. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 64, pp. 1680–1687.

Yang, Y., and Zeyer, J., 2003. Specific detection of *Dehalococcoides* species by fluorescence in situ hybridization with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 69, pp. 2879-2883.

Yan, J., Rash, B.A., Rainey, F.A., and. Moe, W.M. 2009a. Isolation of novel bacteria within the *Chloroflexi* capable of reductive dechlorination of 1,2,3-trichloropropane. **Environmental Microbiology**, vol. 11, pp. 833–843.

Yan, J., Rash, B. A., Rainey, F. A., Moe, W. M., 2009b. Detection and quantification of *Dehalogenimonas* and “*Dehalococcoides*” populations via PC -based protocols targeting 16S rRNA genes. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 75, pp. 7560–7564.

Yoneda, Y., Yoshida, T., Kawaichi, S., Daifuku, T., Takabe, K., Sako, Y., 2012. *Carboxydotherrmus pertinax* sp. nov., a thermophilic, hydrogenogenic, Fe (III)-reducing,

sulfur-reducing carboxydophilic bacterium from an acidic hot spring. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 62, pp. 1692-1697.

Yu, Z., and Mohn, W.W., 2001. Bacterial diversity and community structure in an aerated lagoon revealed by ribosomal intergenic spacer analyses and 16S ribosomal DNA sequencing. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 67, pp. 1565-1574.

Zannoni, D., and Ingledew, W.J., 1985. A thermodynamic analysis of the plasma membrane electron transport components in photoheterotrophically grown cells of *Chloroflexus aurantiacus*. **FEBS Lett.**, vol. 193, pp. 93–98.

Zannoni, D., 1986. The branched respiratory chain of heterotrophically dark-grown *Chloroflexus aurantiacus*. **FEBS Lett.**, vol. 198, pp. 119–124.

Zannoni, D., 1987. The interplay between photosynthesis and respiration in facultative anoxygenic phototrophic bacteria In: S. Papa, B. Chance, and L. Ernster (Eds.) *Cytochrome Systems* Plenum Press New York, NY, pp. 575–583.

Zannoni, D., 1995. Aerobic and anaerobic electron transport chains in anoxygenic phototrophic bacteria In: R. E. Blankenship, M. T. Madigan, and C. E. Bauer (Eds.) *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, The Netherlands, pp. 949–971.

Zehnder, A. J. B. and Wuhrmann, K., 1976. Titanium (III) citrate as a nontoxic oxidation-reduction buffering system for the culture of obligate anaerobes. **Science**, vol. 194, pp. 1165–1166.

Zhang, H., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Hugenholtz, P., Kim, H., Kamagata, Y., Nakamura, K., 2003. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial filo *Gemmatimonates* phyl. nov. **Int. J. Syst. Environ. Microbiol.**, vol. 53, pp. 1155-1163.

Zehnder, A.J.B., and Wuhrmann, K., 1976. Titanium (III) citrate as a nontoxic oxidation-reduction buffering system for the culture of obligate anaerobes. **Science**, vol. 194, pp. 1165-1166.

Zeikus, J. G. 1977. The biology of methanogenic bacteria. **Bacteriol. Rev.**, vol. 41, pp. 514-541.

Zuckerlandl E, and Pauling, L., 1965. Molecules as documents of evolutionary history. **J. Theor. Biol.**, vol. 8, pp. 357-366.

[ANEXO DE TABLAS Y FIGURAS]

SUB FILO	CLASE	ORDEN	FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE
I	<i>Anaerolineae</i>	<i>Araerolineales</i>	<i>Anaerolineaceae</i>	<i>Anaerolinea</i>	<i>Anaerolinea thermophila</i> (AB046413)
					<i>Anaerolinea thermolimos</i> (AB109437)
				<i>Levilinea</i>	<i>Levilinea saccharolytica</i> (AB109439)
				<i>Leptolinea</i>	<i>Leptolinea tardivitalis</i> (AB109438)
				<i>Bellilinea</i>	<i>Bellilinea caldifistulae</i> (AB243672)
				<i>Longilinea</i>	<i>Longilinea arvovzae</i> (AB243673)
				<i>Thermanaerotherix</i>	<i>Thermanaerotherix daxensis</i> (DSM23592)
	<i>Caldilineae</i>	<i>Caldilineales</i>	<i>Caldilineales</i>	<i>Caldilineaceae</i>	<i>Caldilinea aerophila</i> (AB067647)
					<i>Caldilinea tarbellica</i> (DSM 22659)
				<i>Litorilinea</i>	<i>Litorilinea aerophila</i> (DSM 25763)
II	<i>Dehalococcoidia</i>	<i>Dehalococcoidales</i>	<i>Dehalococcoidaceae</i>	<i>Dehalococcoides</i>	<i>Dehalococcoides mccartyi</i> (KCTC15142)
				<i>Dehalogenimonas</i>	<i>Dehalogenimonas lykanthroporepellens</i> (EU679419)
					<i>Dehalogenimonas alkenigignens</i> (JQ994266)
				" <i>Dehalobium</i> "	" <i>Dehalobium Chlorocoercia</i> " (AF393781)
III	<i>"Chloroflexi"</i>	<i>Chloroflexales</i>	<i>Chloroflexaceae</i>	<i>Chloroflexus</i>	<i>Chloroflexus aurantiacus</i> (M34116)
					<i>Chloroflexus aggregans</i> (AJ308499)
				<i>Chloronema</i>	<i>Chloronema giganteum</i> (AF345825.1)
				<i>Heliothrix</i>	<i>Heliothrix oregonensis</i> (IS/F-1)
				<i>Roseiflexus</i>	<i>Roseiflexus castenholzii</i> (AB041226)
				<i>Oscillochloridaceae</i>	<i>Oscillochloris</i>
		<i>Herpetosiphonales</i>	<i>Herpetosiphonaceae</i>	<i>Herpetosiphon</i>	<i>Herpetosiphon aurantiacus</i> (M34117)
					<i>Herpetosiphon geysericola</i> (DSM7119)
IV	Clones ambientales				Cluster SAR 202
	<i>Thermomicrobia</i>	<i>Thermomicrobiales</i>	<i>Thermomicrobiaceae</i>	<i>Thermomicrobium</i>	<i>Thermomicrobium roseum</i> (M34115)
		<i>Sphaerobacterales</i>	<i>Sphaerobacteraceae</i>	<i>Sphaerobacter</i>	<i>Sphaerobacter thermophilus</i> (X53210)
					<i>Thermobaculum terrenum</i> (AF391972)
				<i>Nitrolancetus</i>	<i>Nitrolancetus hollandicus</i> (JQ345500)
<i>Ktedonobacteria</i>	<i>Ktedonobacterales</i>	<i>Ktedonobacteraceae</i>	<i>Ktedonobacter</i>	<i>Ktedonobacter racemifer</i> (DSM44963)	
		<i>Thermosporotrichaceae</i>	<i>Thermosporotrich</i>	<i>Thermosporotrich hazakensis</i> (JCM 16142)	
	<i>Thermogemmatissporales</i>	<i>Thermogemmatissporaceae</i>	<i>Thermogemmatisspora</i>	<i>Thermogemmatisspora onikobensis</i> (JCM16817)	
				<i>Thermogemmatisspora foliorum</i> (JMC16818)	
	<i>Ardenticatenia</i>	<i>Ardenticatenales</i>	<i>Ardenticatenaceae</i>	<i>Ardenticatena</i>	<i>Ardenticatena maritima</i> (JCM17282)

Tabla 1. Esquema de los diferentes subfilos del filo *Chloroflexi*, según Garrity and Holt, 2001a y b, Hugenholtz and Stackebrandt, 2004, Morris *et al.*, 2004, Yamada *et al.*, 2006, Kawaichi *et al.*, 2013, Yabe *et al.*, 2010, Yabe *et al.*, 2011, Chang *et al.*, 2011, Sorokin *et al.*, 2012, Kale *et al.*, 2013, Gregoire *et al.*, 2011b, Gregoire *et al.*, 2011a. Se indica el número de acceso de las secuencias del gen del ARNr 16S de cada especie descrita.

Primer	Grupo blanco	Posic. en <i>E. coli</i>	Secuencia nucleotídica de 5' a 3'	Referencia
Dehal884r	<i>Dehalococcoides</i> (PCE y PCB)	866-884	CGCTTTAAGTGTCCCGCC	Fagenvold <i>et al.</i> , 2005
DHC 1f	<i>Dehalococcoides</i>	1_17	GATGAACGCTAGCGCCG	Hendrickson <i>et al.</i> 2002
DHC 385f	<i>Dehalococcoides</i>	385-405	GGGTTGTAAACCTCTTTTCAC	Hendrickson <i>et al.</i> 2002
DHC 587f	<i>Dehalococcoides</i>	587-611	GGACTAGAGTACAGCAGGAGAAAAC	Hendrickson <i>et al.</i> 2002
DHC 692r	<i>Dehalococcoides</i>	692-673	TCAGTGACAACCTAGAAAAC	Hendrickson <i>et al.</i> 2002
DHC 774f	<i>Dehalococcoides</i>	774-791	GGGAGTATCGACCCTCTC	Hendrickson <i>et al.</i> 2002
DHC 806r	<i>Dehalococcoides</i>	806-787	GTTAGCTTCGGCACAGAGAG	Hendrickson <i>et al.</i> 2002
DHC 946f	<i>Dehalococcoides</i>	946-963	AGTGAACCGAAAGGGAAA	Hendrickson <i>et al.</i> 2002
DHC 1090r	<i>Dehalococcoides</i>	1090-1072	GGCAGTCTCGCTAGAAAAT	Hendrickson <i>et al.</i> 2002
DHC 1212r	<i>Dehalococcoides</i>	1220-1199	GGATTAGTCCAGTTCACACTG	Hendrickson <i>et al.</i> 2002
DHC 1377r	<i>Dehalococcoides</i>	1385-1366	GGTTGGCACATCGACTTCAA	Hendrickson <i>et al.</i> 2002
1f-GC	<i>Dehalococcoides</i>	GCACGGGGGGGATGAACGCTAGCGGCG	Duhamel <i>et al.</i> , 2004
582f	<i>Dehalococcoides</i>	CTGTTGGACTAGAGTACAGC	Duhamel <i>et al.</i> , 2004
728r	<i>Dehalococcoides</i>	GTGACAACCTAGAAAACCGCCTT	Loffler, <i>et al.</i> , 2000.
Dhc730F	<i>Dehalococcoides</i>	GCGGTTTTCTAGGTTGTC	Loffler, <i>et al.</i> , 2000.
Dhc1350R	<i>Dehalococcoides</i>	CACCTTGCTGATATGCGG	Loffler, <i>et al.</i> , 2000.
DeR	<i>D. ethenogenes</i>	1406-1422	ACTTCGTCCCAATTACC	Cupples <i>et al.</i> , 2003
DeF	<i>D. ethenogenes</i>	49-65	GCAATTAAGATAGTGGC	Cupples <i>et al.</i> , 2003
SAR202-104R	cluster SAR202 subphylum IV	GTTACTCAGCCGTCTGCC	Morris <i>et al.</i> , 2004
SAR202-312R	cluster SAR202 subphylum IV	TGTCTCAGTCCCCCTCTG	Morris <i>et al.</i> , 2004
SAR202BR	SAR202 y307 subphylum IV	122-138	AGGGTGTGTTACTCACGC	Giovannoni <i>et al.</i> ,1996
SAR202AR	cluster SAR202 subphylum IV	222-242	AAGACGCGAGCCGCTCCTCCG	Giovannoni <i>et al.</i> ,1996
GNSB-GC1340r	phylum <i>Chloroflexi</i>	1340-1365	CCCCGCCCGTTGCTAGTAACCGCG	Gich <i>et al.</i> , 2001
GNSB941	phylum <i>Chloroflexi</i>	941-957	AAACCACACGCTCCGCT	Gich <i>et al.</i> , 2001
Ch1348f	phylum <i>Chloroflexi</i>	348-365	GAGGCAGCAGCAAGGAA	Fagenvold <i>et al.</i> , 2005

Tabla 2a. Cebadores (primer) para amplificar el gen del ARNr 16S de organismos del filo *Chloroflexi*.. Recopilado de las

Cepa	Acept. de e ⁻ usados en el aislamiento	Etenos clorados como aceptores de e ⁻	Etenos clorados co-metabolizados	Productos finales mayoritarios	Rango de sustratos*	Genes de RDasa con función asignada
195	PCE	PCE, TCE, <i>cis</i> -DCE, 1,1-DCE	<i>trans</i> -DCE, VC	VC, eteno	1,2-DCA, 1,2-dibromoetano, PCBs, PCDDs, naftalenos clorados, clorobenzenos, clorofenoles	<i>pce A</i> (PCE→TCE), <i>tce A</i> (TCE→VC)
CBDB1	1,2,3-TCB, 1,2,4-TCB	PCE, TCE	ninguno	<i>trans</i> -DCE (cis-DCE)	clorobenzenos, clorofenoles, PCDDs, PCBs	<i>cbr A</i> (1,2,3,4-TeCB→1,2,4-TCB, 1,2,3-TCB→1,3-DCB)
BAV1	<i>cis</i> -DCE, VC	<i>cis</i> -DCE, <i>trans</i> -DCE, 1,1-DCE, VC	PCE, TCE	eteno	1,2-DCA, bromuro de vinilo	<i>bvc A</i> (DCEs, VC→eteno)
VS	1,1-DCE, VC	TCE, <i>cis</i> -DCE, 1,1-DCE, VC	ninguno	eteno	ND	<i>vcr A</i> (DCEs, VC→eteno)
GT	TCE	TCE, <i>cis</i> -DCE, 1,1-DCE, VC	ninguno	eteno	ND	<i>vcr A</i> (DCEs, VC→eteno)
FL2	TCE	TCE, <i>cis</i> -DCE, 1,1-DCE	PCE, VC	VC, eteno	ND	<i>tce A</i> (TCE→VC)

Tabla 5 Utilización de etenos clorados y otros compuestos cloroorgánicos por las cepas de la especie *Dehalococcoides mccartyi* aisladas. Se indican en cada cepa los genes que codifican para las diferentes RDasa con función catalítica asignada. El rango de deshalogenación de los compuestos halogenados por cada cepa en particular, no fué sistemáticamente evaluado. DCA dicloroetano; DCB diclorobenceno; DCE dicloroetano; PCB bifenilo policlorado; PCDD dibenzodioxina policlorada; PCE tetracloroetano; TDB triclorobenceno; TCE tricloroetano; TeCB tetraclorobenceno; VC cloruro de vinilo; ND, no determinado. * Se observó la deshalogenación pero el crecimiento con estos compuestos no fué determinado inequívocamente. Tomado de Loffer *et al.*, 2013.

Subgrupo fisiológico	Géneros <i>Chloroflexus</i>			Formas mesófilas de agua dulce				FAPs s/ clorosomas	
Género	<i>Chloroflexus</i>			Familia <i>Oscillochloridaceae</i>		<i>Cloronema</i>		<i>Heliiothrix</i>	<i>Roseiflexus</i>
Especie	<i>C. aurantiacus</i>	<i>C. aurantiacus</i> var. <i>Mesophilus</i> no disponible	<i>C. aggregans</i>	<i>O. trichoides</i>	<i>O. chrysea</i>	<i>C. giganteum</i>	<i>C. spirodium</i>	<i>H. oregonensis</i>	<i>R. castenholzii</i>
Cepa tipo	J-10-fl	no disponible	MD.66	DG-6	no disponible	no disponible	no disponible	IS/F-1	HL08
Morfología	Filamentos rectos	Filamentos rectos	Filamentos rectos	Filamentos rectos	Filamentos rectos	Filamentos en espiral o rectos	Filamentos en espiral	Filamentos rectos	Filamentos rectos
Diám. cel. (µm)	0,7-1,2	0,5-0,7	1,0-1,5	1,0-1,5	4,5-5,5	2,0-2,5	1,5-2,0	1,5	0,8-1,0
Vaina	± *	+	-	±	-	+	+	-	-
Vesículas de gas	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Tinción de Gram	Negativa	ND	Negativa	Variable	Positiva	ND	ND	ND	Negativa
Temp. op. [rango de temp] (°C)	55	20-25	55	28-30	[10-20]	[4-15]	mesofílica	40-55	50
Metabolismo:									
Fotoheterótrofo	+	+	+	"+" fotolito-heterótrofo	ND	ND	ND	+	+
Fotoautótrofo	± (algunas cepas)	-	-	+	"+" ?	+	ND	ND	-
Respiración oxig.	+	+	+	-	"+" ?	+	+	-	-
Clorosomas	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Bacterioclorofilas	a, c	c **	a, c	a, c	a, c	d (c)**	d (c)**	a	a
Picos en el IR de absorción remarcables <i>in vitro</i> (nm)	740, 808 ,868	755	740, 808 ,868	748, 852	ND	720	ND	795, 865	801, 878
Carotenoides mayoritarios	γ y β-caroteno, éster OH-γ-glucósido-caroteno	ND	γ y β-caroteno, éster OH-γ-glucósido-caroteno	γ y β-caroteno	ND	ND	ND	ceto-OH-γ-caroteno, ceto-myxocoxantina, myxobacteno	metoxi-ceto-myxocoxantina, éster de ceto-myxocoxantina glucósido
Ac. grasos mayoritarios	C _{18:0} , C _{16:0} , C _{18:1}	ND	ND	C _{18:1} , C _{16:0} , C _{16:1}	ND	ND	ND	ND	C _{16:0} , C _{14:0} , C _{15:0}
Quinonas mayoritarias	MK-10	ND	MK-10 (MK-4)	MK-10	ND	ND	ND	ND	MK-11
% G+C del ADN (mol %)	56,9-57,1	ND	56,7-57,0	59,2	ND	ND	ND	ND	62
Referencias	1	2	3	4	5	6	6	7	8

Tabla7 Características diferenciales de los filamentos fotótrofos anoxigénicos (FAPs) descritos. ND no determinado. * ocasionalmente finamente envainadas. ** pueden tener otras bacterioclorofilas. Referencias; (1) Pierson and Castenholz, 1974; (2) Gorlenko, 1995; (3) Hanada *et al.*, 1995; (4) Keppen *et al.*, 1993, 1994, 2000, 2001; Gorlenko and Pivovarova, 1977; (5) Gorlenko and Pivovarova, 1977, Keppen *et al.*, 2001; (6) Dubinina and Gorlenko, 1975, Gorlenko and Pierson, 2001; (7) Pierson *et al.*, 1984, 1985; (8) Hanada *et al.*, 2002, Takaichi *et al.*, 2001. Tomado de Hanada and Pierson, 2006.

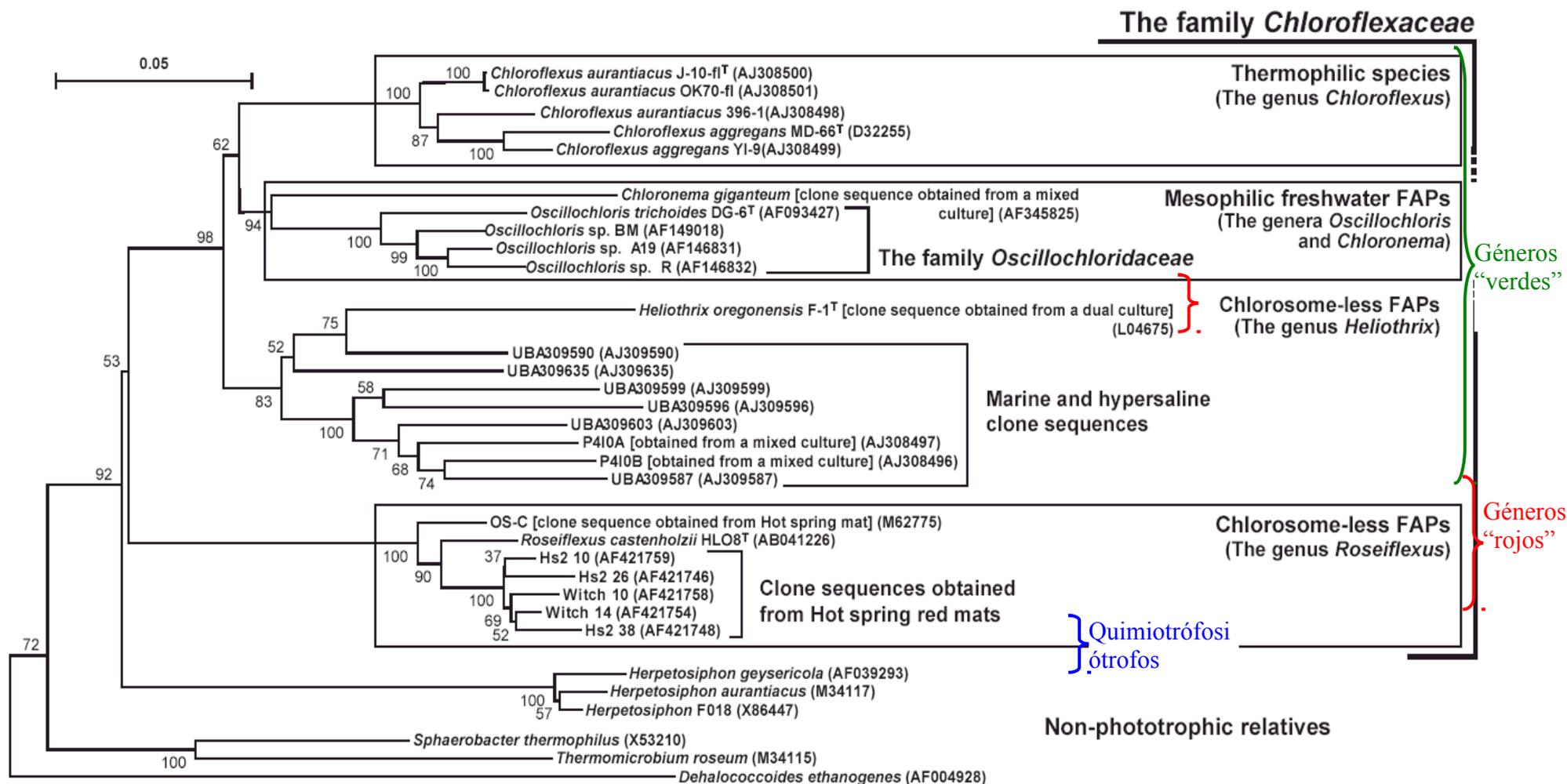


Fig. 18. Árbol filogenético que muestra las relaciones entre los filamentos fotótrofos anoxigénicos (FAPs) y las especies no fototróficas relacionadas, basado en las secuencias de los ARNr 16S. Los valores de Bootstrap correspondientes a 100 repeticiones son indicados en los nodos de ramificación. La barra corresponde a 5 sustituciones de nucleótidos en 100 nucleótidos. Los números de acceso de cada secuencia de referencia están indicados entre paréntesis. Modificado de Hanada and Pierson, 2006.