



UNIVERSIDAD  
DE LA REPUBLICA  
URUGUAY



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**

Tesis de grado para la Licenciatura en Bioquímica

**ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE UNA  
COLECCIÓN DE BACTERIAS ENDOLÍTICAS  
CULTIVABLES DE ORIGEN ANTÁRTICO**

Autor: Bach. Valentina Carrasco Muñoz

Tutor: Elena Fabiano

Co-tutor: Vanesa Amarelle

Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas, Instituto de  
Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Montevideo, Uruguay

Marzo 2016

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Ecosistemas endolíticos .....	1
1.2. Tolerancia a metales .....	2
1.3. El hierro y los sideróforos.....	4
1.4. Oxidación de manganeso .....	6
1.5. Solubilización de fosfato .....	6
1.6. Antecedentes del equipo de trabajo.....	7
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	9
2.1. Hipótesis.....	9
2.2. Objetivo general.....	9
2.3. Objetivo específico.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1. Colección bacteriana .....	10
3.2. Identificación de los aislamientos .....	11
3.3. Caracterización microscópica de los aislamientos.....	11
3.4. Análisis fisiológico de la colección.....	11
3.4.1. Perfil de crecimiento y efecto de la temperatura en el crecimiento .....	11
3.4.2. Tolerancia a metales .....	12
3.4.3. Producción de sideróforos .....	12
3.4.4. Oxidación de Mn .....	13
3.4.5. Solubilización de fosfato de calcio .....	13
4. RESULTADOS .....	14
4.1. Identificación de los aislamientos .....	14
4.2. Microscopía con tinción DAPI .....	18
4.3. Evaluación del crecimiento a distintas temperaturas.....	20
4.4. Tolerancia a metales .....	20
4.4.1. Medio sólido.....	20
4.4.2. Medio líquido .....	21
4.5. Análisis funcional.....	30
4.5.1. Producción de sideróforos .....	30
4.5.2. Oxidación de manganeso .....	30
4.5.3. Solubilización de fosfato de calcio .....	30

5. DISCUSIÓN.....	31
5.1. Identificación de los aislamientos .....	31
5.2. Microscopía con tinción DAPI .....	34
5.3. Evaluación del crecimiento a distintas temperaturas.....	34
5.4. Tolerancia a metales .....	35
5.5. Análisis funcional.....	37
6. CONCLUSIONES .....	39
7. PERSPECTIVAS .....	40
8. BIBLIOGRAFÍA.....	41
ANEXO I: Material de partida .....	50
Tratamiento de las muestras .....	50
Muestra I3 .....	50
Muestra P1 .....	50
Muestra P2 .....	50
Muestra P3 .....	51
Muestra P4 .....	51
Aislamiento de bacterias cultivables y generación de la colección .....	51
ANEXO II: Medios de cultivo.....	53
ANEXO III: PCR.....	56

## ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ATP: Adenosín trifosfato

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

d.e.: Destilada estéril

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato

DO: Densidad óptica

EtOH: Etanol

LBB: Azul de Leucoberbelina

NBRIP: National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium (medio de cultivo)

NCBI: National Center for Biotechnology Information

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

pH: Potencial de Hidrógeno

R2A: Reasoner's 2A (medio de cultivo)

U.F.C.: Unidades Formadoras de Colonias

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Ubicación de las muestras y fecha de colecta.....	10
Tabla 2: Clasificación taxonómica de los aislamientos.....	15
Tabla 3: Caracterización microscópica de los aislamientos. ....	19
Tabla 4: Ensayos en medio sólido de los aislamientos provenientes de las muestras P. ....	22
Tabla 5: Ensayos en medio sólido de los aislamientos provenientes de la muestra I3. ....	23
Tabla 6: Tolerancia a metales en medio sólido y en medio líquido. ....	29

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de los hábitats de las bacterias en sustratos líticos.....	1
Figura 2: Fotografía de un corte de roca.....	2
Figura 3: Mecanismos involucrados en la detoxificación de metales.....	3
Figura 4: Estructuras de sideróforos bacterianos..	5
Figura 5: Esquema de los mecanismos de solubilización, mineralización e inmovilización de P por parte de microorganismos solubilizadores de fosfato en suelos. ....	7
Figura 6: Colecta de muestras.....	10
Figura 7: Abundancia porcentual de los grupos bacterianos detectados.....	17
Figura 8: Abundancia porcentual de los géneros bacterianos detectados.....	17
Figura 9: Ejemplos de las distintas morfologías observadas.....	18
Figura 10: Efecto del Mn en el crecimiento bacteriano.....	24
Figura 11: Efecto del Zn en el crecimiento bacteriano. ....	25
Figura 12: Efecto del Cu en el crecimiento bacteriano. ....	26
Figura 13: Efecto del Cd en el crecimiento bacteriano. ....	27
Figura 14: Efecto del Fe en el crecimiento bacteriano.....	28
Figura 15: Solubilización de fosfato. ....	30

## RESUMEN

Las comunidades endolíticas están constituidas, en parte, por bacterias que son capaces de colonizar las grietas, poros y fisuras de las rocas, las cuales brindan a estos microorganismos protección frente a condiciones ambientales extremas de viento, desecación, alta radiación UV y fluctuaciones en la temperatura, condiciones habituales en lugares como la Antártida. A la vez, los depósitos minerales de las rocas, pueden ser utilizados como fuentes de nutrientes y energía por las bacterias allí presentes.

Basándonos en la hipótesis que las rocas antárticas albergan una comunidad bacteriana diversa con capacidad de participar en los ciclos biogeoquímicos de metales, nos planteamos analizar una colección de 66 bacterias endolíticas cultivables antárticas en cuanto a diversidad y fisiología, haciendo especial hincapié en la evaluación de la respuesta frente a la presencia de metales. Para ello se realizó la identificación de los aislamientos mediante la amplificación y análisis de la secuencia de una región del 16S ADN, se determinaron las distintas morfologías y agrupamientos celulares, se caracterizó la capacidad de los aislamientos de solubilizar fosfato, oxidar manganeso y producir sideróforos, y por último se evaluó la tolerancia a metales tanto en medio sólido como en medio líquido. Los metales ensayados fueron Mn, Cu, Zn, Fe, Ni, Cd y Co, en distintas concentraciones.

Los resultados obtenidos mostraron que la colección estaba compuesta por una importante diversidad de géneros bacterianos, característicos de ambientes endolíticos. El filo Actinobacteria fue el que tuvo mayor número de representantes (50% del total de aislamientos), conteniendo bacterias de 7 géneros distintos. Se detectaron también 5 géneros de Proteobacteria (23% del total, entre Alpha, Beta y Gammaproteobacterias), 4 géneros de Bacteroidetes (17%), 1 género de Firmicutes y 1 género de Deinococcus-Thermus.

La observación microscópica de los aislamientos fue consistente con lo reportado para cada género en cuanto a morfología, con la particularidad de que se evidenció en varios casos la presencia de gránulos de polifosfatos, los cuales se han asociado a varios mecanismos regulatorios celulares y a las respuestas ante condiciones de estrés de un ambiente cambiante: estrés oxidativo, estrés osmótico, variaciones en la temperatura, intensa radiación UV e incluso tolerancia a metales.

Se detectó únicamente una cepa solubilizadora de fosfato, *Pantoea* sp. UYEF8, que también reveló su capacidad de producir sideróforos al igual que *Pedobacter* sp. UYP1. No obstante, la utilización del medio CAS para ensayar esta actividad no fue del todo concluyente debido a que a excepción de los aislamientos ya mencionados, ningún otro fue capaz de crecer, por lo que deberían plantearse ensayos alternativos. No se detectó la oxidación de manganeso por ninguno de los aislamientos, pese a ser capaces de crecer en medio de cultivo suplementado con  $MnCl_2$ .

La respuesta a metales observada mostró distintos perfiles. Se identificaron cepas tolerantes e incluso multitolerantes a metales, destacándose algunos aislamientos en los cuales el crecimiento fue incluso mayor en los medios con el agregado de determinados metales que en el medio sin agregado de metales, en particular en presencia de Mn y Fe. *Pedobacter* sp. UYP1 resultó ser la cepa con características más interesantes, revelando mayores niveles de

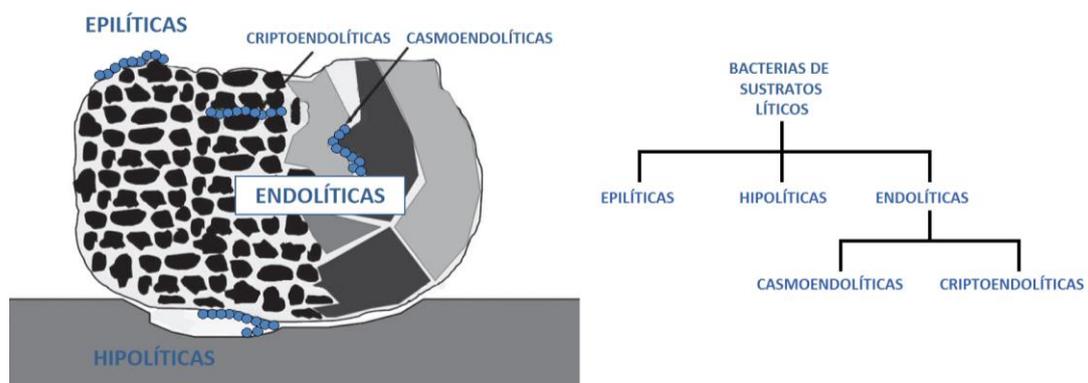
tolerancia a metales, tanto en medio sólido como en medio líquido, y en la mayoría de los metales.

La colección de bacterias endolíticas cultivables analizada en el presente trabajo demostró ser diversa, siendo los géneros identificados característicos de ambientes endolíticos. En cuanto al análisis fisiológico de los aislamientos, este apoya la hipótesis acerca de la relevancia de estos nichos para prospectar bacterias resistentes a metales y conocer su función en los ciclos biogeoquímicos.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Ecosistemas endolíticos

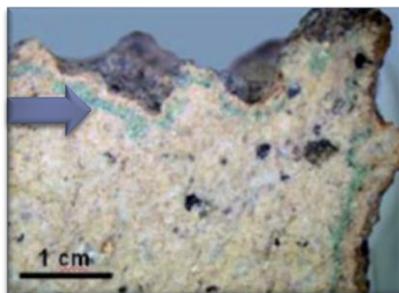
Aunque el agua es esencial para la vida, hasta la más mínima cantidad puede ser suficiente para la supervivencia de algunos organismos vivos. Una estrategia utilizada por algunos organismos para acceder a pequeños depósitos de agua, en ambientes de aridez significativa, es la colonización de las rocas [1], [2]. Ciertos organismos, y entre ellos las bacterias, viven en rocas ya sea colonizando la superficie (región epilítica), la porción de roca en contacto con el suelo (hipolítica) o su interior (endolítica o euendolítica), dentro de poros (criptoendolítica) o en fisuras (casmoendolítica)[3], como se observa en la Figura 1.



**Figura 1. Diagrama de los hábitats de las bacterias en sustratos líticos.** Las bacterias epilíticas se encuentran en la superficie de las rocas mientras que las hipolíticas colonizan la parte inferior del sustrato en contacto con el suelo. Las bacterias endolíticas son aquellas que habitan el interior de las rocas, ya sea en poros (criptoendolíticas) o fisuras (casmoendolíticas) (Modificado de Wierzychos et al. [1])

Se estima que la colonización va a depender de ciertas propiedades de las rocas como lo son la composición, la permeabilidad que presentan así como de su capacidad para retener agua, su estructura y disposición de grietas y poros, del pH, salinidad y de las fuentes de nutrientes que puedan proporcionar (condiciones oligotróficas)[4], [5]. Sin embargo, actualmente no se tienen muchos datos sobre estos parámetros ya que o no se han investigado lo suficiente o son difíciles de determinar. Cuando las porciones epilíticas e hipolíticas no son lo suficientemente seguras para los organismos, prima la colonización endolítica, donde existe un microambiente más favorable para el desarrollo de la vida [6]. Estos nichos representan el principal refugio para la vida en algunos de los principales ambientes extremos del planeta como los desiertos de Negev y Atacama e incluso la Antártida, donde pese a la presencia de agua en forma de hielo y nieve, la mayor parte del año ésta no se encuentra en estado líquido disponible para los seres vivos. El interior de las rocas provee también a los organismos vivos de protección frente a la alta radiación UV, fuertes vientos y las fluctuaciones en la temperatura [1], [2], [6]–[8]. Por otro lado, pese a la intuitiva solidez y resistencia que parecen ofrecer las rocas, la luz es capaz de penetrar en longitudes de onda que permiten la fotosíntesis y por tanto el desarrollo de organismos que la llevan a cabo (Figura 2) [2], [6], [9]–[15]; además ser posible el depósito y ciclaje de nutrientes [5], [8], [16]–[20].

Las comunidades microbianas endolíticas son de los ecosistemas microbianos más simples que se conocen. Poseen una baja complejidad a nivel de especies, estimada en tan sólo cientos por nicho. Sin embargo su diversidad es alta encontrándose alfa, beta y gama Proteobacterias, Actinobacterias, Firmicutes y Bacteroidetes [15][21], lo que las convierte en un nicho muy interesante desde el punto de vista ecológico, por tratarse de ecosistemas modelo simples y ubicuos con una importante fuente de biodiversidad genética [21], [22].



**Figura 2. Fotografía de un corte de roca.** Con la flecha se indica la región del sustrato colonizado por microorganismos fotosintéticos. (Extraída de Wierzychos et al.[1]).

Debido al estrés que sufren estos microorganismos (producto de las condiciones ya mencionadas), presentan ciertas flexibilidades metabólicas, cambios estructurales, fisiológicos y moleculares que deben ser llevados a cabo para permitir la supervivencia [23]–[26]. Muy poco se conoce acerca de los mecanismos que permiten estas flexibilidades metabólicas por lo que constituyen un área de relevancia a desarrollar en la investigación científica [1].

Recientemente, Chan y colaboradores [27] usaron una aproximación de metagenómica para analizar el potencial metabólico de una comunidad endolítica antártica e interesantemente encontraron un gran número de posibles genes implicados en la tolerancia/resistencia a metales pesados. Esto hace que sean comunidades interesantes para disciplinas como la geología y biogeoquímica, ya que el conocimiento de los mecanismos empleados por estos microorganismos ayudaría a comprender los ciclos biogeoquímicos, la biodinámica de las rocas, la meteorización y la biomineralización [5], [8], [16]–[20]. Por otra parte, son de potencial interés biotecnológico para su uso en la biorremediación y biotransformación de metales pesados [28], [29].

## 1.2. Tolerancia a metales

No todos los metales tienen la misma importancia para los seres vivos ya que cada elemento tiene sus propias características fisicoquímicas específicas y son éstas las que van a estar definiendo las diversas interacciones con los seres vivos y por tanto su rol biológico. De acuerdo a su función biológica, su potencial toxicidad y la concentración presente en las células, se pueden definir cuatro grandes grupos de metales [30]. En primer lugar se encuentran aquellos que están en grandes concentraciones en las células vivas y son absolutamente necesarios para la supervivencia de las mismas por estar involucrados en el metabolismo celular básico, ya sea en la producción de energía, mantenimiento de las membranas, de la pared celular, entre otras funciones [31]; estos metales son el sodio (Na), el magnesio (Mg), el potasio (K) y el calcio (Ca). En un segundo nivel están los metales de

transición como el manganeso (Mn), el hierro (Fe), el cobalto (Co), el níquel (Ni), el cobre (Cu) y el cinc (Zn), los cuales se encuentran en concentraciones menores pero aun así están involucrados en variados procesos biológicos esenciales como la producción de energía, reacciones de óxido-reducción, interacciones con proteínas, etc [31]. Los metales relativamente tóxicos para los seres vivos con pocas funciones biológicas como el vanadio (V) y el molibdeno (Mo) ocupan el tercer nivel [32]–[35]. Por último el resto de los metales sin función biológica conocida, suelen ser muy tóxicos para las células y por ello deben ser eliminados de las mismas porque pueden llegar a ser letales [33]–[35].

Muchas enzimas requieren metales como cofactores e incluso la funcionalidad de este tipo de moléculas está limitada por la concentración de los mismos, pudiendo llegar a afectar significativamente el metabolismo y el crecimiento celular [36]–[38]. Un claro ejemplo, y de los más conocidos, es el de la ADN polimerasa que requiere de 2 cationes divalentes como el Mg o el Zn para llevar a cabo la síntesis de ADN [39]. Por otro lado, las bacterias al ser organismos unicelulares e interactuar directamente con el medio externo, deben controlar en todo momento y muy finamente las concentraciones intracelulares de cada metal involucrado en su desarrollo (de metales del primer y segundo nivel principalmente) y a la vez el ingreso de grandes concentraciones de metales que, a pesar de ser necesarios, en concentraciones elevadas pueden acumularse causando toxicidad y afectando la viabilidad celular [29][37]. Para ello las células bacterianas han desarrollado distintos tipos de mecanismos para la detoxificación y transformación de metales, restringiendo el ingreso o mediante detoxificación en el interior de la célula (Figura 3). La tolerancia a los distintos metales va a estar dada tanto por la presencia de cierto tipo de transportadores y proteínas relacionadas al metabolismo de metales (codificadas a nivel genómico y/o plasmídico) como por la eficiencia de estos mecanismos al momento de llevar a cabo su función [28].

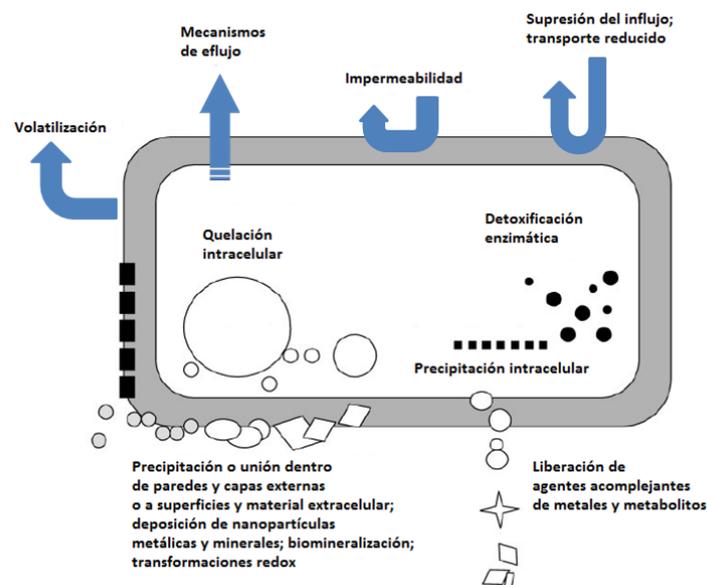


Figura 3: Mecanismos involucrados en la detoxificación de metales. (Modificado de Gadd et al. [28].)

### 1.3. El hierro y los sideróforos

Los micronutrientes o elementos traza son aquellos elementos que los microorganismos requieren en bajas cantidades pero que son tan importantes para el funcionamiento como los macronutrientes. Entre ellos se encuentra el Fe, el cual participa tanto en el metabolismo básico de las células como en procesos biosintéticos y es por tanto esencial para las mismas [36]. El Fe juega un papel muy importante en la respiración, siendo componente clave de los citocromos y de proteínas involucradas en el transporte de electrones; también es cofactor de numerosas enzimas y está involucrado en la síntesis de ADN, en la síntesis de ATP y en la reducción de nitrito en el ciclo del nitrógeno [36][40].

Pese a ser el cuarto elemento más abundante en la naturaleza, el Fe no se encuentra fácilmente disponible en el estado de oxidación deseado. En condiciones anóxicas el Fe se encuentra en su forma soluble como catión ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) mientras, en condiciones de pH neutro o alcalino y presencia de oxígeno el metal es rápidamente oxidado a la forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) que termina formando parte de minerales insolubles (como óxidos o hidróxidos)[40]–[42]. Es por ello que una de las estrategias utilizadas por las células para poder acceder y obtener este elemento es producir ciertas moléculas capaces de unir y transportar al hierro. Los sideróforos son de los compuestos más conocidos con esta capacidad [28]. Se tratan de quelantes de Fe de bajo peso molecular (entre 400 y 1000 kDa) que tienen muy alta afinidad por el metal y cuya síntesis es inducida en condiciones limitantes de Fe [29], [30], [41]–[44] aunque también regulada por factores externos como el pH, la temperatura, las fuentes de carbonos y otros metales presentes [41]. Una vez adquirido el Fe, el complejo es internalizado mediante mecanismos de transporte activo para su posterior asimilación [41].

Variedad de sideróforos son producidos tanto por bacterias como por hongos, e incluso por algunas plantas (fitosideróforos) [41], [42], [45]. A grandes rasgos, los sideróforos pueden clasificarse en tres grandes categorías, según el grupo dador de electrones que va a estar estableciendo el enlace de coordinación con el  $\text{Fe}^{3+}$ . Se tienen entonces a los catecolatos (o fenolatos), los hidroxamatos y los hidroxicarboxilatos; por otro lado están los sideróforos de ligando mixto, es decir, los que en una misma molécula presentan más de un tipo de grupo funcional de unión a Fe [41]. En la Figura 4 se exponen algunas de las estructuras de sideróforos sintetizados por bacterias.

Los sideróforos tienen un rol importante en la virulencia de bacterias patógenas [41], [42]. Estos organismos no sólo utilizan los sideróforos para adquirir el Fe que necesitan para su homeostasis sino que también son capaces de obtener el metal de proteínas del hospedero que lo contengan y de evitar que otros microorganismos competidores lo obtengan, reservándolo intracelularmente. La producción de sideróforos también es importante durante el desarrollo de la infección, más concretamente en la formación de biofilms en el hospedero. No obstante, estas moléculas se han utilizado por sus propiedades en la medicina con fines benéficos para el hospedero con lo que se llama estrategia de “caballo de Troya”. Esta consiste en la utilización de análogos de sideróforos como transportadores de fármacos hacia el interior de células, tras haber sido conjugados a la droga de interés (ej.: antibiótico)[41][46].

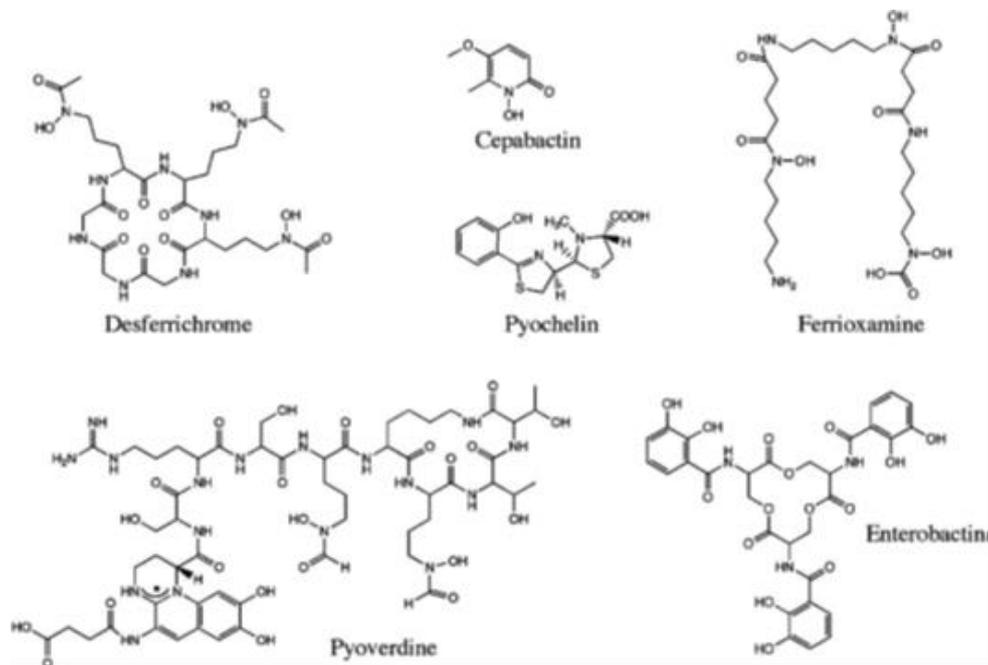


Figura 4: Estructuras de sideróforos bacterianos. (Extraído de Saha et al. 2012) [41].

La relevancia de los sideróforos en la agricultura va de la mano de la fitorremediación y de la promoción del crecimiento vegetal por parte de bacterias de la rizósfera capaces de sintetizarlos. Las bacterias mediante sus sideróforos pueden quelar metales tóxicos del suelo, complejo que es luego incorporado por las plantas dando como resultado una contribución a la descontaminación del ambiente. A la vez, los sideróforos pueden aportar a las plantas metales traza esenciales que de otra forma no podrían obtener. La contribución con el crecimiento vegetal está dada, por un lado, por el hecho de que al quelar metales en las raíces la producción de radicales libres se ve disminuida, conteniendo en cierta medida la degradación de auxinas (fitohormonas que influyen en el crecimiento vegetal). Por otro lado, al igual que ocurre con distintos grupos de microorganismos que habitan un hospedero mamífero, el hecho de que bacterias de la rizósfera productoras de sideróforos sean capaces de competir eficientemente por el Fe con otros organismos patógenos para las plantas, redundando también en su beneficio [41], [47]–[49].

En cuanto a otras aplicaciones para su uso en el laboratorio, los sideróforos pueden ser utilizados como marcadores taxonómicos para la tipificación de cepas bacterianas cercanas ya que los mismos pueden ser cepa específicos. Por otro lado, estudios recientes han demostrado el importante rol de los sideróforos, producidos por bacterias cultivables, en bacterias no cultivables. La adición de estas moléculas al medio de cultivo es capaz de promover el crecimiento de bacterias que en otras condiciones no podrían haberlo hecho [41].

Además del Fe, los sideróforos pueden formar complejos con otros cationes metálicos como  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ . Estudios recientes sugieren que los sideróforos estarían entonces relacionados a la tolerancia a metales y que no sólo las concentraciones de Fe en el medio regularían su síntesis, también la de estos metales. Esta habilidad podría explotarse para su aplicación en la medicina, la industria, en biorremediación, entre otras áreas [30], [41], [44], [50], [51].

## 1.4. Oxidación de manganeso

El Mn es el quinto elemento más abundante de la Tierra, el segundo elemento de transición en cantidad luego del Fe, y es un micronutriente esencial para los organismos vivos, siendo activador de muchas enzimas y encontrándose también en algunas superóxido dismutasas, de importancia crítica en la detoxificación de formas tóxicas del O<sub>2</sub> [36], [37], [52]. Asimismo, es de relevancia en la fotosíntesis de plantas y microorganismos, formando parte del centro de reacción [52].

Los óxidos de Mn<sup>3+</sup> y Mn<sup>4+</sup> son de los minerales más reactivos encontrados en los suelos, sedimentos y aguas. Son capaces de mediar procesos de adsorción, coprecipitación y reacciones redox de numerosos contaminantes y nutrientes, jugando un rol muy importante en la biodisponibilidad y el ciclaje tanto de elementos tóxicos como de aquellos esenciales [53]–[57].

El Mn<sup>2+</sup> soluble es liberado durante la meteorización de rocas que componen este metal, en forma de silicatos y carbonatos, y de fluidos hidrotermales [54][58]. El grupo de organismos oxidadores de manganeso es filogenéticamente diverso, incluyendo bacterias, algas, hongos y algunos otros eucariotas, en una amplia variedad de ambientes. Se caracterizan por su capacidad de catalizar la reacción de oxidación del Mn<sup>2+</sup> soluble a óxidos de Mn insolubles de fórmula general MnO<sub>x</sub> de manera enzimática o no enzimática[28][52][57]. Debido a que la velocidad de la reacción de oxidación mediante catálisis biológica es de hasta cinco órdenes de magnitud mayor que la oxidación espontánea, se cree que la mayor cantidad de óxidos de Mn presentes en el ambiente provienen de procesos biológicos. Esto indica que los microorganismos juegan un papel muy importante en el ciclo biogeoquímico de este elemento[28][52].

Si bien las bacterias oxidadoras de Mn<sup>2+</sup> están ampliamente distribuidas en la naturaleza [56], [57], la función biológica de la biooxidación del Mn<sup>2+</sup> no se conoce. Se especula que los óxidos formados contribuyan a proteger las células de especies reactivas de oxígeno u otros radicales, o que actúe como una cubierta celular protectora de la radiación UV, de la predación por otros microorganismos o de la infección por fagos [55], [56], [59], [60]. Otra posibilidad es que ayude a proveer a la célula de otros metales que están adsorbidos en su estructura[54][56].

## 1.5. Solubilización de fosfato

Los microorganismos participan en la solubilización del fosfato inorgánico, en la mineralización del fosfato orgánico, así como en su inmovilización siendo componentes integrales del ciclo del fósforo [47], [61], [62].

El P es uno de los elementos considerado como macronutriente para los organismos vivos. Se encuentra en el ambiente en forma de fosfatos orgánicos e inorgánicos, y es utilizado por las células para sintetizar ácidos nucleicos, adenosín trifosfato (ATP), fosfolípidos de membrana, coenzimas, entre otros [36].

Los fosfatos orgánicos son abundantes en la naturaleza y pueden ser utilizados tras la acción de enzimas celulares fosfatasas que hidrolizan los ésteres de fosfato orgánico liberando fosfato inorgánico libre, durante la descomposición de material orgánico. Por otro lado, el fosfato proveniente de fuentes de fosfato inorgánico se encuentra mayormente en forma de

complejos minerales insolubles (fosfatos de calcio, aluminio y hierro), que pueden quedar biodisponibles tras su solubilización, mediante la producción de ácidos orgánicos o inorgánicos, por parte de ciertos microorganismos [28], [63], [64].

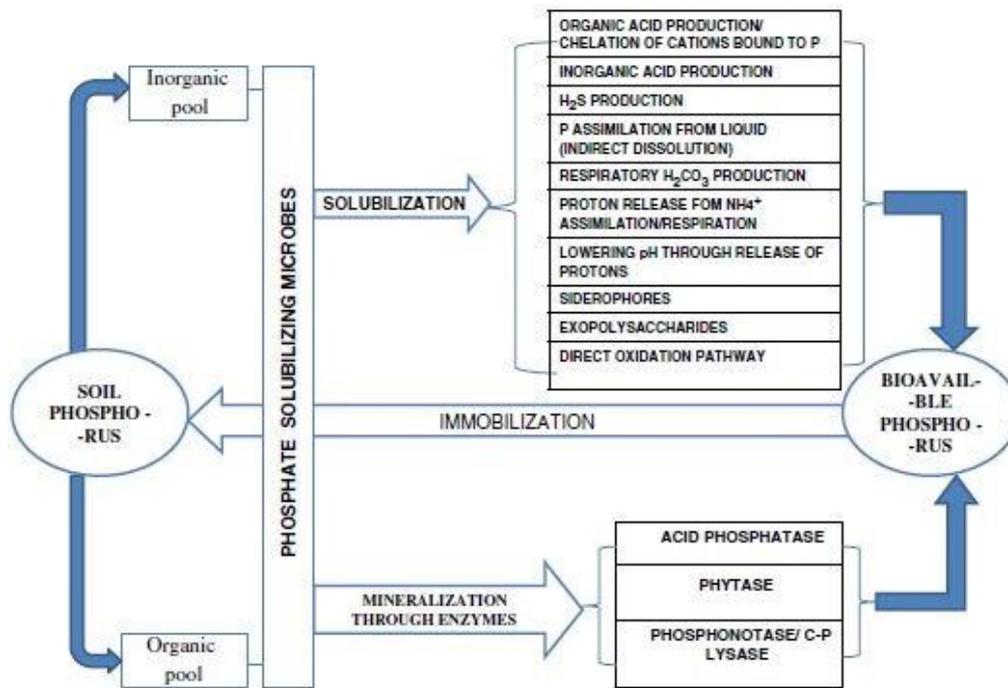


Figura 5: Esquema de los mecanismos de solubilización, mineralización e inmovilización de P por parte de microorganismos solubilizadores de fosfato en suelos. (Extraído de Sharma et al. [63])

Existen variedad de géneros bacterianos y de hongos capaces de llevar a cabo esta actividad la cual es muy buscada por su importancia en la rizósfera. El fósforo es un nutriente limitante para el crecimiento de las plantas. Participa en procesos metabólicos tales como la fotosíntesis, la transferencia de energía, la transducción de señales, la biosíntesis de macromoléculas y la respiración. Pese a que grandes porciones de fosfatos inorgánicos son aplicados en los suelos como fertilizante, éste es rápidamente inmovilizado ya sea por su adsorción a minerales del suelo como por precipitación con constituyentes del mismo (dependiente de pH), formando complejos que no pueden ser absorbidos por las raíces de las plantas. La inoculación de microorganismos solubilizadores de fosfatos en suelos o semillas ha probado aumentar la disponibilidad del fósforo para las plantas mediante la liberación de formas insolubles y fijadas del fósforo, lo que trae como consecuencia un mayor rendimiento en cuanto a los cultivos [63], [65]–[67].

### 1.6. Antecedentes del equipo de trabajo

En los últimos cinco años, nuestro equipo ha estado trabajando en el estudio de bacterias presentes en distintos ecosistemas antárticos. Empleando estrategias de estudio complementarias que incluyen ensayos de microbiología clásica para bacterias cultivables, aproximaciones genómicas y metagenómicas, se han identificado distintas actividades enzimáticas de potencial interés biotecnológico.

Otra línea de investigación del grupo es el estudio de los sistemas y mecanismos que emplean las bacterias para mantener la homeostasis del Fe y del Mn. Se han utilizado como modelos de estudio *Sinorhizobium meliloti* 1021 (diazótrofo simbiote de alfalfa) y *Herbaspirillum seropedicae* Z67 (diazótrofo endófito de gramíneas) con el fin de determinar los sistemas que estas bacterias utilizan para captar estos metales, cuáles son los reguladores que participan en su metabolismo y cuáles mecanismos están implicados.

De cierta forma, integrando el conocimiento generado por la experiencia en ambas líneas, nace la idea de estudiar comunidades bacterianas antárticas en cuanto a su relación con los metales. Se planteó entonces partir de muestras de roca ya que los microorganismos que allí habitan se encuentran en contacto íntimo con el sustrato lítico pudiendo participar en procesos de bioadsorción, biooxidación y bioacumulación de metales, lo que podría dar nuevas visiones acerca del rol de las bacterias en los ciclos biogeoquímicos de los metales.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. Hipótesis**

Las rocas antárticas albergan una comunidad bacteriana diversa y particular, con capacidad de participar en los ciclos biogeoquímicos de metales y de crecer a bajas temperaturas.

### **2.2. Objetivo general**

Contribuir al conocimiento de las comunidades bacterianas endolíticas antárticas especialmente en lo concerniente a su potencial participación en la biotransformación de metales.

### **2.3. Objetivo específico**

-Identificar a nivel de género una colección de bacterias cultivables aisladas de rocas colectadas en la Península Fildes de la Isla Rey Jorge, Antártida.

-Caracterizar la morfología y fisiología de los aislamientos.

- Determinar la respuesta bacteriana a la presencia de diferentes metales.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Colección bacteriana

Se empleó como material de partida una colección de bacterias cultivables obtenidas de rocas recolectadas en los alrededores de la Base Científica Antártica General Artigas (BCAA) ubicada en la Península Fildes, Isla Rey Jorge, durante las expediciones antárticas de enero y mayo de 2014 (Figura 6). La ubicación de las distintas rocas se muestra en la Tabla 1 y los distintos tratamientos de lavado, desinfección de su superficie y disgregación de las rocas se detallan en el anexo I.

**Tabla 1: Ubicación de las muestras y fecha de colecta.**

Muestra	Ubicación	Fecha de colecta
P1	62° 10' 53.4" S, 58° 54' 32.1" W	16-May-2014
P2	62° 10' 51.8" S, 58° 54' 34.0" W	16-May-2014
P3	62° 11' 09.5" S, 58° 54' 31.0" W	16-May-2014
P4	62° 10' 53.4" S, 58° 54' 32.1" W	16-May-2014
I3	62° 10' 53.6" S, 58° 54' 32.6" W	22-Jan-2014

Para la generación de la colección bacteriana, las suspensiones obtenidas a partir de las rocas tratadas fueron inoculadas en medio de cultivo Reasoner's 2A (R2A) o medio marino (MM) y se incubaron hasta la aparición de colonias. En el anexo I se detalla el procedimiento realizado, las temperaturas de incubación, los aislamientos obtenidos para cada muestra y los criterios de selección utilizados para la generación de una colección de 66 aislamientos que fue el material de partida para este trabajo. Los aislamientos de la colección se almacenaron en glicerol 25% (v/v) a -80 °C. Para trabajar, se tomó una ansada de la suspensión almacenada a -80 °C y se estrió en medio sólido para verificar que se estaba trabajando con cultivos puros. Los aislamientos recuperados de cultivos frescos, se ordenaron según un padrón determinado de 48 cepas por placa de Petri conteniendo medios sólidos de R2A o MM, de manera de construir un molde que permitiese trabajar a posteriori con un *replica plater*.



**Figura 6: Colecta de muestras.** Ubicación del sitio de origen de las muestras I3 (a) y P1 (b), durante las colectas realizadas en las expediciones de enero y mayo de 2014, respectivamente.

### **3.2. Identificación de los aislamientos**

Para la identificación a nivel de género de los distintos aislamientos de la colección, se amplificó por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) una región conservada del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S, utilizando los primers universales 27F y 1492R [68]. A partir de colonias aisladas, presentes en los cultivos puros, se realizó la técnica de PCR de colonia. Para ello, mediante la utilización de palillos estériles, se picaron las colonias a ensayar y lo que quedó adherido fue depositado en un tubo de PCR conteniendo la mezcla de reacción. El molde de ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico proviene en este caso, de la lisis por calor de las células sin pasos posteriores de purificación. Como control negativo se utilizó un tubo de PCR puesto en contacto con un palillo estéril sin células. La mezcla de reacción y el ciclo utilizado se detallan en el Anexo III.

Para comprobar la presencia de amplicones del tamaño esperado se realizó una electroforesis en gel de agarosa 0,8% (p/v) en buffer TAE 1X (Tris-acético 0,04 M, EDTA 0,001 M, pH 8,0). Para la visualización de los fragmentos de ADN se utilizó SYBR® Safe (Invitrogen) diluido 10 veces y la posterior exposición del gel a luz ultravioleta. El marcador de peso molecular empleado como referencia fue el GeneRuler® 1kb (ThermoScientific).

Los amplicones se secuenciaron en Macrogen (Corea) y, posteriormente, las secuencias obtenidas fueron ensambladas y depuradas mediante la utilización de los softwares DNABaser y FinchTV respectivamente. Para determinar los géneros de los aislamientos de la colección se empleó el seqmatch, disponible en el sitio web del Ribosomal Database Project. La identidad de las cepas, así como sus secuencias e información adicional sobre el origen de las muestras, fue luego incorporada a la base de datos de GenBank del NCBI.

### **3.3. Caracterización microscópica de los aislamientos**

Para determinar la morfología y tamaño celular de los aislamientos se realizó la observación microscópica de los mismos. Para permitir la visualización se sometieron las muestras a tinción con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). El DAPI se une preferencialmente al ADN doble cadena, asociándose en el surco menor a regiones enriquecidas en adenina y timina. Al exponerse a luz ultravioleta emite una fluorescencia color azul característica. Se utiliza como contraste a nivel nuclear, aunque en bacterias también es empleado para evidenciar la morfología celular.

Se realizaron frotis de cada uno de los aislamientos provenientes de cultivo puro en medio sólido. Tras la fijación por calor, se agregaron aproximadamente 20 µL de DAPI 1,4 µg/mL, de manera de cubrir por completo cada preparado y se dejó reaccionar en oscuridad 30 minutos. Se cubrieron luego con cubreobjetos y se colocó aceite de inmersión para visualizar las bacterias con un objetivo de 100X empleando un microscopio óptico invertido.

### **3.4. Análisis fisiológico de la colección**

#### **3.4.1. Perfil de crecimiento y efecto de la temperatura en el crecimiento**

Para el ensayo en medio líquido se inocularon 5mL de medio R2A con una ansada de cada aislamiento, proveniente del cultivo puro en medio sólido correspondiente. Se incubaron los cultivos a 4 °C y 200 rpm y se registraron los valores de densidad óptica (DO) a una longitud de

onda de 620 nm ( $DO_{620nm}$ ) a distintos tiempos, a fin de evaluar el perfil de crecimiento bacteriano.

En cuanto al ensayo en medio sólido, se utilizó un *replica plater* (Sigma®) para sembrar los aislamientos en medio R2A sólido los cuales fueron luego incubados a temperaturas de 4 °C, 10 °C, 25 °C y 30 °C. Tras un período de incubación de unos 25 días, se registraron los resultados de crecimiento o no crecimiento como presencia o ausencia de colonia, respectivamente.

### 3.4.2. Tolerancia a metales

Se analizó la capacidad de los aislamientos de crecer en medio líquido y en medio sólido adicionado con diferentes concentraciones de metales según recomendaciones descriptas por Chen et al. [69]. Las composiciones de los medios se detallan en el Anexo II.

Se evaluó tolerancia y susceptibilidad a metales en medio sólido evidenciada como crecimiento o ausencia de crecimiento respectivamente. Para ello se agregaron los metales esterilizados por filtración al medio R2A sólido en las siguientes concentraciones:  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  500  $\mu M$ , 1 mM y 5 mM,  $ZnSO_4$  500  $\mu M$ , 1 mM y 5 mM,  $NiCl_2$  500  $\mu M$  y 1 mM,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  200  $\mu M$ , 500  $\mu M$  y 1 mM),  $CuSO_4$  500  $\mu M$  y 1 mM,  $(CH_3COO)_2Cd$  10  $\mu M$  y 100  $\mu M$  y  $FeCl_3$  500  $\mu M$ , 1 mM y 5 mM. Los cultivos en medio sólido se incubaron a 4 °C durante 25 días y en el caso de la cepa I3 también se incubó a 25 °C.

Se eligieron 22 aislamientos para evaluar su crecimiento en medio líquido en presencia de metales. Para este ensayo, primero se normalizaron las DO de los cultivos primarios a un mismo valor y se colocaron alícuotas en placas autoclavadas de 96 pocillos de 2 mL de volumen con un volumen final de medio de 1 mL. Las concentraciones de metales ensayadas fueron:  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  1 mM, 5 mM y 10 mM,  $ZnSO_4$  1 mM, 5 mM y 10 mM,  $CuSO_4$  500  $\mu M$ , 1 mM y 10 mM,  $(CH_3COO)_2Cd$  10  $\mu M$  y 100  $\mu M$ ,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  500  $\mu M$ , 1 mM y 5 mM y  $FeCl_3$  1 mM, 5 mM y 10 mM. Como controles de crecimiento se empleó el medio R2A inoculado sin el agregado de metales, como control de que no sucediera contaminación cruzada se completaron pocillos con medio R2A sin inocular y como control de la posible precipitación de metales en altas concentraciones, se completaron pocillos de medio sin inocular y con el agregado de la mayor concentración empleada para cada metal. El volumen final en todos los casos fue de 1 mL. Las placas se incubaron con agitación a una temperatura de 4 °C. Se determinó el crecimiento por medidas de DO a 620 nm a partir de alícuotas de 100  $\mu L$  de cada cultivo, colocados en placas de 96 pocillos apropiadas para su lectura en Varioskan.

### 3.4.3. Producción de sideróforos

Se evaluó la producción de sideróforos mediante el ensayo de cromo azurol-S (CAS)[70]. Este ensayo está basado en que el colorante es azul en presencia de hierro, mientras que cuando no está complejado con el hierro pasa a ser de color naranja. Por lo tanto la presencia de sideróforos sintetizados por parte de los microorganismos se visualiza como formación de un halo naranja alrededor de la colonia bacteriana sobre el fondo azul del medio. La composición del medio se detalla en el Anexo III (Tabla 5, Anexo II). Los cultivos se crecieron a 4 °C durante 25 días.

#### **3.4.4. Oxidación de Mn**

Se evaluó la oxidación de Mn mediante el uso del colorante azul de Leucoberbelina (LBB) [0,04% (m/V) en ácido acético 45 mM] depositado sobre colonias crecidas durante 25 días a 4 °C en medio sólido adicionado con distintas concentraciones de  $MnCl_2$ . Aquellas colonias que en presencia de Mn y LBB viran a un color azul, se consideraron positivas [71].

#### **3.4.5. Solubilización de fosfato de calcio**

Para identificar bacterias solubilizadoras de fosfato, se utilizó un medio sólido con fosfato de calcio insoluble, el medio National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium (NBRIP)[72]. La capacidad de solubilizar fosfato se evidencia por la presencia de un halo translucido alrededor de la colonia. (Tabla 6, Anexo II). Las condiciones de incubación fueron 4 °C durante 25 días.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Identificación de los aislamientos

A partir de la amplificación, secuenciación y análisis de una región que comprende la casi totalidad del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S (ADNr 16S), se identificaron los géneros de 62 bacterias endolíticas cultivables de origen antártico pertenecientes a la colección del laboratorio. Treinta y cuatro aislamientos identificados procedían de la muestra I3, 18 de la muestra P1, 7 de la muestra P2, 2 de la muestra P3 y 1 de la muestra P4. No fue posible la identificación de 4 de los 66 aislamientos previamente seleccionados por fallos durante la secuenciación. En el caso de los aislamientos UYP17 (proveniente de la muestra P1) y UYP33 (proveniente de la muestra P4), las secuencias obtenidas fueron de baja calidad o demasiado cortas para realizar el BLAST, mientras que no se obtuvo el amplicón correspondiente para los aislamientos UYP19 y UYP21 (ambos proveniente de la muestra P1). Las secuencias resultantes se incorporaron a la base de datos del NCBI donde se encuentran disponibles públicamente. Como se muestra en la Tabla 2, al menos 37 cepas bacterianas correspondientes a los relativos más cercanos provenían de organismos también aislados de ecosistemas fríos e incluso de la propia Antártida.

Como se aprecia en la Figura 7a, se observa un claro predominio del grupo Actinobacteria, el que representa la mitad de la colección (50% de los 62 aislamientos analizados), así como una presencia importante de Bacteroidetes (17%) y Proteobacteria (23%). Dentro de este grupo se encontraron tanto Alpha (11%), Beta (6%) como Gammaproteobacteria (6%). Por otro lado, en menor proporción se encontraron aislamientos pertenecientes a los filos de Deinococcus-Thermus (1%) y Firmicutes (3%). La diversidad bacteriana porcentual de los géneros presentes en la colección se muestra en la Figura 8.a.

Dentro del filo Actinobacteria se identificaron 23 aislamientos pertenecientes al género *Arthrobacter*, 4 al género *Rhodococcus*, 2 *Micrococcus*, 1 *Streptomyces*, 1 *Agrococcus*, 1 *Nakamurella* y 1 *Marisediminicola*. En cuanto a Bacteroidetes, se distinguieron 6 *Pedobacter*, 2 *Chryseobacterium*, 2 *Mucilaginibacter* y 1 *Spirosoma*. Las Alphaproteobacteria encontradas fueron 7 *Sphingomonas*. Los 3 aislamientos de *Massilia* y 1 de *Noviherbaspirillum* fueron los representantes de Betaproteobacteria, mientras que de las 4 Gammaproteobacterias aisladas, 3 fueron *Pseudomonas*, y la restante una *Pantoea*. Por último, los Firmicutes presentes fueron 2 *Bacillus*, y el representante del filo Deinococcus-Thermus fue un único *Deinococcus*.

En las Figuras 7.b y 7.c se resumen las abundancias porcentuales de los grupos bacterianos a los cuales pertenecen los aislamientos identificados provenientes de las muestras I3 y P1, respectivamente. Mientras, en las Figuras 8.b y 8.c, se resumen los géneros a los cuales pertenecen estos mismos aislamientos. En la muestra I3 se identificaron 20 Actinobacteria (14 *Arthrobacter*, 1 *Marisediminicola*, 2 *Micrococcus*, 1 *Nakamurella*, 1 *Rhodococcus* y 1 *Streptomyces*), 6 Alphaproteobacteria (6 *Sphingomonas*), 3 Bacteroidetes (1 *Mucilaginibacter*, 1 *Pedobacter* y 1 *Spirosoma*), 1 Deinococcus-Thermus (1 *Deinococcus*) y 4 Gammaproteobacteria (3 *Pseudomonas* y 1 *Pantoea*). La muestra P1 consistió de 13 Actinobacteria (9 *Arthrobacter*, 3 *Rhodococcus* y 1 *Agrococcus*), 3 Bacteroidetes (2 *Chryseobacterium* y 1 *Pedobacter*), 1 Betaproteobacteria (1 *Massilia*), 1 Firmicutes (1 *Bacillus*) y 3 bacterias no identificadas.

**Tabla 2: Clasificación taxonómica de los aislamientos.** Se muestran los resultados del BLAST realizado en la página web del RDP (Ribosomal Database Project) para cada aislamiento de la colección, obtenido de su respectiva muestra de origen.

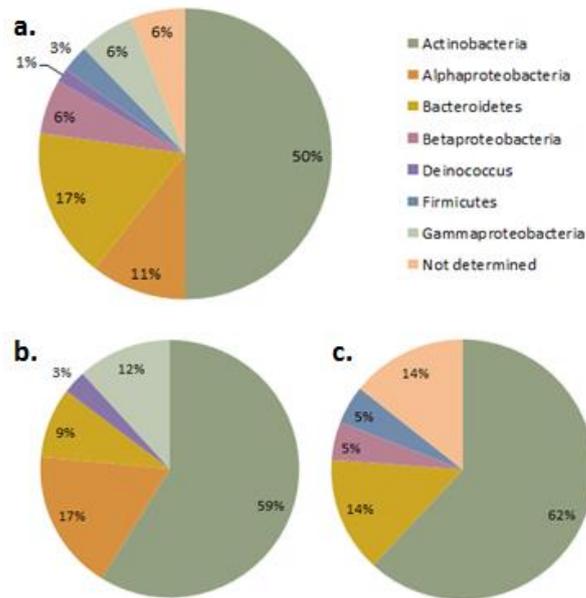
Muestra	Cepa	NCBI Accession number	Grupo	Género	Similarity score	S_ab score	Relativo más cercano	Referencia*
P1-1	UVP1	KU060818	Bacteroidetes	<i>Pedobacter</i>	0.999	0.972	<i>Sphingobacteriaceae bacterium</i> GuR29 (AB545763)	Gulkana Glacier, Alaska [106]
	UVP2	KU060819	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	0.997	0.983	<i>Arthrobacter citreus</i> ; Asd MVL1 (FM955881)	Sediment from a melt water stream of Midtre Lovénbreen glacier, Arctic [105]
	UVP3	KU060820	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	0.999	0.982	<i>Arthrobacter citreus</i> ; Asd MVL1 (FM955881)	Sediment from a melt water stream of Midtre Lovénbreen glacier, Arctic [105]
	UVP4	KU060821	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	1.000	0.993	<i>Arthrobacter</i> sp. FXJ8.091 (JF346423)	Indian Ocean n/p <sup>a</sup>
	UVP5	KU060822	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	1.000	1.000	<i>Rhodococcus fascians</i> 7Y (AJ576249)	Antarctic soil sample n/p
	UVP6	KU060823	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	0.997	0.987	<i>Arthrobacter citreus</i> ; Asd MVL1 (FM955881)	Sediment from a melt water stream of Midtre Lovénbreen glacier, Arctic [105]
	UVP7	KU060824	Bacteroidetes	<i>Chryseobacterium</i>	0.992	0.922	uncultured bacterium ncd294e01c1 (HM272362)	Skin microbiome in atopic dermatitis [103]
	UVP8	KU060825	Bacteroidetes	<i>Chryseobacterium</i>	0.994	0.923	uncultured bacterium ncd294e01c1 (HM272362)	Skin microbiome in atopic dermatitis [103]
	UVP9	KU060826	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	1.000	0.998	<i>Rhodococcus</i> sp. 111H2c. (KJ744027)	Antarctic soil sample n/p
	UVP10	KU060827	Actinobacteria	<i>Agrococcus</i>	0.999	0.989	<i>Agrococcus</i> sp. MDT2-5 (JX949725)	Glaciers in P. R. China n/p
	UVP11	KU060828	Betaproteobacteria	<i>Massilia</i>	0.996	0.972	<i>Massilia aurea</i> HME9229 (KF911334)	Lagoon n/p
	UVP12	KU060829	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	0.999	0.988	<i>Arthrobacter citreus</i> ; Asd MVL1 (FM955881)	Sediment from a melt water stream of Midtre Lovénbreen glacier, Arctic [105]
	UVP13	KU060830	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	0.994	0.963	<i>Arthrobacter</i> sp. JG37-Iso2 (AM292605)	Uranium mining waste piles, Germany n/p
	UVP14	KU060831	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	1.000	0.995	<i>Rhodococcus fascians</i> 7Y (AJ576249)	Antarctic soil sample n/p
	UVP15	KU060832	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	0.997	0.977	<i>Arthrobacter citreus</i> ; Asd MVL1 (FM955881)	Sediment from a melt water stream of Midtre Lovénbreen glacier, Arctic [105]
	UVP16	KU060833	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	0.999	0.986	<i>Arthrobacter citreus</i> ; Asd MVL1 (FM955881)	Sediment from a melt water stream of Midtre Lovénbreen glacier, Arctic [105]
P1-2	UVP17	-	-	-	-	-	-	-
	UVP18	KU060834	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	0.996	0.962	<i>Bacillus</i> sp. BAB2964 (KF889306)	Muck sample, India n/p
	UVP19	-	-	-	-	-	-	-
	UVP20	KU060835	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	1.000	1.000	<i>Arthrobacter</i> sp. 22 (GU213364)	Deglaciated granite sand, Damma glacier (Central Alps) n/p
P1-3	UVP21	-	-	-	-	-	-	
P2-3	UVP22	KU060836	Betaproteobacteria	<i>Noviherbaspirillum</i>	1.000	1.000	Uncultured beta proteobacterium CCY80 (AY62237)	Subsurface soil sample [104]
	UVP23	KU060837	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	1.000	1.000	<i>Sphingomonas</i> sp. KOPRI 25891. (HQ825039)	Alpine glacier cryoconite, Austria [102]
	UVP24	KU060838	Bacteroidetes	<i>Pedobacter</i>	0.997	0.956	<i>Pedobacter</i> sp. A16.2 (UN662526)	Soil of the Tianshan Glacier No. 1, central Asia n/p
	UVP25	KU060839	Bacteroidetes	<i>Pedobacter</i>	0.995	1.000	<i>Pedobacter</i> sp. JC2492 JC2492 IMSNU 14146 (EU642850)	- n/p
	UVP26	KU060840	Bacteroidetes	<i>Pedobacter</i>	1.000	1.000	<i>Pedobacter</i> sp. JC2492 JC2492 IMSNU 14146 (EU642850)	- n/p
	UVP27	KU060841	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	0.993	0.969	<i>Mucilaginibacter</i> sp. KOPRI 25884 (HQ825034)	Alpine glacier cryoconite, Austria [10]
	P3-1	UVP30	KU060842	Bacteroidetes	<i>Pedobacter</i>	0.983	0.905	<i>Pedobacter</i> sp. JC2491 (EU652337)
UVP31		KU060843	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	0.999	0.994	<i>Bacillus</i> sp. SS9.15 (KC160674)	Coastal sediments of King George Island, Antarctica [101]
P4-1	UVP32	KU060844	Betaproteobacteria	<i>Massilia</i>	1.000	0.982	<i>Massilia</i> sp. UFLA04-296 (JQ771203)	Bacteria isolated from siratro n/p
	UVP33	-	-	-	-	-	-	-
P2-3	UVP34	KU060845	Betaproteobacteria	<i>Massilia</i>	0.995	0.982	<i>Massilia brevitalea</i> (T) byr23-80. (EF546777)	Soil lysimeter [100]

Nota: <sup>a</sup> Corresponde a la referencia del relativo más cercano de cada aislamiento; <sup>b</sup> n/p: No publicado

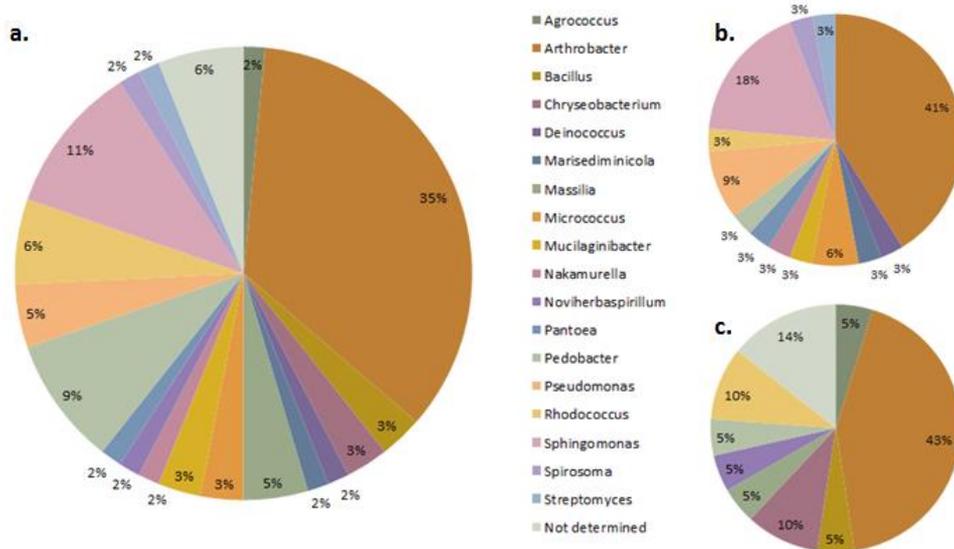
Tabla 2: Continuación.

Muestra	Cepa	NCBI Accesion number	Grupo	Género	Similarity score	S_ab score	Relativo más cercano	Heterencia <sup>a</sup>	
I3	UYEF1	KU060846	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	0.977	0.874	<i>Arthrobacter scleromae</i> strain ARB3 (JF778672)	Permafrost from Qinghai-Tibet Plateau	n/p <sup>b</sup>
	UYEF2	KU060847	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	0.987	0.914	<i>Arthrobacter</i> sp. KFC41 (EF459532)	Soil sample from Kafni Glacier, Himalayas	n/p
	UYEF3	KU060848	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	0.972	0.827	<i>Arthrobacter sulfonivorans</i> BJ15A23 (JX401490)	Permafrost soil, Northeast China	n/p
	UYEF4	KU060849	Actinobacteria	<i>Marisediminicola</i>	0.972	0.913	Actinobacterium P6 (DQ351730)	Soil of La Gorce Mountains, Antarctica	n/p
	UYEF5	KU060850	Actinobacteria	<i>Micrococcus</i>	0.992	0.936	<i>Micrococcus luteus</i> ; KSC_TOT7B. (DQ870770)	-	[54]
	UYEF6	KU060851	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	0.998	0.990	<i>Arthrobacter</i> sp. HLT3-6 (JX949507)	Glaciers in P. R. China	n/p
	UYEF7	KU060852	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	0.980	0.874	<i>Arthrobacter</i> sp. KFC41 (EF459532)	Soil sample from Kafni Glacier, Himalayas	n/p
	UYEF8	KU060853	Gammaproteobacteria	<i>Pantoea</i>	0.963	0.791	<i>Pantoea agglomerans</i> ; A126 (F1357816)	-	[113]
	UYEF9	KU060854	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	0.992	0.948	<i>Arthrobacter</i> sp. KFC41 (EF459532)	Soil sample from Kafni Glacier, Himalayas	n/p
	UYEF10	KU060855	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	0.977	0.873	<i>Arthrobacter</i> sp. MDT3-30 (JX949691)	Glaciers in P. R. China	n/p
	UYEF11	KU060856	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	0.977	0.863	<i>Arthrobacter</i> sp. KFC41 (HF548389)	Soil sample from Kafni Glacier, Himalayas	n/p
	UYEF12	KU060857	Actinobacteria	<i>Micrococcus</i>	0.983	0.892	<i>Micrococcus luteus</i> BAC1004 (HM355595)	Endophytic bacteria of <i>Phaseolus vulgaris</i>	n/p
	UYEF13	KU060858	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	0.997	0.984	<i>Arthrobacter</i> sp. BA-31 (JX949691)	Biofilms from Lake Baikal, Russia	n/p
	UYEF14	KU060859	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	0.985	0.866	<i>Arthrobacter</i> sp. KFC41 (EF459532)	Soil sample from Kafni Glacier, Himalayas	n/p
	UYEF15	KU060860	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	0.983	0.920	<i>Pseudomonas putida</i> ; OC4 (JN624751)	PAH-contaminated soil from Indiana, USA	n/p
	UYEF16	KU060861	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	0.956	0.818	Bacterium enrichment culture clone F12 (HQ602848)	-	[112]
	UYEF17	KU060862	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	0.965	0.837	<i>Pseudomonas montellii</i> CCM 3423 (KC178609)	-	n/p
	UYEF18	KU060863	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	0.978	0.874	<i>Arthrobacter</i> sp. KFC41 (EF459532)	Soil sample from Kafni Glacier, Himalayas	n/p
	UYEF19	KU060864	Actinobacteria	<i>Nakamurella</i>	0.988	0.921	Uncultured actinobacterium B1_4_1B_80 (JQ627565)	Biofilm on mineral composite substrate, Ireland	[111]
	UYEF20	KU060865	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	0.974	0.907	<i>Arthrobacter</i> sp. K12 (JF313068)	Arctic permafrost	n/p
	UYEF21	KU060866	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	0.989	0.918	<i>Arthrobacter sulfonivorans</i> ; Tibethz-14 (JX827191)	Soil from meadow from Qinghai-Tibet Plateau	n/p
	UYEF22	KU060867	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	0.952	0.767	<i>Mucilaginibacter</i> sp. PAMC 26640. (JX847597)	Arctic lichen, Spitsbergen Island	n/p
	UYEF23	KU060868	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	0.978	0.864	<i>Sphingomonas</i> sp. BJ16-D7 (JX483795)	Permafrost soil, China	n/p
	UYEF24	KU060869	Deinococcus-Thermus	<i>Deinococcus</i>	0.962	0.815	Glacier bacterium FJ128 (AY315162)	Southern Hemisphere glacier	[110]
	UYEF25	KU060870	Bacteroidetes	<i>Pedobacter</i>	0.918	0.677	<i>Pedobacter roseus</i> UT28 (JX133186)	Rhizospheric soil from Krakow, Poland	n/p
	UYEF27	KU060871	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	0.965	0.822	Uncultured bacterium ncd560c10c1 (HM274542)	Skin microbiome in atopic dermatitis	[103]
	UYEF29	KU060872	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	0.966	0.775	<i>Sphingomonas</i> sp. JC2489; JC2489 IMSNU 14143 (EU642849)	-	n/p
	UYEF30	KU060873	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	0.998	0.885	Uncultured <i>Sphingomonas</i> sp. ESS-G3n (FJ946587)	Arctic snow from Svalbard, Norway	[109]
	UYEF31	KU060874	Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	0.962	0.810	Uncultured <i>Streptomyces</i> sp. JR-45 (HQ267993)	Rhizosphere soil of bamboo forest	n/p
	UYEF32	KU060875	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	0.967	0.814	<i>Sphingomonas</i> sp. PDD-26b-16 (HQ256808)	Cloud water sampled from the Puy de Dome summit, France	[108]
	UYEF33	KU060876	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	1.000	0.995	<i>Rhodococcus fascians</i> 7Y (AJ576249)	Antarctic soil sample	n/p
	UYEF35	KU060877	Bacteroidetes	<i>Spirosoma</i>	0.946	0.740	<i>Spirosoma spitsbergense</i> (T); SPM-9 (EF451725)	High Arctic permafrost soil from Spitsbergen, Northern Norway	[107]
	UYEF36	KU060878	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	0.983	0.921	<i>Arthrobacter onyzae</i> OS115 (KF424288)	Agricultural field frozen soil, South Korea	n/p
	UYEF37	KU060879	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	0.938	0.635	<i>Sphingomonas</i> sp. JC2489; JC2489 IMSNU 14143 (EU642849)	-	n/p

Nota: <sup>a</sup> Corresponde a la referencia del relativo más cercano de cada aislamiento; <sup>b</sup> n/p: No publicado



**Figura 7: Abundancia porcentual de los grupos bacterianos detectados.** En **a.** sobre el total de los 66 aislamientos de la colección, en **b.** tomando en cuenta sólo los aislamientos provenientes de a muestra I3 y en **c.** sólo aquéllos de la muestra P1.

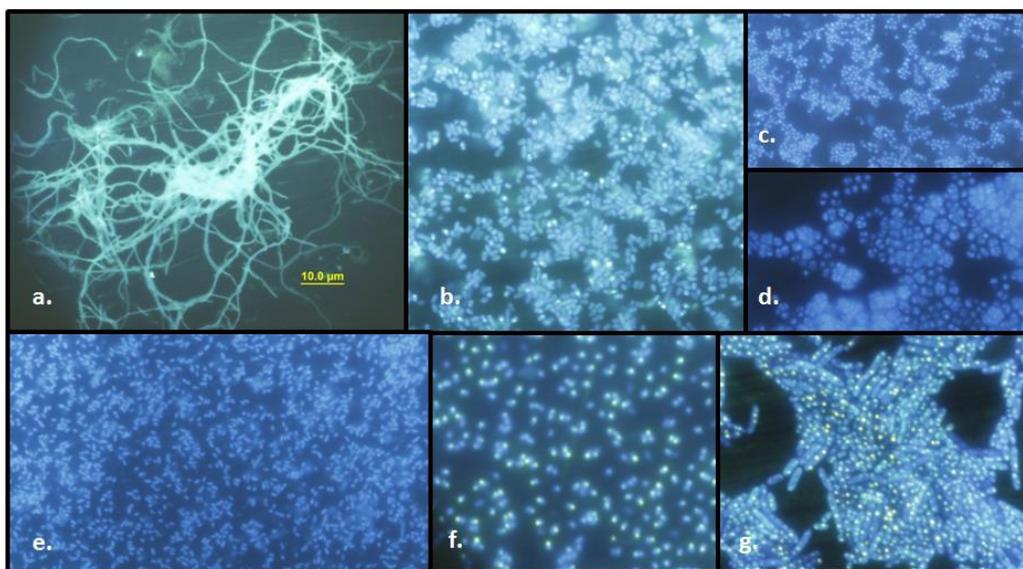


**Figura 8: Abundancia porcentual de los géneros bacterianos detectados.** En **a.** sobre el total de los 66 aislamientos de la colección, en **b.** tomando en cuenta sólo los aislamientos provenientes de a muestra I3 y en **c.** sólo aquéllos de la muestra P1.

## 4.2. Microscopía con tinción DAPI

Mediante observación por microscopía óptica, se distinguieron distintas morfologías celulares, tipos de agrupaciones y diferentes dimensiones celulares, encontrando célula de entre 0,2 a 1,6  $\mu\text{m}$ . Las células de menor tamaño se correspondieron en general a las pertenecientes al género *Arthrobacter*, observándose en este caso cocos o cocobacilos de 0,2 a 0,5  $\mu\text{m}$ . Esta característica se presentó en 21 de los 22 aislamientos de *Arthrobacter* analizados, sin embargo la cepa *Arthrobacter* sp. UYP12 no mostró esta característica, perteneciendo al grupo de mayor tamaño (1,3  $\mu\text{m}$ ). Además de la cepa *Arthrobacter* sp. UYP12, las otras cepas que presentaron mayor tamaño fueron las dos cepas de *Bacillus* sp. (UYP18 de 1,3  $\mu\text{m}$  y UYP31 de 1,3  $\mu\text{m}$ ), *Massilia* sp. UYP11 (1,3  $\mu\text{m}$ ), *Massilia* sp. UYP34 (1,6  $\mu\text{m}$ ) y *Deinococcus* sp. UYEF24 (1,4  $\mu\text{m}$ ). Como era de esperarse, la cepa *Streptomyces* sp. UYEF31 mostró una morfología de tipo filamentososa. En general, las características morfológicas concuerdan con las disponibles en la bibliografía de acuerdo al género identificado (Tabla 3) [36]. Algunas las imágenes representativas de los diferentes géneros se muestran en la Figura 9.

La observación microscópica de los aislamientos permitió detectar en 32 frotis analizados sobre un total de 64, imágenes amarillas, como se distinguen en los casos (f), (g), y en menor medida (b) de la Figura 9. Según la literatura [73]–[76], esta coloración es característica de la presencia de polifosfatos. Con el ejemplo del análisis de las microscopías de las distintas cepas de *Arthrobacter* se pudo ver que la síntesis de polifosfatos no es específica para un género en particular, ya que algunos aislamientos presentaban polifosfatos y otros no (Tabla 3).



**Figura 9: Ejemplos de las distintas morfologías observadas.** Mediante el uso de un microscopio óptico invertido se visualizaron frotis de los distintos aislamientos de la colección teñidos con el reactivo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), el cual fluoresce emitiendo luz azul al ser excitado con luz ultravioleta. De a. a e. imágenes obtenidas con el objetivo 100X donde es válida la barra de escala que se muestra en la figura a. Las imágenes de f. y g. son resultado de una amplificación adicional de 1,6X.. Las imágenes corresponden a: a. *Streptomyces* sp. UYEF31, b. *Pseudomonas* sp. UYEF17, c. *Arthrobacter* sp. UYEF10, d. *Micrococcus* sp. UYEF5, e. *Mucilagibacter* sp. UYEF22, f. *Chryseobacterium* sp. UYP8 y g. *Sphingomonas* sp. UYP23.

Tabla 3: Caracterización microscópica de los aislamientos.

Cepa	Género	Morfología en literatura	Morfología observada	Tamaño aprox. (µm)	Presencia de polifosfatos
UYP1	<i>Pedobacter</i>	Bacilo	Cocobacilo	0,5	+
UYP2	<i>Arthrobacter</i>	Bacilo/Coco	Coco	0,3	+
UYP3	<i>Arthrobacter</i>	Bacilo/Coco	Coco	0,3	+
UYP4	<i>Arthrobacter</i>	Bacilo/Coco	Coco	0,3	+
UYP5	<i>Rhodococcus</i>	Cocobacilo	Coco	0,3	+
UYP6	<i>Arthrobacter</i>	Bacilo/Coco	Coco	0,3	+
UYP7	<i>Chryseobacterium</i>	Bacilo	Bacilo	0,6	+
UYP8	<i>Chryseobacterium</i>	Bacilo	Cocobacilo	0,3	+
UYP9	<i>Rhodococcus</i>	Cocobacilo	Cocobacilo	0,3	+
UYP10	<i>Agrococcus</i>	Cocobacilo	Cocobacilo	0,3	+
UYP11	<i>Massilia</i>	Bacilo	Bacilo	1,3	-
UYP12	<i>Arthrobacter</i>	Bacilo/Coco	Coco	1,3	+
UYP13	<i>Arthrobacter</i>	Bacilo/Coco	Cocobacilo	0,5	+
UYP14	<i>Rhodococcus</i>	Cocobacilo	Cocobacilo	0,5	+
UYP15	<i>Arthrobacter</i>	Bacilo/Coco	Coco	0,3	+
UYP16	<i>Arthrobacter</i>	Bacilo/Coco	Coco	0,3	+
UYP17	-	-	Coco	0,3	+
UYP18	<i>Bacillus</i>	Bacilo	Bacilo	1,3	-
UYP19	-	-	-	-	-
UYP20	<i>Arthrobacter</i>	Bacilo/Coco	Cocobacilo	0,5	+
UYP21	-	-	Coco	0,4	+
UYP22	<i>Noviherbaspirillum</i>	Bacilo	Bacilo	0,6	-
UYP23	<i>Sphingomonas</i>	Bacilo	Bacilo	1,2	+
UYP24	<i>Pedobacter</i>	Bacilo	Bacilo	0,5	+
UYP25	<i>Pedobacter</i>	Bacilo	Bacilo	0,5	+
UYP26	<i>Pedobacter</i>	Bacilo	Bacilo	0,7	-
UYP27	<i>Mucilaginibacter</i>	Bacilo	Bacilo	0,7	+
UYP30	<i>Pedobacter</i>	Bacilo	Bacilo	0,6	+
UYP31	<i>Bacillus</i>	Bacilo	Bacilo	1,3	-
UYP32	<i>Massilia</i>	Bacilo	Bacilo	0,7	-
UYP33	-	-	Bacilo	0,8	-
UYP34	<i>Massilia</i>	Bacilo	Bacilo	1,6	+
UYEF1	<i>Arthrobacter</i>	Bacilo/Coco	Coco	0,3	-
UYEF2	<i>Arthrobacter</i>	Bacilo/Coco	-	-	-
UYEF3	<i>Arthrobacter</i>	Bacilo/Coco	Coco	0,2	-
UYEF4	<i>Marisediminicola</i>	Bacilo pequeño	Cocobacilo	0,3	-
UYEF5	<i>Micrococcus</i>	Coco	Coco	0,4	-
UYEF6	<i>Arthrobacter</i>	Bacilo/Coco	Cocobacilo	0,4	-
UYEF7	<i>Arthrobacter</i>	Bacilo/Coco	Cocobacilo	0,2	-
UYEF8	<i>Pantoea</i>	Bacilo	Bacilo	0,6	-
UYEF9	<i>Arthrobacter</i>	Bacilo/Coco	Cocobacilo	0,4	-
UYEF10	<i>Arthrobacter</i>	Bacilo/Coco	Coco	0,3	-
UYEF11	<i>Arthrobacter</i>	Bacilo/Coco	Coco	0,2	+
UYEF12	<i>Micrococcus</i>	Coco	Coco	0,4	-
UYEF13	<i>Arthrobacter</i>	Bacilo/Coco	Coco	0,2	-
UYEF14	<i>Arthrobacter</i>	Bacilo/Coco	Cocobacilo	0,2	+
UYEF15	<i>Pseudomonas</i>	Bacilo	Bacilo	0,8	+
UYEF16	<i>Pseudomonas</i>	Bacilo	Bacilo	1,0	-
UYEF17	<i>Pseudomonas</i>	Bacilo	Bacilo	0,8	+
UYEF18	<i>Arthrobacter</i>	Bacilo/Coco	Cocobacilo	0,3	-
UYEF19	<i>Nakamurella</i>	Coco	Coco	0,5	+
UYEF20	<i>Arthrobacter</i>	Bacilo/Coco	Coco	0,4	-
UYEF21	<i>Arthrobacter</i>	Bacilo/Coco	Coco	0,4	-
UYEF22	<i>Mucilaginibacter</i>	Bacilo	Bacilo	0,6	-
UYEF23	<i>Sphingomonas</i>	Bacilo	Bacilo	0,5	-
UYEF24	<i>Deinococcus</i>	Bacilo/Coco	Bacilo	1,4	+
UYEF25	<i>Pedobacter</i>	Bacilo	Cocobacilo	0,5	-
UYEF27	<i>Sphingomonas</i>	Bacilo	Bacilo	0,5	-
UYEF29	<i>Sphingomonas</i>	Bacilo	Bacilo	0,3	+
UYEF30	<i>Sphingomonas</i>	Bacilo	Bacilo	0,3	-
UYEF31	<i>Streptomyces</i>	Filamentosa	Filamentosa	-	-
UYEF32	<i>Sphingomonas</i>	Bacilo	Bacilo	0,3	-
UYEF33	<i>Rhodococcus</i>	Cocobacilo	Coco	0,5	+
UYEF35	<i>Spirosoma</i>	Bacilo	Bacilo	0,5	-
UYEF36	<i>Arthrobacter</i>	Bacilo/Coco	Cocobacilo	0,4	-
UYEF37	<i>Sphingomonas</i>	Bacilo	Bacilo	0,5	-

### 4.3. Evaluación del crecimiento a distintas temperaturas

Los aislamientos provenientes de las muestras P1, P2, P3 y P4 crecieron en medio R2A tanto a 4 °C como a 10 °C, un 84% de los aislamientos crecieron a 25 °C y sólo un 59% a 30 °C. Estos resultados concuerdan con la capacidad esperada de crecer a bajas temperaturas ya que se aislaron a temperaturas menores de 10 °C. Por otra parte los resultados indican que cerca de la mitad de los aislamientos de la colección no podrían tolerar temperaturas iguales o mayores a 30 °C lo cual condice con su carácter de organismos psicrófilos (Tabla 4a y Tabla 5a).

En el caso de los aislamientos provenientes de la muestra I3 si bien todos crecieron en R2A a 25 °C, sólo un 76% creció a 10 °C y este número desciende a un 67% cuando la temperatura de incubación pasa a ser 4 °C. Al aumentar la temperatura a 30 °C un 80% de los aislamientos no fue capaz de crecer. Por lo que en este caso la muestra I3 estaría conteniendo, en su gran mayoría, bacterias cultivables que toleran un rango más estrecho de temperatura y, a diferencia del comportamiento observado en los aislamientos de las muestras anteriores, contendría bacterias psicrotolerantes.

Como se muestra en las Tablas 4 y 5, una característica interesante de la colección, fue la gran cantidad de aislamientos de la colección que presentaron fenotipos coloridos, indicativos de pigmentos sintetizados por las propias bacterias, independientemente de la temperatura a la que estaban expuestas.

### 4.4. Tolerancia a metales

#### 4.4.1. Medio sólido

Una vez suplementado el medio R2A con los distintos metales se observaron distintos comportamientos, desde condiciones en las que todos los aislamientos fueron capaces de crecer, hasta condiciones en las que ningún aislamiento logró crecer.

En presencia de  $\text{MnCl}_2$  500  $\mu\text{M}$ , 32 aislamientos provenientes de las muestras P crecieron, 31 de ellos también lo hicieron al duplicar la concentración, mientras que 15 fueron los que toleraron el aumento a 5 mM de Mn. Con el agregado de  $\text{ZnSO}_4$ , el número de cepas capaces de crecer fue mucho menor que con respecto a la presencia Mn. En este caso se observaron 8 colonias en R2A con  $\text{ZnSO}_4$  500  $\mu\text{M}$ , 6 con Zn 1 mM y apenas 2 con Zn 5 mM. El  $\text{CoCl}_2$  200  $\mu\text{M}$  permitió el crecimiento de 18 cepas. Al aumentar la concentración a 500  $\mu\text{M}$ , sólo 4 aislamientos perduraron y, al llevar la concentración a 1 mM, prácticamente todos vieron inhibido su crecimiento. El  $\text{FeCl}_3$  en una concentración de 500  $\mu\text{M}$  permitió que todos los aislamientos crecieran; al pasar a 1mM, 27 de ellos aún crecieron, no obstante 5 mM resultó ser una concentración inhibitoria para todos. En medio R2A con  $\text{CuSO}_4$  500  $\mu\text{M}$ , 20 aislamientos crecieron, mientras que tan sólo 9 de ellos lo hicieron al pasar a una concentración de 1mM. El  $\text{NiCl}_2$  resultó ser mayoritariamente tóxico para las bacterias a una concentración de 1 mM ya que sólo 1 aislamiento fue capaz de crecer aunque, al reducir dicha concentración a la mitad, el Ni pudo ser tolerado por 16 aislamientos. Por último, el agregado de 10 y 100  $\mu\text{M}$  de  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cd}$  al medio, permitió que 20 y 6 de los aislamientos pudieran crecer, respectivamente (Tabla 4).

En cuanto a las cepas provenientes de la muestra I3, el hecho de que no todas lograran crecer a 4 °C condicionó el ensayo de tolerancia a metales y las respuestas que pudieran haber

mostrado. El aumento de temperatura a 25° C para la realización de estos mismos ensayos, efectivamente reveló crecimiento en varias de las condiciones en las que se había agregado metales (datos no mostrados). De todos modos se puede analizar el comportamiento de las 23 que sí pudieron crecer a 4 °C. El número de aislamientos capaces de crecer en las 3 condiciones de Mn evaluadas fue entre 17 y 20. El Zn a concentraciones de 500 µM y 1 mM permitió que apenas 5 y 2 aislamientos, respectivamente, crecieran, mientras que una concentración de 5 mM los inhibió por completo. El Co 1 mM resultó también tóxico para todas las bacterias en este caso, aunque concentraciones menores, de 200 y 500 µM sí permitieran el crecimiento de 17 y 4 aislamientos, respectivamente. En el caso del Fe, éste fue tolerado por 19 cepas a una concentración de 500 µM y por 15 de ellas al duplicar la concentración del metal. Mientras que una concentración de 5 mM fue tóxica. En presencia de Cu, 18 aislamientos crecieron a una concentración de 500 µM y 14 de ellos cuando la concentración alcanzó un valor de 1 mM. En presencia de Ni 500 µM, 18 aislamientos lograron crecer, mientras sólo 5 lo hicieron en 1 mM. Finalmente, se observaron colonias para 18 aislamientos en presencia de Cd 10 µM y 4 a una concentración de 100 µM de dicho metal (Tabla 5).

En resumen, los resultados encontrados muestran que hubo cepas dentro de la colección capaces de tolerar los distintos metales evaluados. Dentro de las 55 cepas que fueron capaces de crecer en medio R2A a una temperatura de 4 °C (condición control), 10 de ellas crecieron en al menos una de las concentraciones de los 7 metales ensayados; 16 aislamientos crecieron en 6 de los 7 metales; 6 aislamientos en 5 de los metales, 8 aislamientos en 4 de ellos, 11 aislamientos en sólo 3 y un sólo aislamiento fue capaz de crecer en un único metal. Por otro lado, 3 aislamientos vieron inhibido completamente su crecimiento en todas las condiciones en las que se agregó un metal al medio de cultivo. Estos resultados sugieren que los mecanismos de tolerancia a metales podrían involucrar la tolerancia a varios metales simultáneamente, hecho denominado como multitolerancia a metales. El aislamiento que mostró de manera más notoria esta capacidad fue *Pedobacter* sp. UYP1, ya que presentó mayores niveles de tolerancia a metales y creció en presencia de todos los metales ensayados. Tanto en las cepas provenientes de las muestras P como en aquellas provenientes de la muestra I3, concentraciones mayores de las mostradas en las Tablas 4 y 5 resultaron tóxicas para las cepas (datos no mostrados). Los metales tolerados en concentraciones más elevadas fueron el Mn y el Fe.

#### 4.4.2. Medio líquido

Con la finalidad de relacionar la presencia del metal con respecto al crecimiento se realizaron cultivos líquidos y se determinó la densidad óptica alcanzada a diferentes tiempos de crecimiento.

A partir de los resultados de los ensayos primarios, se realizó una segunda selección de 12 de los aislamientos a analizar y se ajustaron las condiciones a ser evaluadas. Esta vez las concentraciones ensayadas fueron: MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 1 mM, 5 mM y 10 mM); ZnSO<sub>4</sub> 1 mM, 5 mM y 10 mM; CuSO<sub>4</sub> 500µM y 1 mM; (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Cd 10 µM y 100 µM y FeCl<sub>3</sub> 1 mM. Por problemas técnicos con el equipo de incubación a 4 °C el ensayo debió realizarse a 10 °C. Se procedió en forma similar al ensayo anterior y se incluyeron triplicados de cada muestra para darle al experimento una robustez estadística mayor. Pese a este cambio en el protocolo, al comparar

Tabla 4: Crecimiento en medio sólido de los aislamientos provenientes de las muestras P.

Aislamiento	Género	Crecimiento bacteriano en R2A con diferentes metales y a diferentes temperaturas											
		4 °C	10 °C	25 °C	30 °C	4 °C							
		sin agregado de metales				MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O			ZnSO <sub>4</sub>			CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	
				500uM	1 mM	5 mM	500uM	1 mM	5 mM	200uM	500uM	1 mM	
UYP1	<i>Pedobacter</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.
UYP2	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYP3	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.
UYP4	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYP5	<i>Rhodococcus</i>	+	+	+	n.c.	+	+	n.c.	+	+	n.c.	+	n.c.
UYP6	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYP7	<i>Chryseobacterium</i>	+	+	n.c.	n.c.	+	+	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYP8	<i>Chryseobacterium</i>	+	+	+	n.c.	+	+	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYP9	<i>Rhodococcus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n.c.
UYP10	<i>Agrococcus</i>	+	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.
UYP11	<i>Massilia</i>	+	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYP12	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYP13	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	+
UYP14	<i>Rhodococcus</i>	+	+	+	n.c.	+	+	n.c.	+	+	n.c.	+	n.c.
UYP15	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.
UYP16	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.
UYP17	-	+	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYP18	<i>Bacillus</i>	+	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYP19	-	+	+	+	+	+	+	+	+	n.c.	+	+	n.c.
UYP20	<i>Arthrobacter</i>	+	+	n.c.	n.c.	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	+
UYP21	-	+	+	+	n.c.	+	+	+	+	n.c.	+	+	n.c.
UYP22	<i>Noviherbaspirillum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYP23	<i>Sphingomonas</i>	+	+	n.c.	n.c.	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.
UYP24	<i>Pedobacter</i>	+	+	n.c.	n.c.	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.
UYP25	<i>Pedobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYP26	<i>Pedobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYP27	<i>Mucilaginibacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.
UYP30	<i>Pedobacter</i>	+	+	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.
UYP31	<i>Bacillus</i>	+	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYP32	<i>Massilia</i>	+	+	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.
UYP33	-	+	+	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.
UYP34	<i>Massilia</i>	+	+	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.

Nota: Los colores mostrados corresponden al color de cada colonia; +: crecimiento; n.c.: no creció

Tabla 4: Continuación.

Aislamiento	Género	Crecimiento bacteriano en R2A a 4 °C con diferentes metales										
		sin agregado de metales	FeCl <sub>3</sub>			CuSO <sub>4</sub>			NiCl <sub>2</sub>		(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Cd	
			500uM	1 mM	5 mM	500uM	1 mM	500uM	1 mM	10 μM	100 μM	
UYP1	<i>Pedobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	n.c.	+	n.c.	+	+	
UYP2	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	
UYP3	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	
UYP4	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	
UYP5	<i>Rhodococcus</i>	+	+	+	n.c.	+	n.c.	+	n.c.	+	n.c.	
UYP6	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	
UYP7	<i>Chryseobacterium</i>	+	+	+	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	+	
UYP8	<i>Chryseobacterium</i>	+	+	+	n.c.	+	n.c.	+	n.c.	+	+	
UYP9	<i>Rhodococcus</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	+	+	
UYP10	<i>Agrococcus</i>	+	+	+	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	
UYP11	<i>Massilia</i>	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	
UYP12	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	
UYP13	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	+	+	n.c.	
UYP14	<i>Rhodococcus</i>	+	+	+	n.c.	+	n.c.	+	n.c.	+	n.c.	
UYP15	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	
UYP16	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	
UYP17	-	+	+	+	n.c.	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	
UYP18	<i>Bacillus</i>	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	
UYP19	-	+	+	+	n.c.	+	+	+	+	n.c.	+	
UYP20	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	
UYP21	-	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	+	n.c.	
UYP22	<i>Noviherbaspirillum</i>	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	
UYP23	<i>Sphingomonas</i>	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	
UYP24	<i>Pedobacter</i>	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	
UYP25	<i>Pedobacter</i>	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	
UYP26	<i>Pedobacter</i>	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	
UYP27	<i>Mucilaginibacter</i>	+	+	+	n.c.	+	n.c.	+	n.c.	+	n.c.	
UYP30	<i>Pedobacter</i>	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	+	n.c.	
UYP31	<i>Bacillus</i>	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	
UYP32	<i>Massilia</i>	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	+	
UYP33	-	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	+	n.c.	
UYP34	<i>Massilia</i>	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	

Nota: Los colores mostrados corresponden al color de cada colonia; +: crecimiento; n.c.: no creció

Tabla 5: Crecimiento en medio sólido de los aislamientos provenientes de la muestra I3.

		Crecimiento bacteriano en R2A con diferentes metales y a diferentes temperaturas												
Aislamiento	Género	4 °C	10 °C	25 °C	30 °C	4 °C								
		sin agregado de metales				MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O			ZnSO <sub>4</sub>			CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O		
						500uM	1 mM	5 mM	500uM	1 mM	5 mM	200uM	500uM	1 mM
UYEF1	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.
UYEF2	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.
UYEF3	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.
UYEF4	<i>Marisedimanicola</i>	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.
UYEF5	<i>Micrococcus</i>	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF6	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.
UYEF7	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	+	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.
UYEF8	<i>Pantoea</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF9	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.
UYEF10	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.
UYEF11	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.
UYEF12	<i>Micrococcus</i>	n.c.	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF13	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	+	n.c.
UYEF14	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.
UYEF15	<i>Pseudomonas</i>	n.c.	n.c.	+	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF16	<i>Pseudomonas</i>	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF17	<i>Pseudomonas</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.
UYEF18	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.
UYEF19	<i>Nakamurella</i>	+	+	+	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF20	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	+	n.c.
UYEF21	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	+	n.c.
UYEF22	<i>Mucilaginibacter</i>	n.c.	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF23	<i>Sphingomonas</i>	n.c.	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF24	<i>Deinococcus</i>	+	+	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF25	<i>Pedobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.
UYEF27	<i>Sphingomonas</i>	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF29	<i>Sphingomonas</i>	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF30	<i>Sphingomonas</i>	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF31	<i>Streptomyces</i>	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF32	<i>Sphingomonas</i>	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF33	<i>Rhodococcus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.
UYEF35	<i>Spirosoma</i>	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF36	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	+	n.c.
UYEF37	<i>Sphingomonas</i>	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.

Nota: Los colores mostrados corresponden al color de cada colonia; +: crecimiento; n.c.: no creció

Tabla 5: Continuación.

		Crecimiento bacteriano en R2A a 4 °C con diferentes metales									
Aislamiento	Género	sin agregado de metales	FeCl <sub>3</sub>			CuSO <sub>4</sub>		NiCl <sub>2</sub>		(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Cd	
			500uM	1 mM	5 mM	500uM	1 mM	500uM	1 mM	10 µM	100 µM
UYEF1	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	+	n.c.
UYEF2	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	+	n.c.
UYEF3	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	+	n.c.
UYEF4	<i>Marisedimanicola</i>	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF5	<i>Micrococcus</i>	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF6	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	+	n.c.
UYEF7	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	+	n.c.
UYEF8	<i>Pantoea</i>	+	+	+	n.c.	+	n.c.	+	n.c.	+	+
UYEF9	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	+	n.c.
UYEF10	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	+	n.c.
UYEF11	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	+	n.c.
UYEF12	<i>Micrococcus</i>	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF13	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	+	n.c.
UYEF14	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	+	n.c.
UYEF15	<i>Pseudomonas</i>	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF16	<i>Pseudomonas</i>	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF17	<i>Pseudomonas</i>	+	+	+	n.c.	+	n.c.	+	n.c.	+	+
UYEF18	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	+	n.c.
UYEF19	<i>Nakamurella</i>	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF20	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	+	+	n.c.
UYEF21	<i>Arthrobacter</i>	+	+	n.c.	n.c.	+	+	+	+	+	n.c.
UYEF22	<i>Mucilaginibacter</i>	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF23	<i>Sphingomonas</i>	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF24	<i>Deinococcus</i>	+	+	+	n.c.	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF25	<i>Pedobacter</i>	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	+	n.c.
UYEF27	<i>Sphingomonas</i>	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF29	<i>Sphingomonas</i>	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF30	<i>Sphingomonas</i>	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF31	<i>Streptomyces</i>	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF32	<i>Sphingomonas</i>	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF33	<i>Rhodococcus</i>	+	+	+	n.c.	+	n.c.	n.c.	+	+	n.c.
UYEF35	<i>Spirosoma</i>	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
UYEF36	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	+	n.c.	+	+	+	n.c.
UYEF37	<i>Sphingomonas</i>	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.

Nota: Los colores mostrados corresponden al color de cada colonia; +: crecimiento; n.c.: no creció

el crecimiento y los niveles de tolerancia a metales de los aislamientos evaluados tanto a 4 °C como a 10 °C, no se observaron grandes variaciones en los resultados (datos no mostrados), lo que indica que la diferencia de temperatura no fue significativa a los efectos de lo que se pretendía determinar.

Hay que destacar, en primer lugar, que todos los aislamientos seleccionados para los ensayos de tolerancia a metales en medio líquido crecieron en el medio R2A utilizado como medio base permitiendo la duración del ensayo y la identificación de las diferentes fases de crecimiento.

### Efecto del Mn

Todos los aislamientos evaluados presentaron algún nivel de tolerancia al Mn. En particular, las cepas *Pedobacter* sp. UYP1, *Rhodococcus* sp. UYP14, *Arthrobacter* sp. UYP15, *Noviherbaspirillum* sp. UYP22, *Massilia* sp. UYP32, UYP33 y *Massilia* sp. UYP34, en presencia de Mn 1 mM mostraron un crecimiento similar al control sin el agregado de metales. Niveles de crecimiento menores pero no despreciables fueron alcanzados a esta concentración por *Chryseobacterium* sp. UYP7, *Chryseobacterium* sp. UYP8, *Arthrobacter* sp. UYP20, *Arthrobacter* sp. UYEF10 y *Arthrobacter* sp. UYEF21. A concentraciones mayores de Mn (aun de 10 mM), sólo *Pedobacter* sp. UYP1 fue capaz de crecer y lo hizo a niveles similares al crecimiento en medio sin agregado de metales (Figura 10).

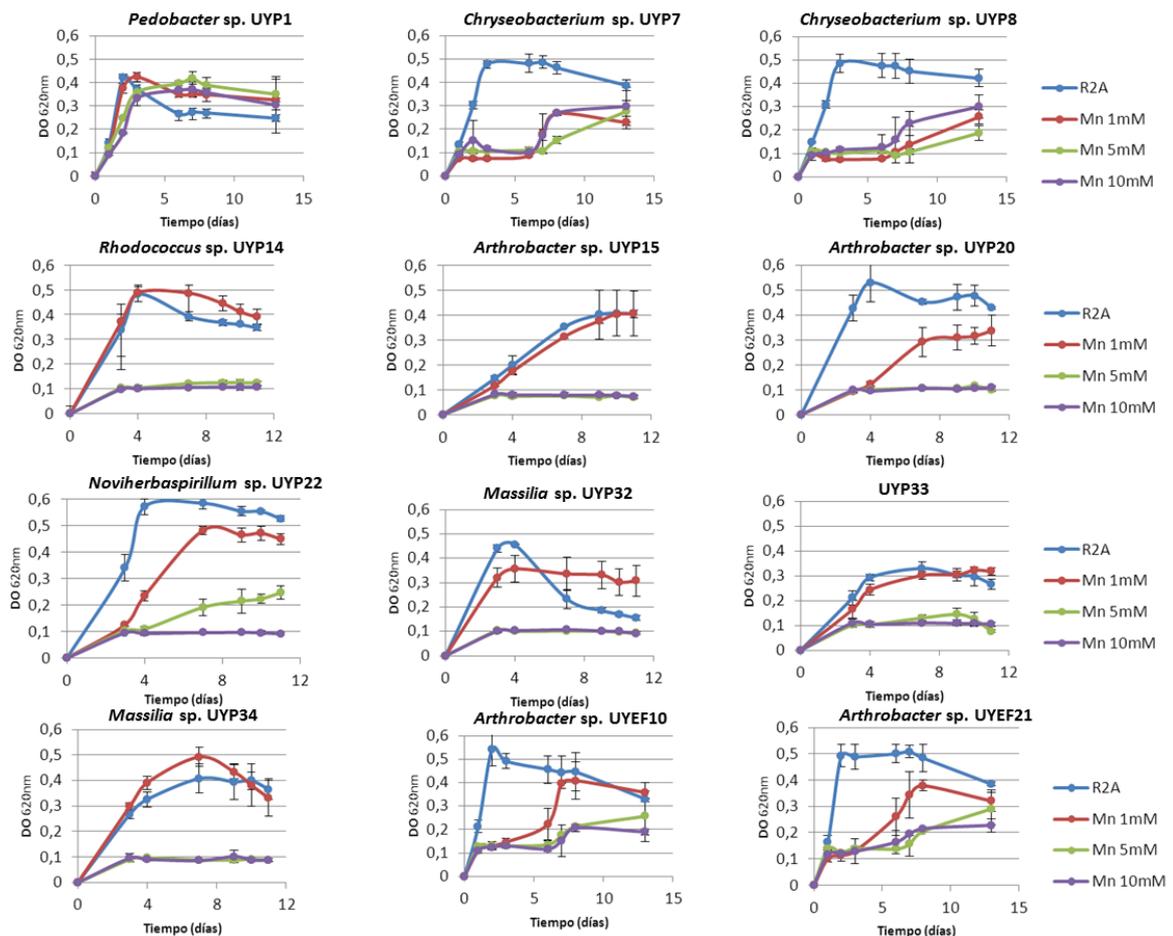


Figura 10: Efecto del Mn en el crecimiento bacteriano.

### Efecto del Zn

El Zn en todas sus concentraciones ensayadas resultó tóxico a excepción de la cepa *Arthrobacter* sp. UYP1. En los casos de *Chryseobacterium* sp. UYP7, *Chryseobacterium* sp. UYP8, *Arthrobacter* sp. UYEF10 y *Arthrobacter* sp. UYEF21 comienza a haber cierto nivel de crecimiento en presencia de Zn 1mM, luego del 6to día. Interesantemente estas mismas cepas fueron las que crecieron en presencia de Mn 1mM presentando un comportamiento similar (Figura 11).

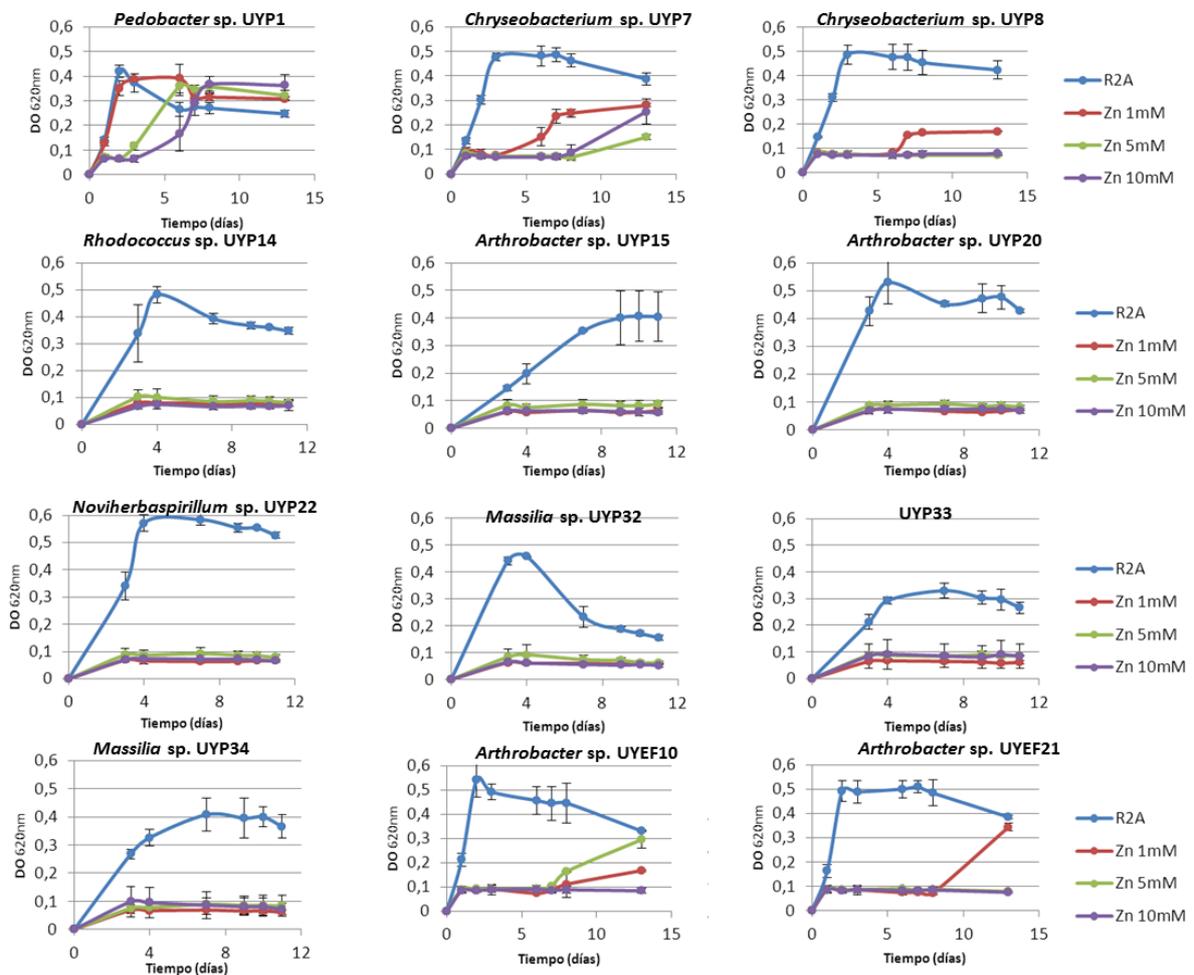


Figura 11: Efecto del Zn en el crecimiento bacteriano.

## Efecto del Cu

Las cepas que lograron tolerar mejor el Cu adicionado al medio y en ambas concentraciones fueron *Rhodococcus* sp. UYP14 y *Arthrobacter* sp. UYP20; en menor medida se encontró a *Arthrobacter* sp. UYP1 que fue inhibida con Cu 1 mM. Cierta nivel de tolerancia fue observado en *Chryseobacterium* sp. UYP7, *Arthrobacter* sp. UYEF10 y *Arthrobacter* sp. UYEF21. Por otro lado, el Cu logró inhibir en las 2 concentraciones estudiadas a las cepas *Chryseobacterium* sp UYP8, *Arthrobacter* sp. UYP15, *Noviherbaspirillum* sp.UYP22, *Massilia* sp. UYP32, UYP33 y *Massilia* sp. UYP34 (Figura 12).

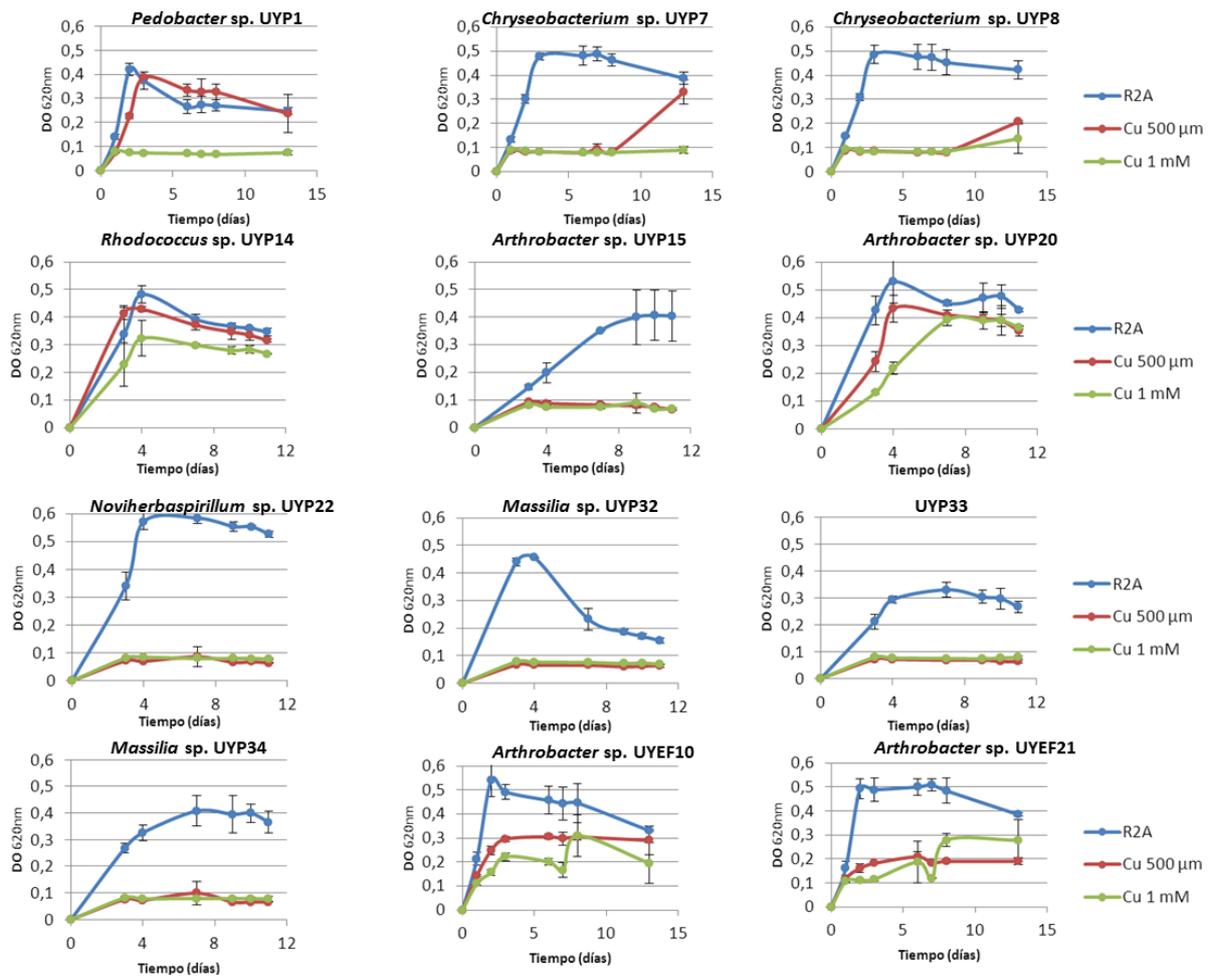


Figura 12: Efecto del Cu en el crecimiento bacteriano.

### Efecto del Cd

El Cd resultó sumamente tóxico para 6 de las 12 bacterias ensayadas. De las 6 restantes, sólo 3 mostraron niveles significativos de tolerancia cuando se adicionó Cd en una concentración de 10  $\mu\text{M}$ : *Pedobacter* sp. UYP1, *Massilia* sp. UYP32 y *Massilia* sp. UYP34. En presencia de Cd 100  $\mu\text{M}$  únicamente *Arthrobacter* sp. UYP1 logró crecer (Figura 13).

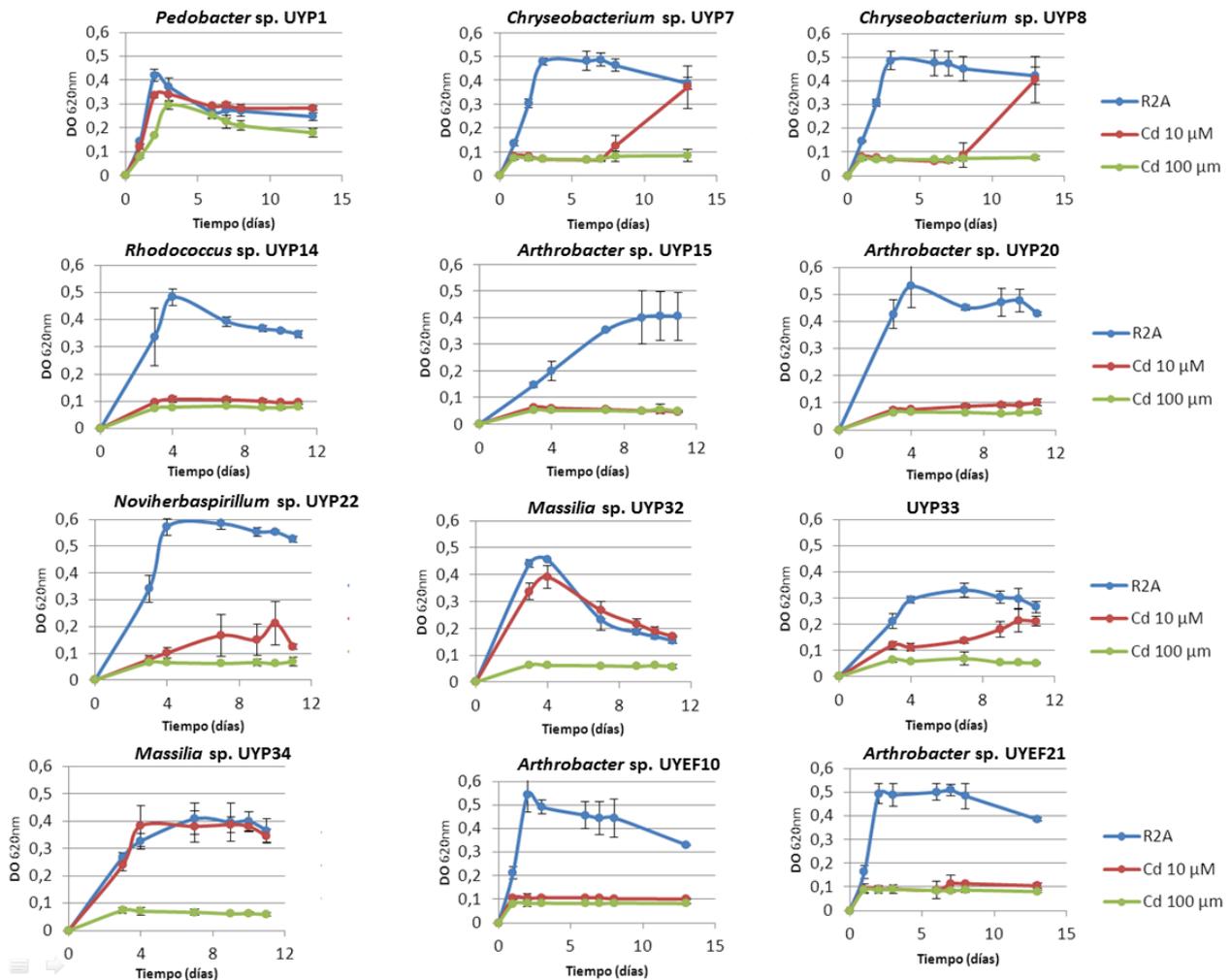


Figura 13: Efecto del Cd en el crecimiento bacteriano.

### Efecto del Fe

En presencia de Fe 1 mM las 12 cepas ensayadas crecieron y lo hicieron en forma similar al del control sin agregado de metales. Como en casos anteriores de tolerancia a metales se puede observar con claridad que en varias oportunidades la fase lag es mayor que la del control (Figura 14).

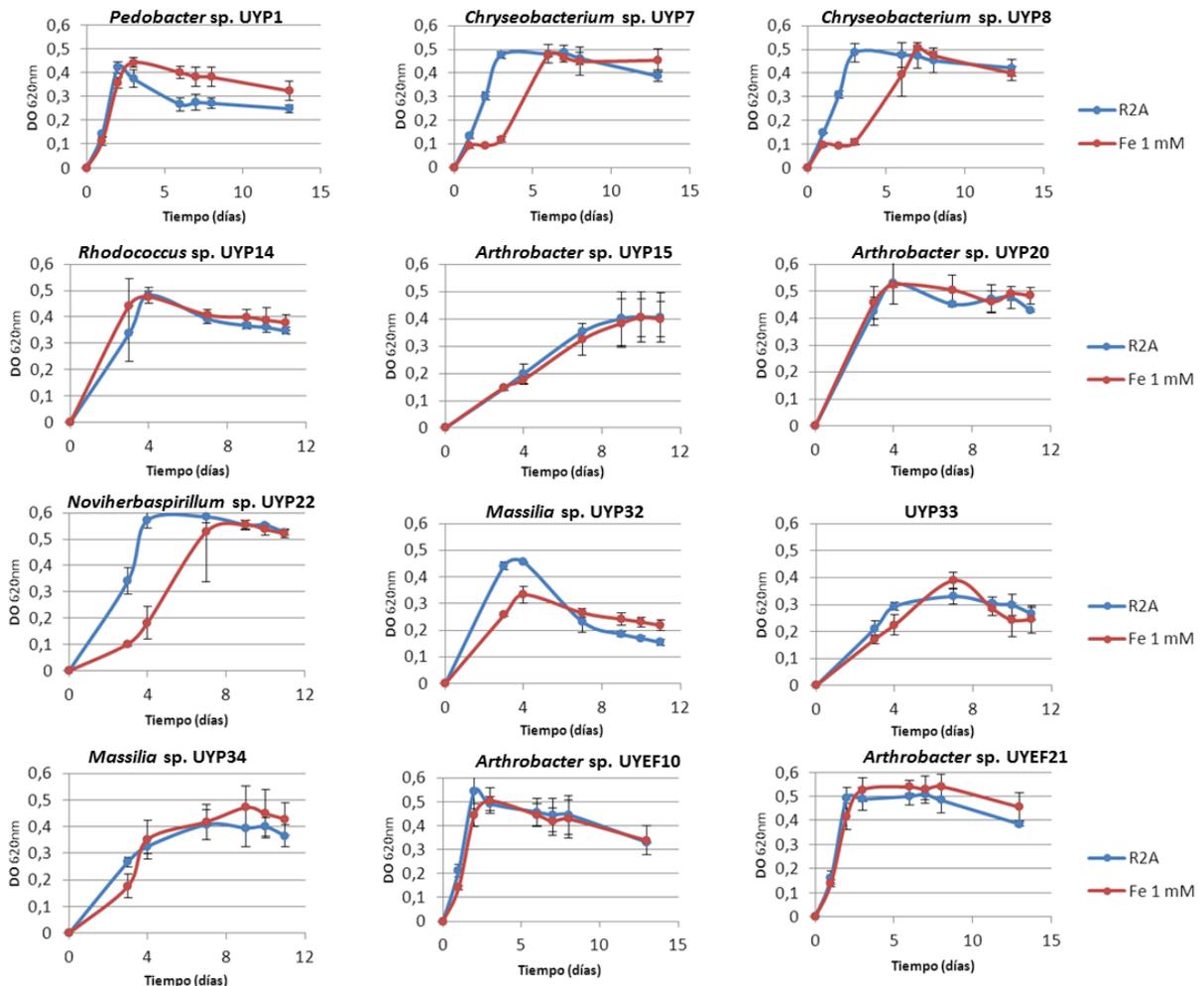


Figura 14: Efecto del Fe en el crecimiento bacteriano.

En la Tabla 6 se exponen, a modo de resumen, los resultados de los ensayos de tolerancia a metales, tanto en medio sólido como en medio líquido, de las 12 cepas analizadas en las distintas condiciones evaluadas en ambos experimentos.

Tabla 6: Resultados obtenidos en los ensayos de tolerancia a metales en medio sólido y en medio líquido.

Medio (T=4 °C)		UYP1	UYP7	UYP8	UYP14	UYP15	UYP20	UYP22	UYP32	UYP33	UYP34	UYEF10	UYEF21
R2A	Líquido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Sólido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mn 500 µM	Sólido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mn 1 mM	Líquido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Sólido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mn 5 mM	Líquido	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	+
	Sólido	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	+	+	+	+	+	+
Mn 10 mM	Líquido	+	+	+	n.c.	+	+						
Zn 500 µM	Sólido	+	+	+	+	n.c.	n.c.						
Zn 1 mM	Líquido	+	+	+	n.c.	+	+						
	Sólido	+	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.						
Zn 5 mM	Líquido	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.
	Sólido	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Zn 10 mM	Líquido	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Co 200 µM	Líquido	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Co 200 µM	Sólido	+	n.c.	n.c.	+	+	+	n.c.	+	+	n.c.	+	+
Co 500 µM	Líquido	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Co 500 µM	Sólido	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+
Co 1 mM	Líquido	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Co 1 mM	Sólido	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Fe 500 µM	Sólido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fe 1 mM	Líquido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Sólido	+	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.
Fe 5 mM	Sólido	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Cu 500 µM	Líquido	+	+	±	+	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	+
	Sólido	+	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	+
Cu 1 mM	Líquido	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	+
	Sólido	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	+
Ni 500 µM	Sólido	+	n.c.	+	+	n.c.	+	n.c.	n.c.	+	n.c.	+	+
Ni 1 mM	Sólido	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+
Cd 10 µM	Líquido	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	±	+	+	+	n.c.	n.c.
	Sólido	+	+	+	+	n.c.	n.c.	+	+	+	+	+	+
Cd 100 µM	Líquido	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
	Sólido	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.

Nota: +: crecimiento; n.c.: no creció

## 4.5. Análisis funcional

### 4.5.1. Producción de sideróforos

Se detectaron únicamente 2 aislamientos (*Pantoea* sp. UYEF8 y *Pedobacter* sp. UYP1) capaces de crecer en medio CAS. Ambas cepas exhibieron la capacidad de producir sideróforos en dicho medio, evidenciado macroscópicamente como la formación del halo anaranjado alrededor de la colonia (datos no mostrados).

### 4.5.2. Oxidación de manganeso

Pese a crecer en medio R2A suplementado con distintas concentraciones de  $MnCl_2$ , ningún aislamiento presentó el fenotipo característico de las bacterias oxidadoras de Mn visualizado como la presencia de precipitados color marronado, ni viraron a un color azul tras agregar LBB, por lo que podemos concluir que no se detectaron bacterias capaces de oxidar Mn.

### 4.5.3. Solubilización de fosfato de calcio

Si bien 28 cepas fueron capaces de crecer en medio NBRIP sólo *Pantoea* sp. UYEF8 generó un halo traslúcido alrededor de su colonia, lo que indica que se trata de una bacteria solubilizadora de fosfato. En la Figura 15 se muestran las colonias indicativas del crecimiento bacteriano para los aislamientos *Arthrobacter* sp. UYEF7, *Pantoea* sp. UYEF8, *Arthrobacter* sp. UYEF9 y *Arthrobacter* sp. UYEF10, presentando, el correspondiente al de la *Pantoea* sp. UYEF8, el halo traslúcido característico de la solubilización de fosfatos.

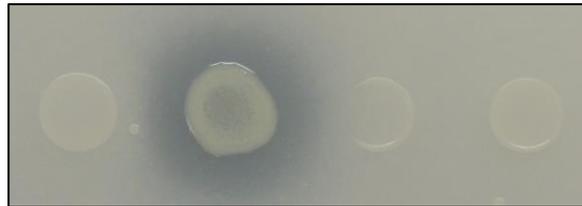


Figura 15: Ensayo de solubilización de fosfato.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Identificación de los aislamientos

Como primer objetivo del presente trabajo, se había planteado determinar la identidad a nivel de género de una colección de bacterias cultivables aisladas de rocas colectadas en la Península Fildes de la Isla Rey Jorge, Antártida.

Como material de partida se utilizaron aislamientos provenientes de 5 muestras distintas. La muestra I3, colectada en enero de 2014, no fue sometida a ningún otro tratamiento más que su pulverización y resuspensión en agua destilada para el aislamiento de las bacterias cultivables presentes en ella, lo que significa que las cepas provenientes de esta muestra no serían todas endolíticas verdaderas sino que comprendería también las posibles bacterias epilíticas e hipolíticas así como otras bacterias de presencia circunstancial. Hay que mencionar de todas formas que en la toma de la muestra se tuvo especial cuidado en no contaminarla con material foráneo y se tomaron las precauciones necesarias para retirar una porción de roca que no estuviese en contacto con otros elementos. Por otro lado, las distintas muestras P (colectadas en una expedición posterior, en mayo de 2014) sí fueron sometidas a diversos tratamientos con la finalidad de desinfectar su superficie y enriquecer la muestra con la fracción de bacterias endolíticas verdaderas (euendolíticas).

El medio utilizado para el aislamiento de las bacterias fue el medio R2A. Su uso está reportado para el aislamiento de bacterias de crecimiento lento que en otro medio podrían no llegar a observarse por la presencia de bacterias de crecimiento más rápido que competirían mejor por la supervivencia. [77] Se había utilizado además en un principio MM. Este medio, simulando la composición de minerales y sales de aguas oceánicas, se utiliza preferentemente para bacterias marinas heterótrofas que puedan tener esos requerimientos especiales como podría ser el caso de algunas endolíticas por su cercanía geográfica al mar [78]. El hecho de utilizar 2 medios distintos para el aislamiento de las bacterias reduce algo del sesgo producido por utilizar un solo medio de cultivo. Sin embargo, todos los aislamientos obtenidos en MM lograron crecer en R2A, por lo que se decidió continuar utilizando sólo R2A en los ensayos siguientes.

Pese a haber incubado los cultivos en presencia de luz, no se obtuvieron bacterias fotosintéticas. Las bacterias recuperadas en los medios ensayados, pertenecientes a esta colección fueron todas heterótrofas.

Otro factor analizado fue la temperatura de crecimiento. Los aislamientos provenientes de la muestra I3 fueron seleccionados a 25° C, y luego evaluados a temperaturas más bajas lo que permitió el crecimiento de bacterias psicrotolerantes. Mientras que los aislamientos provenientes de las muestras P, fueron seleccionados a temperaturas menores, permitieron el desarrollo de mayor proporción de bacterias psicrófilas con mayor tolerancia al frío que las provenientes de I3. Las bacterias psicrófilas se van a diferenciar de manera significativa de las psicrotolerantes en cuanto a ciertas adaptaciones fisiológicas. Para prosperar en ambientes fríos, las bacterias psicrófilas requieren, desde el punto de vista funcional, de enzimas activas a bajas temperaturas para su metabolismo y generación de energía en esas condiciones, y desde el punto de vista estructural, de la síntesis de cierto tipo de lípidos para mantener la integridad

de la membrana celular, su fluidez y sus funciones. El hecho de acortar el largo de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos que conforman los fosfolípidos de membrana, así como introducir en éstos más ácidos grasos insaturados (dobles enlaces en cis), contribuye a una menor interacción entre las cadenas, disminuyendo la temperatura de fusión (y por tanto aumentando la fluidez de la membrana), con respecto a lo que sería la incorporación de ácidos grasos saturados y/o de cadena más larga. Las adaptaciones funcionales están codificadas genéticamente en la secuencia proteica y son resultado de la adaptación a largo plazo, mientras que, las que son a nivel estructural involucran la regulación de vías de biosíntesis preexistentes. No obstante, ninguna de estas adaptaciones básicas es suficiente, debido a que las bajas temperaturas inducen restricciones fisicoquímicas del medio. Las bajas temperaturas reducen el transporte e incrementan la viscosidad del agua y del citoplasma. A medida que se llega a temperaturas cercanas al punto de congelamiento, el metabolismo se ve eventualmente deprimido. Mientras las condiciones de frío prevalecen en los ambientes polares, estas bacterias permanecen metabólicamente activas, pero su crecimiento puede ser limitado por ciertos procesos celulares sensibles a la temperatura [23][36]. Es por esto que al realizar los ensayos de tolerancia y de actividades a 4 °C podríamos esperar que las bacterias psicrófilas y las psicrotolerantes respondieran de manera distinta a las condiciones enfrentadas.

La diversidad microbiana es una manera de caracterizar la estructura de una comunidad y trata no sólo de la clasificación sino que también del número de organismos en las distintas unidades de clasificación (distinto taxón o por su rol o función en la comunidad). En una comunidad dada hay una cierta *richness* (riqueza) o número de taxones diferentes, y una *evenness* o número de individuos por taxón. Los inconvenientes para determinar estos parámetros tienen que ver con el efecto del muestreo la variabilidad temporal y el método de detección. El primero tiene que ver con el tamaño de la muestra, con su heterogeneidad, resulta imposible poder detectar completamente todos los organismos presentes en un lugar, la muestra se supone que va a ser representativa pero de todos modos se van a perder taxones que tienen un número de representantes menor. El momento en que es tomada la muestra también es crucial; las condiciones ambientales cambian a lo largo del tiempo y determinan los organismos que están presentes en un momento dado y su número. El método de detección tiene que ver con la aproximación utilizada [36]. Al aislar organismos cultivables, según las condiciones de cultivo nos podemos quedar sólo con una porción de la comunidad: heterótrofos, autótrofos, aerobios, anaerobios, etc. No obstante, ya al sólo considerar cultivables nos estamos quedando con “la punta del iceberg” [79]. A la mayor proporción de microorganismos no se le ha encontrado aún manera de aislarlos y cultivarlos. A la vez, hay grupos de bacterias distintas que se relacionan muy íntimamente mediante mutualismo, simbiosis, por lo resulta difícil poder aislarlas [36][79]. Es por esto que métodos de análisis metagenómico podrían resultar más adecuados para disminuir ese sesgo al estudiar la diversidad de una comunidad. En este trabajo se analizaron bacterias provenientes de sustratos líticos. Como se mencionó anteriormente, no todas provenían exclusivamente de la porción endolítica. Además, por el método utilizado y el hecho de ser cultivables, se perdió una importante cantidad de organismos presentes que eran no cultivables. Y dentro de esas cultivables, se obtuvieron aislamientos heterótrofos, siendo algunos psicrófilos y otros psicrotolerantes. Por último, de los aislamientos obtenidos, se seleccionaron para construir la

colección algunos de ellos según características fenotípicas de las colonias observadas, dejando por fuera microorganismos e incorporando a la vez más de un representante de un mismo taxón a la vez, muy probablemente. Es por todo esto que en cuanto a diversidad endolítica en general no se pueden sacar conclusiones representativas, por no tratarse de un análisis exhaustivo. Podría entonces plantearse la utilización de una estrategia de análisis de la diversidad mediante metagenómica ya que esto sería más abarcativo y más representativo de la diversidad real presente. Al momento de coleccionar las muestras también se realizó la extracción de ADN metagenómico, no obstante, la concentración obtenida fue baja por lo que se siguió con la estrategia aquí planteada. Si se quisiera volver a tratar con ese enfoque, habría que poner a punto la técnica de extracción de ADN. Otra aproximación podría ser la secuenciación masiva de todos los ADNr 16S o, por otro lado, la incorporación de otro marcador molecular.

La colección aquí analizada estaba conformada por 66 aislamientos, de los cuales sólo 62 pudieron ser identificados a nivel de género. A nivel de filo, Actinobacteria fue el que tuvo mayor número de representantes (50% de los aislamientos identificados), con 23 aislamientos pertenecientes al género *Arthrobacter*, 4 al género *Rhodococcus*, 2 *Micrococcus*, 1 *Streptomyces*, 1 *Agrococcus*, 1 *Nakamurella* y 1 *Marisediminicola*. En segundo lugar, hubo un 23% de organismos pertenecientes a Proteobacteria, dentro de los que distinguimos Alpha (7 *Sphingomonas*), Beta (3 *Massilia* y 1 *Noviherbaspirillum*) y Gammaproteobacteria (3 *Pseudomonas* y 1 *Pantoea*). Un 17% pertenecían a los Bacteroidetes (6 *Pedobacter*, 2 *Chryseobacterium*, 2 *Mucilaginibacter* y 1 *Spirosoma*). Por último, los Firmicutes presentes representaron un 3% (2 *Bacillus*), y el representante del filo Deinococcus-Thermus (1%) fue un único *Deinococcus*.

Las muestras I3 y P1, además de haber sido colectadas en el mismo sitio, fueron las que obtuvieron un mayor número de U.F.C. y, por tanto, de las que se seleccionaron mayor número de aislamientos (34 y 21 aislamientos respectivamente). En ambas muestras fue posible destacar el amplio predominio de Actinobacteria así como la presencia del grupo Bacteroidetes. Sin embargo, el resto de los grupos bacterianos encontrados en cada una fueron distintos. Mientras que en I3 se encontraron Alpha y Gammaproteobacteria así como Deinococcus, en P1 se hallaron Betaproteobacteria y Firmicutes. La muestra I3 comprendió 13 géneros bacterianos distintos, a la vez que P1 se compuso de 8. De no haber sido por el hecho de que no todas las colonias obtenidas, tras los tratamientos a las muestras, fueron seleccionadas, podría haberse realizado una comparación más real en cuanto a la diversidad de estas en 2 épocas del año distintas (verano y otoño).

Teniendo en cuenta que la colección representa parte de la diversidad total, los datos obtenidos sugieren que las comunidades endolíticas son un nicho que presenta una gran diversidad de géneros bacterianos. Se comprobó también que muchos de los géneros presentes en nuestra colección son característicos de ambientes endolíticos ya reportados en otros estudios. Actinobacteria, alfa y gama Proteobacteria, diversas especies de Planctomycete y una abundante cantidad de bacterias no cultivables se han podido detectar en estudios de la diversidad procarionta dominando estos ambientes [15], [21], [26], [80], [81].

Al analizar los relativos más cercanos de los aislamientos (cepas de la base de datos con mayor grado de similitud) de la colección, 37 aislamientos de los 62 estudiados, habían sido aislados de ecosistemas fríos e incluso de la propia Antártida, mientras que los 25 restantes provenían de diversas fuentes. Pese a que los resultados arrojados por el BLAST no dejaron duda acerca de la identidad a nivel de género de los aislamientos, no todos los valores relacionados con la similitud de secuencia fueron lo suficientemente altos como para confirmar la verdadera cercanía entre las cepas. El *S\_ab value* y el *similarity score* son valores, obtenidos por distintos algoritmos, que miden el grado de similitud entre las secuencias comparadas en el BLAST. Un valor más alto indica un mayor grado de similitud entre las secuencias. Aunque no está definido un valor a partir del cual se define si la similitud es importante o no (alta o baja) [82], [83], hay autores que apuntan a que el valor de corte es de 0.97 o 97% [84], [85].

## 5.2. Microscopía con tinción DAPI

Caracterizar la morfología de los aislamientos fue otro de los objetivos. Para ello se realizaron frotis teñidos con DAPI y se visualizaron al microscopio óptico. Se observaron variados tamaños, morfologías y distribuciones de las células, coincidiendo con lo ya reportado para los distintos géneros.

La observación microscópica de los aislamientos indicó en varios casos la presencia de polifosfatos. Se ha reportado que estos polímeros de oxianiones son capaces de unirse al DAPI dando como resultado una fluorescencia amarilla como la observada [73]–[76]. La síntesis de los polifosfatos en bacterias está asociada a varios mecanismos regulatorios, entre ellos a las respuestas a condiciones de estrés de un ambiente cambiante [86]. Pueden estar asociados a la resistencia a metales, el estrés oxidativo, el estrés osmótico, la temperatura, la radiación UV, etc [86]–[89]. El estrés oxidativo se ve acentuado en bacterias psicrófilas/psicrotolerantes como lo son las de la colección estudiada en este trabajo [23][86][90]. Sería interesante plantear como perspectiva determinar si existe en nuestra colección una relación entre la síntesis de polifosfatos y la tolerancia a metales.

## 5.3. Evaluación del crecimiento a distintas temperaturas

Los cepas que pasaron a formar parte de la colección y que provenían de la muestra I3, habían sido aisladas en medio R2A o MM a 25 °C. No es de sorprender entonces que posteriormente no todas fueran capaces de crecer a temperaturas más bajas. Por otro lado, al ser cultivadas a 30 °C y 35°C (datos no mostrados) el número de colonias presente fue también muy bajo. En general, las bacterias cultivables de I3 toleraron un rango estrecho de temperatura. Mientras, varias bacterias provenientes de las muestras P no sólo manifestaron que su temperatura óptima de crecimiento se encontraba entre los 4 °C y 10 °C, sino que también un gran número pudo crecer también a temperaturas mayores, de hasta 30 °C. Esto indicaría que presentan cierta flexibilidad en cuanto a mecanismos fisiológicos y metabólicos que permiten sobrellevar las condiciones cambiantes de su ambiente. Quedaría pendiente conocer más en profundidad cuáles son en concreto estos y si también podrían estar relacionados a adaptaciones hacia otros tipos de estrés. Estudios de proteómica en cepas provenientes de la Antártida han identificado proteínas que son sintetizadas a bajas temperaturas y que permiten el desarrollo de las células en dichas condiciones, y que incluso son inducidas por el frío. Muchas de ellas son proteínas de membrana que tienen que ver con la forma de la célula y mecanismos de transporte. Por otro lado, al comparar proteomas de una misma cepa a 4 °C y 18 °C se vio que

muchas proteínas son directamente reprimidas a bajas temperaturas: proteínas de *heat shock*, relacionadas al plegamiento proteico, un 50% de las relacionadas con el metabolismo bacteriano en general, proteínas del metabolismo del Fe y del estrés oxidativo. Cuando la temperatura ambiental es extremadamente baja o durante la supervivencia de congelación a largo plazo, las bacterias pasan a un estado de inactividad (latencia) con mínima actividad metabólica celular con el objetivo de preservar el programa genético de la célula. Pero cuando la temperatura aumenta transitoriamente, tanto el metabolismo como la división celular son estimulados, lo que puede ser visto como una estrategia adaptativa para incrementar la viabilidad de la población durante los cortos períodos más cálidos [23], [24].

Otra característica interesante observada, independientemente de la temperatura, fue la presencia de bacterias coloridas o pigmentadas. Estudios previos reportan la presencia de pigmentos en bacterias provenientes de ambientes fríos [91]. La síntesis de este tipo de compuestos se trataría de una estrategia utilizada por las bacterias de manera de sobrellevar el estrés ambiental [92], [93], además de constituir factores de virulencia [94]. Según estudios previos, los carotenoides, por ejemplo, parecerían jugar un rol crioprotector y como protector frente a la radiación ultravioleta [91], [95], [96]. Esto quizás explicaría el hecho de que los aislamientos de las muestras P, que toleraron temperaturas más bajas que las de la muestra I3, presentaron una mayor variedad de colores y más intensos.

#### 5.4. Tolerancia a metales

Mediante la tabla 6 es posible comparar los comportamientos de las cepas ensayadas para tolerancia a metales tanto en medio sólido como en medio líquido. Pese a que la temperatura de incubación para los aislamientos en medio líquido fue de 10 °C y no de 4 °C como para el caso del medio sólido, ensayos preliminares en medio líquido a 4 °C habían mostrado para los aislamientos ensayados el mismo comportamiento que el observado a 10 °C (datos no mostrados), por lo que la diferencia de temperatura para esto no parece estar afectando los resultados.

La cepa con características más interesantes resultó ser *Pedobacter* sp. UYP1, ya que presentó, en general, mayores niveles de tolerancia a metales y en la mayoría de los metales, siendo consistente al comparar su comportamiento en medio sólido y líquido.

Las *Chryseobacterium* UYP7 y UYP8 mostraron comportamientos similares en las condiciones ensayadas. Sin embargo, UYP7 logró tolerar mejor el Zn que UYP8, en medio líquido. Es interesante que tanto en este último caso como en presencia de Mn, los niveles de tolerancia alcanzados fueron mayores en medio líquido que en medio sólido. Lo contrario ocurre para ambas cepas en Cd, donde alcanzaron mayor tolerancia en medio sólido que en líquido.

*Rhodococcus* sp. UYP14 fue capaz de tolerar tanto Mn como Fe hasta una concentración de 1mM. Sometido a Zn, logró crecer en concentraciones de 500 µM y 1 mM solamente en medio sólido, así como también en medio sólido suplementado con Co 200 µM y Ni 500 µM (éstas 2 últimas condiciones no se ensayaron en medio líquido). Mayores niveles de tolerancia a Cu (1 mM) fueron alcanzados en medio líquido. Por último, UYP14 logró crecer en Cd a una concentración de 10 µM solamente en medio sólido.

La cepa *Arthrobacter* sp. UYP15 alcanzó su mayor nivel de tolerancia al Mn (5 mM) en medio sólido, no así en medio líquido. A la vez, no fue capaz de tolerar ninguna condición de agregado de Zn ni al medio líquido ni al medio sólido; tampoco en ninguna de las condiciones ensayadas de Ni ni de Cd. La concentración 1 mM de Fe fue la condición máxima tolerada en medio sólido, también toleró esa concentración en medio líquido, pero al no haber podido ensayar condiciones mayores, por el riesgo de que precipitara el metal, no se puede estimar cuál es la concentración máxima tolerada. Por último, ambas condiciones de Cu fueron toleradas en medio sólido pero no así en líquido.

*Arthrobacter* sp. UYP20 no toleró concentraciones mayores a Mn 1 mM. En ninguna de las condiciones evaluadas de Zn y Cd mostró crecimiento. Sí toleró Cu, tanto en medio sólido como en medio líquido en las 2 concentraciones ensayadas. En cuanto al Fe, toleró hasta 1 mM en ambos tipos de cultivo. Concentraciones de Ni 500  $\mu$ M y Co 500  $\mu$ M, en medio sólido, fue el valor máximo tolerado por esta cepa para estos metales.

*Noviherbaspirillum* sp. UYP22, *Massilia* sp. UYP32, UYP33 y *Massilia* sp. UYP34 presentaron comportamientos similares. Toleraron hasta 1 mM de Mn en medio líquido y hasta 5 mM en medio sólido (a excepción de UYP22 que también lo hizo en líquido). Ninguna de estas cepas toleró Zn ni Cu en las concentraciones ensayadas. Se vio un crecimiento significativo en medio líquido con Fe 1 mM pero no en medio sólido. Sólo UYP32 y UYP33 toleraron una concentración de Co de 200  $\mu$ M. UYP33 también pudo crecer en presencia de Ni 500  $\mu$ M. Por último, en Cd 10 $\mu$ M, las 4 cepas mostraron crecimiento tanto en medio líquido como en sólido, siendo UYP32 la única de ellas que toleró los 100  $\mu$ M aunque sólo en medio sólido.

Las cepas UYEF10 y UYEF21 de *Arthrobacter* también tuvieron entre ellas respuestas similares. Toleraron todas las concentraciones de Mn evaluadas tanto en medio sólido como en líquido; lo mismo en el caso del Cu. Llama la atención que sólo hayan podido crecer en presencia de Zn en medio líquido. El Fe también parece haber sido mejor tolerado en medio líquido, al menos en el caso de UYP21. El Cd 10  $\mu$ M sólo permitió el crecimiento de ambas cepas en medio sólido. Ni y Co en las condiciones más bajas ensayadas fueron tolerados por las 2 cepas aunque UYEF21 mostró un nivel de tolerancia mayor en ambos metales.

En varias de las condiciones en las que se adicionó metales, se aprecia un aumento de la fase de latencia en las curvas de crecimiento. Esto es consistente con la literatura donde se ha observado que el crecimiento se enlentece en presencia de metales ya que los mecanismos de tolerancia tardarían en ponerse en funcionamiento [97].

Se observa que hubo cierta consistencia entre los resultados de ambos ensayos para las respuestas dadas por los aislamientos. Es claro que mayores niveles de tolerancia a metales se alcanzaron en medio sólido y en menor medida en medio líquido, aunque en algunos pocos casos haya ocurrido lo contrario. Esto no concuerda con lo reportado en la literatura ya que se sabe que la formación de biofilm en medio sólido protege a las células del estrés causado por metales. Los componentes del biofilm serían responsables de captarlos y retrasar su difusión al interior de las células. En medio líquido, las células están más dispersas por estar en suspensión y por tanto más expuestas al estrés del medio [98]. Nuestros resultados podrían sugerir que los mecanismos de tolerancia a metales utilizados en medio líquido y en medio sólido no son los mismos.

Como se mencionó con anterioridad en los resultados de los ensayos en medio sólido, también en medio líquido los metales mayormente tolerados fueron Mn y Fe, concentraciones mayores resultaron ser más tóxicas. El crecimiento o la ausencia de crecimiento están relacionados con la toxicidad del elemento. Es así como metales más tóxicos como Cd, Cu y Zn son menos tolerados que otros como Mn y Fe. Por otro lado hay que destacar que estos 2 últimos juegan un rol más importante en la fisiología de la célula por lo que concuerda con el resultado obtenido. Sin embargo, parecería que el Cu está siendo más tolerado que el Zn pese a haber evidencia en la literatura que el primero resulta ser más tóxico [30][97].

El hecho de que varias cepas de un mismo género hayan sido evaluadas para las tolerancias a metales y hayan respondido de manera distinta, apoya la hipótesis de que los mecanismos de tolerancia no son específicos de un género sino que varían según la cepa y probablemente muchos de ellos estén codificados en plásmidos.

Mediante el análisis del comportamiento de 12 aislamientos frente a la presencia de metales, podemos concluir que dentro de la comunidad de bacterias endolíticas cultivables de la Antártida existen mecanismos de tolerancia a metales. Interesantemente, muchos de los aislamientos son capaces de tolerar varios metales y en algunos casos altas concentraciones de éstos.

### 5.5. Análisis funcional

Otro de los objetivos planteados en este trabajo era el de caracterizar la fisiología de los aislamientos. Fue por ello que se decidió ensayar si ciertas actividades que podrían ser relevantes en el contexto de la vida endolítica estaban presentes en las bacterias de la colección.

Al analizar la capacidad de los aislamientos de producir y liberar al medio sideróforos como mecanismo de adquisición de hierro, la mayoría no fue capaz de crecer en el medio CAS. Como consecuencia, no podemos determinar si este mecanismo está presente en nuestra colección. Para algunas bacterias (sobretudo gram positivas), los componentes presentes en el medio como el detergente HDTMA pueden resultar tóxico [99]. Como alternativa podría plantearse la determinación de sideróforos en el sobrenadante de un cultivo previamente crecido en medio líquido. Cabe destacar que, como se mencionó anteriormente, un tipo de proteínas que ha sido reportada su represión a bajas temperaturas son las relacionadas con el metabolismo del Fe. Una de ellas es el receptor dependiente de tonB, necesaria para el transporte de los complejos hemo y sideróforos férricos a través de la membrana celular. Iones metálicos como el Fe son esenciales para el metabolismo celular, y por lo tanto, el hecho de que los datos proteómicos apunten a la represión por frío de las proteínas relacionadas con hierro es desconcertante. Posibles explicaciones incluyen que ya de por sí enzimas que requieren Fe o que lo contienen en complejos son reprimidas por las bajas temperaturas. Por otro lado, el Fe<sup>+2</sup> es potencialmente perjudicial, ya que es capaz de inducir daño celular oxidativo mediante la reacción de Fenton dando como resultado la generación de radicales altamente reactivos del hidroxilo, agregándole un tipo de estrés extra a las bacterias [23].

Al analizar otros mecanismos, como son la solubilización de fosfato y la oxidación de manganeso, se puede inferir que éstos no estarían jugando un papel muy importante en la adaptación ni en la supervivencia de las bacterias endolíticas antárticas. Para poder determinar

la verdadera relevancia de estos mecanismos y desarrollar un estudio más profundo de las comunidades endolíticas, sería necesario establecer parámetros más concretos en cuanto al ambiente. Se debería determinar la estructura y composición de la roca y determinar la concentración en la que estos minerales se encuentran así como su biodisponibilidad. Pese a que sí existen estudios geológicos previos realizados de distintas regiones de la Antártida, el determinar parámetros de dentro de la misma roca no es tarea sencilla y no se tienen muchos registros al respecto.

## 6. CONCLUSIONES

En este trabajo, se analizó una colección de 66 aislamientos bacterianos cultivables presentes en ambientes endolíticos antárticos. Se identificó a nivel de género la colección obteniendo una importante diversidad de géneros bacterianos, característicos de ambientes endolíticos.

La observación de los aislamientos al microscopio óptico no sólo reveló distintas morfologías, distribuciones y tamaños de célula, sino que también la presencia de polifosfatos.

Al estudiar la capacidad de los aislamientos de producir y liberar al medio sideróforos como mecanismo de adquisición de hierro, se observó que la mayoría no fue capaz de crecer en el medio CAS. Como consecuencia, no podemos determinar si este mecanismo está presente en nuestra colección.

La solubilización de fosfato y la oxidación de manganeso, parecerían no estar jugando un papel muy importante en la adaptación ni en la supervivencia de las bacterias endolíticas antárticas presentes en la colección.

El análisis del efecto de distintos metales en el crecimiento bacteriano reveló la presencia de cepas tolerantes a metales lo que apoya la hipótesis acerca de la relevancia de estos nichos para prospectar bacterias resistentes a metales y conocer su función en los ciclos biogeoquímicos.

## 7. PERSPECTIVAS

Debido al potencial observado que ofrecen los sustratos líticos antárticos, en cuanto a diversidad genética microbiana y a la prospección de bacterias resistentes a metales, sería muy interesante poder continuar estudiando este nicho. Para ello, de manera de complementar lo ya estudiado, podría plantearse utilizar una aproximación metagenómica. Ésta podría aportar más datos sobre diversidad microbiana endolítica antártica y a la vez permitir la comparación con otros ecosistemas endolíticos de otros lugares. Por otro lado, podría profundizarse a nivel molecular en los mecanismos asociados con las tolerancias a los distintos metales para las cepas que mostraron estas particularidades. El hecho de poder conocer más en profundidad parámetros sobre las rocas que habitan estos microorganismos aportaría más datos acerca de cómo es su vínculo. Por último, otro tema a seguir desarrollando sería el del rol que juegan los polifosfatos en bacterias endolíticas antárticas; ¿son las condiciones extremas presenten allí las que favorecen la acumulación de estos polímeros? ¿Qué tan significativo es su rol en la tolerancia a metales? Actualmente hay grupos de científicos buscando además encontrar la relación entre los polifosfatos y la biosíntesis de nanopartículas metálicas, lo que constituye otra gran área de interés a desarrollar.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Wierzchos, A. de los Ríos, and C. Ascaso, "Microorganisms in desert rocks: the edge of life on Earth," *Int. Microbiol.*, vol. 15, no. 4, pp. 173–83, Dec. 2012.
- [2] T. Horath and R. Bachofen, "Molecular characterization of an endolithic microbial community in dolomite rock in the central Alps (Switzerland).," *Microb. Ecol.*, vol. 58, no. 2, pp. 290–306, Aug. 2009.
- [3] S. Golubic, E. I. Friedmann, and J. Schneider, "The Lithobiotic Ecological Niche, with Special Reference to Microorganisms," *SEPM J. Sediment. Res.*, vol. 51, no. 2, pp. 475–478, Jun. 1981.
- [4] O. Guillitte, "Bioreceptivity: a new concept for building ecology studies," *Sci. Total Environ.*, vol. 167, no. 1–3, pp. 215–220, May 1995.
- [5] T. Warscheid and J. Braams, "Biodeterioration of stone: a review," *Int. Biodeterior. Biodegradation*, vol. 46, no. 4, pp. 343–368, Dec. 2000.
- [6] E. I. Friedmann, "Endolithic microbial life in hot and cold deserts.," *Orig. Life*, vol. 10, no. 3, pp. 223–35, Sep. 1980.
- [7] D. A. Cowan, "Cryptic microbial communities in Antarctic deserts.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 47, pp. 19749–50, Nov. 2009.
- [8] S. B. Pointing and J. Belnap, "Microbial colonization and controls in dryland systems.," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 10, no. 8, pp. 551–62, Aug. 2012.
- [9] C. C. Gaylarde, P. M. Gaylarde, and B. A. Neilan, "Endolithic phototrophs in built and natural stone.," *Curr. Microbiol.*, vol. 65, no. 2, pp. 183–8, Aug. 2012.
- [10] T. B. Norris and R. W. Castenholz, "Endolithic photosynthetic communities within ancient and recent travertine deposits in Yellowstone National Park.," *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 57, no. 3, pp. 470–83, Sep. 2006.
- [11] W. V. Sigler, R. Bachofen, and J. Zeyer, "Molecular characterization of endolithic cyanobacteria inhabiting exposed dolomite in central Switzerland.," *Environ. Microbiol.*, vol. 5, no. 7, pp. 618–27, Jul. 2003.
- [12] M. Roldán, C. Ascaso, and J. Wierzchos, "Fluorescent fingerprints of endolithic phototrophic cyanobacteria living within halite rocks in the Atacama Desert.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 80, no. 10, pp. 2998–3006, May 2014.
- [13] "DIVERSITY OF ENDOLITHIC PROKARYOTES LIVING IN STONE MONUMENTS." [Online]. Available: <http://connection.ebscohost.com/c/articles/91558255/diversity-endolithic-prokaryotes-living-stone-monuments>. [Accessed: 09-Mar-2016].
- [14] E. I. Friedmann and R. Ocampo, "Endolithic blue-green algae in the dry valleys: primary producers in the antarctic desert ecosystem.," *Science*, vol. 193, no. 4259, pp. 1247–9, Sep. 1976.

- [15] J. R. de la Torre, B. M. Goebel, E. I. Friedmann, and N. R. Pace, "Microbial diversity of cryptoendolithic communities from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, no. 7, pp. 3858–67, Jul. 2003.
- [16] B. Frey, S. R. Rieder, I. Brunner, M. Plötze, S. Koetzsch, A. Lapanje, H. Brandl, and G. Furrer, "Weathering-associated bacteria from the Damma glacier forefield: physiological capabilities and impact on granite dissolution.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, no. 14, pp. 4788–96, Jul. 2010.
- [17] S. Uroz, C. Calvaruso, M.-P. Turpault, and P. Frey-Klett, "Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms.," *Trends Microbiol.*, vol. 17, no. 8, pp. 378–87, Aug. 2009.
- [18] L. L. Barton and D. E. Northup, *Microbial Ecology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011.
- [19] H. Viles, "Ecological perspectives on rock surface weathering: Towards a conceptual model," *Geomorphology*, vol. 13, no. 1–4, pp. 21–35, Sep. 1995.
- [20] C. Ascaso, "Ecología microbiana de sustratos líticos." CSIC - Centro de Ciencias Medioambientales (CCMA), 2002.
- [21] J. J. Walker and N. R. Pace, "Endolithic microbial ecosystems.," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 61, pp. 331–47, Jan. 2007.
- [22] E. I. Friedmann and R. Ocampo-Friedmann, "Endolithic microorganisms in extreme dry environments: analysis of a lithobiontic microbial habitat.," pp. 177–185, Jan. 1984.
- [23] F. Piette, S. D'Amico, G. Mazzucchelli, A. Danchin, P. Leprince, and G. Feller, "Life in the cold: a proteomic study of cold-repressed proteins in the antarctic bacterium *pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, no. 11, pp. 3881–3, Jun. 2011.
- [24] J. Park, J. Kawamoto, N. Esaki, and T. Kurihara, "Identification of cold-inducible inner membrane proteins of the psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, by proteomic analysis.," *Extremophiles*, vol. 16, no. 2, pp. 227–36, Mar. 2012.
- [25] D. D. Wynn-Williams, "Antarctic microbial diversity: the basis of polar ecosystem processes," *Biodivers. Conserv.*, vol. 5, no. 11, pp. 1271–1293, Nov. 1996.
- [26] K. A. Hughes and B. Lawley, "A novel Antarctic microbial endolithic community within gypsum crusts.," *Environ. Microbiol.*, vol. 5, no. 7, pp. 555–65, Jul. 2003.
- [27] Y. Chan, J. D. Van Nostrand, J. Zhou, S. B. Pointing, and R. L. Farrell, "Functional ecology of an Antarctic Dry Valley.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 22, pp. 8990–5, May 2013.
- [28] G. M. Gadd, "Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation.," *Microbiology*, vol. 156, no. Pt 3, pp. 609–43, Mar. 2010.

- [29] D. H. Nies, "Microbial heavy-metal resistance.," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 51, no. 6, pp. 730–50, Jun. 1999.
- [30] O. Cunrath, V. A. Geoffroy, and I. J. Schalk, "Metallome of *Pseudomonas aeruginosa*: a role for siderophores.," *Environ. Microbiol.*, Jul. 2015.
- [31] M. Heldal, S. Norland, and O. Tumyr, "X-ray microanalytic method for measurement of dry matter and elemental content of individual bacteria.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 50, no. 5, pp. 1251–7, Nov. 1985.
- [32] C. E. Outten and T. V O'Halloran, "Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis.," *Science*, vol. 292, no. 5526, pp. 2488–92, Jun. 2001.
- [33] K. J. Waldron and N. J. Robinson, "How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal?," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 7, no. 1, pp. 25–35, Jan. 2009.
- [34] A. J. Guerra and D. P. Giedroc, "Metal site occupancy and allosteric switching in bacterial metal sensor proteins.," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 519, no. 2, pp. 210–22, Mar. 2012.
- [35] J. J. Braymer and D. P. Giedroc, "Recent developments in copper and zinc homeostasis in bacterial pathogens.," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 19, pp. 59–66, Apr. 2014.
- [36] D. P. C. Michael T. Madigan, John M. Martinko, David Stahl, *Brock Biology of Microorganisms*, 13th ed. Benjamin Cummings, 2010, p. 1152.
- [37] A. W. Foster, D. Osman, and N. J. Robinson, "Metal preferences and metallation.," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 41, pp. 28095–103, Oct. 2014.
- [38] J. ter Beek, A. Guskov, and D. J. Slotboom, "Structural diversity of ABC transporters.," *J. Gen. Physiol.*, vol. 143, no. 4, pp. 419–35, Apr. 2014.
- [39] J. D. Watson, *Biología molecular del gen*. Ed. Médica Panamericana, 2006, p. 776.
- [40] J. B. Neilands, "Microbial iron compounds.," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 50, pp. 715–31, Jan. 1981.
- [41] R. Saha, N. Saha, R. S. Donofrio, and L. L. Bestervelt, "Microbial siderophores: a mini review.," *J. Basic Microbiol.*, vol. 53, no. 4, pp. 303–17, Apr. 2013.
- [42] J. C. Renshaw, G. D. Robson, A. P. J. Trinci, M. G. Wiebe, F. R. Livens, D. Collison, and R. J. Taylor, "Fungal siderophores: structures, functions and applications," *Mycol. Res.*, vol. 106, no. 10, pp. 1123–1142, Oct. 2002.
- [43] H. Drechsel and G. Jung, "Peptide siderophores," *J. Pept. Sci.*, vol. 4, no. 3, pp. 147–181, May 1998.
- [44] I. J. Schalk, M. Hannauer, and A. Braud, "New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance.," *Environ. Microbiol.*, vol. 13, no. 11, pp. 2844–54, Nov. 2011.

- [45] G. A. Aguado-Santacruz, B. Moreno-Gómez, B. Jiménez-Francisco, E. García-Moya, and R. E. Preciado-Ortiz, "IMPACTO DE LOS SIDERÓFOROS MICROBIANOS Y FITOSIDERÓFOROS EN LA ASIMILACIÓN DE HIERRO POR LAS PLANTAS: UNA SÍNTESIS," *Rev. Fitotec. Mex.*, vol. 35, no. 1, pp. 9–21, 2012.
- [46] A. Górska, A. Sloderbach, and M. P. Marszał, "Siderophore-drug complexes: potential medicinal applications of the 'Trojan horse' strategy.," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 35, no. 9, pp. 442–9, Sep. 2014.
- [47] M. S. Khan, A. Zaidi, and J. Musarrat, Eds., *Phosphate Solubilizing Microorganisms*. Cham: Springer International Publishing, 2014.
- [48] E. Ahmed and S. J. M. Holmström, "Siderophores in environmental research: roles and applications.," *Microb. Biotechnol.*, vol. 7, no. 3, pp. 196–208, May 2014.
- [49] J. B. Neilands, "Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 45, pp. 26723–26726, Nov. 1995.
- [50] S. O'Brien, D. J. Hodgson, and A. Buckling, "Social evolution of toxic metal bioremediation in *Pseudomonas aeruginosa*," *Proc. Biol. Sci.*, vol. 281, no. 1787, p. 20140858–, Jul. 2014.
- [51] A. Braud, V. Geoffroy, F. Hoegy, G. L. A. Mislin, and I. J. Schalk, "Presence of the siderophores pyoverdine and pyochelin in the extracellular medium reduces toxic metal accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* and increases bacterial metal tolerance.," *Environ. Microbiol. Rep.*, vol. 2, no. 3, pp. 419–25, Jun. 2010.
- [52] B. M. Tebo, B. G. Clement, G. J. Dick, C. J. Hurst, R. L. Crawford, J. L. Garland, D. A. Lipson, A. L. Mills, and L. D. Stetzenbach, "Biotransformations of manganese.," no. Ed.3, pp. 1223–1238, 2007.
- [53] E. V. P. L. A. M. C. J. P. M. de V. E. W. de V. J. G. J. Brouwers, "Bacterial Mn<sup>2+</sup> Oxidizing Systems and Multicopper Oxidases: An Overview of Mechanisms and Functions," *Geomicrobiol. J.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–24, Mar. 2000.
- [54] M. T. La Duc, A. Dekas, S. Osman, C. Moissl, D. Newcombe, and K. Venkateswaran, "Isolation and characterization of bacteria capable of tolerating the extreme conditions of clean room environments.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 8, pp. 2600–11, Apr. 2007.
- [55] C. M. Hansel, C. A. Zeiner, C. M. Santelli, and S. M. Webb, "Mn(II) oxidation by an ascomycete fungus is linked to superoxide production during asexual reproduction.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 31, pp. 12621–5, Jul. 2012.
- [56] B. M. Tebo, H. A. Johnson, J. K. McCarthy, and A. S. Templeton, "Geomicrobiology of manganese(II) oxidation.," *Trends Microbiol.*, vol. 13, no. 9, pp. 421–8, Sep. 2005.
- [57] M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt, Eds., *The Prokaryotes*. New York, NY: Springer New York, 2006.

- [58] P. P. Sujith, B. S. Mourya, S. Krishnamurthi, R. M. Meena, and P. A. Loka Bharathi, "Mobilization of manganese by basalt associated Mn(II)-oxidizing bacteria from the Indian Ridge System.," *Chemosphere*, vol. 95, pp. 486–95, Jan. 2014.
- [59] M. J. Daly, E. K. Gaidamakova, V. Y. Matrosova, A. Vasilenko, M. Zhai, A. Venkateswaran, M. Hess, M. V. Omelchenko, H. M. Kostandarithes, K. S. Makarova, L. P. Wackett, J. K. Fredrickson, and D. Ghosal, "Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance.," *Science*, vol. 306, no. 5698, pp. 1025–8, Nov. 2004.
- [60] F. S. Archibald and I. Fridovich, "Manganese and defenses against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum*.," *J. Bacteriol.*, vol. 145, no. 1, pp. 442–51, Jan. 1981.
- [61] S. Banik and B. K. Dey, "Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing micro-organisms," *Plant Soil*, vol. 69, no. 3, pp. 353–364, Oct. 1982.
- [62] A. H. Goldstein, "Bacterial solubilization of mineral phosphates: Historical perspective and future prospects," *Am. J. Altern. Agric.*, vol. 1, no. 02, pp. 51–57, Mar. 1986.
- [63] S. B. Sharma, R. Z. Sayyed, M. H. Trivedi, and T. A. Gobi, "Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils.," *Springerplus*, vol. 2, no. 1, p. 587, Jan. 2013.
- [64] I. Mardad, A. Serrano, and A. Soukri, "Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a Moroccan mineral phosphate deposit." *Academic Journals*, 23-May-2014.
- [65] H. Hamdali, M. Hafidi, M. J. Virolle, and Y. Ouhdouch, "Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 24, no. 11, pp. 2565–2575, Jul. 2008.
- [66] H. Singh and M. S. Reddy, "Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils," *Eur. J. Soil Biol.*, vol. 47, no. 1, pp. 30–34, Jan. 2011.
- [67] B. K. Y. and A. Verma, *The Functioning of Ecosystems*. InTech, 2012.
- [68] W. G. Weisburg, S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane, "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study.," *J. Bacteriol.*, vol. 173, no. 2, pp. 697–703, Jan. 1991.
- [69] W.-M. Chen, C.-H. Wu, E. K. James, and J.-S. Chang, "Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulated *Mimosa pudica*.," *J. Hazard. Mater.*, vol. 151, no. 2–3, pp. 364–71, Mar. 2008.
- [70] B. Schwyn and J. B. Neilands, "Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores.," *Anal. Biochem.*, vol. 160, no. 1, pp. 47–56, Jan. 1987.

- [71] W. E. Krumbein and H. J. Altmann, "A new method for the detection and enumeration of manganese oxidizing and reducing microorganisms," *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, vol. 25, no. 2–3, pp. 347–356, Sep. 1973.
- [72] C. S. Nautiyal, "An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 170, no. 1, pp. 265–270, Jan. 1999.
- [73] R. Docampo and S. N. J. Moreno, "Acidocalcisomes.," *Cell Calcium*, vol. 50, no. 2, pp. 113–9, Aug. 2011.
- [74] "An improved DAPI staining procedure for visualization of polyphosphate granules in cyanobacterial and microalgal cells : Protocol Exchange." [Online]. Available: <http://www.nature.com/protocolexchange/protocols/4075>. [Accessed: 16-Mar-2016].
- [75] S. Günther, M. Trutnau, S. Kleinsteuber, G. Hause, T. Bley, I. Röske, H. Harms, and S. Müller, "Dynamics of polyphosphate-accumulating bacteria in wastewater treatment plant microbial communities detected via DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) and tetracycline labeling.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 7, pp. 2111–21, Apr. 2009.
- [76] R. Aschar-Sobbi, A. Y. Abramov, C. Diao, M. E. Kargacin, G. J. Kargacin, R. J. French, and E. Pavlov, "High sensitivity, quantitative measurements of polyphosphate using a new DAPI-based approach.," *J. Fluoresc.*, vol. 18, no. 5, pp. 859–66, Sep. 2008.
- [77] D. J. Reasoner and E. E. Geldreich, "A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 49, no. 1, pp. 1–7, Jan. 1985.
- [78] "Difco\* & BBL\* Manual | VWR." [Online]. Available: [https://us.vwr.com/store/catalog/product.jsp?catalog\\_number=BB220225](https://us.vwr.com/store/catalog/product.jsp?catalog_number=BB220225). [Accessed: 16-Mar-2016].
- [79] D. Cowan, Q. Meyer, W. Stafford, S. Muyanga, R. Cameron, and P. Wittwer, "Metagenomic gene discovery: past, present and future.," *Trends Biotechnol.*, vol. 23, no. 6, pp. 321–9, Jun. 2005.
- [80] S. C. Cary, I. R. McDonald, J. E. Barrett, and D. A. Cowan, "On the rocks: the microbiology of Antarctic Dry Valley soils.," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, no. 2, pp. 129–38, Feb. 2010.
- [81] J. J. Walker and N. R. Pace, "Phylogenetic composition of Rocky Mountain endolithic microbial ecosystems.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 11, pp. 3497–504, Jun. 2007.
- [82] G. E. Fox, J. D. Wisotzkey, and P. Jurtshuk, "How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity.," *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 42, no. 1, pp. 166–70, Jan. 1992.
- [83] E. STACKEBRANDT and B. M. GOEBEL, "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, no. 4, pp. 846–849, Oct. 1994.

- [84] *Patterns of Community Change of Archaeal and Bacterial Populations Colonizing Extreme Environments at Kilauea Volcano, Hawaii*. ProQuest, 2007, p. 215.
- [85] Y. Song, C. Liu, M. McTeague, and S. M. Finegold, "16S ribosomal DNA sequence-based analysis of clinically significant gram-positive anaerobic cocci.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 4, pp. 1363–9, Apr. 2003.
- [86] M. J. Seufferheld, H. M. Alvarez, and M. E. Farias, "Role of polyphosphates in microbial adaptation to extreme environments.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 19, pp. 5867–74, Oct. 2008.
- [87] R. Docampo, "The origin and evolution of the acidocalcisome and its interactions with other organelles.," *Mol. Biochem. Parasitol.*, Oct. 2015.
- [88] N. N. Rao, M. R. Gómez-García, and A. Kornberg, "Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival.," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 78, no. 1, pp. 605–47, Jan. 2009.
- [89] A. Kornberg, N. N. Rao, and D. Ault-Riché, "Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions.," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 68, pp. 89–125, Jan. 1999.
- [90] M. K. Chattopadhyay, G. Raghu, Y. V. R. K. Sharma, A. R. Biju, M. V. Rajasekharan, and S. Shivaji, "Increase in oxidative stress at low temperature in an antarctic bacterium.," *Curr. Microbiol.*, vol. 62, no. 2, pp. 544–6, Mar. 2011.
- [91] M. Dieser, M. Greenwood, and C. M. Foreman, "Carotenoid Pigmentation in Antarctic Heterotrophic Bacteria as a Strategy to Withstand Environmental Stresses," *Arctic, Antarct. Alp. Res.*, vol. 42, no. 4, pp. 396–405, Nov. 2010.
- [92] S. Jöhler, R. Stephan, I. Hartmann, K. A. Kuehner, and A. Lehner, "Genes involved in yellow pigmentation of *Cronobacter sakazakii* ES5 and influence of pigmentation on persistence and growth under environmental stress.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, no. 4, pp. 1053–61, Feb. 2010.
- [93] M. Mohammadi, L. Burbank, and M. C. Roper, "Biological role of pigment production for the bacterial phytopathogen *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78, no. 19, pp. 6859–65, Oct. 2012.
- [94] G. Y. Liu and V. Nizet, "Color me bad: microbial pigments as virulence factors," *Trends Microbiol.*, vol. 17, no. 9, pp. 406–413, Sep. 2009.
- [95] M. Ehling-Schulz, W. Bilger, and S. Scherer, "UV-B-induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*.," *J. Bacteriol.*, vol. 179, no. 6, pp. 1940–5, Mar. 1997.
- [96] Y. Tong and B. Lighthart, "Solar Radiation Is Shown to Select for Pigmented Bacteria in the Ambient Outdoor Atmosphere," *Photochem. Photobiol.*, vol. 65, no. 1, pp. 103–106, Jan. 1997.
- [97] E. I. Yilmaz, "Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EB1.," *Res. Microbiol.*, vol. 154, no. 6, pp. 409–15, Jan. .

- [98] G. M. Teitzel and M. R. Parsek, "Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, no. 4, pp. 2313–20, Apr. 2003.
- [99] A. M. Milagres, A. Machuca, and D. Napoleão, "Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay," *J. Microbiol. Methods*, vol. 37, no. 1, pp. 1–6, Jul. 1999.
- [100] D. Zul, S. Denzel, A. Kotz, and J. Overmann, "Effects of plant biomass, plant diversity, and water content on bacterial communities in soil lysimeters: implications for the determinants of bacterial diversity," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 21, pp. 6916–29, Nov. 2007.
- [101] M.-Y. Zhou, G.-L. Wang, D. Li, D.-L. Zhao, Q.-L. Qin, X.-L. Chen, B. Chen, B.-C. Zhou, X.-Y. Zhang, and Y.-Z. Zhang, "Diversity of both the cultivable protease-producing bacteria and bacterial extracellular proteases in the coastal sediments of King George Island, Antarctica," *PLoS One*, vol. 8, no. 11, p. e79668, Jan. 2013.
- [102] Y. M. Lee, S.-Y. Kim, J. Jung, E. H. Kim, K. H. Cho, F. Schinner, R. Margesin, S. G. Hong, and H. K. Lee, "Cultured bacterial diversity and human impact on alpine glacier cryoconite," *J. Microbiol.*, vol. 49, no. 3, pp. 355–62, Jun. 2011.
- [103] H. H. Kong, J. Oh, C. Deming, S. Conlan, E. A. Grice, M. A. Beatson, E. Nomicos, E. C. Polley, H. D. Komarow, P. R. Murray, M. L. Turner, and J. A. Segre, "Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis," *Genome Res.*, vol. 22, no. 5, pp. 850–9, May 2012.
- [104] C. L. Reardon, D. E. Cummings, L. M. Petzke, B. L. Kinsall, D. B. Watson, B. M. Peyton, and G. G. Geesey, "Composition and diversity of microbial communities recovered from surrogate minerals incubated in an acidic uranium-contaminated aquifer," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 10, pp. 6037–46, Oct. 2004.
- [105] P. V. Vardhan Reddy, S. S. Shiva Nageswara Rao, M. S. Pratibha, B. Sailaja, B. Kavya, R. R. Manorama, S. M. Singh, T. N. Radha Srinivas, and S. Shivaji, "Bacterial diversity and bioprospecting for cold-active enzymes from culturable bacteria associated with sediment from a melt water stream of Midtre Lovénbreen glacier, an Arctic glacier," *Res. Microbiol.*, vol. 160, no. 8, pp. 538–46, Oct. 2009.
- [106] T. Segawa, Y. Yoshimura, K. Watanabe, H. Kanda, and S. Kohshima, "Community structure of culturable bacteria on surface of Gulkana Glacier, Alaska," *Polar Sci.*, vol. 5, no. 1, pp. 41–51, Apr. 2011.
- [107] A. A. Hansen, R. A. Herbert, K. Mikkelsen, L. L. Jensen, T. Kristoffersen, J. M. Tiedje, B. A. Lomstein, and K. W. Finster, "Viability, diversity and composition of the bacterial community in a high Arctic permafrost soil from Spitsbergen, Northern Norway," *Environ. Microbiol.*, vol. 9, no. 11, pp. 2870–84, Nov. 2007.
- [108] M. Vařtilingom, E. Attard, N. Gaiani, M. Sancelme, L. Deguillaume, A. I. Flossmann, P. Amato, and A.-M. Delort, "Long-term features of cloud microbiology at the puy de Dôme (France)," *Atmos. Environ.*, vol. 56, pp. 88–100, Sep. 2012.

- [109] C. Larose, S. Berger, C. Ferrari, E. Navarro, A. Dommergue, D. Schneider, and T. M. Vogel, "Microbial sequences retrieved from environmental samples from seasonal arctic snow and meltwater from Svalbard, Norway.," *Extremophiles*, vol. 14, no. 2, pp. 205–12, Mar. 2010.
- [110] J. Foght, J. Aislabie, S. Turner, C. E. Brown, J. Ryburn, D. J. Saul, and W. Lawson, "Culturable bacteria in subglacial sediments and ice from two Southern Hemisphere glaciers.," *Microb. Ecol.*, vol. 47, no. 4, pp. 329–40, May 2004.
- [111] M. Ragon, M. C. Fontaine, D. Moreira, and P. López-García, "Different biogeographic patterns of prokaryotes and microbial eukaryotes in epilithic biofilms.," *Mol. Ecol.*, vol. 21, no. 15, pp. 3852–68, Aug. 2012.
- [112] F. J. Cervantes, A. R. Mancilla, E. E. Ríos-del Toro, A. G. Alpuche-Solís, and L. Montoya-Lorenzana, "Anaerobic degradation of benzene by enriched consortia with humic acids as terminal electron acceptors.," *J. Hazard. Mater.*, vol. 195, pp. 201–7, Nov. 2011.
- [113] A. Delétoile, D. Decré, S. Courant, V. Passet, J. Audo, P. Grimont, G. Arlet, and S. Brisse, "Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea* agglomerans strains by multilocus gene sequencing.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 47, no. 2, pp. 300–10, Feb. 2009.

## ANEXO I: Material de partida

### Tratamiento de las muestras

#### Muestra I3

Se colocó una porción de roca de unos 15 g aproximadamente en un frasco estéril y, tras el agregado de 15 mL de agua estéril, se vortexeó enérgicamente hasta que la roca se vio desintegrada.

#### Muestra P1

A partir de esta muestra se obtuvieron 3 fracciones de roca que fueron procesadas con distintos tratamientos:

**P1.1-** En primer lugar, 43 g de roca se lavaron con etanol (EtOH) 70% (v/v) durante 1 minuto. Se realizó un enjuague con H<sub>2</sub>O destilada estéril (H<sub>2</sub>O d.e.) y posteriormente se agregaron 15 mL de H<sub>2</sub>O d.e. para luego vortexear enérgicamente durante 10 minutos.

**P1.2-** 20 g de roca se lavaron con EtOH 70% (v/v) durante 10 minutos, se lavaron con H<sub>2</sub>O d.e. y finalmente se agregaron 10 mL de H<sub>2</sub>O d.e. y se vortexeó enérgicamente 10 minutos. El material resultante fue pulverizado en condiciones de esterilidad mediante la utilización de un mortero de vidrio para ser luego filtrado con una gasa. La esterilización del mortero se llevó a cabo lavándolo en principio con NaClO 2% (p/v), luego con EtOH 70% (v/v) 20 minutos y posteriormente flambeado con mechero y EtOH 90% (v/v).

**P1.3-** Se enjuagaron con EtOH 70% (v/v) 38 g de roca la cual fue luego sumergida durante 1 hora en una mezcla de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% NaClO 2,5% HgCl<sub>2</sub> 0,25%. Se realizaron después 7 enjuagues con H<sub>2</sub>O d.e. y finalmente se agregaron 10 mL más de H<sub>2</sub>O d.e. para luego vortexear 10 minutos.

#### Muestra P2

Se tomaron 3 porciones de roca las que fueron sometidas a diversos tratamientos.

**P2.1-** 6 g de roca se lavaron con EtOH 70% aproximadamente 1 minuto. Se realizó un enjuague H<sub>2</sub>O e.d y posteriormente se agregaron 5 mL de H<sub>2</sub>O d.e. para luego vortexear durante 20 minutos.

**P2.2-** 4 g de roca se lavaron con EtOH 70% durante 10 minutos y se enjuagaron con H<sub>2</sub>O d.e. Posteriormente, se agregaron 5mL de H<sub>2</sub>O d.e. y se vortexeó 10 minutos. El material resultante fue pulverizado en condiciones de esterilidad, mediante la utilización de un mortero de vidrio para ser luego filtrado con una gasa.

**P2.3-** Se enjuagaron con EtOH 70%, 4 g de roca que fueron luego sumergidos durante 1 hora en una mezcla de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, NaClO 2,5%,HgCl<sub>2</sub> 0,25%. Se realizaron después 7 enjuagues con H<sub>2</sub>O d.e. y finalmente se agregaron 5 mL más de H<sub>2</sub>O e.d para luego vortexear 10 minutos. Se pulverizó lo más posible la roca con un mortero de acero inoxidable (lavado con anterioridad con EtOH 70% 20 minutos y flambeado luego con mechero).

### **Muestra P3**

**P3.1-** 7 g de roca se lavaron con EtOH 70% 10 minutos. Se hicieron 3 enjuagues con H<sub>2</sub>O d.e. y se agregaron 5mL más de H<sub>2</sub>O d.e. y se vortexeó 10 minutos. Se pulverizó lo más posible con mortero de vidrio y luego se filtró la suspensión resultante con gasa. En este caso (y para el resto de los tratamientos de las muestras provenientes de P3), se esterilizó el mechero de vidrio realizando primero un lavado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% 10 minutos, luego otro con NaClO 2,5% rápidamente y posteriormente se realizaron 5 enjuagues con EtOH debido a que no quedaba más agua destilada estéril. Por último se flambeó con mechero y EtOH.

**P3.2-** 9 g de roca se lavaron con EtOH 70% 20 minutos. Se hicieron 3 enjuagues con H<sub>2</sub>O d.e., se agregaron 5 ml de H<sub>2</sub>O d.e. y se vortexeó 10 minutos. Se pulverizó la roca con mortero de vidrio.

**P3.3-** Se enjuagaron con EtOH 70% durante 10 minutos 7 g de roca que fueron luego sumergidos durante 20 minutos en una mezcla de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, NaClO 2,5%, HgCl<sub>2</sub> 0,25%. Se realizaron 7 enjuagues con H<sub>2</sub>O d.e. y se agregaron 5mL más de H<sub>2</sub>O d.e. y se vortexeó 10 minutos. Se pulverizó lo más posible la roca con un mortero de vidrio.

### **Muestra P4**

**P4.1-** Se rasparon, mediante la utilización de una cuchara estéril, pequeñas lasquitas de roca recubiertas con líquenes verdes (aproximadamente 1 g). Luego fueron lavadas con EtOH 70% 10 minutos. Se realizaron 3 enjuagues con H<sub>2</sub>O d.e. y se agregaron 5mL de H<sub>2</sub>O d.e. para posteriormente vortexear durante 10 minutos.

### **Aislamiento de bacterias cultivables y generación de la colección**

Cabe destacar que los distintos tratamientos a los que fueron sometidas las rocas de las diferentes muestras se realizaron de manera de realizar cierta “esterilización de superficie” y de esa forma obtener más concretamente las bacterias endolíticas y ya no tanto las que se encuentran en la superficie más externa de la roca (epilíticas).

De la suspensión resultante de I3 se realizaron las diluciones 0 (sin diluir), -1 (1/10) y -2 (1/100), y fueron plaquedas alícuotas de 100 µL de cada dilución en medio R2A y en MM, dejándose incubar durante 20 días a 4 °C y a 25 °C. Tras la incubación de los distintos medios a las dos temperaturas seleccionadas, se obtuvieron más de 100 colonias de las cuales se eligieron 14 colonias provenientes de placas de MM y 20 provenientes de medio R2A. Los criterios utilizados para la selección fueron según las distintas características fenotípicas que presentaban las colonias, como ser color, tamaño, borde, brillo, elevación de manera de abarcar en lo posible la diversidad existente pero a la vez obteniendo un número manejable de aislamientos para los posteriores análisis.

En cuanto a las muestras P, en todos los casos el volumen plaqueado fue 100 µL de dilución -1. La incubación fue de 11 días a una temperatura de entre 4 °C y 10 °C (temperatura ambiente del laboratorio de la BCAA) y la selección de las colonias consideró los mismos criterios que los utilizados con I3. Los cultivos se transportaron a Montevideo a aproximadamente 10 °C. Los aislamientos seleccionados de las distintas muestras P se reaislaron en medio R2A.

En la Tabla 1 se muestra la cantidad de unidades formadoras de colonia (U.F.C.) por gramo de muestra y el número de colonias seleccionadas proveniente de cada muestra/tratamiento.

**Tabla 1.** U.F.C. obtenidas y calculadas por cada muestra/tratamiento.

<b>Muestra/ tratamiento</b>	<b>UFC obtenidas (UFC dil 1/10)</b>	<b>UFC calculadas (UFC/g muestra)</b>	<b>Nº UFC seleccionadas seleccionadas</b>
P1-1	111	645	16
P1-2	13	216	4
P1-3	7	184	1
P2-3	52	6500	7
P3-1	7	250	2
P4-1	2	1000	2
I3	81	1620	34

Para el mantenimiento de la colección se crecieron los distintos aislamientos en tubos de vidrio estériles con 5 mL de medio R2A líquido bajo agitación a 4 °C y se incubaron hasta observar turbidez indicativa del crecimiento bacteriano. Se colocaron 500 µL de cada cultivo en tubos eppendorf con el mismo volumen de glicerol 50% (v/v) para ser luego almacenados en freezer a -80 °C.

## ANEXO II: Medios de cultivo

**Tabla 2.** Composición del medio R2A sólido.

R2A sólido	
Componente	Cantidad por litro
Extracto de levadura	0,5 g
Proteasa peptona N°3	0,5 g
Casaminoácidos	0,5 g
Glucosa	0,5 g
Almidón soluble	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 g
Piruvato de sodio	0,3 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,05 g
Agar	15 g
Agua destilada c.s.p.	1L

**Tabla 3.** Composición del medio R2A líquido.

R2A líquido	
Componente	Cantidad por litro
Extracto de levadura	0,5 g
Proteasa peptona N°3	0,5 g
Casaminoácidos	0,5 g
Glucosa	0,5 g
Almidón soluble	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 g
Piruvato de sodio	0,3 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,05 g
Agua destilada c.s.p.	1L

Ajustar a pH 7,2

**Tabla 4.** Composición de los medios sólidos para metales.

<b>Medios sólidos para metales</b>			
Compuesto	Concentración stock (M)	Concentración final	Volumen por placa ( $\mu\text{L}$ )
$\text{NiCl}_2$	0,1	500 $\mu\text{M}$	100
		1mM	200
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,1	200 $\mu\text{M}$	40
		500 $\mu\text{M}$	100
		1mM	200
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,1	500 $\mu\text{M}$	100
		1mM	200
		5mM	1000
$\text{CuSO}_4$	0,1	500 $\mu\text{M}$	100
		1mM	200
$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cd}$	0,1	10 $\mu\text{M}$	20
		100 $\mu\text{M}$	200
$\text{ZnSO}_4$	0,1	500 $\mu\text{M}$	100
		1mM	200
		5mM	1000
$\text{FeCl}_3$	1	500 $\mu\text{M}$	10
		1mM	20
		5mM	100
R2A sólido	-	-	c.s.p. 20mL

**Tabla 5.** Composición de los medios líquidos para metales.

<b>Medios líquidos para metales</b>			
Compuesto	Concentración stock (M)	Concentración final	Volumen por pocillo ( $\mu\text{L}$ )
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,1	1mM	10
		5mM	50
		10mM	100
$\text{CuSO}_4$	0,1	500 $\mu\text{M}$	5
		1mM	10
$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cd}$	0,1	10 $\mu\text{M}$	0,1
		100 $\mu\text{M}$	1
$\text{ZnSO}_4$	0,1	1mM	10
		5mM	50
		10mM	100
$\text{FeCl}_3$	1	1mM	1
R2A líquido	-	-	c.s.p. 1mL

**Tabla 5. Composición del medio CAS sólido.** Luego de autoclavar, la solución base, salina y HDTMA se mezclan. La solución salina se agrega a la solución base. A la solución colorante se le agrega el cloruro férrico con HDTMA. Finalmente, esta última se une a la solución base. La solución colorante se mezcla con 250  $\mu$ L de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (135 mg/50mL, HCl 0,01N). Bajo agitación se agrega una solución de 18,22 mg de HDTMA en 10 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ .

CAS	
Componente	Cantidad por 250 ml
<i>Medio base</i>	
Solución salina*	25 mL
Pipes	7,56 g
Extracto de levadura desferrado 5% (p/v)	5 mL
$\text{MgCl}_2$ 1M	0,25 mL
$\text{CaCl}_2$ 0,1M	0,25 mL
$\text{H}_2\text{O}$	187 mL
Agar	3,75 g
Llevar a pH = 6,8 con NaOH 50 %	
Autoclavar	
<i>*Solución salina</i>	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,3g
NaCl	0,5g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1,0g
$\text{H}_2\text{O}$	c.s.p. 100 mL
<i>Solución colorante</i>	
CAS	15,12mg
$\text{H}_2\text{O}$	15,5mL
$\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 135mg/50mL HCl 0,01N	250 $\mu$ L
<i>Solución HDTMA</i>	
HDTMA	18,22 mg
$\text{H}_2\text{O}$	10 mL

**Tabla 6.** Composición del medio NBRIP sólido. \*Suplementado con Cicloheximida 100 $\mu$ g/mL para evitar el crecimiento de hongos.

Medio NBRIP sólido	
Componente	Cantidad por litro
Glucosa	10 g
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	5 g
$\text{MgCl}_2$	2,34 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
KCl	0,2 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1 g
Agar	16 g

## ANEXO III: PCR

**Tabla 7.** Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados.

Nombre	Secuencia
Eub27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
Eub1492R	5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

**Tabla 8.** Componentes del mix 5X utilizado para la reacción de PCR.

PCR mix 5X	
Componente	Cantidad
Agua bidestilada	205 µL
Buffer DreamTaq 10X*	25 µL
dNTPs	10 µL
Cebador Eub27F (10µM)	5 µL
Cebador Eub1492R (10µM)	5 µL
DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µL)	10 µL

\*Incluye 20 mM MgCl<sub>2</sub>

**Tabla 9.** Programa de PCR utilizado en la amplificación del ADNr 16S.

Programa de PCR para amplificación de ADNr 16S		
Temperatura	Tiempo	Repetición del ciclo
95 °C	20 min.	-
Apertura para agregado de Taq pol		
95 °C	5 min.	
95 °C	30 seg.	30 veces
59 °C	30 seg.	
72 °C	1 min. 30 seg.	
72 °C	7 min.	-