

## ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y LOCALIZACIÓN DE LAS ESPECIES BACTERIANAS QUE COHABITAN CON LA CIANOBACTERIA *Arthrospira* sp. UTILIZANDO MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

L. Sena D'Anna <sup>a,\*</sup>, A. De Sisto <sup>a</sup>, Z. Duque <sup>b</sup>, D. Rojas <sup>a</sup>, L. Naranjo <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Área de Energía y Ambiente. Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Caracas, Venezuela.

<sup>b</sup> Unidad de Investigación y Desarrollo Biodeterioro Industrial. Fundación Instituto Zuliano de Investigaciones Tecnológicas (INZIT), Maracaibo, Venezuela.

\*Autor Correspondencia, E-mail [lsena@idea.gob.ve](mailto:lsena@idea.gob.ve), phone: +58 212 9035092, Fax: +58 212 9035090

Recibido: Octubre 2012. Aprobado: Abril 2013.

Publicado: Abril 2013.

### RESUMEN

*Arthrospira* sp es una cianobacteria filamentosa de interés biotecnológico por su alto contenido proteico y sus elementos bioactivos. La difícil remoción de las bacterias que cohabitan con *Arthrospira* sp. durante la obtención de sus cultivos axénicos, permite suponer que dichas bacterias se encuentran adosadas o adheridas a los tricomas de *Arthrospira* sp., y el posterior detrimento de dichos cultivos indican la importancia que tienen estas bacterias para la subsistencia de *Arthrospira* sp. En el presente trabajo se analiza la morfología y localización de las bacterias que cohabitan con *Arthrospira* sp. utilizando Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y se aíslan e identifican las cultivables mediante secuenciación del gen 16S del ARNr. Se estudiaron mediante MEB las bacterias aisladas y muestras de un cultivo de *Arthrospira* sp previamente lavado por filtración y tratado con KOH a pH 12 durante 72 horas, para asegurar únicamente la presencia de bacterias cohabitantes. Las observaciones del cultivo se llevaron a cabo en dos tiempos distintos: una semana y dos meses después del tratamiento de pH). Las bacterias cultivables presentaron dos morfologías: bacilos y cocos, las cuales correspondieron con las identificaciones genéticas realizadas: *Bacillus* sp. AP1, *Halomonas desiderata*, *Indibacter alkaliphilus*, *Rhodobaca bogoriensis* y *Bacillus akibai*. Las observaciones del cultivo permitieron detectar la presencia de una morfología distinta: ovoidal pedunculada correspondiente a una bacteria no cultivable y se demuestra que, en efecto, las bacterias que cohabitan con *Arthrospira* sp se encuentran adosadas a la superficie de los filamentos y embebidas en la cubierta mucilaginosa que esta cianobacteria segrega.

**Palabras claves:** *Arthrospira*, bacterias, Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), cubierta mucilaginosa.

### MORPHOLOGICAL ANALYSIS AND LOCALIZATION OF BACTERIAL SPECIES THAT COHABIT WITH *Arthrospira* sp. USING SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

#### ABSTRACT

*Arthrospira* sp is a filamentous cyanobacterium that has biotechnological importance due to its high protein content and bioactive elements used in the industry. The difficult elimination of bacteria that cohabit with *Arthrospira* sp. indicates that they could be attached to the surface of the filaments or embedded in the mucilaginous cover of *Arthrospira* sp., and deterioration of axenic cultures of *Arthrospira* sp. could imply that these cohabitant bacteria are important for *Arthrospira* sp. subsistence. In this paper, we use Scanning Electron Microscopy (SEM) to determine the morphology and location of cohabitant bacteria with *Arthrospira* sp. Lefevre 1963/M-132-1 strain. Cultivable bacteria were obtained from *Arthrospira* sp. cultures previously washed by filtration (AO sterile culture medium), treated at pH 12 for 72 hours (physic-chemical treatment), and observed (sampled) at two different times: one week after the physic-chemical treatment, and two months after the physic-chemical treatment. The micrographs evidenced that the morphologies of five (5) cultivable isolated bacteria match with the morphology of their molecular identification: *Bacillus* sp. AP1 (rod-shaped), *Halomonas desiderata* (rod-shaped), *Indibacter alkaliphilus* (rod-shaped), *Rhodobaca bogoriensis* (spherical) and *Bacillus akibai* (rod-shaped). The SEM of *Arthrospira* sp. culture gave the following results: in T1 we observed in the culture a pedunculated ovoid bacterial morphology that does not match any of the cultivable bacteria, implying that it is an uncultivable bacterium. The *Arthrospira* sp. culture observed in T2 effectively showed that the cohabitant bacteria get attached to the surface of the filaments or embedded in the mucilaginous cover of the cyanobacterium.

**Keywords:** *Arthrospira*, bacteria, Scanning Electron Microscopy, mucilaginous cover

## INTRODUCCIÓN

*Arthrospira* sp. es una cianobacteria filamentososa de interés biotecnológico debido a su alto contenido proteico y sus elementos bioactivos, considerados bioproductos, tales como clorofila, carotenoides, vitaminas, minerales, enzimas y pigmentos únicos (ficocianina y ficoeritrina), los cuales son empleados por la industria alimentaria, agraria, farmacéutica y cosmética [1,2].

Para asegurar porcentajes bajos de contaminación durante los procesos de escalamiento en cultivos masivos de microalgas, es importante partir de cultivos axénicos [3,4]. Sin embargo, la difícil remoción de las bacterias que cohabitan con *Arthrospira* sp. dificultan la obtención de cultivos axénicos, esto se debe posiblemente a que estas bacterias se encuentran adosadas a los tricomas (filamentos) o se encuentran embebidas en la cubierta mucilaginosa que segrega esta cianobacteria, como se sugiere en Sena y colaboradores [4]. En nuestro laboratorio hemos obtenido en reiteradas ocasiones cultivos axénicos de *Arthrospira* sp, sin embargo, estos cultivos tienden a degenerar con el tiempo, lo cual nos indica la importancia que tienen estas bacterias en la subsistencia de *Arthrospira* sp. Pero, ¿Cuáles son dichas bacterias?, ¿En qué proporciones cohabitan? y ¿Dónde se encuentran localizadas en relación a la cianobacteria? Estas preguntas forman parte de los objetivos de este trabajo, los cuales se resumen a continuación: (i) utilizar la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) a bajo vacío para conocer la morfología y localización de las bacterias que cohabitan con *Arthrospira* sp. cepa Lefevre 1963/M-132-1 y (ii) aislar e identificar las bacterias cultivables mediante la amplificación y secuenciación del gen 16S del ARNr. Si bien, existen dos trabajos en los cuales se han reportado las bacterias cultivables presentes en cultivos de *Arthrospira* [5] y [6], en ninguno se ha determinado la morfología, proporción y locación de estas bacterias en relación a la cianobacteria.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### CONDICIONES DE CULTIVO DE LA CEPA *Arthrospira* sp. CEPA LEFEVRE 1963/M-132-1 Y TRATAMIENTO FÍSICOQUÍMICO

*Arthrospira* sp. cepa Lefevre 1963/M-132-1 se obtuvo de la colección de cultivos “Culture Collection of Phototrophic Organisms (CCALA)” de la República Checa. La cepa se cultivó bajo luz fluorescente continua a 1.200 lux (luxímetro x-101, marca Lutron, Taiwan) en medio de cultivo AO (Aiba y Ogawa) [7] a 32 °C y 150 rev/min (incubadora con agitación 311DS Labnet, USA.).

Un volumen de 20 mL del cultivo fue lavado por filtración con medio AO estéril para remover todas las bacterias en suspensión y fue sometido a pH 12 durante 72 horas como se indica en Sena y colaboradores [4].

### CUANTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE LAS BACTERIAS CULTIVABLES ASOCIADAS A LA CIANOBACTERIA *Arthrospira* sp.

Un volumen de 100µL del cultivo previamente tratado, fue sembrado por extensión en placas de medio AO sólido suplementado con glucosa 1%, peptona al 0,5% y extracto de levadura al 0,3%. Las placas fueron incubadas a 32 °C durante 48 horas. Una vez observado el crecimiento bacteriano, las colonias se clasificaron en base a distintos morfotipos (color, textura, borde y tamaño de la colonia). Luego se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) para cada morfotipo y finalmente fueron aislados mediante la técnica de agotamiento por estría y se realizó la tinción de Gram.

### IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS BACTERIAS CULTIVABLES

Las cepas bacterianas aisladas fueron inoculadas en matraces de 500 ml de capacidad con 100 ml de medio AO líquido suplementado e incubadas a 32 °C y 150 rpm toda la noche. Posteriormente, las células fueron recuperadas por centrifugación a 12.000 rpm durante 30s,

y el ADN genómico de cada una de las cepas bacterianas fue aislado con el protocolo previamente descrito por [8]. La identificación molecular de las cepas bacterianas se realizó mediante la amplificación por PCR de un fragmento de ADN de 900 pb interno del 16S del ARNr [9], y se utilizaron los oligonucleótidos universales U1 (5'-CCAGCAGCCGCGTAATACG 3') y U2 (5'-ATCGG(C/T)TACCTGTTACGACTTC-3') [10]. Las reacciones de PCR consistieron en un paso previo de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos de amplificación constituidos por los siguientes pasos: I) desnaturalización a 95°C durante 30 s., II) hibridación a 60°C durante 30 s., III) extensión a 72°C durante 20 s., y VI) extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR fueron purificados con el kit AccuPrepR Purification System (Bionner.; Korea) y secuenciados mediante los oligonucleótidos U1 y U2, el kit de ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, USA) y un secuenciador de ADN ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems; USA). Las secuencias de ADN fueron editadas, ensambladas y analizadas con los programas ChromasPRO Version 1.49 (<http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html>) y Lasergene software package DNASTAR Programs (DNASTAR, Inc., UK) y comparadas con la base de datos Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>), mediante BLASTN [11] y FASTA [12].

#### ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LAS BACTERIAS CULTIVABLES Y OBSERVACIÓN DEL CULTIVO DE *Arthrospira* sp.

El análisis morfológico de las cepas bacterianas aisladas y observación de la cianobacteria se realizaron utilizando MEB en modo de bajo vacío (90-130 Pa), en un FE Quanta 200, por lo que no se requirió preparación previa de las muestras, preservándose intactas durante la evaluación.

El cultivo de *Arthrospira* sp. fue observado por MEB en dos tiempos distintos: T<sub>1</sub> (una semana después del tratamiento fisicoquímico) y T<sub>2</sub> (dos meses después del tratamiento fisicoquímico). Las observaciones se realizan en dos tiempos distintos debido a que el tratamiento fisicoquímico es agresivo remueve incluso gran parte de las poblaciones de las bacterias que cohabitan con la cianobacteria, en consecuencia en el tiempo T<sub>1</sub> se espera ver mejor los filamentos de las cianobacteria, el mucilago que segrega y pocas agrupaciones bacterianas aisladas y distanciadas entre sí sobre los filamentos. La segunda observación se lleva a cabo dos meses después para dar oportunidad a que las poblaciones bacterianas alcancen las proporciones de equilibrio en el cultivo, y así, poder observar mejor la localización de ellas en relación a la cianobacteria.

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tratamiento fisicoquímico aplicado al cultivo de *Arthrospira* sp. permitió remover bacterias y otros contaminantes presentes en el sobrenadante, permaneciendo solo aquellas bacterias que cohabitan con la cianobacteria. Los resultados de la siembra del cultivo por extensión permitieron visualizar siete morfotipos de colonias bacterianas distintas, las cuales denominamos morfotipo IAP, IIAP, IIIAP, IVAP, VAP, VIAP y VIIAP como se describen en la tabla 1.

Cada uno de los morfotipos fue aislado e identificado molecularmente. Los resultados de la identificación molecular se muestran en la Tabla 2, donde se aprecia que tres de los morfotipos (IVAP, VAP, VIIIAP) pertenecen a la misma especie bacteriana, lo que implica que sólo cinco especies bacterianas cultivables cohabitan con *Arthrospira* sp.

Al igual que *Arthrospira* sp, las cinco especies bacterianas cultivables identificadas son alcalófilas, de las cuales tres de ellas, *Bacillus* sp API, *Rhodobaca*

*bogoriensis* y *Halomonas desiderata*, fueron aisladas por primera vez de lagos de soda y lagos carbonatados del Gran Valle del Rift al este de África, es decir, tienen procedencia similar a la de *Arthrospira* sp. cepa Lefevre 1963/M-132-1 (colectada en el Lago Natron, Chad). Por otra parte, también se ha reportado la presencia de las bacterias como *Halomonas desiderata* e *Indibacter alkaliphilus* en cultivos de *Arthrospira* [5] y [6].

**Tabla 1.** Características y tinción Gram de los siete morfotipos de coloniales aisladas del cultivo de *Arthrospira* sp.

Morfotipos coloniales	Características de las colonias	Tinción Gram
IAP	Pequeña, circular, borde liso, elevación convexa, color amarillo oscuro	Gram +
IIAP	Pequeña, circular, borde liso, elevación convexa, color crema-beige	Gram -
IIIAP	Pequeña, circular, borde liso, elevación convexa, color anaranjado translúcido	Ambigua
IVAP	Pequeña, circular, borde liso, elevación convexa, color rosado palido	Gram -
VAP	Grandes, circular, borde liso, elevación convexa, rosadas pálidas	Gram -
VIAP	Pequeña, circular, borde liso, elevación convexa, color amarillo claro	Gram +
VIIAP	Pequeña, circular, borde liso, elevación convexa, color rosado	Gram -

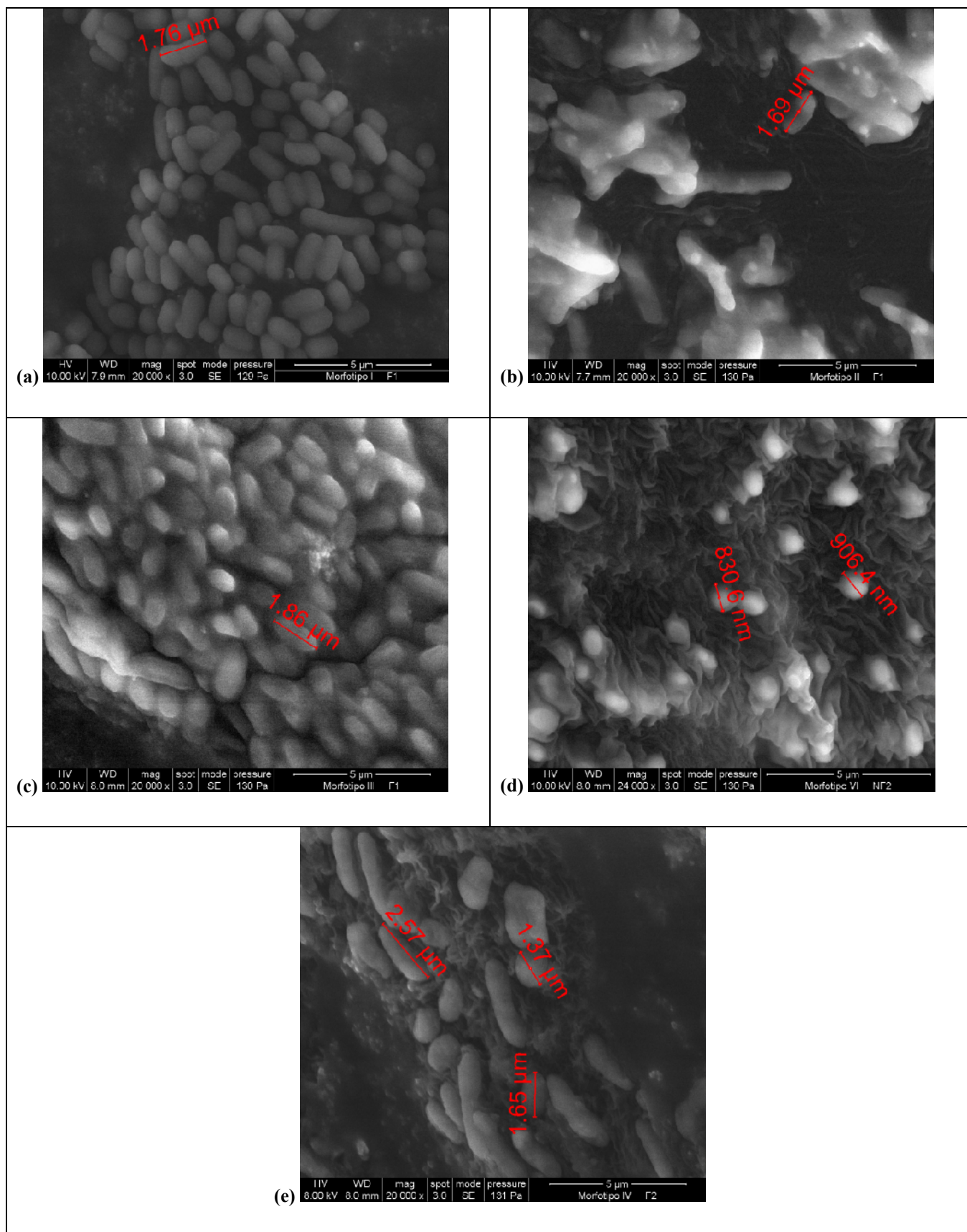
En la Figura 1 se muestran las micrografías obtenidas de las cinco bacterias cultivables aisladas que cohabitan con *Arthrospira* sp. En las Figuras 1a, 1b, 1c y 1e se muestran las micrografías de las bacterias *Bacillus* sp. AP1, *Halomonas desiderata*, *Indibacter alkaliphilus* y *Bacillus akibai* AP2 respectivamente, las cuales presentan una morfología de tipo bacilar. De estas, *Bacillus akibai* sp. AP2 presentó una mayor diferencia en la longitud de los bacilos (ver Tabla 3), algunos largos

(tamaños esperados) y otros muy cortos, es decir se observó polimorfismo. Sin embargo, esta especie no ha sido reportada como un bacilo polimorfo.

**Tabla 2.** Identificación molecular de cepas bacterianas asociadas a la microalga *Arthrospira* sp.

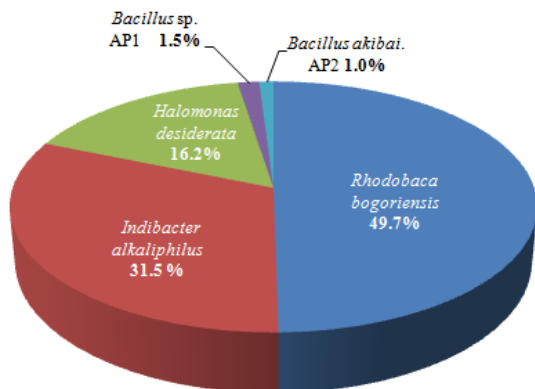
Identificación molecular (morfotipos)	% Identidad	Número de acceso GenBank	Características morfológicas reportadas y procedencia.
<i>Bacillus</i> sp. AP1 (IAP)	99	FJ798608	Bacteria alcalófila, bacilar, Gram+, formador de esporas, móvil, flagelado, aeróbico obligado y con una tasa de crecimiento óptimo a pH 9,5 y temperatura de 35 °C. Aislada de lagos de soda, Tanzania (este de África) [13 y 14].
<i>Halomonas desiderata</i> (IIAP)	99	FJ798609	Bacteria alcalófila, bacilar, Gram -, halotolerante y desnitrificante. Aislada del Lago de Bogoria (Kenya, este de África) [15].
<i>Indibacter alkaliphilus</i> (IIIAP)	97	FJ798610	Bacteria alcalófila, bacilar, Gram -, no móvil, con un tamaño de 2.0-3.0 µm de largo y 0.5-0.7 µm ancho. Aislada del Lago Lonar (India) [16].
<i>Rhodobaca bogoriensis</i> (IVAP, VAP, VIIIAP)	99	FJ798607	Bacteria púrpura no sulfúrea, fototrófica anoxigénica, alcalófila, cocoide pleomorfo (cocos y bacilos cortos), de tamaños 0.8–1 µm 0.8–1.5 µm, Gram -, móviles. Aislada de lagos de Soda del Valle de Rift, (Kenya, este de África) [17].
<i>Bacillus akibai</i> . AP2 (VIAP)	98	FJ798611	Bacteria alcalófila, bacilares, Gram +, con flagelos peritricosos, de tamaños de 3·0–4·0 µm de largo and 0·6–0·8 µm de ancho, producen esporas. Aislada de muestras de suelo (Japón) [18] y [19].

La Figura 1d corresponde a *Rhodobaca bogoriensis* la cual presentó morfología cocoide con diámetros que varían entre 0,3 -1,0 µm y además no se observó la presencia de bacilos cortos a pesar que ha sido reportada como una especie pleomorfa [17].



**Fig. 1.** Micrográficas por MEB donde se muestra las distintas morfologías de las cinco especies bacterianas aisladas y molecularmente identificadas, que están asociadas a *Arthrospira* sp, (a) *Bacillus* sp. AP1 (bacilo); (b) *Halomonas desiderata* (bacilo); (c) *Indibacter alkaliphilus* (bacilo), (d) *Rhodobaca bogoriensis* (coco) y (e) *Bacillus akibai* AP2 (bacilo).

Finalmente, en las micrografías de la Figura 1, se observa claramente que las bacterias *Halomonas desiderata*, *Indibacter alkaliphilus* y *Rhodobaca bogoriensis* presentan glicocáliz, es decir, biopelículas de polisacáridos y glicopéptidos que por lo general median la adherencia, protegen a la bacterias del ataque de sustancias antibacterianas, dificultan que estas sean fagocitadas por protozoarios y fungen de reserva de carbohidratos [20]. Esta biopelícula posiblemente les confiere a estas bacterias una mayor adherencia a los filamentos de la cianobacteria, lo cual permite explicar el hecho de que ellas se encuentran en mayor proporción en el cultivo de *Arthrospira* sp. Esto se evidencia en la Figura 2, donde *Rhodobaca bogoriensis* se encuentra en mayor proporción (50%), seguida por *Indibacter alkaliphilus* (31,5%) y *Halomonas desiderata* (16,2%), mientras que los géneros *Bacillus akibai* y *Bacillus* sp se encontraron en menor proporción (1 y 1,5%, respectivamente).



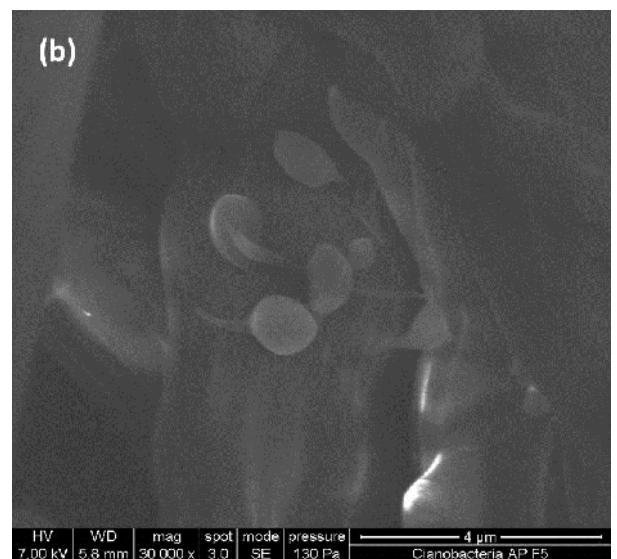
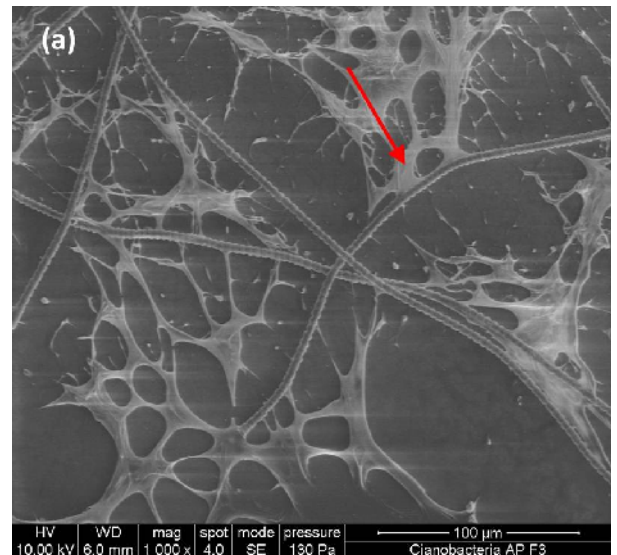
**Fig. 2.** Proporción de las bacterias cultivables aisladas presentes en el cultivo no axénico de *Arthrospira* sp. después del tratamiento fisicoquímico.

En la Figura 3a se puede observar que los filamentos o tricomas de la especie *Arthrospira* sp. cepa Lefevre 1963/M-132-1 empleada en este estudio perdieron su morfología helicoidal usual, presentando una forma lineal. Este fenómeno suele ocurrir cuando los cultivos de este género son mantenidos en condiciones de

**Tabla 3.** Dimensiones de las cepas bacterianas asociadas a *Arthrospira* sp. caracterizadas por MEB.

Cepas bacterianas	Largo (µm)	Ancho (µm)
<i>Bacillus</i> sp. AP1	1,5 - 2,5	0,7 - 1,0
<i>Halomonas desiderata</i>	1,5 - 2,0	0,6 - 0,9
<i>Indibacter alkaliphilus</i>	1,6 - 3,0	0,5 - 0,9
<i>Rhodobaca bogoriensis</i> *	0,3 - 1,0 de diámetro	
<i>Bacillus akibai</i> AP2	1,2 - 4,0	0,8 - 0,95
Bacteria no cultivable**	1,0 - 1,2	0,7 - 0,9

Morfología \*esférica y \*\*ovoide pedunculada.



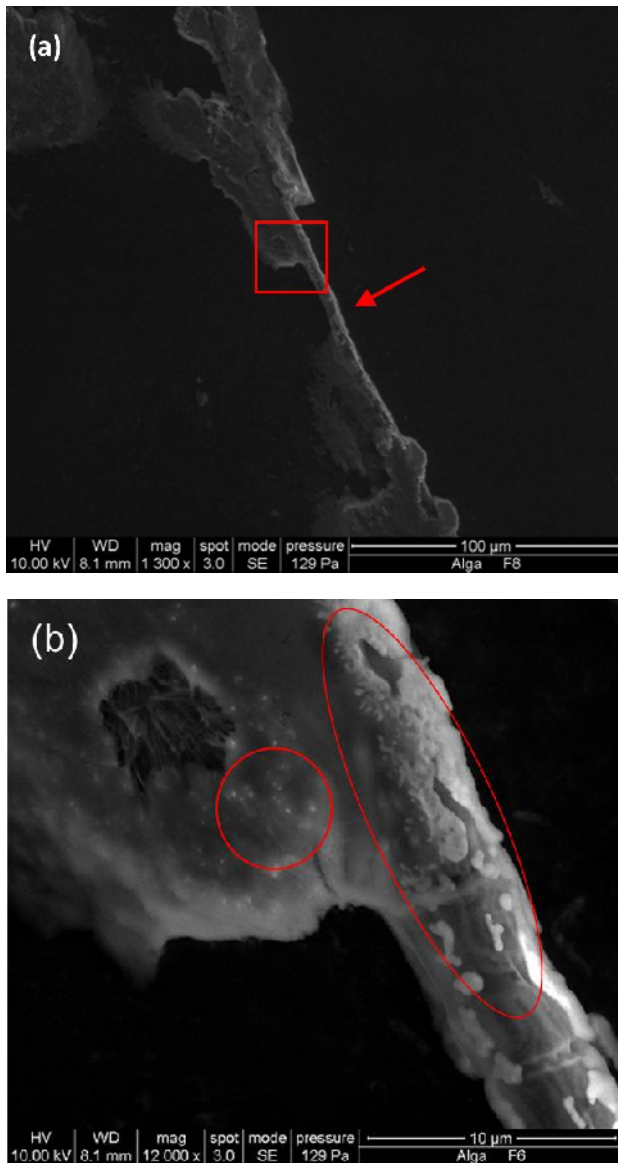
**Fig. 3.** Micrografías por MEB de un cultivo de *Arthrospira* sp. filtrados y tratados (pH 12 - 72 h), observados en el tiempo T<sub>1</sub>: (a) Se muestran los filamentos lineales de *Arthrospira* sp. y la cubierta mucilaginosa que esta segrega, la cual recubre los filamentos y se distiende entre ellos; (b) se muestra bacteria no cultivable con morfología ovoide pedunculada adosada a la microalga.

laboratorio por tiempos prolongados [21] y [22]. Sin embargo, Wang y Zhao [23] describieron que bajo condiciones ambientales (radiaciones UV) los filamentos lineales pueden volver a adquirir su morfología original. Adicionalmente, en la Figura 3a se observa una cubierta mucilaginosa, la cual recubre los filamentos y se distiende entre ellos tal y como lo indica la flecha roja. Esta cubierta es delgada y difluente [22] y está constituida por sustancias poliméricas extracelulares, básicamente polisacáridos y celulosa [24] y [25], la cual es segregada por la cianobacteria a través de poros situados en la pared celular. Entre las funciones que se le atribuyen se encuentra la de proteger a la cianobacteria y mediar su adherencia, además de estar posiblemente involucrada en el movimiento del filamento [24], mediante la motilidad de desplazamiento, mecanismo conocido en inglés como “gliding motility” [23]. También se observa en la Figura 3a, que la cianobacteria segregó una gran cantidad de mucílago, es probable que esto sea una respuesta al tratamiento fisicoquímico aplicado al cultivo, en función de protegerse a ese cambio ambiental. Sin embargo, sólo se ha reportado que un exceso de carbono fijado induce a una mayor formación de dicha cobertura mucilaginosa [23] y [25]. Es importante indicar que la cubierta mucilaginosa era afectada por el haz de electrones del microscopio al chocar con la muestra, ya que quemaba o consumía muy rápidamente. En la Figura 3b se presenta la micrografía con una magnificación de 30000X, la cual es mucho mayor a la de la Figura 3a, permitiendo observar una nueva morfología bacteriana que podemos describir como ovoidal pedunculada, la cual no coincide con ninguno de los dos morfotipos de las bacterias cultivables descritas. Por descarte, se puede asumir que dicha morfología corresponde a una bacteria no cultivable asociada a la cianobacteria. Es de esperar que entre las bacterias que cohabitan con la cianobacteria se encuentre bacterias no cultivables, ya que se conoce que menos del 1% de las bacterias en el ambiente pueden ser

cultivadas mediante el uso de técnicas convencionales [28]. La bacteria no cultivable se observa adosada a la superficie de la cianobacteria y sus dimensiones se reportan en la Tabla 3. Es posible que el pedúnculo confiera estas bacterias una mayor adhesión al filamento y que sea reportado que en el extremo de estas estructuras se encuentran los denominados botones de anclaje (cúmulos de mucopolisacáridos ácidos, segregados en puntos concretos de la célula en algún momento del ciclo de vida de ciertas bacterias) que por lo general facilitan la unión de las bacterias que los poseen a sus sustratos [29] y [30].

En la Figura 4 se presentan las micrografías obtenidas del cultivo de *Arthrospira* sp. en el tiempo T<sub>2</sub> (dos meses después del tratamiento fisicoquímico). En la Figura 4a, se puede observar un filamento amplificado a una magnitud 1300X (señalado por la flecha roja), donde este y algunas sales inorgánicas están parcialmente envueltos por la cubierta mucilaginosa. Adicionalmente el recuadro rojo indica la región que se amplificó a 12000X y que corresponde a la micrografía de la Figura 4b.

La magnificación a 12000X (Figura 4b), muestra claramente la cubierta mucilaginosa con pequeños puntos claros que corresponden a las bacterias (ver área interna del círculo), lo que permite verificar que la mayoría las bacterias cultivables y no cultivables se encuentran adosadas a la superficie de la cianobacteria y embebidas en la capa mucilaginosa. En las zonas expuestas o descubiertas del filamento, donde el haz de electrones del microscopio fue consumiendo el mucílago, se observan las bacterias que se encuentran adosadas a la superficie del filamento de la cianobacteria (ver área interna de la elipse).



**Fig. 4.** Micrografías por MEB de un cultivo de *Arthrospira* sp. filtrados y tratados (pH 12 - 72 h ), observados en el tiempo  $T_2$ : **(a)** Se muestra filamento (1300X) y algunas sales inorgánicas parcialmente cubiertas por la capa mucilaginosa que esta cianobacteria segrega. **(b)** Acercamiento de filamento (12000X de magnitud) donde se puede observar claramente como las bacterias cultivables están embebidas en la capa mucilaginosa de la microalga.

## CONCLUSIONES

La MEB permitió verificar la morfología y ubicación de las bacterias que cohabitan con *Arthrospira* sp. Las bacterias cultivables aisladas presentaron dos morfologías: bacilos y cocos, las cuales correspondieron con las identificaciones moleculares realizadas: *Bacillus*

sp. AP1 (bacilo), *Halomonas desiderata* (bacilo), *Indibacter alkaliphilus* (bacilo), *Rhodobaca bogoriensis* (coco) y *Bacillus akibai* (bacilo). Las observaciones del cultivo mediante MEB permitieron detectar la presencia de una morfología distinta: ovoidal pedunculada correspondiente a una bacteria no cultivable y se demuestra que, en efecto, las bacterias que cohabitan con *Arthrospira* sp se encuentran adosadas a la superficie de los filamentos y embebidas en la cubierta mucilaginosa que segrega esta cianobacteria. Estas bacterias que cohabitan con *Arthrospira* sp segregan biopelículas (glicocálix) o presentan estructuras (pedúnculo) que posiblemente incrementan su capacidad de adhesión a los filamentos. Finalmente, las características morfológicas de las bacterias cultivables, e identificadas molecularmente, coinciden en su mayoría con las reportadas en la literatura.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Lcdo. Ricardo Morales Ocando, operador del MEB en Fundación Instituto Zuliano de Investigaciones Tecnológicas (INZIT) por su valiosa colaboración en las observaciones realizadas, al Laboratorio de Polimorfismos Genéticos de la Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA) donde se llevó cabo la secuenciación de ADN y también agradecemos al árbitro por las correcciones que permitieron mejorar este artículo.

## REFERENCIAS

- [1] Belay A. (2002) The Potential Application of *Spirulina* (*Arthrospira*) as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health Management. *The Journal of the American Nutraceutical Association*. Vol. 5, No. 2 . 27- 48.
- [2] Ramirez L., Olivera R. (2006) Uso tradicional y actual de *Spirulina* sp. (*Arthrospira* sp.). INCI [online]. vol.31, n.9, pp. 657-663. ISSN 0378-1844.



- [3] Duerr EO, Edralin MR, Price NM. (1997) "Facilities requirements and procedures for the laboratory and outdoor raceway culture of *Spirulina* spp." *J Mar Biotechnol.* 5:1.
- [4] Sena L., Rojas D., Montiel E., González H., Moret J., Naranjo L., (2011) "A strategy to obtain axenic cultures of *Arthrospira* spp. Cyanobacteria". *World J Microbiol Biotechnol.* 27(5):1045-1053.
- [5] Gang-Guk C., Myong-Sook B., Chi-Yong A., Hee-Mock, O. (2007) "Induction of axenic culture of *Arthrospira (Spirulina) platensis* based on antibiotic sensitivity of contaminating bacteria" *Biotechnology Letters.* 30:87-92.
- [6] Gómez L., Valero N., Morales E. (2012) Bacterias halotolerantes/alcalofilas productoras de ácido indolacético (AIA) asociadas a *Arthrospira platensis* (Cyanophyceae). *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. XIV No. 2. 81-88 .
- [7] Ogawa T., Terui G., (1970) "Studies on the growth of *Spirulina platensis* on the pure culture of *Spirulina platensis*". *Frment. Tecnnol.* 48: 361-367.
- [8] Chen W., Kuo T., (1993) "A simple and rapid method for the preparation of Gram -negative bacterial genomic DNA" *Nucleic Acids Research.* 21:2260.
- [9] Lu, J., Perng, C., Lee, S., Wan, C. (2000). Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *Journal Clinical Microbiology,* 38, 2076- 2080.
- [10] Weisburg W., Barns S., Pelletier D., Lane D. (1991) "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study" *J. Bacteriol.* 173:697-703.
- [11] Altschul S., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs" *Nucleic Acids Res.* 25:3389–3402
- [12] Pearson, W., Lipman, D. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,* 85(8), 2444-8.
- [13] Pradhan D., Marsic D., Garriott O.K., Ng J.D. (2003). "Novel alkaliphiles from Tanzania soda lakes" *Laboratory for Structural Biology.* (Unpublished).
- [14] Pradhan D., (2007) "Isolation of novel alkaliphilic bacteria from two soda lakes of Tanzania and recombinant expression of two new proteases" *Molecular biology.Unidi by proquest.* goid: 304782532.
- [15] Vargas V., Delgado O., Hatti, R., Mattiasson B., (2004) "Lipase-producing microorganisms from a Kenyan alkaline soda lake" *Biotechnol Lett.* 26:81-86.
- [16] Kumar A., Srinivas T.N., Madhu S., Manorama R., Shivaji S. (2010) "*Indibacter alkaliphilus* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic bacterium isolated from a haloalkaline lake" *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60:721-726.
- [17] Milford A., Achenbach L., Jung D., Madigan, M. (2000) "*Rhodobaca bogoriensis* gen. nov. and sp. nov., an alkaliphilic purple nonsulfur bacterium from African Rift Valley soda" *Arch. Microbiol.* 174:18-27.
- [18] Nogi Y., Takami H., Horikoshi K., (2005) "Characterization of alkaliphilic *Bacillus* strains used in industry: proposal of five novel species" *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55 (PT 6): 2309-2315
- [19] Hakamada Y., Hatada Y., Koike K., Yoshimatsu T., (2000) "Deduced amino acid sequence and possible catalytic residues of a thermostable, alkaline cellulase from an Alkaliphilic bacillus strain" *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64 (11): 2281-2289.

- [20] Madigan M., Martinko J., & Parker J., (1997). *Brock Biología de los microorganismos*. Madrid. Prentice-Hall Iberia.. pp 92-93.
- [21] Komárek J (2000) “Problems in cyanobacterial taxonomy: implication for most common toxin producing species”. In: Istituto Superiore di Sanità Workshop. Freshwater harmful algal blooms: health risk and control management. Istituto Superiore di Sanità. Rome, 17 October 2000. In: Proceedings edited by Serena Melchiorre, Emanuela Viaggiu and Milena Bruno 2002, 103 p. Rapporti ISTISAN 02/9
- [22] Tomaselli L., (1997) Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira (Spirulina) maxima* and *Arthrospira (Spirulina) platensis*” In: Vonshak A., (eds) *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*., London, UK, Taylor & Francis pp 1–19.
- [23] Wang Z., Zhao Y. (2005) “Morphological reversion of *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Cyanophyta): from linear to helical” *J. Phycol.* 41:622–628.
- [24] Nobles D., Romanovicz D. K., Brown, R. M. (2001) “Cellulose in cyanobacteria. Origin of plant cellulose synthase?” *Plant Physiol.* 127:529–42.
- [25] Lee R., (2008) *Phycology*, USA, New York. *Cambridge University Press*, pp 37-38.
- [26] Van Eykelenburg, C. (1979) “The ultrastructure of *Spirulina platensis* in relation to temperature and light intensity” *A.Leeuwenhoek*, 45: 369.
- [27] Otero A., Vincenzini M. (2004). “*Nostoc* (Cyanophyceae) goes nude: extracellular polysaccharides serve as a sink for reducing power under unbalanced C/N metabolism.” *J. Phycol.* 40:74–81.
- [28] Zubair A., Yasir M., Khaliq A., Matsui K., Chung Y.R. (2010) “Mini Review: Too much bacteria still unculturable”. *Crop Environ.* 1: 59-60.
- [29] Madigan, M. T., Madigan, M. T., & Brock, T. D. (2009). *Brock biology of microorganisms*. San Francisco, CA: Pearson/Benjamin Cummings.
- [30] Costerton, J., Geesey G., Cheng K.-J. (1978): El mecanismo de adherencia en las bacterias. *Inv. y Ciencia* (marzo): 66-77.