Tesi doctoral presentada per En/Na

Laura VILLANUEVA ÁLVAREZ

amb el títol

"Ecophysiological and molecular characterization of estuarine microbial mats"

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

BIOLOGIA

Barcelona, 22 de desembre de 2005.

Facultat de Biologia
Departament de Microbiologia

UNIVERSITAT DE BARCELONA

IX. CONCLUSIONS

Figure IX. “We live in the Age of Bacteria as it was in the beginning, is now and ever shall be, until the World ends” Stephen J. Gould (1941–2002).

Picture from NASA that represents the evolution of life on Earth.

Microbial mats that develop in benthic marine and hypersaline environments may be living analogues to the first living biological communities. Thus, they may be useful in understanding biosphere-atmosphere interactions of early Earth. Despite their inherently high productivity and dominant role in the evolution of the biosphere, the present-day environmental distribution of cyanobacterial mats is largely restricted to environments that today could be considered extreme or stressed. However, microbial mats are extremely stable ecosystems with a high diversity, and they are a source of not-yet characterized microorganisms well adapted in the microbial community. Moreover, microbial mats are significant to the field of astrobiology because of the possibility that analogous extraterrestrial microbial systems might also contribute with gas emissions to the atmospheres of distant planets creating indicators of life. Although many studies have been performed with microbial mats as a model of microbial ecosystem, many uncertainties remain concerning biochemical cycles, cooperative associations and the identification of microbial members.

The aim of this work was the application of new techniques and combination of existing ones to give an integrated vision of the structure and physiology, and also analyze the information provided by the integrated approach and characterize less-known microbial populations involved in important processes in the mat. Therefore, we can conclude that the application of the Signature Lipid Biomarker approach in microbial mat samples has proved to be an effective method to obtain information about physiology and composition of natural microbial assemblages. However, more studies need to be performed in order to increase the sensibility and reproducibility of these techniques, and to evaluate the model of distribution of data in mat samples.

In addition, the combination of lipid analysis and nucleic acid-based methods in microbial mats at different depths has provided useful information about the temporal dynamic of populations, their phylogenetic affiliation and physiological status. This study has revealed the importance of heterotrophic bacteria in the photosynthetic layers, the presence of green non-sulfur bacteria in several ‘niches’, as well as fermentative bacteria in the deepest layers. Besides, divergence analysis has showed that depth-related changes might have a greater influence than temporal changes.

Apart from that, the application of the quinone profiling method has been useful for taxonomic purposes, biomass estimation and microbial redox state. In this case, we have observed important differences in the community structure and redox status in microbial mats from different locations that were apparently very similar. In addition, we have performed a preliminarily study about the detection of intact polar lipids in mat samples that will be improved in the future because of its higher taxonomical potential. We have also detected archaeal members that might have an important role in the physiology of the system.

The mentioned approaches were also applied to microbial mat samples along a circadian cycle in order to evaluate changes as a response to daily processes. We observed a pattern of physicochemical responses of the mat that reproduces every day. This fact suggests the idea that microbial mats are predictable and stable complex ecosystems. During this study, we have also observed daily changes attributed to anaerobic microorganisms, and for this reason we have isolated representative members of anaerobic spore-formers. Future studies will be focused on the isolation and characterization of the anaerobic fermentative bacteria in mats to improve our knowledge about the daily processes in which they are involved.

As a result of the data obtained after the application of combined analysis in mats, we realized about the importance of the heterotrophic bacteria in the regulation of metabolic processes in the photic zone. Previous studies have investigated the heterotrophic diversity in mats, but the information about their role and the interactions with other microbial groups are still limiting. In this work, we have isolated and characterized two microbial strains involved in the metabolic interactions of the photic zone. We have demonstrated the metabolic capacities of *Pseudoalteromonas* sp. EBD and the relationship with cyanobacteria. However, further studies should be done to determine the interchange of nutrients between these groups. On the other hand, a member of the *Sphingomonas* genus has been also characterized and its importance in the nutrient cycling and in the polyhydroxyalkanoate dynamics will be investigated.

Finally, we have studied the microbial diversity of sulfur-oxidizers involved in the sulfur cycle of transition zones between oxygen and sulfide. In this case, previous studies performed in our group have described spirilloid and spirochaetal morphotypes that seem to be involved in the sulfur cycle. For this reason, we have investigated the morphological succession in these microbial 'blooms' to predict their reproducibility. We have applied molecular techniques that have provided important information about the composition of the 'sulfur-blooms'. In addition, these molecular screenings have permitted the design of probes that will be applied in future studies for the detection of the observed microorganisms in mats. Moreover, we have observed that the detected microorganisms might be forming resistance structures to environmental perturbations, or accumulating reserve compounds as a protective strategy. Therefore, we are still focused on the detection of these structures that would be an alternative mechanism to spore formation in microorganisms.

X. RESUMEN DEL TRABAJO (SUMMARY)

Figura X. Tapetes microbianos del Delta del Ebro en la ‘Punta de la Banya’.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. TAPETES MICROBIANOS

Los tapetes microbianos son comunidades microbianas estratificadas que se desarrollan en gradientes ambientales establecidos en interfases de agua y sustrato sólido (Davey □ O'Toole, 2000). Este tipo de comunidades se desarrolla en una gran variedad de ambientes, por ejemplo lagunas hipersalinas, desiertos, lagos alcalinos, marismas, chimeneas hidrotermales, fuentes sulfurosas etc. (Oremland □ DesMarais, 1983; Cohen *et al.*, 198□; Stal, 199□; Caumette *et al.*, 199□). Estos ecosistemas microbianos son los análogos modernos de las primeras comunidades microbianas existentes en la Tierra, conocidas como estromatolitos. Los estromatolitos fueron las estructuras sedimentarias microbianas dominantes en la era Precámbrica, juntamente con los depósitos laminados de hierro (Walter *et al.*, 1976). El establecimiento de redes tróficas, la diversificación de formas de vida y el reciclaje de nutrientes hicieron posible el mantenimiento de la vida y la evolución de las células eucariotas (Guerrero, 1998). La identificación de microorganismos, los estudios del estado fisiológico y las asociaciones poblacionales en tapetes microbianos favorecen el entendimiento de la evolución microbiana.

Ciclos biogeoquímicos y reciclado de nutrientes

La comunidad de los tapetes microbianos se encuentra estratificada verticalmente debido a los gradientes de intensidad de luz y condiciones redox que se modifican durante el ciclo diario, y que crean 'micronichos' ocupados por diferentes poblaciones microbianas (Jørgensen, 199□). Las elevadas tasas de fotosíntesis que se dan en la capa fótica de los tapetes crean gradientes de pH, concentración de carbono inorgánico disuelto y concentración de oxígeno. De hecho, la zona oxigénica refleja el balance dinámico entre la producción de oxígeno fotosintético y el consumo de oxígeno por bacterias heterótrofas y oxidadoras de azufre.

Ciclo del carbono y del oxígeno

Durante el día, la irradiación solar penetra en la superficie de los tapetes microbianos e induce la fijación primaria del carbono en microorganismos fototrofos oxigénicos y anoxigénicos. Las fuentes de carbono inorgánico para la producción primaria proceden de la respiración aeróbica y anaeróbica en la capa fótica, y de la actividad heterótrofa en las capas más profundas (Canfield □ DesMarais, 1993). Factores como la intensidad de luz y la temperatura regulan la tasa de producción de oxígeno en los tapetes microbianos. Estudios previos han asociado el aumento de la producción de oxígeno con la intensidad de la radiación incidente (Canfield □ DesMarais, 1993; Wieland □ Kühl, 2000); ya que el aumento de irradiación solar superficial aumenta la penetración de la luz, activa los procesos fotosintéticos en capas más profundas, e induce un aumento linear de la producción de oxígeno.

Por otra parte, la producción de oxígeno responde a cambios de temperatura (Epping □ Kühl, 2000). Temperaturas más elevadas inducen la actividad oxigenasa de la enzima Rubisco (carboxilasa/oxigenasa) y por ello se esperaría una reducción de la fotosíntesis en concentraciones de oxígeno crecientes (Berry □ Raison, 1981). A pesar de ello, recientes estudios han observado que en concentraciones de oxígeno elevadas se da el aumento de la tasa fotosintética. Este hecho probablemente se deba a un aumento de la oxidación de materia orgánica y producción de CO_2 asociados a un eficiente reciclado de fotosintato en la capa fótica (Grötzschel □ de Beer, 2002).

Ciclo del azufre y el nitrógeno

Los tapetes microbianos son un modelo ideal para el estudio del ciclo del azufre. La reducción de sulfato llevada a cabo por las bacterias sulfatorreductoras, es el proceso clave en la generación de compuestos reducidos del azufre que son utilizados por fototrofos anoxigénicos y oxidadores del azufre (Visscher *et al.*, 1992). Las bacterias quimiolitotrofas obtienen energía mediante la oxidación de compuestos reducidos del azufre e igualmente, las bacterias fototrofas anoxigénicas usan estos compuestos como donadores de electrones para fijar CO_2 en condiciones de luz. Por ejemplo, las bacterias rojas del azufre oxidan el sulfhídrico a azufre elemental que almacenan intracelularmente. Por otra parte, las bacterias sulfatorreductoras juegan un papel importante en la regulación del flujo de donadores de electrones en el ciclo del azufre, debido a su versatilidad metabólica en la reducción de sulfato y tiosulfato. Además, recientemente se ha demostrado su papel el la reducción de sulfato en condiciones de presencia de oxígeno, lo cual activa la oxidación de materia orgánica en la capa fótica y la reducción de sulfato durante el día (Minz *et al.*, 1999; Fründ □ Cohen, 1992).

La disponibilidad de nitrógeno es otro elemento clave para la producción de biomasa en los tapetes microbianos. El éxito evolutivo de estas comunidades en ambientes con limitación de nitrógeno se ha atribuido a la habilidad de microoganismos específicos para fijar nitrógeno atmosférico (fototrofos oxigénicos y anoxigénicos, quimiolitotrofos, heterotrofos; Paerl *et al.*, 199□). Otras fuentes de nitrógeno para el sistema son el amonio, los nitratos y nitritos que deben ser reducidos a amonio por procesos de asimilación, y materia orgánica disuelta (Nielsen □ Sloth, 199□).

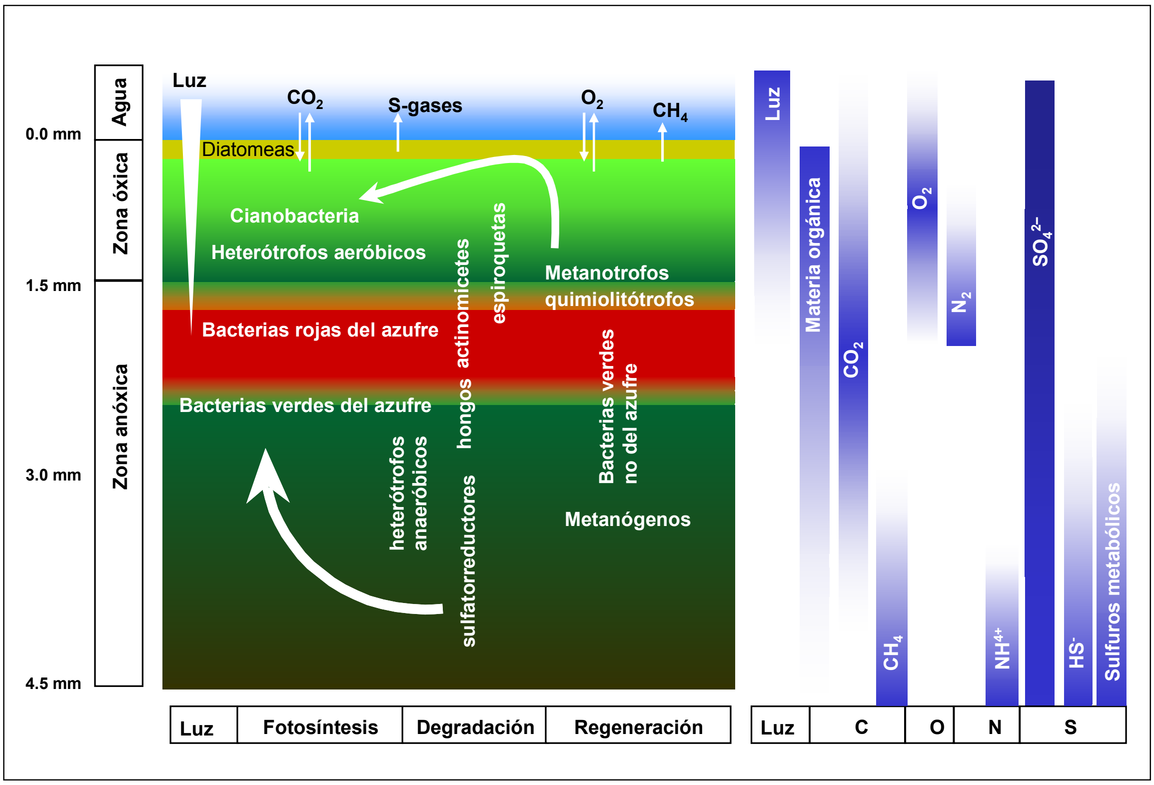


Figura X.1. Esquema de las relaciones fisiológicas entre las poblaciones microbianas y gradientes establecidos en tapetes microbianos (Navarrete, 1999).

Composición de la comunidad microbiana

A pesar que el conocimiento de las principales poblaciones microbianas es amplio, poco se sabe de aquellos microorganismos que no se encuentran distribuidos en capas definidas pero que contribuyen de forma significativa a la dinámica poblacional. El proceso más importante de la mayor parte de estos sistemas es la fotosíntesis llevada a cabo por las cianobacterias (unicelulares y filamentosas, p.ej. *Synechocystis*, *Phormidium*, *Microcoleus*, *Lyngbya*, *Pseudoanabaena*, etc. García-Pichel *et al.*, 1998; Urmeneta *et al.*, 2003). Posteriormente, las bacterias sulfatorreductoras (p.ej. *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, etc. Teske *et al.*, 1998) usan los productos resultantes de la producción de las cianobacterias como fuente de carbono y además producen sulfhídrico. El sulfhídrico puede ser reoxidado a sulfato por las bacterias oxidadoras del azufre (p.ej. *Beggiatoa*, *Thiomicrospira*, *Thiobacillus* etc. Mills *et al.*, 200□; Brinkhoff □ Muyzer, 1997) y bacterias rojas y verdes del azufre (p.ej. *Chromatium*, *Thiocapsa*, *Chlorobium* etc. Imhoff □ Pfenning, 2001; Caumette, 1989). Las bacterias aerobias heterotrofas son funcionalmente importantes ya que su actividad reduce en contenido de oxígeno en el sistema; por otra parte, los microorganismos fermentadores proporcionan sustratos de crecimiento a las bacterias sulfatorreductoras. En los tapetes microbianos, estos grupos metabólicamente diferentes establecen funciones metabólicas asociadas que favorecen el reciclado de materia orgánica y energía en el sistema.

Perspectivas

Las técnicas microbiológicas tradicionales son insuficientes para el estudio de comunidades microbianas, y la aplicación de técnicas moleculares ofrece alternativas para el estudio de la estructura y composición microbiana. Por ello, la integración de técnicas moleculares basadas en ácidos nucleicos, lípidos, proteínas etc., con enfoques más clásicos proporciona una visión más amplia de la dinámica y composición de comunidades microbianas. El éxito ecológico y la amplia gama de actividades metabólicas en los tapetes microbianos sugieren su aplicación en el biorremedio de lugares contaminados o en la biogeneración de productos (Bender □ Phillips, 200□), así como en la caracterización de los requerimientos para la vida microbiana.

2. BIOMARCADORES LIPÍDICOS para el estudio de comunidades microbianas

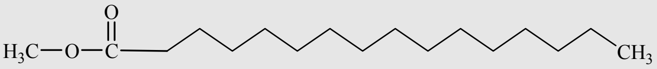
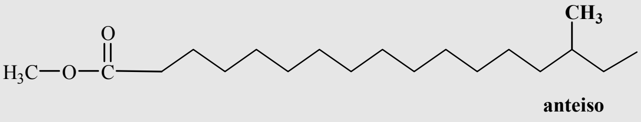
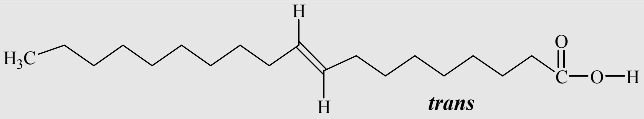
Clasificación de los lípidos

A continuación proponemos una clasificación de los lípidos en la cual se ha dado más importancia a aquellas clases lipídicas analizadas en la metodología de los Biomarcadores Lipídicos Señal. Una clasificación más completa puede encontrarse en Radtledge □ Wilkinson (1988).

Lípidos simples

- Ácidos grasos: Se clasifican en función de su estructura y presencia de dobles enlaces.

Tabla X.1. Estructura y clasificación de los ácidos grasos.

Ácido graso[1]	Estructura
Saturado: cadena de carbonos sin dobles enlaces	
Ramificado: grupos metilo. Con determinada configuración son *iso* y *anteiso*. Pueden tener anillo ciclopropanoico (‘*cy*’).	
Monoenoico: una doble enlace que puede tener forma *cis* o *trans*	
Polienoico: más de un doble enlace	

[1] La nomenclatura de ácidos grasos es la forma de “A:BωC”, donde ‘A’ indica el número de carbonos, ‘B’ el número de dobles enlaces, y ‘C’ la distancia a la instauración más próxima desde el extremo alifático de la molécula (ω). Los sufijos ‘*c*’ y ‘*t*’ se refieren a los isómeros *cis* y *trans*. Los prefijos ‘*i*’, ‘*a*’ y ‘*Me*’ se refieren a la ramificación de metilo *iso* y *anteiso*, y a la ramificación de metilo en medio de la cadena. Los anillos ciclopropilos se indican con el prefijo ‘*cy*’.

- Ácidos grasos esterificados: Entre ellos destacamos los poliésteres y como ejemplo los polihidroxialcanoatos (PHAs). Estos compuestos han sido a veces considerados como carbohidratos pero sus características de solubilidad los clasifican como lípidos.

Los polímeros de hidroxialcanoatos se han detectado en una gran variedad de organismos procariotas y también en plantas y células animales, aunque únicamente en procariotas se acumulan PHAs en forma de gránulos citoplasmáticos. El interés aplicado de estos biopolímeros se debe al desarrollo de plásticos biodegradables debido a las propiedades fisico-químicas de este compuesto (Steinbüchel □ Valentin, 1995). Los PHAs se clasifican en tres clases en función del número de carbonos en sus unidades monoméricas: PHAs de cadena corta (3–5 carbonos; butirato, valerato), de cadena media (6–1□; hexanoato, octanoato), y de cadena larga (>1□ carbonos) (Steinbüchel *et al.*, 1992). Entre ellos, el polihidroxibutirato (PHB) es el más común en bacterias.

- Aldehídos y vinil-éteres: Los aldehídos de cadena larga se encuentran frecuentemente incluidos en lípidos complejos en la forma de vinil-éteres formando los plasmalógenos (p.ej. plasmalógenos de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina). El primer carbono del glicerol está unido a la cadena carbonada a través de un enlace vinil-éter: [–C–O–C=C–]. Este enlace es sensible al tratamiento ácido y genera aldehídos de cadena larga que en presencia de metanol pasan a ser dimetilacetales.

- Amino-ácidos grasos: Ácidos grasos unidos a aminoácidos que se encuentran en fosfolípidos de diversas especies microbianas. Por ejemplo, el ácido serratámico (serina-lípido) que parece estar implicado en la virulencia de especies de *Serratia* (Cartwright, 1957); el flavolípido de *Flavobacterium* (serina-lípido; Kawai *et al.*, 1988); lípidos con contenido en ornitina en especies de *Bordetella*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, etc., que se ha relacionado con funciones de virulencia y como respuesta a crecimiento con limitación de fosfato (Kawai *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 1998).

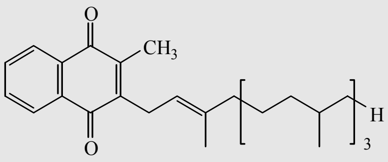
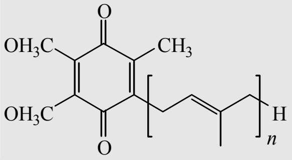
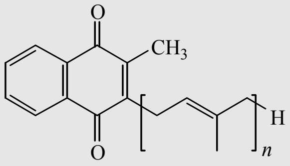
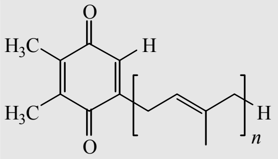
- Amino-alcoholes: Son ácidos grasos con grupos 'amida' que suelen encontrarse formando formas complejas llamadas esfingolípidos. Las ceramidas son ácidos grasos con un grupo 'amida' con bases di o trihidroxiladas de cadena larga. Los amino-alcoholes o bases esfingoides de cadena larga más comunes son la ‘esfingosina’ (18 carbonos y un doble enlace, C18:1) y la ‘dihidro-esfingosina’ (C18:0).

- <u>Lípidos terpenóicos:</u> Su estructura está basada en varias unidades isoprenoides. En función del número de unidades se distinguen los diterpenoides (□ unidades isoprenoides), p.ej. el fitol y el geranil-geraniol; los triterpenoides (6 unidades), p.ej. los ‘esteroles’ que se encuentran en las membranas de eucariotas y también en bacterias (Taylor, 198□), y los ‘hopanoides’, más comunes como constituyentes de las membranas procariotas; los tetraterpenoides (8 unidades), p.ej. los carotenoides (pigmentos naturales); y los politerpenoides (>8 unidades), entre los cuales se encuentran las quinonas isoprenoides y los isopranil éteres.

Las quinonas isoprenoides están implicadas en el transporte electrónico y en los procesos de fosforilación oxidativa, y por lo tanto están asociadas a membranas plasmáticas de bacterias, membranas mitocondriales de eucariotas y membranas tilacoidales en fotótrofos. Las quinonas isorpenoides se clasifican en naftoquinonas y benzoquinas. Las naftoquinonas a su vez se dividen en ‘Filoquinonas’, ‘Menaquinonas’ (MK) y ‘Demetilmenaquinona’ (DMK). La filoquinona o vitamina K_1 se encuentra en organismos fotosintéticos (Collins □ Jones, 1981). Las benzoquinonas están integradas por las ubiquinonas (Q) y las plastoquinonas (PQ) que se encuentran únicamente en tejidos fotosintéticos de plantas superiores, algas y cianobacterias (Threlfall □ Whistance, 1971). Las quinonas isoprenoides se denominan seguidas de un número que indica el número de unidades isoprenoides (Tabla X.2).

La presencia de isopranil éteres en los fosfolípidos y glicolípidos de membrana es una de las características que distingue a las Arqueobacterias de las Eubacterias y Eucariotas. La configuración del residuo de glicerol con cadenas hidrocarbonadas unidas por enlaces tipo éter caracteriza la estructura llamada ‘arqueol’ (2,3-di-*O*-fitanil-*sn*-glicerol). Los diéteres de arqueol se encuentran habitualmente en las membranas de halófilos extremos y metanógenos del dominio *Archaea*. Igualmente, los metanógenos pueden tener tetraéteres (‘caldarqueol’) en sus membranas, que es a su vez el componente polar principal en las membranas de termófilos extremos (Nishihara *et al.*, 1987; Hopmans *et al.*, 2000).

Tabla X.2. Estructura y clasificación de quinonas isoprenoides.

Quinona	Estructura	Quinona	Estructura
Filoquinona o vitamina K_1		**Ubiquinona Q-*n***	
Menaquinona MK-*n* DMK es una MK sin metilo en el C2		**Plastoquinona PQ-*n***	

Lípidos complejos

Los lípidos complejos se clasifican en fosfolípidos, glicolípidos y lipoaminoácidos. Los fosfolípidos se caracterizan por un residuo de fosfato, une molécula de glicerol y amino-alcoholes o ácidos grasos. Mayoritariamente se clasifican en dos categorías: los glicerofosfolípidos, derivados del ácido fosfatídico (p.ej. fosfatidil glicerol, etanolamina, colina etc.); y los esfingolípidos que contienen fósforo y una base de cadena larga (base esfingoide). Los glicerofosfolípidos son compuestos habituales en las membranas plasmáticas, en cambio los esfingolípidos se encuentran específicamente en membranas de *Sphingomonas* y *Bacteroides*, en el caso de bacterias (Kawasaki *et al.*, 199□; Kato *et al.*, 1995). Por otra parte, los glicolípidos constituyen una clase heterogénea donde cabe destacar los lipopolisacáridos, componentes importantes de la membrana externa de Gram-negativos. Finalmente, los lipoaminoácidos son los lípidos complejos que presentan las estructuras anteriormente mencionadas como aminoácidos unidos a ácidos grasos.

Estudio de Biomarcadores lipídicos

El análisis de lípidos microbianos es un método sensible que se basa en la extracción, separación y cuantificación de lípidos de muestras ambientales que pueden ser usados como biomarcadores para la caracterización de poblaciones microbianas (White *et al.*, 1998). La explicación de esta metodología se divide en tres partes que corresponden con las fracciones lipídicas obtenidas tras la separación mediante cromatografía de ácido silícico de los lípidos totales de una muestra.

- <u>Fracción de lípidos polares:</u> Esta fracción incluye los ácidos grasos de los fosfolípidos (PLFA) cuya identificación y cuantificación son útiles para determinar la biomasa microbiana viable, el estado fisiológico y la composición de la comunidad.

La determinación de PLFAs proporciona una medida de la biomasa viable ya que todas las células vivas poseen membranas intactas con PLFAs que serán transformados a diacilglicéridos tras la muerte celular por la acción de fosfolipasas celulares (White *et al.*, 1979). Por otra parte, los microorganismos o comunidades microbianas responden a cambios en su 'microambiente' mediante cambios en su composición lipídica. En este aspecto, se ha observado que en situaciones de estrés fisiológico y crecimiento estacionario, los microorganismos pueden aumentar la proporción de ácidos grasos con configuración '*cis*' respecto a la '*trans*'. Así mismo, también se aumenta la proporción de ácidos grasos ciclopropanóicos con el objetivo de reducir la fluidez de membrana para limitar el transporte y facilitar la conservación de energía (Heipieper *et al.*, 1992; Guckert *et al.*, 1986). Además, como diferentes grupos de microorganismos sintetizan una variedad de PLFAs a través de diferentes vías bioquímicas éstos son biomarcadores taxonómicos efectivos. A pesar de su versatilidad, el análisis de PLFA presenta limitaciones porque algunos grupos microbianos presentan perfiles solapados (Ratledge □ Wilkinson, 1988).

- <u>Fracción de glicolípidos:</u> En esta fracción no solo se recuperan compuestos glicolipídicos, sino que además puede analizarse el contenido de polihidroxialcanoatos (PHA). Una gran variedad de microorganismos presentan la capacidad de acumular estos compuestos de reserva si disponen de fuentes de carbono y energía en exceso, pero algún elemento esencial para el crecimiento está limitante (Dawes *et al.*, 1973). El nivel de PHA puede variar rápidamente como respuesta a variaciones en el estado nutricional (Elhottová *et al.*, 1997), por ello la determinación del índice de la concentración de PHA respecto a la cantidad de PLFAs es un marcador importante del crecimiento y del estado fisiológico (Tunlid □ White, 1992).

- Fracción de lípidos neutros: En esta fracción pueden analizarse los esteroles (marcadores de microeucariotas), los diglicéridos, triacilglicéridos y las quinonas respiratorias. La función de las quinonas respiratorias es la de transportadores de electrones en cadenas respiratorias y sistemas de transporte electrónico fotosintético. Además de su importancia biológica, la variación estructural de las quinonas las convierte en biomarcadores de importancia taxonómica (Crane, 1965; Collins □ Jones, 1981). Igualmente, estudios recientes han demostrado que el contenido en quinonas está correlacionado con la biomasa microbiana (Hiraishi *et al.*, 2003). Las quinonas isoprenoides también pueden ser utilizadas para evaluar el estado redox de comunidades microbianas. Estudios realizados por Hedrick y White (1986) propusieron a las quinonas como indicadores sensibles del metabolismo aeróbico y anaeróbico en comunidades microbianas.

- Expansión del método de biomarcadores lipídicos: Uno de los puntos más importantes incluye el análisis de DNA presente en el residuo no lipídico tras a extracción de lípidos totales. Este DNA puede ser utilizado para estudios de caracterización taxonómica, detección de genes de expresión proteica, etc. (Stephen *et al.*, 1999).

3. OBJETIVO DEL TRABAJO

Esta tesis doctoral está integrada en los objetivos generales del grupo de 'Ecogenética microbiana' del departamento de Microbiología de la Universidad de Barcelona. Nuestro grupo de investigación está centrado en el estudio de los tapetes microbianos como sistema microbiano complejo en el cual se establecen relaciones ecofisiológicas entre sus miembros. Desde 1999, el grupo de 'Ecogenética microbiana' se ha interesado en la caracterización ecofisiológica mediante métodos moleculares basados en el DNA y biomarcadores lipídicos señal. Este interés es el resultado de la colaboración con el Prof. D. C. White del 'Center for Biomarker Analysis' (TN, EUA) y con el Dr. Roland Geyer del 'UF□ Center for Environmental Research' (Leipzig, Alemania). Por lo tanto, el objetivo general de esta tesis fue la caracterización ecofisiológica y molecular de tapetes microbianos de diferente localización, y el aislamiento y caracterización de nuevas especies microbianas implicadas en las relaciones fisiológicas de este ecosistema modelo.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE BIOMARCADORES LIPÍDICOS SEÑAL EN TAPETES MICROBIANOS

1. INTRODUCCIÓN Y OBJECTIVOS

En la fracción de lípidos polares, los PLFAs han sido ampliamente estudiados pero también están presentes otras clases lipídicas como plasmalógenos presentes en Clostridia y otros microorganismos anaeróbicos (Moore *et al.*, 199□); esfingolípidos de *Sphingomonas* y *Bacteroides* (Busse *et al.*, 1999; Kato *et al.*, 1995); lipoaminoácidos indicadores de diversos géneros microbianos y de condiciones de limitación de fosfato (Taylor *et al.*, 1998); y alquil-éteres presentes en *Archaea*. Por lo tanto, el fraccionamiento secuencial y cuantificación de estos lípidos puede ser usado para la caracterización de microorganismos (White *et al.*, 1997). Estudios previos han descrito un método para el análisis de ácidos grasos esterificados y unidos por enlaces 'amida' (Mayberry □ Lane, 1993), pero uno de los problemas de éste es el análisis de los componentes al mismo tiempo ya que puede llevar a identificaciones erróneas.

Los objetivos de este capítulo fueron (i) desarrollar y validar un protocolo de fraccionamiento secuencial para el análisis de clases lipídicas en la fracción de lípidos polares, (ii) validar la detección de polihidroxivalerato, y (iii) determinar la variabilidad de muestras de tapetes microbianos y la aplicabilidad de los métodos validados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de cultivos puros de *Sphingomonas paucimobilis* (contenido en bases esfingoides), *Clostridium butyricum* (plasmalógenos), *Staphylococcus aureus* (lipoaminoácidos) se obtuvieron en los medios de cultivos adecuados. Además *Pseudomonas putida* se cultivó en medio R2A con 0.3 g ('fosfato alto') y 0.05 g ('fosfato bajo') $K_2HPO_{\square}$ para inducir el aumento de lípidos de ornitina en condiciones de limitación de fosfato (Kawai *et al.*, 1988). Muestras de tapetes microbianos se recogieron a las 12:00 am en Marzo y Mayo del 200□. Las lípidos totales de las muestras se extrajeron por el método modificado de Bligh □ Dyer (1959) y se separaron en lípidos polares, glicolípidos y lípidos neutros por cromatografía de ácido silícico (White *et al.*, 1997).

La fracción de lípidos polares se trató en el protocolo secuencial descrito en la Fig. X.2. Fosfatidiletanolamina bovina con un contenido del 60% de plasmalógenos se usó para la identificación de dimetilacetales (DMAs) derivados de plasmalógenos. La fracción de glicolípidos se analizó según el protocolo descrito por Elhottová *et al.* (2000). Cultivos de *Cupriavidus necator* en un medio con valerato sódico como fuente de carbono y energía se usaron para validar la detección de monómeros derivatizados de polihidroxivalerato.

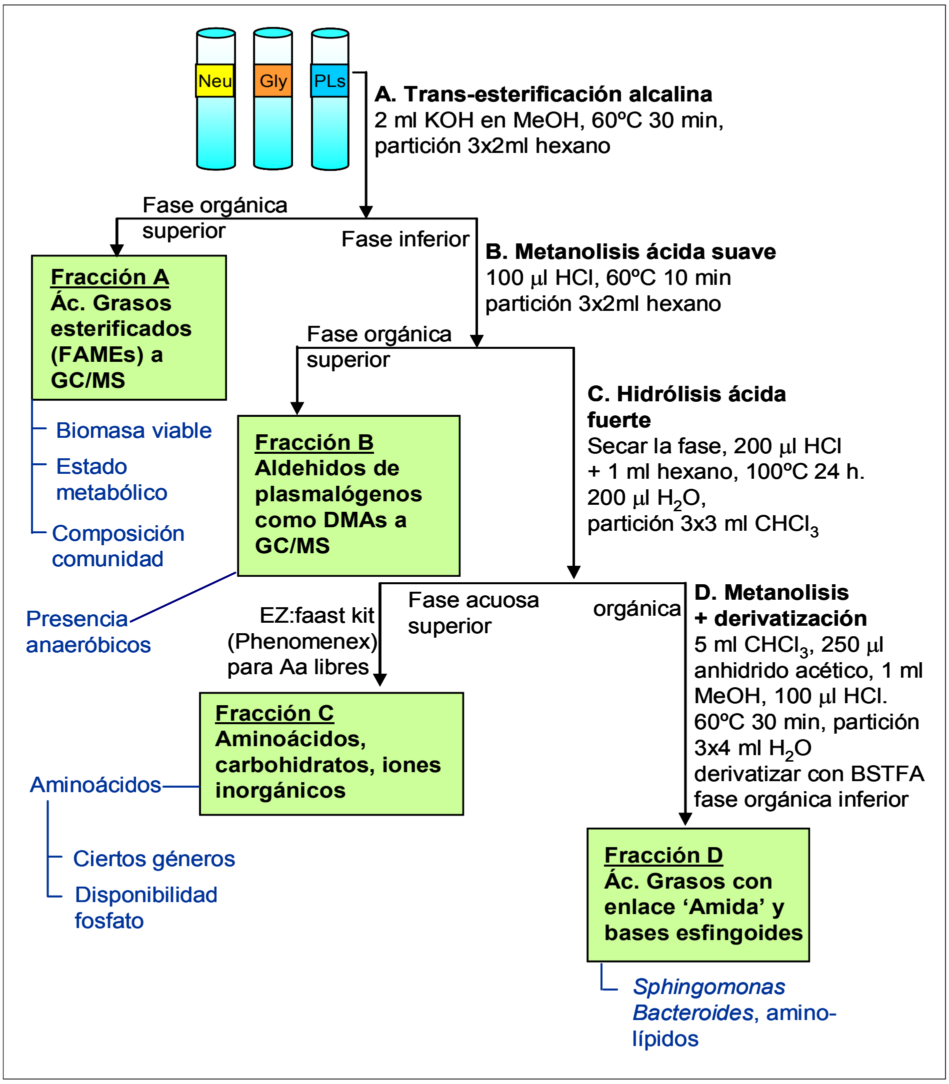


Figura X.2. Protocolo secuencial. PLs (lípidos polares), Gly (glicolípidos), Neu (neutros), MeOH (metanol), GC/MS (cromatografía de gases/espectrometría de masas), Aa (aminoácidos), DMAs (dimetilacetales), $CHCl_3$ (cloroformo), BSTFA (trimetilsililtrifluoroacetamida).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para validar el protocolo secuencial desarrollado, se estimaron los %mol (picomoles por g de peso seco respecto al total) de los FAMEs recuperados en el paso ‘A’ en las muestras de cultivos puros y de tapetes microbianos. Los FAMEs mayoritarios en *Staphylococcus aureus* fueron *a*15:0 y ácidos grasos saturados ramificados terminalmente; *Sphingomonas paucimobilis* presentó un elevado porcentaje de 16:0; *Clostridium butyricum* 16:0 y *cy*19:0; y los cultivos de *Pseudomonas putida* ‘fosfato alto’ y ‘fosfato bajo’ mostraron abundancia de los FAMEs 16:1ω9*c*, 16:1ω7*c* y 16:0. Las muestras de tapetes microbianos presentaron mayor %mol en los FAMEs monoenóicos 16:1ω7*c*, 18:1ω9*c*, 18:1ω7*c* y en 16:0. La desviación estándar fue baja en todos los casos a excepción a aquellos FAMEs con %mol más elevados o aquellos que tienden a coeluir y han de ser integrados manualmente (p.ej. 18:1ω9*c*).

Los FAMEs también se recuperaron en el paso ‘B’ del protocolo lo cual indica que cierta fracción de la fase orgánica del paso ‘A’ permanece en la interfase no recuperada o en las paredes del tubo de ensayo. El porcentaje y la reproducibilidad de la fase orgánica del paso ‘A’ que se recupera en ‘B’ depende del manipulador, y se estimado en un 3–5% (datos obtenidos en cultivo puro). Los porcentajes relativos de los FAMEs recuperados en el paso B se esperaban que fueran similares a los obtenidos en el paso ‘A’, pero se detectaron diferencias en el porcentaje de recuperación. En los cultivos de *Pseudomonas putida*, los ácidos grasos 16:1ω9*c* y 18:1ω9*c* presentaron un mayor porcentaje de recuperación en el paso ‘A’ y 16:1ω7*c* y 16:0 en el ‘B’ (Fig. X.3). Por el contrario, las muestras de tapetes microbianos mostraron %mol superiores en 18:1ω7*c* y *cy*19:0 en el paso ‘A’, y 16:0 y 18:1ω9*c* en el ‘B’. No parece existir una correspondencia entre los ácidos grasos con diferentes % de recuperación entre los cultivos y las muestras de tapetes microbianos, pero si parece existir una recuperación preferente de ácidos grasos monoenóicos.

A pesar de ello, la recuperación preferente de 16:0 en ambos tipos de muestra puede estar relacionada con la estructura química del ácido graso o por un aumento en la liberación de este ácido graso esterificado tras la metanolisis ácida del paso ‘B’. Aunque el % de recuperación de *cy*19:0 en el paso ‘A’ no fue muy evidente, podría estar relacionado con la sensibilidad de los ácidos ciclopropanóicos en condiciones ácidas (Mayberry □ Lane, 1993). Este hecho podría explicar las diferencias en el % de recuperación debido a una degradación parcial del FAME en el paso 'B'.

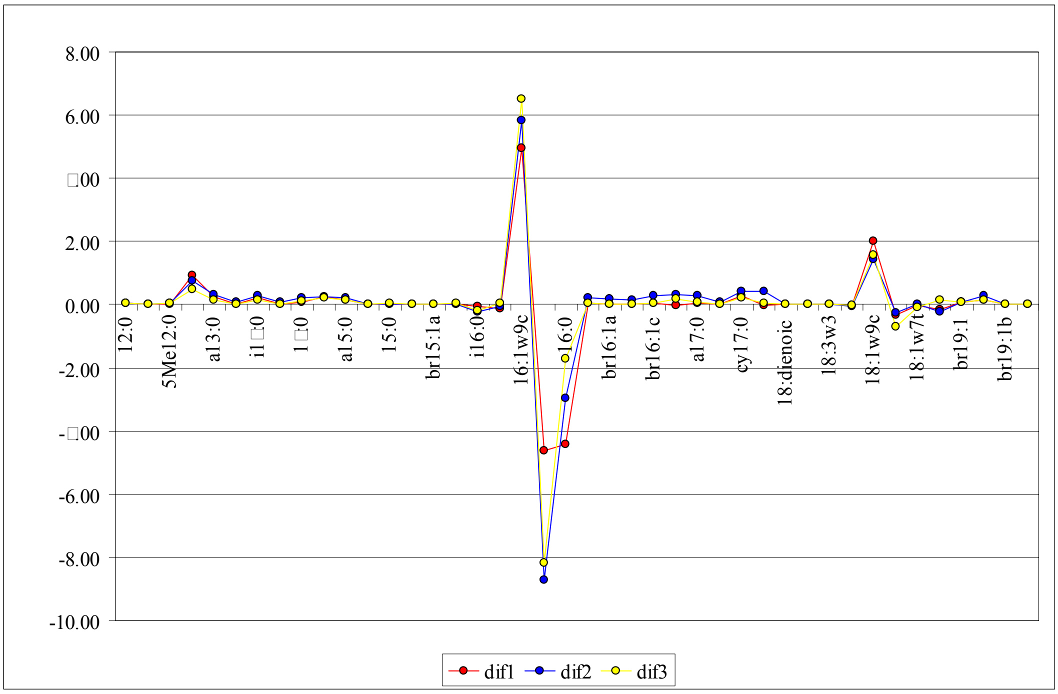


Figura X.3. Diferencias en el % de recuperación de FAMEs en el paso 'A' y 'B'.

Pseudomonas putida 'fosfato bajo'. Las diferencias entre el porcentaje mol (%mol) de cada ácido graso en el paso 'A' con el correspondiente valor en el paso 'B' son 'dif1', 'dif2' y 'dif3' referidas a la sustracción entre las tres réplicas.

La importancia de la recuperación de FAMEs en el paso 'A' y 'B' fue también evaluada para el cálculo de los índices metabólico ([(*cy*17:0/16:1ω7*c*) + (*cy*19:0/18:1ω7*c*)]) y de estrés ([(16:1ω7*t*/16:1ω7*c*) + (18:1ω7*t*/18:1ω7*c*)]) en muestras de tapetes microbianos. Se observó que el valor de los índices era el mismo con los datos del paso 'A' y sumando los valores de ambos pasos y recalculando el % de nuevo.

La identificación de dimetilacetales (DMAs) en el paso 'B' se realizó por comparación con el patrón de fragmentación de la muestra de fosfatidiletanolamina bovina. El cultivo de *Clostridium butyricum* reveló la presencia de DMAs de 16 a 20 carbonos con una predominancia de DMAs 19:1. En las muestras de tapetes microbianos, el DMA más representativo fue el 15:0 y las muestras de recogidas en Mayo presentaron el doble de DMA cuantificados. Las desviaciones estándar fueron bajas para las muestras de cultivos puros, aunque en las muestras de tapetes se observó mayor variabilidad. La baja reproducibilidad de los valores de DMAs puede deberse a su labilidad en condiciones ácidas. Para evitar este proceso, la fase resultante del paso 'A' debería secarse para evitar la presencia de agua y añadir anhídrido acético durante el proceso del paso 'B'. Otro proceso que puede inducir a esta variabilidad en la cuantificación de DMAs puede ser la tendencia de los 16:0 y 18:0 DMAs a coeluir con los FAMEs *i*16:0 y *i*18:0.

La detección de aminoácidos en el paso 'C' no dio resultado y diversos problemas deberían solucionarse en este aspecto. Las condiciones acídicas del paso 'C' permiten la rotura de los enlaces 'amida' pero no podemos predecir el efecto de un pH cercano a 1 en la estructura de lo aminoácidos y en la extracción sólida y derivatización del kit E□:faast. En paso 'D' del protocolo las bases esfingoides no pudieron ser cuantificadas debido a su tendencia a coeluir en el mismo pico. Para solucionar este problema, debería utilizarse una columna de separación cromatográfica más adecuada para separar compuestos estructuralmente similares. La detección de polihidroxivalerato por el método de Elhottová *et al.* (2000) fue validado. A pesar de ello, la variabilidad de las réplicas fue alta y deben buscarse métodos alternativos con mayor sensibilidad, mejorar la reproducibilidad del análisis y buscar estándares internos más adecuados.

4. CONCLUSIONES

- Se ha evaluado un método de fraccionamiento secuencial de la fracción polar que integra la detección de FAMEs, DMAs, y otros compuestos como bases esfingoides, aminolípidos y potencialmente lípidos de arqueas. La detección de DMAs, aminoácidos y bases esfingoides debe ser mejorada para aumentar la reproducibilidad y detección.

- Cierta proporción de FAMEs del paso 'A' son detectados en 'B'. Aunque el %mol se esperaría similar en ambos pasos, se han detectado diferencias en el % de recuperación.

- Se ha validado la detección de polihidroxivalerato en muestras de tapetes microbianos por el método desarrollado por Elhottová *et al.* (2000).

CARACTERIZACIÓN VERTICAL A 'MICROESCALA' DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA Y DEL ESTADO FISIOLÓGICO

1. INTRODUCCIÓN

La caracterización de la estructura de una comunidad microbiana mediante la evaluación de cambios en su composición de ácidos grasos de los fosfolípidos (PLFAs), se ha aplicado en diversos estudios de muestras ambientales (White □ Findlay, 1998). Este concepto metodológico ha llevado a la identificación y la cuantificación de la biomasa viable, el estado fisiológico y la composición de la comunidad en diversos ecosistemas (Ringelberg *et al.*, 1988: Navarrete *et al.*, 2000; Ibekwe *et al.*, 2001). A pesar de la versatilidad de este análisis, existe una limitación en la identificación de los grupos o géneros que integran una comunidad microbiana, ya que la identificación de PLFA solo clasifica a nivel de grandes grupos (Gram-positivos, anaeróbicos, etc.). Para superar esta limitación, los análisis de PLFA se han complementado con técnicas basadas en ácidos nucleicos (Macnaughton *et al.*, 1999).

Además de la determinación de la composición de la comunidad a nivel de género y especie, es importante conocer la diversidad de las poblaciones que integran este tipo de ecosistemas. Algunas teorías han relacionado la diversidad de especies con la función de los ecosistemas, de tal forma que la estabilidad del ecosistema se encontraría correlacionada positivamente con la diversidad (Naeem *et al.*, 1995; Tilman *et al.*, 1996). Por ello, los objetivos planteados en este estudio fueron: (i) determinar las diferencias en el estado fisiológico y en la diversidad microbiana mediante un enfoque combinado de análisis lipídico y de ácidos nucleicos, (ii) identificar los miembros microbianos que integran la comunidad, y (iii) investigar cómo los cambios abióticos afectan a la diversificación y la dinámica de las poblaciones en los tapetes.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de tapetes microbianos de la Camarga (delta del Rhone, Francia) se recogieron en Abril del 2002 a las 8:00 am GMT y a las 3:00 pm GMT. Las muestras se seccionaron por criomicrotomía y se generaron 16 muestras en profundidad (15 primeras de 500 µm de profundidad y la última de 1.25 mm. Total 8.75 mm analizados). Los lípidos totales de las muestras (por duplicado) se extrajeron y se separaron por cromatografía de ácido silícico. La fracción de lípidos polares se trans-esterificó a ésteres de metilo de ácidos grasos (FAMEs) que se identificaron y cuantificaron por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS).

Los ácidos nucleicos de la fase acuosa resultante de la extracción de lípidos totales se precipitaron. El DNA se empleó en una amplificación por PCR con oligonucleótidos para la amplificación de un fragmento de la molécula del 16S rDNA. Los fragmentos obtenidos se separaron en un gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) con un gradiente de 30−50% (Muyzer *et al.*, 1993). Las bandas separadas por el gel se recortaron y se reamplificaron para ser clonadas o secuenciadas directamente.

El índice de divergencia (*D*) (Iwasaki □ Hiraishi, 1998; Hiraishi, 1999) se calculó con los datos de %mol de los PLFA detectados, para estimar las diferencias existentes entre las muestras. Posteriormente, se construyó un dendrograma basado en la matriz de valores *D* con el algoritmo de 'neighbor-joining' (Saitou □ Nei, 1987). Los geles de DGGE se escanearon y se analizaron con el software 'NIH Scion Image' para transformar la intensidad de cada banda en porcentaje. Los índices de diversidad de Shannon-Weaver y Simpson (Shannon □ Weaver, 1963; Simpson, 19□9) se calcularon con los datos de %mol de los PLFAs detectados y de la intensidad de las bandas de los geles DGGE. Ambos tipos de datos se normalizaron a una sensibilidad analítica común antes del cálculo de los índices (Hedrick *et al.*, 2000).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La biomasa viable máxima (determinada por el contenido total de PLFAs) a las 8:00 am se observó en la superficie del tapete. Este hecho puede deberse a la migración de cianobacteria a la superficie para evitar la exposición tóxica al sulfhídrico (generado durante la noche por la actividad de sulfatorreductores), y bacterias rojas del azufre que empezarían a usar la luz incidente para iniciar la fotosíntesis. Por el contrario, a las 3:00 pm el máximo de biomasa viable se detectó en las capas subyacentes a la superficial; lo cual podría explicarse como resultado de lisis celular en la superficie debido a la elevada irradiancia o por un aumento de la presencia de heterotrofos aeróbicos en la capa fótica en asociación metabólica con los productores primarios (Grötzschel □ de Beer, 2002).

Los perfiles vertical indicaron una tasa de crecimiento menor (índice *cyclo*/ω7*c* alto) en las capas más profundas. Con ello, se sugiere un aumento en la actividad de bacterias sulfatorreductoras y anaeróbicos fermentadores especialmente en las muestras recogidas por la mañana, ya que las condiciones anóxicas nocturnas inducen el desarrollo de estas poblaciones que usan el exceso de carbono producido durante el día pero se ven limitados de otros nutrientes. Por otra parte, a las 3:00 pm se observó una reducción de la tasa de crecimiento en la superficie y en las capas medias del tapete. Esto podría deberse al estado fisiológico en el que se encuentran las cianobacterias y bacterias rojas del azufre que, tras la fotosíntesis activa que se da por la mañana, se encontrarían limitadas en su crecimiento por nutrientes esenciales. La reducción en la tasa de crecimiento también podría atribuirse a los heterotrofos que se encuentran en la capa fótica y reciclan el fotosintato generado por los fototrofos y aumentan el consumo de oxígeno en este nicho (Epping □ Kühl, 2000). El estrés metabólico se determinó como el índice de ácidos grasos con configuración *trans* respecto a la *cis* (Heipieper *et al.*, 1992), y se detectó el máximo nivel de estrés (valor de 1.5) en las capas superficiales en las muestras de las 8:00 am.

La caracterización de la comunidad mediante PLFAs indicó una dominancia de Gram-negativos por la mañana (PLFAs monoenóicos). Además, los PLFAs propios de Gram-positivos presentaron un mayor porcentaje en las capas medias y profundas (máximo 2□6%). Por la tarde, la proporción the PLFAs de anaeróbicos fue mayor (12.□%) que a las 8:00 am, y aumentó con la profundidad. Los análisis de DGGE (Fig. X.□) observaron una importante contribución de heterotrofos aeróbicos en las capas superiores sobretodo por la mañana. Este hecho apoya la hipótesis anteriormente mencionada sobre el papel de este grupo en la mineralización de fotosintatos en la capa fótica. Un gran número de bandas secuenciadas presentaron homología con el género *Halanaerobium* (fermentadores anaeróbicos), que se ha descrito en ecosistemas marinos (Ollivier *et al.*, 199□; Edder *et al.*, 2001). Estos datos concuerdan con la predominancia detectada por PLFAs de Gram-positivos a las 8:00 am, ya que probablemente esta población de Gram-positivos podría explotar los 'micronichos' anaerobios con alto contenido en compuestos orgánicos abundantes a primera hora de la mañana. La presencia de bandas homólogas al género *Chloroflexus* sp. fue abundante e indica la importancia de este grupo en tapetes microbianos (Nübel *et al.*, 2001, 2002; Fourçans *et al.*, 200□). El dendrograma del índice de divergencia *D* indicó que las diferencias entre las muestras relacionadas con la profundidad parecen tener una mayor influencia que los cambios temporales.

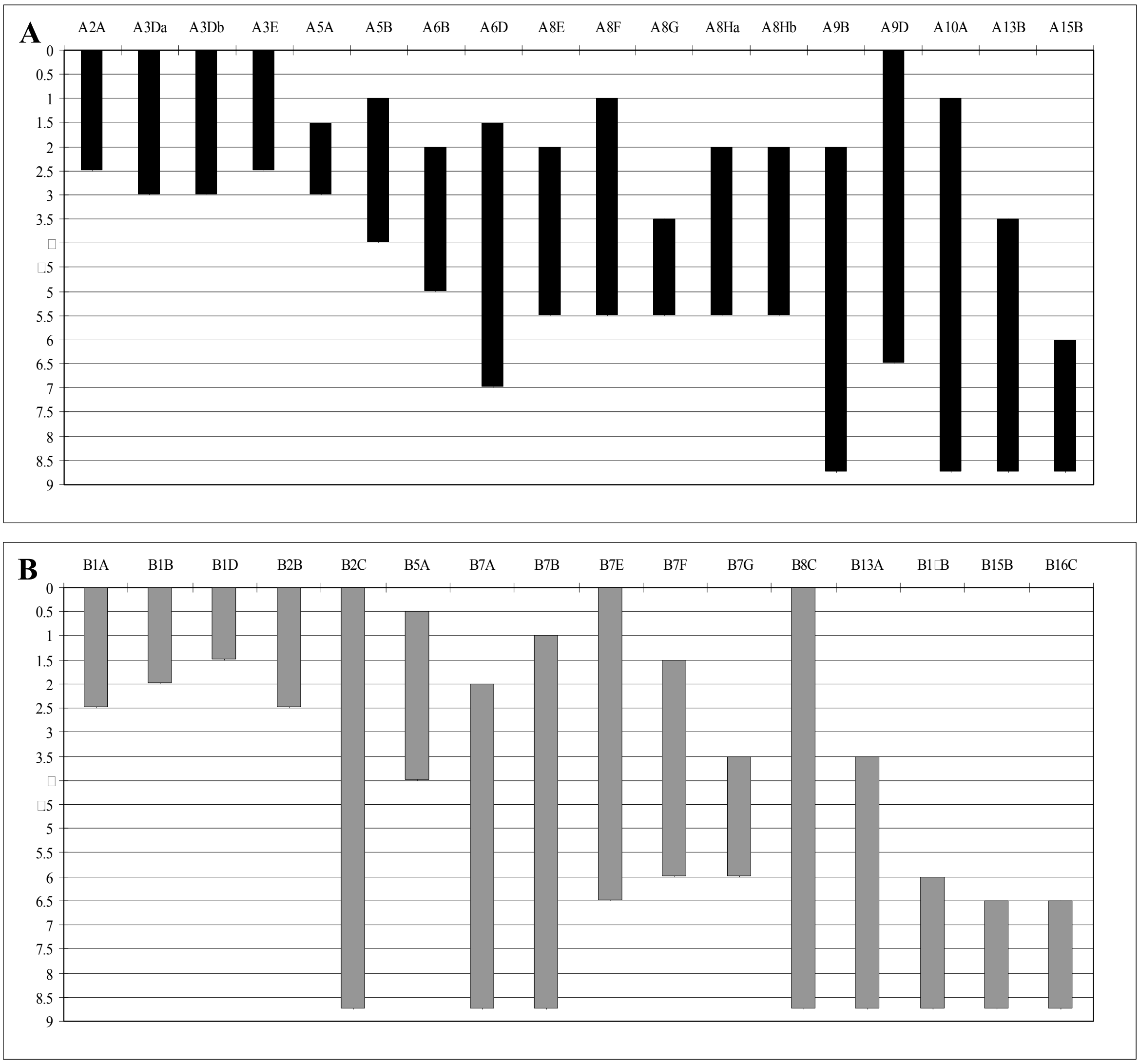


Figura X.□ Distribución de las bandas DGGE a las 8:00 am (A) y a las 3:00 pm (B).

Homología: A2$_{A}$, B1$_{A}$, B1$_{D}$ *Psychroflexus*; A5$_{A}$, A5$_{B}$, A6$_{D}$, A10$_{A}$, B13$_{A}$ *Halanaerobium*; A3$_{E}$, B2$_{B}$, *Marinobacter* (γ-Proteobacteria); A6$_{B}$, A9$_{B}$, A9$_{D}$, B5$_{A}$, B7$_{A}$, B7$_{F}$, B7$_{G}$, B16$_{C}$, *Bacteroidetes*; A8$_{E}$, A8$_{G}$, A8$_{H}$, B15$_{B}$, *Chloroflexi*; A15$_{B}$, Clostridia; B2$_{C}$, *Microcoleus*.

Los índices de diversidad de Shannon-Weaver y Simpson, que se calcularon con los datos de PLFA y DGGE, mostraron valores similares en todas las muestras lo cual sugiere un mantenimiento estable de este tipo de comunidades microbianas. Aun así, se observó una disminución en los valores de los índices a las 3:00 pm entre □.5 y 5 mm de profundidad. Este hecho, podría atribuirse a la estratificación de la comunidad por el establecimiento de gradientes opuestos de oxígeno y sulfhídrico (quimioclina).

4. CONCLUSIONES

- Las determinaciones de biomasa viable (PLFAs totales), índice metabólico (*cyclo*/ω7*c*) y estrés fisiológico (índice *trans*/*cis*) en muestras de tapetes microbianos tomadas a las 8:00 am y a las 3:00 pm, sugieren la existencia de procesos dinámicos durante un ciclo diario. Estos procesos, estarían relacionados con la actividad de los organismos fototrofos, con los heterotrofos asociados a éstos en procesos de remineralización de carbono y respiración, y con bacterias sulfatorreductoras y anaerobios fermentadores especializados en nichos anaeróbicos.

- La determinación de la composición de la comunidad por análisis de PLFAs y DGGE, observó una mayor distribución de anaerobios en todo el perfil vertical a primera hora de la mañana y la presencia de Gram-positivos en las capas medias y profundas. La secuenciación de las bandas DGGE demostró la presencia de bandas homólogas al *Halanaerobium* (anaerobio fermentador) que podría aprovechar las condiciones anaeróbicas del tapetes cuando aún no se han iniciado los procesos fotosintéticos. A las 3:00 pm, se observó una estratificación más marcada de las poblaciones integrantes con mayor proporción de anaerobios en las capas más profundas. Las secuencias DGGE mostraron también homología con miembros de *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* en las capas superficiales y miembros relacionados con el género *Chloroflexus*.

- Los análisis de los índices de divergencia y diversidad demostraron que las diferencias relacionadas con la profundidad tenían más influencia que los cambios temporales. Este hecho fue corroborado por los índices de diversidad que indicaron el mantenimiento estable de la diversidad.

ESTADO REDOX Y COMPOSICIÓN MICROBIANA EN TAPETES MICROBIANOS DE DIFERENTE LOCALIZACIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El análisis de quinonas respiratorias ha ganado reconocimiento como un enfoque simple y útil para estudiar la estructura de comunidades microbianas, determinar su estado redox y establecer su biomasa (Hedrick □ White, 1986; Hiraishi, 1998; Hiraishi *et al.*, 2003). La composición de la comunidad también se ha determinado por el análisis de PLFAs, pero tienden a ser comunes y no permiten una clasificación correcta. Por ello, el estudio de lípidos polares intactos se ha propuesto como alternativa para determinar las fuentes de los lípidos polares mayoritarios (Ward *et al.*, 199□). Los lípidos polares intactos son objetivos analíticos interesantes ya que son taxonómicamente más específicos, y evitan la exclusión de señal de microorganismos con lípidos-éter presentes en arqueas y diversas bacterias.

Los miembros del dominio *Archaea* representan una fracción considerable en ecosistemas marinos y terrestres, lo cual indica que este dominio debe tener un gran impacto en los ciclos globales de materia y energía. El dominio *Archaea* está dividido en *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota*, *Korarchaeota*. Estudios moleculares recientes, han demostrado la presencia de miembros de este dominio en tapetes microbianos (Ramirez-Moreno *et al.*, 2003; Blumenberg *et al.*, 2005), aunque la afiliación y fisiología de este grupo es todavía desconocida. El objetivo de este capítulo fue: (i) determinar cómo los cambios relacionados con la profundidad y la lugar de muestreo afectan a la composición de quinonas de diferentes tapetes microbianos, (ii) identificar lípidos polares intactos de grupos microbianos específicos, y (iii) clonar y secuenciar fragmentos del 16S rDNA de arqueas amplificados de muestras de tapetes microbianos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Se muestrearon tapetes microbianos del delta del Ebro, de la Camarga y de un estanque hipersalino. Los dos primeros se seccionaron por criomicrotomía generando 15 muestras de 500 µm de profundidad (7.75 mm total), aunque los tapetes del delta del

Ebro también se trataron como un 'core' entero. Los lípidos totales de las muestras se extrajeron y fraccionaron por cromatografía de ácido silícico. La fracción de lípidos neutros se analizó por cromatografía líquida/espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS) según lo descrito en Geyer *et al.* (200□). Ubiquinonas (Q-*n*), menaquinonas (MK-*n*), demetilmenaquinonas (DMK-*n*), plastoquinonas (PQ-*n*), filoquinona (K_1). El índice de divergencia microbiana de ubiquinonas y menaquinonas (*MD* ub+mk), el índice bioenergético (*BD* ub+mk) y el índice de divergencia entre las muestras (*D*), se calcularon según Iwasaki □ Hiraishi (1998). Los valores *D* se emplearon para la construcción de un dendrograma según 'Neighbor-joining' (Saitou □ Nei, 1987).

Los lípidos polares intactos se analizaron de la fracción polar resultante de la cromatografía mediante LC-MS/MS según Fang *et al.* (2000) con modificaciones. Muestras de tapetes del delta del Ebro y de la Camarga como 'cores enteros' se liofilizaron y homogeneizaron. El DNA de estas muestras se extrajo con el kit 'Power Soil™ de Mobio Labs, y se amplificó un fragmento del 16S rDNA con oligonucleótidos específicos de arqueas (Bano *et al.*, 200□). Los fragmentos amplificados se clonaron en el vector pGEM-T (Promega) para ser secuenciados posteriormente.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La abundancia detectada de Q-8 y Q-10 a todas las profundidades en tapetes del delta del Ebro, sugiere dominancia de α-, β-, y γ-Proteobacteria (probablemente *Rhodobacteraceae*, bacterias rojas del azufre, *Halomonas*, *Beggiatoa*, *Thiomicrospira*, y *Alteromonadaceae*). Los tapetes de la Camarga mostraron una mayor presencia de MK-9 en las capas superficiales y de Q-8 en las capas más profundas, lo cual es consistente con una importante contribución de *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Bacteroides* en la capa fótica (Fig. X.5). Además el elevado %mol de MK-□, 8 y 10 en las capas superficiales de estos tapetes también sugiere la presencia de bacterias verdes no del azufre (*Chloroflexus*) que han sido previamente detectadas por análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (T-RFLPs; Fourçans *et al.*, 200□).

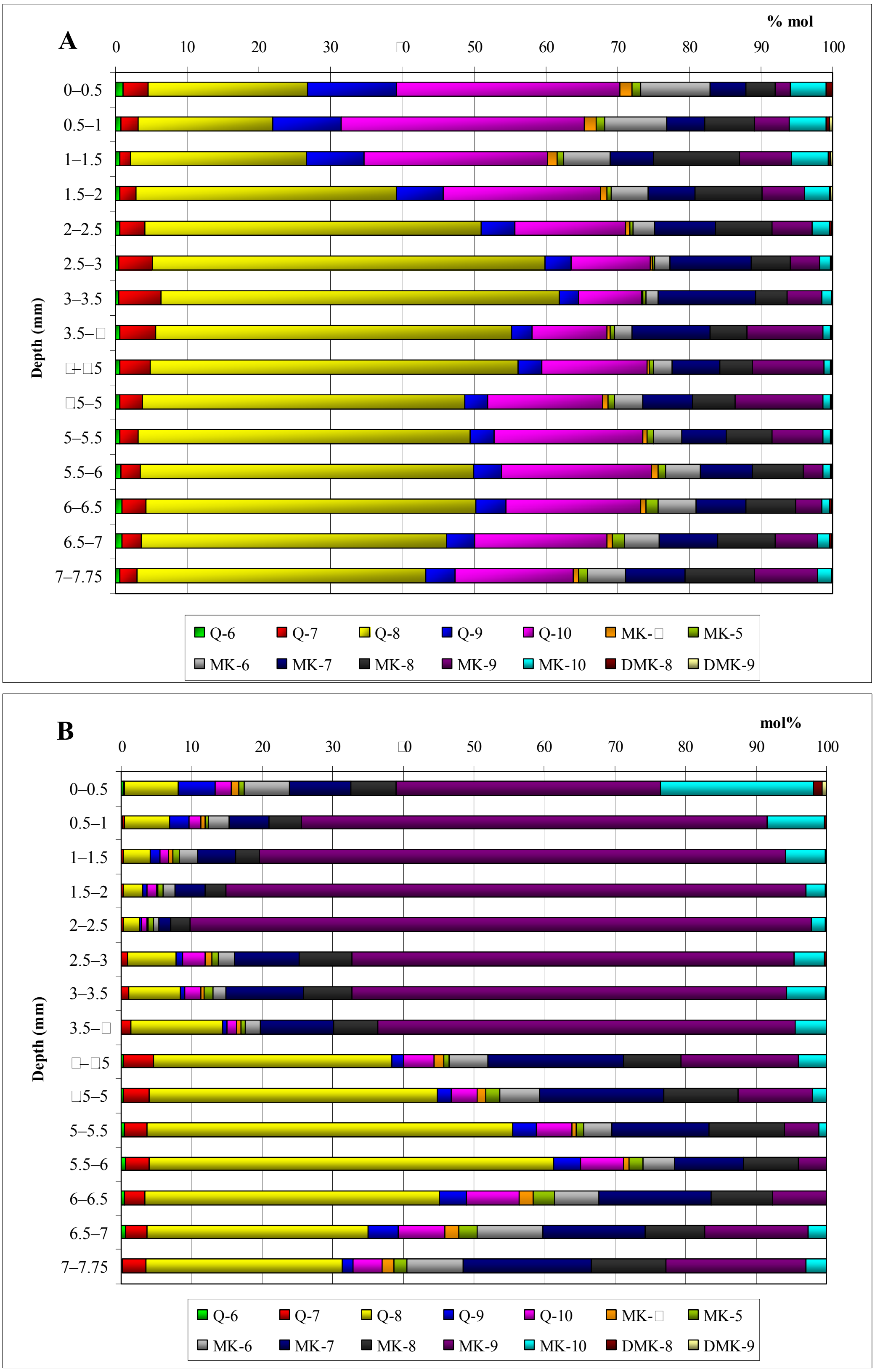


Figura X.5. Composición de quinonas en tapetes del delta del Ebro (A) y Camarga (B).

También se detectaron cantidades considerables de quinonas fotosintéticas (PQ-9 y K_1) en ambos tapetes, y aunque en los tapetes de la Camarga la cantidad fue un orden de magnitud mayor, ambos sistemas presentaron la misma distribución vertical. Este hecho apoya la idea que cuando una muestra de tapete se analiza como un ‘core’ entero se están determinando más una unidad funcional de tapete microbiano, y por ello tras una disminución progresiva en capas profundas de las quinonas fotosintéticas éstas empezaron a incrementar de nuevo.

La composición de quinonas del ‘estanque salino’ presentó un porcentaje abundante de MK-8, marcador de arqueas, que coincide con una importante contribución de *Halobacteriales* halofílicos en estos ecosistemas (Mouné *et al.*, 2003). La MK-7, atribuida a *Bacillus* halofílicos (Yoon *et al.*, 200□a,b) y la Q-8 (γ-Proteobacteria; *Salinimonas*, *Salinivibrio*, *Halomonas*; Yeon *et al.*, 2005) también fueron predominantes. La muestra de tapete del delta del Ebro tratada como un ‘core entero’ presentó diferencias con la muestra del mismo tapete seccionada en capas, ya que el ‘core entero’ presentó una elevada contribución de MK-9 (y de K_1 y Q-8), que puede deberse a que el análisis en profundidad de un ‘core entero’ es aproximadamente □ veces más que los 7.75 mm analizados en fracciones, por lo cual las capas subyacentes estarían sometidas a condiciones anóxicas que favorecerían en desarrollo de poblaciones microbianas anaeróbicas. El estado redox de las comunidades se determinó según el índice ubiquinonas/menaquinonas (UQ/MK), y se observó un estado más aeróbico o microaerofílico en todas las capas del tapete del delta del Ebro. Además, el dendrograma construido con los datos del índice de divergencia (*D*) determinó que las muestras parecían estar más influenciadas por diferencias relacionadas con la profundidad.

Paralelamente, se realizó la detección de lípidos polares intactos en las fracciones de lípidos polares de las muestras del delta del Ebro. Los lípidos más abundantes fueron los fosfatidilgliceroles (PG), aunque también se detectó la presencia de sulfoquinovosildiacilgliceroles (SQD) que se han descrito como uno de los lípidos mayoritarios en cianobacterias (Gage *et al.*, 1992; Keusgen *et al.*, 1997). La mayor cuantificación de fosfolípidos se detectó en 2.5−3 mm de profundidad, a excepción de C18:0/C18:1-SQD con valores máximos en 3−3.5 mm y C18:0/C18:1-PG en 0.5−2.5

mm. En este estudio, se ha llevado a cabo una detección preliminar de lípidos con enlaces tipo éter de arqueas en tapetes microbianos, pero no hemos podido asignar los valores *m/z* (masa-carga) de los espectros de masas a lípidos-éteres específicos. En este aspecto, las futuras investigaciones estarán centradas en la detección de estos lípidos de arqueas que se supone que contribuyen de forma importante al contenido de lípidos polares en los tapetes. Este hecho está avalado por la abundancia de MK-7 y 8, marcadoras de arqueas, en estos ecosistemas. Además, las secuencias clonadas de los tapetes del delta del Ebro mostraron homología con miembros de *Euryarchaeotas*, en concreto con *Methanomicrobiales* y *Thermoplasmatales*; y este tipo de secuencias se han detectado previamente en diferentes localizaciones (Eder *et al.*, 1999; Benlloch *et al.*, 2002). Otras secuencias detectadas presentaron homología con *Crenarchaeotas*.

4. CONCLUSIONES

- La composición de la comunidad microbiana y el estado redox de tapetes microbianos del delta del Ebro y de la Camarga se ha determinado mediante el estudio de las diferencias estructurales de las quinonas respiratorias. La composición de quinonas ha revelado una predominancia de Q-8 y Q-10 (α- y γ-Proteobacteria) en tapetes del delta del Ebro, y de MK-9 (*Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Bacteroides*) en la superficie de los tapetes de la Camarga. La detección de quinonas fotosintéticas (PQ-9 y K_1) indicó que los tapetes de la Camarga presentaban mayor biomasa fotosintética. La composición de quinonas en el 'estanque salino' reveló la predominancia de miembros de arqueas, *Bacillus* halofílicos y γ-Proteobacteria.

- El índice UQ/MK determinó que los tapetes del delta del Ebro eran más aeróbicos o microaerofílicos. La representación gráfica del índice de divergencia (*D*) destacó que las muestras se encontraban más influenciadas por diferencias relacionadas con la profundidad.

- La determinación de lípidos polares intactos en tapetes del delta del Ebro reveló la predominancia de fosfatidilgliceroles y sulfoquinovosildiacilglicerol, propio de cianobacterias. Por otra parte, las secuencia de arqueas clonadas en este ecosistema presentaron afiliación con miembros de los filos *Euryarcheota* y *Crenarchaeota*.

VARIACIONES ECOFISIOLÓGICAS EN UN CICLO CIRCADIANO

1. INTRODUCCIÓN

Tal y como se mencionó en la introducción y en el primer capítulo, el análisis de biomarcadores lipídicos señal proporciona información de la biomasa viable, el estado fisiológico y la composición de la comunidad microbiana. Esta información suele venir aportada por los ácidos grasos de los fosfolípidos (PLFAs) que se analizan en la fracción de lípidos polares y que son uno de los biomarcadores lipídicos de mayor interés. Aparte de los PLFAs, otras clases lipídicas pueden aportar información sobre la composición de las poblaciones y del estado nutricional, por ejemplo los plasmalógenos (propios de anaeróbicos estrictos, Clostridia y algunos Gram-negativos; Moore *et al.*, 199□) y los esfingolípidos encontrados en *Sphingomonas* y *Bacteroides*, entre otros (Kato *et al.*, 1995). En este estudio se ha aplicado la metodología de biomarcadores lipídicos señal con la identificación y el análisis de las diferentes clases lipídicas incluidas en las fracciones de lípidos polares, glicolípidos y lípidos neutros.

Por ello, los objetivos de este capítulo fueron: (i) monitorizar los cambios en la biomasa microbiana y evaluar situaciones de privación de nutrientes, estrés fisiológico, crecimiento no balanceado y estado redox, (ii) analizar la composición de la comunidad por PLFAs, contenido en quinonas y presencia de biomarcadores lipídicos específicos de grupos, y (iii) aislar cepas representativas de bacterias sulfatorreductoras y Gram-positivos anaeróbicos y analizar el contenido de dimetilacetales en sus membranas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de tapetes microbianos del delta del Ebro se muestrearon como ‘cores enteros’ en Octubre del 2002 durante un ciclo diario cada tres horas. Se extrajeron los lípidos totales de las muestras y se fraccionaron mediante cromatografía de ácido silícico. La fracción de lípidos polares se analizó según el protocolo secuencial explicado en el primer capítulo, y se obtuvieron los FAMEs, los dimetilacetales (DMAs) derivados de los plasmalógenos y los componentes detectados en el paso ‘D’ tras la hidrólisis ácida fuerte. El polihidroxibutirato (PHB) y valerato (PHV) se detectaron y cuantificaron según el método de Elhottová *et al.* (2000) que se validó previamente. El contenido de quinonas respiratorias se evaluó en la fracción de lípidos neutros tal y como se mencionó en capítulos previos. Los índices de divergencia microbiana (*MD* ub+mk) y de divergencia bioenergética (*BD* ub+mk) se calcularon con los datos de %mol de las quinonas detectadas.

El aislamiento de bacterias sulfatorreductoras y Gram-positivos anaeróbicos de tapetes microbianos se realizó con medios selectivos en condiciones de anaerobiosis y tras un choque térmico en el caso de los endoesporulados. Las cepas aisladas se caracterizaron por microscopía electrónica y por secuenciación del 16S rDNA. Los lípidos totales de las cepas liofilizaron se extrajeron y fraccionaron. La fracción polar se trató para la cuantificación de FAMEs y DMAs. Las quinonas respiratorias también se determinaron.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores máximos de biomasa viable como PLFA y contenido de quinonas se detectaron a las 15:00. Posteriormente, a las 18:00 se observó una disminución drástica del contenido de PLFAs que coincidió con un aumento de DMAs. A pesar que el contenido de DMA aumentó al doble en este punto, solo representó el 13% del total de PLFA en picomoles por gramo de peso seco. El aumento de DMA puede atribuirse al aumento de la actividad de microorganismos anaeróbicos formadores de plasmalógenos (Gram-positivos de bajo %G+C como *Clostridium* y algunos sulfatorreductores; Rütters *et al.*, 2001). La composición de la comunidad determinada por los PLFAs indicó que los porcentajes relativos de los diferentes grupos permanecían estables a excepción del punto de las 18:00, ya que debido a la disminución de PLFAs se observó un mayor porcentaje relativo de anaeróbicos a expensas de la reducción de Gram-negativos. La composición de la comunidad según el contenido en quinonas también observó que los %mol eran similares en todos los puntos menos a las 18:00, donde se detectó una importante reducción en el contenido de todas las quinonas especialmente la MK-9, y un ligero aumento de la Q-8. Además se detectó que el contenido en quinonas diminuía durante la noche pero volvía a alcanzar los valores detectados en el día anterior, lo cual es consistente con la repetición de la dinámica diaria en este tipo de tapetes. La drástica disminución de la MK-9 puede estar asociada con la disminución de miembros de

Firmicutes, *Actinobacteria* y *Bacteroides*. Lo que parece sorprendente es que el aumento de DMAs a las 18:00 no se correspondió con un aumento en ninguna clase de quinona existente en los microorganismos con plasmalógenos en sus membranas.

Paralelamente, se aisló una cepa de bacterias sulfatorreductoras y una cepa Gram-positiva anaeróbica formadora de endosporas que fueron caracterizadas y nombradas *Desulfovibrio* sp. EBD y *Clostridium* sp. EBD (Fig. X.6). A pesar que estudios recientes han caracterizado la presencia de especies de *Clostridium* en tapetes microbianos antárticos (Spring *et al.*, 2003), este es el primer estudio que acredita la presencia de especies de *Clostridium* en tapetes microbianos de estuario. *Desulfovibrio* sp. EBD presentó abundancia de MK-6 en su fase de lípidos neutros, mientras que la quinona mayoritaria en *Clostridium* sp. EBD fue la MK-9, que se detectó con valores muy bajos en comparación con los valores observados en otros cultivos puros. La presencia de plasmalógenos se detectó únicamente en *Clostridium* sp. EBD.

Relacionado con lo mencionado anteriormente, un aumento en la actividad de miembros de este género a las 18:00 podría explicar el aumento de los DMAs sin suponer un aumento en un tipo de quinona. La MK-9 también podría atribuirse a miembros del género *Bacteroides*, que contribuyen de forma importante a la población de tapetes microbianos de la Camarga (capítulos anteriores). Este género también se caracteriza por la presencia de esfingolípidos en sus membranas. A pesar que en este estudio no se pudieron cuantificar las bases esfingoides en el paso 'D' del protocolo secuencial, se detectaron bases esfingoides de 18 y 19 carbonos. Además, se cuantificaron los ácidos grasos hidroxilados liberados en este paso y que, en teoría, proceden de los enfingolípidos. La cuantificación de éstos indicó una disminución a las 18:00 que podría explicar la reducción de miembros de este género y por lo tanto la reducción del contenido de MK-9.

A las 18:00 se detectó un aumento en el índice metabólico (*cyclo*/ω7*c* alto, tasa de crecimiento menor), aumento del estrés fisiológico (*trans*/*cis*), una mayor proporción de microorganismos anaeróbicos, mayor cuantificación de DMAs, mayor actividad respiradora (índice quinonas/PLFA), un carácter más aeróbico (índice UQ/MK mayor), mayor acumulación de PHB y PHV, y una menor proporción de biomasa viable. Este hecho puede deberse a una mayor actividad de microorganismos heterotrofos aeróbicos o facultativos que aprovecharían el exceso de carbono generado por los fototrofos, llegando a una situación de crecimiento no-balanceado con falta de nutrientes esenciales que induciría la acumulación de polímeros de reserva. La reducción de PLFAs y el aumento de los índices *cyclo*/ω7*c* y *trans*/*cis* a las 18:00 está claramente correlacionada con un situación de deprivación de nutrientes que no tiene porque implicar muerte celular, sino que puede deberse a una reducción del volumen celular y un uso preferente de ácidos grasos *cis* como mecanismo de supervivencia en situación de inanición (Guckert *et al.*, 1986).

4. CONCLUSIONES

- El análisis combinado de lípidos polares, glicolípidos y lípidos neutros en muestras de tapetes microbianos durante un ciclo diario mostró un cambio en la dinámica poblacional a las 18:00, con una disminución en la biomasa viable, un aumento de estrés metabólico, disminución de la tasa de crecimiento, aumento de dimetilacetales derivados de plasmalógenos, una mayor proporción de bacterias anaeróbicas, una mayor acumulación de biopolímeros, una mayor actividad respiradora y un carácter más aeróbico.

- En este punto, el aumento del contenido en DMAs no se correspondió con un aumento de ningún tipo de quinona propia de los microorganismos formadores de endosporas (*Clostridium* y microorganismos cercanos), y además se observó una disminución brusca de la MK-9. La incapacidad general de los miembros del género *Clostridium* de sintetizar quinonas y el hecho que la cepa aislada *Clostridium* sp. EBD presente plasmalógenos en sus membranas pero su contenido en MK-9 sea muy bajo, parece explicar la falta de aumento de quinonas relacionado con un aumento de DMAs. La reducción de MK-9 en este punto podría asociarse con una disminución del género *Bacteroides*, con contenido en esta menaquinona, y que estaría también relacionado con la disminución de ácidos grasos hidroxilados con enlaces amida de esfingolípidos sintetizados por este género.

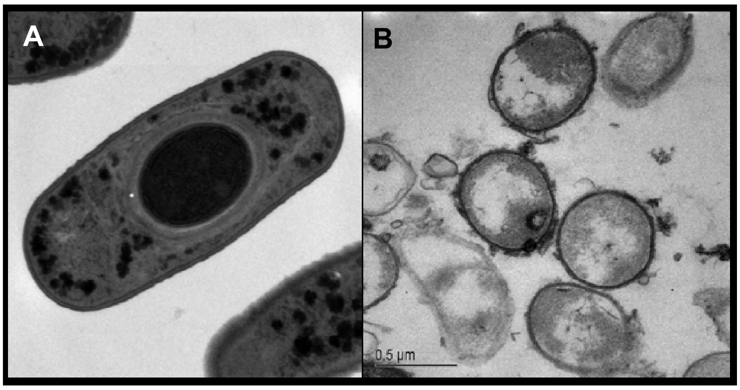


Figura X.6. Cepas aisladas: (A) *Clostridium* sp. EBD; (B) *Desulfovibrio* sp. EBD.

Tabla X.3. Biomarcadores microbianos medidos en los tapetes microbianos del delta del Ebro.

Muestra	12:00	15:00	18:00	21:00	24:00	3:00	6:00	9:00
Biomasa[1]								
Total PLFA	13570.□□	26882.51	7668.70	8933.01	110□5.57	8060.82	12772.□□	9708.78
Total DMA	1675.6□	18□□.18	3513.86	3□□.08	11□1.13	128□.81	1960.99	1073.33
Composición[2]								
Nsats	3.97	7.87	6.69	7.33	6.1□	11.37	5.05	9.28
BrM-MBrSats	29.□5	22.16	56.□6	3□.07	36.33	□1.1□	□3.96	□6.□□
TBrSats	□.11	9.26	10.83	7.18	8.09	10.99	8.□1	9.□1
Monoenóicos	53.36	50.65	18.□3	□2.16	39.□9	27.52	33.06	28.7□
Polienóicos	9.11	10.05	7.59	9.26	9.95	8.98	9.53	6.12
***MD* ub+mk**	758.88	75□.25	863.32	708.12	789.99	812.52	831.31	833.15
Fisiología[3]								
cyclo*/ω7*c	0.23	0.□1	0.5□	0.31	0.37	0.□6	0.26	0.□8
trans*/*cis	0.07	0.09	0.32	0.15	0.12	0.□0	0.18	0.21
PHB/PLFA	□.87	8.07	13.77	11.96	7.19	10.11	9.26	9.60
PHV/PLFA	35.08	27.87	190.17	□8.85	56.65	77.77	50.09	83.5□
UQ/MK+DMK	0.□1	0.37	0.62	0.28	0.□1	0.□□	0.□5	0.55
***BD* ub+mk**	190.9□	188.62	197.22	182.52	190.7□	192.18	192.66	195.65
Q/PLFA	2.□8	1.65	2.78	2.16	1.87	1.6□	1.□6	1.88

[1] Datos de biomasa como picomoles g^{-1}, DMA dimetilacetales; [2] Composición de la comunidad: NSats Saturados-Todos los géneros, BrM-MBrSats Ramificados monoenóicos y saturados ramificados en la mitad de la cadena-Anaeróbicos, TBrSats Saturados ramificados terminalmente-Gram positivos, Monoenóicos-Gram negativos, Polienóicos-Microeucariotas, *MD* ub+mk índice de divergencia microbiana de ubiquinonas y menaquinonas; [3] Estado fisiológico: índices *cyclo*/ω7*c* y *trans*/*cis*, PHB/PLFA polihidroxibutirato/PLFA en pmol g^{-1}, PHV/PLFA polihidroxivalerato/PLFA en pmol g^{-1}, UQ/MK+DMKs calculado con datos en %mol, *BD* ub+mk índice bioenergético, Q/PLFA quinonas totales/PLFA en pmol g^{-1}.

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS HETEROTROFAS AISLADAS DE LA CAPA FÓTICA

1. INTRODUCCIÓN

Los tapetes microbianos son áreas de intensa producción primaria. Durante la fotosíntesis, se producen compuestos orgánicos que son liberados parcialmente al ambiente. Existen pocos estudios basados en la diversidad y el papel de bacterias aeróbicas heterotrofas aunque algunos estudios han identificado filogenéticamente las poblaciones dominantes y han sugerido que las cepas aisladas están especializadas en la degradación de fotosintatos excretados por los productores primarios del sistema (Epping *et al.*, 1999; Van Trappen *et al.*, 2002; Jonkers □ Abed, 2003).

Algunos estudios han destacado la importancia de las bacterias aerobias heterotrofas de la capa fótica en la degradación de contaminantes (Cohen *et al.*, 1992; McGowan et al., 200□). El 'microhábitat' que rodea a las cianobacterias asegura la disponibilidad de oxígeno y nutrientes que son requisitos indispensables para la degradación aeróbica. Diversos géneros bacterianos se han caracterizado por presentar esta capacidad biodegradadora, p.ej. *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Marinobacter*, *Sphingomonas*, etc. (Bartha □ Atlas, 1977; Van Hamme □ Ward, 2001). Los objetivos de este capítulo fueron los siguientes: (i) el aislamiento y caracterización de bacterias heterotrofas asociadas con cianobacterias en la capa fótica, y (ii) el aislamiento y caracterización de miembros del género *Sphingomonas* sp. y la detección de esfingolípidos en sus membranas y en muestras de tapetes microbianos como indicadores de la capacidad 'potencial' de la comunidad de degradar contaminantes.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Cianobacterias filamentosas extraídas de tapetes microbianos del delta del Ebro, fueron micromanipuladas (micromanipulador Skerman) sobre placas de agar MN (agar mineral para el crecimiento de cianobacterias). El crecimiento heterotrofo generado entorno a las vainas de las cianobacterias se transfirió a placas de agar nutritivo salino (SWYP) para aislar las cepas en cultivo puro. La cepa aislada se caracterizó morfológicamente por microscopía óptica y electrónica, y bioquímicamente mediante pruebas de degradación en placa, API 50CH, API 20NE y API □YM (Biomèrieux). También se secuenció la molécula del 16S rDNA y se determinó su posición filogenética.

Se testó la capacidad de la cepa aislada de producir compuestos anti-bacterianos o auto-inhibidores según el método de Rao *et al.* (2005). Para determinar la relación entre la cepa aislada y las cianobacterias filamentosas del tapete se realizó un experimento basado en la inhibición de la fotosíntesis con DCMU ([3-(3',□'-diclorofenil)-1,1-dimetilurea). Una especie de cianobacterias filamentosas se traspasó a medio líquido con DCMU para inhibir la fotosíntesis. Posteriormente, los filamentos se transfirieron a placas de agar mineral con o sin DCMU y con inóculo y sin inóculo de la cepa del heterotrofo aislada. Por otra parte, muestras de cianobacterias filamentosas recogidas de tapetes se fijaron y se hibridaron con las sondas fluorescentes PSA18□ (específica del género *Pseudoalteromonas*) y con EUB388 (de eubacterias).

El aislamiento de cepas del género *Sphingomonas* se realizó en tapetes microbianos del delta del Ebro y de la Camarga mediante el método propuesto por Vanbroekhoven *et al.* (200□) basado en la resistencia de este género a concentraciones altas de estreptomicina y a su pigmentación amarilla. La cepa aislada se caracterizó morfo-bioquímicamente y su molécula del 16S rDNA se secuenció. Paralelamente, se extrajeron los lípidos totales de la cepa aislada, de cepas de *Sphingomonas* de colección y de muestras de tapetes microbianos del delta del Ebro y de la Camarga., y se trataron mediante el protocolo de Leung *et al.* (1999) para la determinación de esfingolípidos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una única cepa se aisló del crecimiento heterotrofo entorno a la cianobacteria filamentosa micromanipulada (Fig. X.7). La cepa se identificó como Gram-negativa, anaeróbica facultativa, oxidasa y catalasa positiva, de 0.5−0.8 µm de ancho y 1.7−□µm de largo, no forma endosporas ni acumula PHB. La cepa se caracterizó por ser muy versátil con un amplio rango de crecimiento en diferentes pH (5−10), temperatura (□−35ºC), y salinidad (1.5−10% NaCl), una amplia gama de actividades enzimáticas (lipasa, proteinasa, hemolisina, DNasa, amilasa, etc.). Además, se observó actividad biosurfactante en el sobrenadante de cultivos de la cepa, y sensibilidad a diferentes antibióticos. La quinona mayoritaria detectada fue la Q-8 y los ácidos grasos principales de la membrana fueron 1□:0, 16:0, *a*17:0, y *br*16:1. La secuenciación del 16S rDNA sugirió su clasificación como miembro del género *Pseudoalteromonas*, y aunque presentó un elevado porcentaje de homología con la especie *Pseudoalteromonas elyakovii* (Sawabe *et al.*, 2000), sus características metabólicas recomiendan su clasificación como especie nueva. Hasta ese momento, le asignaremos el nombre de *Pseudoalteromonas* sp. EBD.

El ensayo de interacción entre cianobacterias filamentosas y *Pseudoalteromonas* sp. EBD determinó que en las placas de agar de medio mineral con DCMU inoculadas con la cianobacterias y las cepas de *Pseudoalteromonas* sp. EBD se desarrollaron colonias de heterotrofos mayores en aquellas zonas en contacto con el inóculo de cianobacterias. Por otra parte, Las placas control inoculadas únicamente con la cianobacteria y sin DCMU demostraron que las cianobacterias se recuperaban tras el tratamiento con el inhibidor del fotosistema II, por lo cual la incubación con DCMU no era letal. Estos resultados sugirieron que *Pseudoalteromonas* puede crecer a expensas de otros compuestos asimilables aparte del fotosintato generado por las cianobacterias, como por ejemplo componentes estructurales de la vaina de éstas. De hecho, la vaina de las cianobacterias proporciona un ambiente donde se concentran los nutrientes y actúa como elemento de protección para los heterotrofos (Lange, 1979). Las actividades enzimáticas de cepas de *Pseudoalteromonas* y su elevada versatilidad, pueden indicar la existencia de relaciones cooperativas de esta población de heterotrofos y de otros géneros como *Halomonas* (también aislada en los tapetes microbianos) en el reciclaje de nutrientes en la capa fótica y en relación directa con la población de cianobacterias. Relaciones cooperativas similares se han descrito en algas del género *Fucus* (Ivanova *et al.*, 2002a,b). Además, la aplicación de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) demostró la presencia dominante de miembros del género *Pseudoalteromonas* entorno a las vainas de cianobacterias filamentosas en tapetes (Fig. X.8).

Por otra parte, se ha realizado el aislamiento de otras bacterias heterótrofas de la capa fótica con capacidades metabólicas interesantes. El método de aislamiento de Vanbroekhoven *et al.* (200□) permitió el aislamiento de una cepa del género

Sphingomonas en tapetes de la Camarga. La cepa aislada es aerobia estricta, catalasa y oxidasa positiva, acumula PHB, y presenta un rango de de crecimiento entre 20−37ºC, pH 5−8, salinidad 0−2.5% NaCl. La secuenciación del 16S rDNA sugirió su clasificación como miembro de la especie *Sphingomonas melonis* (Buonario *et al.*, 2002) y la cepa se denominó *Sphingomonas* sp. Camargue. El análisis de bases esfingoides por el método de Leung *et al.* (1999), determinó la presencia de bases tanto en la cepa de *Sphingomonas* sp. Camargue como en los tapetes del delta del Ebro y la Camarga. La presencia de bases esfingoides en tapetes de la Camarga con un orden de magnitud mayor que en el delta del Ebro, y el hecho de que solo se hayan aislado miembros del género *Sphingomonas* en este sistema sugiere una mayor importancia de este grupo en estos tapetes. A pesar de ello, la abundancia de bases esfingoides también puede ser atribuida a miembros del género *Bacteroides*, que a su vez se detectaron en este tipo de tapetes mediante DGGE en uno de los capítulos anteriores.

4. CONCLUSIONES

- Se ha aislado una cepa Gram-negativa, anaeróbica facultativa, sin capacidad de acumular PHB, muy versátil a nivel enzimático, metabólico, y con un rango amplio de crecimiento en diferentes condiciones de pH, temperatura y salinidad, del crecimiento heterotrofo entorno a las vainas de cianobacterias filamentosas previamente micromanipuladas. La cepa se ha denominado *Pseudoalteromonas* sp. EBD.

- Ensayos de interacción de *Pseudoalteromonas* sp. EBD con cianobacterias inhibidas por DCMU, sugirieron la capacidad de la cepa heterotrofa de crecer a expensas de otros compuestos asimilables aparte de los fotosintatos, por ejemplo la vaina gelatinosa de las cianobacterias. Además, los ensayos FISH han demostrado la presencia de miembros del género *Pseudoalteromonas* entorno a las mencionadas vainas.

- Se ha aislado un miembro del género *Sphingomonas* en tapetes de la Camarga con capacidad de acumular PHB. Sus características morfoquímicas y filogenéticas sugieren su clasificación en la especie *Sphingomonas melonis*. Una mayor cuantificación de bases esfingoides mayor en los tapetes de la Camarga y el aislamiento del género *Sphingomonas* únicamente en este sistema, sugiere una mayor importancia de este grupo en estos tapetes microbianos.

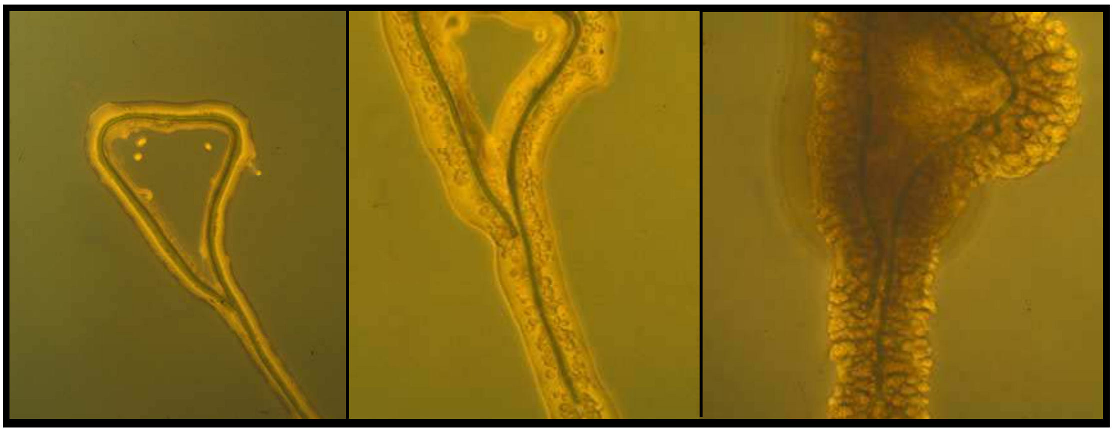


Figura X.7. Cianobacterias filamentosas micromanipuladas con un crecimiento heterotrofo entorno a las vainas.

De izquierda a derecha, incubación de 2, □y 12 días sobre agar mineral para cianobacterias a 20ºC y en condiciones de luz/oscuridad. Aumento 200×.

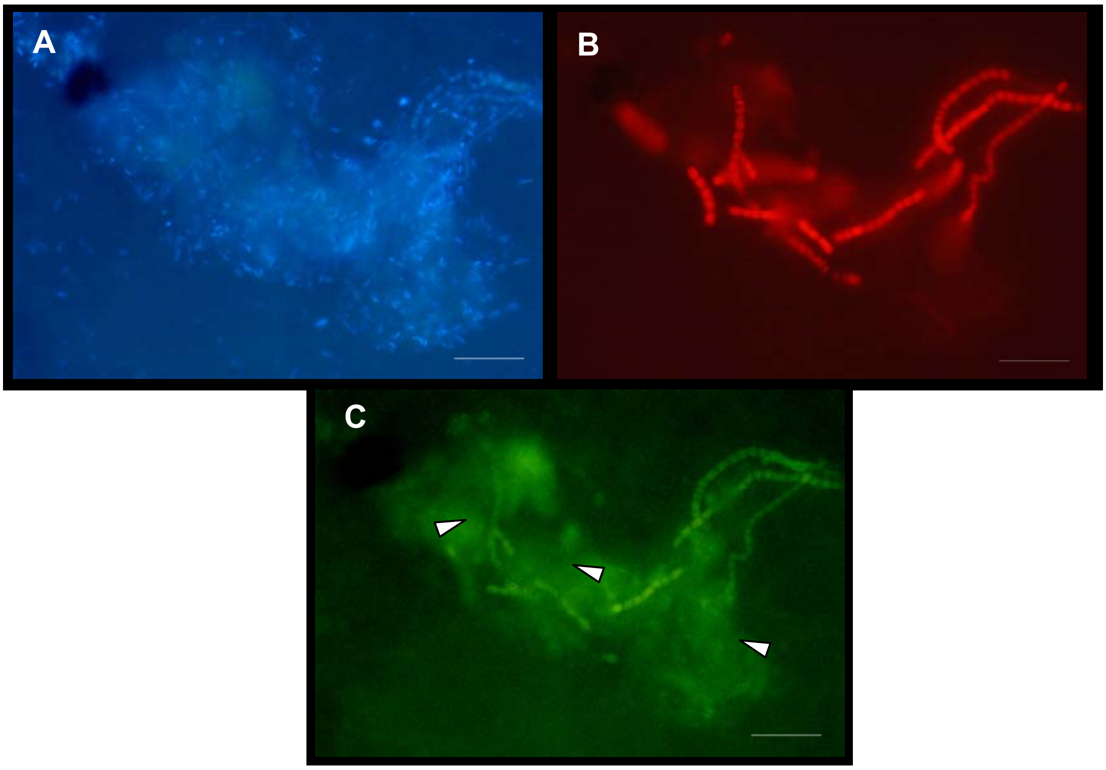


Figura X.8. Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) de cianobacterias de tapetes microbianos con la sonda PSA18□marcada con fluoresceína (FITC).

(A) Tinción DAPI; (B) Autofluorescencia de las cianobacterias; (C) Señal de fluorescencia de la fluoresceína. Las flechas indican tinción difusa en las vainas. Barra = 10 µm.

SUCESIÓN BACTERIANA EN AMBIENTES SULFUROSOS DE TAPETES MICROBIANOS

1. INTRODUCCIÓN

Los tapetes microbianos son sistemas dinámicos en los que se establecen zonas de transición por oposición de gradientes oxígeno-sulfhídrico (Fründ □ Cohen, 1992). Estas zonas son potencialmente inestables y su posición cambia durante los ciclos diarios, por lo cual los microorganismos que las ocupan desarrollan estrategias, tienen capacidad de migración y suelen oxidar compuestos reducidos del azufre para obtener energía. Se han realizado estudios para caracterizar la morfología de estos microorganismos microaerofílicos y móviles, pero aun se desconoce su afiliación taxonómica (Thar □ Kühl, 2002; Thar □ Fenchel, 2005). Entre estos microorganismos se han descrito miembros de bacterias oxidadoras del azufre como *Beggiatoa*, *Thiomicrospira*, *Thiovulum*, *Thiobacillus* y más recientemente *Arcobacter* (Nelson, 1992; Brinkhoff □ Muyzer, 1997; Wirsen *et al.*, 2002). Aparte de estas zonas de interfase, se han descrito otros ambientes ricos en azufre en los cuales se establecen relaciones sintróficas, p.ej. en los tapetes sulfurosos '*Thiodendron*' en los cuales se han observado consorcios de espiroquetas y sulfidogénicos (Dubinina *et al.*, 200□).

Por ello, los objetivos de este capítulo fueron: (i) el estudio de la sucesión bacteriana en ambientes ricos en azufre establecidos en el agua superficial de los tapetes, (ii) la caracterización morfológica y molecular de espiroquetas y espirilos observados en crecimientos masivos, y (iii) diseñar y aplicar sondas para la detección *in situ* por fluorescencia de grupos bacterianos previamente detectados en estos ambientes.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Tapetes microbianos del delta del Ebro se mantuvieron en el laboratorio como 'microcosmos' en condiciones similares a las del ambiente (luz/oscuridad, desecación, etc.). Se desarrollaron crecimientos masivos con alto contenido en azufre en el agua superficial de los tapetes, en los cuales se observaron sucesiones de poblaciones que se recogieron y fijaron para microscopía, FISH y análisis moleculares. La caracterización y evolución de las sucesiones se siguió por microscopía de contraste de fases, campo oscuro y tinción con azul de metileno. Las muestras obtenidas de 'blooms' de espiroquetas y espirilos se fijaron con glutaraldehido 2.5% para ser tratadas y visualizadas por microscopía electrónica de rastreo y transmisión. Las muestras se filtraron sobre filtros de policarbonato y se hibridaron las muestras con las sondas fluorescentes ARC82□(marcada con Cy3™) y UnSpiro (marcada con FITC), las cuales se optimizaron a diferentes concentraciones de formamida.

Para el aislamiento de miembros de los géneros *Thiomicrospira*/*Thiobacillus* en muestras de tapetes microbianos y 'blooms', se realizaron enriquecimientos en medios selectivos y diferenciales. Una vez aisladas en cultivo puro, las cepas crecidas en placa se trataron con doble fijación al vapor para microscopía de rastreo. La detección de la presencia de *Thiomicrospira* se realizó mediante la PCR de detección específica de género diseñada por Brinkhoff □ Muyzer (1997). Por otra parte, para determinar la composición de los 'blooms' observados, se realizó una amplificación PCR con oligonucleótidos universales para el 16S rDNA y el producto obtenido se clonó, seleccionó y secuenció posteriormente. La presencia de quimeras se descartó *in silico*.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El primer paso en la sucesión bacteriana observada en este tipo de 'blooms' fue la aparición de filamentos de *Beggiatoa*. Este hecho se ha asociado a una actividad reductora de sulfato alta en las capas profundas del tapete que aumenta la cantidad de sulfhídrico producido provocando un movimiento vertical de la interfase oxígeno−sulfhídrico y una migración vertical de *Beggiatoa*. Después del crecimiento masivo de *Beggiatoa*, se formó una matriz mucosa con alto contenido en azufre. La formación de estos velos se ha interpretado como un mecanismo de adaptación para reducir el intervalo de profundidad donde se solapan los gradientes oxígeno−sulfhídrico y como lugar de anclaje de microorganismos (Thar □ Kühl, 2002). Inicialmente, los velos aparecieron dominados por diferentes morfotipos de células vibriodes-espiriloides. Un morfotipo helicoidal de mayor tamaño presentaba acumulaciones de azufre en su citoplasma y podría estar relacionado con miembros del género *Thiospira* (Dubinina *et al.*, 1993). El movimiento de estas células helicoides estaba caracterizado por un direccionamiento hacia deposiciones de azufre y probablemente se encuentre relacionado con una 'quimiotaxis' hacia sustancias liberadas tras la degradación de células acumuladoras de azufre. Las observaciones de microscopía de rastreo indicaron la presencia de estructuras polares en este morfotipo que se asemejan al orgánulo polar multilaminar observado en miembros de ε-Proteobacteria (Ritchie *et al.*, 1966). El clonaje del 16S rDNA amplificado de estos 'blooms' determinó la presencia de secuencias homólogas al género *Arcobacter* (92% homólogas a '*Candidatus* Arcobacter sulfidicus'; Wirsen *et al*., 2002). A partir de esta secuencia, se diseñó la sonda específica ARC82□ que se aplicó a la muestra del 'bloom' por hibridación FISH. La hibridación fluorescente demostró la presencia de microorganismos con la mencionada secuencia en una elevada proporción y cuyo morfotipo no se correspondía con las células helicoides de mayor tamaño.

El siguiente paso en la sucesión bacteriana fue la aparición de un 'bloom' de espiroquetas de gran tamaño. La observación de la muestra reveló la presencia de una gran población de bacterias en forma de bacilo y de pequeño tamaño. Esta población de bacterias fue identificada como miembros del género *Thiobacillus*/*Thiomicrospira* mediante secuenciación del 16S rDNA, técnicas de cultivo selectivas, y la PCR específica diseñada por Brinkhoff □ Muyzer (1997). En este tipo de hábitat, los miembros de estos dos géneros tienen que competir con otras especies por el sulfhídrico como donador de electrones. Las espiroquetas de gran tamaño se observaron por microscopía de rastreo sobre filtros de 3 µm de diámetro de poro (Fig. X.10), y también a partir estos se realizó la amplificación del 16S rDNA de la población existente en la muestra. La secuencia de uno de lo clones obtenidos presentó homología con miembros del género *Spirochaeta* y más concretamente con *Spirochaeta* sp. M6 descrita por Dubinina *et al*. (200□) como una espiroqueta aerotolerante con capacidad de reducir compuestos del azufre como mecanismo de protección. Esta secuencia se empleó para diseñar la sonda fluorescente UnSpiro□65 que fue hibridada sin éxito sobre la muestra en cuestión. En este caso, las espiroquetas observadas en el 'bloom' no presentaron inclusiones de azufre citoplasmáticas durante los primeros estadios pero se detectaron inclusiones birrefringentes cuando la motilidad de las células y la concentración de sulfhídrico se redujo considerablemente. Por lo tanto, estas estructuras podrían atribuirse a compuestos de reserva, gránulos de azufre o estructuras de resistencia. Por otra parte, estas espiroquetas presentaron una respuesta quimiotáctica hacia ambientes ricos en azufre o sustancias liberadas por bacterias oxidadoras de azufre. Este hecho podría asociarse con una relación entre espiroquetas y otros grupos, tal y como se ha descrito en estudios previos sobre la relación de *Spirochaeta plicatilis* y *Beggiatoa* (Blakemore □ Canale-Parola, 1973). En conclusión, las respuestas de taxis bacterianas en interfases de 'clina' se consideran como ventajas de supervivencia, al igual que la formación de matrices mucosas como lugares de anclaje microbiano. La diversidad de espiroquetas y espirilos en este tipo de ambientes sugiere la existencia de relaciones metabólicas cooperativas entre diferentes grupos implicados en el ciclo del azufre.

4. CONCLUSIONES

- La ocurrencia y sucesión bacteriana se ha estudiado en ambientes ricos en azufre de tapetes microbianos, y se ha observado un primer estadio de dominancia de bacterias oxidadoras del azufre como *Beggiatoa*, posteriormente abundancia de morfotipos vibriodes–espiriloides y finalmente la aparición de poblaciones de espiroquetas.

- Los 'blooms' con morfotipos vibriodes–espiriloides estaban formados por células helicoides de gran tamaño, con gránulos de azufre citoplasmáticos, y con estructuras polares similares al orgánulo polar de ε-Proteobacteria. El clonaje del 16S rDNA indicó la presencia de secuencias similares a '*Candidatus* Arcobacter sulfidicus', y a partir de ésta se diseño la sonda ARC82□ La hibridación FISH de esta sonda detectó la presencia de bacterias cuyo morfotipo no se correspondía con las células helicoides.

- En el 'bloom' de espiroquetas se observó la presencia de *Halothiobacillus* y *Thiomicrospira* mediante cultivo y detección específica por PCR. Las espiroquetas de gran tamaño presentaron inclusiones citoplasmáticas birrefringentes a medida que envejecían. El clonaje del 16S rDNA de la muestra demostró la presencia de secuencias homólogas al género *Spirochaeta* y se diseñó la sonda UnSpiro□65 que se aplicará en el futuro para detectar y observar la dinámica de espiroquetas en tapetes microbianos.

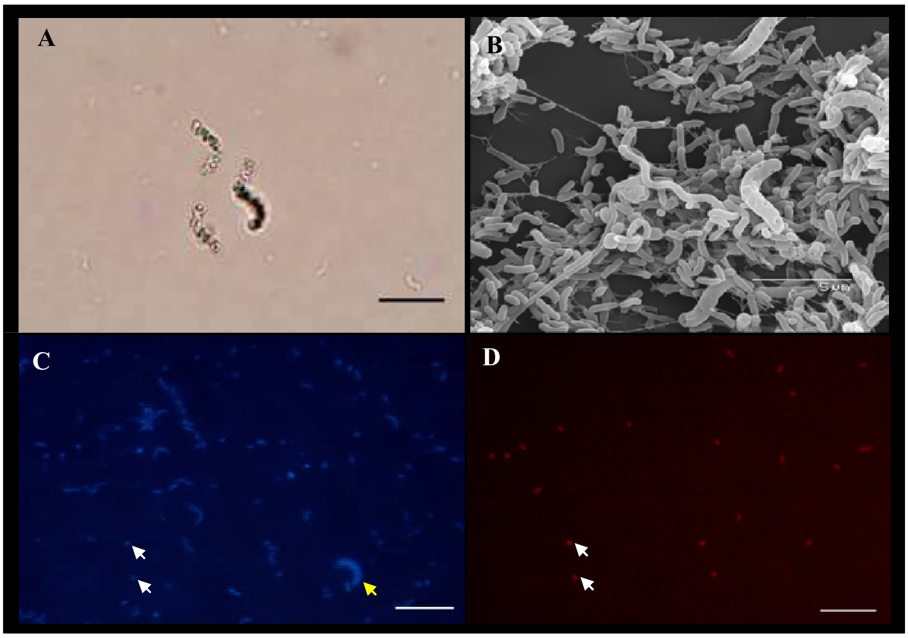


Figura X.9. ‘ Bloom’ de microorganismos vibrioides−espiriloides.

(A) Células helicoides de gran tamaño con los inclusiones de azufre citoplasmáticas; (B) Microscopía de rastreo que muestra la presencia de bacterias vibriodes de pequeño tamaño y espiroquetas; (C) Tinción DAPI de la muestra fijada; (D) Hibridación FISH con la sonda ARC82□ Las flechas blancas indican el morfotipo hibridado y en amarillo las células helicales grandes. Barra = 10 μm.

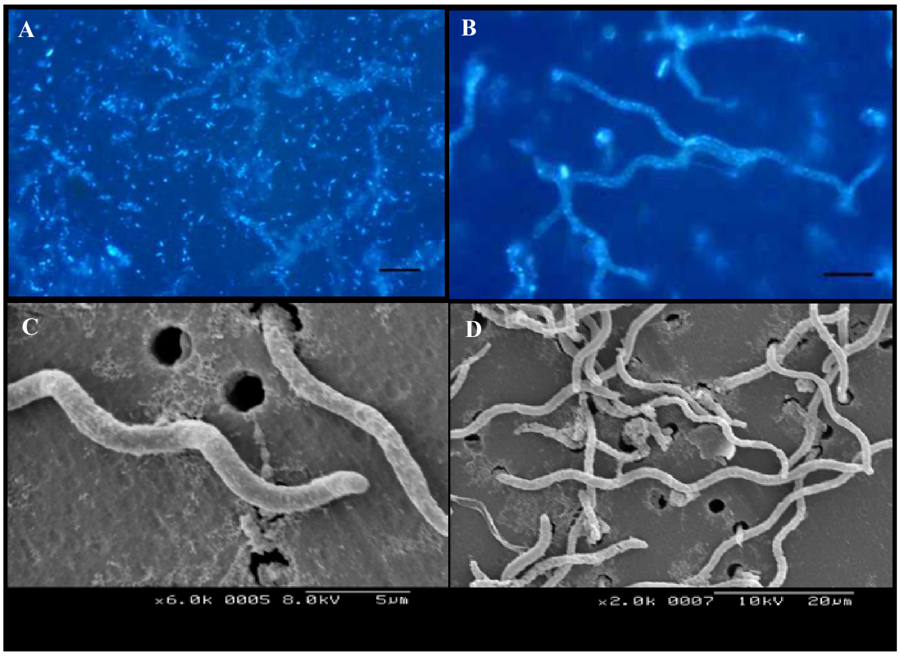


Figura X.10. ‘ Bloom’ de espiroquetas.

(A) DAPI de la muestra; (B) DAPI tras filtrar por filtro de 3 μm; (C y D) Microscopía de rastreo. Barra= 10 μm.

CONCLUSIONES

Los tapetes microbianos son ecosistemas estables que presentan una gran diversidad, por lo cual son una fuente de microorganismos no caracterizados y adaptados a la comunidad microbiana. Aunque se han realizado muchos estudios de los tapetes microbianos como modelo de ecosistema microbiano, aun existen muchas incógnitas sobre los ciclos bioquímicos, las asociaciones cooperativas y sobre la taxonomía de los miembros que integran este sistema.

El principal objetivo de este trabajo fue la aplicación de técnicas nuevas y la combinación con otras existentes para obtener una visión integrada de la estructura y fisiología, y también analizar la información obtenida por éstas para caracterizar poblaciones microbianas menos conocidas pero implicadas en procesos importantes. Se puede concluir que la aplicación de la técnica de biomarcadores lipídicos señal ha demostrado ser un método efectivo para obtener información sobre este tipo de ecosistemas. Sin embargo, se necesitan más estudios para aumentar la sensibilidad y la reproducibilidad con muestras naturales. Además, la combinación del análisis lipídico con métodos basados en ácidos nucleicos en tapetes microbianos a diferente profundidad, ha proporcionado información muy útil sobre la dinámica temporal y espacial de las poblaciones y sobre su afiliación taxonómica. Este estudio, ha revelado la importancia de bacterias heterotrofas en las capas fotosintéticas, la presencia de bacterias verdes del azufre en numerosos nichos, y de bacterias fermentadoras en las capas más profundas. Por otra parte, los análisis de divergencia han sugerido que los cambios relacionados con la profundidad parecen tener mayor influencia que los cambios temporales.

El análisis de quinonas respiratorias en muestras de tapetes ha aportado estimaciones de biomasa, composición taxonómica y estado redox de la comunidad. En este caso, se han observado importantes diferencias en la estructura de la comunidad y en el estado redox en tapetes microbianos de diferente localización, y que eran aparentemente bastante similares. Además, se ha realizado una detección preliminar sobre la composición de lípidos polares intactos que será mejorada en el futuro debido a su gran potencialidad taxonómica. Por otra parte, también se han detectado miembros del dominio *Archaea* en tapetes microbianos que podrían jugar un papel importante en la fisiología del sistema.

Las metodologías mencionadas anteriormente se aplicaron en tapetes microbianos durante un ciclo circadiano para evaluar la respuesta de la comunidad a cambios diarios. Se observó un patrón de respuestas fisiológicas que se reproducía diariamente, lo cual sugiere que los tapetes microbianos son ecosistemas complejos altamente predecibles. Durante este estudio, también se aisló una cepa anaeróbica esporulada, pero los estudios futuros se basarán en el aislamiento y caracterización de la diversidad de este grupo y cómo está implicado en los procesos diarios de los tapetes.

Los resultados obtenidos tras la aplicación de los análisis combinados, destacaron la importancia de las bacterias heterotrofas en la regulación de procesos metabólicos de la capa fótica. En este trabajo, se aislaron y caracterizaron dos cepas microbianas de las capas fotosintéticas. Se han demostrado las capacidades metabólicas de *Pseudoalteromonas* sp. EBD y su relación con las cianobacterias. A pesar de ello, se requieren más estudios que determinen el intercambio de nutrientes entre estos grupos. Por otra parte, se ha caracterizado un miembro del género *Sphingomonas* aunque se deberá determinar su importancia en el reciclaje de nutrientes y en la dinámica de polihidroxialcanoatos.

Finalmente, se ha estudiado la diversidad de oxidadores del azufre en las zonas de transición oxígeno-sulfhídrico. En este caso, estudios previos realizados en el grupo habían descrito morfotipos espiriloides y espiroquetas implicados de alguna forma en el ciclo del azufre. Por ello, se ha investigado la sucesión morfológica en estos crecimientos ‘masivos’ a fin de predecir su reproducibilidad. La aplicación de técnicas moleculares ha proporcionado información importante sobre la composición de estos crecimientos, y ha permitido el diseño de sondas que serán aplicadas en el futuro para detectar los microorganismos observados en tapetes. Además, se ha observado que los microorganismos detectados podrían formar estructuras de resistencia o acumular compuestos de reserva ante perturbaciones ambientales. Por ello, se está trabajando en esta línea para la detección de este tipo de estructuras que supondría un mecanismo microbiano alternativo a la formación de esporas.

XI. REFERENCES

Figure XI. Sampling in the ‘Halophilic ponds’ of the ‘Salines de la Trinitat’ (Ebro delta, Spain).

A

Ackman R. G. 1999. Comparison of lipids in marine and freshwater organisms. *In* Lipids in freshwater ecosystems, p. 263–298. M. T. Arts and B. C. Wainman (ed.). Springer-Verlag, NY

Al-Hasan R. H., D. A. Al-Bader, and N. A. Sorkhoh. 1998. Evidence for *n*-alkane consumption and oxidation by filamentous cyanobacteria from oil-contaminated coasts of the Arabian Gulf. *Marine Biol.* **130**:521–527

Altschul S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. **25**:3389–3402

Amann R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, and D. A. Stahl. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1919–1925

Amann R. I., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**:143–169

Amara A. A., and B. H. A. Rehm. 2003. Replacement of the catalytic nucleophile Cys-296 by serine in class II polyhydroxyalkanoate synthase from *Pseudomonas aeruginosa*-mediated synthesis of a new polyester:Identification of catalytic residues. *Biochem. J.* **374**:413–421

Amico V., G. Oriente, M. Piattelli, C. Tringali, E. Fattorusso, S. Mango, and L. Mayol. 1977. (-)-(R)-1-*O*-Geranylgeranylglycerol from the brown alga. *Experientia* **33**:989–990

Anderson A. J., and E. A. Dawes. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* **54**:450–472

Aragno M., and H. G. Schlegel. 1992. The mesophilic hydrogen oxidizing (Knallgas) bacteria. *In* The Prokaryotes, 2nd edn, p. 3917–3933. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.). Springer, NY

Armitage J. P. 1999. Bacterial tactic responses. *Adv. Microb. Physiol.* **41**:229–289

Awramik S. M. 1984 Ancient stromatolites and microbial mats. *In* Microbial mats: stromatolites, p. 1–22. Y. Cohen, R. W. Castenholz, and H. O. Halvorson (ed.). Alan R. Liss, New York, NY

B

Baker G. C., J. J. Smith, and D. A. Cowan. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods* **55**541–555

Balkwill, D. L., F. R. Leach, J. T. Wilson, J. F. McNabb, and D. C. White. 1988. Equivalence of microbial biomass measures based on membrane lipid and cell wall components, adenosine triphosphate, and direct counts in subsurface sediments. *Microb. Ecol.* **16**73–84

Bano N., S. Ruffin, B. Ransom, and J. T. Hollobaugh. 2004. Phylogenetic composition of Arctic ocean archaeal assemblages and comparison with Antarctic assemblages. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**781–789

Barbara G. M., and J. G. Mitchell. 1996. Formation of 30- to 40-micrometer-thick laminations by high-speed marine bacteria in microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**3985–3990

Barns S. M., C. F. Delwiche, J. D. Palmer, and N. R. Pace. 1996. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophily from environmental rRNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**9188–9193

Barr R., M. D. Henninger, and F. L. Crane. 1967. Comparative studies on plastoquinone II. Analysis for plastoquinones A, B, C and D. *Plan. Physiol.* **42**1246–1254

Bartha R., and R. M. Atlas. 1977. The microbiology of aquatic oil spills. *Adv. Appl. Microbiol.* **22**225–266

Bateson M. M., and D. M. Ward. 1988. Photoexcretion and fate of glycolate in a hot spring cyanobacterial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**1738–1743

Bauld J., and T. D. Brock. 1974. Algal excretion and bacterial assimilation in hot spring algal mats. *J. Phycol.* **10**101–106

Bauld J. 1984. Microbial mats in marginal marine environmentsShark Bay, Western Australia, and Spencer Gulf, South Australia. *In* Microbial matsstromatolites, p. 39–58. Y. Cohen, R. W. Castenholz, and H. O. Halvorson (ed.)Alan R. Liss, New York, NY

Bebout B. M., H. W. Paerl, J. E. Bauer, D. E. Canfield, and D. J. Des Marais. 1994. Nitrogen cycling in microbial mat communitiesthe quantitative importance of N-fixation and other sources of N for primary productivity, p. 265–272. *In* Microbial Mats, L. J. Stal and P. Caumette (ed.) NATO ASI Series, Vol. 35. Springer-Verlag, Berlin

Bebout B. M., T. M. Hoehler, B. Thamdrup, D. Albert, S. P. Carpenter, M. Hogan, K. Turk, and D. J. Des Marais. 2004. Methane production by microbial mats under low sulphate concentrations. *Geobiology* **2**:87–96

Beccari M., M. Majone, P. Massanisso, and R. Ramori. 1998. A bulking sludge with high storage response selected under intermittent feeding. *Wat. Res.* **32**:3403–3413

Belkin S., and H. W. Jannasch. 1989. Microbial mats at deep-sea hydrotermal vents: New observations, p. 16–21. *In* Microbial mats: physiological ecology of benthic microbial communities. Y. Cohen, and E. Rosenberg (ed.). American Society for Microbiology, Washington DC

Bender J., and P. Phillips. 2004. Microbial mats for multiple applications in aquaculture and bioremediation. *Bior. Tecnol.* **94**:229–238

Benlloch S., S. G. Acinas, J. Antón, López-López, S. P. Luz, F. Rodríguez-Valera. 2001. Archaeal biodiversity in crystallizer ponds from a solarn saltern: Culture versus PCR. *Microb. Ecol.* **41**:12–19

Benlloch S., A. López-López, E. O. Casamayor, L. Øvreås, V. Goddard, F. L. Daae, G. Smerdon, R. Massana, I. Joint, F. Thingstad, C. Pedrós-Alió, and F. Rodríguez-Valera. 2002. Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environ. Microbiol.* **4**:349–360

Benning C., Z. H. Huang, and D. A. Gage. 1995. Accumulation of a novel glycolipid and a betaine lipid in cells of *Rhodobacter sphaeroides* grown under phosphate limitation. *Arch. Biochem. Biophys.* **317**:103–111

Benson A. A., and B. Mauro. 1958. Piant phospholipids. I. Identification of the phosphatidyl glycerols. *Biochi. Biophys. Acta* **27**:189–195

Bergey, J. G. Holt, N. R. Krieg, and P. H. A. Sneath. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edition. J. G. Holt (ed.). Williams & Wilkins, Baltimore, MD

Bernard C., and T. Fenchel. 1995. Mats of colourless sulphur bacteria. II. Structure, composition of biota and successional patterns. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **128**:171–179

Berry J. A., and J. K. Raison. 1981. Responses of macrophytes to temperature, p. 277–338. *In* Physiological Plant Ecology, I Response to the physical environment, vol. 12a. O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond, and H. Ziegler (ed.). Springer-Verlag, Berlin

Bertocchi C., L. Navarini, A. Cesàro. 1990. Polysaccharides from cyanobacteria. *Carbo. Polym.* **12**:127–153

Bhat R. U., and R. W. Carlson. 1992. A new method for the analysis of amide-linked hydroxy fatty acids in lipid-A from gram-negative bacteria. *Glycobiology* **2**:535–539

Bishop N. I. 1958. The influence of the herbicide, DCMU, on the oxygen-evolving system of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **27**:205–206

Blakemore R. P., and E. Canale-Parola. 1973. Morphological and ecological characteristics of *Spirochaeta plicatilis*. *Arch. Mikrobiol.* **89**:273–289

van Bleijswijk J., and G. Muyzer. 2004. Genetic diversity of oxygenic phototrophs in microbial mats exposed to different levels of oil pollution. *Ophelia* **58**:157–164

Bligh E. G., and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**:911–917

Blumenberg M., R. Seifert, K. Nauhaus, T. Pape, and W. Michaelis. 2005. In vitro study of lipid biosynthesis in an anaerobically methane-oxidizing microbial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:4345–4351

Boon J. J., W. I. C. Rijpstra, F. De Lange, J. W. De Leeuw, M. Yoshioka, and Y. Sumizu. 1979. The Black Sea sterol–a molecular fossil for dinoflagellate blooms. *Nature* **277**:125–127

Boon N., W. De Windt, W. Verstraete, and E. M. Top. 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rDNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* **39**:101–112

Bouvier T., and P. A. del Giorgio. 2003. Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence *in situ* hybridization (FISH): a quantitative review of published reports. *FEMS Microbiol. Ecol.* **44**:3–15

Brambilla E., H. Hippe, A. Hagelstein, B. J. Tindall, and E. Stackebrandt. 2001. 16S rDNA diversity of cultured and uncultured prokaryotes of a mat sample from Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Extremophiles* 5:23–33

Brandl H., R. A. Gross, R. W. Lenz, and R. C. Fuller. 1988. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1977–1982

Braunegg G., B. Sonnleitner, and R. M. Lafferty. 1978. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-*β*-hydroxybutyric acid in microbial biomass. *Eur. J. Appl. Microbiol.* **6**:29–37

Brinkhoff T., and G. Muyzer. 1997. Increased species diversity and extended habitat range of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3789–3796

Brinkhoff T., G. Muyzer, C. O. Wirsen, and J. Kuever. 1999a. *Thiomicrospira kuenenii* sp. nov., and *Thiomicrospira frisia* sp. nov., two mesophilic obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacterium isolated from an intertidal mud flat. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:385–392

Brinkhoff T., G. Muyzer, C. O. Wirsen, and J. Kuever. 1999b. *Thiomicrospira chilensis* sp. nov., a mesophilic obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacterium isolated from a *Thioploca* mat. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:875–879

Brisbarre N., M. L. Fardeau, V. Cueff, J. L. Cayol, G. Barbier, V. Cilia, G. Ravot, P. Thomas, J. L. Garcia, and B. Ollivier. 2003. *Clostridium caminithermale* sp. nov., a slightly halophilic and moderately thermophilic bacterium isolated from an Atlantic deep-sea hydrothermal chimney. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:1043–1049

Brune A., P. Frenzel, and H. Cypionka. 2000. Life at the oxic–anoxic interface: microbial activities and adaptations. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:691–710

Buckley D. H., J. R. Graber, and T. M. Schmidt. 1998. Phylogenetic analysis of nonthermophilic members of the kingdom crenarchaeota and their diversity and abundance in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4333–4339

Buonaurio R., V. M. Stravato, Y. Kosako, N. Fujiwara, T. Naka, K. Kobayashi, C. Cappelli, and E. Yabuuchi. 2002. *Sphingomonas melonis* sp. nov., a novel pathogen that causes brown spots on yellow Spanish melon fruits. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:2081–2087

Busse H.-J., P. Kämpfer, and E. B. M. Denner. 1999. Chemotaxonomic characterization of *Sphingomonas*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **23**:242–251

C

Canfield D. E., and D. J. Des Marais. 1993. Biogeochemical cycles of carbon, sulfur, and free oxygen in a microbial mat. *Geochim. Cosmochim. Acta* **57**:3971–3984

Cartwright N. J. 1957. The structure of serratamic acid. *Biochem. J.* **67**:663–669

Clejan S., T. A. Krulwich, K. R. Mondrus, D. Seto-Young. 1986. Membrane lipid composition of obligately and facultatively alkalophilic strains of *Bacillus* spp. *J. Bacteriol.* **168**:334–340

Casamayor E. O., C. Pedrós-Alió, G. Muyzer, and R. Amann. 2002. Microheterogeneity in 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations from stratified planktonic environment is related to temporal changes and to ecological adaptations. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1706–1714

Castelholz R. W. 1984. Composition of Hot spring microbial mats: a summary, p. 101–119. *In* Microbial mats stromatolites. Y. Cohen, R. W. Castelholz, and H. O. Halvorson (ed.). Liss, A. L. New York, NY

Castenholz R. W., J. Bauld, and B. K. Pierson. 1992. Photosynthetic activity in modern microbial mat-building communities, p. 279–285. *In* The proterozoic biosphere. J. W. Schopf, and C. Klein (ed.). Cambridge Univ. Press, New York, NY

Castenholz R. W. 1994. Microbial mat research: The recent past and new perspectives, p. 3–18. *In* Microbial mats. Structure, development, and environmental significance. L. J. Stal, and P. Caumette (ed.). Springer-Verlag, Berlin

Caumette P. 1989. Ecology and general physiology of anoxygenic phototrophic bacteria in benthic environments, p. 283–304. *In* Microbial mats: physiological ecology of benthic microbial communities. Y. Cohen, and E. Rosenberg (ed.). American Society for Microbiology, Washington DC

Caumette P., Y. Cohen, and R. Matheron. 1991. Isolation and characterization of *Desulfovibrio halophilus* sp. nov., a halophilic sulfate-reducing bacterium isolated from Solar Lake (Sinai). *Syst. Appl. Microbiol.* **14**:33–38

Caumette P., R. Matheron, N. Raymond, and J. C. Relexans. 1994. Microbial mats in the hypersaline ponds of Mediterranean salterns (Salins-de-Giraud, France). *FEMS Microbiol. Ecol.* **13**:273–286

Caumette P., R. Guyoneaud, J. F. Imhoff, J. Suling, and V. Gorlenko. 2004. *Thiocapsa marina* sp. nov., a novel, okenone-containing, purple sulfur bacterium isolated from brackish coastal and marine environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:1031–1036

Cavicchioli R., F. Fegatella, M. Ostrowski, M. Eguchi, and J. Gottschal. 1999. Sphingomonads from marine environments. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **23**:268–272

Chaillan F., M. Gugger, A. Sailot, A. Couté, and J. Oudot. 2005. Role of cyanobacteria in the biodegradation of crude oil by a tropical cyanobacterial mat. *Chemosphere* X:XX–XX (In Press)

Chen X. -L., Y. -Z. Zhang, P. -J. Gao, and X. -W. Luan. 2003. Two different proteases produced by a deep-sea psychrotrophic bacterial strain, *Pseudoaltermonas* sp. SM9913. *Mar. Biol.* **143**:989–993

Cogan N. G., and C. W. Wolgemuth. 2005. Pattern formation by bacteria-driven flow. *Biophys. J.* **88**:2525–2529

Cohen S. N., A. C. Chang, and L. Hsu. 1972. Nonchrosomal antibiotic resistance in bacteria:genetic transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **69**:2110–2114

Cohen Y., B. B. Jørgensen, E. Padan, and M. Shilo. 1975. Sulfide dependent anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Nature* **257**:489–492

Cohen Y. 1983. Oxygenic photosynthesis, anoxygenic photosynthesis, and sulfate reduction in cyanobacterial mats, p. 435–441. *In* Current perspectives in microbial ecology. M. J. Klug, and C. A. Reddy (ed.). American Society for Microbiology, Washington DC

Cohen Y., R. W. Castenholz, and H. O. Halvorson. 1984. Microbial mats. Stromatolites. Alan R. Liss, New York, NY

Cohen Y., and E. Rosenberg. 1989. Microbial mats. Physiological ecology of benthic microbial communities. ASM, Washington

Cohen Y. 2002. Bioremediation of oil by marine microbial mats. *Int. Microbiol.* **5**:189–193

Cole J. R., B. Chai, T. L. Marsh, R. J. Farris, Q. Wang, S. A. Kulam, S. Chandra, D. M. McGarrell, T. M. Schmidt, G. M. Garrity, and J. M. Tiedje. 2003. The Ribosomal Database Project (RDP-II):previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res.* **31**:442–443

Collins M. D., and D. Jones. 1981. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microbiol. Rev.* **45**:316–354

Collins M. D., and P. N. Green. 1985. Isolation and characterization of a novel coenzyme Q from some methane-oxidizing bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **133**:1125–1131

Cossins A. R., and M. Sinensky. 1986. Adaptation of membranes to temperature, preassure, and exogenous lipids, p. 1–20. *In* M. Shinitzky (ed.), Physiology of membrane fluidity, CRC Press, Boca Raton, FL

Crane F. L. 1965. Distribution of quinones, p. 183–206. *In* Biochemistry of quinones. R. A. Morton (ed.). Academic Press Inc., London, UK

Cytryn E., D. Minz, R. S. Oremland, and Y. Cohen. 2000. Distribution and diversity of archaea corresponding to the limnological cycle of a hypersaline stratified lake (Solar Lake, Sinai, Egypt). *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3269–3276

D

Daniel J., C. Deb, V. S. Dubey, T. D. Sirakova, B. Abomoelak, H. R. Morbidoni, and P. E. Kolattukudy. 2004. Induction of a novel class of diacylglycerol acyltransferases and triacylglycerol accumulation in *Mycobacterium tuberculosis* as it goes into a dormancy-like state in culture. *J. Bacteriol.* **186**:5017–5030

Davey M. E., and G. A. O'Toole. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:847–867

Dawes E. A. 1986. Microbial energy reserve compounds, p. 145–165. *In* Microbial energetics. E. A. Dawes (ed.), Blackie, Glasgow, UK

Decho A. W. 1994. Exopolymers in microbial mats: Assessing their adaptative roles. *In* Microbial mats. Structure, development, and environmental significance. L. J. Stal, and P. Caumette (ed.). Springer-Verlag, Berlin

Defarge C., J. Trichet, A. Maurin, and M. Huchner. 1994. Kopara in Polynesian atolls: early stages of formation of calcareous stromatolites. *Sediment. Geol.* **89**:9–23

Defarge C., J. Trichet, A. M. Jaunet, M. Robert, J. Tribble, and F. J. Sansone. 1996. Texture of microbial sediment revealed by cryoscanning electron microcopy. *J. Sediment. Res.* **66**:935–947

Deppe U., H. H. Richnow, W. Michaelis, and G. Antranikian. 2005. Degradation of crude oil by an antartic microbial consortium. *Extremophiles* X:XX–XX (In Press)

Detmers J., V. Brüchert,K. S. Habicht, and J. Kuever. 2001. Diversity of sulfur isotope fractionations by sulfate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:888–894

De Rosa M., A. Tricone, B. Nicolaus, and A. Gambacorta. 1991. Archaebacteria: lipids, membrane structures, and adaptation to environmental stress, p. 61–87. *In* Life under extreme conditions. G. di Prico (ed.), Springer-Verlag, Berlin

Del Campo J. 2005. Poly-β-hydroxyalkanoates accumulation in microbial mats. DEA certificate (Diploma d'estudis avançats). Universitat de Barcelona.

Des Marais D. J. 2003. Biogeochemistry of hypersaline microbial mats illustrates the dynamics of modern microbial ecosystems and the early evolution of the biosphere. *Biol. Bull.* **204**:160–167

Deutsch R. M., R. Engel, and B. E. Tropp. 1980. Effect of 3,4-dihydroxybutyl-1-phosphonate on phosphoglyceride and lipoteichoic acid synthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **255**:1521–1525

De Witt R., and H. Van Gemerden. 1988. Interactions between phototrophic bacteria in sediment ecosystems. *Hydrobiol. Bull.* **22**:135–145

Diefenbach R., H. J. Heipieper, and H. Keweloh. 1992. Conversion to *cis* into *trans* unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* P8:evidence for a role in the regulation of membrane fluidity. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**:382–387

Diestra E., A. Solé, and I. Esteve. 2004. A comparative study of cyanobacterial diversity in polluted and unpolluted microbial mats by means CLSM. *Ophelia* **58**:151–156

Doi Y., A. Tamaki, M. Kunioka, K. Soga. 1987. Biosynthesis of terpolyesters of 3-hydroxybutyrate, 3-hydroxyvalerate, and 5-hydroxyvalerate in *Alcaligenes eutrophus* from 5-chloropentanoic and pentanoic acids. *Macromol. Rapid Commun.* **8**:631–635

Doi Y. 1990. Microbial polyesters. VCH Publishers, New York, NY

Donachie S. P., J. P. Bowman, and M. Alam. 2004a. *Psychroflexus tropicus* sp. nov., an obligately halophilic Cytophaga–Flavobacterium–Bacteroides group bacterium from an Hawaiian hypersaline lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:935–940

Donachie S. P., S. Hou, K. S. Lee, C. W. Riley, A. Pikina, C. Belisle, S. Kempe, T. S. Gregory, A. Bossuyt, J. Boerema, J. Liu, T. A. Freitas, A. Malahoff, and M. Alam. 2004b. The Hawaiian archipelago:A microbial diversity hotspot. **48**:509–520

Donachie S. P., J. P. Bowman, S. L. W. On, and M. Alam. 2005. *Arcobacter halophilus* sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:1271–1277

Dowling N. J. E. F. Widdel, and D. C. White. 1986. Phospholipid-ester linked fatty acid biomarkers of acetate-oxidizing sulfate reducers and other sulfide-forming bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **132**:1815–1825

Dubinina G. A., M. Y. Grabovich, A. M. Lysenko, N. A. Chernykh, and V. V. Churikova. 1993a. Revision of the taxonomic position of colorless sulfur spirilla of the genus *Thiospira* and description of a new species, *Aquaspirillum bipunctata* comb. nov. *Microbiology* **62**:638–644

Dubinina G. A., N. V. Leshcheva, and M. Y. Grabovich. 1993b. The colorless sulfur bacterium "*Thiodendron*" is actually a symbiotic association of spirochetes and sulfidogens. *Mikrobiologiya* **62**:717–732

Dubinina G. A., M. Y. Grabovich, and Y. Y. Chernyshova. 2004. The role of oxygen in the regulation of the metabolism of aerotolerant spirochetes, a major component of '*Thiodendron*' bacterial sulfur mats. *Microbiology* **73**:621–628

Dubois-Brissonnet F., C. Malgrange, L. Guerin-Mechin, B. Heyd, and J. Y. Leveau. 2000. Effect of temperature and physiological state on the fatty acid composition of *Pseudomonas aeruginosa. Int. J. Food Microbiol.* **55**:79–81

E

Eder W., W. Ludwig, and R. Huber. 1999. Novel 16S rRNA gene sequences retrieved from highly saline brine sediments of Kebrit Deep, Red Sea. *Arch Microbiol* **172**:213–218

Eder W., L. L. Jahnke, M. Schmidt, and R. Huber. 2001. Microbial diversity of the brine-seawater interface of the Kebrit Deep, Red-Sea, studied via 16S rRNA gene sequences and cultivation methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:3077–3085

Edlung A., P. D. Nichols, R. Roffey, and D. C. White. 1985. Extractable and lipopolysaccharide fatty acid and hydroxy fatty acid profiles from *Desulfovibrio* species. *J. Lipid Res.* **26**:982–988

Efthimion M. H., and W. A. Corpe. 1969. Effect of cold temperatures on the viability of *Chromobacterium violaceum*. *Appl. Microbiol.* **17**:169–175

Eichner C. A., R. W. Erb, K. H. Timmis, and I. Wagner-Dögler. 1999. Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:102–109

Eilers H., J. Pernthaler, F. Glöckner, and R. Aman. 2000. Culturability and *in situ* abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3044–3051

Elhottová D., J. Tríska, H. Santruckvá, J. Kveton, J. Santrucek, and M. Simková. 1997. Rhizosphere microflora of winter wheat plants cultivated under elevated CO_2. *Plant Soil* **197**:251–259

Elhottová D., J. Tríska, S. O. Petersen, and H. Santruckvá. 2000. Analysis of poly-β-hydroxybutyrate in environmental samples by GC-MS/MS. *Fresenius J. Anal. Chem.* **367**:157–164

Elshahed M. S., F. Z. Najar, B. A. Roe, A. Oren, T. A. Dewers, and L. R. Krumholz. 2004. Survey of archaeal diversity reveals an abundance of halophilic archaea in a low-salt, sulfide- and sulfur-rich spring. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**2230–2239

Engel A. S., N. Lee, M. L. Porter, L. A. Stern, P. C. Bennett, and M. Wagner. 2003. Filamentous “*Epsilonproteobacteria*“ dominate microbial mats from sulfidic cave springs. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**5503–5511

Epping E. H. G., A. Khalili, and R. Thar. 1999. Photosynthesis and the dynamics of oxygen consumption in a microbial mat as calculated from transient oxygen microprofiles. *Limnol. Oceanogr.* **44**1936–1948

Epping E., and M. Kühl. 2000. The responses of photosynthesis and oxygen consumption to short-term changes in temperature and irradiance in a cyanobacterial mat (Ebro Delta, Spain). *Environ. Microbiol.* **2**465–474

Esteve I., E. Montesinos, J. G. Mitchell, and R. Guerrero. 1990. A quantitative ultrastructural study of *Chromatium minus* in the bacterial layer of Lake Cisó (Spain). *Arch. Microbiol.* **153**316–323

Esteve I., D. Ceballos, M. Martínez-Alonso, N. Gaju, and R. Guerrero. 1994. Development of versicolored microbial mats Succession of microbial communities, p. 415–420. *In* Microbial mats. Structure, development, and environmental significance. L. J. Stal, and P. Caumette (ed.). Springer-Verlag, Berlin

F

Fang J., and M. J. Barcelona. 1998. Structural determination and quantitative analysis of phospholipids using liquid chromatography/electrospray ionization/mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods* **33**23–35

Fang J., M. J. Barcelona, and P. J. J. Alvarez. 2000. Phospholipid compositional changes of five pseudomonad archetypes grown with and without toluene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**382–389

Fang J., N. Lovanh, and P. J. Alvarez. 2004. The use of isotopic and lipid analysis techniques linking toluene degradation to specific microorganismsapplications and limitations. *Wat. Res.* **38**2529–2536

Farmer J. 1992. Grazing and bioturbation in modern microbial mats, p. 295–297. *In* The proterozoic biosphere. J. W. Schopf, and C. Klein (ed.). Cambridge Univ. Press, NY

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**783–791

Fenchel T., and R. N. Glud. 1998. Veil architecture in a sulphide-oxidizing bacterium enhances countercurrent flux. *Nature* **394**:367–369

Fenchel T., and M. Kühl. 2000. Artificial cyanobacterial mats: Growth, structure, and vertical zonation patterns. *Microb. Ecol.* **40**:85–93

Fera M. T., T. L. Maugeri, C. Gugliandolo, C. Beninati, M. Giannone, E. La Camera, and M. Carbone. 2004. Detection of *Arcobacter* spp. in the coastal environment of the Mediterranean Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:1271–1276

Fernández A., S. Huang, S. Cestón, J. Xing, R. Hickey, C. Criddle, and J. Tiedje. 1999. How stable is stable? Function versus community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3697–3704

Ferrari V. C., and J. T. Hollibaugh. 1999. Distribution of microbial assemblages in the Central Arctic Ocean basin studied by PCR/DGGE: analysis of a large data set. *Hydrobiologia* **401:**55–68

Ferris M. J., and D. M. Ward. 1997. Seasonal distributions of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1375–1381

Findlay, R. H., and D. C. White. 1987. A simplified method for bacterial nutritional status based on simultaneous determination of phospholipid and endogenous storage lipid poly-β-hydroxyalkanoate. *J. Microbiol. Methods* **6**:113–120

Findlay R. H., and F. C. Dobbs. 1993. Quantitative description of microbial communities using lipid analysis, p. 271–284. *In* Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology. P. F. Kemp, B. Sherr, E. B. Sherr, and J. J. Cole (ed.). Lewis, Boca Raton, FL

Fischer W., and D. Arneth-Seifert. 1998. D-Alanylcardiolipin, a major component of the unique lipid pattern of *Vagococcus fluvialis*. *J. Bacteriol.* **180**:2950–2957

Fischer W., and K. Leopold. 1999. Polar lipids of four *Listeria* species containing L-lysylcardiolipin, a novel lipid structure, and other unique phospholipids. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:653–662

Fischer W., R. Hartmann, J. Peterkatalinic, and H. Egge. 1994. (S)-2-Amino-1,3-propanediol-3-phosphate-carrying diradylglyceroglycolipids–novel major membrane-lipids of *Clostridium innocuum*. *Eur. J. Biochem.* **223**:879–892

Fisher W. 1977. The polar lipids of group B Streptococci. II. Composition and positional distribution of fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* **487**:89–104

Fisher S. G., and L. S. Lerman. 1979. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell* **16**:191–200

Fourçans A.,T. García de Oteyza,A. Wieland, A. Solé, E. Diestra, J. van Bleijswijk, J. O. Grimalt, M. Kühl, I. Esteve, G. Muyzer, P. Caumette, R. Duran. 2004. Characterization of functional bacterial groups in a hypersaline microbial mat community (Salins-de-Giraud, Camargue, France). *FEMS Microbiol. Ecol.* **51**:55–70

Fredickson J. K., J. P. McKinley, S. A. Nierzwicki-Bauer, D. C. White, D. B. Ringelberg, S. A. Rawson, S.-M. Li, F. J. Brockman, and B. N. Bjornstad. 1995. Microbial community structure and biogeochemistry of miocene subsurface sediments: implications for long-term microbial survival. *Molecular Ecol.* **4**:619–626

Fromin N., J. Hamelin, S. Tarnawski, D. Roesti, K. Jourdain-Miserez, N. Forestier, S. Teyssier-Cuvelle, F. Gillet, M. Aragno, and P. Rossi. 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ. Microbiol.* **4**:634–643

Fründ C., and Y. Cohen. 1992. Diurnal cycles of sulfate reduction under oxic conditions in cyanobacterial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:70–77

Fuchs B. M., G. Wallner, W. Beisker, I. Schwippl, W. Ludwig, and R. Amann. 1998. Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labelled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4973–4982

Fujie K., H.-Y. Hu, H. Tanaka, K. Urano, K. Saito, and A. Katayama. 1998. Analysis of respiratory quinone profile in soil for characterization of microbiota. *Soil Sci. Plant Nutr.* **44**:393–404

Fukui T., and Y. Doi. 1997. Cloning and analysis of the Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. *J. Bacteriol.* **179**:4821–4830

G

Gage D. A., Z. H. Huang, and C. Benning. 1992. Comparison of sulfoquinovosyl diacylglycerol from spinach and the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides* by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Lipids* **27**:632–636

Ganz T. 2001. Fatal attraction evaded. How pathogenic bacteria resist cationic polypeptides. *J. Exp. Med.* **193**:F31–34

Gao J. L., B. Weissenmayer, A. M. Taylor, J. Thomas-Oates, I. M. Lopez-Lara, and O. Geiger. 2004. Identification of a gene required for the formation of lyso-ornithine lipid, an intermediate in the biosynthesis of ornithine-containing lipids. *Mol. Microbiol.* **53**:1757–1770

García-Pichel F., and R. W. Castenholz. 1994. On the significance of solar ultraviolet radiation for the ecology of microbial mats, p. 77–84. *In* Microbial mats. Structure, development, and environmental significance. L. J. Stal, and P. Caumette (ed.). Springer-Verlag, Berlin

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

García-Pichel F., U. Nübel, and G. Muyzer. 1998. The phylogeny of unicellular, extremely halotolerant cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* **169**:469–482

García-Pichel F., A. López-Cortés, and U. Nübel. 2001. Phylogenetic and morphological diversity of cyanobacteria in soil desert crust from the Colorado plateau. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1902–1910

Gattinger A., A. Günthner, M. Schloter, and J. C. Munch. 2003. Characterization of *Archaea* in soils by polar lipid analysis. *Acta Biotechnol.* **23**:21–28

Gauthier G., M. Gauthier, and R. Christen. 1995. Phylogenetic analysisof the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twuelve new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:755–761

Gehron, M. J., and D. C. White. 1982. Quantitative determination of the nutritional status of detrital microbiota and the grazing fauna by triglyceride glycerol analysis. *J. Exp. Mar. Biol.* **64**:145–158

van Germerden H., C. S. Tughan, R. de Wit, and R. A. Herbert. 1989. Laminated microbial ecosystems on sheltered beaches in Scapa Flow, Orkney Islands. *FEMS Microbiol. Ecol.* **62**:87–102

van Germerden H. 1993. Microbial mats:a joint venture. *Mar. Geol.* **113**:3–25

Geyer R., A. D. Peacock, D. C. White, C. Lytle, and G. J. Van Berkel. 2004. Atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for simultaneous mass spectrometric analysis of microbial respiratory ubiquinones and menaquinones. *J. Mass Spectrom.* **39**:922–929

Gibbons R. J., and L. P. Engle. 1964. Vitamin K compounds in bacteria that are obligate anaerobes. *Science* **146**:1307–1309

Gibson J., E. R. Leadbetter, and H. B. Hannasch. 1984. Great Sippewisset marsh:A summary of projects carried out by students in the microbial ecology course of the marine biological laboratory, Woods Hole, during summer 1972–1981. In Microbial mats:stromatolites, p. 95–100. Y. Cohen, R. H. Castelholz, and H. O. Halvorson (ed.) Liss, A. R. New York, NY

Gibson J. A. E., M. R. Miller, N. W. Davies, G. P. Neill, D. S. Nichols, and J. K. Volkman. 2005. Unsaturated diether lipids in the psychrotrophic *archaeon Halorubrum lacusprofundi*. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**:19–26

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

Glud R. N., M. Kühl, O. Kohls, and N. B. Ramsing. 1999. Heterogeneity of oxygen production and consumption in a photosynthetic microbial mat as studied by planar optodoes. *J. Phycol.* **35**:270–279

Göbel U. B. 1991. Targeting ribosomal RNA sequences: a universal approach to the detection and identification of microorganisms, p. 27–36. *In* Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology. Vaheri A., R. C. Tilton, and A. Balows (ed.). Springer, Heidelberg

Goldfine H., and P. O. Hagen. 1972. Bacterial plasmalogens, p. 329–350. *In* Ether lipids, chemistry and biology. Snyder F. (ed), Academic, New York, NY

Gottwald M., J. R. Andresen, J. Le Gall, and L. G. Ljungdabl. 1975. Presence of cytochrome and menaquinone in *Clostridium formicoaceticum* and *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* **122**:325–328

Grochulski P., F. Bouthillier, R. J. Kazlauskas, A. N. Serreqi, J. D. Schrag, E. Ziomek, and M. Cygler. 1994. Analogs of reaction intermediates identify a unique substrate binding site in *Candida rugosa* lipase. *Biochemistry* **33**:3494–3500

Grossi V., A. Hirschler, D. Raphel, J.-F. Rontani, J. W. De Leeuw, and J.-C. Bertrand. 1998. Biotransformation patways in recent anoxic sediments. *Org. Geochem.* **29**:845–861

Grötzschel S., and D. de Beer. 2002. Effect of oxygen concentration on photosynthesis and respiration in two hypersaline microbial mats. *Microb. Ecol.* **44**:208–216

Guckert, J. B., C. P. Antworth, P. D. Nichols, and D. C. White. 1985. Phospholipid, ester-linked fatty acid profiles as reproducible assays for changes in prokaryotic community structure of estuarine sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**:147–158

Guckert, J. B., M. A. Hood, and D. C. White. 1986. Phospholipid, ester-linked fatty acids profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: increases in the *trans/cis* ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:794–801

Güde H., W. R. Strohl, and J. M. Larkin. 1981. Mixotrophic and heterotrophic growth of *Beggiatoa alba* in continuous culture. *Arch. Microbiol.* **129**:357–360

Guerrero R., J. Urmeneta, and G. Rampone. 1993a. Distribution of types of microbial mats at the Ebro delta, Spain. *BioSystems* **31**:135–144

Guerrero R., J. B. Ashen, M. Solé, and L. Margulis. 1993b. *Spirosymplokos deltaeiberi* nov. gen., nov. sp.: variable-diameter composite spirochete from microbial mats. *Arch. Microbiol.* **160**:461–470

Guerrero R. 1998. Crucial crises in biology: life in the deep biosphere. *Int. Microbiol.* **1**:285–294

Guerrero R., A. Hasselton, M. Solé, A. Wier, and L. Margulis. 1999. *Titanospirillum velox*: A huge, speedy, sulphur-storing spirillum from Ebro delta microbial mats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:11584–11588

Guerrero R., M. Piqueras, and M. Berlanga. 2002. Microbial mats and the search for minimal ecosystems. *Int. Microbiol.* **5**:177–188

Guyoneaud R., S. Moune, C. Eatock, V. Bothorel, A. Hirschler-Rea, J. Willison, R. Duran, W. Liesack, R. Herbert, R. Matheron, and P. Caumette. 2002. Characterization of three spiral-shaped purple nonsulfur bacteria isolated from coastal lagoon sediments, saline sulfur springs, and microbial mats: emended description of the genus *Roseospira* and description of *Roseospira marina* sp. nov., *Roseospira navarrensis* sp. nov., and *Roseospira thiosulfatophila* sp. nov. *Archiv. Microbiol.* **178**:315–324

H

Haack S. K., L. R. Fogarty, T. G. West, E. W. Alm, J. T. McGuire, D. T. Long, D. W. Hyndman, and L. J. Forney. 2004. Spatial and temporal changes in microbial community structure associated with recharge-influenced chemical gradients in a contaminated aquifer. *Environ. Microbiol.* **6**:438–448

Hall T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**:95–98

Hammand R. K., and D. C. White. 1969. Separation of vitamin K_2 isoprenologues by reverse-phase thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.* **45**:446–452

van Hamme J. D., and O. P. Ward. 2001. Physical and metabolic interactions of *Pseudomonas* sp. strain JA5-B45 and *Rhodococcus* sp. strain F9-D79 during growth on crude oil and effect of chemical surfactant on them. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4874–4879

Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557–580

Haque M., Y. Hirai, K. Yokota, and K. Oguma. 1995. Steryl glycosides: a characteristic feature of the *Helicobacter* spp.? *J. Bacteriol.* **177**:5334–5337

Hareland W., R. L. Crawford, P. J. Chapman, and S. Dagley. 1975. Metabolic function and properties of 4-hydroxyphenylacetic acid 1-hydrolase from *Pseudomonas acidovorans*. *J. Bacteriol.* **121**:272–285

Harwood C. S., and E. Canale-Parola. 1984. Ecology of spirochetes. *Ann. Rev. Microbiol.* **38**:161–192

Hedrick D. B., and D. C. White. 1986. Microbial respiratory quinones in the environment. *J. Microbiol. Methods* **5**:243–254

Hedrick D. B., J. B. Guckert, and D. C. White. 1991. Archaebacterial ether lipid diversity analyzed by supercritical fluid chromatography: Integration with a bacterial lipid protocol. *J. Lipid Res.* **32**:659–663

Hedrick D. B., A. Peacock, J. R. Stephen, S. J. Macnaughton, J. Brüggeman, and D. C. White. 2000. Measuring soil microbial community diversity using polar lipid fatty acid and denaturing gradient gel electrophoresis data. *J. Microbiol. Methods* **41**:235–248

Heipieper, H-J., R. Diefenbach, and H. Kewoloh. 1992. Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1847–1852

Heising S., W. Dilling, S. Schnell, and B. Schink. 1996. Complete assimilation of cysteine by a newly isolated non-sulfur purple bacterium resembling *Rhodovulum sulfidophilum* (*Rhodobacter sulfidophilus*). *Archiv. Microbiol.* **165**:397–401

Hibayashi E., and N. Imamura. 2003. Action mechanism of a selective anti-cyanobacetrial compound, argimicin A. *J. Antibiot. (Tokyo)* **56**:154–159

Higgins D., J. Thompson, J. D. Gibson T. Thompson, D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673–4680

Hilker D. R., M. L. Gross, H. W. Knocke, and J. M. Shively. 1978. The interpretation of the mass spectrum of an ornithine-containing lipid from *Thiobacillus thiooxidans*. *Biomed. Mass Spectrom.* **5**:64–71

Hippchen B., A. Röll, and K. Poralla. 1981. Occurrence in soil of thermo-acidophilic bacilli prossessing ω-cyclohexane fatty acids and hopanoids. *Arch. Microbiol.* **129**:53–55

Hiraishi A. 1988. Respiratory quinone profiles as tools for identifying different bacterial populations in activated sludge. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **34**:39–56

Hiraishi A., Y. Ueda, J. Ishihara, and T. Mori. 1996. Comparative lipoquinone analysis of influent sewage and activated sludge by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **42**:457–469

Hiraishi A., Y. Ueda, and J. Ishihara. 1998. Quinone profiling of bacterial populations in natural and synthetic sewage activated sludge for enhanced phosphate removal. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:992–998

Hiraishi A. 1999. Isoprenoid quinones as biomarkers of microbial populations in the environment. *J. Biosci. Bioeng.* **88**:449–460

Hiraishi, A. T. Umezawa, H. Yamamoto, K. Kato,and Y. Maki. 1999. Changes in quinone profiles of hot spring microbial mats with a thermal gradient. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:198–205

Hiraishi A., M. Iwasaki, T. Kawagishi, N. Yoshida, T. Narihiro, and K. Kata. 2003. Significance of Lipoquinone as quantitative biomarkers of bacterial populations in the environment. *Microb. Environ.* **18**:89–93

Hirschler-Rea A., R. Matheron, C. Riffaud, S. Moune, C. Eatock, R. A. Herbert, J. C. Willison, and P. Caumette. 2003. Isolation and characterization of spirilloid purple phototrophic bacteria forming red layers in microbial mats of Mediterranean salterns:description of *Halorhodospira neutriphila* sp. nov. and emendation of the genus *Halorhodospira*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:153–163

Hoehler T. M., B. M. Bebout, and D. J. DesMarais. 2001. The role of microbial mats in the production of reduced gases on the early Earth. *Nature* **412**:324–327

Höllander R. 1976. Correlation of function of desmethylmenaquinones in bacterial electron transport with its redox potential. *FEBS Lett.* **72**:98–100

Höllander R., G. Wolf, and W. Mannheim. 1977. Lipoquinones of some bacteria bacteria and mycoplamas, with consideration on their functional significance. *Antonie van Leewenhoek* **43**:177–185

Holmström C., and S. Kjelleberg. 1999. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**:285–293

Hopmans E. C., S. Schouten, R. D. Pancost, M. T. J. van der Meer, and J. S. Sinninghe Damsté. 2000. Analysis of intact tetraether lipids in archaeal cell material and sediments by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**:585–589

Horodyski R. J. B. Bloesser, and S. J. Von Der Haar. 1977. Laminated algal mats from a coastal lagoon, Laguna Mormona, Baja California, Mexico. *J. Sediment Pet.* **47**:680–696

Hu H.-Y., K. Fujie, H. Nakagome, K. Urano, and A. Katayama. 1999. Quantitaive analyses of the change in microbial diversity in a bioreactor for wastewater treatment based on respiratory quinones. *Water Res.* **33**:3263–3270

Hu H.-Y., B.-R. Lim, N. Goto, and K. Fujie. 2001. Analytical precision and repeatability of respiratory quinones for quantitative study of microbial community structure in environmental samples. *J. Microbiol. Methods* **47**:17–24

Huber H., M. J. Hohn, R. Rachel, T. Fuchs, V. C. Wimmer, and K. O. Stetter. 2002. A new phylum of archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**:63–67

Hughes J. B., J. J. Hellmann, T. H. Ricketts, and B. J. M. Bohannan. 2001. Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4399–4406

Hughes K. A., and B. Lawley. 2003. A novel antartic microbial endolithic community within gypsum crusts. *Environ. Microbiol.* **5**:555–565

Ibekwe A. M., S. K. Papiernik, J. Gan, S. R. Yates, C.-H. Yang, and D. E. Crowley. 2001. Impact of fumigants on soil microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:3245–3257

I

Imhoff J. F., D. J. Kushner, S. C. Kushawaha, and M. Kates. 1982. Polar lipids in phototrophic bacteria of the *Rhodospirillaceae* and *Chromatiaceae* families. *J. Bacteriol.* **150**:1192–1201

Imhoff J. F. 1984. Quinones of phototrophic purple bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **25**:85–89

Imhoff J. F., and N. Pfennig. 2001. *Thioflavicoccus mobilis* gen. nov., sp. nov., a novel purple sulfur bacterium with bacteriochlorophyll b. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:105–110

Ingram L. O. 1976. Adaptation of membrane lipids to alcohols. *J. Bacteriol.* **125**:670–678

Ivanova E. P., I. Y. Bakunina, T. Sawage, K. Hayashi, Y. V. Alexeeva, N. V. Zhukova, D. V. Nicolau, T. N. Zvaygintseva, and V. V. Mikhailov. 2002a. Two species of culturable bacteria associated with degradation of brown algae *Fucus evanescens*. *Microb. Ecol.* **43**:242–249

Ivanova E. P., T. Sawage, K. Hayashi, Y. V. Alexeeva, A. M. Lysenko, N. M. Gorshkova, K. Hayashi, N. V. Zhukova, R. Christen, and V. V. Mikhailov. 2002b. *Pseudoalteromonas issachenkonii* sp. nov., a bacterium that degrades the thallus of the brown alga *Fucus evanescens*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:229–234

Ivanova E. P., I. Y. Bakunina, O. I. Nedashkovskaya, N. M. Gorshkova, Y. V. Alexeeva, E. A. Zelepuga, T. N. Zvaygintseva, D. V. Nicolau, and V. V. Mikhailov. 2003. Ecophysiological variabilities in ectohydrolytic enzyme activities of some *Pseudoalteromonas* species, *P. citrea*, *P. issachenkonii*, and *P. nigrifaciens*. *Curr. Microbiol.* **46**:6–10

Iwasaki M., and A. Hiraishi. 1998. A new approach to numerical analyses of microbial quinone profiles in the environment. *Microbes Environ.* **13**:67–76

J

James S., C. Holmström, and S. Kjelleberg. 1996. Purification and characterization of a novel anti-bacterial protein from the marine bacterium D2. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2783–2788

Javor B. J., and R. W. Castelholz. 1984. Productivity studies of microbial mats, Laguna Guerrero Negro, Mexico. In Microbial mats:stromatolites, p. 149–170. Y. Cohen and R. W. Castelholz (ed.). Liss A. R., New York, NY

Jelgersma J. S., J. de Jong, W. H. Zagwijn, and J. F. van Regteren Altena. 1970. The coastal dunes of the western Netherlands:geology, vegetation history and archaeology. *Meded. Rijks Geol. Dienst* **21**:93–167

Jeon C. O., J. M. Lim, D. J. Park, and C. J. Kim. 2005. *Salinimonas chungwhensis* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a solar saltern in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:239–243

Johns R. B., J. K. Volkman, and F. T. Gillian. 1978. Kerogen precursors:chemical and biological alteration of lipids in the sedimentary surface layers. *APEA J.* **18**:157–160

Jones D. E., and J. D. Smith. 1979. Phospholipids of the differentiating bacterium *Caulobacter crescentus*. *Can. J. Biochem.* **57**:424–428

Jonkers H. M., G. F. Koopmans, and H. van Gemerden. 1998. Dynamics of dimethyl sulfide in a marine microbial mat. *Microb. Ecol.* **36**:93–100

Jonkers H. M., and R. M. M. Abed. 2003. Identification of aerobic heterotrophic bacteria from the photic zone of a hypersaline microbial mat. *Aquat. Microb. Ecol.* **30**:127–133

Jørgensen B. B. 1982. Ecology of the bacteria of the sulphur cycle with special reference to anoxic-oxic interface environments. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **298**:543–561

Jørgensen B. B., and N. P. Revsbech. 1983. Colorless sulfur bacteria, *Beggiatoa* spp. and *Thiovulum* spp., in O_2 and H_2S microgradients. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:1261–1270

Jørgensen B. B., Y. Cohen, and D. J. Des Marais. 1987. Photosynthetic action spectra and adaptation to spectral light distribution in a benthic cyanobacterial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:879–886

Jørgensen B. B., and D. J. Des Marais. 1988. Optical properties of benthic photosynthetic communities:fiber optic studies of cyanobacterial mats. *Limnol. Oceanogr.* **33**:99–113

Jørgensen B. B. 1994a. Sulfate reduction and thiosulfate transformations in a cyanobacterial mat during a diel oxygen cycle. *FEMS Microbiol. Ecol.* **13**:303–312

Jørgensen B. B. 1994b. Diffusion processes and boundary layers in microbial mats, p. 243–253. *In* Microbial mats. Structure, development, and environmental significance. L. J. Stal, and P. Caumette (ed.). Springer-Verlag, Berlin

Jørgensen B. B. 2001. Life in the diffusive boundary layer, p. 348–373. *In* The benthic boundary layer. B. P. Boudreau and B. B. Jørgensen (ed.), Oxford University Press, cambridge, UK

Jukes T. H., and R. R. Cantor. 1966. Evolution of protein molecules, p. 21–132. *In* Mammalian protein metabolism. H. N. Munro (ed.). Academic Press, NY

Jung D. O., L. A. Achenbach, E. A. Karr, S. Takaichi, and M. T. Madigan. 2004. A gas vesiculate planktonic strain of the purple non-sulfur bacterium *Rhodoferax antarcticus* isolated from Lake Fryxell, Dry Valleys, Antarctica. *Archiv. Microbiol.* **182**:236–243

Jurgens G., K. Lindstrom, and A. Saano. 1997. Novel group within the kingdom crenarchaeota from boreal forest soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:803–805

K

Kabelitz N., P. M. Santos, and H. J. Heipieper. 2003. Effect of aliphatic alcohols on growth and degree of saturation of membrane lipids in *Acinetobacter calcoaceticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **220**:223–227

Kalinovskaya N. I., E. P. Ivanova, Y. V. Alexeeva, N. M. Gorshkova, T. A. Kuznetsova, A. S. Dmitrenok, and D. V. Nicolau. 2004. Low-molecular-weight, biologically active compounds from marine *Pseudoalteromonas* species. *Curr. Microbiol.* **48**:441–446

Kamio Y., S. Kanegasaki, and H. Takahashi. 1969. Occurrence of plasmalogens in anaerobic bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **15**:439–451

Kaneda T. 1991. Iso and anteiso fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol. Rev.* **55**:288–302

Katayama A., H.-Y. Hu, M. Nozawa, H. Yamakawa, and K. Fujie. 1998. Long-term changes in microbial community structure in soils subjected to different fertilizing practices revealed by quinone profile analysis. *Soil Sci. Plant Nutr.* **44**:559–570

Kates M. 1978. Phytanyl ether-linked polar lipids and isoprenoid neutral lipids of extremely halophilic bacteria. *Prog. Chem. Fats other lipids* **15**:301–342

Kates M. 1988. Structure, physical properties, and function of archaebacterial lipids, p. 357–384. *In* Biological Membranes: Aberrations in membrane structure and function. L. M. Karnovsky, A. M. Leaf, and L. C. Bolis (ed.), Alan R. Liss, New York, NY

Kato M., Y. Muto, K. Tanaka-Bandoh, K. Watanabe, and K. Ueno. 1995. Sphingolipid composition in *Bacteroides* species. *Anaerobe* **1**:135–139

Kawaguchi A., N. Uemura, and S. Okuda. 1986. Characterization of the fatty acid synthetase system of *Curtobacterium pusillum*. *J. Biochem. (Tokyo)* **99**:1735–1742

Kawahara K., U. Seydel, M. Matsuura, H. Danbara, E. T. Rietschel, and U. Zahringer. 1991. Chemical structure of glycosphingolipids isolated from *Sphingomonas paucimobilis*. *FEBS Lett.* **292**:107–110

Kawai Y., I. Yano, and K. Kaneda. 1988. Various kinds of lipoamino acids including a novel serine-containing lipid in an opportunistic pathogen *Flavobacterium*. Their structures and biological activities on erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* **171**:73–80

Kawai Y., I. Yano, K. Kaneda, and E. Yabuuchi. 1988. Ornithine-containing lipids of some *Pseudomonas* species. *Eur. J. Biochem.* **175**:633–641

Kawai Y., Y. Nakagawa, T. Matuyama, K. Akagawa, K. Itagawa, K. Fukase, S. Kusumoto, M. Nishijima, and I. Yano. 1999. A typical bacterial ornithine-containing lipid N alpha-(D)-[3-(hexadecanoyloxy)hexadecanoyl]-ornithine is a strong stimulant for macrophages and a useful adjuvant. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **23**:67–73

Kawasaki S., R. Moriguchi, K. Sekiya, T. Nakai, E. Ono, K. Kume, and K. Kawahara. 1994. The cell envelope structure of the lipopolysaccharide-lacking gram-negative bacterium *Sphingomonas paucimobilis*. *J. Bacteriol.* **176**:284–290

Kawazoe R., H. Okuyama, W. Reichardt, and S. Sasaki. 1991. Phospholipids and a novel glycine-containing lipoamino acid in *Cytophaga johnsonae* Stanier strain C21. *J. Bacteriol.* **173**:5470–5475

Kenyon C. N. 1972. Fatty acid composition of unicellular strains of blue-green algae. *J. Bacteriol.* **109**:827–834

Keusgen M., J. M. Curtis, P. Thibault, J. A. Walter, A. Windust, and S. W. Ayer. 1997. Sulfoquinovosyl diacylglycerols from the alga *Heterosigma carterae*. *Lipids* **32**:1101–1112

Kieft T. L., D. B. Ringelberg, and D. C. White. 1994. Changes in ester-linked phospholipid fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3292–3299

Killian J. A., C. H. J. P. Fabrie, W. Baart, S. Morein, and B. de Kruijff. 1992. Effects of temperature variation and phenethyl alcohol addition on acyl chain order and lipid organization in *Escherichia coli* derived membrane systems. A 2H- and 31P-NMR study. *Biochim. Biophys. Acta* **1105**:253–262

Kim Y. H., J. S. Yoo, and M. S. Kim. 1997. Structural characterization of sulfoquinovosyl, monogalactosyl and digalactosyl diacylglycerols by FAB-CID-MS/MS. *J. Mass Spectrom.* **32**:968–977

Kim H., M. Nishiyama, T. Kunito, K. Senoo, K. Kawahara, K. Murakami, and H. Oyaizu. 1998. High population of *Sphingomonas* species on plant surface. *J. Appl. Microbiol.* **85**:731–736

Kim Y. H., J. S. Choi, J. Hong, J. S. Yoo, and M. S. Kim. 1999. Identification of acylated glycoglycerolipids from a cyanobacterium, *Synechocystis* sp., by tandem mass spectrometry. *Lipids* **34**:847–853

Kim B.-S., H.-M. Oh, H. Kang., and J. Chun. 2005. Archaeal diversity in tidal flat sediment as revealed by 16S rDNA analysis. *J. Microbiol.* **43**:144–151

Kiene R. P., and D. G. Capone. 1988. Microbial transformations of methylated sulfur compounds in anoxic salt marsh sediments. *Microb. Ecol.* **15**:275–291

Klappenbach J. A., and B. K. Pierson. 2004. Phylogenetic and physiological characterization of a filamentous anoxygenic photoautotrophic bacterium 'Candidatus *Chlorothrix halophila*' gen. nov., sp. nov., recovered from hypersaline microbial mats. *Archiv. Microbiol.* **181**□17–25

Knittel K., J. Kuever, A. Meyerdierks, R. Meinke, R. Amann, and T. Brinkhoff. 2005. *Thiomicrospira artica* sp. nov. and *Thiomicrospira psychrophila* sp. nov., psychrophilic, obligately chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacteria isolated from marine Artic sediments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**□781–786

Koizumi Y., H. Kojima, K. Oguri, H. Kitazato, and M. Fukui. 2004. Vertical and temporal shifts in microbial communities in the water column and sediment of saline meromictic Lake Kaiike (Japan), as determined by a 16S rDNA-based analysis, and related to physicochemical gradients. *Environ. Microbiol.* **6**□622–637

Kolibachuk D., A. Miller, and D. Dennis. 1999. Cloning, molecular analysis, and expression of the polyhydroxyalkanoic acid synthase (phaC) gene from *Chromobacterium violaceum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**□3561–3565

Koopmans M. P., J. Köster, H. M. E van Kaam-Peters, F. Kenig, S. Schouten, W. A. Hartgers, J. W. de Leeuw, J. S. Sinninghe Damsté. 1996. Dia-and catagenetic products of isorenieratene□molecular indicators for photic zone anoxia. *Geochim. Cosmochim. Acta* **60**□4467–4496

Kouker G. and K.-E. Jaeger. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl. Env. Microbiol.* **53**□211–213

Krieg N. R. 1984. Aerobic/microaerophilic, motile, helical/vibrioid Gram-negative bacteria, p. 71–124. *In* Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1. N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.). The Williams & Williams Co., Baltimore

Kruk J., K. Burda, G. H. Schmid, A. Radunz, and K. Strzałka. 1998. Function of plastoquinones B and C as electron acceptors in Photosystem II and fatty acid analysis of plastoquinone B. *Photosynth. Res.* **58**□203–209

Krumbein W. E., and Y. Cohen. 1974. Klastische und evaporitische sedimentation in einem mesothermen monomiktischen ufernahen See (Golf von Aquaba, Sinai). *Geol. Rundsch.* **63**□1035–1065

Krumbein W. E., Y. Cohen, and M. Shilo. 1977. Solar Lake (Sinai). 4. Stromatolitic cyanobacterial mats. *Limnol. Oceanogr.* **22**□635–656

Kuenen J. G., and O. H. Tuovinen. 1981. The genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira*, p. 1023–1036. *In* The prokaryotes. M. P. Starr, H. Stolz, H. G. Trüper, A. Ballows, and H. G. Schlegel (ed.). Springer-Verlag, Berlin

Kuever J., C. Wawer, and R. Lillebæk. 1996. Microbiological observations in the anoxic basin Golfo Dulce, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* **44**:49–57

Kühl M., and T. Fenchel. 2000. Bio-optical characteristics and the vertical distribution of photosynthetic pigments and photosynthesis in an artificial cyanobacterial mat. *Microb. Ecol.* **40**:94–103

Kumar S., K. Tamura, and M. Nei. 2004. MEGA3:Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* **5**:150–163

Kunsman J. E. 1973. Characterization of the lipids of six strains of *Bacteroides ruminicola*. *J. Bacteriol.* **113**:1121–1126

L

LaBach J. P., and D. C. White. 1969. Identification of ceramide phosphoryl ethanolamine and ceramide phosphorylglycerol in the lipids of an anaerobic bacterium. *J. Lipid Res.* **10**:528–534

Lane D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115–175. *In* Nucleic acid techniques in bacterial systematics. E. Stackebrandt, M. Good-fellow (ed.) John Wiley and Sons, NY

Laneelle G., and J. Asselineau. 1968. Structure of a peptidolipid glycoside isolated from a *Mycobacterium*. *Eur. J. Biochem.* **5**:487–491

Laneelle M. A., D. Prome, G. Lanéelle, J. C. Prome. 1990. Ornithine lipid of *Mycobacterium tuberculosis*:its distribution in some slow- and fast-growing mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **136**:773–778

Lange W. 1976. Speculations on a possible essential function of the gelatinous sheath of blue-green algae. *Can. J. Microbiol.* **22**:1181–1185

Langworthy T. A. 1977. Long-chain diglycerol tetraethers from *Thermoplasma acidophilum*. *Biochim. Biophys. Acta* **487**:37–50

Langworthy T. A. 1985. Lipids of archaebacteria, p. 459–497. *In* The bacteria, vol. 8. C. R. Woese and R. S. Wolfe (ed.), Academic Press, New York, NY

La Rivière J. W., and K. Schmidt. 1992. Morphologically conspicuous sulfur-oxidizing eubacteria, p. 3934–3947. *In* The prokaryotes, vol. 4. A. Ballows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.). Springer, New York, NY

Larsen N., G. J. Olsen, B. L. Maidak, M. J. McCaughey, R. Overbeek, T. J. Macke, T. L. Marsh, and C. R. Woese. 1993. The Ribosomal Database Project. *Nucleic Acids Res.* **21**:3021–3023

Lauro F. M., G. Bertoloni, A. Obraztsova, C. Kato, B. M. Tebo, D. H. Bartlett. 2004. Pressure effects on *Clostridium* strains isolated from a cold deep-sea environment. *Extremophiles* **8**:169–173

Lechevalier H., and M. P. Lechevalier. 1988. Chemotaxonomic use of lipids – an overview, p. 869–902. *In* Microbial lipids, vol. 1. C. Ratledge and S. G. Wilkinson (ed.) Academic Press, New York, NY

Lee C., R. B. Gagosian, and J. W. Farrington. 1980. Geochemistry of sterols in sediments from Black Sea and the southwest African shelf and slope. *Org. Geochem.* **2**:103–113

Lee S. Y. 1996. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.* **49**:1–14

Lemoigne M. 1923. Production d'un acide β-oxybutyrique par certaines bactéries du groupe du *Bacillus subtilis*, *CR Hebdomadaires Seances Academie des Sciences* **176**:1761–1763

Lester R. L., D. C. White, and S. L. Smith. 1964. The 2-demethyl vitamin K_2's. A new group of naphthoquinones isolated from *Haemophilus parainfluenzae*. *Biochem.* **3**:949–954

Levring T. 1946. Some culture experiments with *Ulva* and artificial seawater. *K. Fysiogr. Sällsk. Lund. Förh.* **16**:45–56

Leys N. M. E. J., A. Ryngaert, L. Bastiaens, W. Verstraete, E. M. Top, and D. Springael. 2004. Ocurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:1944–1955

Liebergesell M., S. Rehalkar, and A. Steinbüchel. 2000. Analysis of the *Thiocapsa pfennigii* polyhydroxyalkanoate synthase: subcloning, molecular characterization and generation of hybrid synthases with the corresponding *Chromatium vinosum* enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**:186–194

Lim J. M., J. H. Yoon, J. C. Lee, C. O. Jeon, D. J. Park, C. Sung, and C. J. Kim. 2004. *Halomonas koreensis* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:2037–2042

Linscheid M., B. W. Diehl, M. Overmohle, I. Riedl, and E. Heinz. 1997. Membrane lipids of *Rhodopseudomonas viridis*. *Biochim. Biophys. Acta* **1347**:151–163

Loffhagen N., C. Härtig, and W. Babel. 2004. *Pseudomonas putida* NCTC 10936 balances membrane fluidity in response to physical and chemical stress by changing the saturation degree and the *trans*/*cis* ratio of fatty acids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**:317–323

López N. I., M. E. Floccari, A. Steinbüchel, A. F. García, and B. S. Méndez. 1995. Effect of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) content on the starvation-survival of bacteria in natural waters. *FEMS Microbiol. Ecol.* **16**:95–102

Lovejoy C., J. P. Bowman, and G. M. Hallegraeff. 1998. Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (Class *Proteobacteria*, Gamma subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2806–2813

Lovely D. R., D. F. Dwyer, and M. J. Klug. 1982. Kinetic analysis of competition between sulfate reducers and methanogens for hydrogen in sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**:1373–1379

Lowe D. R. 1980. Stromatolites 3400-Myr old from the Archean of Western Australia. *Nature* **284**:441–443

Luchsinger R. H., B. Bergersen, and J. G. Mitchell. 1999. Bacterial swimming strategies and turbulence. *Biophys. J.* **77**:2377–2386

Ludwig J. A., and J. F. Reynolds. 1988. p. 96. *In* Statistical Ecology: I. Primer on methods and computing. Wiley-Interscience, New York, NY

Lytle C. A., Y. D. M. Gan, K. Salone, and D. C. White. 2001. Sensitive characterization of microbial ubiquinones from biofilms by electrospray/mass spectrometry. *Environ. Microbiol.* **3**:265–272

M

Macarrón B. 1998. Utilización de marcadores lipídicos en el estudio de la biomasa, la estructura, y el estado nutricional de las comunidades de los tapices microbianos del delta del Ebro. Ph.D. thesis. Universitat Autónoma de Barcelona, Barcelona, Spain

MacCorquodale D. W., L. C. Cheney, S. B. Binkley, W. F. Holcomb, R. W. McKee, S. A. Thayer, and E. A. Doisy. 1939. The constitution and synthesis of vitamin K_1. *J. Biol. Chem.* **131**:357–370

Macfarlane M. G. 1962. Characterization of lipoamino-acids as *O*-amino-acid esters of phosphatidylglycerol. *Nature* **196**:136–138

MacGarrity J. T., and J. B. Armstrong. 1975. The effect of salt on phospholipid fatty composition in *Escherichia coli* K-12. *Biochim. Biophys. Acta* **398**:258–264

Macnaughton S. J., J. R. Stephen, A. D. Venosa, G. A. Davis, Y.-J. Chan, and D. C. White. 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3566–3574

Macnaughton, S. J., and J. R. Stephen. 2001. A combined phospholipid and 16S rDNA PCR-DGGE analysis to study bioremediative microbial communities *in situ*. *In* Environmental Molecular Microbiology: Protocols and applications. P. A. Rochelle (ed.). Horizon Scientific Press, Wymondham, UK

Makula R. A., and M. E. Singer. 1978. Ether-containing lipids of methanogenic bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **82**:716–722

Mallet C., M. Basset, G. Fonty, C. Desvilettes, G. Bourdier and D. Debroas. 2004. Microbial population dynamics in the sediments of a eutrophic lake (Aydat, France) and characterization of some heterotrophic bacterial isolates. *Microb. Ecol.* **44**:66–77

Marr A. G., and J. L. Ingraham. 1962. Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **84**:1260–1267

Margulis L., E. S. Barghoorn, D. Ashendorf, S. Barnejee, D. Chase, S. Francis, S. Giovannoni, and J. Stolz. 1980. The microbial community in the layered sediments at Laguna Figueroa, Baja California, Mexico: does it have Precambrian analogues? *Precambrian Res.* **11**:93–123

Margulis L., L. Lopez-Baluja, S. M. Awramik, and D. Sagan. 1986. Comunity living long before man: fosil and living microbial mats and early life. *Sci Total Environ.* **56**:379–397

Margulis L., G. Hinkle, J. Stolz, F. Craft, I. Esteve, and R. Guerrero. 1990. *Mobilifilum chasei*: morphology and ecology of a spirochete from an intertidal stratified microbial mat community. *Archiv. Microbiol.* **153**:422–427

Margulis L., J. B. Ashen, M. Solé, and R. Guerrero. 1993. Composite, large spirochetes from microbial mats: Spirochete structure review. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:6966–6970

Margulis L. 1996. Archaeal-eubacterial mergers in the origin of the Eukarya: Phylogenetic classification of life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:1071–1076

Margulis L., M. F. Dolan, and R. Guerrero. 2000. The chimeric eukaryote: Origin of the nucleus from the karyomastigont in amitochondriate protists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:6954–6959

Marshall K. C. 1989. Cyanobacterial–heterotrophic bacterial interaction, p. 239–245. *In* Microbial mats: physiological ecology of benthic microbial communities. Y. Cohen, and E. Rosenberg (ed.). American Society for Microbiology, Washington DC

Martínez-Alonso M., J. Van Bleijswijk, N. Gaju, and G. Muyzer. 2005. Diversity of anoxygenic phototrophic sulfur bacteria in the microbial mats of the Ebro Delta: a combined morphological and molecular approach. *FEMS Microbiol. Ecol.* **52**:339–350

Mas-Castellà J. 1991. Acumulación de poli-β-hidroxialcanoatos por bacterias. Distribución en la naturaleza y biotecnología. Ph. D. Thesis. Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Mas-Castellà J., R. Guerrero, and J. De Jonkheere. 1996. High degree of similary between *Chromatium vinosum* and *Chromatium minutissimum* as revealed by ribotyping. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:922–925

Massana R., E. F. DeLong, and C. Pedrós-Alió. 2000. A few cosmopolitan phylotypes dominate planktonic archaeal assemblages in widely different oceanic provinces. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1777–1787

Matsusaki H., S. Manji, K. Taguchi , M. Kato , T. Fukui, and Y. Doi. 1998. Cloning and molecular analysis of the Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas* sp. strain 61–63. *J. Bacteriol.* **180**:6459–6467

Mayberry W. R., and J. R. Lane. 1993. Sequential alkaline saponification/acid hydrolysis/esterification: a one-tube method with enhanced recovery of both cyclopropane and hydroxylated fatty acids. *J. Microbiol. Methods* **18**:21–32

McArthur J. V., D. A. Kovacic, and M. H. Smith. 1988. Genetic diversity in natural populations of a soil bacterium across a landscape gradient. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:9621–9624

McCool G. J., and M. C. Cannon. 2001. PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* **183**:4235–4243

McGowan L., R. Herbert, and G. Muyzer. 2004. A comparative study of hydrocarbon degradation by *Marinobacter* sp., *Rhodococcus* sp., and *Corynebacterium* sp. isolated from different mat systems. *Ophelia* **58**:271–281

McKee R. W., S. V. Binkley, D. W. MacCorquodale, S. A. Thayer, and E. A. Doisy. 1939. Constitution and synthesis of vitamin K_1. *J. Am. Chem. Soc.* **61**:1295

McMaster M. C., and C. McMaster. 1998. GC/MS: A practical user's guide. Wiley-VCH (ed.), New York, NY

van der Meer M. T. J., S. Schouten, B. van Dongen, W. I. C. Rijpstra, G. Fuchs, J. S. Sinninghe Damsté, J. de Leeuw, and D. M. Ward. 2001. Biosynthetic controls on the ^{13}C contents of organic components in the photoautotrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *J. Biol. Chem.* **276**:10971–10976

Merz-Preiβ M. 2000. Calcification in cyanobacteria, p. 50–56. *In* Microbial sediments. R. E. Riding, and S. M. Awramik (ed.). Springer, Berlin Heidelberg, New York, NY

Mickell, A. T., T. J. Phelps, and D. C. White. 1987. Phospholipids to monitor microbial ecology in anaerobic digesters, p. 413–144. *In* Smith WH and Frank JR (ed.), Methane for Biomass, a system approach. Elsevier, New York, NY

Mills H. J., R. J. Martinez, S. Story, and P. A. Sobecky. 2004. Identification of members of the metabolically active microbial populations associated with *Beggiatoa* species mat communities from Gulf of Mexico cold-seep sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5447–5458

Minnikin D. E, and H. Abdolrahimzadeh. 1974. The replacement of phosphatidylethanolamine and acidic phospholipids by an ornithine-amide lipid and a minor phosphorus-free lipid in *Pseudomonas fluorescens* NCMB 129. *FEBS Lett.* **43**:257–260

Minz D., S. Fishbain, S. J. Green, G. Muyzer, Y. Cohen, B. E. Rittmann, and D. A Stahl. 1999. Unexpected population distribution in a microbial mat community: sulfate-reducing bacteria localized to the highly oxic chemocline in contrast to a eukaryotic preference for anoxia. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4659–4665

Mir J., M. Martínez-Alonso, I. Esteve, and R. Guerrero. 1991. Vertical stratification and microbial assemblage of a microbial mat in the Ebro Delta (Spain). *FEMS Microbiol. Ecol.* **86**:59–68

Montes C. 1990. Estudio de las zonas húmedas de España peninsular. Inventario y tipología. Dirección General de Obras Hidráulicas, Ministerio de Obras Públicas y Urbanismo. Madrid

Moore, L. V. H., D. M. Borne, and W. E. C. Moore. 1994. Comparative distribution and taxonomic value of cellular fatty acids in thirty-three genera of anaerobic Gram-negative bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:338–347

Moreira D., and R. Amils. 1997. Phylogeny of *Thiobacillus cuprinus* and other mixotrophic thiobacilli: proposal for *Thiomonas* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:522–528

Morikawa M., H. Daido, T. Takao, S. Murata, Y. Shimonishi, and T. Imanaka. 1993. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *J. Bacteriol.* **175**:6459–6466

Moter A., and U. B. Göbel. 2000. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Methods* **41**:85–112

Mouné S., C. Eatock, R. Matheron, J. C. Willison, A. Hirschler, R. Herbert, and P. Caumette. 2000. *Orenia salinaria* sp. nov., a fermentative bacterium isolated from anaerobic sediments of Mediterranean salterns. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:721–729

Mouné S. P. Caumette, R. Matheron, and J. C. Willison. 2003. Molecular sequence analysis of prokaryotic diversity in the anoxic sediments underlying cyanobacterial mats of two hypersaline ponds in Mediterranean salterns. *FEMS Microbiol. Ecol.* **44**:117–130

Mountfort D. O., F. A. Rainey, J. Burghardt, H. F. Kaspar, and E. Stackebrandt. 1997. *Clostridium vincentii* sp. nov., a new obligately anaerobic, saccharolytic, psychrophilic bacterium isolated from low-salinity pond sediment of the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Arch. Microbiol.* **167**:54–60

Moyer C. L., F. C. Dobbs, and D. M. Ward. 1994. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:871–879

Muβmann M., K. Ishii, R. Rabus, and R. Amman. 2005. Diversity and vertical distribution of cultured and uncultured Deltaproteobacteria in an intertidal mud flat of the Wadden Sea. *Environ. Microbiol.* **7**:405–418

Müller A. K., K. Westergaard, S. Christensen, and S. J. Sørensen. 2002. The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances. *Microb. Ecol.* **44**:49–58

Murata N., and I. Nishida. 1987. Lipids of blue-green algae (cyanobacteria), p. 315–347. *In* The biochemistry of plants, vol 4. Lipids: structure and function. P. K. Stumpf (ed.). Academic Press, New York

Murphy R. C. 2002. Mass spectrometry of phospholipids: Tables of molecular and product ions. Illuminati Press, Denver, Colorado

Muyzer G., E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:695–700

Muyzer G., and E. C. de Waal. 1994. Determination of the genetic diversity of microbial communities using DGGE analysis of PCR-amplified 16S rDNA, p. 205–214. *In* Microbial mats. Structure, development, and environmental significance. L. J. Stal, and P. Caumette (ed.). Springer-Verlag, Berlin

Muyzer G., and K. Shamala. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leewenhoek* **73**:127–141

N

Naeem S., L. J. Thompson, S. P. Lawler, J. H. Lawton, and R. M. Woodfin. 1995. Empirical evidence that declinig species diversity may alter the performance of terrestrial ecosystems. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **347**:249–262

Nahaie M. R, M. Goodfellow, D. E. Minnikin, and V. Hajek. 1984. Polar lipid and isoprenoid quinone composition in the classification of *Staphylococcus*. *J. Gen. Microbiol.* **130**:2427–2437

Naka T., N. Fujiwara, I. Yano, S. Maeda, M. Doe, M. Minamino, N. Ikeda, Y. Kato, K. Watabe, Y. Kumazawa, I. Tomiyasu, and K. Kobayashi. 2003. Structural analysis of sphingophospholipids derived from *Sphingobacterium spiritivorum*, the type species of genus *Sphingobacterium*. *Biochim. Biophys. Acta* **1635**:83–92

Naka T., N. Fujiwara, I. Yano, S. Maeda, M. Doe, M. Minamino, N. Ikeda, Y. Kato, K. Watabe, Y. Kumazawa, I. Tomiyasu, and K. Kobayashi. 2003. Structural analysis of sphingophospholipids derived from *Sphingobacterium spiritivorum*, the type species of genus *Sphingobacterium*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1635**:83–92

Nanninga H. J., and J. C. Gottschal. 1987. Properties of *Desulfovibirio carbinolicus* sp. nov. and other sulfate-reducing bacteria isolated from an anaerobic-purification plant. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:802–809

Navarrete A. 1999. PhD thesis. Caracterización bioquímica y ecofisiológica de los tapetes microbianos del delta del Ebro. Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Navarrete A., A. Peacock, S. J. Macnaughton, J. Urmeneta, J. Mas-Castellà, D. C. White, and R. Guerrero. 2000. Physiological status and community composition of microbial mats of the Ebro delta, Spain, by Signature Lipid Biomarkers. *Microb. Ecol.* **39**:92–99

Navarrete A., J. Urmeneta, J. M. Cantu, E. Vegas, D. C. White, and R. Guerrero. 2004. Signature lipid biomarkers of microbial mats of the Ebro delta (Spain), Camargue and Étang de Berre (France):An assessment of biomass and activity. *Ophelia* **58**:175–188

Nelson D. C., C. O. Wirsen, and H. W. Jannasch. 1989. Characterization of large, autotrophic *Beggiatoa* spp. Abundant at hydrothermal vents of the Guaymas Basin. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:2909–2917

Nelson D. C. 1992. The genus *Beggiatoa*, p. 3171–3180. *In* The prokaryotes, vol. 4. A. Ballows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.). Springer, New York, NY

Nichols P. D., G. A. Smith, C. P. Antworth, R. S. Hanson, and D. C. White. 1985. Phospholipid and lipopolysaccharide normal and hydroxy fatty acids as potential signatures for the methane-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**:327–335

Nickels, J. S., J. D. King, and D. C. White. 1979. Poly-β-hydroxybutyrate accumulation as a measure of unbalanced growth of the estuarine detrital microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**:459–465

Nielsen L. P., and N. P. Sloth. 1994. Denitrification, nitrification and nitrogen assimilation in photosynthetic microbial mats, p. 319–324. *In* Microbial mats. Structure, development, and environmental significance. L. J. Stal, and P. Caumette (ed.). Springer-Verlag, Berlin

Nisbet E. G., and C. M. R. Fowler. 1999. Archaean metabolic evolution of microbial mats. *Proc. R. Soc. Lon. B.* **266**:2375–2382

Nishihara M., H. Morii, and Y. Koga. 1987. Structure of a quartet of novel tetraether lipids from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Biochem.* **101**:1007–1115

Nübel U., B. Engelen, A. Felske, J. Snaidr, A. Wieshuber, R. I. Amann, W. Ludwig, and H. Backhaus. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **178**:5636–5643

Nübel U., F. Garcia-Pichel, M. Kühl, and G. Muyzer. 1999. Spatial scale and the diversity of benthic cyanobacteria and diatoms in a salina. *Hydrobiologia* **401**:199–206

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

Nübel U., M. M. Bateson, V. Vandieken, A. Wieland, M. Kuhl, and D. M. Ward. 2002. Microscopic examination of distribution and phenotypic properties of phylogenetically diverse *Chloroflexaceae*-related bacteria in hot spring microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4593–4603

O

Oeding V., and H. G. Schlegel. 1973. Beta-ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly-beta-hydroxybutyrate metabolism. *Biochem J.* **134**□239–248

Ochsenreiter T., F. Pfeifer, and C. Schleper. 2002. Diversity of Archaea in hypersaline environments characterized by molecular-phylogenetic and cultivation studies. *Extremophiles* **6**□267–274

O'Leary W. M., and S. G. Wilkinson. 1988. Gram-positive bacteria, p. 117–201. *In* Microbial Lipids vol. 1, C. Ratledge and S. G. Wilkinson (ed.). Academic Press, New York, NY

Ollivier B., P. Caumette, J.-L. García, and R. A. Mah. 1994. Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiol. Rev.* **58**□27–38

Okuyama H., N. Okajima, S. Sasaki, S. Higashi, and N. Murata. 1991. The *cis*/*trans* isomerization of the double bond of a fatty acid as a strategy for the adaptation to changes in the ambient temperature in the psychrophylic bacterium, *Vibrio* sp. strain ABE-1. *Biochim. Biophys. Acta* **1084**□13–20

Oremland R. S., and D. J. Des Marais 1983. Distribution, abundance and carbon isotopic composition of gaseous hydrocarbons in Big Soda Lake, Nevada□an alkaline meromictic lake. *Geochim. Cosmochim Acta* **47**□2107–2114

Oremland, R. S., and G. M. King. 1989. Methanogenesis in hypersaline environments, p. 180–190. *In* Microbial Mats□Physiological Ecology of Benthic Microbial Communities. Y. Cohen and E. Rosenberg (ed.), American Society for Microbiology, Washington, DC

Oren A., B. J. Paster, and C. R. Woese. 1984. *Haloanaerobiaceae*□A new family of moderately halophilic, obligately anaerobic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **5**□71–80

Oren A.. 1989. Photosynthetic and heterotrophic benthic bacterial communities of a hypersaline sulfur spring on the shore of the Dead Sea (Hamei Mazor), p. 64–76. *In* Microbial mats□physiological ecology of benthic microbial communities, Y. Cohen, and E. Rosenberg (ed.). ASM Washington DC

Ostle A. G., and J. G. Holt. 1982. Nile Blue A as a Fluorescent Stain for Poly-3-Hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**□238–241

Östling J., A. Goodman, and S. Kjelleberg. 1991. Behaviour of IncP-1 plasmids and a miniMu transposon in a marine *Vibrio* sp.□isolation of starvation inducible *lac* operon fusions. *FEMS Microbiol. Ecol.* **86:**83–94

P

Paerl H. W. 1990. Physiological ecology and regulation of N_2 fixation in natural waters. *Adv. Microb. Ecol.* **11**:305–344

Paerl H. W., B. M. Bebout, C. A. Currin, M. W. Fitzpatrick, and J. L. Pinckney. 1994. Nitrogen fixation dynamics in microbial mats, p. 325–337. *In* Microbial Mats, L. J. Stal and P. Caumette (ed.) NATO ASI Series, Vol. 35. Springer-Verlag, Berlin

Paerl H. W., J. L. Pinckney, and T. F. Steppe. 2000. Cyanobacterial–bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments. *Environm. Microbiol.* **2**:11–26

Pancost R. D., and J. S. Sinninghe Damsté. 2003. Carbon isotopic compositions of prokaryotic lipids as tracers of carbon cycling in diverse settings. *Chem. Geol.* **195**:29–58

Patchmayr F. 1960. Vorkommen und bestimmung von schwefelverbindungen in mineralwasser. PhD thesis, University of Munich, Munich, Germany

Paterson D. M., M. L. Yallo, and C. George. 1994. Spatial variability in sediment erodibility on the island of Texel. *In* Biostabilization of sediments, p. 107–119. W. E. Krumbein, D. M. Paterson, and L. J. Stal (ed.). Bibliotheks und Informationssystem der Universität, Oldenburg, Germany

Peacock A. D., Y.-J. Chang, J. D. Istok, L. Krumholz, R. Geyer, B. Kinsall, D. Watson, K. L. Sublette, and D. C. White. 2004. Utilization of microbial biofilms as monitors of bioremediation. *Microb. Ecol.* **47**:284–292

Peter K., and J. Moldowan. 1993. Biomarker guide. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ

Peter-Katalinic J., and W. Fischer. 1998. Alpha-D-glucopyranosyl-, D-alanyl- and L-lysylcardiolipin from gram-positive bacteria: analysis by fast atom bombardment mass spectrometry. *J. Lipid Res.* **39**:2286–2292

Petersen S. O., and M. J. Klug. 1994. Effects of sieving, storage, and incubation temperature on the phospholipid fatty acid profile of a soil microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2421–2430

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

Pohlschroeder M., S. Leschine, and E. Canale-Parola. 1994. *Spirochaeta caldaria* sp. nov., a thermophilic bacterium that enhances cellulose degradation by *Clostridium thermocellum*. *Arch. Microbiol.* **161**:17–24

Polglase W. J., W. T. Pun, and J. Withaar. 1966. Lipoquinones of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **118**:425–426

Poter K. G., and Y. S. Feig. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* **25**:943–948

Potts M., J. J. Olie, J. S. Nickels, J. Parsons, and D. C. White. 1987. Variations in phospholipid ester-linked fatty acids and carotenoids of dessicated *Nostoc commune* (cyanobacteria) from different geographic locations. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:115–120

Pulfer M., and R. C. Murphy. 2003. Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrom. Rev.* **22**:332–364

Q

Qi Q., and B. H. Rehm. 2001. Polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Caulobacter crescentus*: molecular characterization of the polyhydroxybutyrate synthase. *Microbiology* **147**:3353–3358

Qiu D.-F., M. P. L. Games, X.-Y. Xiao, D. E. Games, and T. J. Walton. 2000. Characterisation of membrane phospholipids and glycolipids from a halophilic archaebacterium by high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**:1586–1591

R

Ratledge C., and S. G. Wilkinson. 1988. Microbial lipids volume 1. C. Ratledge and S. G. Wilkinson (ed.) Academic Press, New York, NY

Ramirez-Moreno S., M. R. Martinez-Alonso, S. Mendez-Alvarez, I. Esteve, and N. Gaju. 2003. Seasonal population changes in the restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns from PCR-amplified 16S rRNA genes of predominant ribotypes in microbial mat samples from the Ebro Delta (Spain). *Curr Microbiol.* **46**:190–198

Rampone G., J. Urmeneta, C. Puigdefàbregas, and R. Guerrero. 1993. Geographical distribution of microbial mats in the Ebro delta: Structural diversity and role in the stabilization of the sediments. *Vehr. Internat. Verein. Limnol.* **25**:1014–1019

Rao D., Webb J. S., and S. Kjelleberg. 2005. Competitive interaction in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**□1729–1736

Rashidan K. K., and D. F. Bird. 2001. Role of predatory bacteria in the termination of a cyanobacterial bloom. *Microb. Ecol.* **41**□97–105

Reasoner D. J., and E. E. Geldreich. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**□1–17

Revsbech N. P., B. B. Jørgensen, and T. H. Blackburn. 1983. Microelectrode studies of the photosynthesis and O_2, H_2S, and pH profiles of a microbial mat. *Limnol. Oceanogr.* **28**□1062–1074

van Rijn J., and M. Shilo. 1985. Carbohydrate fluctuations, gas vacuolation, and vertical migration of scum-forming cyanobacteria in fishponds. *Limnol. Oceanogr.* **30**□1219–1228

Ringelberg D. B., J. D. Davis, G. A. Smith, S. M. Pfiffner, P. D. Nichols, J. S. Nickels, J. M. Henson, J. T. Wilson, M. Yates, D. H. Kampbell, H. W. Reed, T. T. Stocksdale, and D. C. White. 1988. Validation of signature phospholipids fatty acid biomarkers for alkaline-utilizing bacteria in soils and subsurface aquifer materials. *FEMS Microbiol. Ecol.* **62**□39–50

Rippka R., J. Deruelles, J. B. Waterbury, M. Herdman, and R. Y. Stanier. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen. Microbiol.* **111**□1–61

Ritchie A. E., R. F. Keeler, and J. H. Bryner. 1966. Anatomical features of *Vibrio fetus*□electronic microscopic survey. *J. Gen. Microbiol.* **43**□427–438

Rontani J.-F., D. Raphel, and P. Cuny. 1996. Early diagenesis of the intact and photooxidized chlorophyll phytyl chain in a recent temperate sediment. *Org. Geochem.* **24**□825–832

Rontani J.-F. 1998. Photodegradation of unsaturated fatty acids in senescent cells of phytoplankton□photoproduct structural identification and mechanistic aspects. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **114**□37–44

Rontani J.-F., P. C. Bonin, and J. K. Volkman. 1999. Biodegradation of free phytol by bacterial communities isolated from marine sediments under aerobic and denitrifying conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**□5484–5492

Rosselló-Mora R., B. Thamdrup, H. Schäfer, R. Weller, and R. Amann. 1999. The response of the microbial community of marine sediments to organic carbon input under anaerobic conditions. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**□237–248

Rothermich M. M., R. Guerrero, R. W. Lenz, and S. Goodwin. 2000. Characterization, seasonal occurrence, and diel fluctuations of poly(hydroxyalkanoate) in photosynthetic microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4279–4291

Rothrock M. J. Jr, and F. Garcia-Pichel. 2005. Microbial diversity of benthic mats along a tidal desiccation gradient. *Environ. Microbiol.* **7**:593–601

Rushforth S. R., and E. A. Felix. 1982. Biotic adjustements to changing salinities in the Great Salt Lake, Utah, USA. *Microbiol. Ecol.* **8**:161–167

Russell N. J., and D. S. Nichols. 1999. Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria – a dogma rewritten. *Microbiology* **145**:767–779

Rütters H., H. Sass, H. Cypionka, and J. Rullötter. 2002. Phospholipid analysis as a tool to study complex microbial communities in marine sediments. *J. Microbiol. Methods* **48**:149–160

Rütters H., H. Sass, H. Cypionka, and J. Rullötter. 2001. Monoalkylether phospholipids in the sulfate-reducing bacteria *Desulfosarcina variabilis* and *Desulforhabdus amnigenus*. *Arch. Microbiol.* **176**:435–442

Rützler K., and D. L. Santavy. 1983. The black band disease of Atlantic reef corals. I. Description of the cyanophyte pathogen. *Marine Ecol.* **4**:301–319

S

Saitou K., K. Nagasaki, H. Yamakawa, H. Y. Hu, K. Fujie, and A. Katayama. 1999. Linear relation between the amount of respiratory quinones and the microbial biomass in soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* **45**:775–778

Saitou N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406–425

Sambrook J., and D. W. Russel. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY

Sanger F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **74**:5463–5467

Sawabe T., H. Makino, M. Tatsumi, K. Nakano, K. Tajima, M. M. Iqbal, I. Yumoto, Y. Ezura, and R. Christen. 1998. *Pseudoalteromonas bacteriolytica* sp. nov., a marine bacterium that is the causative agent of red spot disease of *Laminaria japonica*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:769–774

Sawabe T., R. Tanaka, M. M. Iqbal, K. Tajima, Y. Ezura, E. P. Ivanova, and R. Christen. 2000. Assignment of *Alteromonas elyakovii* KMM 162T and five strains isolated from spot-wounded fronds of *Laminaria japonica* to *Pseudoalteromonas elyakovii* comb. nov. and the extended description of the species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:265−271

Schlegel H. G., R. Lafferty, and I. Krauss. 1970. The isolation of mutants not accumulating poly-β-hydroxybutyric acid. *Arch. Mikrobiol.* **71**:283–294

Sekiguchi H., M. Watanabe, T. Nakahara, B. Xu, and H. Uchiyama. 2002. Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5142–5150

Shannon C. E., and W. Weaver. 1963. The mathematical theory of communications. University of Illinois Press, Urbana.

Shilo M. 1970. Lysis of blue-green algae by mixobacter. *J. Bacteriol.* **104**:453–461

Sikkema J., J. A. M. de Bont, and B. Poolman. 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* **269**:8022–8028

Sikkema J., J. A. M. de Bont, and B. Poolman. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **59**:201–222

Simpson E. H. 1949. Measurement of diversity. *Nature* **163**:688

Sivasamy A., K. P. Singh, D. Mohan, and M. Maruthamuthu. 2001. Studies on defluoridation of water by coal-based sorbents. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **76**:717–722

Skerman V. B. 1968. A new type of micromanipulator and microforge. *J. Gen. Microbiol.* **54**:287–297

Skovhus T. L., N. B. Ramsing, C. Holmström, S. Kjelleberg, and I. Dahllöf. 2004. Real-time quantitative PCR for assessment of abundance of *Pseudoalteromonas* species in marine samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:2373–2382

Smith L. D. 1970. *Clostridium oceanicum*, sp. nov., a sporeforming anaerobe isolated from marine sediments. *J. Bacteriol.* **103**:811–813

Sneath P. H. A. 1956. Cultural and biochemical characteristics of the genus *Chromobacterium*. *J. Gen. Microbiol.* **15**:70–98

Søballe B., and R. K. Poole. 1999. Microbial ubiquinones:multiple roles in respiration, gene regulation and oxidative stress management. *Microbiology* **145**:1817–1830

Solé A., N. Gaju, R. Guerrero, and I. Esteve. 1998. Confocal laser scanning microscopy of Ebro Delta microbial mats. *Microsc. Anal.* **29**:13–15

Sorkhoh N., and R. Al-Hassan. 1992. Self-cleaning of the Gulf. *Nature* **359**:109

Spiekermann P., B. H. A. Rehm, R. Kalscheuer, D. Baumeister, and A. Steinbüchel. 1999. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Arch. Microbiol.* **171**:73–80

Spring S., B. Merkhoffer, N. Weiss, R. M. Kroppenstedt, H. Hippeand, and E. Stackebrandt. 2003. Characterization of novel psychrophilic clostridia from an Antarctic microbial mat: description of *Clostridium frigoris* sp. nov., *Clostridium lacusfryxellense* sp. nov., *Clostridium bowmanii* sp. nov. and *Clostridium psychrophilum* sp. nov. and reclassification of *Clostridium laramiense* as *Clostridium estertheticum* subsp. *laramiense* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:1019–1029

Sprott G. D. 1992. Structures of archaebacterial membrane lipids. *J. Bioenerg. Biomem.* **24**:555–566

Stahl D. A., and W. C. Capman. 1994. Application of molecular genetics to the study of microbial communities, p. 193–205. *In* Microbial mats. Structure, development, and environmental significance. L. J. Stal, and P. Caumette (ed.). Springer-Verlag, Berlin

Stal L. J., and W. E. Krumbein. 1985. Isolation and characterization of cyanobacteria from a marine microbial mat. *Botanica Marina* **28**:351–365

Stal L. J. 1994. Microbial mats in coastal environments, p. 21–32. *In* Microbial mats. Structure, development, and environmental significance. L. J. Stal, and P. Caumette (ed.). Springer-Verlag, Berlin

Steinbüchel A. 1991. Polyhydroxyalkanoic acids, p. 124–213. *In* Biomaterials: novel materials from biological sources. D. Byron (ed.). Stockton, New York, NY

Steinbüchel A., and H. E. Valentin. 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**:219–228

Steinbüchel A., E. Hustede, M. Liebergesell, U. Pieper, A. Timm, and H. E. Valentin. 1992. Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**:217–230

Stephen, J. R., Y-J. Chang, Y. D. Gan, A. Peacock, S. M. Pfiffner, M. J. Barcelona, D. C. White, and S. J. Macnaughton. 1999. Microbial characterization of a JP-4 fuel –contaminated site using a combined lipid biomarker/polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)-based approach. *Environ. Microbiol.* **1**:231–241

Steppe T. F., J. B. Olson, H. W. Paerl, R. W. Litaker, and J. Belnap. 1996. Consortial N_2 fixation: a strategy for meeting nitrogen requirements of marine and terrestrial cyanobacterial mats. *FEMS Microbiol. Ecol.* **21**:149–156

Strohl W. R., G. C. Cannon, J. M. Shively, H. Güde, L. A. Hook, C. M. Lane, and J. M. Larkin. 1981. Heterotrophic carbon metabolism by *Beggiatoa alba*. *J. Bacteriol.* **148**:572–583

Strom P. F. 1985. Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid-waste composting. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:899–905

Sturt H. F., R. E. Summons, K. Smith, M. Elvert, and K.-U. Hinrichs. 2004. Intact polar membrane lipids in prokaryotes and sediments deciphered by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization multistage mass spectrometry—new biomarkers for biogeochemistry and microbial ecology. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**:617–628

Suutari M., and S. Laakso. 1993. Effect of growth temperature on the fatty acid composition of *Mycobacterium phlei*. *Arch. Mikrobiol.* **159**:119–123

Suutari M., and S. Laakso. 1994. Microbial fatty acids and thermal adaptation. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**:285–328

T

Tang J.-C., T. Kanamori, Y. Inoue, T. Yasuta, S. Yoshida, and A. Katayama. 2004. Changes in the microbial community structure during thermophilic composting of manure as detected by the quinone profile method. *Proc. Biochem.* **39**:1999–2006

Tankéré S. P. C., D. G. Bourne, F. L. L. Muller, and V. Torsvik. 2002. Microenvironments and microbial community structure in sediments. *Environ. Microbiol.* **4**:97–105

Taylor C. D., and C. O. Wirsen. 1997. Microbiology and ecology of filamentous sulfur formation. *Science* **277**:1483–1485

Taylor C. J., A. J. Anderson, and S. G. Wilkinson. 1998. Phenotypic variation of lipid composition in *Burkholderia cepacia*: a response to increased growth temperature is a greater content of 2-hydroxy acids in phosphatidylethanolamine and ornithine amide lipid. *Microbiol.* **144**:1737–1745

Taylor R. F. 1984. Bacterial triterpenoids. *Microbiol. Rev.* **48**:181–198

Teece M. A., M. L. Fogel, M. E. Dollhopf, and K. H. Nealson. 1999. Isotopic fractionation associated with biosynthesis of fatty acids by a marine bacterium under oxic and anoxic conditions. *Org. Geochem.* **30**:1571–1579

Teske A., P. Sigalevich, Y. Cohen, and G. Muyzer. 1996. Molecular identification of bacteria from a coculture by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal DNA fragments as a tool for isolation in pure cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4210–4215

Teske A., N. B. Ramsing, K. Habicht, M. Fukui, J. Küver, B. B. Jørgensen, and Y. Cohen. 1998. Sulfate-reducing bacteria and their activities in cyanobacterial mats of Solar Lake (Sinai, Egypt). *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2943–2951

Thar R., and M. Kühl. 2001. Motility of *Marinochromatium gracile* in response to light, oxygen, and sulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5410–5419

Thar R., and M. Kühl. 2002. Conspicuous veils formed by vibrioid bacteria on sulfidic marine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:6310–6320

Thar R., and M. Kühl. 2003. Bacteria are not too small for spatial sensing of chemical gradients:An experimental evidence. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **100**:5748–5753

Thar R., and T. Fenchel. 2005. Survey of motile microaerophilic bacterial morphotypes in the oxygen gradient above a marine sulfidic sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:3682–3691

Thiele O. W., C. J. Biswas, and D. H. Hunneman. 1980. Isolation and characterization of an ornithine-containing lipid from *Paracoccus denitrificans*. *Eur. J. Biochem.* **105**:267–274

Threlfall D. R., and G. R. Whistance. 1971. Biosynthesis of isoprenoid quinones and chromanols, p. 357–404. *In* T. W. Goodwin (ed.), Aspects of terpernoid chemistry and biochemistry. Academic Press, Inc., London, UK

Tilman D. 1996. Biodiversity:Population versus ecosystem stability. *Ecology* **77**:350–363

Tornabene T. G., and T. A. Langworthy. 1979. Diphytanyl and dibiphytanyl glycerol ether lipids of methanogenic archaebacteria. *Science* **203**:51–53

Torsvik V., and L. Øverås. 2002. Microbial diversity and function in soil:from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**:240–245

Torsvik V., L. Øverås, and T. F. Thingstad. 2002. Prokaryotic diversity – magnitude, dynamics and controlling factors. *Science* **269**:1064–1066

Tourova T. P. 2000. The role of DNA–DNA hybridization and 16S rRNA gene sequencing in solving taxonomic problems by the example of the order *Haloanaerobiales*. *Microbiology* **69**:741–752

van Trappen S. J. Mergaert, S. Van Eygen, P. Dawyndt, M. C. Cnockaert, and J. Swings. 2002. Diversity of 746 heterotrophic bacteria isolated from microbial mats from ten antartic lakes. *System. Appl. Microbiol.* **25**:603–610

Tunlid A., and D. C. White. 1992. Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status and metabolic activity of the microbial community in soil, p. 229–262. *In* Soil biochemistry, vol. 7. J. M. Bollag and G. Stotzky (ed.), Marcel Dekker, New York, NY

Tyler S. A., and E. S. Barghoorn. 1954. Occurence of structurally preserved plants in pre-Cambrian rocks of the Canadian shield. *Science* **119**:606–608

U

Urakawa H., T. Yoshida, M. Nishimura, and K. Ohwada. 2000. Characterization of depth-related population variation in microbial communities of a coastal marine sediment using 16S rDNA-based approaches and quinone profiling. *Environ. Microbiol.* **2**:542–554

Urakawa H., T. Yoshida, M. Nishimura, and K. Ohwada. 2005. Characterization of depth-related changes and site-specific differences of microbial communities in marine sediments using quinone profiles. *Fish. Sci.* **71**:174–182

Urmeneta J. 1995. PhD thesis. Distribución geográfica y ecofisiológica de los tapetes microbianos del delta del Ebro. Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Urmeneta J., J. Mas-Castellà, and R. Guerrero. 1995. Biodegradation of Poly-β-hydroxyalkanoates in a lake sediment sample increases bacterial sulfate reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2046–2048

Urmeneta J., O. Alcoba, E. Razquín, E. Tarroja, A. Navarrete, and R. Guerrero. 1998. Oxygenic photosynthesis and respiratory activity by the oxygen exchange method in microbial mats of the Ebro delta, Spain. *Curr. Microbiol.* **37**:151–155

Urmeneta J., and A. Navarrete. 2000. Mineralogical composition and biomass studies of the microbial mat sediments from the Ebro Delta, Spain. *Int. Microbiol.* **3**:97–101

Urmeneta, J., A. Navarrete, J. Huete, and R. Guerrero. 2003. Isolation and characterization of cyanobacteria from microbial mats of the Ebro delta, Spain. *Curr. Microbiol.* **46**:199–204

V

Vanbroekhoven K., A. Ryngaert, L. Bastiaens, P. Wattiau, M. Vancanneyt, J. Swings, R. De Mot, and D. Springae. 2004. Streptomycin as a selective agent to facilitate recovery and isolation of introduced and indigenous *Sphingomonas* from environmental samples. *Environ. Microbiol.* **6**:1123–1136

Vandame P., M. Vancanneyt, B. Pot, L. Mels, B. Hoste, D. Dewettinck, L. Vlades, C. van den Borre, R. Higgins, J. Hommez, K. Kersters, J. P. Butzler, and H. Goossens. 1992. Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., and aerotolerant bacterium isolated from veterinaty specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**:344–356

Vandame P., and T. Coenye. 2004. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*:a tale of lost and found. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:2285–2289

Vestal J. R., and D. C. White. 1989. Lipid analysis in microbial ecology:Quantitative approaches to the study of microbial communities. *BioScience* **39**:535–541

Vicenzini M., C. Sili, R. de Philippis, A. Ena, and R. Materasi. 1990. Ocurrence of poly-β-hydroxybutyrate in *Spirulina* species. *J. Bacteriol.* **172**:2791–2792

Vincent W. F., M. T. Downes, R. W. Castenholz, and C. Howard-Williams. 1993. Community structure and pigment organisation of cyanobacteria-dominated microbial mats in Antarctica. *Eur. J. Phycol.* **28**:213–221

Vincent W. F., D. R. Mueller, and S. Bonilla. 2004. Ecosystems on ice:the microbial ecology of Markham Ice Shelf in the high Arctic. *Cryobiol.* **48**:103–112

Visscher P. T., R. A. Prins, and H. van Gemerden. 1992. Rates of sulfate reduction and thiosulfate consumption in a marine microbial mat. *FEMS Microbiol. Ecol.* **86**:283–294

Visscher P. T., L. K. Baumgartner, D. H. Buckley, D. R. Rogers, M. E. Hogan, C. D. Raleigh, K. A. Turk, and D. J. Des Marais. 2003. Dimethyl sulphide and methanethiol formation in microbial mats:potential pathways for biogenic signatures. *Environ. Microbiol.* **5**:296–308

Volkman J. K., F. T. Gillian, and R. B. Johns. 1981. Sources of neutral lipids in a temperate intertidal sediment. *Geochim. Cosmochim. Acta* **45**:1817–1828

W

Walter M. R., A. D. T. Goode, and W. D. M. Hall. 1976. Microfossils from a newly discovered Precambrian stromatolitic iron formation in Western Australia. *Nature* **261**□221–223

Wältermann M., and A. Steinbüchel. 2005. Neutral lipid bodies in prokaryotes□recent insights into structure, formation, and relationship to eukaryotic lipid depots. *J. Bacteriol.* **187**□3607–3619

Ward D. M., T. A. Tayne, k. L. Anderson, and M. M. Bateson. 1987. Lipid biochemical markers and the composition of microbial mats, p. 439–454. *In* Microbial mats□physiological ecology of benthic microbial communities. Y. Cohen, and E. Rosenberg (ed.). American Society for Microbiology, Washington DC

Ward D. M., R. Weller, and M. M. Bateson. 1990. 16S rRNA sequences reval numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* **345**□63–65

Ward D. M., J. Shiea, Y. Bin Zeng, G. Dobson, S. Brassell, and G. Eglinton. 1989. Lipid biomarkers and the composition of microbial mats, p. 439–454 *In* Microbial mats□physiological ecology of benthic microbial communities. Y. Cohen, and E. Rosenberg (ed.). American Society for Microbiology, Washington DC

Ward D. M., J. Bauld, R. W. Castenholz, and B. K. Pierson. 1992. Modern phototrophic microbial mats□anoxygenic, intermittently oxygenic/anoxygenic, thermal, eukaryotic, and terrestrial, p. 309–324. *In* The proterozoic biosphere. J. W. Schopf, and C. Klein (ed.). Cambridge Univ. Press, New York, NY

Ward D. M., S. Panke, K.-D. Klöppel, R. Christ, and H. Fredickson. 1994. Complex polar lipids of a hot spring cyanobacterial mat and its cultivated inhabitants. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**□3358–3367

Weibel E. K., P. Hadvary, E. Hochuli, E. Kupfer, and H. Lengsfeld. 1987. Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*. I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **40**□1081–1085

Whistance G. R., and D. R. Threlfall. 1968. Effect of anaerobiosis on the concentrations of demethylmenaquinone, menaquinone and ubiquinone in *Escherichia freundii*, *Proteus mirabilis* and *Aeromonas punctata*. *Biochem J.* **108**□505–507

White, D. C., R. J. Bobbie, J. S. Heron, J. D. King, and S. J. Morrison. 1979. Biochemical measurements of microbial mass and activity from environmental samples, p. 69–81. *In* Native aquatic bacteria: Enumeration, Activity and Ecology, ASTM STP 695. J. W. Costerton and R. R. Colwell (ed.), American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA

White D. C., R. J. Bobbie, J. S. Nickels, S. D. Fazio, and W. M. Davis. 1980. Nonselective biochemical methods for the determination of fungal mass and community structure in estuarine detrital microflora. *Botanica Marina* **23**:239–250

White D. C. 1988. Validation of quantitative analysis for microbial biomass, community structure and metabolic activity. *Adv. Limnol.* **31**:1–18

White D. C., and R. H. Findlay. 1988. Biochemical markers for measurements of predation effects on the biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial biofilms. *Hydrobiologia* **159**:119–132

White, D. C., H. C. Pinkart, and D. G. Ringelberg. 1995. Biomass measurements: biochemical approaches, p. 91–101. *In* Manual of Environmental Microbiology, 1st ed. C. H. Hurst, G. Kudsen, M. McInerney, L. D. Stetzenbach and M. Walter (ed.), American Society for Microbiology Press. Washington, DC

White D. C., S. D. Sutton, and D. B. Ringelberg. 1996. The genus *Sphingomonas*: physiology and ecology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**:301–306

White, D. C., and D. B. Ringelberg. 1997. Utility of the signature lipid biomarker analysis in determining *in situ* microbial biomass, community structure and nutritional/physiological status of deep subsurface microbiota, p. 117–134. *In* The Microbiology of the Terrestrial Subsurface. P. S. Amy and D. L. Haldeman (ed.), CRC Press, Boca Raton, FL

White D. C., C. A. Flemming, K. T. Leung, and S. J. Macnaughton. 1998. *In situ* microbial ecology for quantitative appraisal, monitoring, and risk assessment of pollution remediation in soils, the subsurface, the rhizosphere and in biofilms. *J. Microbiol. Methods* **32**:93–105

White D. C., A. M. Peacock, R. Geyer, Y.-J. Chang, Y.-D. M. Gan, and C. A. Lytle. 2003. Rapid detection/Identification of microbes, bacterial spores, microbial communities, and metabolic activities in environmental matrices, p. 3–19. *In* The utilization of bioremediation to reduce soil contamination: Problems and solutions. Šašek V. *et al.* (ed.). Kluwer Academic Publishers, Netherlands

Whitton B. A. 1973. Interactions with other organisms, p. 415–433. *In* The biology of blue-green algae. N. G. Carr and B. A. Whitton (ed.), Oxford

Widdel F., S. Schnell, S. Heising, A. Ehrenreich, B. Assmus, and B. Schink. 1993. Ferrous iron oxidation by anoxygenic phototrophic bacteria. *Nature* **362**834–835

Więckowski S., and M. Bojko. 1997. The NADPH-dependent electron flow in chloroplasts of the higher plants. *Photosynthetica (Prague)* **34**481–496

Wieland A., and M. Kühl. 2000a. Irradiance and temperature regulation of oxygenic photosynthesis and O_2 consumption in a hypersaline cyanobacterial mat (Solar Lake, Egypt). *Mar. Biol.* **137**71–85

Wieland A., and M. Kühl. 2000b. Short-term temperature effects on oxygen and sulfide cycling in a hypersaline cyanobacterial mat (Solar Lake, Egypt). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **196**87–102

Wieland A., M. Kühl, L. McGowan, A. Fourçans, R. Duran, P. Caumette, T. García de Oteyza, J. O. Grimalt, A. Solé, E. Diestra, I. Esteve,and R. A. Herbert. 2003. Microbial mats on the Orkney Islands revisited Microenvironment and microbial community composition. *Microb. Ecol.* **46**371–390

Wieland A., J. Zopfi, M. Benthie, and M. Kühl. 2005. Biogeochemistry of an iron-rich hypersaline microbial mat (Camargue, France). *Microb. Ecol.* **49**34–49

Wilkinson S. G. 1988. Gram-negative bacteria, p. 299–488. In Microbial Lipids. C. Ratledge and S. G. Wilkinson (ed.). Academic Press, London, UK

Wintzingerode F. V., U. B. Göbel, and E. Stackebrandt. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**213–229

Wirsen C. O., S. M. Sievert, C. M. Cavanaugh, S. J. Molyneaux, A. Ahmad, L. T. Taylor, E. F. DeLong, and C. D. Taylor. 2002. Characterization of an autotrophic sulfide-oxidizing marine *Arcobacter* sp. that produces filamentous sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**316–325

Woese C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**221–271

Wood B. J. B. 1988. Lipids of algae and protozoa, p. 807– 868. *In* Microbial Lipids. C. Ratledge and S. G. Wilkinson (ed.). Academic Press, London, UK

Wood A. P., and D. P. Kelly. 1993. Reclassification of *Thiobacillus thyasiris* as *Thiomicrospira thyasirae* comb. nov., an organism exhibiting pleomorphism in response to environmental conditions. *Arch. Microbiol.* **159**45–47

Worm J., and M. Søndergaard. 1998. Dynamics of heterotrophic bacteria attached to *Microcystis* spp. (cyanobacteria). *Aquat. Microb. Ecol.* **14**19–28

X-Y

Yabuuchi E., I. Yano, H. Oyaizu, Y. Hashimoto, T. Ezaki, and H. Yamamoto. 1990. Proposals of *Sphingomonas paucimobilis*, gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. *Microbiol. Immunol.* **34**:99–119

Yamamoto K., R. Murakami, Y. Takamura. 1998. Isoprenoid quinone, cellular fatty acid composition and diamopimelic isomers of newly classified thermophilic anaerobic gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Letters* **161**:351–358

Yeon S. H., W. J. Jeong, and J. S. Park. 2005. The diversity of culturable organotrophic bacteria from local solar salterns. *J. Microbiol.* **43**:1–10

Yoon J. H., I.-G. Kim,K. H. Kang, T.-K. Oh, and Y.-H. Park. 2003. *Bacillus marisflavi* sp. nov. and *Bacillus aquimaris* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:1297–1303

Yoon J. H., I. G. Kim, P. Schumann, T. K. Oh, and Y. H. Park. 2004a. *Marinibacillus campisalis* sp. nov., a moderate halophile isolated from a marine solar saltern in Korea, with emended description of the genus *Marinibacillus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:1317–1321

Yoon J. H., K. H. Kang, T. K. Oh, and Y. H. Park. 2004b. *Halobacillus locisalis* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a marine solar saltern of the Yellow Sea in Korea. *Extremophiles* **8**:23–28

Yuan W., Y. Jia, J. Tian, K. D. Snell, U. Muh, A. J. Sinskey, L.R. H. Lambalot, C. T. Walsh, and J. Stubbe. 2001. Class I and III polyhydroxyalkanoate synthases from *Ralstonia eutropha* and *Allochromatium vinosum*: characterization and substrate specificity studies. *Arch. Biochem. Biophys.* **394**:87–98

Z

Zeng Y. B., D. M. Ward, S. Brassell, and G. Eglinton. 1992. Biogeochemistry of hot spring environments. 3. Apolar and polar lipids in the biologically active layers of a cyanobacterial mat. *Chem. Geol.* **95**:347–360

Zhang C. L. , Z. Huang, J. Cantu, R. D. Pancost, R. L. Brigmon, T. W. Lyons, and R. Sassen. 2005. Lipid biomarkers and carbon isotope signatures of a microbial (*Beggiatoa*) mat associated with gas hydrates in the gulf of Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:2106–2112

Zhilina T. N., and G. A. Zavarzin. 1991. Anaerobic bacteria participating in organic matter destruction in halophilic cyanobacterial community. *J. Obshey. Biol.* **52**:302–318

Zhilina T. N., V. V. Zevbrin, A. M. Lysenko, and G. A. Zavarzin. 1991. Saccharolytic anaerobes in a halophilic cyanobacterial mat. *Mikrobiologiya* **60**:139–147

XII. APPENDIXES

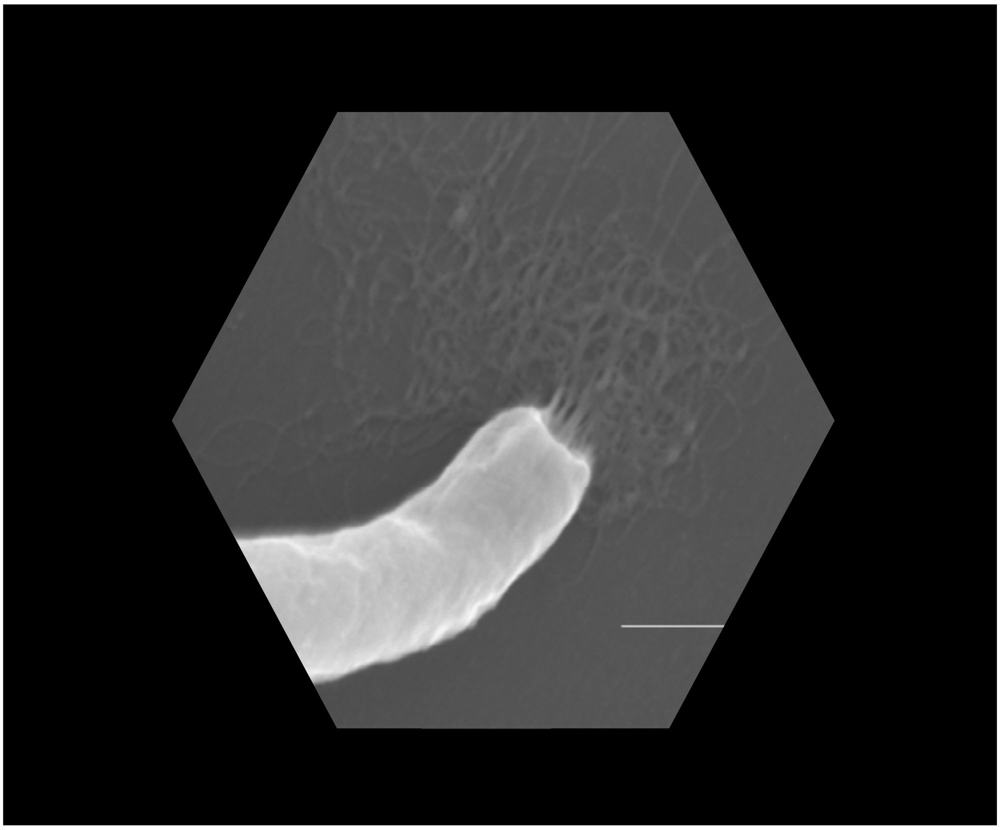


Figure XII.1. Detail of the polar tuf of flagella of a *Spirillum* detected in sulfur-rich blooms (scanning electron micrograph by the author).

INDEX TO FIGURES

CONTENTS

ABBREVIATIONS

I. INTRODUCTION

II. GENERAL MATERIAL AND METHODS

III. VALIDATION OF THE SIGNATURE LIPID BIOMARKER APPROACH IN MICROBIAL MATS

IV. VERTICAL MICROSCALE CHARACTERIZATION OF BACTERIAL DIVERSITY AND PHYSIOLOGICAL STATUS

V. REDOX STATE AND COMMUNITY COMPOSITION IN MICROBIAL MATS FROM DIFFERENT LOCATIONS

VI. ECOPHYSIOLOGICAL VARIATIONS DURING A CIRCADIAN CYCLE

VII. CHARACTERIZATION OF HETEROTROPHIC BACTERIA ISOLATED FROM THE PHOTIC ZONE

VIII. BACTERIAL SUCCESSION IN MICROBIAL MAT SULFUR BLOOMS

IX. CONCLUSIONS

X. RESUMEN DEL TRABAJO (SUMMARY)

XI. REFERENCES AND XII. APPENDIXES

INDEX TO TABLES

I. INTRODUCTION

II. GENERAL MATERIAL AND METHODS

III. VALIDATION OF THE SIGNATURE LIPID BIOMARKER APPROACH IN MICROBIAL MATS

IV. VERTICAL MICROSCALE CHARACTERIZATION OF BACTERIAL DIVERSITY AND PHYSIOLOGICAL STATUS

V. REDOX STATE AND COMMUNITY COMPOSITION IN MICROBIAL MATS FROM DIFFERENT LOCATIONS

VI. ECOPHYSIOLOGICAL VARIATIONS DURING A CIRCADIAN CYCLE

VII. CHARACTERIZATION OF HETEROTROPHIC BACTERIA ISOLATED FROM THE PHOTIC ZONE

VIII. BACTERIAL SUCCESSION IN MICROBIAL MAT SULFUR BLOOMS

X. RESUMEN DEL TRABAJO (SUMMARY)

USEFUL WEBSITES

Bioedit software package:

http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html (updated 31st May 2005)

Biopolymer calculator or Primer calculador:

http://paris.chem.yale.edu/extinct.html

BLAST:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ (updated 22nd August 2005)

ClustalW Multalign on-line:

http://www.ebi.ac.uk/clustalw/ (updated 18th May 2005)

Check_Chimera:

http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera.cgi?su=SSU

The Lipid library:

http://www.lipidlibrary.co.uk/ (updated 22nd September 2005)

Cyberlipid:

http://www.cyberlipid.org (updated 26th September 2005)

Denaturing Gradient Electrophoresis (DGGE) protocol:

http://www.nioo.knaw.nl/CL/ME/protocol_DGGE.pdf (updated March 2004)

MEGA evolutionary software package:

http://www.megasoftware.net/

PubMed (Service of the National Library of Medicine):

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi

Ribosomal database project (RDP):

http://rdp.cme.msu.edu/

SeaWIFS (Sea-viewing Wide Field-of-view Sensor**) project from NASA:**

http://oceancolor.gsfc.nasa.gov/SeaWiFS/

Spirochetes information (photographs and videoclips):

http://www.ucmp.berkeley.edu/bacteria/spirochetes.html
http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artmay99/vidmaya.html

Movies of microaerophilic bacteria in the oxic gradient (by M. Kühl):

http://www.mbl.ku.dk/mkuhl/DSGC/survey.html

ProbeBase (Database of molecular probes for FISH):

http://www.microbial-ecology.net/probebase/

PUBLICATIONS AND COMMUNICATIONS

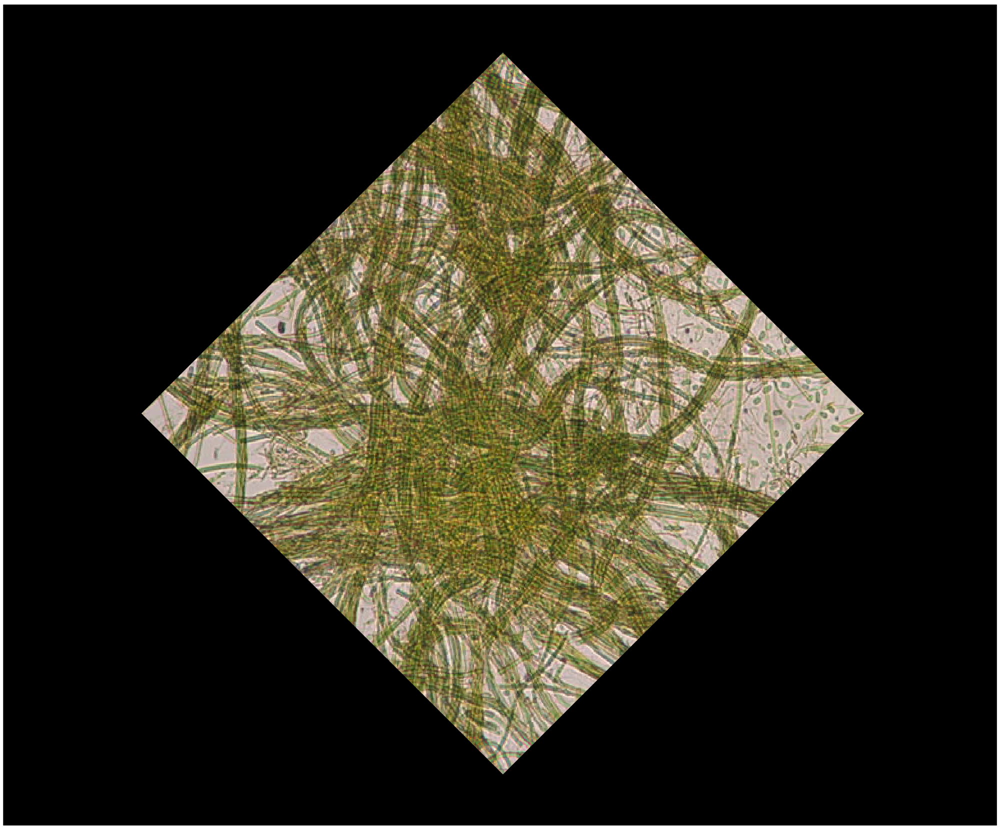


Figure XII.2. Filamentous cyanobacteria from Ebro delta microbial mats.

Characterization of Estuarine Microbial Mats from different Locations by Quinone Profiling and Intact Lipid Biomarkers

Laura Villanueva[1], Antoni Navarrete[1], Javier del Campo[1], Jordi Urmeneta[1], Ricardo Guerrero[1], and Roland Geyer[2]

Running title: Quinone and intact lipid profiling in microbial mats

Keywords: Microbial mats, quinone, polar lipids

[1]Department of Microbiology, Faculty of Biology. University of Barcelona. Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona (Spain).

[2]Department of Environmental Microbiology. UFZ Centre for Environmental Research Leipzig-Halle. Permoserstraße 15, 04318 Leipzig (Germany).

In preparation

***Correspondence author:** Laura Villanueva. Tel. +34 934039040, Fax: +34 934034629. E-mail: villanueva□ ub.edu

Increased Metabolic Stress, Slowed Growth, Anaerobic Microniches and Increased Polyhydroxyalkanoates Induced by Photosynthetic Activity during a Circadian Cycle in an Estuarine Microbial Mat

Laura Villanueva[1*], Antoni Navarrete[1], Jordi Urmeneta[1], Roland Geyer[2], Ricardo Guerrero[1], and D. C. White[3]

Running title: Analysis of polar, neutral and glycolipids in microbial mats

Keywords: Microbial mats, quinone, polar lipids, polyhydroxyalkanoates

[1]Department of Microbiology, Faculty of Biology. University of Barcelona. Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona (Spain).

[2]Department of Environmental Microbiology. UFZ Center for Environmental Research Leipzig-Halle. Permoserstraße 15, 04318 Leipzig (Germany).

[3]Center for Environmental Biotechnology, University of Tennessee. Research Dr. Suite 300, Knoxville, Tennessee (USA).

In preparation

***Correspondence author:** Laura Villanueva. Tel. +34 934039040, Fax: +34 934034629. E-mail: villanueva□ ub.edu

Heterotrophic Bacteria Associated with Cyanobacteria in the Photic Zone of Estuarine Microbial Mats

Laura Villanueva*, Javier del Campo, Antoni Navarrete, A. Barberán, Jordi Urmeneta, and Ricardo Guerrero

Running title: Heterotrophic bacteria in microbial mats

Keywords: Microbial mats, heterotrophic bacteria, cyanobacteria, photic zone

Department of Microbiology, Faculty of Biology. University of Barcelona. Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona (Spain).

In preparation

***Correspondence author:** Laura Villanueva. Tel. +34 934039040, Fax: +34 934034629. E-mail: villanueva@ub.edu

Diversity of Sulfur-Blooms in Microbial Mats

Laura Villanueva[*], Antoni Navarrete, Javier del Campo, Jordi Urmeneta,
and Ricardo Guerrero

Running title: Microbial diversity of sulfur-blooms in microbial mats

Keywords: Microbial mats, spirochetes, spirilloid-bacteria, sulfur-blooms

Department of Microbiology, Faculty of Biology. University of Barcelona. Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona (Spain).

In preparation

***Correspondence author:** Laura Villanueva. Tel. +34 934039040, Fax: +34 934034629. E-mail: villanueva□ ub.edu

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Nov. 2004, p. 6920–6926 Vol. 70, No. 11
0099-2240/04/$08.00+0 DOI: 10.1128/AEM.70.11.6920–6926.2004

Combined Phospholipid Biomarker-16S rRNA Gene Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Bacterial Diversity and Physiological Status in an Intertidal Microbial Mat

Laura Villanueva,[1]* Antoni Navarrete,[1] Jordi Urmeneta,[1] David C. White,[2]
and Ricardo Guerrero[1]

Department of Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain,[1] and Center for Environmental Biotechnology, University of Tennessee, Knoxville, Tennessee[2]

Received 12 January 2004/Accepted 26 June 2004

A combined lipid biomarker-16S rRNA gene denaturing gradient gel electrophoresis analysis was used to monitor changes in the physiological status, biomass, and microbial composition of a microbial mat. In the morning hours, an increase in the biomass of layers containing a high density of phototrophs and a decrease in the growth rate in the deep layers were observed. The combined approach also revealed differences in major groups of microorganisms, including green nonsulfur, gram-positive, and heterotrophic bacteria.

Photosynthetic microbial mats are sedimentary structures composed of different populations of bacteria distributed in multilayered communities (2, 10, 21, 22). The use of signature lipid biomarker analysis in microbial ecology studies provides an estimate of the viable microbial biomass (25) and physiological status of the microbial community, since phospholipid fatty acids (PLFAs) reflect the phenotypic response of microorganisms to environmental conditions. Despite its versatility, PLFA analysis has limited application to the analysis of gram-negative bacteria (28). To overcome this, PLFA studies have been complemented by nucleic acid-based analyses (15, 24). In the present report, differences in the metabolic status and microbial diversity of estuarine microbial mats were monitored by means of a combined lipid-nucleic acid approach.

Mat samples were taken from the Camargue (Rhone Delta, France) in April 2002 at two times during the day, 8:00 a.m. Greenwich mean time (GMT) (A samples) and 3:00 p.m. GMT (B samples). Each sample was cut by microtomy into layers 50 μm thick, and 10 cuts were grouped to form each sample group (from sample groups 1 to 15; group 16 contained 25 slices 50 μm thick). Samples were extracted with the single-phase chloroform-methanol-buffer system of Bligh and Dyer (1), as modified by White et al. (26, 27). The total lipid extract was fractionated by silicic acid chromatography, and the polar lipid fraction was transesterified to fatty acid methyl esters (8, 18). Nucleic acid was precipitated from the PLFA aqueous phase of the total lipid extraction (13). PCR amplification of 16S rRNA gene and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) were carried out as described by Muyzer et al. (17). Excised DGGE bands served as templates in PCRs as noted above, and the purified PCR products were sequenced. Amplification products that failed to directly generate legible sequences were cloned into the pGEM-T Easy System II (Promega, Madison, Wis.) cloning vector according to the manufacturer's instructions.

Maximum viable biomass as measured by total PLFAs (Fig. 1) accumulated at the top of the mat early in the day; however, in the afternoon, the highest levels of biomass were found underlying the uppermost layers.

An increase in the concentration of cyclopropanoic fatty acids represents the shift to conditions that slow down the growth rate (23). In addition, gram-negative communities make *trans*-monoenoic fatty acids in response to changes in their environment (9, 11). In the morning hours, the reduction in the growth rate (the ratio of cyclopropyl fatty acids to monoenoic PLFAs) increased with depth (Fig. 2A), whereas in the afternoon, the slowest growth was detected at the top and in the middle of the mat. Data concerning metabolic stress (Fig. 2B) indicated maximum stress at the topmost layers in the morning; however, the ratio of *trans* to *cis* monoenoic PLFAs increased at the bottom of the mat in the afternoon.

In the morning (Fig. 3A), the microbial community consisted mainly of gram-negative bacteria, as indicated by the presence of monoenoic PLFAs (30). Terminal branched saturated fatty acids (characteristic of gram-positive bacteria) comprised a high proportion of the total PLFA in the middle layers of the biomat and from samples at the deepest layers (maximum 24.6%). Branched monoenoics and mid-chain branched saturated fatty acids, representative of anaerobic microorganisms (3), were constant along the vertical profile. In the afternoon (Fig. 3B), the proportion of anaerobic microorganisms was higher and increased with depth. The prominent DGGE bands were sequenced, and their corresponding vertical positions and phylogenetic affiliations are shown in Fig. 4 and Table 1, respectively.

Determining the viable biomass of a microbial community provides an estimate of the amount of active microorganisms and their capacity for metabolic transformation (25). The maximum viable biomass (Fig. 1) observed in the morning hours

---

* Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology, University of Barcelona, Av. Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Spain. Phone: 34-934034628. Fax: 34-934034629. E-mail: address: villanueva@ub.edu.

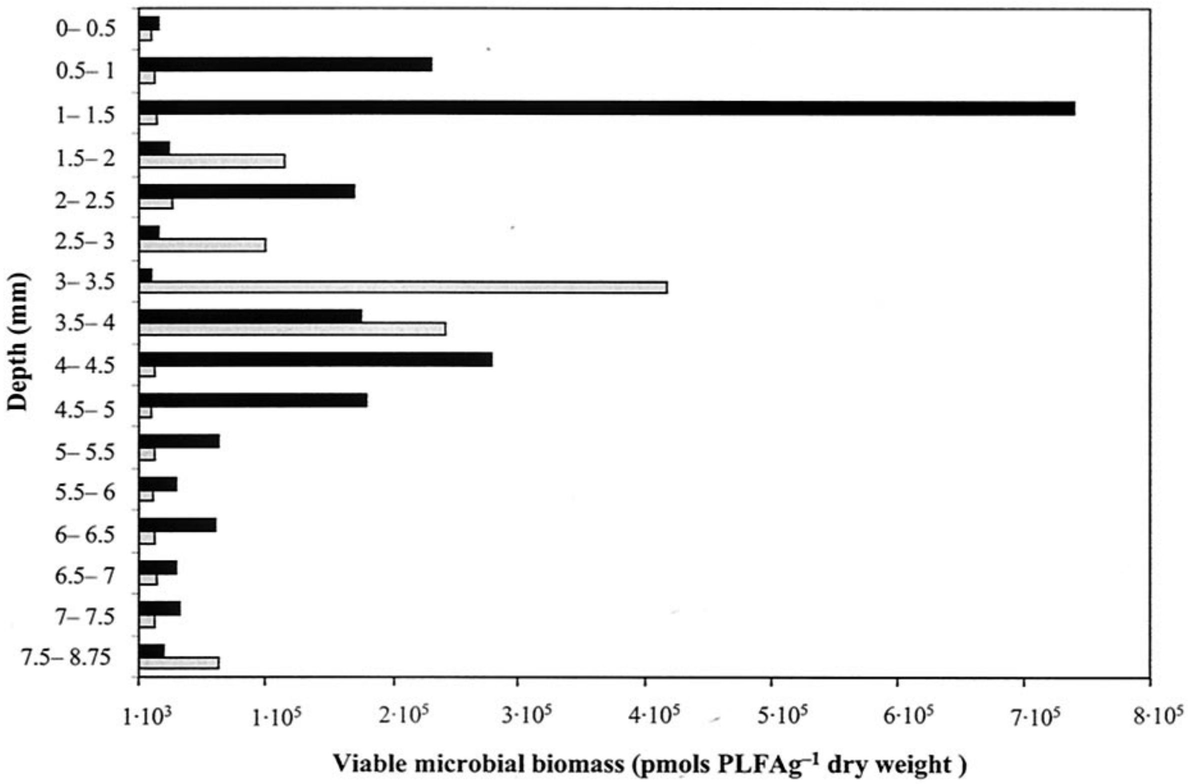


FIG. 1. Viable microbial biomass as measured by total PLFA, expressed as picomoles of PLFAs per gram (dry weight). Determination of the total PLFA provides a quantitative measure of the viable or potentially viable biomass. Viable microorganisms have an intact membrane that contains phospholipids (and PLFAs) which are turned over rapidly after cell death by means of cellular enzymes that hydrolyze the phosphate group from phospholipids, resulting in formation of diacylglycerols. ■, A samples, collected at 8:00 a.m. GMT; ▨, B samples, collected at 3:00 p.m. GMT.

might be explained by the migration (i) of cyanobacteria towards the top of the mat in order to avoid toxic exposure to sulfide (produced by sulfate-reducing bacteria and accumulated during the night) and (ii) of purple sulfur bacteria, which use the light in the early morning to begin photosynthetic processes. In fact, recent studies have reported an increase in bacterial biomass in layers containing a high density of phototrophs (6, 7, 14). The slow growth rate at the bottom of the mat (Fig. 2A) might be due to an increase in the activity of sulfate-reducing bacteria, especially at 8:00 a.m. In fact, during the night, anoxic conditions trigger the development of this population, which uses organic matter and produces sulfide. Limiting amounts of organic carbon (low C/N rate) may account for the slow growth of the sulfate reducers. The reduction in the growth rate at the top and in the middle of the mat at 3:00 p.m. (Fig. 2A) can be explained by photosynthesis and carbon fixation carried out by cyanobacteria and purple sulfur bacteria, resulting in the generation of abundant organic compounds and limiting amounts of nitrogen (high C/N rate). The exposure of cyanobacteria to sulfide (accumulated during the night) most likely accounts for the high degree of metabolic stress observed at the topmost layer in the morning. In this layer, a major contribution of aerobic heterotrophic bacteria during the morning hours has been reported. Indeed, previous studies provided evidence of cross-feeding of heterotrophs by excretion of photosynthates in microbial mats (4, 5, 12).

It is noteworthy that the DGGE band pattern showed high similarity to that of genus *Halanaerobium*. These data are consistent with the PLFA community composition analysis at 8:00 a.m. (Fig. 3A), since PLFAs of gram-positive bacteria were predominant in middle and deep layers of the microbial mat. PLFAs representative of gram-negative bacteria were dominant between a depth of 2.5 and 3.5 mm at 8:00 a.m. (Fig. 3A). These results are in agreement with the DGGE pattern, which showed a predominance of bands related to green nonsulfur bacteria (19, 20). A higher proportion of polyenoic fatty acids (indicative of microeukaryotes and cyanobacteria) in the afternoon was consistent with results of previous studies (16) in which an increase in the eukaryotic population in the anoxic region was reported. Finally, the detection at both sampling times of bands homologous to those from gamma-proteobacteria and purple nonsulfur bacteria supports recent findings for Orkney Island microbial mats (29).

The data provide a complete picture of the response of microbial mats to physicochemical variables influenced by time and depth, since ecological processes affect the cycling of nutrients at a community level. Changes in metabolic status can be attributed mainly to the activity of phototrophs, which in-

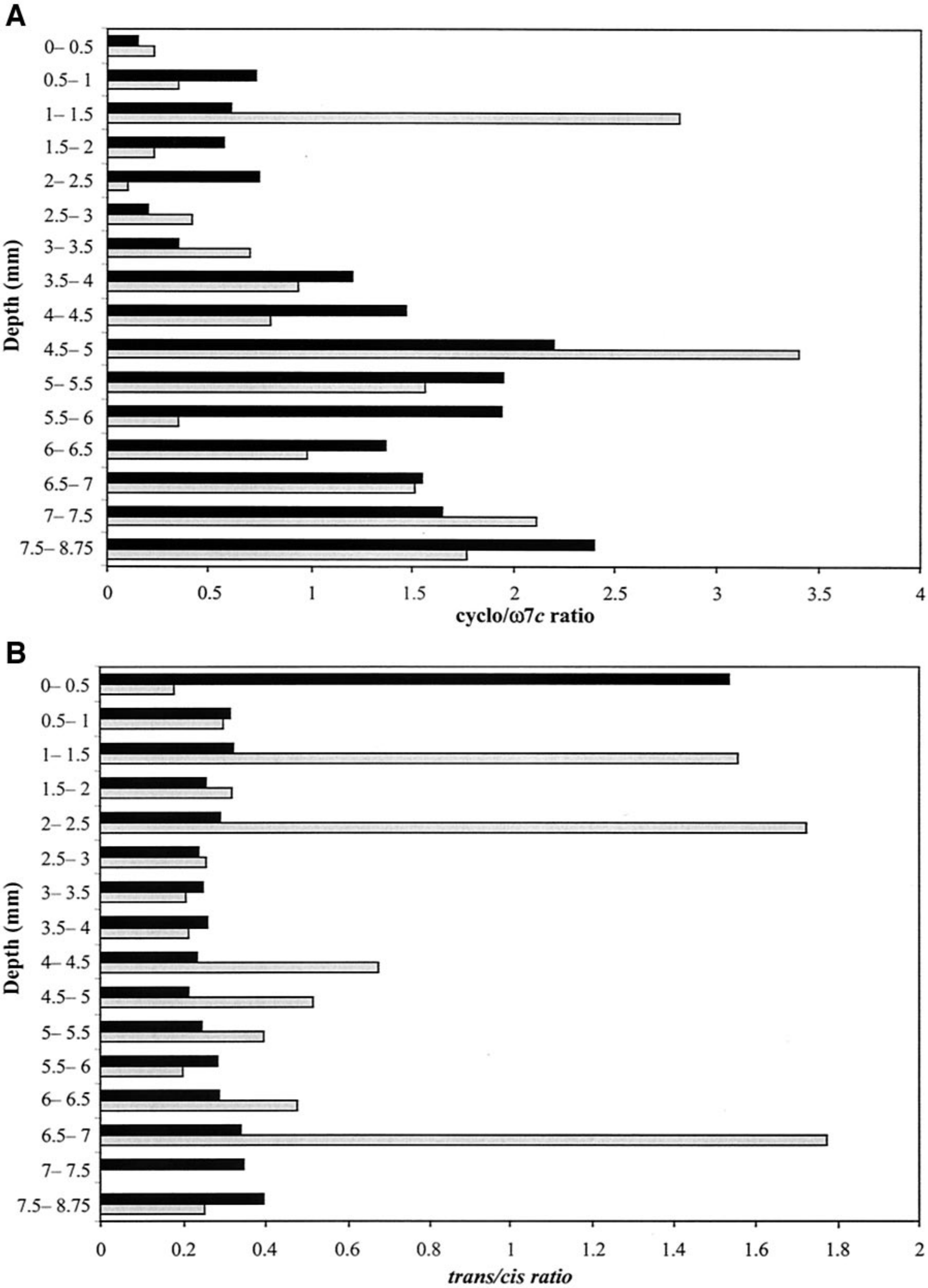


FIG. 2. (A) Metabolic status or starvation index as the ratio of cyclopropyl fatty acids to monoenoic PLFAs (cyclo/ω7*c* ratio). An increase in the concentration of cyclopropanoic fatty acids represents the shift to conditions that slow down the growth rate. This ratio ranges from 0.05 (exponential phase) to 2.5 or higher (stationary phase) in gram-negative bacteria. (B) Metabolic stress expressed as the *trans*/*cis* ratio of monoenoic PLFAs. Gram-negative bacterial communities make *trans*-monoenoic fatty acids in response to changes in their environment (exposure to solvent, toxic metals, or starvation). *Trans*/*cis* ratios greater than 0.1 indicate starvation in bacterial isolates, while ratios of 0.05 or lower are found in nonstressed microbial populations. ■, A samples, collected at 8:00 a.m. GMT; ▨, B samples, collected at 3:00 p.m. GMT.

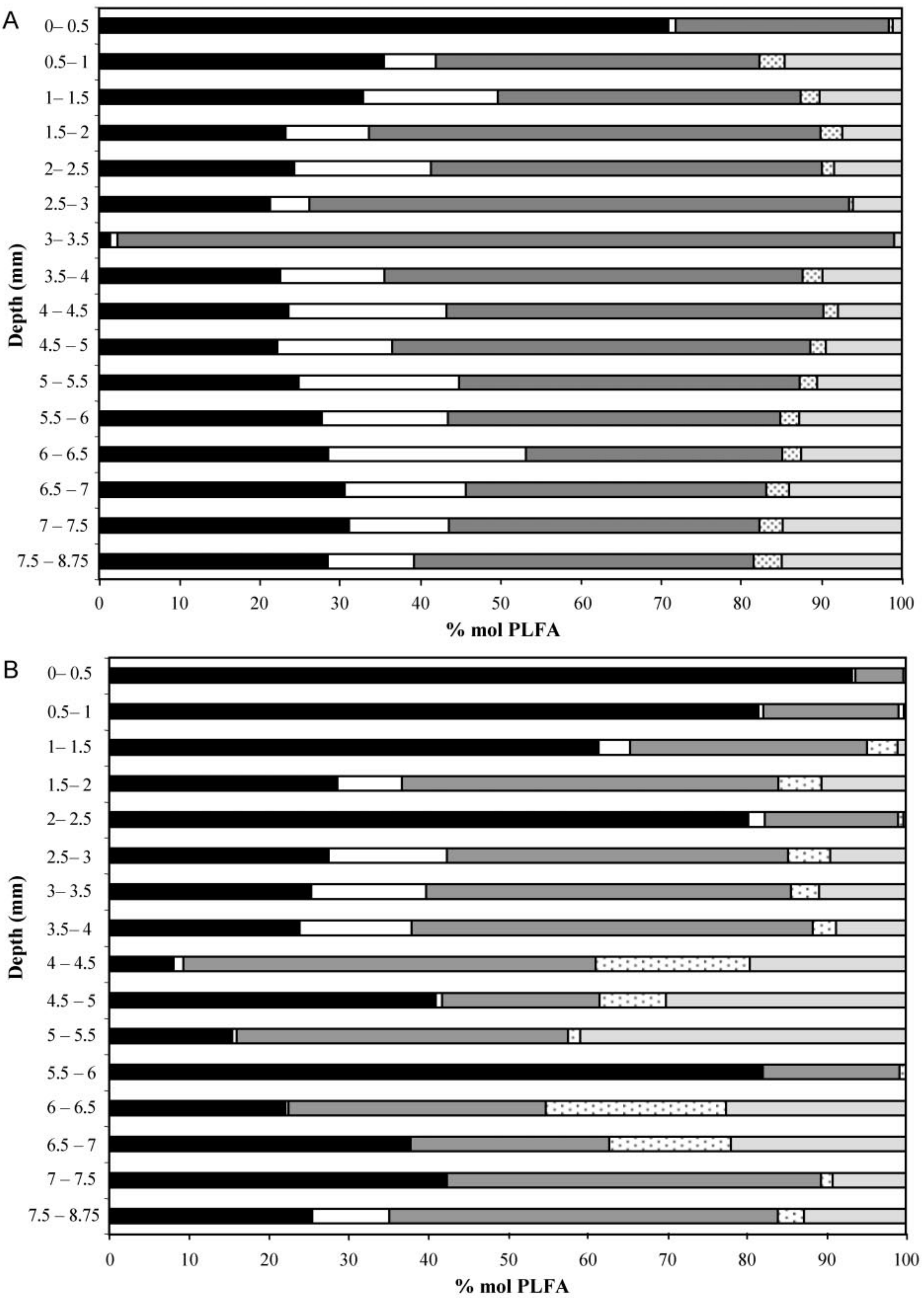


FIG. 3. Community composition expressed as moles percent PLFA. (A) Samples taken at 8:00 a.m. GMT; (B) samples taken at 3:00 p.m. GMT. The presence of certain groups of microorganisms can be inferred by the detection of unique lipids. For example, specific PLFAs are prominent in microbial groups as follows: as normal saturated PLFAs (all genera) (black bars), as terminal branched saturated PLFAs (gram-positive bacteria) (white bars), as monoenoic PLFAs (gram-negative bacteria) (dark-gray bars), as polyenoic PLFAs (microeukaryotes) (dotted bars), and as branched monoenoic and mid-branched saturated PLFAs (anaerobic microorganisms) (light-gray bars).

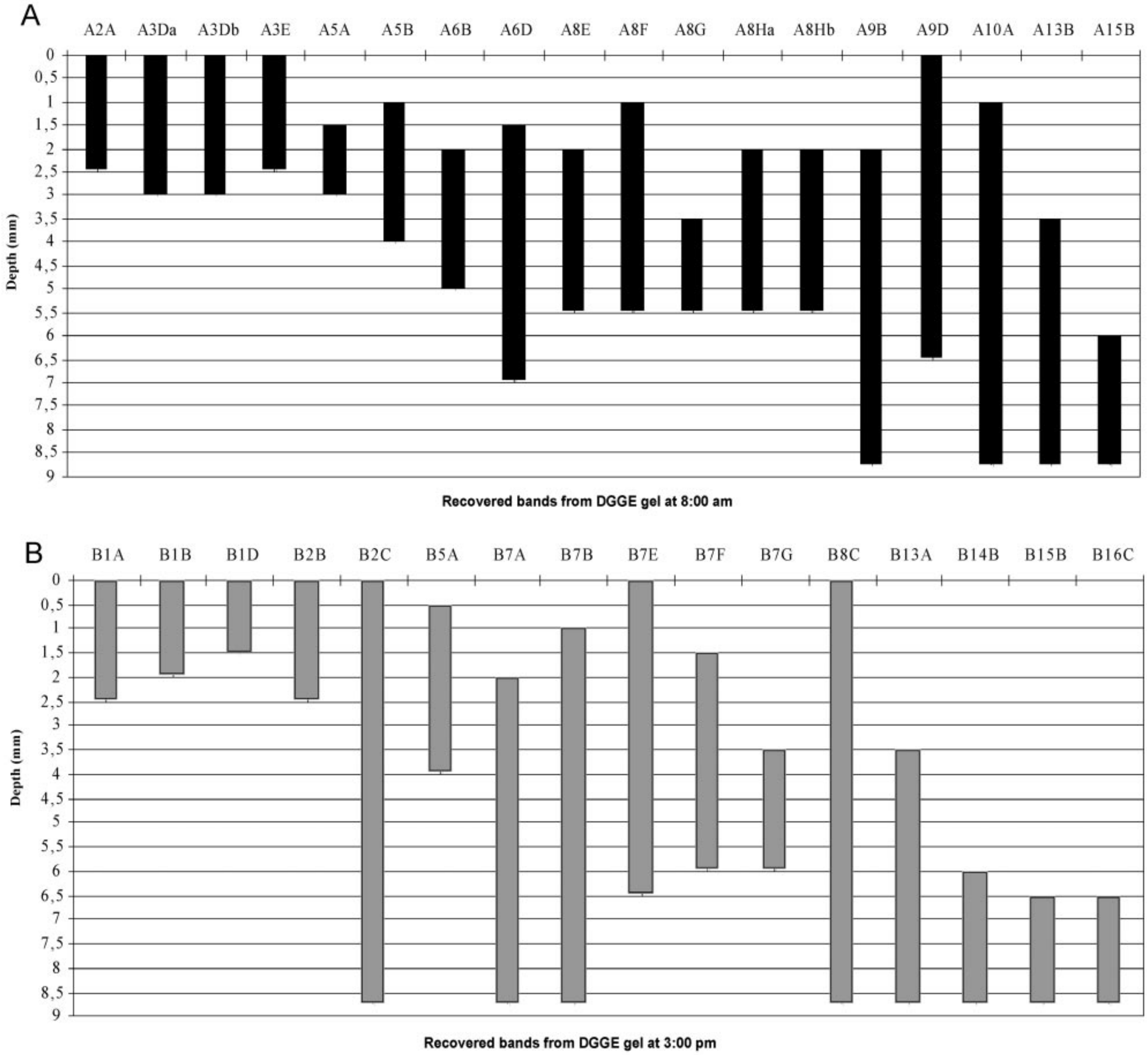


FIG. 4. DGGE analysis of the microbial mat community at two sampling times. Amplified products were separated on a gradient of 30 to 65% denaturant. Labeled bands were excised from the gel, reamplified, and sequenced. Bands that failed to generate legible sequences were cloned. The vertical distribution of DGGE bands recovered from gel A at 8:00 a.m. (A) and from gel B at 3:00 p.m. (B) is shown. For example, band $A2_A$ was obtained from a sample taken at a depth of 0 to 2.5 mm.

duce the exudation of photosynthates, the cross-feeding of associated heterotrophic bacteria, and the growth of anaerobic microorganisms. Combining phenotypic analyses based on PLFA with DNA analyses provides greater insight into the dynamic shifts in metabolism in microbial mat communities than that obtained from nucleic acid studies alone.

The DGGE and PLFA data strengthen the idea of the model of microbial mats as complex and dynamic ecosystems in which vertical migrations and physiological adaptations occur over intervals of hours and progress through day-night cycles.

We thank Mercè Piqueras and Wendy Ran for helpful suggestions. We are grateful to the staff of the Center for Biomarker Analysis (Knoxville, Tenn.) for advice and technical assistance.

This research was supported by Spanish MCyT grant BOS2002-02944 and EU grant EVK3-CT-1999-00010 (Matbiopol project), both given to R.G., and by grant DE-FC02-96ER62278 from the Office of Biological and Environmental Research (OBER) and the Natural and

TABLE 1. Similarity between DNA recovered from DGGE gels and closest relatives

Band code	GenBank accession no.	Similarity (%)	Closest relative
$A2_A$	AY525644	100	*Psychroflexus tropicus*
$A3_D$	AY525677	95	Uncultured *Spirochaetaceae* bacterium
	AY525676	87	Uncultured bacterium clone C11-F10
$A3_E$	AY525645	99	Gamma-proteobacterium GWS-SE-H242b
$A5_A$	AY525647	97	*Halanaerobium saccharolyticum*
$A5_B$	AY525648	98	*Halanaerobium saccharolyticum*
$A6_B$	AY525646	93	Uncultured bacterium clone s22
$A6_D$	AY525654	100	*Halanaerobium saccharolyticum*
$A8_E$	AY525658	94	Uncultured green nonsulfur bacterium
$A8_F$	AY525662	89	*Bdellovibrio* sp. strain JS7
$A8_G$	AY525665	95	Uncultured green nonsulfur bacterium
$A8_H$	AY525666	98	Uncultured bacterium clone ZB56
	AY525667	94	Uncultured *Chloroflexi* bacterium clone
$A9_B$	AY525668	93	Bacteria from anoxic bulk soil
$A9_D$	AY525660	93	Bacteria from anoxic bulk soil
$A10_A$	AY525649	100	*Halanaerobium saccharolyticum*
$A13_B$	AY525656	97	Uncultured *Rhodobacter* sp.
$A15_B$	AY525675	92	*Peptoniphilus harei*
$B1_A$	AY525652	99	*Psychroflexus tropicus*
$B1_B$	AY525651	93	*Psychroflexus tropicus*
$B1_D$	AY525669	96	*Psychroflexus tropicus*
$B2_B$	AY525670	97	Gamma-proteobacterium GWS-SE-H242b
$B2_C$	AY525671	98	Uncultured cyanobacterium (*Microcoleus* sp.)
$B5_A$	AY525655	88	Uncultured bacterium clone C11-F10
$B7_A$	AY525650	93	Uncultured bacterium GR-Sh2-12
$B7_B$	AY525674	98	Uncultured *Bacteroidetes* bacterium clone
$B7_E$	AY525663	91	Uncultured bacterium clone ZB69
$B7_F$	AY525657	93	Bacteria from anoxic bulk soil
$B7_G$	AY525664	94	Uncultured bacterium clone s22
$B8_C$	AY525661	94	Uncultured delta-proteobacterium clone
$B13_A$	AY525653	100	*Halanaerobium saccharolyticum*
$B14_B$	AY525659	95	Uncultured gamma-proteobacterium clone
$B15_B$	AY525673	95	Uncultured green nonsulfur bacterium clone
$B16_C$	AY525672	91	Bacteria from anoxic bulk soil

Accelerated Bioremediation Research (NABIR) Program. L.V. is a recipient of a scholarship from the Spanish MECD (AP2001-0953).

REFERENCES

1. **Bligh, E. G., and W. J. Dyer.** 1954. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. **37:**911–917.
2. **Caumette, P., R. Matheron, N. Raymon, and J. C. Relexans.** 1994. Microbial mats in the hypersaline ponds of Mediterranean salterns (Salins de Giraud, France). FEMS Microbiol. Ecol. **13:**273–286.
3. **Dowling, N. J. E., F. Widdel, and D. C. White.** 1986. Phospholipid ester-linked fatty acid biomarkers of acetate-oxidizing sulfate reducers and other sulfide forming bacteria. J. Gen. Microbiol. **132:**1815–1825.
4. **Epping, E., and M. Kühl.** 2000. The responses of photosynthesis and oxygen consumption to short-term changes in temperature and irradiance in a cyanobacterial mat (Ebro Delta, Spain). Environ. Microbiol. **2:**465–474.
5. **Fenchel, T., and M. Kühl.** 2000. Artificial cyanobacterial mats: growth, structure, and vertical zonation patterns. Microb. Ecol. **40:**85–93.
6. **Glud, R. N., M. Kühl, O. Kohls, and N. B. Ramsing.** 1999. Heterogeneity of oxygen production and consumption in a photosynthetic microbial mat as studied by planar optodoes. J. Phycol. **35:**270–279.
7. **Grötzschel, S., and D. de Beer.** 2002. Effect of oxygen concentration on photosynthesis and respiration in two hypersaline microbial mats. Microb. Ecol. **44:**208–216.
8. **Guckert, J. B., M. A. Hood, and D. C. White.** 1985. Phospholipid, ester-linked fatty acid profiles as reproducible assays for changes in prokaryotic community structure of estuarine sediments. FEMS Microbiol. Ecol. **31:**147–158.
9. **Guckert, J. B., M. A. Hood, and D. C. White.** 1986. Phospholipid, ester-linked fatty acids profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: increases in the *trans*/*cis* ratio and proportions of cyclopropil fatty acids. Appl. Environ. Microbiol. **52:**794–801.
10. **Guerrero, R., J. Urmeneta, and G. Rampone.** 1993. Distribution of types of microbial mats at the Ebro Delta, Spain. BioSystems **31:**135–144.
11. **Heipieper, H. J., R. Diffenbach, and H. Keweloch.** 1992. Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. Appl. Environ. Microbiol. **58:**1847–1852.
12. **Jonkers, H. M., and R. M. M. Abed.** 2003. Identification of aerobic heterotrophic bacteria from the photic zone of a hypersaline microbial mat. Aquat. Microb. Ecol. **30:**127–133.
13. **Kehrmeyer, S. R., B. M. Appelgate, H. Pinkart, D. B. Hedrick, D. C. White, and G. S. Sayler.** 1996. Combined lipid/DNA extraction method for environmental samples. J. Microbiol. Methods **25:**153–163.
14. **Kühl, M., and T. Fenchel.** 2000. Bio-optical characteristics and the vertical distribution of photosynthetic pigments and photosynthesis in an artificial cyanobacterial mat. Microb. Ecol. **40:**94–103.
15. **Macnaughton, S. J., J. R. Stephen, A. D. Venosa, G. A. Davis, Y.-J. Chang, and D. C. White.** 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. Appl. Environ. Microbiol. **65:**3566–3574.
16. **Minz, D., S. Fishbain, S. J. Green, G. Muyzer, Y. Cohen, B. E. Rittmann, and D. A. Stahl.** 1999. Unexpected population distribution in a microbial mat community: sulfate-reducing bacteria localized to the highly oxic chemocline in contrast to a eukaryotic preference for anoxia. Appl. Environ. Microbiol. **65:**4659–4665.
17. **Muyzer, G., E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. **59:**695–700.
18. **Navarrete, A., A. Peacock, S. J. Macnaughton, J. Urmeneta, J. Mas-Castellà, D. C. White, and R. Guerrero.** 2000. Physiological status and community composition of microbial mats of the Ebro Delta, Spain, by Signature Lipid Biomarkers. Microb. Ecol. **39:**92–99.
19. **Nübel, U., M. M. Bateson, M. T. Madigan, M. Kühl, and D. M. Ward.** 2001. Diversity and distribution in hypersaline microbial mats of bacteria related to *Chloroflexus* spp. Appl. Environ. Microbiol. **67:**4365–4371.
20. **Nübel, U., M. M. Bateson, V. Vandieken, A. Wieland, M. Kuhl, and D. M. Ward.** 2002. Microscopic examination of distribution and phenotypic properties of phylogenetically diverse *Chloroflexaceae*-related bacteria in hot spring microbial mats. Appl. Environ. Microbiol. **68:**4593–4603.

21. **Paerl, H. W., J. L. Pinckney, and T. F. Steppe.** 2000. Cyanobacterial-bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments. Environ. Microbiol. **2:**11–26.
22. **Risatti, J. B., W. C. Capman, and D. A. Stahl.** 1994. Community structure of a microbial mat: the phylogenetic dimension. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91:**10173–10177.
23. **Sikkema, J., J. A. M. de Bont, and D. Poolman.** 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol. Rev. **58:**201–222.
24. **Stephen, J. R., Y.-J. Chang, Y. D. Gan, A. Peacock, S. M. Pfiffner, M. J. Barcelona, D. C. White, and S. J. Macnaughton.** 1999. Microbial characterization of a JP-4 fuel-contaminated site using a combined lipid biomarker/polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)-based approach. Environ. Microbiol. **1:**231–241.
25. **Vestal, J. R., and D. C. White.** 1989. Lipid analysis in microbial ecology: quantitative approaches to the study of microbial communities. Bioscience **39:**535–541.
26. **White, D. C., R. J. Bobbie, J. S. Heron, J. D. King, and S. J. Morrison.** 1979. Biochemical measurements of microbial mass and activity from environmental samples, p. 69–81. *In* J. W. Costerton and R. R. Colwell (ed.), Native aquatic bacteria: enumeration, activity and ecology, ASTM STP 695. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pa.
27. **White, D. C., J. O. Stair, and D. B. Ringelberg.** 1996. Quantitative comparisons of *in situ* microbial biodiversity by signature biomarker analysis. J. Ind. Microbiol. **17:**185–196.
28. **White, D. C., and D. B. Ringelberg.** 1997. Utility of the signature lipid biomarker analysis in determining *in situ* microbial biomass, community structure and nutritional/physiological status of deep subsurface microbiota, p. 119–136. *In* P. S. Amy and D. L. Haldeman (ed.), The microbiology of the terrestrial deep subsurface. Lewis Publishers, Boca Raton, Fla.
29. **Wieland, A., M. Kühl, L. McGowan, A. Fourçans, R. Duran, P. Caumette, T. García de Oteyza, J. O. Grimalt, A. Solé, E. Diestra, I. Esteve, and R. A. Herbert.** 2003. Microbial mats on the Orkney Islands revisited: microenvironment and microbial community composition. Microb. Ecol. **46:**371–390.
30. **Wilkinson, S. G.** 1988. Gram-negative bacteria, p. 299–488. *In* C. Ratledge and S. G. Wilkinson (ed.), Microbial lipids, vol. 1. Academic Press, London, United Kingdom.

OPHELIA **58** (3): 165-173 (December 2004)

PHYSIOLOGICAL STATUS AND MICROBIAL DIVERSITY ASSESSMENT OF MICROBIAL MATS: THE SIGNATURE LIPID BIOMARKER APPROACH

Laura Villanueva,[1] Antoni Navarrete,[1] Jordi Urmeneta,[1] David C. White,[2] and Ricardo Guerrero[1]*

[1]Department of Microbiology, University of Barcelona, Spain
[2]Center for Environmental Biotechnology, University of Tennessee, Knoxville, Tennessee, USA
*Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology, University of Barcelona. Av. Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Spain. Phone: 34-934034628. Fax: 34-934034629. E-mail address: villanueva@ub.edu

ABSTRACT

Molecular fingerprinting using signature lipid biomarker (SLB) analysis and nucleic-acid-based techniques provides a quantitative and comprehensive method to assess the viable biomass, community composition and physiological status of microbial communities. Photosynthetic microbial mats are sedimentary structures composed primarily of different populations of bacteria in multilayered communities. Traditionally, microbial ecology studies of microbial mat communities have been incomplete because of the inability to identify and quantify all contributing populations. In fact, classical methods often revealed less than 1% of the microbial diversity. Examination of the lipid components of microbial mat samples allows a sensitive assessment of the *in situ* microbial community that is independent of the isolation and culture of certain microorganisms. Numerous studies based on SLB analysis of microbial mats have established a relationship between physiological activities, daily and seasonal processes and microniches within the mat. Expansion of the SLB approach and concomitant analysis of the nucleic acids derived from the lipid extraction provide a powerful tool for improving our understanding of complex microbial communities such as intertidal microbial mats.

Key Words: Lipid analysis, Phospholipid fatty acids, Poly-β-hydroxyalkanoates, Ecophysiology, Microbial mats.

INTRODUCTION

Microbial mats are laminated sedimentary structures composed of a consortium of bacteria dominated by photoautotrophic cyanobacteria, anoxygenic phototrophs (purple and green bacteria), colorless sulfur bacteria, and sulfate-reducing bacteria. The niches for the different groups of microorganisms are steep environmental microgradients of oxygen and sulfide that are spatially separated or overlapped. Photosynthetic mats represent the remains of one of the first ecosystems that evolved on Earth, about 3.5 billion years ago, which testifies to their capacity in adapting to and modifying hostile environments through cellular and community-mediated activities (Van Gemerden 1993).

The driving force of microbial mats is the photosynthetic activity carried out by cyanobacteria and algae. Consequently, sulfate-reducing bacteria reduce sulfate to sulfide using the end-products of cyanobacterial metabolism, and the sulfide is further reoxidized to sulfate by colorless and anoxygenic phototrophs. The microbial mat community is vertically stratified into four distinct phototrophic populations (Des Marais 1990, Stolz 1990) that can be distinguished according to their pigment and species composition. The uppermost layer consists of *Navicula*, *Rhopalodia* and other diatom species as well as cyanobacteria, such as *Aphanothece* sp., *Phormidium* sp., *Microcoleus chthonoplastes*, *Chroococcidiopsis* sp., *Lyngbya* sp., *Oscillatoria* sp., *Spirulina* sp., and *Gloeocapsa* sp. (Vincent et al. 2004, Urmeneta et al. 2003). Below, the anoxygenic phototrophs predominate. Among anoxygenic phototrophic anaerobes, some genera of purple sulfur bacteria have been isolated in microbial mats, such as *Chromatium* sp., *Thiocapsa* sp., *Thioflavicoccus* sp., *Thiorhodococcus* sp., *Halorhodospira* sp., *Rhodospirillum*, and *Ectothiorhodospira* sp. (Zaar et al. 2003, Imhoff & Pfenning 2001, Pfenning et al. 1997, Caumette et al. 2004, Hirschler-Rea et al. 2003). Data strongly suggest that the diversity of filamentous green phototrophs (*Chloroflexus* sp., *Oscillochloris* sp.) is abundant in these kind of microbial ecosystems (Klappenbach & Pierson 2004). Furthermore, several groups of microorganisms that do not form stable layers have also been found in microbial mats. These heterotrophic bacteria, consisting of purple non-sulfur bacteria, psychro- or salt-tolerant bacteria, spirochetes, and spirilla, are important for maintenance of the microbial mats, and many genera, such as *Rhodobacter* sp. (Heising et al. 1996), *Rhodoferax* sp. (Jung et al. 2004), *Roseospira* sp. (Guyoneaud et al. 2002), *Roseospirillum* sp. (Glaeser & Overmann 1999), *Marinobacter* sp., *Halomonas* sp., *Roseobacter* sp. (Jonkers & Abed, 2003), *Psychroflexus* sp., *Pseudoalteromonas* sp. (Teske et al. 2000), *Spirochaeta* spp., *Spirosymplokos deltaeiberi* (Margulis et al. 1993), *Titanospirillum velox* (Guerrero et al. 1999), and *Mobilifilum chasei* (Margulis et al. 1990), have been identified in these environments.

Together with purple sulfur bacteria, colorless sulfur bacteria play a role in maintaining the level of sulfide and avoiding its inhibitory action on cyanobacteria. Among the sulfur bacteria, most abundant are the genera *Beggiatoa* (Mills et al. 2004), *Thiomicrospira* (Brinkhoff & Muyzer 1997), *Thiobacillus*, and *Thiovulum* (Thar & Kühl 2002).

Sulfate-reducing bacteria are mainly found at the bottom of the mat where they form a thick black layer. However, an unexpected distribution of this population in the oxic chemocline has been recently observed (Minz et al. 1999). The slightly halophilic sulfate reducers of mats have been allocated to the genera *Desulfovibrio, Desulfobacter, Desulfococcus, Desulfosarcina*, and *Desulfonema*. Likewise, other anaerobic microorganisms have been isolated in microbial mats, such as psychrophilic clostridia and members of the Halanaerobiaceae family (Spring et al. 2003, Ollivier et al. 1994).

The study of microbial mats, including their community composition, metabolic relationships and physiological status, can expand our knowledge of these first microbial ecosystems to have evolved on Earth. Likewise, their ecological success and their broad array of metabolic activities suggest that microbial mat ecosystems will have useful applications in the

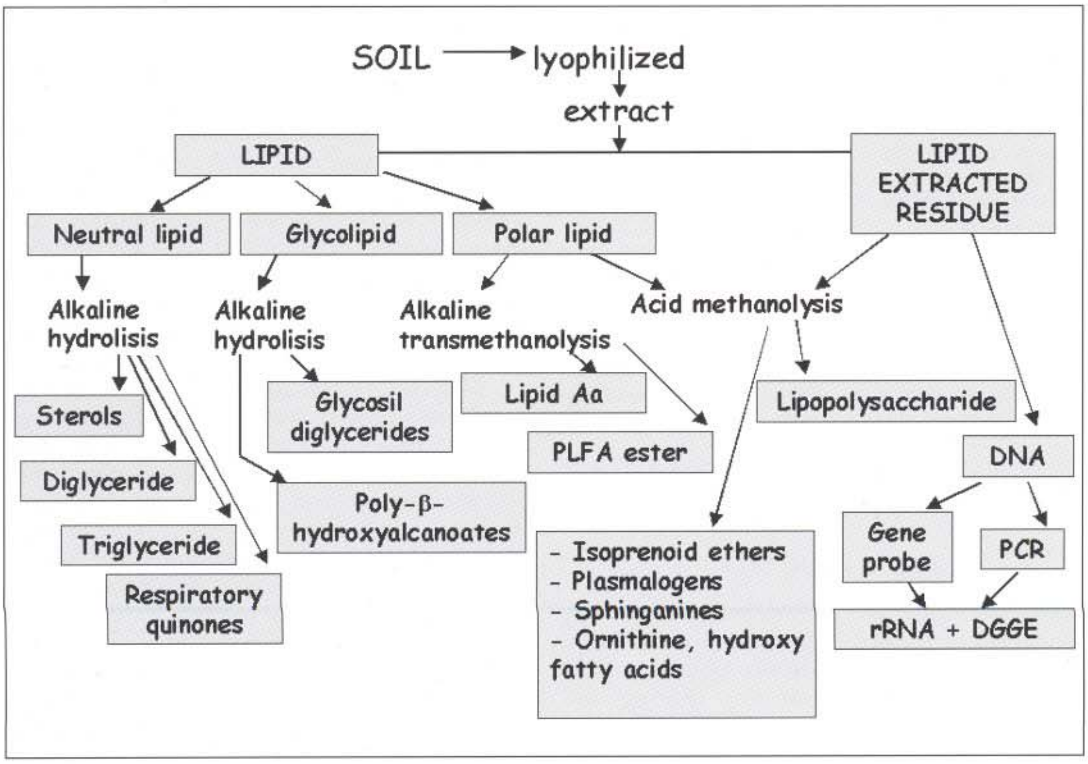


FIG. 1. Signature lipid biomarker/ environmental nucleic-acid probe analysis showing each of the lipid fractions that can be identified and quantified.

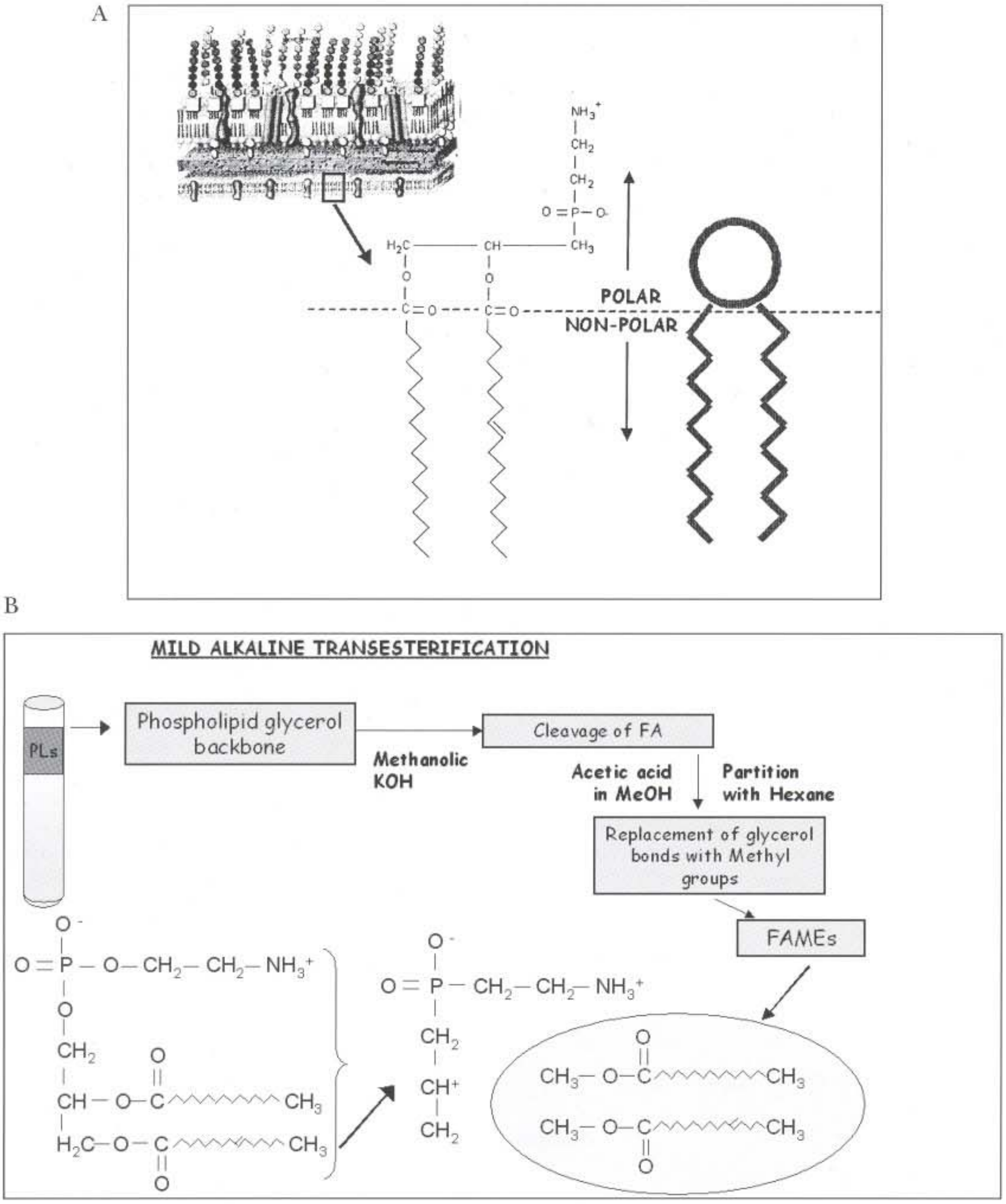


Fig. 2. (A) Lipid bilayer and structure of phospholipids: Phosphate head group, glycerol backbone, and phospholipid fatty acids (PLFA) linked to C_1 and C_2 (modified from Madigan et al., p. 74, Brook Biology of Microorganisms, 9th edition).

(B) Mild alkaline trans-esterification of the polar lipid fraction to obtain fatty acid methyl esters (FAMEs), which can be identified and quantified by gas chromatography (GC).

bioremediation of polluted sites as well as in the biogeneration of useful products (Bender & Phillips 2004). Photosynthetic microbial mats contain ecophysiological strategies to support life under a broad range of environmental conditions (Paerl et al. 2000) and can be used to characterize the requirements for microbial life on Earth and, potentially, on other planets.

Signature Lipid Biomarker Analysis and Molecular Fingerprinting in Microbial Mats

Microbial lipid analysis is a relatively sensitive, quantitative method to detect most of the microorganisms present in a particular environment. The method is based on the liquid extraction and separation of microbial lipids from environmental samples, followed by quantitative analysis using gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Several unique classes of lipids, including sterols, diglycerides (DG), respiratory quinones (RQ), poly-β-hydroxyalkanoates (PHA), phospholipid fatty acids (PLFA), lipo–amino acids, plasmalogens, acyl ethers, sphingolipids and lipopolysaccharide hydroxy fatty acids (LPS–OHFA), can be used as signature lipid biomarkers (SLB) in order to characterize microbial populations (White et al. 1998). Using this methodology, microbial population changes due to physical or chemical environmental perturbations can be followed over time. A scheme proposed for SLB/environmental nucleic-acid probe analysis is diagrammed in Fig. 1.

1. Polar lipid fraction: Phospholipid fatty acid

Phospholipids fatty acids (PLFA) (Fig. 2A, 2B) are essential membrane components of living cells and thus one of the most important classes of SLB. The extraction, identification, and quantification of PLFA can therefore provide valuable information about the microbial communities present in natural ecosystems, such as microbial abundance, community structure, and nutritional status (White & Ringelberg 1997).

Viable Microbial Biomass. Total PLFA is a quantitative measure of the viable or potentially viable biomass. Viable microorganisms have an intact membrane that contains PLFAs, whereas cellular phospholipases hydrolyze and release the phosphate group within minutes to hours following cell death (White et al. 1979). Since the resulting diglyceride contains the same signature fatty acids as the original phospholipid, at least for a short time thereafter, comparison of the ratio of phospholipid fatty acid to diglyceride fatty acid profiles provides a measure of the viable to nonviable microbial abundance (Fig. 3).

The SLB approach was applied for the first time in a study of estuarine microbial mats by Navarrete et al. (2000). Samples from microbial mats in the Ebro Delta (Spain) were taken in spring over a day-night cycle every six hours. The results reflected the daily variations of viable microbial biomass in mat samples. The same approach was later applied in a study of several estuarine microbial mats in order to identify the physicochemical variables relevant for the establishment and maintenance of those microbial ecosystems (Navarrete et al. this issue). Samples were obtained from uncontaminated and contaminated locations during different seasons. The viable biomass distribution along the vertical profile of the mat sam-

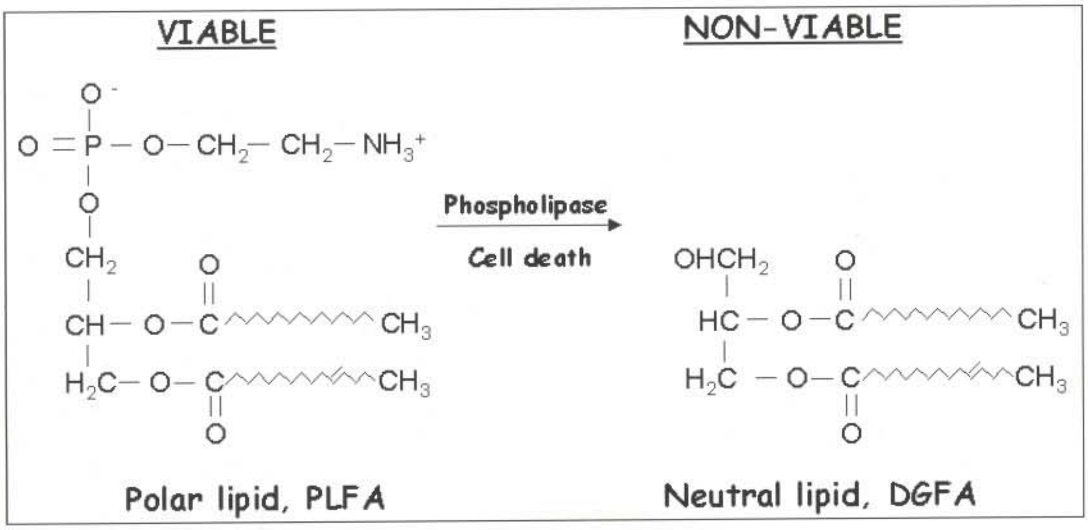


FIG. 3. Conversion of phospholipid fatty acid (PLFA) to diglyceride fatty acid after cell death.

ples was also investigated in that work and showed differences between seasons. Indeed, the effectiveness of the SLB method in analyzing microbial mat layers along the vertical profile has led to recent studies in which estuarine microbial mats were sampled at both different times and different depths (Villanueva et al., 2004).

Physiological status. Insights into the nutritional and physiological status of the microbial community can also be determined through SLB analysis, since PLFA are products of biosynthetic pathways and thus reflect phenotypic responses of microorganisms to environmental conditions.

Many components of the microbial community respond to specific conditions in their microenvironment with shifts in lipid composition. In fact, conversion of the monoenoic PLFA 16:1ω7*c* and 18:1ω7*c* to the cyclopropyl fatty acids *cy*17:0 and *cy*19:0, respectively, increases in gram-negative bacteria as the microorganisms shift from exponential to stationary growth (starvation index *cyclo*/ω7*c*). This ratio varies from organism to organism and environment to environment, but usually falls within the range of 0.05 (exponential phase) to 2.5 or even higher (stationary phase) (Mickell et al. 1987).

In addition, starvation can lead to minicell formation and a relative increase in specific *trans* monoenoic PLFA compared to the *cis* isomers. Increases in the ratios of *trans*/*cis* monoenoic PLFAs in cells are indicative of metabolic stress (Guckert et al. 1986), and *trans*/*cis* ratios higher than 0.1 have been shown to indicate starvation in bacterial isolates (Heipieper et al. 1992). This value is usually 0.05 or less in healthy non-stressed communities (Fig. 4).

With respect to the physiological assessment of mats using SLB, Navarrete et al. (2000) reported a similar tendency in the daily variation of both the starvation index and metabolic stress, and observed that an increase of the latter is coupled with a shift to slow-growth conditions. Likewise, in the study applying SLB to compare changes in several microbial mats during different seasons (Navarrete et al. this issue), a correlation between a higher slow-growth rate and better development of the mat was noted. Finally, data from the study in which estuarine microbial mat were sampled at several different times and depths showed fluctuations in the starvation and metabolic stress

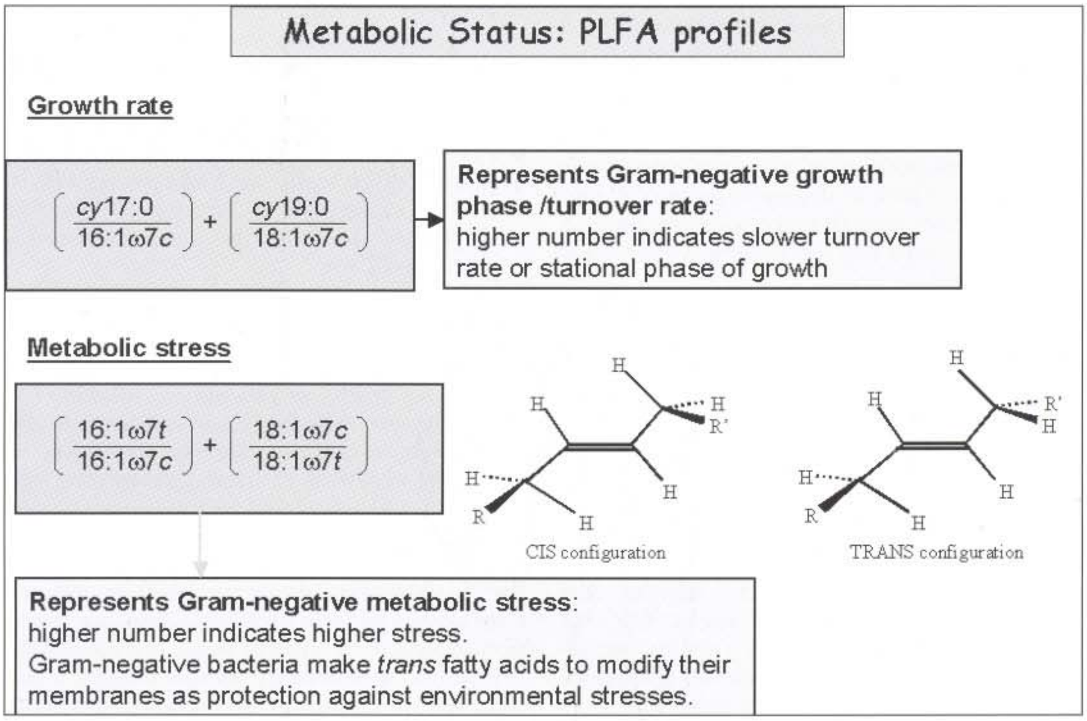


FIG. 4. Phospholipid fatty acids (PLFA) ratios reflect phenotypic responses of microorganisms to environmental conditions: cyclo/ω7*c* and *trans*/*cis* ratio.

indexes during the day and along different depths.

Community composition. Because different groups of microorganisms synthesize a variety of PLFA through various biochemical pathways, PLFA are effective taxonomic markers. Furthermore, the induction of microbial community compositional shifts by alterations in the microenvironment also results in characteristic changes in SLB that are dominant in certain groups of microorganisms. However, despite its versatility, PLFA analysis of the community structure of gram-negative bacteria is limited since they have overlapping PLFA patterns dominated by monoenoic saturated and cyclopropanoic fatty acids (Wilkinson et al. 1988). Thus, while quantitative comparisons of total community PLFA patterns accurately show shifts in community composition, they may not allow the identification of species of microorganisms in an environmental sample or provide a definitive analysis of shifts in specific microbial groups. To overcome this problem, a complementary nucleic-acid-based analysis can be applied (see below).

Data concerning community composition was obtained by Navarrete and coworkers (Navarrete et al. 2000), who monitored specific PLFA in microbial mats samples during a daily cycle (2000). These authors showed a microbial community composed mainly of gram-negative bacteria and relevant variations in the microbial composition of the community between day and night. Moreover, based on the PLFA composition of microbial mats at several locations and at different seasons a coupling effect between the increased presence of particular groups and the sampling season was demonstrated.

A recent study of microbial mats in the Camargue (France) involving several sampling times and different depths combined SLB data with results of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in order to obtain a more complete picture of community composition as well as the distribution of microorganisms over time and along the vertical axis. Analyses of community structure according to both DGGE and PLFA profiles suggested a predominance of certain groups at specific depths that changed between day and night. Indeed, DGGE analysis revealed the relative importance of green non-sulfur bacteria, gram-positive, aerobic heterotrophic bacteria, members of the phylum Bacteroides, and uncultured spirochetes.

2. Glycolipid fraction: Poly-β-hydroxyalkanoates

Some bacteria undergo unbalanced growth and cannot divide when provided with sufficient carbon and terminal electron acceptors but insufficient essential nutrients (e.g. phosphate, nitrate, trace elements). In response, these bacteria form intracellular lipid storage compounds called poly-β-hydroxyalkanoates (PHAs). When the essential component that was lacking becomes available, the bacteria catabolize PHA, subsequently forming PLFA as they grow and divide. Cells that can accumulate large quantities of PHA are viable for longer periods of time than low-PHA-accumulating cells.

The level of PHA in a community can change rapidly due to variations in nutritional status (Elhottová et al. 1997); thus, the ratio of PHA concentration to the total concentration of microbial biomass is an important marker of the growth and nutritional status of microbial communities (Tunlid & White 1992). PHA/PLFA ratios can range from 0 (dividing cells) to over 40 (carbon storage). Ratios higher than 0.2 usually indicate the beginnings of unbalanced growth in at least part of the microbial community (White et al. 1995).

Results from the study of a circadian cycle in Ebro Delta microbial mats (Navarrete et al. 2000) supported the view of a correlation between slower growth and a maximum in the glycolipids/PLFA ratio. They also reinforced the hypothesis that an excess of carbon assimilates, produced by photosynthetic processes, accumulates in cells as biopolymers, since under the conditions of "unbalanced growth" observed in the mats the resident bacteria accumulated PHA.

3. Neutral lipid fraction: Isoprenoid quinones

Isoprenoid quinones act as electron carriers in respiratory chains and in photosynthetic electron-transport systems. Early studies on the occurrence of quinones showed that inherent structural variations of these lipid-soluble substances can be correlated with taxonomic criteria (Hiraishi 1999). Accordingly, a biomarker approach, quinone profiling, was developed for the determination of microbial community structures. Quinone profiling allows the detection of structural types of respiratory and photosynthetic quinones in microbial cells. It has been useful not only in microbial chemotaxonomy (Collins & Jones 1981) but also in estimating community structures (Hiraishi et al. 1998) and microbial redox states (Hedrick & White 1986).

Hedrick and White (1986) first demonstrated the value of quinone analysis in ecological studies in which menaquinone/ubiquinone ratios were used to evaluate the redox state of microbial communities. Almost all aerobic gram-negative bacteria examined thus far have ubiquinones (UQs), whereas in anaerobic gram-negative bacteria that have quinones menaquinones (MKs) predominate, and some facultative gram-negative bacteria have DMKs (desmethylmenaquinones) as well as UQs and/or MKs (Collins & Jones 1981). Thus, changes in quinones reflect changes in the availability of oxygen in the environment.

4. Combined nucleic acid and SLB analysis

It has recently been shown that solvent extraction in SLB analysis liberates cellular nucleic acids that can be used for gene amplification. The DNA recovered from the lipid extraction is of high quality and suitable for enzymatic amplification (Macnaughton & Stefen 2001). As a result, new techniques based on combining lipid analysis and PCR of rDNA, with subsequent separation of the amplicons by DGGE, can be applied in order to obtain a complete picture of the activities, dynamics and diversity of a microbial community (Stefen et al. 1999, Villanueva et al., 2004). Since SLB analysis involves detection by mass spectrometry, rates of incorporation of non-radioactive ^{13}C and ^{15}N mass-labeled precursors into signature biomarkers can be used to gain further insight into specific metabolic activities (Fang et al. 2004). Moreover, the application of other techniques, e.g. Real-time PCR, analysis of the expression of certain genes, and microarrays, would provide an even better understanding of complex ecosystems such as those of microbial mats.

5. Conclusions

Measurement of SLB is one of the most useful culture-independent techniques to study microbial communities. It offers a quantitative approach to assessing the effects of environmental disturbances and internal ecophysiological dynamics in microbial mats. Since the method is based on the response of microniche environments, it could also be useful in predicting long-term responses or potential responses in bioremediation processes.

Although chemical biomarker and molecular methods are innovative approaches with respect to their applications in microbial ecology and environmental microbiology, they still have limitations, especially regarding taxonomic characterization. To compensate for these limitations, a polyphasic approach is required. The combined use of molecular biology techniques and SLB analysis in the study of natural microbial communities, e.g. microbial mats, provides more accurate data and increases our knowledge about the population dynamics and community structure of these ecosystems.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mercè Piqueras and Wendy Ran for proofreading the manuscript and for useful suggestions. We are grateful to the Center for Biomarker Analysis (Knoxville, TN, USA) staff for advice and technical assistance. This research was supported by Spanish MCyT (Ministry of Science and Technology) grant BOS2002-02944 and EU grant EVK3-CT-1999-00010 (project Matbiopol), both to RG, and by grant DE-FC02-96ER62278, from the Office of Biological and Environmental Research (OBER) of the Office of Science (SC), U.S. Department of Energy (DOE), Natural and Accelerated Bioremediation Research (NABIR) Program (Assessment Element). Laura Villanueva is recipient of a scholarship from the Spanish MECD (Ministry of Education, Culture and Sport) (AP2001-0953).

REFERENCES

Bender J & Phillips P (2004) Microbial mats for multiple applications in aquaculture and bioremediation.– *Bioresource Technology* **94**: 229-238

Brinkhoff T & Muyzer G (1997) Increased species diversity and extended habitat range of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* spp.– *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3789-3796

Caumette P, Guyoneaud R, Imhoff JF, Suling J & Gorlenko V (2004) *Thiocapsa marina* sp. nov., a novel, okenone-containing, purple sulfur bacterium isolated from brackish coastal and marine environments.– *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 1031-1036

Collins MD & Jones D (1981) Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications.– *Microbiology Reviews* **45**: 316-354

Des Marais DJ (1990) Microbial mats and the early evolution of life.– *Trends in Ecology and Evolution* **5**: 140-144

Elhottová D, Tríska J, Santrucková H, Kveton J, Santrucek J & Simková M (1997) Rhizosphere microflora of winter wheat plants cultivated under elevated CO_2.– *Plant Soil* **197**: 251-259

Fang J, Lovanh N & Alvarez PJ (2004) The use of isotopic and lipid analysis techniques linking toluene degradation to specific microorganisms: applications and limitations.– *Water Research* **38**: 2529-2536

Findlay RH & White DC (1983) Polymeric beta-hydroxyalkanoates from environmental samples and *Bacillus megaterium*.– *Applied and Environmental Microbiology* **45**: 71-78

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

Guckert JB, Hood MA & White DC (1986) Phospholipid, ester-linked fatty acids profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: increases in the *trans/cis* ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids.– *Applied and Environmental Microbiology* **52**: 794-801

Guerrero R, Hasselton A, Solé M, Wier A & Margulis L (1999) *Titanospirillum velox*: A huge, speedy, sulphur-storing spirillum from Ebro delta microbial mats.– *Proceedings of the Natural Academy of Science USA* **96**: 11584-11588

Guyoneaud R, Moune S, Eatock C, Bothorel V, Hirschler-Rea A, Willison J, Duran R, Liesack W, Herbert R, Matheron R & Caumette P (2002) Characterization of three spiral-shaped purple nonsulfur bacteria isolated from coastal lagoon sediments, saline sulfur springs, and microbial mats: emended description of the genus *Roseospira* and description of *Roseospira marina* sp. nov., *Roseospira navarrensis* sp. nov., and *Roseospira thiosulfatophila* sp. nov.– *Archives of Microbiology* **178**: 315-324

Hedrick DB & White DC (1986) Microbial respiratory quinones in the environment. I. A sensitive liquid chromatographic method.– *Journal of Microbiology Methods* **5**: 243-254

Heipieper HJ, Diefenbach R & Kewoloh H (1992) Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity.– *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 1847-1852

Heising S, Dilling W, Schnell S & Schink B (1996) Complete assimilation of cysteine by a newly isolated nonsulfur purple bacterium resembling *Rhodovulum sulfidophilum* (*Rhodobacter sulfidophilus*).– *Archives of Microbiology* **165**: 397-401

Hiraishi A, Ueda Y & Ishihara J (1998) Quinone profiling of bacterial communities in natural and synthetic sewage activated sludge for enhanced phosphate removal.– *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 992-998

Hirschler-Rea A, Matheron R, Riffaud C, Moune S, Eatock C, Herbert RA, Willison JC & Caumette P (2003) Isolation and characterization of spirilloid purple phototrophic bacteria forming red layers in microbial mats of Mediterranean salterns: description of *Halorhodospira neutriphila* sp. nov. and emendation of the genus *Halorhodospira*.– *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 153-163

Imhoff JF & Pfennig N (2001) *Thioflavicoccus mobilis* gen. nov., sp. nov., a novel purple sulfur bacterium with bacteriochlorophyll b.– *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 105-110

Jonkers HM & Abed RMM (2003) Identification of aerobic heterotrophic bacteria from the photic zone of a hypersaline microbial mat.– *Aquatic Microbial Ecology* **30**: 127-133

Jung DO, Achenbach LA, Karr EA, Takaichi S & Madigan MT (2004) A gas vesiculate planktonic strain of the purple non-sulfur bacterium *Rhodoferax antarcticus* isolated from Lake Fryxell, Dry Valleys, Antarctica.– *Archives of Microbiology* **182**: 236-243

Klappenbach JA & Pierson BK (2004) Phylogenetic and physiological characterization of a filamentous anoxygenic photoautotrophic bacterium ' Candidatus *Chlorothrix halophila*' gen. nov., sp. nov., recovered from hypersaline microbial mats.– *Archives of Microbiology* **181**: 17-25

Macnaughton SJ & Stephen JR (2001) A combined phospholipid and 16S rDNA PCR-DGGE analysis to study bioremediative microbial communities *in situ*. In: "Environmental Molecular Microbiology: Protocols and applications" (Rochelle PA Ed. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK).

Margulis L, Hinkle G, Stolz J, Craft F, Esteve I & Guerrero R (1990) *Mobilifilum chasei*: morphology and ecology of a spirochete from an intertidal stratified microbial mat community.– *Archives of Microbiology* **153**: 422-427

Margulis L, Ashen JB, Solé M & Guerrero R (1993) Composite, large spirochetes from microbial mats: Spirochete structure review. – *Proceedings of the Natural Academy of Science USA* **90**: 6966-6970

Mickell AT, Phelps TJ & White DC (1987) Phospholipids to monitor microbial ecology in anaerobic digesters. In: "Methane for Biomass, a system approach" (Smith WH & Frank JR Eds.) pp 413-144.

Mills HJ, Martinez RJ, Story S & Sobecky PA (2004) Identification of members of the metabolically active microbial populations associated with *Beggiatoa* species mat communities from Gulf of Mexico cold-seep sediments. – *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 5447-5458

Minz D, Flax JL, Green SJ, Muyzer G, Cohen Y, Wagner M, Rittmann BE & Stahl DA (1999) Diversity of sulfate-reducing bacteria in oxic and anoxic regions of a microbial mat characterized by comparative analysis of dissimilatory sulfite reductase genes.–*Applied and Environmental Microbiology* **65**: 4666-4671

Navarrete A, Peacock A, Macnaughton SJ, Urmeneta J, Mas-Castellà J, White DC & Guerrero R (2000) Physiological status and community composition of microbial mats of the Ebro delta, Spain, by signature lipid biomarkers.– *Microbial Ecology* **39**: 92-99

Navarrete A, Urmeneta J, Cantu JM, Vegas E, White DC & Guerrero R (2004) Analysis of Signature Lipid Biomarkers of Microbial Mats of the Ebro Delta (Spain), Camargue and Etang de Berre (France): an Assessment of Biomass and Activity.– *Ophelia* **58**: 175-188

Ollivier B, Caumette P, Garcia JL & Mah RA (1994) Anaerobic bacteria from hypersaline environments.– *Microbiology Reviews* **58**: 27-38

Paerl HW, Pinckney JL & Steppe TF (2000) Cyanobacterial–bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments.– *Environmental Microbiology* **2**: 11-26

Pfennig N, Lunsdorf H, Suling J & Imhoff JF (1997) *Rhodospira trueperi* gen. nov., spec. nov., a new phototrophic Proteobacterium of the alpha group.– *Archives of Microbiology* **168**: 39-45

Spring S, Merkhoffer B, Weiss N, Kroppenstedt RM, Hippe H & Stackebrandt E (2003) Characterization of novel psychrophilic clostridia from an Antarctic microbial mat: description of *Clostridium frigoris* sp. nov., *Clostridium lacusfryxellense* sp. nov., *Clostridium bowmanii* sp. nov. and *Clostridium psychrophilum* sp. nov. and reclassification of *Clostridium laramiense* as *Clostridium estertheticum* subsp. laramiense subsp. nov.– *Inter-*

national Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **53**: 1019-1029

Stephen JR, Chang YJ, Gan TD, Peacock A, Pfiffner SM, Barcelona MJ, White DC & Macnaughton SJ (1999) Microbial characterization of a JP-4 fuel –contaminated site using a combined lipid biomarker/polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)-based approach.– *Environmental Microbiology* **1**: 231-241

Stolz JF (1990) Distribution of phototrophic microbes in the flat laminated microbial mat at Laguna Figueroa, Baja California, Mexico.– *Biosystems* **23**: 345-357

Teske A, Brinkhoff T, Muyzer G, Moser DP, Rethmeier J & Jannasch HW (2000) Diversity of thiosulfate-oxidizing bacteria from marine sediments and hydrothermal vents.– *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 3125-3133

Thar R & Kuhl M (2002) Conspicuous veils formed by vibrioid bacteria on sulfidic marine sediment.– *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 6310-6320

Tunlid A & White DC (1992) Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status and metabolic activity of the microbial community in soil. In: "Soil biochemistry, vol. 7. Marcel Dekker, New York" (Bollag JM & Stotzky G Eds.) pp 229-262

Urmeneta J, Navarrete A, Huete J & Guerrero R (2003) Isolation and characterization of cyanobacteria from microbial mats of the Ebro delta, Spain.– *Current Microbiology* **46**: 199-204

Van Gemerden H (1993) Microbial mats: a joint venture.– *Marine Geology* **113**: 3-25

Villanueva L, Navarrete A, Urmeneta J, White DC & Guerrero R (2004) Combined Phospholipid Biomarkers and 16S rRNA gene denaturating gel electrophoresis. Analysis of Bacterial Diversity and Physiological Status in an Intertidal Microbial Mat.– *Applied and Environmental Microbiology* **70**: X-X (in press)

Vincent WF, Mueller DR & Bonilla S (2004) Ecosystems on ice: the microbial ecology of Markham Ice Shelf in the high Arctic.– *Cryobiology* **48**: 103-112

White DC, Bobbie RJ, Heron JS, King JD & Morrison SJ (1979) Biochemical measurements of microbial mass and activity from environmental samples. In: "Native aquatic bacteria: Enumeration, Activity and Ecology, ASTM STP 695. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA." (Costerton JW & Colwell RR Eds.) pp 69-81.

White DC, Pinkart HC & Ringelberg DG (1995) Biomass measurements: biochemical approaches. In: "Manual of Environmental Microbiology, 1st ed, American Society for Microbiology Press. Washington, D.C." (Hurst CH, Kudsen G, McInerney M, Stetzenbach LD & Walter M Eds.) pp 91-101.

White DC & Ringelberg DB (1997) Utility of the signature lipid biomarker analysis in determining *in situ* microbial biomass, community structure and nutritional/physiological status of deep subsurface microbiota. In: "The Microbiology of the Terrestrial Subsurface. CRC Press, Boca Raton, FL." (Amy PS and Haldeman DL Eds.) pp 117-134.

White DC, Flemming CA, Leung KT & Macnaughton SJ (1998) In situ microbial ecology for quantitative appraisal, monitoring, and risk assessment of pollution remediation in soils, the subsurface, the rhizosphere and in biofilms.– *Journal of Microbiological Methods* **32**: 93-105

Wilkinson SG (1988) Gram-negative bacteria. In: "Microbial Lipids, vol. 1. Academic Press, London, U.K" (Ratledge C & Wilkinson SG Eds.) pp 299-488

Zaar A, Fuchs G, Golecki JR & Overmann J (2003) A new purple sulfur bacterium isolated from a littoral microbial mat, *Thiorhodococcus drewsii* sp. nov.– *Archives of Microbiology* **179**: 174-183

ANÁLISIS COMBINADO DE BIOMARCADORES LIPÍDICOS SEÑAL Y 16S rDNA-DGGE PARA EL ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD Y EL ESTADO FISIOLÓGICO DE TAPETES MICROBIANOS

Laura Villanueva, Antoni Navarrete, Jordi Urmeneta y Ricard Guerrero
Departament de Microbiologia. Universitat de Barcelona.

INTRODUCCIÓN

Los tapetes microbianos son comunidades procarióticas compuestas de poblaciones microbianas que forman capas horizontales de crecimiento activo.

Se han realizado estudios sobre tapetes microbianos de diferentes localizaciones pero aun se desconocen aspectos de su biodiversidad y dinámica fisiológica. Por otra parte, estudios preliminares han destacado el papel significativo que pueden tomar en el bioremedio de zonas costeras contaminadas por hidrocarburos (Al-Hasan et al., 1998).

La extracción, identificación y cuantificación de los ácidos grasos de los fosfolípidos (PLFA) puede proporcionar información sobre la biomasa microbiana viable (ya que todas las células contienen fosfolípidos que se degradan tras la muerte celular), el estado fisiológico (cambios en la composición lipídica debidos a variación del microambiente, p.ej. un aumento en la concentración de ác. grasos ciclopropanóicos es indicativo de una tasa de recambio inferior o crecimiento no balanceado en bacterias Gram negativas, y un aumento de ác. grasos *trans* respecto a sus homologos *cis* es indicativo de un estrés tóxico) (Heipieper et al., 1992), y de la comunidad microbiana presente en ecosistemas naturales (Navarrete et al., 2000).

A pesar de la importancia del análisis lipídico, son necesarios métodos basados en ácidos nucleicos para realizar un estudio taxonómico más exacto. La combinación del análisis lipídico con una amplificación por PCR del 16S rDNA seguida de un análisis DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) (Muyzer et al., 1993), permite enumerar, establecer el estado fisiológico e identificar los componentes microbianos mayoritarios de la comunidad de estudio.

El objetivo de este estudio era incrementar el conocimiento del estado fisiológico y caracterizar la comunidad microbiana de los tapetes microbianos de la Camarga (delta del Rhône, Francia) mediante la combinación de ambos análisis, y establecer variaciones diarias en este ecosistema.

MATERIAL y MÉTODOS

Se recogieron muestras de la parte superior del tapete microbiano en dos momentos del día (8:00 am y 3:00 pm GMT, Abril 2002) y posteriormente se cortaron mediante criomicrotomía en capas de 500 μm de espesor. Se llevó a cabo la extracción de lípidos totales de las muestras (White et al., 1979) y se conservó la fase acuosa resultante de la extracción para efectuar análisis moleculares posteriores. Los lípidos totales se fraccionaron mediante cromatografía en columna y se obtuvieron los lípidos polares, con contenido en fosfolípidos, existentes en el extracto total. Los lípidos polares se transesterificaron, mediante una metanolisis alcalina, a ácidos grasos metil esters (FAME) que se identificaron y cuantificaron por cromatografía de gases/ espectrometría de masas (GC/MS). El análisis de PCR-DGGE se realizó con el DNA contenido en la fase acuosa (**Fig. 1**). Las bandas mayoritarias obtenidas se secuenciaron y se observó un posicionamiento específico de ciertas bandas en los puntos horarios del estudio así como una migración vertical. El patrón de bandas se analizó digitalmente y se cuantificó la importancia relativa de cada banda a fin de realizar análisis estadísticos basados en los datos del índice de diversidad de Shannon-Weaver (Shannon et al., 1963).

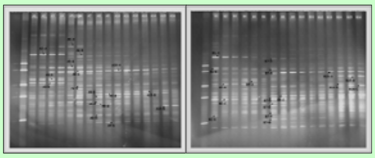


Fig. 1. Geles DGGE de las muestras recogidas a las 8:00 am (muestras *A*) y a las 3:00 pm (muestras *B*), nombradas del 1 al 16 en función del aumento de profundidad (500 μm de espesor cada una, a excepción de las muestras 16 de 1,25 mm). Profundidad total: 8.75 mm

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Biomasa microbiana viable en términos de PLFA totales

El máximo de biomasa viable en términos de PLFA totales a las 8:00 am (**Fig. 2**) (rango del perfil de 1·10□ a 7·10^5 pmols PLFA/ g peso seco), se observó en la superficie del tapete, mientras que a las 3:00 pm, el máximo se encontró en capas subyacentes (rango del perfil de 2·10^3 a □·10^5 pmols PLFA/ g peso seco). Se detectaron ciertas diferencias según la profundidad y en ambas horas de muestreo, especialmente a las 3:00 pm ya que el máximo de células viables estaba concentrado en la zona de 2 a □ mm en comparación con el resto de muestras.

Los tapetes microbianos de la Camarga, en este caso, muestran un mínimo de biomasa viable en el fondo del tapete sobretodo en las muestras recogidas a las 3:00 pm.

A las 8:00 am, el máximo de biomasa viable estaría formado por cianobacterias que se dispondrían en la superficie del tapete para evitar la exposición tóxica al sulfhídrico (producido por bacterias sulfato-reductoras y acumulado en el tapete durante la noche) y por bacterias rojas del azufre que usarían la luz a primeras horas del día para realizar la fotosíntesis. El máximo de biomasa viable observada a las 3:00 pm en capas subyacentes puede ser debido a lisis celular en la superficie por la elevada irradiancia solar o por migraciones verticales.

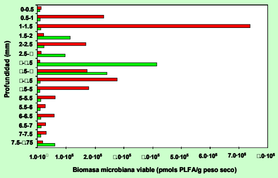


Fig. 2. Biomasa microbiana viable cuantificada como PLFAs totales. 🟥 Muestras *A*, 8:00 am; 🟩 Muestras *B*, 3:00 pm.

Estado fisiológico de los tapetes microbianos

El análisis de los PLFA indicativos del estado fisiológico estableció un máximo de crecimiento no balanceado (**Fig. □**) (relación de PLFA *cyclo*/ω7*c* alta) en las capas más profundas sobretodo a las 8:00 am, donde el crecimiento no balanceado aumentó con la profundidad y los valores más altos se localizaron entre □-6 mm y en las muestras más profundas (máximo 2,5). Por otra parte, a las 3:00 pm los perfiles verticales mostraron un aumento del crecimiento no balanceado en la superficie y en las capas medias (1,5 mm y 5,5 mm) con un valor máximo *cyclo*/ω7*c* de 3,5. El máximo crecimiento no balanceado localizado en las capas profundas, puede ser debido a la actividad de bacterias sulfato-reductoras, especialmente a las 8:00 am, ya que durante la noche las condiciones anóxicas potencian el desarrollo de esta población (que consume materia orgánica y produce sulfhídrico). Probablemente la razón del crecimiento no balanceado de los sulfato-reductores, sea la limitación de carbono orgánico (relación C/N baja) agotado durante la noche. En cambio, el aumento de crecimiento no balanceado a las 3:00 pm puede ser explicado por procesos fotosintéticos y de fijación de carbono llevados a cabo por cianobacterias y bacterias rojas del azufre, ya que aumentaría la presencia de compuestos orgánicos pero una limitación de nitrógeno (relación C/N alta).

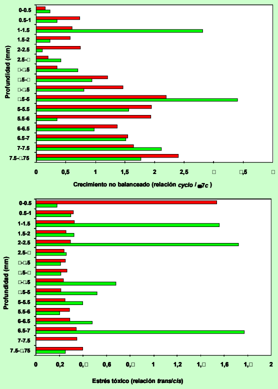


Fig. □ y □. Estado metabólico expresado como la relación de ácidos grasos ciclopropanóicos/monoenóicos y ácidos grasos *trans*/*cis*. 🟥 Muestras *A*, 8:00 am; 🟩 Muestras *B*, 3:00 pm.

El nivel más elevado de estrés metabólico (**Fig. □**) se observó en la superficie del tapete a las 8:00 am (relación de PLFA *trans*/*cis* aprox. 1,5) mientras que a las 3:00 pm el nivel máximo se localizó en las capas medias con dos valores destacables en las profundidades 1-1,5 mm y 2-2,5 mm, y en las zonas más profundas del tapete (6-7,5 mm). En este caso, una explicación plausible para el alto nivel de estrés tóxico en la superficie a las 8:00 am, podría ser la exposición al sulfhídrico (acumulado durante la noche por la actividad de sulfato-reductores) al cual se encontrarían sometidas las cianobacterias.

PCR 16S rDNA y análisis DGGE

Los resultados obtenidos tras la secuenciación y clonaje de las bandas seleccionadas se resumen en la **Tabla 1 y 2**. Las diferencias entre los geles *A* y *B* muestran la heterogeneidad de las poblaciones microbianas y migraciones verticales, acopladas con los gradientes fisicoquímicos desarrollados en los tapetes durante un ciclo día-noche. Se puede destacar la importancia relativa de las siguientes especies en el mantenimiento de las relaciones tróficas aunque son necesarios estudios de aislamiento y caracterización fisiológica.

Tablas 1 y 2. Porcentaje de similitud, homólogos más cercanos y afiliaciones filogenéticas del DNA recuperado de las bandas recortadas en el gel *A* y *B* (8:00 am y 3:00 pm).

Banda		Homólogo	Posición relativa	
Nombre	**% Similitud**	**Organismo**	**Nº Acceso**	**8:00 am GMT**
$A2_A$	100	*Psychroflexus* sp. LA1	AF513434	0- 2.5 mm
$A3_D$	95	Clon no cultivado, Spirochaetaceae	AF507855	0- 3 mm
	87	*Sphingobacterium*-like sp.	X89912	
$A3_E$	98	Alteromonadaceae LA50	AF513454	0- 2.5 mm
$A5_A$	97	*Halanaerobium* sp. KT-2/3-3	AJ309519	1.5- 3 mm
$A5_B$	98	*Halanaerobium* sp. KT-2/3-3	AJ309519	1- 4 mm
$A6_B$	92	Clon no cultivado *BT60DS4BH4*	AF365771	2- 5 mm
$A6_D$	100	*Halanaerobium saccharolyticum*	X89070	1.5- 7 mm
$A8_E$	95	Clon no cultivado, bacteria verde no del azufre	AJ441228	2- 5.5 mm
$A8_F$	89	*Bdellovibrio* sp. JS7	AF084862	1- 5.5 mm
$A8_G$	95	Clon no cultivado, bacteria verde no del azufre	AJ441227	3.5- 5.5 mm
$A8_H$	97	Clon no cultivado, eubacteria marina	AF159651	2- 5.5 mm
	94	Clon no cultivado, Chloroflexi	AF513960	
$A9_B$	93	Bacteria de suelo anóxico (grupo CFB)	AJ229237	2- 8.75 mm
$A9_D$	93	Bacteria from anoxic bulk soil	AJ229236	0- 6.5 mm
$A10_A$	100	*Halanaerobium saccharolyticum*	X89070	1- 8.75 mm
$A13_B$	97	Clon no cultivado, *Rhodobacter*	AF513933	3.5- 8.75 mm
$A15_B$	92	*Clostridium hastiforme*	X80841	6- 8.75 mm

Banda		Homólogo	Posición relativa	
Nombre	**% Similitud**	**Organismo**	**Nº Acceso**	**3:00 pm GMT**
$B1_A$	99	*Psychroflexus* sp. LA1	AF513434	0- 2.5 mm
$B1_B$	93	Clon bacteriano no cultivado, KD1-108	AY218549	0- 2 mm
$B1_D$	96	Clon no cultivado, Flavobacteriaceae	AF513959	0- 1.5 mm
$B2_B$	97	Alteromonadaceae LA50	AF513454	0- 2.5 mm
$B2_C$	98	Cianobacteria (*Microcoleus* sp.)	AF210048	0- 8.75 mm
$B5_A$	87	*Flavobacterium* sp. V4.ME.09	AJ244696	0.5- 4 mm
$B7_A$	93	Sphingobacteriaceae cepa EP211	AF493691	2- 8.75 mm
$B7_B$	98	Clon no cultivado, clase Bacteroidetes	AF507867	1- 8.75 mm
$B7_E$	91	Clon no identificado de bacteria verde no del azufre	AF027032	0- 6.5 mm
$B7_F$	93	Bacteria from anoxic bulk soil	AJ229236	1.5- 6 mm
$B7_G$	98	Clon bacteriano no identificado	Z88582	3.5- 6 mm
$B8_C$	94	Clon no cultivado delta proteobact. (*Desulfovibrio*)	AY083013	0- 8.75 mm
$B13_A$	100	*Halanaerobium saccharolyticum*	X89070	3.5- 8.75 mm
$B14_B$	95	Clon no cultivado, gamma proteobacterium	AF452606	6- 8.75 mm
$B15_B$	95	Clon no cultivado de bacteria verde no del azufre	AJ441227	6.5- 8.75 mm
$B16_C$	93	Bacteria de suelo anóxico (grupo CFB)	AJ229237	6.5- 8.75 mm

Análisis de diversidad- geles DGGE

A las 8:00 am (rango entre 0,55 y 0,75), el índice de diversidad de *Shannon* (Fig. 5) permanence estable a excepción de la muestra entre 3 –3,5 mm. El parámetro *H´* a las 3:00 pm, oscila de 0,□5 a 0,65 y muestra fluctuaciones verticales. Es posible que las condiciones anaeróbicas en el tapete a primera hora de la mañana induzcan el posicionamiento de las poblaciones microbianas. Esto puede explicar la uniformidad del índice de *Shannon* a las 8:00 am. En cambio, a las 3:00 pm las oscilaciones pueden deberse a a estratificación y los gradientes fisicoquímicos. El aumento de *H´* en las capas medias del tapete (entre 2,5 – □ mm) puede coincidir con la zona de interfase (quimioclina).

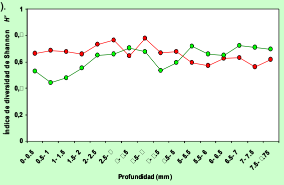


Fig. 5. Índice de diversidad

● Muestras *A*, 8:00 am; ● Muestras *B*, 3:00 pm.

El principal objetivo de este estudio era conocer mejor la dinámica de los tapetes microbianos combinando diferentes métodos, y de esta manera determinar el estado fisiológico, la biomasa microbiana viable y la estructura de la comunidad microbiana de este ecosistema natural. Observando los resultados de los análisis conjuntos de PLFA y de PCR-DGGE, es evidente que mientras que cada uno de los métodos proporciona información única sobre comunidades microbianas, son métodos complementarios. Los datos obtenidos sugieren que la biodiversidad microbiana en los tapetes microbianos es mayor de lo que previamente se había observado basándose en técnicas microscópicas. Además, cabe destacar que las condiciones ambientales no actúan al azar y modelan, a su vez, la estructura de las mencionadas comunidades microbianas.

REFERENCIAS

- Al-Hasan, R. H., D. A. Al-Bader, and N. A. Sorkhoh. 1998. Evidence for n-alkane consumption and oxidation by filamentous cyanobacteria from oil-contaminated coasts of the Arabian Gulf. Marine Biol. 130:521–527
- Heipieper, H-J., R. Diefenbach, and H. Kewoloh. 1992. Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. Appl. Environ. Microbiol. 58:18□7–1852
- Muyzer, G., E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59:695–700
- Navarrete, A. Peacock, A., Macnaughton, S. J., Urmeneta, J., Mas-Castellà, White, D. C. and Guerrero, R. 2000. Physiological status and community composition of microbial mats of the Ebro Delta, Spain, by signature lipid biomarkers. Microb. Ecol. 39:92–99
- Shannon, C. E., and W. Weaver. 1963. The mathematical theory of communications. University of Illinois Press, Urbana.
- White, D. C., R. J. Bobbie, J. S. Heron, J. D. King, and S. J. Morrison. 1979. Biochemical measurements of microbial mass and activity from environmental samples, p. 69–81. *In* J. W. Costerton and R. R. Colwell (ed.), Native aquatic bacteria: Enumeration, Activity and Ecology, ASTM STP 695. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, P.A.

Daily Variations of Bacterial Diversity and Physiological Status in an Estuarine Microbial Mat

*Contact information: Department of Microbiology,
University of Barcelona.
Av. Diagonal 6□5, E-08028 Barcelona, Spain.
Phone: 3□-93□03□628. Fax: 3□-93□03□629.
E-mail address: villanueva@ub.edu

Laura Villanueva[1*], Antoni Navarrete[1], Jordi Urmeneta[1], Ricardo Guerrero[1], and David C. White[2]

[1]University of Barcelona, Barcelona, SPAIN and [2]University of Tennessee. Center for Biomarker Analysis, Knoxville TN

ABSTRACT

Microbial mats are prokaryotic communities used as model systems to study microbial metabolism and ecophysiological strategies for survival under certain environmental conditions. Here, we report a combined lipid biomarker and 16S rDNA PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to determine the response of microorganisms to physicochemical variables that are influenced by time and vertical zonation. Data concerning total phospholipid fatty acid (PLFA) have reported an increase of viable biomass in layers of high density of phototrophs in the morning. This observation, as well as the contribution of aerobic heterotrophic bacteria assessed by DGGE profiles, suggested a close coupling of the activity of phototrophs and heterotrophs. Growth rates decreased in the deep layers in the early morning and at the uppermost layers after midday, which correspond to active physiological processes inhibition if essential nutrients are not available. In addition, a higher degree of metabolic stress was detected in the photic zone, which can be due to a toxic effect of sulfide on photosynthetic microorganisms. DGGE analysis revealed the importance of members of green non-sulfur bacteria, gram-positive and aerobic heterotrophic bacteria groups that are novel findings in estuarine microbial mats. Analyses of the community structure suggested an increase of anaerobic microorganisms at deep layers in the afternoon, however a homogeneous distribution was reported in the morning. The daily ecological succession in the microbial mats studied showed a correlation with variables such as time and depth, and shifted in response to photobiological adaptations and metabolic status of the microbial community.

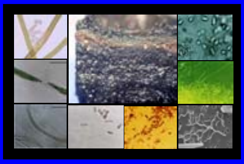


Figure 1. Ebro Delta estuarine microbial mat: The upper layer of the photosynthetic microbial mat is formed mainly by unicellular and filamentous cyanobacteria. Below, there are different populations of anaerobic phototrophic bacteria (purple and green sulfur bacteria, Chromatiaceae and Chlorobiaceae, and green non-sulfur bacteria, *Chloroflexus*). In the bottom layer, sulfate-reducing bacteria (SRB) are abundant. Heterotrophic, sulfur-oxidizing, spirochetes and methanogenic bacteria, but in not-defined layers, have also been detected in many microbial mats.

INTRODUCTION

Photosynthetic microbial mats are sedimentary structures composed primarily of different populations of bacteria in multilayered communities (**Fig. 1**). The determination of total PLFA provides a quantitative measure of the viable or potentially viable biomass, because the viable microbes have an intact membrane with PLFA that turn over rapidly after cell death. The presence of certain groups of microorganims can be inferred by the detection of unique lipids. For example, specific PLFA are prominent in microbial groups (e.g. monoenoic PLFA typical of gram-negative bacteria). Despite its versatility, PLFA analysis has limitations for the analysis of gram-negative bacteria community because their PLFA profiles are dominated by monoenoic saturated and cyclopropanoic fatty acids, and it is difficult to detect species of microorganisms since many have overlapping PLFA patterns. To overcome this, a complementary nucleic acid-based analysis has been applied. Indeed, the solvent extraction in Signature Lipid Biomarker (SLB) analysis has been shown to liberate cellular nucleic acids, which can be used for gene amplification.

Moreover, insights into the nutritional status of the microbial mat community can be determined (Navarrete *et al*., 2000), since PLFA are products of biosynthetic pathways and reflect the phenotypic response of microorganisms to environmental conditions.

This study was undertaken to gain insight on the dynamics and biodiversity of an estuarine microbial mat in order to evaluate the responses of metabolic processes at the community level. The combined lipid biomarker and 16S rDNA/denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis can provide an integrating determination of ecological succession and physiological adaptation in microbial mats.

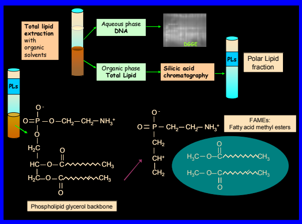


Figure 2. The signature lipid biomarker approach: Total lipid extraction by the modified Bligh & Dyer method and silicic acid chromatography. The organic phase of the polar lipid fraction was transesterified to fatty acid methyl esters by a mild alkaline reaction. The DNA included in the aqueous phase was precipitated and used as a template in a PCR reaction for the 16S rDNA of eubacteria, and then DGGE was carried out.

MATERIAL and METHODS

The hypersaline microbial mats studied are located at the bottom of a pre-concentration pond (□° 11´ E, □° 57´ E; □3° □0´ N, □□° □0´ N) in the Salin de Giraud solar salt works in the Camargue (Rhone delta, southern France). Sediment samples were taken in April 2002 at two selected times during the day (8:00 am GMT named A samples and 3:00 pm GMT named B samples). Each sample was cut by microtomy into layers 50 μm thick, and ten cuts were grouped to form each sample group (from sample group 1 to 15; group 16 contained 25 slices 50-μm thick). Samples were extracted with the single-phase chloroform/methanol/buffer system of Bligh and Dyer, as modified by White *et al*., 1996 (**Fig. 2**). The total lipid extract was fractionated by silicic acid chromatography and the polar lipid fraction was transesterified to fatty acid methyl esters (FAMEs). Nucleic acid was precipitated from the PLFA aqueous phase of the total lipid extraction. PCR amplification of 16S rRNA gene and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) were carried out as described by Muyzer *et al*., 1993. Excised DGGE bands served as templates in PCR reactions as noted above, and the purified PCR products were sequenced. Amplification products that failed to directly generate legible sequences were cloned into the pGEM-T® easy system II (Promega, USA) cloning vector according to the manufacturer's instructions.

RESULTS

Maximum viable biomass as measured by total PLFAs (**Fig. □A**) accumulated at the top of the mat early in the day; however, in the afternoon, the highest levels of biomass were found underlying the uppermost layers. An increase in the concentration of cyclopropanoic fatty acids represents the shift to conditions that slow down growth rate. In addition, gram-negative communities make *trans*-monoenoic fatty acids in response to changes in their environment. In the morning hours, the reduction in the growth rate (high *cyclo*/ω7*c* ratio) increased with depth (**Fig. □B**), whereas in the afternoon the slowest growth was detected at the top and in the middle of the mat. Data concerning metabolic stress (**Fig. □C**) indicated maximum stress at the topmost layers in the morning; however, the ratio of *trans*/*cis* monoenoic PLFA increased at the bottom of the mat in the afternoon.

In the morning (**Fig. □A**), the microbial community consisted mainly of gram-negative bacteria, as indicated by the presence of monoenoic PLFA. Terminal branched saturated fatty acids (characteristic for gram-positive bacteria) comprised a high proportion of the total PLFA in the middle layers of the mat and from samples at the deepest layers (maximum 2□.6%). Branched monoenoics and mid-chain branched saturated fatty acids, representative of anaerobic microorganisms, were constant along the vertical profile. In the afternoon (**Fig. □B**), the proportion of anaerobic microorganisms was higher and increased with depth. The prominent DGGE bands were sequenced and their corresponding vertical positions and phylogenetic affiliations are shown in **Figure 5-6** and **Table 1**.

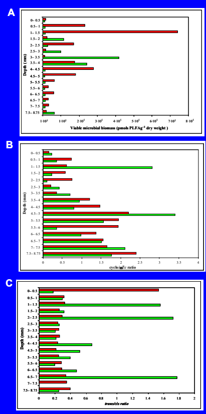


Figure □. (A) Viable microbial biomass as measured by total phospholipid fatty acids (PLFA), expressed as PLFA g^{-1} dry weight. Viable microorganisms have an intact membrane that contains phospholipids (and PLFA) which are turned over rapidly after cell death by means of cellular enzymes that hydrolyze the phosphate group from phospholipids, resulting in formation of diacylglycerols.

(B) Metabolic status or starvation index as ratio cyclopropyl fatty acids to monoenoic PLFA. An increase in the concentration of cyclopropanoic fatty acids represents the shift to conditions that slow down growth rate. This ratio ranges from 0.05 (exponential phase) to 2.5 or higher (stationary phase) in gram-negative bacteria.

(C) Metabolic stress expressed as *trans/cis* ratio of monoenoic PLFA. Gram-negative bacterial communities make *trans*-monoenoic fatty acids in response to changes in their environment (exposure to solvent, toxic metals or starvation). *Trans/cis* ratios greater than 0.1 indicate starvation in bacterial isolates while ratios of 0.05 or lower are found in non-stressed microbial populations.

🟥 A samples, □:00 am GMT, 🟩 B samples, □:00 pm GMT.

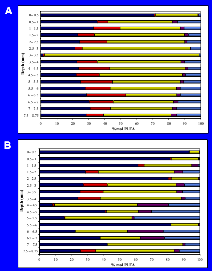


Figure □. Community composition as % mol PLFA. (A) Samples taken at □:00 am; (B) Samples taken at □:00 pm GMT.

■ Normal saturated PLFA, all genera. 🟥 Terminal branched saturated PLFA, gram-positive bacteria. 🟨 Monoenoic PLFA, gram-negative bacteria. 🟪 Polyenoic PLFA, microeukaryotes. 🟦 Branched monoenoic and mid-branched saturated PLFA, anaerobic microorganisms.

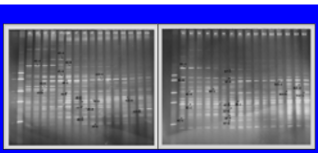


Figure 5. DGGE eubacterial community profile of microbial mat samples taken at □:00 am GMT (A) and at □:00 pm GMT (B), Numbered bands correspond to 16S rDNA sequence types described in Table 1.

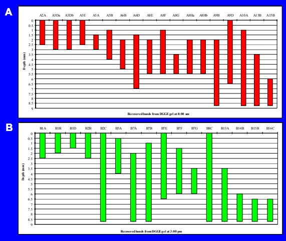


Figure 6. Vertical distribution of DGGE bands recovered from gel A at □:00 am (A), and from gel B at □:00 pm (B) is shown. For example, band A2$_A$ was obtained from a sample taken at a depth of 0 to 2.5 mm.

DISCUSSION

The maximum of viable biomass (**Fig. □A**) observed in the morning hours might be explained by the migration of cyanobacteria towards the top of the mat in order to avoid toxic exposure to sulfide (produced by sulfate-reducing bacteria and accumulated during the night), and of purple sulfur bacteria, which use the light in the early morning to begin photosynthetic processes. The slow growth rate at the bottom of the mat (**Fig. □B**) might be due to an increase in the activity of sulfate-reducing bacteria, especially at 8:00 am. In fact, during the night, anoxic conditions trigger the development of this population, which uses organic matter and produces sulfide. Limiting amounts of organic carbon (low C/N rate) may account for the slow growth of the sulfate reducers. The reduction in the growth rate at the top and in the middle of the mat at 3:00 pm (**Fig. □B**) can be explained by photosynthesis and carbon fixation carried out by cyanobacteria and purple sulfur bacteria, resulting in the generation of abundant organic compounds and limiting amounts of nitrogen (high C/N rate). It is noteworthy that the DGGE band pattern showed high similarity to that of genus *Halanaerobium*. These data are consistent with the PLFA community composition analysis at 8:00 am (**Fig. □A**), since PLFAs of gram-positive bacteria were predominant in middle and deep layers of the microbial mat. PLFAs representative of gram-negative bacteria were dominant between a depth of 2.5 and 3.5 mm at 8:00 am (**Fig. □A**). These results are in agreement with the DGGE pattern, which showed a predominance of bands related to green non-sulfur bacteria (Nübel *et al*., 2001).

The data provide a complete picture of the response of microbial mats to physicochemical variables influenced by time and depth, since ecological processes affect the cycling of nutrients at a community level. Combining phenotypic analyses based on PLFA with DNA analyses provides greater insight into the dynamic shifts in metabolism in microbial mat communities than obtained from nucleic acid studies alone.

REFERENCES

- **Muyzer, G., E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. **59:**695–700
- **Navarrete, A., A. Peacock, S. J. Macnaughton, J. Urmeneta, J. Mas-Castellà, D. C. White, and R. Guerrero.** 2000. Physiological status and community composition of microbial mats of the Ebro Delta, Spain, by Signature Lipid Biomarkers. Microb. Ecol. **□9:**92–99
- **Nübel, U., M. M. Bateson, M. T. Madigan, M. Kühl, and D. M. Ward.** 2001. Diversity and distribution in hypersaline microbial mats of bacteria related to *Chloroflexus* spp. Appl. Environ. Microbiol. **67:**□365–□371
- **Villanueva, L., A. Navarrete, J. Urmeneta, D. C. White, and R. Guerrero.** A combined phospholipid biomarkers and 16S rDNA/DGGE analysis of bacterial diversity and physiological status in an intertidal microbial mat. Appl. Environ. Microbiol. (in press)
- **White, D. C., J. O. Stair, and D. B. Ringelberg.** 1996. Quantitative comparisons of *in situ* microbial biodiversity by signature biomarker analysis. J. Ind. Microbiol. **17:**185–196

Band			Closest relative
Code	Accession no.	Similarity (%)	Organism
A2$_A$	AY5256□□	100	*Psychroflexus tropicus*
A□$_D$	AY525677	95	a)- Uncultured Spirochaetaceae bacterium
	AY525676	□7	b)- Uncultured bacterium clone C11-F10
A□$_E$	AY5256□5	99	Gamma proteobacterium GWS-SE-H2□2b
A5$_A$	AY5256□7	97	*Halanaerobium saccharolyticum*
A5$_B$	AY5256□□	9□	*Halanaerobium saccharolyticum*
A6$_B$	AY5256□6	9□	Uncultured bacterium clone s22
A6$_D$	AY52565□	100	*Halanaerobium saccharolyticum*
A□$_E$	AY52565□	9□	Uncultured green non-sulfur bacterium
A□$_F$	AY525662	□9	*Bdellovibrio* sp. JS7
A□$_G$	AY525665	95	Uncultured green non-sulfur bacterium
A□$_H$	AY525666	9□	a)- Uncultured bacterium clone ZB56
	AY525667	9□	b)- Uncultured Chloroflexi bacterium clone
A9$_B$	AY52566□	9□	Bacteria from anoxic bulk soil
A9$_D$	AY525660	9□	Bacteria from anoxic bulk soil
A10$_A$	AY5256□9	100	*Halanaerobium saccharolyticum*
A1□$_B$	AY525656	97	Uncultured *Rhodobacter* sp.
A15$_B$	AY525675	92	*Peptoniphilus harei*
B1$_A$	AY525652	99	*Psychroflexus tropicus*
B1$_B$	AY525651	9□	*Psychroflexus tropicus*
B1$_D$	AY525669	96	*Psychroflexus tropicus*
B2$_B$	AY525670	97	Gamma proteobacterium GWS-SE-H2□2b
B2$_C$	AY525671	9□	Uncultured cyanobacterium (*Microcoleus* sp.)
B5$_A$	AY525655	□□	Uncultured bacterium clone C11-F10
B7$_A$	AY525650	9□	Uncultured bacterium GR-Sh2-12
B7$_B$	AY52567□	9□	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone
B7$_E$	AY52566□	91	Uncultured bacterium clone ZB69
B7$_F$	AY525657	9□	Bacteria from anoxic bulk soil
B7$_G$	AY52566□	9□	Uncultured bacterium clone s22
B□$_C$	AY525661	9□	Uncultured delta proteobacterium clone
B1□$_A$	AY52565□	100	*Halanaerobium saccharolyticum*
B1□$_B$	AY525659	95	Uncultured gamma proteobacterium clone
B15$_B$	AY52567□	95	Uncultured green non-sulfur bacterium clone
B16$_C$	AY525672	91	Bacteria from anoxic bulk soil

Table 1. Similarity between DNA recovered from DGGE gels and closest relatives

Presentation number: N-0□0

*Contact information: Department of Microbiology,
University of Barcelona.
Av. Diagonal 6□5, E-08028 Barcelona, Spain.
Phone: 3□-93□03□628. Fax: 3□-93□03□629.
E-mail address: villanueva@ub.edu

Increased Metabolic Stress, Slowed Growth, Anaerobic Microniches and Increased Poly-β-hydroxyalkanoate Induced by Photosynthetic Activity during a Circadian Cycle in an Estuarine Microbial Mat

Laura Villanueva[1*], Antoni Navarrete[1], Jordi Urmeneta[1], Ricardo Guerrero[1], Roland Geyer[2], David C. White[2]

[1]University of Barcelona, Barcelona, SPAIN and [2]University of Tennessee. Center for Biomarker Analysis, Knoxville TN

ABSTRACT

Microbial mats are prokaryotic communities that are thought to represent the present-day analogues of the first ecosystems on Earth. Their study reveals microbial strategies for survival under a broad range of environments. Here, we report an integrated lipid biomarker characterization to determine changes in the physiological status, viable biomass and community composition, in microbial mats taken from the Ebro Delta (NE Spain) during a daily cycle every 3 hours. Physicochemical variables (light, conductivity and sulfide) were measured. Total lipid fraction was extracted and then fractioned into polar, glyco- and neutral lipids. **Phospholipid fatty acid** (PLFA) profiles of the polar fraction indicated shifts in viable cell biomass, community composition and metabolic conditions. The **polar lipids** were also examined for plasmalogens, indicative of bacteria of the genus *Clostridium*. The **glycolipid fraction** was processed for poly-β-hydroxyalkanoates (PHA) and the **neutral lipid** fraction was used to evaluate the quinone content (reflecting the redox state of the community). The slowest growth rate was detected before sunset, which coincided with an increase in metabolic stress, a higher proportion of anaerobic bacteria (as well as an increase of the plasmalogen content), and a lower viable biomass. Maximum values of PHA were detected at the same sampling time, which is not consistent with a typical PHA production during the night and suggest a possible role of cyanobacteria in the PHA dynamics of mats. The quinone analysis reported that the metabolism was mainly aerobic with anaerobic niches. The integrated results of the lipid analysis suggest that a high photosynthetic activity in the morning leads to an excess of carbon-assimilated compounds that induces an unbalanced growth situation. The maximum values of metabolic stress and PHA storage were shown to shift in response to the excess of organic compounds. Analyses to date indicate a similar tendency in circadian cycles that remain stable between seasons and years and support the idea that microbial mats are a relatively stable complex ecosystem.

Figure 1. Ebro Delta estuarine microbial mat: The upper layer of the photosynthetic microbial mat is formed mainly by unicellular and filamentous cyanobacteria. Below, there are different populations of anaerobic phototrophic bacteria (purple and green sulfur bacteria, Chromatiaceae and Chlorobiaceae, and green non-sulfur bacteria, *Chloroflexus*). In the bottom layer, sulfate-reducing bacteria (SRB) are abundant. Heterotrophic, sulfur-oxidizing and methanogenic bacteria, but in not-defined layers, have also been detected in many microbial mats.

INTRODUCTION

Photosynthetic microbial mats are sedimentary structures composed primarily of different populations of bacteria in multilayered communities (**Fig. 1**). The determination of total PLFA provides a quantitative measure of the viable or potentially viable biomass, because the viable microbes have an intact membrane with PLFA that turn over rapidly after cell death (□estal *et al.*, 1989). The presence of certain groups of microorganims can be inferred by the detection of unique lipids. For example, specific PLFA are prominent in microbial groups (e.g. monoenoic PLFA typical of gram-negative bacteria). In this study, the analysis of other lipids such as plasmalogens-derived dimethylacetals (DMA), found in *Clostridia* as well as some gram-negative bacteria, have provided a more detailed community composition vision.

Insights into the nutritional status of the microbial community can be determined, since PLFA are products of biosynthetic pathways and reflect the phenotypic response of microorganisms to environmental conditions (Guckert and White, 1986). Moreover, the relative amount of PHA (endogenous storage compounds) compared to the PLFA, provide a measure of the physiological status. Apart from that, respiratory quinone composition can be used for the evaluation of the redox state in microbial communities (Hedrick and White, 1986).

This study was undertaken to gain insight on the dynamics of an estuarine microbial mat during a daily cycle, in order to evaluate the responses of metabolic processes at the community level. The signature lipid biomarker (SLB) approach can provide a powerful integrating and comprehensive determination of ecological succession and physiological adaptation in microbial mats.

MATERIAL and METHODS

The microbial mats studied are located in the coastal area of the Ebro Delta (Spain, □0° □0′ N, 0° □0′ E). Mat samples were taken in Fall 2002, over a day–night cycle. The upper part of the mat was sampled (two cores at each time) every 3 hours starting at midday (12:00, 15:00, 18:00, 21:00, 2□00, 3:00, 6:00, 9:00, GMT). Physicochemical conditions of the overlaying water were analyzed at each sampling time. Samples were extracted with the single-phase chloroform–methanol–phosphate buffer system of Bligh and Dyer, as modified by White *et al.* (White *et al.*, 1996). The total lipid extract was fractionated into neutral, glyco-, and polar lipids by silicic acid chromatography (**Fig. 2A**). The polar lipid fraction was transesterified to fatty acid methyl esters (FAMEs, **Fig. 2B**), with the Mayberry and Lane (1993) method to release plasmalogens ethers as dimethylacetals (**Fig. 2C**). The FAMEs and dimethylacetals were analyzed by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). The poly-β-hydroxybutyrate included in the glycolipid fraction, was fractionated by a mild alkaline methanolysis to release the β-hydroxybutyrate (3-OH $C_{□0}$) monomers, and then they were derivatized by *N*-tert-butyl-dimethylsilyl-*N*-methyltrifluoroacetamide (MBSTFA) and analyzed by GC/MS (Elhottová *et al.*, 2000). The neutral lipid fraction was examined for respiratory ubiquinone and menaquinone isoprenologues by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometry (HPLC/APPI/MS/MS) (Lytle *et al.*, 2001).

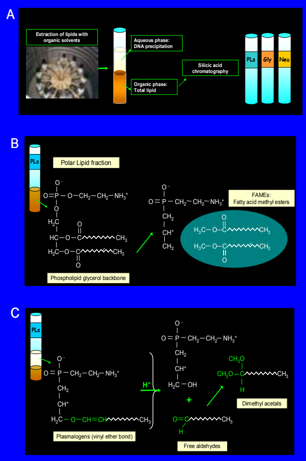


Figure 2. The signature lipid biomarker approach: (A) Total lipid extraction by the modified Bligh & Dyer method and silicic acid chromatography. (B) The organic phase of the polar lipid fraction was transesterified to fatty acid methyl esters by a mild alkaline reaction. (C) The plasmalogens in the remaining aqueous phase were released as dimethylacetals by a mild acid methanolysis.

RESULTS

Physicochemical conditions. Light intensity (**Fig. □A**) measured on the sampling point, decreased reaching a minimum value at night time. Conductivity values were rather stable (25,000-27,500 µS cm-1). Sulfide reached its maximum value at 6:00 am (18 µM) and it was practically undetectable during the rest of the day/night cycle (**Fig. □A**).

Viable microbial biomass. The minimum value of total PLFA (**Fig. □B**) was found at 18:00. Microbial biomass DMA was maximum at 18:00 (3.5 × 10^3 pmols DMA/g dry weight). The DMA biomass trend was coincident with the PLFA biomass profile except from a lag time at the maximum peaks.

Physiological and respiratory status. At 18:00 and 3:00, there was a decrease of the growth rate (high *cyclo*/ω7*c* ratio) and a shift to a higher metabolic stress (high *trans*/*cis* ratio) (**Fig. □C**). The ratio of ubiquinones to menaquinones (**Fig. □D**) is proportional to the ratio of anaerobic respiration to aerobic respiration. In this case, values around 1.0 were indicative of a metabolism mainly aerobic with anaerobic niches or microaerophilic environment. The ratio of total quinones to PLFA is indicative of respiration activity (**Fig. □D**). These results suggested a low respiration activity, but the differences along the circadian cycle are not significative. The increased recovery of DMA from plasmalogens-forming anaerobes at 18:00 was indicative of a higher anaerobic activity. Likewise, maximum value of PHB/PLFA ratio was found at the same sampling time (**Fig. □**). Ratios greater than 0.2 usually indicate the beginnings of unbalanced growth in at least part of the microbial community. Therefore, data suggested a situation of carbon storage by some of the microbial populations in the mat during the circadian cycle.

Community structure by PLFA analysis and DMAs. The community consisted mainly of Gram-negative bacteria (including cyanobacteria) at 12:00 and 15:00, as confirmed the presence of a high percentage of monoenoic PLFA (**Fig. 5**). Maximum values of PLFA indicative of Gram-negative microorganisms, were found at 12:00 and minimum values at 18:00 (18.□3%). From 12:00 to 15:00 sampling times, terminally branched saturated fatty acids, PLFA typical of Gram-positive bacteria, increased slightly (□11% to 9.26%) and lipids representative of anaerobic microorganisms (branched monounsaturated and mid-chain branched saturated) decreased (29.□5% to 22.16%). At 18:00, an inversion in the profile dominated by Gram-negative bacteria was observed, showing an increase of PLFA typical of anaerobic bacteria (56.□6%) in comparison with the rest of the sampling times. Moreover, at this sampling time, a maximum of DMA, common in strict anaerobes as *Clostridium* sp. and also in soil bacteria grown under anoxic conditions, was detected.

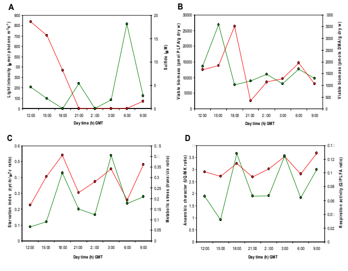


Figure □. (A) Physicochemical conditions of the overlaying water: Light intensity ● (µmol photons m^{-2} s^{-1}) was measured with a LICOR LI-1□9 meter, and sulfide concentration ● (µM) was measured by the Patchmayr colorimetric method (Navarrete *et al.*, 2000). (B) Viable microbial biomass as total PLFA ● (pmols PLFA g^{-1} dry weight), and total DMA ● (pmols DMA g^{-1} dry weight). (C) Metabolic status as ratio cyclopropyl fatty acids to monoenoic PLFA ● (0.05 in logarithmic phase to 2.5 or higher in stationary phase), and metabolic stress expressed as *trans/cis* ratio of monoenoic PLFA ● (*trans/cis* ratios greater than 0.1 indicate starvation in bacterial isolates but ratios of 0.05 or lower are found in non-stressed microbial populations).

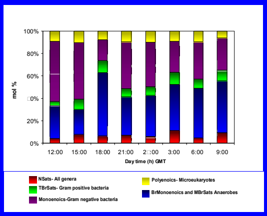


Figure □. Community composition as % mol of PLFA during the circadian cycle. Nsats: Normal saturated fatty acids. TBRSats: Terminal branched fatty acids. Monoenoics: Monoenoic or monounsaturated fatty acids. Polyenoics: Polyenoic or polyunsaturated fatty acids. BrMonoenoics and MBrSats: Branched monounsaturated and mid-branched saturated fatty acids.

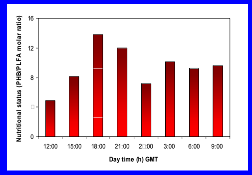


Figure 5. Nutritional or metabolic status as molar ratio of PHB [poly-β-hydroxybutyrate] (pmols of MTBSTFA-hydroxybutyrate g^{-1} dry weight)/ phospholipid fatty acids (pmols of PLFA g^{-1} dry weight), in the Ebro delta microbial mat circadian cycle.

DISCUSSION

The maximum viable microbial biomass found at 15:00 could be explained by an increase of photosynthetic microorganisms that are doing active metabolic processes after the maximum light intensity value at 12:00 am.

The decrease of the growth rate and the higher metabolic stress detected at 18:00 and 3:00, has been previously reported in Ebro delta microbial mats during a 6h day/night cycle in Spring of 1997 (Navarrete *et al.*, 2000) but in that case, the maximum values of *cyclo*/ω7*c* and *trans/cis* ratios were observed at 18:00 and 6:00. In this regard, the minimum viable biomass values in samples taken in Spring 1997 were found at 18:00 and 6:00.

At 18:00, an increase of the starvation index was detected, which coincided with an increase in the metabolic stress, a higher proportion of anaerobic bacteria (**Fig. □**), a maximum of DMA from plasmalogens-forming anaerobes, and a lower proportion of viable cell numbers as total PLFA. This can be explained because during the day, there is a high oxygenic and anoxygenic photosynthetic activity that predominates over sulfate reduction processes and aerobic respiration within the mat. In that situation, there is an excess of carbon assimilated in comparison with other compounds that changes the C/N ratio and leads to an unbalanced growth situation. Apart from that, the excess of carbon assimilated which were not used for growth, was accumulated in the cells as biopolymers, and this is a suitable explanation for the maximum values of metabolic stress before sunset (**Fig. □C**) and the maximum PHB/PLFA ratios at the same sampling point (18:00, **Fig. 5**). Maximum value of PHA detected in the afternoon, is not consistent with a typical PHA production by purple-sulfur bacteria during the night, according to the model suggested by Rothermich *et al.*, and suggest a possible role of cyanobacteria in the PHA dynamics of mats.

It seemed to be a good correspondence between and increase of unbalanced growth, higher metabolic stress and decrease of viable cell numbers. The comparison between the presented data and the data summarized in Navarrete *et al.* (Navarrete *et al.*, 2000), reported a similar tendency in microbial mat activities along a day/night cycle that remained stable between seasons and years. Although further studies need to be done in order to assess this hypothesis, these data support the idea that microbial mats are a relative stable complex system in which the development is ruled by different microbial populations and the physicochemical conditions of the surrounding environment.

REFERENCES

- **Elhottová D., J. Tríska, S. O. Petersen, and H. Santrucková.** 2000. Analysis of poly-β-hydroxybutyrate in environmental samples by GC-MS/MS. Fresenius J. Anal. Chem. **□67:**157–16□
- **Guckert, J. B., M. A. Hood, and D. C. White.** 1986. Phospholipid, ester-linked fatty acids profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: increases in the *trans/cis* ratio and proportions of cyclopropil fatty acids. Appl. Environ. Microbiol. **52:**79□–801
- **Hedrick, D. B., and D. C. White.** 1986. Microbial respiratory quinones in the environment. I. A sensitive liquid chromatographic method. J. Microbiol. Methods **5**: 2□3–25□
- **Lytle, C. A., Y. D. Gan, K. Salone, and D. C. White.** 2001. Sensitive characterization of microbial ubiquinones from biofilms by electrospray/mass spectrometry. Environ. Microbiol. **□:**265–272
- **Mayberry, W. R., and J. R. Lane.** 1993. Sequential alkaline saponification/acid hydrolysis/esterification: a one tube method with enhanced recovery of both cyclopropane and hydroxylated fatty acids. J. Microbiol. Methods **1□:**21–32
- **Navarrete, A., A. Peacock, S. J. Macnaughton, J. Urmeneta, J. Mas-Castellà, D. C. White, and R. Guerrero.** 2000. Physiological status and community composition of microbial mats of the Ebro Delta, Spain, by Signature Lipid Biomarkers. Microb. Ecol. **□9:**92–99
- **Rothermich, M. M., R. Guerrero, R. W. Lenz, and S. Goodwin.** 2000. Characterization, seasonal occurrence, and diel fluctuations of poly(hydroxyalkanoate) in photosynthetic microbial mats. Appl. Environ. Microbiol. **66:**□279–□291
- **Vestal, J. R., and D. C. White.** 1989. Lipid analysis in microbial ecology: Quantitative approaches to the study of microbial communities. BioScience **□9:**535–5□1
- **White, D. C., Stair J. O., and D. B. Ringelberg.** 1996. Quantitative comparisons of *in situ* microbial biodiversity by signature biomarker analysis. J. Ind. Microbiol. **17:**185–196

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Caracterización de bacterias heterotróficas implicadas en el reciclado de nutrientes en la capa fótica de tapetes microbianos

Laura Villanueva[1]*, Javier del Campo[1], Antoni Navarrete[1], Albert Barberán[1], Santi Demajo[1],
Ricardo Guerrero[1], y Jordi Urmeneta[1]

*e-mail: villanueva@ub.edu

[1]Departamento de Microbiología. Universidad de Barcelona.

INTRODUCCIÓN

Los tapetes microbianos son ecosistemas procarióticos complejos formados por poblaciones de microorganismos fotoautótrofos, fotoheterótrofos, quimioautótrofos y heterótrofos. Una de las poblaciones menos caracterizadas es la de los aerobios heterótrofos y tanto la diversidad como su papel de la mineralización de carbono son poco conocidos (Jonkers and Abed, 2003; Van Trappen et al., 2002).

La fotosíntesis oxigénica es el principal proceso de producción primaria en los tapetes. Durante la fotosíntesis, se producen y se liberan compuestos orgánicos. Estudios previos han observado que estos compuestos pueden ser fácilmente asimilados y reciclados por bacterias heterótrofas asociadas (Epping et al., 1999). Por ello, los procesos de fotosíntesis y heterotrofía parecen encontrarse asociados metabólica y estructuralmente en la capa fótica de los tapetes microbianos.

El objetivo de este estudio es caracterizar la población de heterótrofos asociada al nicho existente en torno a las cianobacterias filamentosas en un tapete microbiano. Se pretende discernir el papel de los heterótrofos en la mineralización del carbono orgánico en la capa fótica, y determinar qué tipo de relación se da entre los miembros de esta asociación.

Figura 1. Tapete microbiano del delta del Ebro y detalle de su estructura en láminas formadas por diferentes poblaciones microbianas: La capa superior está formada por cianobacterias. Por debajo suelen encontrarse bacterias fototróficas anoxigénicas (bacterias rojas y verdes del azufre, y verdes no del azufre *Chloroflexus* sp.). En las capas más profundas las bacterias sulfatorreductoras son abundantes. También se han detectado poblaciones de bacterias heterótrofas, fermentadoras, metanógenas, etc. aunque no forman capas definidas.

MATERIAL y MÉTODOS

Cianobacterias filamentosas procedentes de la capa fótica de un tapete microbiano se micromanipularon con un micromanipulador Skerman sobre placas de agar mineral para el crecimiento de fotótrofos. La progresión del crecimiento de heterótrofos entorno a las vainas de las cianobacterias aisladas se observó con microscopía de contraste de fases. El crecimiento heterotrófico fue transferido a placas de medio rico en compuestos orgánicos y agua de mar para proceder al aislamiento del componente heterótrofo.

La cepa aislada se caracterizó morfológica y bioquímicamente realizando las siguientes pruebas: Gram, motilidad, crecimiento en rangos de temperatura, pH y salinidad, susceptibilidad a antibióticos, asimilación de carbohidratos, actividades enzimáticas, actividad surfactante, composición de ácidos grasos de membrana y contenido en quinonas. La clasificación taxonómica se completó con la secuenciación de la molécula del 16S rDNA. La producción de compuestos antimicrobianos o autoinhibidores por parte de la cepa se determinó según el método descrito en Rao *et al.* (2005).

Para determinar la presencia y localización de la cepa aislada, se realizaron estudios de hibridación *in situ* fluorescente (FISH, Fluorescence *in situ* hybridization) con sondas específicas para la detección de la cepa. Las hibridaciones se realizaron con muestras fijadas de la capa fótica de tapetes microbianos.

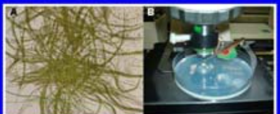


Figura 2. (A) Cianobacterias filamentosas de la capa fótica y (B) micromanipulación mediante el Micromanipulador Skerman.

RESULTADOS

Se aisló una única morfología colonial del crecimiento heterotrófico entorno a las vainas de cianobacterias y la cepa aislada no presentó crecimiento en placas de agar mineral para cianobacterias (Fig. 3). La cepa aislada es un bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo, catalasa y oxidasa positivo, de 0.5–0.8 µm de ancho y 1.7–4 µm longitud (Fig. 4). La cepa aislada no forma endosporas ni acumula poly-β-hydroxibutirato. Las Tablas 2-4 resumen las características bioquímicas, uso de carbohidratos, susceptibilidad de antibióticos y actividades enzimáticas (Fig. 5).

Figura 3. Cianobacterias micromanipuladas sobre placas de agar mineral y el crecimiento heterotrófico entorno a sus vainas tras 2, 4 y 12 días de incubación (mag. 200×).

Tabla 1. Caracterización morfobioquímica (*Resultado: + positivo, - negativo; ᵇtestado por antibiograma).

Característica	Resultado*	Característica	Resultado
Gram	–	Acumulación de PHB	–
Motilidad	+	Susceptibilidad aᵇ	
Disposición flagelar	Polar	Ampicilina (10 µg)	Sensible
Sensibilidad a O_2	Facultativo	Trimetroprim (1.25 µg)	Sensible
Oxidasa	+	Estreptomicina (10 µg)	Sensible
Catalasa	+	Gentamicina (10 µg)	Sensible
Crecimiento NaCl (%)	1.5–10%	Cloranfenicol (30 µg)	Sensible
Crecimiento temperatura	4–35ºC	Quinona isoprenoide	Q-8
Crecimiento pH	5–10	Actividad biosurfactante	+
Pigmentación	–		

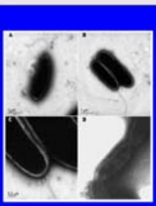


Figura 4. Microscopía de transmisión de células de la cepa aislada teñidas con tinción negativa. De A a D detalles de la posición del flagelo.

Tabla 2. Características bioquímicas basadas en las galerías API20NE, API ZYM y pruebas en placa.

Característica	Resultado*	Característica	Resultado
Reducción nitratos a nitritos	–	Asimilación de glucosa	+
Reducción de nitratos a N_2	–	Asimilación de arabinosa	–
Formación de indol	–	Asimilación de manosa	–
Fermentación D-Glucosa	–	Asimilación de manitol	–
Arginina dihydrolasa	–	Asimilación N-acetil-glucosamina	+
β-Galactosidasa	–	Asimilación de D-maltosa	+
α-Galactosidasa	–	Asimilación de gluconato potásico	–
β-Glucuronidasa	–	Asimilación de ácido cáprico	–
α-Glucosidasa	–	Asimilación de ácido adípico	–
α-Manosidasa	–	Asimilación de ácido málico	–
α-Fucosidasa	–	Asimilación de citrato	–
Fosfatasa alcalina	+	Asimilación de fenilacetato	–
Esterasa (C4)	+	Actividad DNasa	+
Esterasa lipasa (C8)	+	Actividad Caseinasa	+
Lipasa (C14)	+	Actividad Amilasa	+
Leucina arilamidasa	+	Actividad Celulasa	–
Valina arilamidasa	+	Degradación de PHB	–
Cistina arilamidasa	–	Degradación de TBT	+
Tripsina	–	Degradación de aceite	+
α-Quimotripsina	–	Actividad algínasa	–
Fosfatasa ácida	+	Actividad Hemolítica	+
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	+	Hidrólisis de Esculina	+
Ureasa	–	Hidrólisis de gelatina	+

Tabla 3. Oxidación de carbohidratos testada por la galería API50CH.

Componente activo	Resultado*	Componente activo	Resultado
Glicerol	–	Esculina Citrato Férrico	+
Eritritol	–	Salicina	–
D-Arabinosa	–	D-Celobiosa	–
L-Arabinosa	–	D-Maltosa	+
D-Ribosa	–	D-Lactosa	–
D-Xilosa	–	D-Melibiosa	–
L-Xilosa	–	D-Sacarosa	+
D-Adonitol	–	D-Trehalosa	–
Metil-β-D-xilopiranósido	–	Inulina	–
D-Galactosa	–	D-Melezitosa	–
D-Glucosa	+	D-Rafinosa	–
D-Fructosa	+	Almidón	+
D-Manosa	–	Glicógeno	+
L-Sorbosa	–	Xilitol	–
L-Ramnosa	–	Gentiobiosa	+
Dulcitol	–	D-Turanosa	–
Inositol	–	D-Lixosa	–
D-Manitol	–	D-Tagatosa	–
D-Sorbitol	–	D-Fucosa	–
Metil-α-D-manopiranósido	–	L-Fucosa	–
Metil-α-D-glucopiranósido	–	D-Arabitol	–
N-Acetilglucosamina	+	L-Arabitol	–
Amigdalina	–	Gluconato potásico	–
Arbutina	–	Potasio 2-cetogluconato	–
		Potasio 5-cetogluconato	–

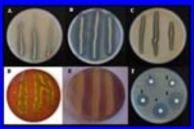


Figura 5. Actividades enzimáticas en placa y susceptibilidad a antibióticos: (A) Actividad DNAsa; (B) Actividad gelatinasa; (C) Actividad caseinasa; (D) Actividad hemolítica; (E) Actividad amilasa; (F) Antibiograma: 1. Trimetroprim 1,25 µg, 2. Estreptomicina 10 µg, 3. Cloranfenicol 30 µg, 4. Ampicilina 10 µg, 5. Gentamicina 10 µg.

El análisis de la molécula del 16S rDNA de la cepa aislada permitió su clasificación como miembro de la subclase de γ-*Proteobacteria* con una homología del 99% con *Pseudoalteromonas elyakovii* (Fig. 6). Ciertas características fenotípicas de la cepa aislada como su capacidad de crecer a 4ºC, ausencia de actividad algínasa, uso de ciertos carbohidratos y su carácter anaerobio facultativo recomiendan su clasificación como especie nueva del género *Pseudoalteromonas*. Proponemos el nombre *Pseudoalteromonas* sp. EBD hasta que los experimentos de hibridación de DNA-DNA confirmen su asignación como nueva especie. No se detectó ninguna actividad antibacteriana o de auto-inhibición en el sobrenadante obtenido de la cepa aislada aunque no puede descartar la formación de compuestos inhibidores por parte de la cepa. La hibridación FISH con la sonda PSA184 específica del género *Pseudoalteromonas* en muestras de fijadas de tapetes microbianos, demostró la presencia de este género rodeando las vainas de cianobacterias filamentosas (Fig. 7).

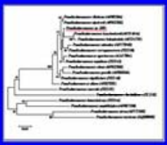


Figura 6. Árbol filogenético que muestra la relación entre la secuencia del 16S rDNA de la cepa aislada *Pseudoalteromonas* sp. EBD con especies de *Pseudoalteromonas* relacionadas (árbol construido con el algoritmo de Neighbor-joining y el modelo de Jukes y Cantor. La barra indica un 0,5% de diferencias nucleotídicas. Los valores del ensayo 'bootstrap' están indicados en las ramas).

DISCUSIÓN

Pseudoalteromonas sp. EBD es un microorganismo muy versátil con un amplio rango de crecimiento a diferentes salinidades, pH y temperaturas, y capacidades enzimáticas que pueden ser activas en diferentes condiciones ambientales. Estas adaptaciones favorecen al microorganismo en el acceso a fuentes de nutrientes más estables. Además, la actividad biosurfactante de la cepa aislada podría explicar la implicación de bacterias heterótrofas en la degradación de compuestos orgánicos contaminantes en la capa fótica de tapetes microbianos (Deppe et al., 2005).

Las vainas de las cianobacterias ofrecen un microambiente donde los nutrientes se concentran y son usados por las cianobacterias, y donde los fotosintatos producidos por los fotótrofos están disponibles para los heterótrofos asociados. La vaina gelatinosa actúa como matriz protectora que aporta humedad y nutrientes a la población de bacterias heterótrofas pero, en ausencia de sustratos más apropiados, las bacterias pueden degradar la vaina. En este estadio de degradación, miembros del género *Pseudoalteromonas* pueden degradar las vainas de las cianobacterias gracias a sus actividades enzimáticas y obtener compuestos orgánicos para su crecimiento y para otras poblaciones de heterótrofos que se encuentren en la capa fótica. De hecho, estudios previos han demostrado la existencia de una relación cooperativa entre miembros del género *Pseudoalteromonas* sp. y *Halomonas* sp. (también detectado en tapetes microbianos) en la degradación de algas marrones del género *Fucus evanescens* (Ivanova et al., 2002). La aplicación del FISH con sondas para la detección de *Pseudoalteromonas* en muestras naturales de tapetes microbianos demuestra la presencia mayoritaria de este género entorno a las vainas de cianobacterias filamentosas. Futuras investigaciones se centrarán en la implicación de este género en el reciclaje de compuestos orgánicos en la capa fótica de ecosistemas microbianos complejos.

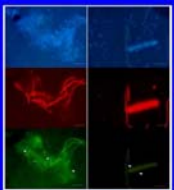


Figura 7. FISH con la sonda PSA184 para *Pseudoalteromonas* sp. en muestras de cianobacterias. De arriba debajo de la figura: Tinción DAPI que muestra el contenido en DNA; Autofluorescencia de las cianobacterias visualizada a través de un filtro Cy3; Señal de fluorescencia de la sonda PSA184 marcada con fluoresceína. Las flechas indican la tinción FISH heterogénea entorno a las vainas de las cianobacterias.

REFERENCIAS

- Deppe U., H. H. Richnow, W. Michaelis, and G. Antranikian. 2005. Degradation of crude oil by an arctic microbial consortium. *Extremophiles* [illegible] (In Press).
- Epping E. H. G., A. Khalili, and R. Thar. 1999. Photosynthesis and the dynamics of oxygen consumption in a microbial mat as calculated from transient oxygen microprofiles. *Limnol. Oceanogr.* 44:1936–1948.
- Ivanova E. P., I. Y. Bakunina, T. Sawabe, K. Hayashi, Y. V. Alexeeva, N. V. Zhukova, D. V. Nicolau, T. N. Zvaygintseva, and V. V. Mikhailov. 2002. Two species of culturable bacteria associated with degradation of brown algae *Fucus evanescens*. *Microb. Ecol.* 43:242-249.
- Jonkers H. M., and R. M. M. Abed. 2003. Identification of aerobic heterotrophic bacteria from the photic zone of a hypersaline microbial mat. *Aquat. Microb. Ecol.* 30:127–133.
- Rao D., Webb J. S., and S. Kjelleberg. 2005. Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1729–1736.
- van Trappen S., J. Mergaert, S. Van Eygen, P. Dawyndt, M. C. Cnockaert, and J. Swings. 2002. Diversity of 746 heterotrophic bacteria isolated from microbial mats from ten antarctic lakes. *Syst. Appl. Microbiol.* 25:603-610.