

Análisis filogenético y genómico del género *Salinivibrio*

Clara López Hermoso

Tesis Doctoral 2017

Departamento de

Microbiología y Parasitología

Facultad de Farmacia

Universidad de Sevilla



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Análisis filogenético y genómico del género

Salinivibrio

Clara López Hermoso

Sevilla, 2017

Memoria que presenta la Lcda. en Farmacia Clara
López Hermoso para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Sevilla



Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla

ANTONIO VENTOSA UCERO, CATEDRÁTICO, CRISTINA SÁNCHEZ-PORRO-ÁLVAREZ, PROFESORA TITULAR Y RAFAEL RUIZ DE LA HABA, PROFESOR CONTRATADO DOCTOR, TODOS PERTENECIENTES AL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral titulada: "Análisis filogenético y genómico del género *Salinivibrio*", presentada por la Lcda. en Farmacia CLARA LÓPEZ HERMOSO para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, bajo nuestra dirección, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Sevilla, a 25 de mayo de 2017.

Fdo.: Antonio Ventosa
Uceró

Fdo.: Cristina Sánchez-Porro
Álvarez

Fdo.: Rafael Ruiz
de la Haba



Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla

MIGUEL ÁNGEL CAVIEDES FORMENTO, PROFESOR TITULAR Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICA: Que la Tesis Doctoral titulada: "Análisis filogenético y genómico del género *Salinivibrio*", presentada por la Lcda. en Farmacia CLARA LÓPEZ HERMOSO para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección de los Doctores D. Antonio Ventosa Ucerro, Dña. Cristina Sánchez-Porro Álvarez y D. Rafael Ruiz de la Haba.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Sevilla, a 25 de mayo de 2017.

Fdo.: Miguel Ángel Caviedes Formento

La realización de esta **Tesis Doctoral** ha sido financiada mediante la ayuda de los siguientes **proyectos de investigación**:

“Biodiversidad microbiana de ambientes hipersalinos basada en estudio metagenómicos” (CGL2010-19303), subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación durante el periodo 2011-2013.

“Towards comprehending prokaryotic species using *Halorubrum* sp. as a model” financiado por la National Science Foundation (USA) durante el periodo 2009-2013.

“Búsqueda y utilización de microorganismos halófilos para la producción de nuevos componentes bioactivos”, financiado por la Universidad de Sevilla durante el periodo de febrero a abril de 2014.

“De la metagenómica al cultivo puro: *Spiribacter salinus*” (CGL2013-46941-P), subvencionado por el Ministerio de Economía y Competitividad durante el periodo 2014-2017.

ÍNDICE

17	ÍNDICE DE TABLAS
21	ÍNDICE DE FIGURAS
25	ABREVIATURAS
27	I. INTRODUCCIÓN
29	I.1. Ambientes extremos
30	I.1.1. Ambientes hipersalinos
35	I.1.2. Salinas solares
36	<i>I.1.2.1. Salinas Bras del Port de Santa Pola, Alicante</i>
39	<i>I.1.2.2. Salina de Isla Cristina, Huelva</i>
40	<i>I.1.2.3. Salinas Aragonesas y Salinas de Isla Bacuta, Huelva</i>
41	<i>I.1.2.4. Salinas Es Trenc, Mallorca</i>
42	<i>I.1.2.5. Salinas de La Malahá, Granada</i>
43	<i>I.1.2.6. Salinas de Bufadero y salinas de Arinaga, Gran Canaria</i>
44	<i>I.1.2.7. Salinas de Cabo Rojo, Puerto Rico</i>
45	I.2. Microorganismos halófilos
47	I.2.1. Taxonomía de bacterias halófilas
50	I.2.2. Mecanismos de osmoadaptación de bacterias halófilas
54	I.2.3. Aplicaciones biotecnológicas y clínicas de bacterias halófilas
55	I.2.4. Ecología y biodiversidad de bacterias halófilas
57	I.3. Taxonomía procariota
57	I.3.1. Definición de especie procariota (pasado, presente y futuro)
58	I.3.2. Caracterización polifásica
58	<i>I.3.2.1. Caracterización fenotípica</i>

60	<i>I.3.2.2. Caracterización genómica</i>
64	<i>I.3.2.3. Caracterización filogenética</i>
71	<i>I.3.2.4. Caracterización quimiotaxonómica</i>
73	<i>I.3.2.5. Técnicas de tipificación genético-molecular (fingerprinting)</i>
77	I.4 Género <i>Salinivibrio</i>
77	I.4.1. Taxonomía
79	I.4.2. Fisiología y osmorregulación
81	I.4.3. Genética y genómica
83	I.4.4. Ecología y diversidad
86	I.4.5. Aplicaciones biotecnológicas
89	II. OBJETIVOS
95	III. MATERIAL Y MÉTODOS
97	III.1. Muestras ambientales, medios de aislamiento y cepas bacterianas
97	III.1.1. Muestras y tratamiento de las muestras
98	III.1.2. Medios de cultivo
99	III.1.3. Métodos de aislamiento
100	III.1.4. Material biológico
100	III.1.5. Conservación de las cepas bacterianas
100	III.2. Manipulaciones del ADN genómico
101	III.2.1. Extracción de ADN
103	III.2.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa
104	III.2.3. Determinación de la concentración y pureza del ADN
105	III.3. Amplificación del ADN mediante PCR
108	III.4. Secuenciación de los amplicones
109	III.5. Estudio filogenético
111	III.6. Caracterización taxonómica

111	III.6.1. Estudio de tipificación molecular o <i>fingerprinting</i>
113	III.6.2. Caracterización fenotípica
113	<i>III.6.2.1. Morfología y movilidad</i>
113	<i>III.6.2.2. Pruebas fisiológicas</i>
114	<i>III.6.2.3. Pruebas bioquímicas</i>
115	<i>III.6.2.4. Pruebas nutricionales</i>
116	III.6.3. Caracterización genotípica
116	<i>III.6.3.1. Determinación del contenido en G+C del ADN</i>
117	<i>III.6.3.2. Hibridación ADN-ADN</i>
122	III.6.4. Caracterización quimiotaxonómica
125	III.7. Análisis genómico del género <i>Salinivibrio</i>
125	III.7.1. Secuenciación de ADN genómico y control de calidad
126	III.7.2. Ensamblaje de las secuencias
128	III.7.3. Anotación de las secuencias genómicas
129	III.7.4. Análisis genómico y genómica comparativa
133	III.8. Reclutamientos genómicos
135	IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
137	IV.1. Aislamiento y selección de cepas del género <i>Salinivibrio</i>
156	IV.2. Filogenia del género <i>Salinivibrio</i> basada en el análisis comparativo de secuencias del gen ARNr 16S y genes <i>housekeeping</i>
156	IV.2.1. Análisis del gen ARNr 16S
163	IV.2.2. Análisis por Secuenciación Multilócica (MLSA)
164	<i>IV.2.2.1. Análisis de los genes concatenados</i>
169	<i>IV.2.2.2. Análisis de los genes individuales</i>
177	<i>IV.2.2.3. Conclusión del estudio MLSA</i>
182	IV.3. Hibridación ADN-ADN
182	IV.3.1. Interpretación de los resultados de la hibridación ADN-ADN
185	IV.4. Correlación entre la técnica MLSA y la DDH

188	IV. 5. Técnicas de tipificación molecular
191	IV.6. Caracterización fenotípica de las cepas
191	IV.6.1. Características morfológicas
191	IV.6.2. Características fisiológicas
194	IV.6.3. Pruebas bioquímicas
205	IV.6.4. Pruebas nutricionales
217	IV.7. Determinación del porcentaje guanina mas citosina del ADN
219	IV. 8. Análisis genómico de cepas del género <i>Salinivibrio</i>
219	IV.8.1. Secuenciación y ensamblaje de las secuencias
226	IV.8.2. Características generales de los <i>draft genomes</i>
229	IV.8.3. Cálculo del <i>Average Aminoacid Nucleotide (ANI)</i>
234	IV.8.4. Hibridación ADN-ADN <i>in silico</i>
237	IV.8.5. Pangenoma del género <i>Salinivibrio</i>
238	<i>IV.8.5.1. Filogenómica del género Salinivibrio</i>
243	IV. 9. Aislamiento y caracterización de las cepas del filogrupo 1
259	IV. 9.1. Descripción de <i>Salinivibrio kushneri</i> sp. nov.
261	IV.10. Sinonimia de especies: <i>S. proteolyticus</i> y <i>S. costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i>
272	IV. 10.1. Corrección de la especie <i>Salinivibrio vallismortis</i> comb nov.
275	V. CONCLUSIONES
279	VI. CONCLUSIONS
283	VII. SUMMARY
289	VIII. BIBLIOGRAFÍA

ÍNDICE DE TABLAS

- 97** Tabla III.1. Características geográficas y fisicoquímicas y localización de los puntos de muestreo.
- 100** Tabla III.2. Cepas de colección del género *Salinivibrio* utilizadas en este estudio.
- 106** Tabla III.3. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S y de los genes *housekeeping gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD*. Las secuencias de los cebadores se muestran de acuerdo al código de la IUPAC para la denominación de nucleótidos ambiguos. La posición de los cebadores se indica con respecto a la numeración del gen correspondiente de *Escherichia coli*.
- 108** Tabla III.4. Condiciones de las reacciones de PCR.
- 133** Tabla III.5. Características de las bases de datos metagenómicos de los ambientes hipersalinos estudiados.
- 139** Tabla IV.1. Colección de bacterias aisladas, longitud de secuencia amplificada del gen ARNr 16S, fecha y sitio de aislamiento y especie más relacionada filogenéticamente, según la comparación de las secuencias parciales del gen que codifica el ARNr 16S.
- 152** Tabla IV.2. Sitio y fecha de cada muestro junto con las bacterias aisladas y las cepas relacionadas filogenéticamente con el género *Salinivibrio*.
- 152** Tabla IV.3. Colección de cepas pertenecientes al género *Salinivibrio* con su especie más relacionada filogenéticamente, según la comparación de las secuencias casi completas del gen que codifica el ARNr 16S.
- 162** Tabla IV.4. Porcentajes de semejanza entre las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas tipo y las cepas aisladas del género *Salinivibrio*.
- 167** Tabla IV.5. Porcentajes de semejanza entre la concatenación de las secuencias de los genes: *gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD* de las cepas tipo y las cepas aisladas del género *Salinivibrio*.
- 176** Tabla IV.6. Porcentajes de semejanza a nivel intrafilogrupo (negrita) e interfilogrupo para las secuencias individuales y concatenadas de los genes *gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD* de las cepas aisladas y cepas tipo del género *Salinivibrio*.

- 178** Tabla IV.7. Relación de cepas de *Salinivibrio* utilizadas en este estudio, y número de acceso del GenBank / EMBL / DDBJ para los genes ARNr 16S, *gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD*.
- 184** Tabla IV.8. Valores de la hibridación ADN-ADN dentro de cada filogruppo del género *Salinivibrio* y entre cepas representativas de cada filogruppo.
- 192** Tabla IV.9. Rango salino, de pH y de temperatura de una selección de cepas del género *Salinivibrio*.
- 195** Tabla IV.10. Principales características bioquímicas diferenciales de las cepas tipo y aisladas en este estudio del género *Salinivibrio*.
- 201** Tabla IV.11. Producción de ácidos a partir de carbohidratos y alcoholes de todas las cepas del género *Salinivibrio* objeto de este estudio.
- 205** Tabla IV.12. Utilización de azúcares por parte de las cepas del género *Salinivibrio* objeto de este estudio.
- 209** Tabla IV.13. Utilización de aminoácidos por parte de las cepas del género *Salinivibrio* objeto de este estudio.
- 213** Tabla IV.14. Utilización de ácidos orgánicos por parte de las cepas del género *Salinivibrio* objeto de este estudio.
- 217** Tabla IV.15. Contenido en G+C de las cepas seleccionadas objeto de estudio.
- 219** Tabla IV.16. Colección de cepas a las que se les ha secuenciado su genoma y tecnología de secuenciación usada.
- 222** Tabla IV.17. Principales características de los genomas secuenciados según el ensamblador utilizado.
- 226** Tabla IV.18. Características principales de los 33 *draft genomes* del género *Salinivibrio*.
- 230** Tabla IV.19. Valores de ANI_b de las treinta y tres cepas objeto de estudio.
- 231** Tabla IV.20. Valores de ANI_m de las treinta y tres cepas objeto de estudio
- 232** Tabla IV.21. Valores de OrthoANI de las treinta y tres cepas objeto de estudio
- 233** Tabla IV.22. Porcentajes de valores de ANI a nivel intrafilogruppo (negrita) y entre filogruppos.
- 234** Tabla IV.23. Valores de AAI entre filogruppos y entre la especie *Vibrio cholerae*.

- 236** Tabla IV.24. Valores de DDH *in silico* de las treinta y tres cepas objeto de estudio
- 237** Tabla IV.25. Valores de hibridación ADN-ADN *in silico* de las cepas objeto de estudio.
- 237** Tabla IV.26. Características del pangenoma en base a alineamientos nucleotídicos.
- 238** Tabla IV.27. Características del pangenoma en base a alineamientos aminoacídicos.
- 248** Tabla IV.28. Características diferenciales entre las cepas *Salinivibrio* sp. AL184^T, IB560, IB563, IC202, IC317, MA421, ML277, ML318, ML328A y ML331.
- 252** Tabla IV.29. Características diferenciales entre la cepa AL184^T y las especies descritas del género *Salinivibrio*.
- 255** Tabla IV.30. Contenido de ácidos grasos celulares de la cepa AL184^T y las especies más estrechamente relacionadas con el género *Salinivibrio*.
- 256** Tabla IV.31. Resultados de los cálculos del GGDC (%) entre los genomas de las diez cepas y las especies descritas del género *Salinivibrio*.
- 257** Tabla IV.32. Porcentajes de valores de ANIb y OrthoANI entre los genomas de las diez cepas y las cepas descritas del género *Salinivibrio*.
- 268** Tabla IV.33. Características fenotípicas y genotípicas diferenciales entre las siete cepas del filogrupo 4 y el resto de especies del género *Salinivibrio*.
- 269** Tabla IV.34. Composición de ácidos grasos, lípidos polares y quinonas respiratorias de las cepas *S. costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T y *S. proteolyticus* DSM 11403^T
- 270** Tabla IV.35. Relación de valores de la hibridación ADN-ADN (DDH) *in silico*, valores de ANIb y de OrthoANI de la cepa *S.costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T frente a las cepas pertenecientes al mismo filogrupo junto con las especies descritas del género *Salinivibrio*.

ÍNDICE DE FIGURAS

- 31 Figura I.01. Ejemplos de ambientes acuáticos talasosalinos.
- 33 Figura I.02. Ejemplos de ambientes acuáticos atalasalinos.
- 35 Figura I.03. Ejemplos de suelos salinos.
- 37 Figura I.04. Salina Bras del Port en Santa Pola, Alicante.
- 40 Figura I.05. Salinas de Isla Cristina (Huelva).
- 41 Figura I.06. A, salinas Aragonesas (Huelva); B, salinas de Isla Bacuta (Huelva).
- 41 Figura I.07. Salinas Es Trenc (Mallorca).
- 42 Figura I.08. Salinas de La Malahá en Granada.
- 43 Figura I.09. Salinas de Bufadero.
- 44 Figura I.10. Salinas de Arigana.
- 45 Figura I.11. Salinas de Cabo Rojo (Puerto Rico).
- 48 Figura I.12. Árbol filogenético universal determinado por la comparación de secuencias de la subunidad menor del ARN ribosómico.
- 102 Figura III.01. A, ADN genómico extraído mediante el método de Marmur. B, ADN genómico disuelto en 0,1x SSC.
- 103 Figura III.02. Patrón de pesos moleculares de 1 Kb DNA ladder (Invitrogen).
- 104 Figura III.03. A, Espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific). B, Espectrofotómetro Lambda 20 (Perkin-Elmer).
- 117 Figura III.04. Espectrofotómetro Lambda 20 (Perkin-Elmer) UV-Vis equipado con un sistema Peltier PTP-1.
- 151 Figura IV.01. Número de cepas aisladas según su sitio de aislamiento.
- 155 Figura IV.02. Representación del número de cepas aisladas pertenecientes a cada especie del género *Salinivibrio*.
- 157 Figura IV.03. Árbol filogenético obtenido por el método *neighbour-joining* basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas tipo del género *Salinivibrio* y otros miembros de la familia *Vibrionaceae*.

- 158** Figura IV.04. Árbol filogenético obtenido por el método *neighbour-joining* basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas aisladas y las cepas tipo del género *Salinivibrio*.
- 159** Figura IV.05. Árbol filogenético obtenido por el método *maximum-parsimony* basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas aisladas y las cepas tipo del género *Salinivibrio*.
- 160** Figura IV.06. Árbol filogenético obtenido por el método *maximum-likelihood* basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas aisladas y las cepas tipo del género *Salinivibrio*.
- 168** Figura IV.07. Árbol filogenético basado en la comparación de la secuencia concatenada de los genes *gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD* obtenido por el método *neighbour-joining* en el que se muestra la posición filogenética de la colección de cepas aisladas y las cepas tipo del género *Salinivibrio*.
- 174** Figura IV.08. Árboles filogenéticos obtenidos por el método de *neighbour-joining* basados en la comparación de las secuencias de los genes *gyrB* (A), *recA* (B), *rpoA* (C) y *rpoD* (D), en los que se muestra la posición filogenética de las cepas aisladas y cepas tipo del género *Salinivibrio*.
- 183** Figura IV.09. Árbol filogenético basado en la comparación de la secuencia concatenada de los genes *gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD* obtenido por el método *neighbour-joining* en el que se muestra la posición filogenética de la colección de cepas aisladas y las cepas tipo del género *Salinivibrio*.
- 186** Figura IV.10. Relación entre valores de hibridación ADN-ADN y valores de similitud génica de los genes *gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD* concatenados.
- 187** Figura IV.11. Resolución taxonómica en relación al rango de similitudes (%) intraespecíficas (negro) e interespecíficas (gris).
- 190** Figura IV.12. Dendrograma basado en los datos de Rep-PCR BOX-A1R, donde se comparan las cepas aisladas y las cepas tipos del género *Salinivibrio*.
- 239** Figura IV.13. Árbol filogenético basado en el *core-genome* de las secuencias nucleotídicas de las 27 cepas aisladas y las cepas tipo del género *Salinivibrio*.

- 242** Figura IV.14. Árbol filogenético basado en el *core-genome* de las secuencias aminoacídicas de las 27 cepas aisladas y las cepas tipo del género *Salinivibrio*.
- 244** Figura IV.15A. Árbol filogenético obtenido por el método *neighbour-joining* basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas AL184^T, IB560, IB563, IC202, IC317, MA421, ML277, ML318, ML328A y ML331 y las cepas tipo del género *Salinivibrio*.
- 245** Figura IV.15B. Árbol filogenético obtenido por el método *maximum-likelihood* basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas AL184^T, IB560, IB563, IC202, IC317, MA421, ML277, ML318, ML328A y ML331 y las cepas tipo del género *Salinivibrio*.
- 245** Figura IV.15C. Árbol filogenético obtenido por el método *maximum-parsimony* basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas AL184^T, IB560, IB563, IC202, IC317, MA421, ML277, ML318, ML328A y ML331 y las cepas tipo del género *Salinivibrio*.
- 246** Figura IV.16. Árbol filogenético basado en la comparación de la secuencia concatenada de los genes *gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD* obtenido por el método *neighbour-joining* en el que se muestra la posición filogenética de cepas AL184^T, IB560, IB563, IC202, IC317, MA421, ML277, ML318, ML328A y ML331 y las cepas tipo del género *Salinivibrio*.
- 258** Figura IV.17. Árbol filogenético basado en el *core-genome* de las cepas AL184^T, IB560, IB563, IC202, IC317, MA421, ML277, ML318, ML328A y ML331 y las cepas tipo del género *Salinivibrio*.
- 259** Figura IV.18. Representación de los 10 subsistemas más característicos de los genomas objeto de estudio.
- 262** Figura IV.19. Árbol filogenético obtenido por el método *neighbour-joining* basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas tipo del género *Salinivibrio* y otros miembros de la familia *Vibrionaceae*.
- 263** Figura IV.20. Árbol filogenético obtenido por el método *maximum-likelihood* basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S en el que se

muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas IB574, IB872, PR5, PR919 y PR932 y las cepas tipo del género *Salinivibrio*.

- 265** Figura IV.21. Árbol filogenético basado en la comparación de la secuencia concatenada de los genes *gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD* obtenido por el método *maximum-likelihood* en el que se muestra la posición filogenética de las cepas IB574, IB872, PR5, PR919 y PR932 y las cepas tipo del género *Salinivibrio*.
- 271** Figura IV.22. Árbol filogenético basado en el *core-genome* de las cepas IB574, IB872, PR5, PR919 y PR932 y las cepas tipo del género *Salinivibrio*. Este árbol fue obtenido por el método *neighbour-joining* calculado a partir de la alineación de 1255 genes ortólogos compartidos de estos genomas.
- 272** Figura IV.23. Representación de los 10 subsistemas más característicos de los genomas objeto de estudio.

ABREVIATURAS

³H-dCTP: desoxi-(1', 2', 5'-3H) citidina trifosfato

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARNr: ácido ribonucleico ribosómico

C: citosina

°C: grado centígrado

cm: centímetro

col. : colaboradores

c.s.p.: cantidad suficiente para

DDBJ: *DNA Data Bank of Japan*

DGGE: electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización

dNTP: desoxinucleótido trifosfato

DO: densidad óptica

DSMO: dimetilsulfóxido

EDTA: ácido etilen-diamino-tetracético

EE.UU.: Estados Unidos

EMBL: *European Molecular Biology Laboratory*

et al.: et alii (y otros)

g: gramo

gen.: género

G: guanina

G+C: contenido en guanina + citosina

Kpb: kilopares de bases

l: litro

M: molar

Mpb: megapares de base

mg: miligramo

min: minuto

ml: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

N: nucleótido

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

nm: nanómetro

nov.: nuevo/a

OGs: genes ortólogos

ORF: marco abierto de lectura

pb: pares de bases
PCR: reacción de amplificación en cadena de la polimerasa
PE: *paired end*
p/v: relación peso/volumen
Q8: ubiquinona 8
SDS: dodecil sulfato sódico
seg.: segundo
sp.: especie
T: timina
TAE: tampón Tris-acetato-EDTA
Taq: ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*
TE: tampón TrisHCl-EDTA
 T_m : temperatura media de desnaturalización del ADN
 μg : microgramo
 μl : microlitro
 μm : micrómetro
 μM : micromolar
UPGMA: *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*
UV: ultravioleta
V: voltio
v/v: relación volumen/volumen
W: vatios

I. Introducción

I.1. AMBIENTES EXTREMOS

Durante las últimas décadas, han sido relevantes los avances científicos con los que se han ampliado los límites del espacio habitable en la Tierra a través de la investigación de los denominados “microorganismos extremófilos”, que habitan en condiciones ambientales extremas o incluso las requieren para su crecimiento (Rothschild y Mancinelli, 2001; Baross, 2007; Pikuta y Hoover, 2007; Stan-Lotter, 2012). Es importante matizar que el término “ambiente extremo” corresponde a un concepto subjetivo y de gran complejidad, por lo que tradicionalmente ha sido difícil de definir. En estos ambientes las condiciones ambientales tales como el pH, la temperatura, la presión, la concentración de los nutrientes o la salinidad son extremadamente elevadas o bajas, y sólo un número limitado de especies se encuentran bien adaptadas, y no sólo toleran, sino que pueden crecer óptima o estrictamente bajo estas condiciones límite. Los microorganismos adaptados a crecer óptimamente en estos ambientes se denominan “extremófilos” (Mesbah y Wiegel, 2008; 2012). Así pues, lo que nosotros denominamos “extremo” podría considerarse como “normal” para algunos microorganismos (Ventosa, 2006; La Cono y col., 2011; Oren y col., 2011; Yakimov y col., 2015).

En 1979, Brock definió los ambientes extremos como “ambientes en los que existe una escasa diversidad de especies y en los que están ausentes algunos grupos taxonómicos”. Posteriormente, Rodríguez-Valera (1988) corroboró esta definición al indicar que la diversidad de las especies biológicas disminuye a medida que las condiciones se hacen más extremas. Sin embargo, hoy día gracias a los estudios realizados en las últimas décadas, se ha puesto de manifiesto que la biodiversidad taxonómica presente en estos ambientes es muy superior a lo que se pensó en un principio (Ghai y col., 2011; Aguirre-Garrido y col., 2015; Oren., 2015; Ventosa y col., 2015).

Aunque los organismos extremófilos están representados en todos los Dominios del árbol de la vida, los ambientes extremos suelen estar habitados por organismos procariotas (bacterias y arqueas) (Canganella y Wiegel, 2011). Adicionalmente, la comprensión de los límites de la vida posee un gran interés aplicado, debido a las extraordinarias propiedades y

características de estos ambientes y de los microorganismos que allí habitan. La totalidad de los seres vivos de la Tierra sufren cambios necesarios para sobrevivir a las condiciones hostiles del planeta. De ahí que los mecanismos de adaptación experimentados por los microorganismos en estos ambientes puedan sentar las bases para nuevos avances en los sectores de la biotecnología, la biomedicina y la astrobiología entre otros; (Ventosa y Arahál, 2002a, 2002b; Mellado y Ventosa, 2003; Oren, 2010; Abriouel y col., 2011; Pérez y col., 2011; Wang y col., 2011; Amils y col., 2014; 2016; González-Toril y col., 2014; Fernández y col., 2016; Gutiérrez-Preciado y col., 2017; Khodadad y col., 2017).

I.1.1. Ambientes hipersalinos

Dadas las características de los ambientes hipersalinos, éstos se engloban dentro de los ambientes considerados como extremos. El principal factor limitante de los ambientes hipersalinos es su elevada concentración de sal. Sin embargo, existen otros factores físico-químicos limitantes en el desarrollo de la vida en esos ambientes como son: la temperatura, el pH, la radiación solar, la disponibilidad de oxígeno o de nutrientes y la presencia de metales pesados y de otros compuestos tóxicos (Rodríguez-Valera, 1988). La biota de dichos hábitats está dominada por **microorganismos halófilos** bien adaptados, que en numerosas ocasiones son poliextremófilos, dada su habilidad para crecer óptimamente no solo a altas concentraciones de sales sino también a elevados valores de pH, bajas o altas temperaturas y en otras condiciones extremas mencionadas previamente (Bowers y col., 2009; Bowers y Wiegel, 2011; Mesbah y Wiegel, 2012).

Los ambientes hipersalinos están constituidos principalmente por sistemas acuáticos y suelos hipersalinos (Ventosa y col., 2008), aunque también se incluyen depósitos de sal, algunas plantas del desierto, salmueras de yacimientos petrolíferos, pieles y una gran variedad de productos salados, como pescados o carnes sazonadas y alimentos fermentados, entre otros (Grant y col., 1998; Ventosa, 2006; Ventosa y col., 2008; Oren, 2011; Mokhtarnejad y col., 2016; Motlagh y col., 2017).

Los ambientes acuáticos hipersalinos son los que se han estudiado en mayor profundidad, y se caracterizan porque presentan una concentración de sales superior a la del agua del mar (Rodríguez-Valera, 1988), es decir, superior a un 3,5 % (p/v) de sales totales, aproximadamente (Edgerton y Brimblecome, 1981). Dependiendo de su origen, la composición salina de los ambientes acuáticos hipersalinos puede diferir o no de la del agua del mar, por lo que en base a esto, se clasifican en aguas talasosalinas o atalasosalinas.

Las **aguas talasosalinas** tienen un origen marino y por tanto una composición salina similar a la del agua del mar. Químicamente se caracterizan por un claro predominio de iones monovalentes Cl^- y Na^+ , aunque también están presentes otros iones como Mg^{2+} , SO_4^{2-} , K^+ , Ca^{2+} , HCO_3^- , Br^- y F^- (de la Haba y col., 2011). Un ejemplo de ambientes talasosalinos son las salinas marinas, utilizadas para la producción de sal por evaporación del agua del mar, que además de poseer una elevada concentración de sales, están sometidas a una fuerte irradiación solar y a grandes oscilaciones de temperatura entre el día y la noche (Rodríguez-Valera y Ruiz-Berraquero, 1983), por lo que constituyen un excelente modelo para el estudio de los microorganismos que viven en condiciones extremas (Rodríguez-Valera, 1988; Grant, 1990). Sin embargo, el Gran Lago Salado, en Utah (Estados Unidos), a pesar de no tener un origen marino y proceder de la disolución de sales de roca causada por el agua de lluvia, ríos o aguas subterráneas, presenta una composición relativa de sales similar a la del agua del mar (Post, 1977; Rodríguez-Valera, 1993), por lo que se engloba dentro de los denominados hábitats talasosalinos (Figura I.01).



Figura I.01. Ejemplos de ambientes acuáticos talasosalinos. A, el Gran Lago Salado (Utah, Estados Unidos); B, salina solar de Isla Cristina (Huelva).

Por otro lado, las **aguas atalasalinas** son aquellas cuya composición salina refleja la geología, topología y condiciones climáticas circundantes, proviniendo, generalmente, de la disolución de depósitos minerales de origen continental. Las sales que forman estos ambientes se encuentran en unas proporciones bastante alejadas a las de un medio marino típico, predominando generalmente en su composición los cationes divalentes como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} (Brock, 1979; Rodríguez-Valera y Ruiz-Berraquero, 1983; Rodríguez-Valera, 1993).

Aun siendo menos abundantes, estos ambientes se caracterizan por ser más heterogéneos que los anteriores, dando lugar a hábitats muy diferentes entre sí. Un ejemplo de hábitat atalasalino muy estudiado es el Mar Muerto (Volcani, 1940a; Oren, 1983c; 1988; 2006; 2007a; Arahal, 1997; Ventosa y col., 1998b; Bodaker y col., 2010; Cheewinthamrongrody col., 2016; Lai y col., 2017), el cual se caracteriza por presentar una concentración de sales del 34 %, con predominancia de cationes divalentes, un valor de pH cercano a 6 y un índice de radiación solar alto, haciendo de éste un ambiente inhóspito para la mayoría de los microorganismos, impidiendo incluso el crecimiento de la mayoría de los microorganismos mejor adaptados a estos ambientes (de la Haba y col., 2011). Otros ejemplos de ambientes atalasalinos estudiados en profundidad son algunos lagos hipersalinos de la Antártida (Liao y col., 2016; Najnin y col., 2016; Tschitschko y col., 2016; Williams y col., 2017), lagos salinos y alcalinos de África Oriental (como el lago Magadi en Kenia [Kavembe y col., 2015; 2016; Kambura y col., 2016], el lago Natron en Tanzania [Yakimov y col., 2001] o los lagos del Wadi Natrun en Egipto [Jones y col., 1998; Mesbah y Wiegel, 2009]), de Estados Unidos (tales como el Mono Lake y el Big Soda Lake [Oren, 2002c; Namsaraev y col., 2009; Hoefl y col., 2016; Thomas y col., 2017]) y de Asia (Irán [Mehrshad y col., 2015; Corral y col., 2016] y China [Grant y col., 2011; He y col., 2015; Zhuang y col., 2016]) (Figura I.02).

A diferencia de otros ambientes atalasalinos, los lagos salinos y alcalinos son pobres en iones Mg^{2+} y Ca^{2+} , siendo en cambio abundantes los aniones CO_3^{2-} y Cl^- , debido a la intensa evaporación y a la química de sus aguas, lo

que se traduce en valores de pH superiores a 8 (Sui y col., 2016; de León-Lorenzana y col., 2017).

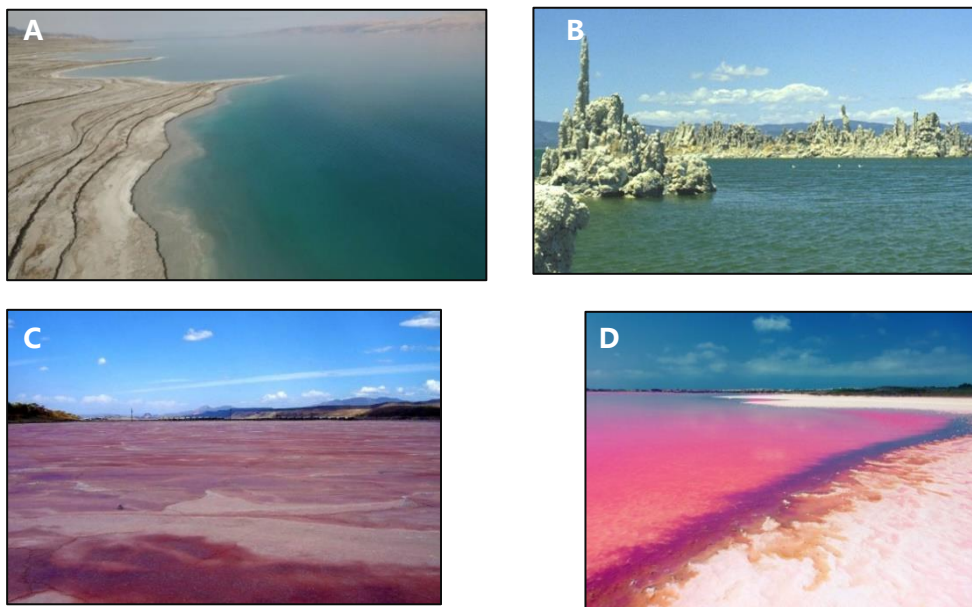


Figura I.02. Ejemplos de ambientes acuáticos atalasalinos. A, Mar Muerto (Israel/Jordania); B, Lago Mono (Estados Unidos); C, Lago Magadi (Kenia); D, Lago Natron (Tanzania).

En contraste con los ambientes acuáticos hipersalinos, no existe una definición precisa de **suelo salino** o **hipersalino**. Según Kaurichev (1980), los suelos salinos son aquellos que contienen una concentración superior al 0,2 % (p/v) de sales solubles. Éstos, se encuentran ampliamente distribuidos en nuestro planeta, particularmente en regiones áridas o semiáridas, aunque no de manera exclusiva.

A diferencia de los sistemas acuáticos hipersalinos, hay muy pocos estudios acerca de la biodiversidad microbiana en los suelos salinos, pese a que representan una superficie significativa de nuestro planeta. Los primeros estudios realizados sobre la diversidad microbiana en suelos salinos tuvieron lugar en los años 80, utilizando los métodos tradicionales de cultivo (Quesada y col., 1982). Algunos estudios más recientes son los realizados por Luque y col. (2012a; 2012b; 2014), Bin Ma y col. (2013), Oueriaghli y col. (2013; 2014), Navarro-Noya y col. (2015), Chen y col. (2017) o León-Lorenzana y col. (2017), entre otros.

La microbiota que los habita se caracteriza por su capacidad para crecer en un rango de salinidad muy amplio (Quesada y col., 1982). Se piensa que este fenómeno es debido a la heterogeneidad de los suelos salinos, en los cuales la salinidad puede cambiar bruscamente en el espacio y en el tiempo (por ejemplo como consecuencia de la lluvia o de variaciones en las condiciones ambientales) (de la Haba y col., 2011). Es esta heterogeneidad la que puede provocar que los microorganismos excesivamente especializados sean eliminados periódicamente, mientras que los microorganismos eurihalinos (en concreto aquellos capaces de crecer en un amplio rango de concentraciones de sales) sean favorecidos (Ventosa y col., 2008).

Estudios realizadas desde el punto de vista taxonómico demuestran que los microorganismos aislados en suelos hipersalinos pertenecen a grupos taxonómicos muy diversos: *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e incluso *Halobacteria* de forma ocasional (Ventosa y col., 2008; Luque y col., 2014; Chen y col., 2017).

En un estudio realizado por Oueriaghli y col. (2014), en el que estudiaron la diversidad y la distribución del género *Halomonas* tanto en muestras de suelo como en sedimentos acuosos en Rambla Salada, en Murcia (sureste de España) utilizando diferentes técnicas moleculares, se observó que la abundancia y la uniformidad de las poblaciones del género *Halomonas* se encuentran influenciadas principalmente por la estación del año, el pH y la salinidad (Oueriaghli y col., 2014). En un estudio llevado a cabo por Pandit y col. (2015), se ha estudiado la diversidad taxonómica de la comunidad microbiana presente en el desierto salino de El Gran Rann de Kutch, en Gujarat (India) mediante estudios metagenómicos. Para ello se estudió la variación de las comunidades microbianas en relación con la salinidad y la época del año, revelando que El Gran Rann de Kutch presenta una rica diversidad microbiana con representantes de los phyla principales, diferente al resto de ambientes hipersalinos, aunque más similar a la microbiota encontrada en el agua del mar y a la de los lagos salinos (Figura I.03). En un estudio más reciente León-Lorenzana y col. (2017) estudiaron el suelo del antiguo lago Texcoco, observaron que tras las inundaciones producidas, no sólo se modificaba la conductividad electrolítica, sino también la población

microbiana presente siendo el cambio más drástico la fuerte disminución de bacterias pertenecientes a la clase *Gammaproteobacteria*.

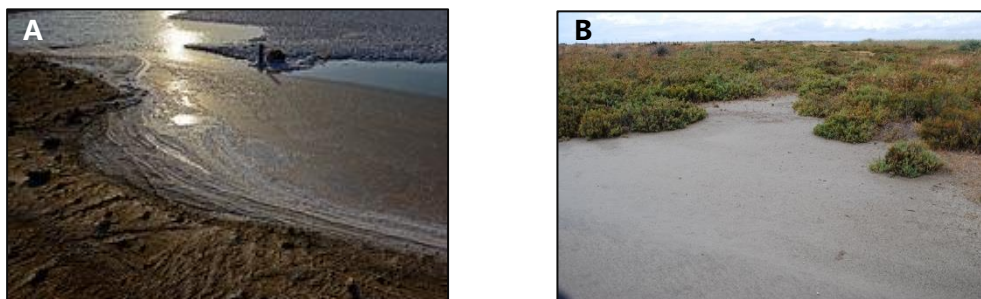


Figura I.03. Ejemplos de suelos salinos. A, desierto salino de El Gran Rann de Kutch (India); B, suelo salino de Isla Bacuta (Huelva).

I.1.2. Salinas solares

Dentro de los ambientes hipersalinos encontramos las salinas solares; éstas constituyen un excelente modelo para el estudio de la biodiversidad y ecología de microorganismos halófilos. Las salinas solares poseen a menudo un sistema de estanque múltiple para la producción de sal común, brindando así un amplio rango de salinidades, que van desde la concentración del agua del mar hasta la saturación de sales. Los sistemas de estanque múltiple se organizan mediante una serie de estanques con poca profundidad en los que el agua se transfiere periódicamente desde los estanques con menos salinidad (concentradores) a los estanques en los que precipita la sal (cristalizadores). La saturación de las diferentes sales por evaporación del agua provoca la precipitación secuencial de las sales: carbonato, yeso y halita. Por ello, la proporción relativa de sales en los estanques es inicialmente semejante a la del agua del mar pero varía a medida que van precipitando las diferentes sales (Rodríguez-Valera 1988; Ventosa y col., 2014). La densidad de la comunidad microbiana que se encuentra en las mismas es generalmente alta y las salinas son en su mayoría de fácil acceso (Litchfield y col., 1999; Oren, 1993).

Los estudios realizados en salinas solares son más numerosos en los estanques cristalizadores (Antón y col., 1999, 2000; Pašić y col., 2009; Khemili-Talbi y col., 2015; Di Meglio y col., 2016; Leboulanger y col., 2017),

siendo por tanto el conocimiento de los estanques con salinidades intermedias mucho más limitado. Esto ha despertado el interés de varios grupos de investigación por las poblaciones microbianas que habitan en estos ambientes por lo que cada vez son más los estudios realizados en estanques con salinidades intermedias (Ghai y col., 2011; Fernández y col., 2014a; 2014b; León y col., 2014; 2015; 2016; Aguirre-Garrido y col., 2016; Selvarajan y col., 2017), algunos de ellos realizados por nuestro grupo de investigación. Estos estudios han puesto de manifiesto una vez más que los microorganismos tradicionalmente aislados en cultivo puro no constituyen la microbiota predominante en dichos ambientes.

1.1.2.1. Salinas Bras del Port de Santa Pola, Alicante

Uno de los sistemas acuáticos salinos mejor estudiado desde el punto de vista microbiológico es la salina Bras del Port de Santa Pola (Alicante) (Figura I.04). El clima que predomina en esta zona es el mediterráneo, con una baja precipitación anual y unas temperaturas moderadas, con poca oscilación entre invierno y verano (Rodríguez-Valera y col., 1985). El agua de los estanques con altas salinidades presenta unos valores de pH más bajos y temperaturas máximas más elevadas, llegándose a alcanzar una diferencia de pH de una unidad, y de unos 10 °C de temperatura entre los estanques cristalizadores y aquellos con una salinidad inferior al 15 %. En estos estanques con bajas salinidades, la elevada actividad fotosintética provoca una reducción en la presión parcial de CO₂, aumentándose por tanto los valores de pH (Landry y Jaccard, 1984).

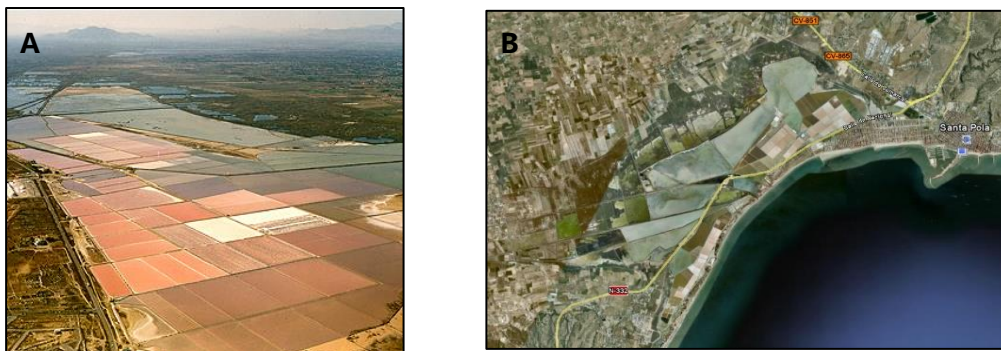


Figura I.04. Salina Bras del Port en Santa Pola, Alicante. A, fotografía aérea, B, imagen de la salina vía satélite.

Inicialmente en estas salinas se llevaron a cabo estudios basados en técnicas clásicas de cultivo de microorganismos, permitiendo la caracterización taxonómica de un gran número de géneros y especies tanto de arqueas como de bacterias halófilas (Rodríguez-Valera y col., 1985; Ventosa y col., 2014). A salinidades por encima del 15 % de sales totales casi todos los organismos eran presentes halófilos. En un rango entre el 15 y el 30 % de sales totales, las poblaciones del alga verde *Dunaliella* sp. se incrementan considerablemente, disminuyendo bruscamente en los estanques cristalizadores. Dentro de ese mismo rango de sales totales, predominan algunas especies halófilas moderadas y algunas arqueas de rápido crecimiento. Entre las especies de bacterias halófilas, los principales grupos taxonómicos aislados fueron los miembros de los géneros *Halomonas*, *Chromohalobacter* (Ventosa y col., 1989) y otros géneros relacionados de la familia *Halomonadaceae*. En cambio, los representantes del género *Salinivibrio* (Mellado y col., 1996), se aislaron con mayor frecuencia a concentraciones por debajo del 15 % de salinidad. Se observó que, en estanques con salinidades superiores al 30 % de sales, la diversidad bacteriana estaba enormemente reducida (Rodríguez-Valera y col., 1985). Otros géneros que incluyen bacterias halófilas aisladas de estas salinas son *Salinicoccus* (Ventosa y col., 1990) y *Salinibacter* (Antón y col., 2002).

Debido a la falta de información acerca de la ecología microbiana de estos ambientes, se llevaron a cabo estudios basados en técnicas moleculares de PCR, DGGE o FISH (Antón y col., 1999; Benlloch y col., 2001; 2002;

Casamayor y col., 2002a; Burns y col., 2007). Estos estudios concuerdan con la afirmación de que los estudios de biodiversidad basados en las técnicas tradicionales de cultivo permiten aislar menos del 1 % de las especies microbianas presentes en el ambiente (Amann y col., 1995) y por tanto, no representan la microbiota predominante en dichos hábitats.. En general se observó como el incremento en la salinidad daba lugar a una reducción progresiva en la abundancia de los grupos de eucariotas, a la vez que un incremento en la biomasa de microorganismos procariotas (Ventosa y col., 2014).

Los primeros estudios metagenómicos llevados a cabo en esta salina se centraron en los estanques cristalizadores. Estos estudios, junto con otros estudios moleculares no dependientes de cultivo realizados en estas salinas, han puesto de manifiesto que una gran parte de la microbiota presente en las mismas no se corresponde con las especies aisladas y caracterizadas hasta la fecha. Sin embargo, la biomasa presente en estos estanques es muy elevada, alcanzando 10^8 células ml^{-1} (Díez y col., 2000). Por otro lado, el análisis de estos metagenomas ha puesto de manifiesto que la diversidad microbiana disminuye a lo largo del gradiente de salinidad (Ghai y col., 2011; Fernández y col., 2014a; 2014b).

Hasta hace poco, el conocimiento que se tiene sobre los estanques de salinidades intermedias era mucho menor. Estudios realizados con cultivos puros mostraron que en estos estanques con salinidades intermedias existe una amplia gama de microorganismos halófilos pertenecientes principalmente al phylum *Proteobacteria* y a la clase *Halobacteria* (Rodríguez-Valera y col., 1985). Los representantes del género *Vibrio* (actuales representantes del género *Salinivibrio*) se aislaron con más frecuencia a partir de estanques con concentraciones por debajo del 15 % de salinidad (Rodríguez-Valera y col., 1985), pero éstos se encontraban en una baja presencia a pesar de ser comúnmente aislados en cultivo puro en el laboratorio (Arahal y col., 2001; Arenas y col., 2009). Los análisis detallados de las bases de datos metagenómicas, han permitido realizar el ensamblaje de *contigs* y determinar con mayor exactitud las características de los

microorganismos presentes en dichos ambientes salinos. Se observó que, un grupo de *Gammaproteobacteria* muy abundante en estanques de salinidades intermedias, estaba relacionado filogenéticamente con especies del género *Alkalilimnicola*, *Arhodomonas* y *Nitrococcus* y que no había sido aislado en cultivo puro anteriormente. Gracias a estos estudios metagenómicos, Leon y col. (2014) diseñaron medios y condiciones de cultivo consiguiendo el aislamiento de la bacteria halófila moderada *Spiribacter salinus*. Un año más tarde, el grupo de Dres. Copa-Patiño y Soliveri (Universidad de Alcalá de Henares) consiguieron aislar una segunda cepa de este género *Spiribacter curvatus* (León y col., 2015).

1.1.2.2. Salina de Isla Cristina, Huelva

La salina de Isla Cristina fue construida en 1955 sobre los humedales en las marismas del río Carreras, en la localidad de Isla Cristina (Huelva), localizada cerca de industrias de procesamiento de alimentos (Figura I.05). Se encuentra sometida a temporadas de lluvia, a una alta radiación solar y a altas fluctuaciones de temperatura entre el día y la noche (Moreno y col., 2009). A partir de esta salina se han aislado y caracterizado diversas especies bacterianas y de arqueas (Mota y col., 1997; Moreno y col., 2010), como son el caso de las bacterias halófilas *Spiribacter salinus* (León y col., 2014), *Idiomarina aquatica* (León y col., 2015) y *Spiribacter roseus* (León y col., 2016), aisladas por nuestro grupo de investigación.

Por otro lado, mediante técnicas metagenómicas se ha analizado la diversidad taxonómica existente en la columna de agua de un estanque con un 21 % de salinidad de esta salina solar, designado como IC21 (Fernández y col., 2014b). En este estudio, se observó que los géneros bacterianos predominantes eran *Psychroflexus*, *Owenweeksia*, *Gracilimonas*, *Spiribacter* y *Salinibacter*; y en cuanto al phylum *Euryarchaeota* se encontraron muy representados los géneros *Halorubrum*, *Haloquadratum* y *Natronomonas*.

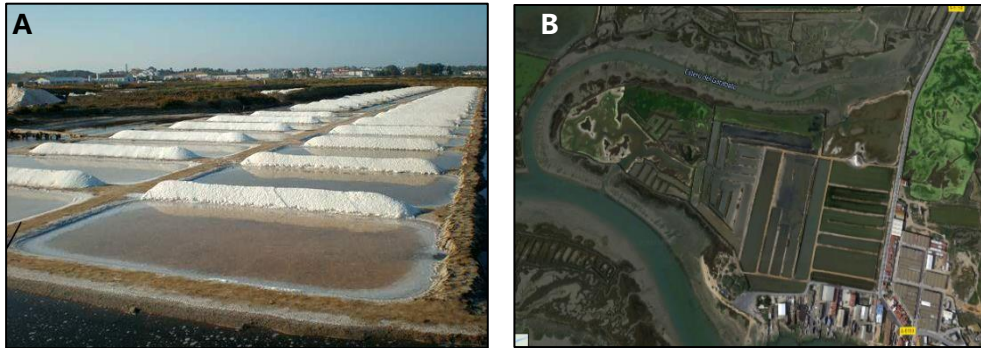


Figura I.05. Salinas de Isla Cristina (Huelva). Estanques (A) y vista aérea (B) de las salinas.

1.1.2.3. Salinas Aragonesas y Salinas de Isla Bacuta, Huelva

Dentro del paraje Natural Marismas del Odiel, se encuentran las salinas industriales Aragonesas y las salinas de Isla Bacuta. Ambas salinas de litoral, fueron resultado de la transformación de la marisma para su dedicación a la extracción de sal a partir de agua de mar (Figura I.06). El grado de transformación de estas salinas ha producido numerosos efectos secundarios sobre el ecosistema. La creación de grandes balsas mediante la construcción de muros ha generado elevaciones artificiales que han afectado a determinadas especies, ha alterado la cubierta vegetal y ha redistribuido la fauna (Morón, 2011). Por otro lado, estas salinas industriales se han transformado en un espacio de gran importancia para la alimentación de determinadas aves como los flamencos (Harmer, 1913). A partir de las salinas de Isla Bacuta se han aislado y caracterizado algunas especies microbianas como la bacteria halófila *Larsenimonas salina* y la arquea *Halovenus salina*, ambas aisladas por nuestro grupo de investigación (Leon y col., 2014; Infante-Dominguez y col., 2015).

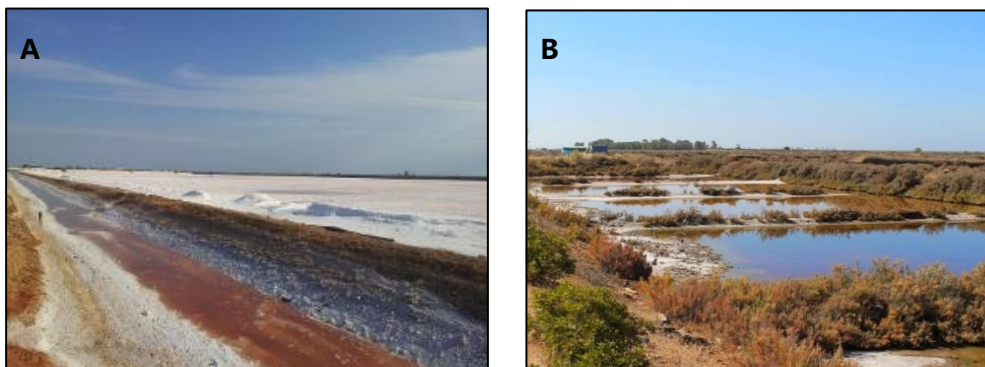


Figura I.06. A, salinas Aragonesas (Huelva); B, salinas de Isla Bacuta (Huelva).

1.1.2.4. Salinas Es Trenc, Mallorca

Las “Salinas de Levante” se ubican en el sureste de Mallorca. Es un espacio natural cuyo suelo fue calificado como no urbanizable en 1991 por la Ley de Espacios Naturales (LEN). Dentro de las “Salinas de Levante” se encuentra la zona de Trenc-Salobrar, donde se sitúan un conjunto de estanques (sistema de estanques múltiples) construidos artificialmente y dedicados actualmente a la obtención de sal. Estos estanques se encuentran conectados mediante un canal de agua procedente de la playa Es Trenc (Figura I.07). En 2015 Mirete y col., realizaron una búsqueda de genes en comunidades microbianas presentes en las rizosfera y salmuera de las salinas de Es Trenc.

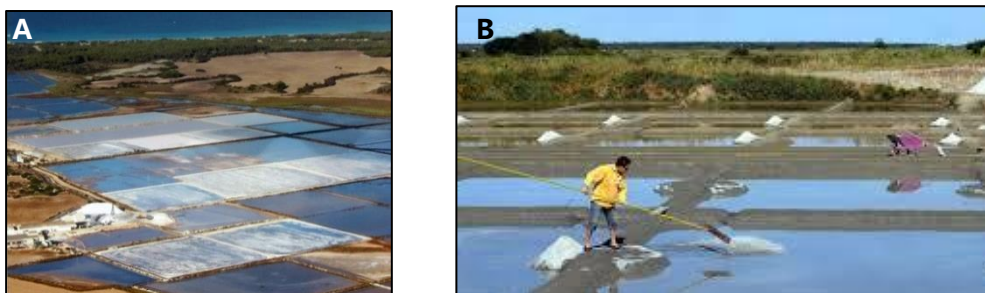


Figura I.07. Salinas Es Trenc (Mallorca). Vista aérea (A) y estanques (B) de las salinas.

1.1.2.5. Salinas de La Malahá, Granada

Estas salinas, de origen atalasalino, eran explotadas desde la época de los romanos y se encuentran en la llanura de El Temple, en el pueblo de La Malahá (Figura I.08). Su nombre proviene del árabe *al-mallaha*, que significa "alquería de la sal". Estas salinas de interior se caracterizan por poseer un alto contenido en cloruros y sulfatos. La presencia de estas sales se debe a fenómenos de precipitación por evaporación y desecación. La redisolución de las sales al entrar en contacto con las aguas subterráneas da lugar a manantiales y mantos freáticos salinos que pueden ser aprovechados para la obtención industrial de sal (Fernández-Palacios y col., 2004).

Esta salina se abastece de agua procedente de tres manantiales, dos de ellos subterráneos y un tercero que aflora en superficie cerca del río Salado, formando una balsa. El agua pasa a través de una conducción subterránea desde los manantiales hasta el depósito de forma mecánica y desde allí es elevada mediante un motor hasta los decantadores, donde se acumula el agua durante los meses de invierno y por decantación los sedimentos se depositan en el fondo, quedando el agua limpia para extraer a partir de ella las sales. Hasta la fecha solo se ha conseguido describir una bacteria halófila de esta salina, *Alkalibacillus almallahensis* aislada por Pérez-Davó y col. (2014).



Figura I.08. Salinas de La Malahá en Granada (estanques).

1.1.2.6. Salinas de Bufadero y salinas de Arinaga, Gran Canaria

Las salinas del Bufadero se localizan en el norte de la isla en la zona de Bañaderos, municipio de Arucas, Gran Canaria (Figura I.09); datan probablemente del S. XVII y forman parte de un conjunto de seis salinas ubicadas en este litoral. Son un ejemplo de una actividad económica tradicional muy antigua, aunque en la actualidad estas salinas se encuentra prácticamente en desuso (Rodríguez, 2003).

Están sobre una amplia y escalonada plataforma lávica, y en ella se produce un doble sistema cristalizador: los estanques de captación o condensadores en el nivel inferior y los cristalizadores, denominados maretas, en el nivel superior. Los condensadores se localizan muy cerca de la orilla para que en la pleamar las olas lleguen a ellos. Aquí, aparte de captar el agua, ésta se va saturando. El agua, ya más concentrada en sales se traslada desde los condensadores hasta la maretas donde se produce la cristalización de la sal. Su superficie es de unos 1800 m², aunque en los últimos años han perdido el 30 % de las maretas por efecto de las lluvias y la falta de mantenimiento.

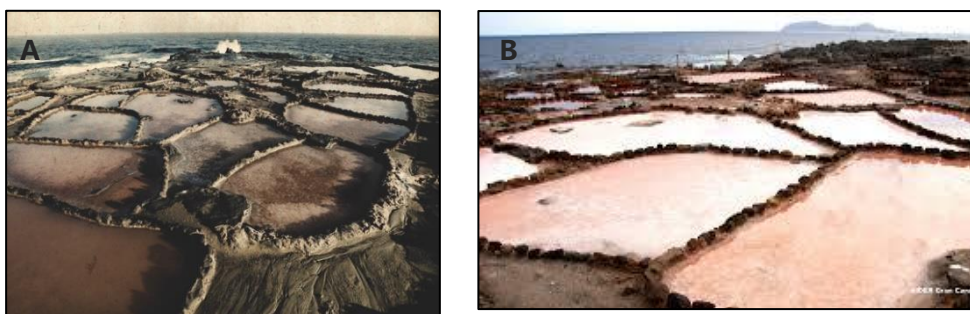


Figura I.09. Estanques (A) y condensadores (B) de las Salinas de Bufadero

En cambio, en el sureste de la isla, se encuentran las salinas industriales de Arinaga (Figura I.10), construidas hacia 1820. La mitad sur de la salina está en explotación mientras que la mitad norte solo anegada. Declaradas Bien de Interés Cultural, constituyen un magnifico recurso para la obtención de sal en la isla. Su construcción se basa en un conjunto de estanques múltiples interconectados por canales (Rodríguez, 2003).

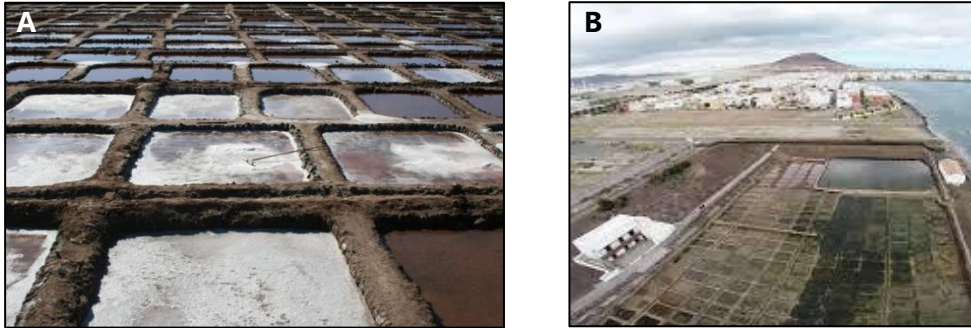


Figura I.10. Salinas de Arigana. Estanques (A) y vista aérea (B) de las salinas.

1.1.2.7. Salinas de Cabo Rojo, Puerto Rico

Al suroeste de la isla de Puerto Rico se sitúan las salinas de Cabo Rojo (Figura I.11). Éstas están compuestas de un estuario que alimenta a una serie de estanques artificiales con agua de mar. El clima en esta zona es tropical sujeto a cambios estacionales extremos durante las estaciones secas y lluviosas. La alta radiación solar y la escasez de lluvia durante casi todo el año promueven la formación de ambientes hipersalinos, en especial durante el periodo seco (entre diciembre y marzo) (González-Miranda, 2006).

Debido a que estas salinas funcionan mediante un sistema de estanques múltiples, a medida que el agua entrante va pasando de un estanque a otro aumenta su salinidad y por consiguiente, disminuye el oxígeno. El análisis fisicoquímico de estos estanques indica una gran concentración de nutrientes limitantes como el fósforo y el nitrógeno. La presencia de NO_3^- podría resultar de la actividad nitrificante y las bajas concentraciones de sulfato en la columna de agua son posiblemente debido a la precipitación de BaSO_4 y $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Los minerales más abundantes en esta zona son cuarzo, feldespato y carbonatos de calcio (Caborrojeños Pro Salud y Ambiente Inc, 2009). A partir de estas salinas se han aislado y caracterizado algunas arqueas como *Halogeometrium boriquense* (Montalvo-Rodríguez y col., 1998) y *Haloterrigena thermotolerans* (Montalvo-Rodríguez y col., 2000).

Recientemente se han aislado dos nuevas cepas, cuyo genoma ha sido secuenciado, que posiblemente constituyen nuevas especies de los géneros

Halorubrum (Sánchez-Nieves y col., 2016a) y *Haloarcula* (Sánchez-Nieves y col., 2016b).

Cercano a las salinas de Cabo Rojo se encuentra el manglar negro *Avicennia germinans*, el cual ha desarrollado mecanismos para tolerar altas concentraciones de sales, obtener oxígeno a partir de sedimentos casi anóxicos y reproducirse bajo condiciones ambientes severas (Soto-Ramírez y col., 2008). De este “manglar negro” se han aislado algunas bacterias halófilas como *Halomonas avicenniae* (Soto-Ramírez y col., 2007), *Halobacillus mangrovi* (Soto-Ramírez y col., 2008) y *Kushneria aurantia*, perteneciente a la familia *Halomonadaceae* (Sánchez-Porro y col., 2009).

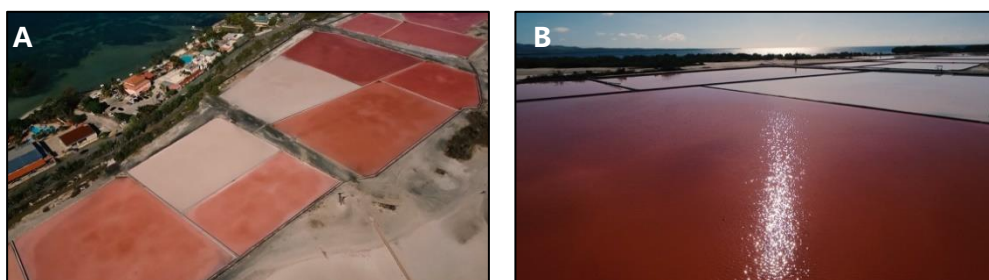


Figura I.11. Salinas de Cabo Rojo (Puerto Rico). Vista aérea de las salinas (A) y estanques (B) de las salinas.

I.2. MICROORGANISMOS HALÓFILOS

Los microorganismos halófilos, del griego “hals” (sal) y “phil” (amigo, amante), son aquellos que necesitan para su crecimiento NaCl por encima de los valores normales, pudiendo sobrevivir y proliferar en los anteriormente nombrados ambientes hipersalinos (de la Haba y col., 2011). Puesto que las sales forman parte de la composición química de cualquier organismo y son un nutriente esencial, es importante recalcar el matiz de “por encima de los valores normales”, ya que de otra forma cualquier organismo vivo podría ser considerado como halófilo hasta cierto punto. De hecho, sólo un reducido grupo de organismos (comparado con la diversidad biológica total) es calificado como halófilo. Asimismo, se han descrito

microorganismos, a los que se les denominan halotolerantes, que toleran la sal a concentraciones elevadas (Kushner, 1978).

El concepto de "halófilo" y "halotolerante", así como las relaciones de los distintos microorganismos con la sal han sido interpretados de diferente manera por distintos autores, de tal modo que se han propuesto varias clasificaciones (Trüper y Galinski, 1986; Vreeland, 1987; Ramos-Cormenzana, 1989). Una de las mejores aceptadas es la propuesta en 1988 por Kushner y Kamekura, que definieron varias categorías de microorganismos en base a la concentración de NaCl requerida para su crecimiento óptimo:

- No halófilos: crecen óptimamente en medios con menos del 1 % (aprox. 0,2 M) de NaCl. Algunos pueden tolerar elevadas concentraciones de sal y se les denomina halotolerantes. Si toleran una concentración de NaCl superior al 15 % (aprox. 2,5 M) se denominan microorganismos halotolerantes extremos.
- Halófilos débiles (microorganismos marinos): tienen su crecimiento óptimo en medios que contienen del 1 al 3 % (aprox. 0,2-0,5 M) de NaCl.
- Halófilos moderados: presentan un crecimiento óptimo en medios con 3-15 % (aprox. 0,5 a 2,5 M) de NaCl.
- Halófilos extremos: con crecimiento óptimo en medios que contienen del 15 al 32 % (saturación) (aprox. 2,5-5,2 M) de NaCl.

Es importante señalar que, en los marcos ajenos a la comunidad científica especializada en el estudio de microorganismos halófilos, los distintos términos "haloderivados" (por ejemplo, halotolerante, halófilo, haloresistente, etc.) son utilizados indistintamente para definir organismos que muestran un comportamiento halófilo muy débil que, sin embargo, ayuda a diferenciarlos de otras especies filogenéticamente relacionadas. Este uso inapropiado de la terminología puede dar lugar a numerosas confusiones, de tal forma que si se realiza una búsqueda en las bases de datos bibliográficas probablemente se obtendrían muchos resultados no deseados (Ventosa y Arahal, 2002a; Fernández y col., 2012).

Los microorganismos halófilos moderados y los halófilos extremos son los más abundantes en los ambientes hipersalinos, especialmente cuando la salinidad supera el 10 % de NaCl. A concentraciones intermedias (entre el 10-20 %) predominan las bacterias halófilas moderadas, mientras que, en ambientes con salinidades superiores al 20%, abundan los halófilos extremos (haloarqueas y bacterias) (Rodríguez-Valera y col., 1985; Rodríguez-Valera, 1988; Benlloch y col., 2002; Ventosa, 2006; Ghai y col., 2011; Fernández y col., 2014a; 2014b; Ventosa y col., 2014; 2015).

Es interesante destacar el gran potencial biotecnológico que poseen los microorganismos halófilos, presentando incluso una serie de ventajas adicionales en relación a su manipulación genética, como, por ejemplo, su facilidad de cultivo y mantenimiento en el laboratorio bajo unas condiciones asépticas que se ven reducidas al máximo (Ventosa y Nieto, 1995). Algunas de sus aplicaciones de mayor interés son la producción de bacteriorrodopsinas, bioplásticos o enzimas, su uso en la degradación de productos tóxicos en ambientes hipersalinos, o en la detección de determinados tipos de cáncer (Mellado y Ventosa, 2003; Oren, 2010; Raveendran y col., 2015; Sarvari y col., 2015; Cheewinhamrongrod y col., 2016; Maes y Verschaeve, 2016; Dumorné y col., 2017).

I.2.1. Taxonomía de bacterias halófilas

En la década de los años 70, Carl Woese y col. propusieron la clasificación de los organismos vivos en tres dominios: *Archaea* (incluyendo a las denominadas entonces como "arqueobacterias"), *Bacteria* (que agrupaba a las conocidas entonces como "eubacterias") y *Eukarya* (que englobaba a todos los seres eucariotas), basándose en la utilización de la subunidad menor del ARN ribosómico como marcador filogenético (Woese, 1987; Woese y col., 1990). Estos tres dominios se desarrollaron a partir de un hipotético ancestro común (Penny y Poole, 1999), que es la raíz del árbol universal de la vida (Figura I.12).

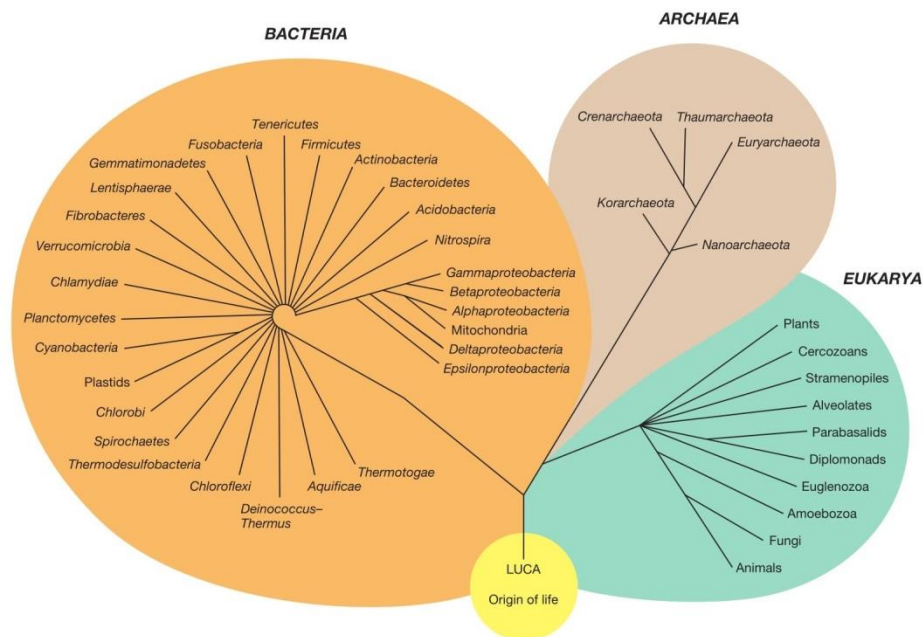


Figura I.12. Árbol filogenético universal determinado por la comparación de secuencias de la subunidad menor del ARN ribosómico. Dentro de cada dominio sólo se muestran algunos organismos clave de cada linaje. De los tres dominios, dos (*Bacteria* y *Archaea*) contienen sólo representantes procariotas. La flecha indica la raíz hipotética del árbol y representa la posición del antecesor común de todas las células (Madigan y col., 2015).

Los organismos procariotas se encuadran dentro de los dominios *Archaea* y *Bacteria*, si bien se ha demostrado que los organismos que constituyen el dominio *Archaea* están más estrechamente relacionados con el dominio *Eukarya*, que con el dominio *Bacteria* (Madigan y col., 2015). Aunque ésta es la clasificación más aceptada, en estos últimos años ha habido estudios que proponen la clasificación de los microorganismos en dos dominios, *Arqueas* y *Bacterias*, y apoya la hipótesis de que las *Arqueas* participaron en orígenes eucariotas (Williams y col., 2014). Estudios de Raymann y col. en 2015 proponen que los *Eukarya* están asociados a varios phyla de *Arqueas*, desafiando la topología tradicional del árbol de arqueas.

En los ambientes hipersalinos se encuentran representantes pertenecientes a los tres dominios de la vida (Ventosa, 2006; de la Haba y col., 2010; McGenity y Oren, 2012). Clásicamente se han diferenciado dos grupos de microorganismos halófilos como habitantes de los ambientes hipersalinos:

las arqueas aerobias halófilas extremas (denominadas haloarqueas) y las bacterias halófilas moderadas. Sin embargo, actualmente sabemos que las arqueas halófilas no sólo están representadas por haloarqueas y que no todas las especies de haloarqueas pueden ser consideradas halófilas extremas, dado que algunas pueden crecer a concentraciones de NaCl más bajas de las descritas para los microorganismos halófilos extremos (Purdy y col., 2004) y por tanto deberían ser consideradas halófilas moderadas. Por otro lado, las bacterias halófilas presentes en los ambientes hipersalinos están representadas por un gran número de especies pertenecientes a una gran variedad de grupos filogenéticos, lo que refleja la amplia variedad metabólica de los representantes de este grupo. Aunque clásicamente han sido consideradas como halófilas moderadas, algunas bacterias se han descrito como especies halófilas extremas (Selvarajan y col, 2017).

Nuestro trabajo se centra en un género dentro del dominio *Bacteria* por lo que nos centraremos sólo en este dominio; revisando brevemente su taxonomía, mecanismos de adaptación, aplicaciones biotecnológicas y ecología de bacterias halófilas presentes en los ambientes hipersalinos.

En el dominio *Bacteria* encontramos representantes halófilos moderados y extremos pertenecientes a una amplia variedad de taxones. Existe un gran número de especies de bacterias halófilas moderadas y halófilas extremas cuyos nombres han sido válidamente publicados; la mayor parte de ellas se han aislado de ambientes hipersalinos (lagos, salinas solares, suelos salinos) así como de productos salados (de la Haba y col., 2011). Filogenéticamente se han descrito bacterias halófilas pertenecientes al menos a 8 phyla: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* y *Thermotogae*, siendo los phyla con un mayor número de representantes halófilos *Proteobacteria* (*Gamma-* y *Alphaproteobacteria*), *Firmicutes* y *Actinobacteria* (de la Haba y col., 2011).

Las bacterias halófilas constituyen un grupo muy heterogéneo de microorganismos con diferentes actividades metabólicas, composición de la pared celular, morfología, respiración (desde aerobias hasta anaerobias estrictas) y metabolismo (desde fotótrofas a heterótrofas) (Oren, 2002;

Ventosa, 2006; de la Haba y col., 2011). La mayoría de ellas son halófilas moderadas que crecen mejor a salinidades inferiores a las haloarqueas y son organismos predominantes en ambientes con salinidades intermedias (10-20 % de NaCl). En general, son bacterias quimioorganotrofas, a excepción de algunas fototrofas (Ventosa, 1988; 1993; 1994; Ventosa y col., 1998b; Pedrós-Alió y col., 2000; Oren, 2002a; 2002b; Srinivas y col., 2007; Gorlenko y col., 2009; de la Haba y col., 2010; 2011). No obstante, algunas bacterias tienen requerimientos y tolerancia a la sal que recuerdan a las arqueas halófilas de la familia *Halobacteriaceae*, es el caso de la bacteria halófila extrema *Salinibacter ruber* (Antón y col., 2000), aislada inicialmente de los cristalizadores de salinas de Alicante y Mallorca y que ha sido estudiada en profundidad (Antón y col., 2000; 2002; 2008; Bidle y col., 2005; Corcelli y col., 2004; González-Torres y col., 2015; Peña y col., 2010; Oren, 2002a; 2013; Talon y col., 2014; Viver y col., 2015).

Gracias a los estudios detallados de las bases de datos metagenómicas, se observaron un grupo de gammaproteobacterias muy abundantes en estanques con salinidades intermedias, relacionados filogenéticamente con especies de los géneros *Alkalilimnicola*, *Arhodomonas* y *Nitrococcus* y que no había sido aislado en cultivo puro anteriormente. Gracias a estos estudios se han podido diseñar medios y condiciones de cultivo que posibilitaran su aislamiento. Finalmente, se consiguió aislar una cepa perteneciente a un nuevo género y especie de la familia *Ectothiorhodospiraceae*, a la que se le denominó *Spiribacter salinus* (León y col., 2014), siendo ésta la primera bacteria halófila moderada definida ecológicamente que constituye un excelente modelo para el estudio de microorganismos halófilos debido a su abundancia en sistemas acuáticos hipersalinos. Un año después, se consiguió aislar una segunda especie de este nuevo género, *Spiribacter curvatus* (Leon y col., 2015) y en 2016 se aisló una tercera especie denominada *Spiribacter roseus* (León y col.).

1.2.2. Mecanismos de osmoadaptación de bacterias halófilas

El denominador común de los microorganismos halófilos es el requerimiento de sales para crecer óptimamente, siendo este requerimiento

variable entre las distintas especies, e incluso puede variar para una misma especie en función de determinadas condiciones de cultivo, como la temperatura (Post, 1977) o la concentración de nutrientes presentes en el medio (Forsyth y Kushner, 1970). Aunque el NaCl es la principal sal presente en ambientes hipersalinos, no todos los microorganismos halófilos requieren su presencia y algunas especies necesitan otras sales, no solo NaCl (Arahal y col., 2007). Por otro lado, determinados microorganismos necesitan iones específicos para su crecimiento, como el Na⁺ (Sánchez-Porro y col., 2009), el Mg²⁺ (Valderrama y col., 1991) o el Cl⁻ (Müller y Oren, 2003).

La vida a altas concentraciones de sales implica tener que tolerar varios tipos de estrés, entre ellos la baja actividad del agua, produciendo como consecuencia, la inhibición de numerosos procesos biológicos. Por tanto, es necesaria una adaptación en el interior de la célula, ya que el microorganismo tiene que balancear la presión osmótica del citoplasma con respecto a la presión externa. A pesar de la existencia de canales de agua (acuaporinas) presentes en la mayoría de los microorganismos, hay que tener en cuenta que ninguna célula bacteriana puede bombear agua activamente a través de la membrana plasmática para compensar la entrada y salida de agua que se produce como consecuencia de los cambios de osmolaridad en el medio externo. Debido a ello, los microorganismos tienen que equilibrar el gradiente osmótico a través de su membrana citoplasmática indirectamente, influyendo en el potencial osmótico del citoplasma para dirigir el flujo de agua hacia afuera o hacia dentro de la célula. De esta forma, cuando se encuentran en condiciones hiperosmóticas acumulan iones y solutos compatibles, atrayendo consigo agua, previniendo así la deshidratación celular, expulsando rápidamente estos compuestos a través de los canales mecanosensibles para evitar la ruptura celular cuando la osmolaridad cae repentinamente (Booth y Louis, 1999; Wood, 2011).

Se han realizado numerosos estudios sobre los mecanismos de osmoadaptación utilizando como organismos modelos bacterias halófilas moderadas. En el caso de Zhu y col. (2008) utilizaron la bacteria *Salinivibrio costicola* subsp. *yaniae*; Müller y Köcher, (2011) investigaron la bacteria

Halobacillus halophilus; Pastor y col. (2013) emplearon la bacteria *Chromohalobacter salexigens*; Ferreira y col. (2016) estudiaron las bacterias *Gimesia maris* y *Rubinisphaera brasiliensis* y Kindzierski y col. (2017) usaron la bacteria *Halomonas elongata*.

Existen dos tipos de estrategias que permiten controlar la concentración en el citoplasma de las moléculas osmóticamente activas. Una primera estrategia sería la conocida como **salt-in**, que consiste en la acumulación de sales orgánicas (principalmente KCl) en el citoplasma con el fin de compensar el estrés osmótico del medio y así mantener el balance de presión (Larsen, 1986; Tindall, 1988; Gilmour, 1990; Galinski y Trüper, 1994; Galinski, 1995; Oren y col., 2002; Deole y col., 2013). Esta estrategia requiere una adaptación de la maquinaria enzimática intracelular y de los componentes estructurales intracelulares, como las proteínas, las cuales tienen que mantener su conformación y actividad a concentraciones de sales muy elevadas. El proteoma de estos microorganismos se caracteriza por ser muy ácido. De esta forma, las proteínas producidas por estos microorganismos poseen en su superficie una mayor cantidad de aminoácidos con carácter ácido con el fin de neutralizar las cargas positivas (Lanyi, 1974; Eisenberg y Watchel, 1987; Danson y Hough, 1997; Oren, 2013; Vaclare y col., 2015). Por otro lado, las membranas celulares de estos microorganismos sufren una serie de cambios en su composición lipídica, aumentando su proporción de lípidos aniónicos, tales como fosfatidilglicerol y/o glicolípidos, y disminuyendo la de fosfatidiletanolamina, lo que se traduce en un aumento de moléculas cargadas negativamente (Russell y Kogut, 1985; Russell, 1989; Sutton y col., 1991).

Esta estrategia es la que han adoptado típicamente haloarqueas (Oren, 1999), aunque también se ha descrito para la bacteria halófila extrema *Salinibacter ruber* (Antón y col., 2002), así como para una serie de bacterias halófilas moderadas Gram positivas, acetogénicas y sulfato reductoras, del orden *Halanaerobiales* (Galinski, 1995; Oren 1999).

El inconveniente que presenta este mecanismo es que, a pesar de su eficacia, es muy poco flexible, por lo que los microorganismos que la han adoptado poseen un margen relativamente pequeño de adaptación a diferentes osmolaridades del medio externo (Galinski y Trüper, 1994). A consecuencia de ello, la mayoría de las veces no sobreviven en ausencia o a bajas concentraciones de sales (Oren, 2008).

Una segunda estrategia es la denominada como ***salt-out***, la cual consiste en mantener el citoplasma libre de NaCl en una gran proporción, acumulando grandes cantidades de compuestos orgánicos específicos, que actúan como osmolitos para equilibrar la presión osmótica externa. Se trata de moléculas de bajo peso molecular, muy solubles y generalmente de carga neutra denominados solutos compatibles, ya que no interfieren con el metabolismo celular (Brown, 1976), y pueden acumularse hasta alcanzar concentraciones muy elevadas, del orden de 1 mol/kg de agua, éstos son captados del medio externo o bien sintetizado por ellos mismo, esto segundo ocurre cuando se cultiva en un medio mínimo. Además, poseen unas propiedades físico-químicas que las hacen compatibles con la bioquímica y la fisiología de las células (Wood, 2011). Algunos de estos solutos orgánicos son la glicina betaína, la ectoína, la hidroxietoína y otros derivados de aminoácidos, azúcares y alcoholes (Cánovas y col., 1996; Ventosa y Arahál, 2002a; Vargas y col., 2004; Empadinhas y da Costa, 2008; Oren, 2010a; López-Pérez y col., 2013; Widderich y col., 2014).

En el caso de esta estrategia no es necesario que las proteínas y los orgánulos estén especialmente adaptados, permitiendo que las enzimas funcionen de forma eficaz. Por dicha razón, ésta es la estrategia utilizada por la mayoría de los procariontes, destacando las bacterias halófilas moderadas y marinas, las halotolerantes, algunas arqueas metanógenas halófilas moderadas, e incluso algas, levaduras, hongos, plantas y células humanas (Bremer y Krämer, 2000; Welsh, 2000; Roberts, 2004). De hecho, la naturaleza de dichos solutos compatibles está evolutivamente bien conservada en los tres dominios de la naturaleza (Yancey, 1994).

Una de las ventajas de este tipo de adaptación es que el nivel de solutos compatibles que se acumula es dependiente de la osmolalidad del medio (Galinski, 1995; Kempf y Bremer, 1998), lo que permite que las células no sólo puedan vivir en elevadas concentraciones salinas (medio hiperosmótico), sino también en concentraciones muy inferiores, ya que este mecanismo les permite adaptarse a las fluctuaciones de la presión osmótica externa simplemente ajustando la concentración interna de solutos compatibles a cada osmolalidad externa en particular (Kempf y Bremer, 1998).

Los genes implicados en el mecanismo de osmoregulación de algunos microorganismos halófilos han sido estudiados en profundidad, como es el caso de las bacterias halófilas moderadas *Halobacillus halophilus*, *Halomonas elongata*, *Halomonas boliviensis* y *Chromohalobacter salexigens* (Rodríguez-Moya y col., 2010; Köcher y col., 2011; Schwibbert y col., 2011; Reina-Bueno y col., 2012; Saum y col., 2012 Hänel y col., 2013 Shiyan y col., 2014; Salvador y col., 2015; García-Torreiro y col.: 2016; 2017; Kindzierski y col., 2017; Salar-García y col., 2017).

I.2.3. Aplicaciones biotecnológicas y clínicas de bacterias halófilas

Los microorganismos halófilos tienen un inmenso potencial biotecnológico, aunque en contraste con los microorganismos termófilos u otros extremófilos, su uso se está llevando a cabo de forma muy limitada en procesos industriales, por lo que se requieren estudios en mayor profundidad para explotar todas sus capacidades.

Las bacterias halófilas moderadas tienen un enorme potencial biotecnológico en numerosas áreas, favorecido también por una serie de ventajas como son su facilidad de cultivo y mantenimiento en el laboratorio, su capacidad para crecer en un amplio rango de concentraciones salinas, su difícil contaminación en medios de elevada salinidad y su fácil manipulación genética (Ventosa y Nieto, 1995). Entre sus principales aplicaciones están su uso en procesos de biorremediación y de extracción de petróleo, en la

elaboración de encurtidos, en la fermentación de productos alimenticios (como la salsa de soja o aceitunas de mesa) y fundamentalmente, en la producción de compuestos de interés industrial, como solutos compatibles (que son usados en la industria cosmética y como estabilizadores de enzimas entre otras cosas), exopolisacáridos, enzimas extracelulares (amilasas, proteasas, lipasas, nucleasas, etc.), carotenoides, antifúngicos, biocombustibles o compuestos antimicrobianos y anticancerígenos (Barnard y col., 2010; Oren, 2010b; Pastor y col., 2010; Abriouel y col., 2011; Pérez y col., 2011; Yoo y col., 2011; Oliveira y col., 2015 Raveendran y col., 2015; Sarvari y col., 2015; Cheewinhamrongrod y col., 2016; Maes y Verschaeve, 2016; Dumorné y col., 2017). Dentro del grupo de los solutos compatibles, destaca el uso de la ectoína; entre sus diversos fines se encuentra el uso de este soluto compatible como tratamiento adecuado para la dermatitis atópica (Marini y col., 2014); también contra la rinitis alérgica (Werkhäuser y col., 2014; Eichel col., 2014). También y gracias a su capacidad para estabilizar proteínas e impedir la formación de agregados proteicos, puede ser capaz de prevenir ciertas enfermedades o proteger a la piel frente a las radiaciones dañinas (Pastor y col., 2010; Beblo-Vranesevic y col., 2017; Salar-García y col., 2017).

1.2.4. Ecología y biodiversidad de bacterias halófilas

En los últimos años, son numerosos los avances en el estudio de la ecología microbiana de los microorganismos halófilos. A pesar de ello, los métodos tradicionales de cultivo no han conseguido obtener en cultivo puro los microorganismos más relevantes de los diferentes ambientes naturales, puestos de manifiesto mediante técnicas independientes de cultivo, conduciendo por tanto, al aislamiento de numerosas especies de rápido y fácil crecimiento, pertenecientes a taxones que en muchos casos no constituyen la población microbiana predominante en dichos ambientes. Existe un vacío entre los estudios de diversidad basados en técnicas dependientes de cultivo y aquellos basados en técnicas no dependientes de cultivo, especialmente en el caso de microorganismos oligotrofos de lento y

difícil crecimiento (Ghai y col., 2011; Fernández y col., 2014a; 2014b; León y col., 2014).

En el trabajo llevado a cabo por Ghai y col. (2011), se pudo corroborar que los estudios de biodiversidad basados en técnicas dependientes de cultivo no reflejan la realidad de las poblaciones microbianas que habitan en un ambiente determinado. En dicho trabajo, se secuenciaron varios metagenomas a partir de estanques con distintas salinidades (19 % y 37 %) de una salina solar mediante pirosecuenciación 454. Los datos obtenidos, mostraron que bacterias halófilas moderadas de fácil aislamiento y obtenidas en cultivo puro en el laboratorio, como las pertenecientes a los generos *Halomonas* y *Salinivibrio*, no constituyen un porcentaje relevante de la comunidad microbiana allí presente. En cambio la bacteria halófila moderada *Spiribacter salinus* a pesar de ser un microorganismo de difícil aislamiento y crecimiento, ha demostrado ser una de las microbiotas dominantes en ambientes hipersalinos intermedios (López-Pérez y col., 2013; León y col., 2014).

Otros estudios metagenómicos más recientes, acerca de la biodiversidad en ambientes hipersalinos, son los realizados en salinas de Argentina (Di Meglio y col., 2016) en Salar de Uyuni, Bolivia (Haferburg y col., 2017) o en Heard Island (Allen y Cavacchioli, 2017).

Por tanto, los métodos tradicionales de laboratorio empleados para la clasificación de los microorganismos halófilos deberían ser complementados con una clasificación más realista basada en una distribución ecológica, con la finalidad de intentar aislar aquellas especies dominantes en un determinado ambiente. Por tanto, los microorganismos predominantes en esos ambientes ecológicos, necesitan ser estudiados en el laboratorio para conocer y entender los mecanismos que rigen el comportamiento de un ecosistema y las interacciones entre sus componentes (Carini y col., 2013; Oren, 2015).

I.3. TAXONOMÍA PROCARIOTA

I.3.1. Definición de especie procariota (pasado, presente y futuro)

La **taxonomía** es la ciencia de la clasificación de los organismos y está organizada en tres áreas principales, la identificación, la clasificación y la nomenclatura. En sus inicios y durante mucho tiempo, la taxonomía bacteriana se basaba en el análisis fenotípico para la identificación y la clasificación de las bacterias en grupos o taxones. La **clasificación** es la organización de organismos en grupos en base a su parecido fenotípico o su parentesco evolutivo. La **identificación**, permite situar un organismo desconocido dentro de un taxón previamente descrito y la **nomenclatura** es el proceso de asignar nombre a los grupos taxonómicos. La nomenclatura es la única parte de la taxonomía que está reglamentada (Lapage y col., 1992; Brenner y col., 2005a; Madigan y col., 2009), mientras que la clasificación y la caracterización de los procariotas son áreas que no están formalmente reguladas y en las que han tenido lugar numerosos cambios en los últimos 50 años.

Las primeras definiciones de especie procariota estaban basadas en grupos monotéticos definidos por un único carácter fenotípico. Posteriormente, esta definición adquirió un carácter politético de modo que las especies fueron definidas por una combinación de caracteres fenotípicos independientes, co-variables y de igual peso (Sneath y Sokal, 1973; Goodfellow y col., 1997). Finalmente, gracias al desarrollo y aplicación de las técnicas moleculares y de secuenciación que permiten un análisis genético y genómico, se dio un nuevo enfoque al concepto de especie procariota (Konstantinidis y Tiedje, 2004; Oren, 2004; Stackebrandt, 2004; Staley, 2006).

Una especie procariota se define conceptualmente como “un grupo monofilético y genómicamente coherente de organismos individuales que muestran un elevado grado de similitud global con respecto a muchas características independientes, y que es diagnosticable por unas propiedades fenotípicas discriminativas” (Rosselló-Móra y Amann, 2001;). Más recientemente, el avance en la taxonomía microbiana basada en

estudios genómicos está abriendo camino para crear un concepto de especie más universal y transparente; no obstante, todavía se encuentra en una etapa de transición hasta llegar a convertirse en un criterio sólido para la descripción de nuevas especies microbianas, que se fundamentará en una combinación entre un estudio polifásico de la especie a estudiar y un estudio genómico detallado (Vandamme y Peeters, 2014; Thompson y col., 2015; Al-saari y col., 2015). Llegados a este nivel, se pueden estimar las semejanzas genómicas completas entre cepas (inter- e intraespecífica), estimar el efecto que tiene la transferencia horizontal de genes (THG), establecer de manera inequívoca las verdaderas relaciones evolutivas entre las cepas (filogenómica), dilucidar qué caracteres fenotípicos son análogos, etc (Oren y col., 2014; Thompson y col., 2015).

I.3.2. Caracterización polifásica

Actualmente, la taxonomía procariota se basa en estudios polifásicos en los que se aplica un amplio abanico de tipos de información y que permiten analizar la variabilidad dentro y fuera de los taxones. A continuación se va a desarrollar con detalle cada una de estas caracterizaciones.

1.3.2.1. Caracterización fenotípica

Una especie no debe ser establecida a menos que pueda ser identificada por caracteres fenotípicos determinativos e identificativos (Rosselló-Móra y Amann, 2001), por lo que la caracterización fenotípica debe ser lo más exhaustiva posible y propiciar de esta manera un sistema de clasificación apropiado (Cowan, 1965; Wayne y col., 1987). Es la base para establecer una coherencia en los taxones y la diversidad interna en los mismos. Puesto que diferenciar los caracteres fenotípicos homólogos de los análogos es muy complejo, para minimizar el efecto de estos últimos se deben analizar tantos caracteres como sea posible, tratando a todos los caracteres con la misma importancia (Sneath y Sokal, 1973). Cuando el número de caracteres

estudiados en un análisis fenético es lo suficientemente grande, los grupos generados tienden a coincidir con los grupos genómicos (Rosselló-Móra y col., 1994; Sikorski y col., 1999).

Los análisis fenotípicos incluyen, entre otras cosas, las características **morfológicas, bioquímicas y fisiológicas** de los microorganismos. Hay que tener en cuenta que la mayoría de los procariotas no poseen características morfológicas complejas. La reproducibilidad de los análisis fenotípicos inter- e intralaboratorio solo se consigue usando pruebas estandarizadas (medio de cultivo, temperatura de incubación, etc.) (Schleifer, 2009).

Los datos fenotípicos, al igual que los genómicos, se pueden analizar fenéticamente (taxonomía numérica) comparando un conjunto de caracteres independientes, co-variables y de igual peso, los cuales no necesariamente están presentes de manera universal en todos los taxones (Sneath, 1989). Los caracteres individuales fenotípicos, de manera general no tienen suficiente capacidad para resolver las relaciones evolutivas; sin embargo, un análisis fenético basado en un número suficiente de caracteres fenotípicos sí que puede proporcionar una base para establecer clasificaciones cladísticas.

Según los caracteres fenotípicos incluidos en el estudio fenético, los resultados pueden no ser congruentes entre sí. Además, hay que tener en cuenta que el fenotipo no refleja toda la información genómica que contiene un microorganismo. Todos estos problemas se pueden minimizar incluyendo en el análisis fenético la mayor cantidad posible de caracteres.

Por otro lado, otra finalidad de las caracterizaciones fenotípicas es la creación de un marco que permita una correcta identificación de los microorganismos. Este marco puede consistir en tablas diagnósticas (Trüper y Schleifer, 1992) consistentes en la agrupación de taxones que comparten un conjunto de caracteres específicos e identificativos (Wayne y col., 1987). El éxito en la identificación de nuevos aislados depende de cómo de buena sea la descripción de las especies, así como del número de cepas pertenecientes a cada especie incluidas en la base de datos.

1.3.2.2. Caracterización genómica

La técnica estándar para delimitar la especie procariota es la **hibridación ADN-ADN**. Aunque la hibridación ADN-ADN no puede ser considerada como un análisis propiamente cladístico, cuando dos cepas presentan valores de hibridación ADN-ADN elevados están filogenéticamente relacionadas. Los datos empíricos obtenidos con esta técnica presentan una elevada correlación con los de otras aproximaciones genómicas y fenéticas. Se ha establecido empíricamente y bajo unas condiciones de hibridación óptimas, que la mayoría de las especies procariotas se componen de cepas cuyos valores de hibridación ADN-ADN están por encima del 70 % o cuyo ΔT_m es inferior a 5 °C (Ward, 1998). No obstante, se ha visto empíricamente que la actual circunscripción podría ser más laxa en términos de valores de similitud del ADN-ADN, siempre que ese hecho esté apoyado por otros datos, de manera que se puede llegar al umbral del 50 % de hibridación ADN-ADN o 7 °C de ΔT_m (Ursing y col., 1995; Vandamme y col., 1996; Goodfellow y col., 1997).

El proceso de hibridación ADN-ADN se puede medir mediante dos parámetros: (i) la tasa relativa de unión o *relative binding ratio* (RBR) y (ii) la diferencia de temperatura en el punto medio de la curva de desnaturalización térmica entre ADNs homodúplex y heterodúplex (ΔT_m). En este caso nos centraremos en el segundo caso. La desnaturalización del ADN de doble cadena depende básicamente del contenido en G+C, de la fuerza iónica de la solución en el que está disuelto el ADN y de la temperatura. En una curva de desnaturalización térmica de un ADN de doble cadena, la temperatura a la que el 50 % de las cadenas están desnaturalizadas, es lo que se conoce como temperatura media de desnaturalización o *melting temperature* (T_m). En la medida en que los ADNs heterodúplex tienen menos apareamientos de bases que los ADNs homodúplex, serán menos estables, de manera que en una curva de desnaturalización la T_m se alcanza a una menor temperatura. En este caso, el parámetro utilizado para medir el grado de reasociación ADN-ADN es el ΔT_m entre la T_m de los ADNs homodúplex y la T_m de los ADNs heterodúplex. El resultado del ΔT_m es independiente de la

metodología utilizada para realizar la hibridación y además, el valor no tiene que ser relativizado (Grimont y col., 1980).

Para que se forme un heterodúplex, incluso bajo condiciones no restrictivas de hibridación, es necesario que las secuencias heterólogas muestren como mínimo un 80 % de complementariedad. De este modo, un rango de similitud entre secuencias del 80 al 100 % se expande a un rango de valores de hibridación ADN-ADN entre el 0 % y el 100 % (Goodfellow y O'Donnell, 1993; Roselló-Móra y Amann, 2001).

Hay que considerar que los estudios de hibridación ADN-ADN son laboriosos y costosos, y que se basan en comparaciones de parejas de ADN homólogos y heterólogos. Esto hace que por norma general, los experimentos se realicen con pocos microorganismos (Hartford y Sneath, 1988). Además, no se puede crear una base de datos escalable de manera similar a la de las secuencias nucleotídicas pues los resultados son por parejas de microorganismos y porque la reproducibilidad de los resultados depende de la metodología empleada (Goodfellow y col., 1997).

Debido al espectacular avance metodológico que se ha producido en los últimos años, las técnicas utilizadas para obtener la información genómica se han impuesto hasta el punto de resultar imprescindibles en los estudios de taxonomía. Todos los microorganismos poseen información genómica y a diferencia de lo que sucede con la información fenotípica, las condiciones ambientales únicamente pueden influir en la concentración de las moléculas de ADN o ARN y no en su composición. Actualmente se ha implantado el análisis de la hibridación ADN-ADN de los genomas, más conocido como **hibridación ADN-ADN *in silico***, como técnica estándar para delimitar la especie procariota. Esta herramienta bioinformática pretende reemplazar la DDH experimental por la comparación del genoma-genoma *in silico*. Esto se calcula mediante la herramienta *Genome-to-Genome Distance Calculator* o más conocido por sus siglas **GGDC** (Auch y col., 2010a; 2010b; Meier-Kolthoff y col., 2013). Además este programa calcula de las diferencias en el contenido en G+C del ADN, información útil para la delineación de especies

(Meier-Kolthoff y col., 2014). Además es aplicable tanto para genomas completos e incompletos.

Otra alternativa para la definición de especie son los índices **AAI** (identidad aminoacídica media) y **ANI** (identidad nucleotídica media). Ambos son dos parámetros derivados de la comparación de parejas de genomas de diferentes cepas, que representan el promedio de la identidad de secuencia (de aminoácidos o nucleótidos, respectivamente) que muestran todos los genes ortólogos compartidos. Estos índices dan una medida robusta de la similitud genómica que presentan las cepas, pudiendo ser utilizados con la misma finalidad que la hibridación ADN-ADN: delimitar especies procariontas. Se ha visto empíricamente que valores de aproximadamente el 94-95 % de ANI equivalen al valor del 70 % de hibridación ADN-ADN utilizado para definir una especie. Estos índices se caracterizan porque permiten realizar análisis *in silico* y crear bases de datos acumulativas. Además, debido a las diferencias en las constricciones evolutivas de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas, los resultados obtenidos con los valores ANI y AAI presentan diferentes niveles de resolución, el primero para microorganismos filogenéticamente relacionados y el segundo para microorganismos distantes (con un valor de semejanza menor al 80 %) (Konstantinidis y Tiedje, 2004; 2005; Roselló-Móra, 2005; Rodriguez y Konstantinidis, 2014).

Dentro del índice ANI se incluyen:

- **ANIb**: ANI basado en el algoritmo BLAST. Se puede aplicar para genomas tanto cerrados como incompletos. El ANIb se calcula a partir de dos secuencias del genoma (el de referencia y el problema). La secuencia problema se divide en fragmentos de 1020 pb (simulando el experimento de la hibridación ADN-ADN), posteriormente cada fragmento se enfrenta a la secuencia de referencia usando el programa **BLASTn** de la base de datos NCBI. Éste índice es el más utilizado para fines taxonómicos (Goris y col., 2007).
- **ANIm** (Richter y Roselló-Móra, 2009). Este tipo de ANI está basado

en el programa de alineación ultrarrápida MUMmer (Delcher y col., 2002). Los valores de ANI se calcularon mediante el uso del software MUMmer; en particular, la herramienta NUCmer (nucleótido MUMmer), que permite alineamientos de secuencias de ADN de múltiples secuencias de referencia y de consulta. Este método está diseñado para comparar grandes fragmentos de ADN y evita la manipulación previa de las secuencias. Los resultados obtenidos mediante ANIm son robustos (cuando el valor de ANI > 90%), rápidos y precisos (Richter y Rosselló-Móra, 2009).

De forma general ambos índices correlacionan de forma muy precisa rindiendo resultados casi idénticos, especialmente cuando los valores son > 90%. Estas discrepancias se deben sobre todo a la sensibilidad y que el programa MUMmer, que es más estricto (Richter y Rosselló-Móra, 2009).

- **OrthoANI:** Este tipo de ANI sólo tiene en cuenta las secuencias ortólogas, proporcionando unos resultados más robustos y rápidos que el ANI siempre que sean con fines taxonómicos. El esquema algorítmico para calcularlo (entre dos genomas) consta de tres pasos: (i) ambas secuencias del genoma (problema y de referencia) se cortan en 1020 pb de longitud por fragmentos. Cualquier fragmento de menos de 1.020 pb de tamaño se ignora; (ii). todos los fragmentos fueron registradas y las identidades de nucleótidos se calcularon utilizando el programa **BLASTn**; sólo cuando dos fragmentos se buscaron recíprocamente como mejores *hits* se incluyen en el cálculo posterior de identidad de nucleótidos; (iii) los fragmentos ortólogos entre los dos genomas se identificaron. Los valores de corte son ligeramente superiores al ANI original 95-96%. OrthoANI es más adecuado para la comparación a estudios de gran escala y al igual que el ANI, no proporciona medidas muy fiables cuando los genomas se encuentran alejados. La correlación entre el ANI original y el OrthoANI es muy alta (Lee y col., 2016).

Tanto el ANI como la hibridación ADN-ADN *in silico* se desarrollaron de

forma independiente, pero se ha visto que existe una gran correlación entre ambas; pudiéndose proponer ambas como alternativas para desplazar la hibridación ADN-ADN experimental (Goris y col., 2007; Konstantinidis y Tiedje; 2007; Richter y Rosselló-Móra, 2009; Meier-Kolthoff y col., 2014; Li y col: 2015; Varghese y col., 2015).

1.3.2.3. Caracterización filogenética

En los procariotas, las relaciones filogenéticas se infieren principalmente con el marcador molecular ARNr 16S, aunque en los últimos años, otros genes *housekeeping* están adquiriendo cierta relevancia principalmente en grupos taxonómicos de reciente divergencia (León y col., 2014; Pérez-Cataluña y col., 2016; Dubert y col., 2017; Palmer y col., 2017).

Debido a los inconvenientes que presenta la hibridación ADN-ADN se han realizado estudios de correlación entre ésta y otras técnicas alternativas (por ejemplo secuencias génicas del ARNr 16S), con el fin de proponerlas como complementarias o alternativas para delimitar una genoespecie. Debido a que no existe una correlación lineal entre el porcentaje de hibridación ADN-ADN y el porcentaje de similitud de secuencias del ARNr 16S, la definición de especie no puede basarse únicamente en este parámetro (Grimont, 1988; Stackebrandt y Goebel, 1994). No obstante, tiene un carácter altamente pragmático pues permite obtener con bastante precisión la situación filogenética de los microorganismos (Goodfellow y col., 1997). Según Kim y col. (2014) se ha visto que cepas con valores de semejanza de secuencia del ARNr 16S inferiores al 98,65 % muestran valores de hibridación ADN-ADN inferiores al 70 % y por consiguiente pueden ser consideradas de diferente especie sin necesidad de realizar estudios de hibridación ADN-ADN. Sin embargo, cuando dos cepas presentan valores de similitud de secuencia por encima del 98,65 % e incluso del 100 % pueden o no pertenecer a la misma especie. En este caso, es necesario realizar estudios de hibridación ADN-ADN para dilucidar la vinculación entre cepas (Stackebrandt y Ebers, 2006).

El gen ARNr 16S presenta una tasa de evolución lenta, por lo que muchas veces resulta difícil establecer las relaciones filogenéticas entre taxones cuya divergencia es reciente. Por ello, se utiliza principalmente como marcador en rangos taxonómicos por encima de la especie (Stackebrandt y Goebel, 1994; Stackebrandt y Ebers, 2006). Además, las secuencias de los genes ARNr pueden ser utilizadas para explorar la diversidad de las especies viables no cultivadas (Embley y Stackebrandt, 1997), y monitorizar comunidades microbianas sin necesidad de cultivarlas mediante el empleo de sondas de los genes ARNr marcadas (Amann y col., 1995).

A fecha de hoy, aunque se ha incrementado exponencialmente el número de genomas secuenciados, la secuenciación rutinaria de todos los aislados ambientales no es factible. Una de las técnicas moleculares que está adquiriendo más relevancia en la taxonomía procariota es el **Multilocus Sequence Analysis** (MLSA) o Análisis por Secuenciación Multilócica, técnica que se está proponiendo como herramienta alternativa para delimitar una especie procariota desde un punto de vista genómico y filogenético. El análisis de varios genes distribuidos por todo el genoma, denominados **genes housekeeping**, se puede considerar como un muestreo de la secuencia primaria del genoma de un microorganismo, y por consiguiente, una medida directa de la similitud genómica. No obstante, para poder validar esta aproximación es necesario realizar estudios de correlación entre la similitud de las secuencias génicas concatenadas y los valores de similitud genómica obtenidos mediante hibridación ADN-ADN o secuenciación de genomas (Glaeser y col., 2016; Doi y col., 2017; Koh y col., 2017). Este análisis, al igual que el MLST (*Multilocus Sequence Typing*), también se puede aplicar para estudios epidemiológicos. En estos casos pueden incluirse como marcadores genes de virulencia o regiones intergénicas (Jennison y col., 2017; Xia y col., 2017).

Algunos ejemplos de genes *housekeeping* son la subunidad β de la ADN girasa (*gyrB*), el factor sigma 70 de la RNA polimerasa (*rpoD*), la subunidad β de la ATP sintetasa (*atpD*), proteínas de recombinación (*recA* y *recM*), el factor de elongación G (*fusA*), etc. (de la Haba y col., 2011; Ahn y col., 2017;

Palmer y col., 2017). A la hora de utilizar los genes que codifican ARNr (*genes housekeeping*) o cualquier otra secuencia génica como marcador molecular para inferir la filogenia hay que considerar que (i) no haya sufrido transferencia horizontal de genes (THG), para que reflejen realmente las relaciones evolutivas entre microorganismos; (ii) la similitud entre las secuencias génicas sea un reflejo de la similitud que presentan los genomas completos y, por consiguiente, de la distancia evolutiva entre los microorganismos; (iii) las secuencias tengan un tamaño adecuado, ni demasiado pequeño, para que tenga suficiente información filogenética, ni demasiado grande, para que se pueda secuenciar con facilidad; (iv) posea una tasa de evolución acorde con el poder de resolución al que se quiere llegar; y (v) en general, se prefieren genes con una única copia en el genoma y que sean universales (presentes en todos los organismos) (Farhad y col., 2015; Steinum y col., 2016).

Las ventajas con respecto al análisis de un único gen son: (i) al incluir varios genes, la cantidad de nucleótidos analizados es mayor y, en principio, el poder de resolución también es mayor; (ii) en caso de que algún gen seleccionado haya sufrido THG, el efecto de éste en el cladograma resultante puede quedar "amortiguado" por el resto de genes concatenados, mostrándose por consiguiente unas relaciones filogenéticas más acordes con la historia evolutiva real de los microorganismos. Para ello se aconseja seleccionar genes con una amplia distribución física en el genoma.

Aunque el *Ad Hoc committee for the re-evaluation of the species definition* consensuó que era necesario trabajar como mínimo con cinco genes de diversa localización en el genoma para obtener la suficiente información como para distinguir entre especies de taxones relacionados (Stackebrandt y col., 2002), otros autores han propuesto reducir el número de genes para tal fin (Zeigler, 2003; Urbanczyk y col., 2007; Rameshkumar y col, 2008), siempre que los mismos permitan medir la similitud genómica entre microorganismos con igual o incluso más precisión que con la hibridación ADN-ADN (Zeigler, 2003; Urbanczyk y col., 2007; Rameshkumar y col, 2008).

El análisis de secuencias génicas posee un serie de ventajas respecto a otras técnicas utilizadas en taxonomía procariota: (i) los datos pueden estar disponibles en bases de datos públicas a disposición de la comunidad científica; (ii) a diferencia de la mayoría de técnicas de tipificación molecular los resultados obtenidos son reproducibles intra- e interlaboratorio; (iii) el análisis de datos es escalable, pudiendo comparar secuencias de estudios independientes; y (iv) el análisis de secuencias puede ser realizado en los tres dominios del árbol de la vida: *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya* (Pascual y col., 2010; Steinum y col., 2016).

No obstante, el principal problema que existe hasta la fecha a la hora de aplicar el MLSA en la definición de especie procariota es encontrar la combinación de genes que se pueda aplicar en todos los grupos taxonómicos, pues los genes que correlacionan bien la información genómica en unos grupos taxonómicos pueden no hacerlo en otros. Por ello, los genes que deben utilizarse en los estudios de MLSA nunca serán los mismos para todos los taxones. Son muchos los estudios que se han realizado en grupos taxonómicos concretos, pero escasos aquellos que han incluido una gran diversidad de grupos taxonómicos diferentes (Alexandre y col., 2008; Martens y col., 2008; de la Haba y col., 2012 Al-Saari y col., 2015).

Si los genes (*ARNr* y *housekeeping*) únicamente se transmitieran verticalmente, las inferencias filogenéticas derivadas de los mismos deberían ser similares entre sí, reflejando en todos los casos las relaciones evolutivas. Sin embargo, existen genes que sufren transferencia horizontal, de manera que las relaciones establecidas a partir de esos genes puede que no necesariamente sean filogenéticas. La THG se puede definir como el intercambio de material genético entre microorganismos mediante los mecanismos de conjugación, transducción y transformación. La THG en los procariotas no es un proceso aleatorio, puesto que algunos genes (genes esenciales) se transmiten con menor frecuencia que otros genes (genes de adaptación). Aunque se puede dar tanto entre especies cercanas como entre taxones filogenéticamente distantes, la THG es más frecuente entre microorganismos que comparten ciertos factores: tamaño de genoma,

composición de G+C, fuentes de carbono y energía utilizadas, tolerancia al oxígeno, temperatura óptima de crecimiento, etc. La THG permite la adaptación de los microorganismos al ambiente, facilitando su diversificación y especiación (Papke y col., 2015). Entre otras cosas permite la adquisición de genes implicados en la resistencia a antibióticos, genes de virulencia o nuevas rutas metabólicas. La THG juega un papel muy importante en la sistemática bacteriana, principalmente en las reconstrucciones filogenéticas (Zhaxybayeva y col., 2006). El problema de establecer las relaciones filogenéticas con un único gen es que si éste ha sufrido THG, el árbol filogenético de ese gen particular puede que no se corresponda con el árbol filogenético real de los microorganismos (de la Haba y col., 2011). Además, la adquisición de material genético exógeno mediante THG también puede modificar el fenotipo de las cepas y con ello generar errores en la clasificación e identificación (Boucher y col., 2003). Lo ideal es identificar los caracteres que están afectados por la THG y excluirlos de los estudios taxonómicos. Pero eso no es una tarea fácil, pues se requiere conocer las secuencias génicas que codifican dichos caracteres. No obstante, este problema se minimiza al realizar estudios fenéticos en los que se analizan un número elevado de características (Boucher y col., 2013). Según Woese (2000), para poder entender la evolución de los microorganismos hay que considerar la conexión que existe entre la evolución vertical y la adquisición horizontal de nuevo material genético. Por ello, la evolución de los procariotas no hay que verla como un esquema vertical sino más bien a modo de red.

En cuanto a la construcción de árboles filogenéticos, éstos se pueden construir a partir de alineamientos múltiples de secuencias; para ello hay que asumir que cada posición en el alineamiento es homóloga, ya que esto es esencial para la resolución del árbol; por tanto es imprescindible revisar los alineamientos antes de realizar los árboles. En general, los problemas suelen acumularse en las regiones más variables en las que hay muchas sustituciones o gaps. Existen diversos métodos de reconstrucción de filogenia, según se basen en distancia, parsimonia, y máxima verosimilitud.

Árboles basados en distancias

A partir de una matriz de distancia podemos utilizar distintos métodos estadísticos para reconstruir un árbol. Existen numerosos métodos, pero los más utilizados son el **UPGMA** (Prager y Wilson, 1978) y el ***Neighbour-joining*** (Gouy y Li, 1989). Estos métodos, basados en matrices de distancias, son muy rápidos y permiten utilizar secuencias muy largas en un gran número de individuos con unos recursos computacionales de memoria y tiempo muy limitados.

Una vez creado el árbol se puede estudiar cómo de preciso es el ajuste del mismo a la matriz de datos original realizando un test de correlación cofenético. En este test a partir del árbol se calcula una nueva matriz de distancias y esta matriz se compara con la original para estudiar como de bien se correlacionan. También se puede realizar un análisis de *bootstrap* para validar el árbol.

Árboles basados en la máxima parsimonia

Mediante este método también conocido como ***maximum-parsimony*** (Barnabas y col., 1972), se obtienen árboles que ordenan las ramas de tal modo que se minimiza el número de mutaciones que deben haber ocurrido.

Para elegir el mejor árbol, en teoría habría que evaluar todos los árboles posibles. Esta evaluación podría hacerse si el número de taxones es pequeño, pero a medida que este número aumenta el número de árbol crece desmesuradamente y no es factible evaluar todos los árboles posibles. En la práctica los programas utilizan un método heurístico para evaluar sólo los árboles más razonables y desechar directamente los más improbables (Moore y col., 1976).

El resultado final de un algoritmo de ***maximum-parsimony*** no tiene porqué ser un único árbol puesto que puede que existan varios árboles que impliquen un mismo número de mutaciones.

El método de parsimonia ha sido tradicionalmente el preferido por bastantes investigadores, pero presenta algunos problemas estadísticos

sistemáticos. Se ha demostrado que éste método, en algunos casos, no garantiza encontrar el árbol correcto incluso teniendo información de un gran número de caracteres informativos. Uno de los casos en los que éste método falla sistemáticamente es el caso en el que algunas ramas sean mucho más largas que otras (Swenson y col., 2016; Bryant y col., 2017).

Árboles basados en la máxima verosimilitud

Éste método también conocido como *maximum-likelihood* (Hutchinson, 1929) busca el árbol máximoverosímil, es decir, el árbol que es más probable que haya generado los datos que hemos observado. En este método se parte de los datos y de un modelo de evolución. Partiendo de esta base se calcula la probabilidad de que nuestros datos hayan sido generados por los distintos árboles posibles y se devuelve el árbol que presenta una máxima probabilidad.

Para poder calcular uno de estos árboles es imprescindible elegir un modelo de mutación a priori. Una vez determinado el modelo, el algoritmo hará una estima máximoverosímil de los parámetros relativos a las tasas de mutación así como del árbol (Boyd, 1954; 1955).

De modo análogo al método de parsimonia en este caso para calcular el árbol más verosímil también deberían explorarse todos los árboles posibles, pero dado que eso es computacionalmente imposible de llevar a cabo también se utilizan métodos heurísticos para explorar tan sólo los árboles más razonables.

Este método tiene la ventaja frente a los de distancia y de parsimonia de utilizar con mayor eficiencia la información filogenética contenida en el alineamiento múltiple. Es decir, dado un mismo alineamiento éste método tiende a generar un resultado más cercano a la realidad. Este método, por ejemplo, no presenta el problema sistemático con las ramas de distinto tamaño que describimos en el método de máxima parsimonia (Serdoz y col., 2017; Wiebel y col., 2017).

1.3.2.4. Caracterización quimiotaconómica

El término quimiotaconomía hace referencia a la aplicación de métodos analíticos para obtener información de los constituyentes químicos de las células con fines taxonómicos. Puesto que la expresión de muchos de los componentes celulares puede variar según las condiciones ambientales, cuando se realiza un análisis quimiotaconómico es necesario estandarizar las condiciones de cultivo. De este modo, la variación en los constituyentes celulares dependerá únicamente de las diferencias genéticas. Esto es muy importante sobre todo en los estudios que implican análisis cuantitativos de los datos químicos (Goodfellow y O'Donnell, 1993). Tal y como ocurre con otros datos fenotípicos y genómicos, hay datos quimiotaconómicos que han sido utilizados en un amplio número de procariotas mientras que otros componentes quimiotaconómicos son tan específicos que su análisis se restringe a un taxón particular. De manera general, los análisis quimiotaconómicos permiten diferenciar entre rangos taxonómicos altos, por encima de la especie (Oren, 2012; Zhu y col., 2016; Cañavate y col., 2017).

Los marcadores quimiotaconómicos normalmente tienen un carácter de exclusión entre taxones y no de inclusión, aunque existen excepciones. Algunos análisis quimiotaconómicos son: (i) lípidos polares; (ii) ácidos grasos; (iii) quinonas isoprenoides; (iv) pigmentos (bacterioclorofila, carotenoides, etc.); (v) peptidoglicano; (vi) ácidos teicoicos; (vii) poliaminas, (viii) lipopolisacáridos; (ix) ácidos micólicos; etc (Lee y col., 2017; Oh y col., 2017; Tkachenko y col., 2017; Yan y col., 2017). El análisis de otros componentes celulares obtenidos mediante serotipado, fagotipado y perfiles electroforéticos de proteínas y lipopolisacáridos, también ha sido ampliamente utilizado en estudios de tipificación procariota.

Clásicamente la identificación de procariotas se ha basado en el estudio de métodos fenotípicos, incluyendo las características morfológicas que presentan los microorganismos en diferentes métodos de cultivo, así como las reacciones bioquímicas propias de cada cepa (Carroll y col., 2007). Sin embargo, esto conlleva un gasto de tiempo y dinero importante en el

laboratorio. Bajo esta inquietud, se han investigado técnicas que aumenten la exactitud y disminuyan los tiempos de respuesta en la identificación microbiana.

Como mejora a los problemas mencionados, se propone la espectrometría de masas, en concreto, **MALDI-TOF MS**, por sus siglas en inglés *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Esta técnica permite la identificación de bacterias y hongos mediante el perfil de proteínas, acortando de forma significativa los tiempos de respuesta, mejorando la exactitud de los métodos de identificación convencional y disminuyendo los altos costos involucrados en ellos (reactivos y mano de obra) (Seng y col., 2009). La espectrometría de masas es un método que permite la identificación de una molécula mediante la medición de su masa en relación a su carga (relación masa/carga), así como la de los fragmentos generados a partir de ella.

La técnica de **MALDI-TOF MS** utiliza el cálculo del tiempo de migración (tiempo de vuelo) de cada fragmento de una molécula a través de un trayecto predeterminado previa desorción/ionización láser de la molécula en una matriz determinada. Esta técnica tiene la capacidad de medir macromoléculas de hasta 100.000 Dalton, dentro de las cuales están los péptidos y proteínas que forman parte de hongos y bacterias. Dado que un microorganismo analizado mediante **MALDI-TOF MS** mostrará siempre el mismo espectro de masas, los fabricantes han generado base de datos con los espectros de masas de la fragmentación de los péptidos y proteínas que presentan los distintos microorganismos para una misma emisión del láser y una misma distancia de migración. La identificación se realiza a través del balance (correlación) del resultado de un microorganismo con todos los espectros de masas que contiene el archivo proporcionado por el fabricante, y de acuerdo a puntos de corte definidos para estas correlaciones (Welker y col., 2011).

I.3.2.5. Técnicas de tipificación genético-molecular (*fingerprinting*)

Estas técnicas más conocidas como *fingerprinting* (huella genética) permiten detectar de manera indirecta diferencias en los genomas procariotas o en fragmentos específicos de los mismos. Éstas pueden variar en su poder de resolución y reproducibilidad y pueden ser utilizadas para analizar la diversidad inter- y/o intraespecies, pudiendo incluso reflejar en algunos casos las relaciones evolutivas (Stalin y Srinivasan, 2016). Muchas de éstas técnicas también han sido utilizadas en estudios epidemiológicos (Smith y col., 2011; Jung y col., 2014; Schleihauf y col., 2017). En la actualidad, existe un gran número de técnicas de tipificación genético-molecular a disposición de la comunidad científica, algunas de las más relevantes son:

- **AFLP** (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Esta técnica se caracteriza por producir patrones de bandas complejos, lo que le da un elevado poder de resolución. También es muy sensible y reproducible. Puede ser aplicada en taxones tanto filogenéticamente cercanos como distantes, y muchas veces los grupos formados se corresponden con grupos de similitud ADN-ADN. También se ha utilizado en estudios de epidemiología. Sin embargo se ha comprobado empíricamente que es una técnica compleja, requiere de mucho tiempo y cara (Miller y col., 2016; Baselga y col., 2017; Pergola y col., 2017).
- **RAPD** (*Random Amplified Polymorphic DNA*) y **Rep-PCR** (*Repetitive extragenic palindromic PCR*). El RAPD consiste en la amplificación de ADN usando cebadores de secuencia arbitraria. La Rep-PCR consiste en amplificar fragmentos de ADN que se encuentran entre motivos de ADN repetitivos, como por ejemplo la secuencia repetida en tándem (GTG)₅ o las secuencias BOX, ERIC I, ERIC II. Éstas se utilizan como técnicas de tipificación inter- e intraespecífica pudiendo presentar una elevada correlación con los resultados de hibridación ADN-ADN. Ambas son técnicas rápidas, fáciles de realizar, de coste relativamente bajo y aplicadas muchas veces en estudios de epidemiología. Como inconveniente cabe destacar su baja

reproducibilidad en algunos casos (Szabó y co., 2017; Vaněrková y col., 2017; Vishalakshi y col., 2017).

- **PCR-RFLP** (*Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphisms*). Consiste en la amplificación de determinados genes (16S ARNr, *gyrB*, *rpoD*, etc.) por PCR y su posterior fraccionamiento mediante enzimas de restricción, obteniéndose de esta manera unos fragmentos de ADN que se separan mediante electroforesis. Se utiliza para clasificar e identificar especies y grupos subespecíficos. Es una técnica reproducible, cuyo poder de resolución puede variar según el gen empleado (Chen y col., 2017; Huang y co., 2017).
- **RFLP** (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Técnica que se refiere a secuencias específicas de nucleótidos en el ADN que son reconocidas y cortadas por enzimas de restricción. Las secuencias de restricción presentan diferentes patrones de distancia, longitud y se encuentran en disposiciones diferentes en el ADN de algunos individuos de una población, por lo que se dice que es polimórfica para estos fragmentos de restricción. Ésta técnica se ha empleado como marcador para el análisis filogenético de especies cercanas ya que se basan en la homología de las secuencias (Shridhar y col., 2017, Volpini y col., 2017).
- **LFRFA** (*Low-Frequency Restriction Fragment Analysis*). Se basa en la fragmentación del ADN genómico mediante enzimas de restricción de baja frecuencia de corte y posterior separación mediante electroforesis en campo pulsante (Vandamme y col., 1996; Amils y col., 1998).
- **Ribotipado**. Esta técnica se basa en el hecho de que los procariotas pueden diferir en el número y distribución de los operones de ARNr que poseen en su genoma. Esta técnica permite la caracterización e identificación de los microorganismos tanto a nivel intra- como interespecífico. Se ha utilizado en estudios epidemiológicos así como

en estudios de diversidad genómica de cepas ambientales (Behar y col., 2017; Moono y col., 2017; Nicholas y col., 2017). Su poder de resolución depende de las endonucleasas y sondas marcadas utilizadas (van Dorp y col., 2017).

- **ISR** (*Intergenic spacer region*). Los genomas procariotas normalmente comprenden varias copias (2-14) del operón multigénico ARNr, pudiendo existir pequeñas diferencias en las secuencias primarias y en los tamaños entre copias dentro de un mismo genoma. La región espaciadora entre el 16S y el 23S ARNr, al estar sometida a una menor presión selectiva, posee mayor variabilidad que la propia secuencia del ARNr 16S. El estudio de la variabilidad de dichas secuencias se puede realizar por secuenciación directa, PCR o PCR-RFLP. Esta técnica es simple, económica y se utiliza para estudios de tipificación inter- e intraespecífica (Wickhorst y col., 2016; Fernández-Delgado y col., 2017).

Los perfiles electroforéticos que se obtienen tras aplicar las técnicas descritas anteriormente deben de ser analizados con el fin de establecer la similitud entre los OTU's (Unidad Taxonómica Operativa). Este análisis se puede hacer manualmente en el caso de que los perfiles electroforéticos obtenidos sean simples/sencillos o bien con la ayuda de programas informáticos.

Entre los programas empleados para el análisis de los patrones de bandas obtenidos mediante las técnicas de *fingerprinting* destacan el **Phoretix 1D pro** (Olakanye y col., 2014; Ram Mohan y col., 2014) el cual trata en primer lugar las imágenes de los geles electroforéticos, convirtiendo la imagen de 24-bit (tamaño que se obtiene con el captador de imágenes) a 8-bits optimizando el brillo y contraste, y eliminando el ruido de fondo de la imagen. Posteriormente, se determinan las carreras electroforéticas del gel realizando una normalización mediante marcadores de pesos moleculares incluidos en el gel. Las bandas de los marcadores de peso moleculares de cada gel se alinean respecto a un marcador de referencia, permitiendo de esta manera comparar carreras electroforéticas obtenidas en geles

diferentes. Finalmente, se obtienen las matrices de similitud que permiten comparar los diferentes OTU's entre sí mediante (i) el coeficiente de correlación de *Pearson* y/o (ii) el análisis basado en la presencia/ausencia de bandas. En el primer caso, se analizan como un todo las curvas densitométricas de los perfiles electroforéticos para obtener la matriz de similitud. En el segundo caso, el análisis basado en la presencia/ausencia de bandas requiere determinar las distintas bandas presentes en cada una de las carreras. Una vez definidas se calcula la matriz de similitud mediante un coeficiente basado en caracteres binarios, como son el coeficiente de Jaccard (Laurentin y col., 2016) o el de Dice (Otlewska y col., 2013) entre otros. El paso crítico a la hora de obtener una matriz de similitud es decidir si ésta debe ser obtenida analizando las curvas densitométricas o la presencia/ausencia de bandas. Ambas aproximaciones tienen ventajas y desventajas, de manera que se deben utilizar en base a la importancia que se le quiera dar a la intensidad de los amplicones. Normalmente, el análisis de las curvas densitométricas se aplica en aquellas técnicas cuyo paso final previo a la separación electroforética es una amplificación de PCR (AFLP, Rep-PCR, RAPD, etc.); mientras que el análisis de la presencia/ausencia de bandas se realiza en aquellas técnicas cuyo último paso previo a la separación electroforética es una restricción del material genético (RFLP, LFRFA, etc.), y donde los fragmentos generados se encuentran en principio en cantidades equimolares. Finalmente, tras obtener una matriz de similitud basada en la correlación de las curvas densitométricas o en la presencia/ausencia de bandas se procede a realizar el agrupamiento de los OTU's mediante un algoritmo, como por ejemplo UPGMA (Arnau y col., 2017), obteniéndose de esta manera un dendrograma. Este método se basa en un proceso repetitivo y secuencial de unión de clados, a partir de una matriz de similitud cuyo tamaño se va reduciendo hasta que consiste en una única celda, que se corresponde con la raíz del dendrograma. El UPGMA calcula la media aritmética a partir de todas las similitudes individuales entre las muestras de los nuevos clústeres por un lado y los clados ya existentes por otro, es decir se basa en un criterio de máxima similitud para juntar los clados (Szenejko y col., 2016).

I.4 GÉNERO *SALINIVIBRIO*

El género *Salivibrio* pertenece a la familia *Vibrionaceae* (Veron, 1965), en la clase *Gammaproteobacteria*. La familia *Vibrionaceae* agrupa actualmente 12 géneros: *Aliivibrio*, *Allomonas*, *Beneckeia*, *Catenococcus*, *Echinimonas*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, *Listonella*, *Lucibacterium*, *Photobacterium*, *Salinivibrio* y *Vibrio* (Sawabe y col., 2014). Esta familia comprende un gran número de especies, más de 140, con una amplia distribución geográfica y asociadas a ambientes acuáticos, principalmente agua de mar y estuarios (Farmer III y Janda, 2005). El género tipo de la familia es *Vibrio* y la especie tipo del género *Vibrio* es *V. cholerae*.

I.4.1. Taxonomía

En 1938 Smith aisló una cepa con morfología de bacilo curvado a partir de costillas de cerdo en salazón, cepa a la que designó como *Vibrio costicola*. Esta especie crece de forma óptima en medios que contiene un 10 % de sales totales y se ha aislado frecuentemente de carnes en salazón y salmueras (Gardner, 1980; Shewan y Veron, 1974). Años más tarde, se consiguió aislar de ambientes hipersalinos (Ventosa y col., 1982; Márquez y col., 1987) y de suelos salinos aunque en éstos últimos en menor proporción (Quesada y col., 1983). Estudios posteriores mostraron que esta especie era fácilmente aislada de ambientes acuáticos hipersalinos; además, estudios de hibridación ADN-ADN y el análisis del gen ARNr 16S revelaron que *Vibrio costicola* no mostraba tanta semejanza con el resto de especies del género *Vibrio* y que ésta podría constituir un género distinto (Brenner y col., 1983; García y col., 1987; Gutiérrez y col., 1989; Kita-Tsukamoto y col., 1993; Ruimy y col., 1994).

Es en 1996 cuando Mellado y col. en base a estudios anteriormente mencionados junto con la secuencia del gen ARNr 16S, donde se observaron que las distancias filogenéticas entre *Vibrio costicola* y otras especies de *Vibrio* eran relativamente grandes, además de un estudio de hibridación ADN-ADN, sugirieron la reclasificación de la especie *Vibrio costicola* en un

nuevo género denominado *Salinivibrio*, renombrándose por tanto a esta especie como *Salinivibrio costicola*.

En el año 2000, Huang y col., consiguieron aislar una cepa la cual, según análisis del gen ARNr 16S tenía un porcentaje de semejanza del 97,7 % y un valor del 93 % de hibridación ADN-ADN con la especie *Salinivibrio costicola*; sin embargo, características tales como la halotolerancia, producción de gas, crecimiento a 50 °C, resistencia a antibióticos y su espectro en la utilización de carbohidratos, llegaron a concluir que se trataba de una subespecie de *Salinivibrio costicola*, a la que denominaron *Salinivibrio costicola* subsp. *vallismortis*, ya que fue aislada del Valle de la Muerte, EE.UU. Como consecuencia de todo esto, la especie *Salinivibrio costicola*, pasó a ser denominada como *Salinivibrio costicola* subsp. *costicola*.

En el año 2005, Romano y col., aislaron una cepa proveniente de un alga verde del lago alcalino *Pozza del Sale*, en Italia. Observaron mediante hibridación ADN-ADN que poseía un 72 % y un 99 % de semejanza según el gen ARNr 16S con respecto a la especie *Salinivibrio costicola* subsp. *costicola* (cepa tipo del género *Salinivibrio*), pero que presentaba diversas diferencias fenotípicas con ésta, creciendo óptimamente en medios con un pH alcalino, por lo que concluyeron que se trataba de una nueva subespecie a la que denominaron *Salinivibrio costicola* subsp. *alcaliphilus*.

En 2008, Amoozegar y col., estudiaron una cepa aislada del lago salino Bakhtegan, Irán. Según la hibridación ADN-ADN, se obtuvo un valor del 10,1 % y según el ARNr 16S un 96,8 % con respecto a la cepa tipo del género (*S. costicola* subsp. *costicola*); concluyendo por tanto que se trataba de una nueva especie a la que designaron como *Salinivibrio proteolyticus*.

Pla-ra es un pescado fermentado típico de la región de Tailandia. En 2009, Chamroensaksri y col. consiguieron aislar una cepa de este producto, la cual poseía un rango de semejanza de entre el 98,3-98,6 % según el gen ARNr 16S y el resto de especies ya descritas del género *Salinivibrio*; según experimentos de hibridación ADN-ADN el valor con respecto al resto de

especies del género era siempre inferior al 70 %, razonando, por tanto, que se trataba de una nueva especie a la cual llamaron *Salinivibrio siamensis*.

En 2011, Romano y col., aislaron una cepa de un lago salino en Parque de RasMohammed (Egipto). Esta cepa presentaba unos valores de semejanza según el ARNr 16S de entre 98,1 y 99,1 % con el resto de cepas descritas del género y unos valores de hibridación ADN-ADN inferiores al 55 %, por lo que se concluyó que esta cepa constituía una nueva especie del género *Salinivibrio*, a la que se le asignó el nombre de *Salinivibrio sharmensis*.

En resumen, el género *Salinivibrio* se conforma de cuatro especies, una de ellas con tres subespecies; siendo la especie tipo del género *Salinivibrio costicola* subsp. *costicola* (Mellado y col., 1996).

De forma general, el género *Salinivibrio* incluye bacterias Gram-negativas, con forma de bacilos curvados (típicos de vibrios), móviles mediante un flagelo polar, que se pueden presentar aislados, en parejas o agrupados en espirales o en forma de "S". Su concentración óptima de NaCl para el crecimiento es de 5 a 12 %, a una temperatura de 37 °C y un pH óptimo que oscila entre 7,5-7,8 excepto la especie *Salinivibrio costicola* subsp. *alcaliphilus* cuyo pH óptimo es 9. Una característica importante es que son anaerobios facultativos.

I.4.2. Fisiología y osmorregulación

La especie *Vibrio costicola* ha sido utilizada como modelo para estudios fisiológicos y mecanismos de osmorregulación en bacterias halófilas moderadas (Kushner, 1978; Kushner y Kamekura, 1988). Reclasificada posteriormente como *S. costicola* subsp. *costicola* ésta se siguió empleando como modelo en estudios de osmorregulación y mecanismos fisiológicos en bacterias halófilas moderadas (Oren, 2002; 2003; Amoozegar y col., 2008).

El lípido A es un lipopolisacárido ubicado en la membrana microbiana siendo de los primeros en entrar en contacto con el hábitat externo, por ello posee un papel clave en los mecanismos de adaptación de los

microorganismos extremófilos. Carillo y col. (2013a; 2013b) llevaron a cabo un estudio en la cepa *Salinivibrio sharmensis* BAG^T (previamente descrita por ellos), en la cual observaron que, gracias a la acilación del lípido A pasando de di- a hexa-acilo podría estar conectado a la estructura supramolecular de su membrana manteniendo la supervivencia de esta bacteria, cuando entra en contacto con un hábitat externo.

En 1997, Hamana llevó a cabo un estudio sobre los patrones de distribución de poliaminas que presentaban algunas familias dentro de la clase *Gammaproteobacteria*. Las poliaminas son moléculas de naturaleza policatiónica presentes en plantas, animales y microorganismos que afectan a aspectos del desarrollo, crecimiento y respuesta a estrés. Éstas son biosintetizadas a partir de la cadaverina y por transferencia de un grupo aminopropilo proporcionado por una molécula de S-adenosil metionina descarboxilada. En este estudio se realizó una caracterización quimiotaxonómica para clasificar a estos miembros según el patrón de poliaminas que presentaban. Uno de los géneros objeto de estudio fue el género *Salinivibrio*, el cual presentó putrescina, diaminopropano, cadaverina y noespermidina, este último de forma limitada, pero no espermidina, triamina ni agmantina.

Los miembros del género *Salinivibrio* presentan una estrategia de osmoregulación *salt-out* acumulando en su citoplasma solutos compatibles, que pueden biosintetizar o captar del medio externo. Debido al gasto de energía que supone la síntesis de estos compuestos, siempre que sea posible serán captados del medio externo (Ashengroph, 2017).

Para hacer frente al estrés osmótico debido a las altas salinidades, las bacterias halófilas generalmente sintetizan solutos compatibles como estrategia de osmoadaptación (Brown, 1976). Estos solutos compatibles son útiles en aplicaciones biotecnológicas para su uso como productos químicos respetuosos con el medio ambiente, ya que poseen una potente capacidad protectora de las enzimas y células frente a diferentes tipos de estrés tales como la sal, el calor, la congelación y la desecación (Da Costa y col., 1998). En el género *Salinivibrio* la ectoína, glicina betaína y glutamato se consideran importantes solutos compatibles (Romano y col., 2005). Un

ejemplo de ello son los trabajos llevados a cabo por Zhu y col. (2008; 2010) que estudiaron la síntesis o captación de solutos compatibles por parte de "*Salinivibrio costicola* subsp. *yanie*", para su supervivencia en ambientes hipersalinos. Se observó que esta cepa utilizaba dos estrategias: (i) producción de ectoína o bien; (ii) obtención de glicina betaína del medio exterior. Cuando la ruta de la síntesis de la ectoína se encontraba inactiva, la célula capta glicina betaína del medio, siendo por tanto esta segunda estrategia una alternativa a la primera. Cuando se exponía a la cepa a concentraciones salinas bajas, era el glutamato (el precursor de la ectoína) el que actuaba como soluto compatible.

I.4.3. Genética y genómica

El contenido en G+C del ADN de los miembros del género *Salinivibrio*, determinado mediante el cálculo de la temperatura media de desnaturalización (T_m) oscila entre el 49,0 y el 51,0 moles% (Romano y col., 2011).

Un estudio pionero sobre la organización genómica de los microorganismos halófilos fue realizado por Mellado y col. (1997), en el cual se determinó el tamaño del genoma de *Salinivibrio costicola* E-367 mediante electroforesis en campo pulsado después de la digestión con endonucleasas de restricción. Cuando se usó la enzima *SfiI*, el tamaño fue de 2,5 Mb; mientras que cuando se empleó la enzima *MboI* el tamaño fue de 2,2 Mb; observándose que el tamaño era parecido a otros microorganismos halófilos como la bacteria *Vibrio cholerae* (Choudhury y col., 1994) o la arquea *Haloferax mediterranei* (López-García y col., 1992).

En 2011, Yang y col., realizaron un estudio en cepas de la familia *Vibrionaceae* con el objetivo de detectar una serie de moléculas de señalización del *quorum sensing* (QS). En conclusión, se encontraron una gran diversidad y complejidad en cuanto a las moléculas QS difundidas ampliamente en esta familia. Muchas de estas moléculas no se detectaron en la especie *S. costicola* subsp. *costicola*.

En 2013, se realizó por primera vez un estudio genómico del género *Salinivibrio*. Este genoma pertenecía a la especie tipo del género *S. costicola* subsp. *costicola*, cuyo tamaño del genoma fue de 3,38 Mb, bastante superior al que aportó Mellado y col. en 1997; este genoma poseía una cobertura de 29 x, un G+C de 49,3 %, un total de 83 ARNt, 20 ARNr y un solo cromosoma (Dikow y col., 2013). Un año más tarde, se aislaron tres cepas pertenecientes al género *Salinivibrio* del lago Socompa, Argentina. A estas tres cepas a las que se denominaron "*Salinivibrio socompensis*" S10B, S34 y S35, se les secuenció su genoma; cuyo tamaño fue de 4,78 Mb, 3,35 Mb y 3,33 Mb, respectivamente. La cobertura estimada de estos genomas fue de 13, 15 y 17 x, con un contenido en G+C de 49,5, 49,4 y 49,5 %. Una vez anotados las cepas S10B, S34 y S35 se identificaron 3.429, 3.979 y 3.477 genes codificadores de proteínas (CDS), en todas ellas solo se encontró un cromosoma. En estos genomas se encontraron genes involucrados en la reparación del ADN tales como las enzimas helicasa/nucleasa RecBCD y la endonucleasa UvrABC. También se localizaron genes responsables de la resistencia al arsénico como *arsDAC*, éstos no habían sido encontrados en el genoma de *S. costicola* subsp. *costicola*. En cuanto a genes relacionados con la osmorregulación se encontraron de la ectoína *EctABC*, de la colina y de la betaína *BetABT*. Además también se encontraron genes relacionados con la xantorrodopsina, *XR* (Gorriti y col., 2014).

En cuanto a virus, el halofago CW02 infectó a la cepa *Salinivibrio costicola* SA50; después de su caracterización, se situó a este fago dentro del supergrupo T7, miembros localizados en diversos ambientes acuáticos incluidos salinos. La morfología del halofago CW02 posee similitudes con los virus de la familia Podoviridae. La cápside de CW02 consistía en un bacteriófago lambda *gpD*. Su adaptación a medios extremos era similar a la que presentaban otros virus que habían infectado a arqueas como es el caso de *Sulfolobus turreted* (Shen y col., 2011; Hardies y col., 2013).

I.4.4. Ecología y diversidad

Los representantes del género *Salinivibrio* habitan en diversos ambientes acuáticos hipersalinos, alimentos en salazón y salmueras salinas y también se pueden encontrar, aunque en menor medida, en suelos salinos (Mellado y col., 1996; Chamroensaksri y col., 2009).

Dentro de los ambientes hipersalinos, Caton y col. (2004) realizaron un estudio de diversidad microbiana en el Gran Llano de sal de Oklahoma, donde a partir de muestras al 10 % de sales, aislaron diversos grupos de bacterias heterótrofas; entre los géneros más representativos de bacterias Gram-negativas se aislaron miembros del género *Salinivibrio*. Un año más tarde, Yeon y col. (2005) estudiaron la diversidad de bacterias organotróficas en los estanques de agua salada situados en la localidad de Taean-Gun, provincia de Chungnam, Corea. Utilizando medios de cultivo con un 2 y 20 % de sales para inocular las muestras tomadas, encontraron que dentro del grupo de las Gammaproteobacterias, el género *Salinivibrio* constituía la población más predominante, siendo la especie *Salinivibrio costicola* subsp. *costicola* la que mayor número de aislados consiguió.

El Lago Rojo es un lago salino formado como consecuencia de la disolución de la masa salina de las montañas de Gurghiu en Rumania. El agua del lago posee aproximadamente un 15 % de sales y un pH entre 8,8-8,9. En 2013, Borsodi y col. estudiaron la diversidad filogenética de los procariotas que habitaban tanto en el agua como en los sedimentos de dicho lago. En las muestras de agua se observó que el género *Salinivibrio* se encontraba en bastante abundancia junto con otros géneros como *Halomonas* y *Marinobacter*, en especial la especie *Salinivibrio costicola* subsp. *alcaliphilus*.

En 2014, Al-Maillem y col., realizaron un estudio de la diversidad microbiana presente en el suelo y agua de dos zonas costeras hipersalinas en Kuwait. Estas zonas se caracterizan, además de su elevada concentración de sales, por ser suelos con alto contenido en carbono. Tras realizar varios muestreos tanto de suelo como de agua uno de los géneros que más aislaron fue el género *Salinivibrio* y en concreto la especie *Salinivibrio siamensis*.

Recientemente, Zhang y col. (2017) estudiaron la variación de la comunidad bacteriana en ecosistemas naturales de humedales, río y mar (desde el Río Amarillo hasta el Mar de Bohai, en China); aislando un buen número de miembros de *Salinivibrio* en los humedales costeros pero no en el río Amarillo o en el mar de Bohai; la variación espacial en la comunidad bacteriana se correlacionó con el pH, la salinidad y la concentración de sulfato (SO_4^{2-}) en tales ambientes costeros. Por otro lado, Fernández-Delgado y col. (2017) ha aislado cepas pertenecientes al género *Salinivibrio* de las lagunas tropicales del Mar Caribe.

Tkavc y col. (2011) estudiaron la heterogeneidad bacteriana asociada a especímenes de *Artemia* spp. (tanto adulta como nauplios). Para ello se tomaron muestras de diferentes estanques, a diferentes concentraciones salinas (5,5, 11, 13,8 y 30,7 %) de las salinas solares de Eilat, en Israel. Se observó que en los nauplios de *Artemia*, la población de *Salinivibrio* era la predominante en las muestras con 11 y 13,8 % de salinidad junto con representantes del género *Halomonas*, en las muestras al 30,7 % ambos géneros disminuían considerablemente; y en el 5,5 % de salinidad no se encontraron miembros del género *Salinivibrio*. Esto mismo ocurría en el estadio adulto pero en mucha menor proporción, encontrándose miembros del género *Salinivibrio* al 11 y 13,8 % y en mucha menor medida al 30,7 %.

En 2013, Riddle y col. realizaron una identificación de microorganismos en una especie de camarón denominada *Artemia franciscana*. Para ello tomaron muestras de dos puntos, uno de la Bahía de San Francisco, y otro del Gran Lago Salado. Para este trabajo se utilizaron tanto camarones adultos como quistes (embriones) de camarón. Se observó que, en los quistes de camarón, tanto de la Bahía de San Francisco como del Gran Lago Salado, la población dominante era de *Salinivibrio* junto con *Idiomarina*, mientras que en el camarón adulto y en el agua ambos géneros estaban ausentes; llegaron a la conclusión de que la diversidad microbiana difería según el estadio en el que se encontraba *Artemia Franciscana*.

Xiao y col. (2008) estudiaron la diversidad presente en una anémona de mar recogida de las aguas costeras de la isla de Naozou en el Mar de China Meridional. Aislaron una gran proporción de cepas de la clase

Gammaproteobacteria, constituyendo el 33 % de todos los aislados, siendo el género *Salinivibrio* uno de los predominantes dentro de esta clase. Un año más tarde Huang y col. (2009) examinaron la heterogeneidad bacteriana presente en un erizo de mar recogido de la misma isla que el estudio anteriormente mencionado, isla de Naozbou. Obtuvieron también un alto porcentaje de aislados de la clase *Gammaproteobacteria*, y especialmente del género *Salinivibrio*.

En Corea, Lee y col. (2014) investigaron los efectos de la concentración de sal en la fermentación del camarón salado "*saeu-jeot*" y como afectaba a la diversidad microbiana. Utilizaron muestras a diferentes concentraciones de sal (del 20, 24, 28 y 32 %), observándose que en todo momento la comunidad bacteriana era superior a la de arqueas. En la muestra al 20 % se observó que, durante la fase de fermentación inicial, la comunidad de *Salinivibrio* era la predominante, disminuyendo de forma considerable a los 10 días de la fermentación y dejando paso a otros géneros como *Halanaerobium* el cual se asoció como inicio de putrefacción debido a la producción de glicerol, acetato y butirato entre otros.

El *myeolchi-aekjeot* es una salsa de pescado hecha a base de anchoas fermentadas, típica de Corea. Lee y col. (2015) estudiaron la comunidad bacteriana presente en esta salsa durante el proceso de fermentación, para ello utilizaron tres tipos de salsa, cada una de ella se difería de la otra por el tamaño de anchoa usado; se encontró que, en la salsa con las anchoas de menor tamaño, la población de *Salinivibrio* era predominante a partir de una semana, coincidiendo con el comienzo de la fermentación, pero tras 28 días esta población de *Salinivibrio* desaparecía dejando paso a otros géneros como *Tetragenococcus* y *Halanaerobium*, que se mantuvieron presentes hasta el final de la fermentación.

Zhang y col. (2016) estudiaron, mediante aproximaciones metagenómicas y técnicas dependientes de cultivo, la diversidad microbiana presente en un producto fermentado de China denominado Yucha, compuesto por arroz cocido y pescado fresco. Se concluyó que el género *Salinivibrio* constituía una de las poblaciones predominantes en este tipo de producto fermentado.

I.4.5. Aplicaciones biotecnológicas

Las proteasas microbianas se encuentran dentro de las enzimas hidrolíticas más importantes y han sido ampliamente estudiadas (Gupta y col., 2002). Estas proteasas representan uno de los tres grandes grupos de enzimas industriales y constituyen aproximadamente el 60 % de ventas totales de enzimas (Rao y col., 1998). Estas enzimas tienen numerosas aplicaciones en la producción industrial de detergentes, alimentos, productos farmacéuticos, cueros y reactivos de diagnóstico (Gupta y col., 2002). Diversos estudios llevados a cabo en el género *Salinivibrio* han mostrado que este género es un productor nato de estas enzimas (Sánchez-Porro y col., 2003a, 2003b; Amoozegar y col., 2007), concluyendo por tanto, que este género sea un candidato para su utilización en procesos biotecnológicos, tales como el tratamiento de aguas salinas o soluciones residuales con materiales proteicos y contenidos en sal. Se ha observado que la mayor secreción de proteasa se realiza al final de su fase exponencial de crecimiento (Amoozegar y col., 2007; Badoei-Dalfard y col., 2010). Lama y col. (2005) observaron que en *S. costicola* subsp. *costicola* 18AG la enzima proteasa alcanzaba su máxima producción cuando al medio salino se le adicionaba un 10 % de gelatina. En el año 2013, Karbalaeei-Heidari y col. aislaron una proteasa capaz de tolerar disolventes orgánicos y líquidos iónicos, ideal para su uso en la industria biotecnológica.

Nuestro grupo de investigación ha realizado estudios acerca de la diversidad de bacterias halófilas moderadas con actividad hidrolasa, entre las que se obtuvieron cepas del género *Salinivibrio* aisladas de diferentes ambientes acuáticos hipersalinos. Entre las enzimas hidrolíticas presentes en los aislados del género *Salinivibrio* se encontraron amilasas, ADNsas, lipasas, proteasas y pululanasas (Sánchez-Porro y col., 2003a, 2003b).

Salinivibrio, como uno de los géneros más importantes asociados a *Artemia* spp., es conocido productor de quitinasas (Aunpad y Panbangred, 2003), de metaloproteasas extracelulares de zinc aisladas inicialmente de la cepa *Salinivibrio proteolyticus* (Karbalaeei-Heidari y col., 2006; 2008; Amoozegar y col., 2008b; Badoei-Dalfard y col., 2010; Beigi y col., 2012; Borhani y col., 2016) y metaloproteasas de serina (Karbalaeei-Heidari y col., 2007), de lipasas

termohalofílicas ideales para procesos industriales en los que se requiera altas temperaturas y concentraciones de sal (Amoozegar y col., 2008a), de queratinasas (Herzog y col., 2016) y de celulasas (Wang y col., 2009; Selvarajan y col., 2017), todas ellas idóneas para aplicaciones industriales.

En 2011, Xue y col., investigaron la producción de 2,3-butanodiol y ácido succínico, en condiciones anaeróbicas, a partir de una cepa perteneciente al género *Salinivibrio*, a la que denominaron *Salinivibrio* YS, aislada del lago Aydingkol, en China.

Selvarajan y col. (2017), utilizando la cepa *Salinivibrio* sp. SP9, aislada de una salina solar de Sudáfrica, demostraron su actividad frente al benzantraceno. Además en este mismo estudio se comprobó que esta cepa, *Salinivibrio* sp. SP9 producía el compuesto hexahidro-3-(2-metilpropil) pirrolo [1,2a] pirazina-1,4-diona, comúnmente empleado como antimicrobiano de amplio espectro para el tratamiento de algunas infecciones por bacterias, hongos y nematodos (Mohan y col., 2016). Este compuesto también se ha demostrado que tienen propiedades anticancerígenas (Rabha y col., 2015).

El trabajo de Ashengroph (2017), mostró que la cepa *Salinivibrio costicola* GL6 aislada del lago Hoz Soltan en Irán es capaz de transformar la cafeína en dos metabolitos: teobromina y paraxantina, siendo el rendimiento del primero mucho más alto.

II. Objetivos

El género *Salinivibrio* fue propuesto en 1996 por Mellado y col., para reclasificar la especie *Vibrio costicola* basándose en la comparación de la secuencia del gen ARNr 16S y en las diferencias fenotípicas y genotípicas existentes entre esta bacteria halófila y las demás especies del género *Salinivibrio*.

El género *Salinivibrio* pertenece a la familia *Vibrionaceae.*, dentro de la clase *Gammaproteobacteria*. Todos los miembros de este género son microorganismos Gram-negativos, la mayoría crecen entre el 3 y el 15 % de sales, siendo por tanto, bacterias halófilas moderadas, a temperaturas entre 25 y 40 °C y a valores de pH entre 7,0-8,0. Presentan una morfología de bacilos curvados y son móviles gracias a la presencia de un flagelo polar en uno de sus extremos. Una característica importante es que son anaerobios facultativos. Su rango de G+C del ADN varía desde 49,0 a 51,0 moles% (Romano y col., 2011).

Hasta abril de 2017, este género incluía sólo cuatro especies, una de ellas con tres subespecies. Éstas se han aislado de diversos hábitats, tales como costillas de cerdo en salazón, lagos salinos, producto de pescado fermentado o del Valle de la Muerte en Estados Unidos, reflejando por tanto su amplia biodiversidad (Mellado y col., 1996; Huang y col., 2000; Romano y col., 2005; 2011; Amoozegar y col., 2008; Chamroensaksri y col., 2009).

El marcador filogenético más ampliamente empleado hasta la fecha es el gen ARNr 16S; sin embargo, su poder de resolución interespecífico es muy reducido, de tal forma que no permite distinguir, en muchos casos, especies muy próximas filogenéticamente. Por ello, en los últimos años se han realizado estudios por secuenciación multilócica (MLSA) en la familia *Vibrionaceae*, dado que el gen ARNr 16S ha mostrado no ser un marcador filogenético útil para esta familia (Thompson y col., 2005; 2008; Pascual y col., 2010; Sawabe y col., 2013; Gabriel y col., 2014; González-Castillo y col., 2014; 2015; 2016; Tarazona y col., 2014; 2015; Gao y col., 2016; Pérez-Cataluña y col., 2016). Hasta la fecha no existe ningún estudio filogenético detallado del género *Salinivibrio*, además de disponer de una colección de cepas gracias al fácil aislamiento de este género, que puedan aportar variabilidad intraespecífica y que sirva como modelo de bacterias halófilas;

se propone a este género como un candidato óptimo dentro de las bacterias halófilas para realizar un estudio MLSA y comprobar su utilidad en este grupo taxonómico.

Debido al gran avance en los últimos años de las técnicas de secuenciación genómica y su fácil acceso, hemos incorporado a nuestros estudios de taxonomía la utilización de técnicas genómicas a fin de una mejor discriminación y conocimiento de los taxones.

En la presente Tesis Doctoral pretendemos realizar un estudio filogenético y genómico del género *Salinivibrio*, incluyendo tanto las especies y subespecies de este género descritas hasta la fecha, como nuevos aislados obtenidos de ambientes hipersalinos naturales.

De forma más concreta, los objetivos del presente trabajo son los siguientes:

1. Realizar un aislamiento y caracterización taxonómica de cepas a partir de muestras tomadas de varias salinas localizadas en diferentes sitios geográficos y en distintas épocas del año, con la finalidad de obtener una colección de cepas ambientales del género *Salinivibrio*, así como la posibilidad de describir nuevas especies de este género.
2. Realizar un estudio de tipificación molecular con el objetivo de analizar si las cepas aisladas de un mismo ambiente y estrechamente relacionadas desde el punto de vista filogenético poseen patrones de bandas que permitan diferenciarlas, así como descartar la posibilidad de que las cepas constituyan clones.
3. Evaluar la capacidad de resolución taxonómica que presentan un conjunto de genes *housekeeping* (*gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD*) de manera individual así como concatenando sus secuencias (MLSA) para inferir de forma más precisa en la historia evolutiva de las especies de *Salinivibrio*, teniendo en cuenta posibles fenómenos de transferencia horizontal de genes (THG) y poder así realizar una clasificación e identificación más precisa de estos taxones.

4. Evaluar el grado de correlación entre el MLSA desarrollado en la presente Tesis Doctoral y la técnica de hibridación ADN-ADN (DDH), a fin de validar este estudio MLSA como método alternativo para la circunscripción de especies del género *Salinivibrio*.
5. Esclarecer la posición taxonómica de las especies y subespecies del género *Salinivibrio* mediante un estudio polifásico, haciendo uso del análisis MLSA, de la caracterización fenotípica, de la hibridación ADN-ADN, de estudios de tipificación molecular, de la filogenómica y de una serie de índices genómicos.
6. Evaluar la capacidad de resolución taxonómica que presenta un análisis mediante MALDI-TOF MS y su utilidad para clasificar las cepas de éste género, comparándolo con las técnicas moleculares mencionadas en puntos anteriores.
7. Secuenciar el genoma de un conjunto de cepas del género *Salinivibrio* que posibilite su análisis genómico comparativo permitiendo un conocimiento más detallado de su organización genómica, metabolismo y relaciones con el medio externo de los microorganismos de éste género.
8. Estudiar la distribución y diversidad de cepas del género *Salinivibrio* en ambientes hipersalinos de nuestro planeta mediante estudios de reclutamiento genómico.

III. Material y Métodos

III.1. MUESTREOS AMBIENTALES, MEDIOS DE AISLAMIENTO Y CEPAS BACTERIANAS

III.1.1. Muestreos y tratamiento de las muestras

Con el objetivo de obtener una colección de cepas del género *Salinivibrio* geográficamente dispersas así como la posibilidad de describir nuevas especies dentro de este género, se realizaron muestreos de agua procedente de ambientes hipersalinos, en concreto de salinas solares situadas en distintas áreas tanto de la geografía española como en Puerto Rico (Tabla III.1). La concentración salina de las muestras de agua se determinó con un refráctometro Atago S-28 y el pH mediante un pH-metro Basic 20 (Crison).

Para la toma de muestras se utilizaron recipientes estériles y se transportaron al laboratorio en un breve espacio de tiempo (3-4 horas siguientes a su recogida) y, seguidamente, se procedió a su siembra en diferentes medios de cultivo.

Tabla III.1. Características geográficas y fisicoquímicas y localización de los puntos de muestreo.

Salinas	Localización		Salinidad (%)	pH	Fecha de muestreo
	Latitud (°)	Longitud (°)			
Aragonesas (Huelva)	37,19	-6,921	6-16	7,2-8,3	May-2013
Isla Bacuta (Huelva)	37,27	-6,99	5-20	7,1-8,1	Oct-2011 Ene-2013 May-2013 Sep-2013
Isla Cristina (Huelva)	37,20	-7,32	17-21	7,5-7,6	Oct-2011
Santa Pola (Alicante)	38,19	-0,56	5- 19	7,4-8,0	Nov-2011
Es Trenc (Mallorca)	39,33	2,98	12	7,4	Nov-2011
La Malahá (Granada)	37,10	-3,72	5-15	7,2-7,6	Nov-2012 Nov-2013
Bañaderos (Gran Canaria)	27,84	-15,41	6,5-16	7,2-7,4	Sep-2013
Cabo Rojo (Puerto Rico)	18,08	-67,14	8-19	7,1-8,0	Sep-2013

III.1.2. Medios de cultivo

Con el fin de obtener la mayor representación posible de cepas del género *Salinivibrio* que pudieran encontrarse en estado viable en las muestras, se utilizaron diferentes medios de cultivo, todos ellos partiendo de una solución de sales al 30 % y suplementados con diferentes fuentes de carbono.

Solución de sales al 30 %

Consiste en una solución de diferentes sales con una concentración final del 30 % respetando las proporciones relativas al agua de mar, con una ligera disminución en las concentraciones de CaCl_2 y NaHCO_3 , que se añaden al final y por separado para evitar la precipitación de las mismas. Este stock de sales se utiliza como base en la preparación de diversos medios de cultivo y a partir del mismo se realizan diluciones para obtener diferentes concentraciones de sales a las cuales se le añaden los diferentes nutrientes. La composición de la solución de sales al 30 % es la siguiente (Subov, 1931):

NaCl	234,0 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	39,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	61,0 g
KCl	6,0 g
NaBr	0,7 g
NaHCO_3	0,2 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Medios PS, AC y GL

Estos medios se emplearon el fin de obtener una colección de cepas del género *Salinivibrio*. Preparados a partir de la solución de sales al 30 % diluido hasta el 15 % de sales. Se han diseñado tres medios con distintas fuentes de carbono. Estos medios se denominan: **medio PS** (con 10 mM de piruvato sódico); **medio AC** (con 10 mM de acetato cálcico); y **medio GL** (con 10 mM de glicerol). A cada uno de estos medios se le adicionó extracto de levadura a diferentes concentraciones, concretamente al 0,01 %, 0,05 % y

..... **III. Material y métodos**

0,1 %. El pH se ajustó entre 7,2-7,4 con una solución 1 M de NaOH y el medio se solidificó mediante la adición de agar al 1,8 % (p/v).

Medio SW 7,5

Este medio se preparó a partir del stock de sales diluido al 7,5 % y suplementado con un 1,5 % (p/v) de extracto de levadura y un 1,8 % (p/v) de agar, ajustando el pH entre 7,2-7,4. Este medio fue el seleccionado, una vez obtenida la colección de cepas del género *Salinivibrio*, como medio de cultivo óptimo para el crecimiento de estas cepas, por lo que se usó también como medio de mantenimiento.

Medio 1

Este medio se empleó para el crecimiento de las cepas para la determinación de los ácidos grasos. Su composición es la siguiente (g/L): extracto de levadura 10,0; NaCl 100,0; Na₃-citrato 3,0; Na₂CO₃ 3,0; KCl 2,0; MgSO₄·7H₂O 1,0; MnCl₂·4H₂O 0,00036; FeSO₄ 0,05; agar 18 (Romano y col., 2011).

III.1.3. Métodos de aislamiento

Se inocularon 100 µl de las muestras de agua provenientes de los estanques de las salinas en los medios PS, AC y GL, extendiéndose con una espátula esterilizada previamente. Se realizaron diluciones seriadas al décimo en solución de NaCl estéril al 10 % hasta 10⁻⁴. Estas siembras también se realizaron inoculando un volumen de 100 µl por cada una de las diluciones.

Las placas ya inoculadas se incubaron a 37 °C durante una semana en una cámara de anaerobiosis Oxoid; posteriormente se observaron las colonias crecidas al microscopio para seleccionar aquellas que tuvieran forma de bacilos curvados. Estas colonias se volvieron a sembrar en placas en condiciones de aerobiosis protegidas en bolsas de plástico a fin de prevenir la evaporación y desecación del medio.

III.1.4. Material biológico

Cepas aisladas

En el presente trabajo se aislaron un total de 288 cepas de las cuales 70 correspondían a cepas pertenecientes al género *Salinivibrio*.

Cepas de colección

Para llevar a cabo este estudio se han utilizado como referencia las cepas tipo de las especies y subespecies del género *Salinivibrio* ya descritas, todas ellas procedentes de colecciones de cultivo (Tabla III.2).

Tabla III.2. Cepas de colección del género *Salinivibrio* utilizadas en este estudio.

Cepa	Referencia
<i>S. costicola</i> subsp. <i>costicola</i> CECT 4059 ^T	Mellado y col. (1996)
<i>S. costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 19052 ^T	Romano y col. (2005)
<i>S. costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285 ^T	Huang y col. (2000)
<i>S. proteolyticus</i> DSM 19052 ^T	Amoozegar y col. (2008)
<i>S. sharmensis</i> DSM 18182 ^T	Romano y col. (2011)
<i>S. siamensis</i> JCM 14472 ^T	Chamroensaksri y col. (2009)

III.1.5. Conservación de las cepas bacterianas

La conservación de las cepas se realizó mediante resiembras en tubos de agar inclinado en el medio de cultivo óptimo (medio SW 7,5) para el crecimiento de las mismas. De forma paralela, todas las cepas se conservaron mediante congelación a -80 °C en el medio líquido adecuado conteniendo glicerol al 20 % (v/v).

III.2. MANIPULACIONES DEL ADN GENÓMICO

El ADN genómico de las cepas aisladas se extrajo utilizando distintas metodologías según los ensayos posteriores que se fuesen a llevar a cabo. Posteriormente fue purificado, cuantificado y se comprobó su integridad y pureza.

..... III. Material y métodos

III.2.1 Extracción de ADN

Método del choque hipoosmótico y térmico

Este método se utilizó para extracciones de ADN a pequeña escala de todas las cepas aisladas para la posterior amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S. Para ello se tomó con un palillo estéril una pequeña cantidad de cultivo en medio sólido y se resuspendió en 50 µl de agua miliQ, creando así un ambiente hipoosmótico que produjo la turgencia de la célula y, por consiguiente, la liberación al medio del ADN. A continuación, se hirvió durante 10 segundos en baño María para completar la lisis de las células y extraer así la totalidad del ADN.

Método de Marmur

El método de Marmur (1961) se empleó para la extracción del ADN genómico a fin de realizar los estudios de hibridación ADN-ADN y las determinaciones del contenido en Guanina más Citosina (G+C) del ADN de las distintas cepas microbianas. El protocolo seguido fue el que se muestra a continuación:

1. Obtención de células: a partir de 1000 ml de un cultivo líquido del microorganismo, centrifugar (Centrifuge 5810 R eppendorf) durante 10 minutos a 9500 g. Eliminar el sobrenadante.
2. Lavado de células: Resuspender las células en 100 ml de EDTA salino (EDTA, 33,62 g/l y NaCl, 8,7 g/l en agua destilada, pH 8,0).
3. Lisis celular:
 - a. Añadir 10 mg de lisozima.
 - b. Incubar 30 minutos a 37 °C.
 - c. Añadir 10 ml de SDS al 25 % (p/v).
 - d. Incubar en baño María a 60 °C durante 10 minutos.
 - e. Añadir 20 ml de NaClO₄ 5 M.
4. Desproteínización:
 - a. Añadir un volumen de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1).
 - b. Agitar vigorosamente hasta mezclar las fases. Durante la agitación, permitir la salida de los gases de cloroformo generados.

- c. *Dejar reposar a temperatura ambiente al menos 30 minutos para que se separen las fases.*
 - d. *Centrifugar a 7500 g durante 10 minutos.*
 - e. *Extraer la fase acuosa. Repetir la desproteínización tantas veces como sea necesario hasta obtener una fase acuosa limpia.*
5. Precipitación del ADN:
- a. *Colocar la fase acuosa en un vaso de precipitado de cristal.*
 - b. *Añadir 2 volúmenes de alcohol 96 ° frío sobre la fase acuosa dejándolo deslizar por las paredes.*
 - c. *Extraer las fibras de ADN enrollándolas en una varilla de vidrio fina (Figura III.01.A).*
 - d. *Disolverlas en tampón 0,1x SSC preparado a partir de un stock 20x SSC (NaCl, 175,3 g; C₆H₅Na₃O₇, 88,2 g; agua destilada, c.s.p. 1000 ml).*
6. Tratamiento con ARNasa:
- a. *Añadir 500 µl de una solución de ARNasa (ARNasa, 2 mg/ml y NaCl, 16 mg/ml en agua destilada Calentar 10 minutos a 100 °C para eliminar la acción de posibles ADNasas. Conservación a 4 °C o -20 °C).*
 - b. *Calentar a 37 °C durante 30 minutos.*
 - c. *Volver a realizar los pasos correspondientes a la desproteínización y precipitación del ADN hasta obtener un sobrenadante claro.*
7. Conservación del ADN: *El ADN resultante del tratamiento con ARNasa y posterior desproteínización y precipitación se conserva en tampón 0,1x SSC a 4 °C (para períodos cortos de tiempo) o bien a -80 °C (para períodos largos de tiempo) (Figura III.01.B).*

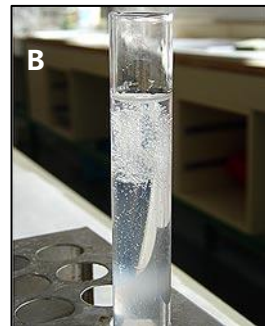
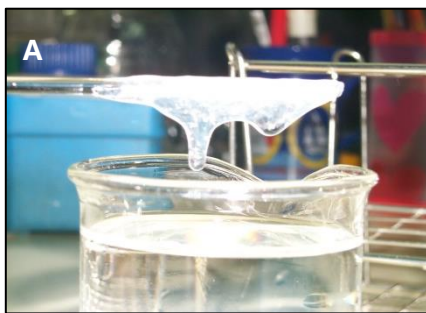


Figura III.01. A, ADN genómico extraído mediante el método de Marmur. B, ADN genómico disuelto en 0,1x SSC.

..... III. Material y métodos

Uso de kit comercial

Para la amplificación y secuenciación de los genes *housekeeping* así como para la obtención de las secuencias genómicas se requirió un ADN de elevada pureza, por lo que se utilizó el kit de extracción G-spin™ Total (Intron Biotechnology) en el caso de los genes *housekeeping* y el QIAamp DNA Mini Kit (QUIAGEN) para las secuencias genómicas. En ambos casos se siguieron las indicaciones del fabricante.

III.2.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Tras la extracción de ADN y con el objetivo de observar la integridad del mismo, se procedió a la visualización del ADN mediante una electroforesis en gel de agarosa. Para ello, se prepararon geles horizontales de agarosa (Seakem, LE Agarose) a concentraciones entre el 1,0 y el 1,5 % (p/v) de agarosa, en función del tamaño del fragmento de ADN que se quería observar; así, la concentración de agarosa se incrementó cuanto menor fuera el tamaño del fragmento de ADN. La preparación del gel se realizó disolviendo la agarosa en tampón TAE 1x (preparado a partir de un stock de tampón TAE 50x: ácido acético glacial, 57,1 ml; 100 ml EDTA 50 mM, pH 8,0; tris-base, 242 g y agua destilada, c.s.p. 1000 ml) y 2,8 µl de bromuro de etidio (EtBr) (Promega). Una vez solidificado el gel se colocó en la cubeta de electroforesis y se sumergió en el mismo tampón. Una alícuota de la muestra de ADN, normalmente 5 µl, se mezcló con tampón de carga (azul de bromofenol 0,25 % p/v y glicerol 30 %) y se cargó en el gel una vez solidificado.

El EtBr se intercala en la doble cadena del ADN y permite su visualización tras la exposición del gel a la luz ultravioleta a 360 nm (Sambrook y Russell, 2001), para lo cual se utilizó un transiluminador (TFP-M/WL). El patrón de pesos moleculares que se utilizó fue 1 kb DNA ladder (Invitrogen) (Figura III.02).

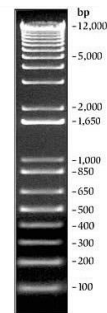


Figura III.02. Patrón de pesos moleculares de 1 Kb DNA ladder (Invitrogen).

III.2.3. Determinación de la concentración y pureza del ADN

Para determinar la concentración del ADN se utilizó el método de cuantificación por fluorescencia del bromuro de etidio en geles de agarosa (Sambrook y Russell, 2001), mediante la comparación visual de la intensidad luminosa de las bandas de ADN después de la electroforesis con un patrón de concentraciones conocidas. Cuando se requirió determinar con mayor precisión la concentración de las muestras de ADN se utilizaron espectrofotómetros Nanodrop (Thermo Scientific) (Figura III.03.A) y Lambda 20 (Perkin-Elmer) (Figura III.03.B), midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm. En el caso de aquellas muestras a las cuales se les iba a realizar la secuenciación genómica, se hizo uso de un fluorímetro modelo QuantiFluor ST Fluorometer de Promega.

Para determinar la pureza del ADN se midió la absorbancia a 280, 260 y 230 nm y se calcularon los cocientes A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} con el objetivo de detectar la presencia de posibles contaminantes en las muestras. Los contaminantes orgánicos absorben a 230 nm y las proteínas a 280 nm, mientras que el ADN absorbe a 260 nm. En general, se acepta que un ADN es puro cuando los cocientes A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} son $\sim 1,8$ y $\sim 2,0$, respectivamente (Wilfinger y col., 1997).

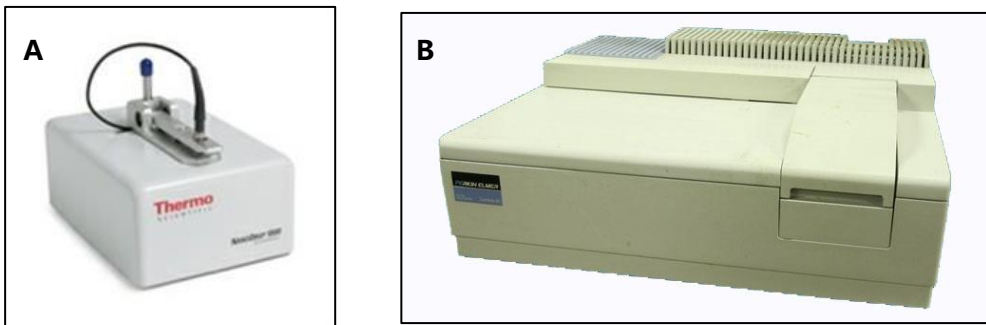


Figura III.03. A, Espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific). B, Espectrofotómetro Lambda 20 (Perkin-Elmer).

III.3. AMPLIFICACIÓN DEL ADN MEDIANTE PCR

Para la amplificación de los genes de interés se utilizó la técnica de la PCR siguiendo las indicaciones de Sambrook y Russell (2001), usando los termocicladores GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) y Mastercycler Ep (Eppendorf).

Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes finales de 50 µl utilizando tubos de microcentrífuga de 0,2 ml previamente esterilizados. La enzima empleada fue la ADN polimerasa modificada de *Thermus aquaticus* (Lawyer y col., 1989), *Taq* ADN polimerasa (Promega, Eppendorf y Dominion). El protocolo general de las reacciones de PCR, con diversas modificaciones según los casos, es el que se muestra a continuación:

Tampón de reacción 10x.....	5,0 µl
MgCl ₂ (25 mM).....	2,5 µl
dNTPs (1,25 mM cada dNTP).....	8,0 µl
Cebador directo (12 µM).....	2,5 µl
Cebador reverso (12 µM).....	2,5 µl
ADN (50 ng/µl).....	5,0 µl
<i>Taq</i> ADN polimerasa (5 U/µl).....	0,5 µl
Agua estéril c.s.p.....	50 µl

Los distintos cebadores empleados en las reacciones de amplificación mediante PCR en el presente trabajo se detallan en la Tabla III.3.

Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo de forma general (con modificaciones según el caso) de acuerdo al siguiente esquema:

- Desnaturalización inicial del ADN molde: 5 minutos a 95 °C.
- 25-35 ciclos en los que se repiten tres fases:
 - Desnaturalización: 30 - 60 segundos a 94 °C.
 - Hibridación de los cebadores: normalmente la temperatura de hibridación se ajustó 5 °C por debajo de la temperatura media de desnaturalización (T_m) más baja de los dos cebadores.
 - Elongación: se recomienda una temperatura de 68 ó 72 °C y un tiempo de 1 min/Kb.

- Elongación final: 10 minutos a 68 ó 72 °C, con el objetivo de conseguir la elongación completa de los productos de la reacción.
- Finalmente, las muestras se conservan a 4 °C.

Tabla III.3. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S y de los genes *housekeeping gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD*. Las secuencias de los cebadores se muestran de acuerdo al código de la IUPAC para la denominación de nucleótidos ambiguos. La posición de los cebadores se indica con respecto a la numeración del gen correspondiente de *Escherichia coli*.

En negrita se marcan los cebadores que sólo se usaron para la amplificación.

Gen	Cebador	Secuencia (5' → 3')	Posición
ARNr 16S	16F27	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	8-27
ARNr 16S	16F530	GTG CCA GCA GCC GCG G	515-530
ARNr 16S	16R343	ACT GCT GCC TCC CGT A	358-343
ARNr 16S	16R530	CCG CGG CTG CTG GCA C	545-530
ARNr 16S	16R1488	CGG TTA CT TGT TAG GAC TTC ACC	1511-1488
<i>gyrB</i>	gyrB1626F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CAA GAG CAG TAC ATY AAA GAY G	1626-1664
	gyrB2230R	CAG GAA ACA GCT ATG AC TC TGG GTT CAT CTC RCC	2246-2239
<i>recA</i>	recA-01-F	TGA RAA RCA RTT YGG TAA AGG	54-74
	recA-02-R	TCR CNT TRT AGC TRT ACC	889-872
<i>rpoA</i>	rpoA-01-F	ATG CAG GGT TCT GTD ACA G	1-19
	rpoA-03-R	GHG GCC ART TTT CHA RRC GC	967-947
<i>rpoD</i>	rpoD-70-F	ACG ACT GAC CCG GTA CGC ATG TAY	280-303
	rpoD-70-R	ATA GAA ATA ACC AGA CGT AAG TTN GCY TCN ACC ATY TCY TTY T	1169-1127

..... **III. Material y métodos**

Para comprobar la correcta amplificación del ADN se procedió a la visualización de los fragmentos de ADN sometiendo una alícuota del producto de PCR a una electroforesis en gel de agarosa. Por último, los fragmentos de ADN amplificados se purificaron utilizando el kit de purificación MEGAquickspin™ Total (Intron Biotechnology) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para las técnicas de tipificación molecular también se utilizó la técnica de PCR pero con otras características como se explica en el apartado III.6.1.

Para la amplificación del gen ARNr 16S se utilizaron los cebadores 16F27 y R1488 (Tabla III.3). Estos cebadores permiten amplificar casi completamente el gen ARNr 16S, concretamente desde la posición 8 hasta la 1511.

De acuerdo a las recomendaciones para la familia *Vibrionaceae* realizadas por Pascual y col. (2010), Sawabe y col. (2007; 2013) y Thompson y col. (2001; 2004; 2005; 2007), los genes *housekeeping* seleccionados en este estudio para llevar a cabo el análisis MLSA fueron: *gyrB* (subunidad B de la ADN girasa), *recA* (recombinasa A), *rpoA* (subunidad α de la ARN polimerasa) y *rpoD* (subunidad β de la ARN polimerasa).

La amplificación de los genes *housekeeping* *recA*, *rpoA* y *rpoD* se llevó a cabo utilizando cebadores existentes en la literatura: *recA*-01-F y *recA*-02-R, *rpoA*-01-F y *rpoA*-03-R y *rpoD*-70-F y *rpoD*-70-R (Pascual y col., 2010; Sawabe y col., 2007; 2013; Thompson y col., 2001; 2004; 2005; 2007) (Tabla III.3). En el caso del gen *gyrB* se emplearon los cebadores *gyrB*1626F y *gyrB*2230R, diseñados específicamente para este trabajo. Para ello se alinearon con el programa **CLUSTAL_X 2.1** (Larkin y col., 2007) las secuencias de diversas especies de *Gammaproteobacteria* correspondientes a las regiones del gen *gyrB* que se deseaban amplificar. A continuación, con ayuda del programa **BOXSHADE 3.21** (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) se seleccionaron las zonas más conservadas y se sintetizaron oligonucleótidos de entre 18 y 20 nucleótidos, evitando siempre la formación de dímeros y de estructuras secundarias.

Para la amplificación del gen ARNr 16S y de los genes *housekeeping* se optimizaron los parámetros de la etapa cíclica de la PCR en cuanto al tiempo de desnaturalización, la temperatura de hibridación de los cebadores, el tiempo de elongación y el número de ciclos. De esta forma, las condiciones de las reacciones de PCR para estos genes se muestran en la Tabla III.4.

Tabla III.4. Condiciones de las reacciones de PCR.

Gen	Condiciones de PCR
ARNr 16S	5 min, 95 °C; 25 x (1 min, 94 °C, 1 min, 50 °C, 2 min, 72 °C); 10 min, 72 °C
<i>gyrB</i>	5 min, 95 °C; 35 x (1 min, 94 °C, 1 min, 59 °C, 1 min 30 s, 68 °C); 10 min, 72 °C
<i>recA</i>	
<i>rpoA</i>	5 min, 95 °C; 3 x (1 min, 95 °C, 2 min 15 s, 55 °C, 1 min 15 s, 72 °C);
<i>rpoD</i>	30 x (30 s, 95 °C, 1 min 15 s, 55 °C, 1 min 15 s, 72 °C); 7 min, 72 °C

III.4. SECUENCIACIÓN DE LOS AMPLICONES

Los fragmentos de ADN amplificados en este trabajo se secuenciaron por las empresas NBT-NewBiotechnic (Sevilla, España) y Stab Vida (Oeiras, Portugal) empleando el método de terminación de la cadena con el uso de didesoxinucleótidos trifosfato y mediante el uso de los secuenciadores automáticos ABI 3130XL y ABI 3700 (Applied Biosystems), respectivamente.

Los cebadores utilizados para la secuenciación de los fragmentos de ADN obtenidos mediante PCR fueron los mismos que se utilizaron para su amplificación y otros cebadores adicionales en algunos casos (Tabla III.3) como estrategia para intentar obtener un solapamiento completo de las secuencias parciales y poder de esta forma obtener una secuencia de mayor longitud de cada uno de los genes.

Para la secuenciación del gen ARNr 16S se utilizaron los cebadores 16F27 y R1488; en los casos que no se obtuvo una única secuencia del gen mediante solapamiento de ambos cebadores, se utilizaron cebadores intermedios

..... **III. Material y métodos**
(16F530, 16R343 y 16R530) que ayudasen a obtener una sola secuencia casi completa del ARN 16S. En cambio, para la secuenciación de los genes *housekeeping* se utilizaron los mismos cebadores mencionados para la amplificación de las secuencias de estos genes.

III.5. ESTUDIO FILOGENÉTICO

Con el objetivo de determinar tentativamente la afiliación de las cepas aisladas al género *Salinivibrio*, se realizó la amplificación parcial (con el cebador 16F27 exclusivamente, Tabla III.3) del gen ARNr 16S. Las secuencias parciales obtenidas, con un tamaño aproximado de 700 pb, se alinearon y se compararon con las secuencias disponibles en las bases de datos mediante el programa **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul y col., 1990) del servidor NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y la aplicación **EzTaxon-e** (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) (Kim y col., 2012). Aquellas cepas bacterianas cuya secuencia del gen ARNr 16S presentó porcentajes de semejanzas entre el 96 y 100 % con respecto al género *Salinivibrio* se seleccionaron con el fin de llevar a cabo un estudio más detallado de cada una de ellas y se secuenció el gen completo con la ayuda de otros cebadores (16F530, 16R343, 16R530 y 16R1488).

Las secuencias obtenidas se ensamblaron con el programa **ChromasPro** version 1.5 (Technelysium Pty Ltd) y aquellas posiciones ambiguas o indeterminaciones, indicadas con "N", se corrigieron manualmente obteniéndose así la secuencia final del gen ARNr 16S. Las secuencias finales obtenidas se analizaron mediante la comparación de las mismas con las secuencias disponibles en las bases de datos públicas (EMBL, GenBank y DDBJ) con la ayuda del programa **BLAST** del servidor NCBI. Adicionalmente las secuencias obtenidas se compararon con las disponibles en el servidor **EzTaxon-e** (Kim y col., 2012).

La construcción de alineamientos y de árboles filogenéticos para el gen ARNr 16S, se realizó con el software **ARB** y la base de datos **LTPs_106_SSU** (Ludwig y col., 1997; 1998; 2004). Las secuencias se alinearon con las de las

cepas tipo de las especies más relacionadas desde un punto de vista filogenético y cuyos nombres se encontraban válidamente publicados, mediante la ayuda del programa **Fast Aligner v. 1.03**, integrado en el paquete **ARB**, usando como referencia las regiones conservadas del gen ARNr 16S, así como la estructura secundaria característica del mismo (Gutell y col., 1985; Ludwig y Schleifer, 1994; 1999; Ludwig y col, 2004). A continuación los alineamientos se revisaron manualmente. A partir de las secuencias alineadas se obtuvo la matriz de distancias y se construyeron los correspondientes árboles filogenéticos. Para ello, se empleó un filtro, denominado "termini". Los valores de distancia se corrigieron para obtener la matriz de sustitución nucleotídica mediante la fórmula de Jukes y Cantor (1969). Para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizaron tres métodos distintos: *neighbour-joining* (Saitou y Nei, 1987), *maximum-parsimony* (Fitch, 1971) y *maximum-likelihood* (Felsenstein, 1981). Hay que tener en cuenta que cada algoritmo representa un modelo evolutivo diferente, y que la topología de los árboles filogenéticos debe mantenerse lo más estable posible. Con el objeto de determinar la estabilidad de cada una de las ramas filogenéticas y en consecuencia la robustez de la topología de los árboles obtenidos se calcularon 1000 pseudoréplicas de cada uno de los alineamientos para obtener lo que se conoce como valor de *bootstrap* (Felsenstein, 1985).

En el caso de los genes *housekeeping*, las secuencias obtenidas se revisaron y ensamblaron mediante el programa **ChromasPro** Version 1.5 (Technelysium Pty Ltd), posteriormente se tradujeron a aminoácidos, luego se alinearon y se tradujeron a nucleótidos de nuevo, para lo cual se utilizaron los programas **CLUSTAL_X 2.1** (Larkin y col., 2007) y **BioEdit** (Hall y col., 1999). Los parámetros de alineamiento múltiple se ajustaron por defecto. En todos los casos los alineamientos se revisaron y corrigieron manualmente. El cálculo de las matrices de distancias y la construcción de los árboles filogenéticos mediante los métodos *maximum-parsimony* (Fitch, 1971) y *neighbour-joining* (Saitou y col., 1987) se realizó mediante el programa **MEGA 5** (Tamura, 2013), mientras que el cálculo de los árboles con el algoritmo *maximum-likelihood* (Felsenstein, 1981) se efectuó con ayuda de la herramienta **PhyML** (Guindon y Gascuel, 2003). El análisis de

..... **III. Material y métodos**
bootstrap se realizó utilizando 1000 pseudoréplicas (Felsenstein, 1985). Para determinar cuál fue el modelo óptimo de sustitución nucleotídica se utilizó el programa **jModelTest** (Posada, 2008).

En cuanto a los árboles concatenados, las secuencias de los genes *housekeeping* se concateraron; el cálculo de las matrices y la construcción de los arboles filogenéticos se realizó siguiendo la misma metodología que para los genes *housekeeping*.

III.6. CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA

Con el objetivo de realizar un estudio taxonómico, se realizó un tipado, así como la caracterización fenotípica, genotípica y quimiotaxonómica de las cepas bacterianas objeto de este estudio.

III.6.1. Estudio de tipificación molecular o *fingerprinting*

Las técnicas de tipificación molecular se utilizan ampliamente para el tipado de bacterias, permitiendo hacer una rápida identificación de distintas especies de bacterias e incluso de cepas (Versalovic y col., 1991; 1994; Rademaker y De Bruijn, 1997). Para el presente trabajo se llevó a cabo la técnica de amplificación por PCR de elementos repetitivos, más conocida como **rep-PCR**, la cual se fundamenta en la utilización del método de PCR con cebadores que hibridan de forma específica con unas secuencias de ADN repetitivas (secuencias rep), de función desconocida, que se encuentran dispersas por todo el genoma de muchas bacterias. Hay tres familias de secuencias repetitivas: las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (secuencias REP), las secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (secuencias ERIC) y las secuencias o subunidades BOX A de los elementos BOX de *Streptococcus pneumoniae*. Estas unidades repetidas están separadas por largos fragmentos de ADN no repetidos, de manera que los cebadores que se emplean se diseñan desde la mitad de la zona repetitiva hacia la zona no repetitiva. Existen cebadores y un protocolo prácticamente universal para grupos de bacterias muy diversos (Versalovic y col., 1991; 1994). Para este estudio sólo se emplearon las subunidades BOX

A, cuya secuencia del cebador de amplificación utilizado BOX A1R fue 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3' (Versalovic y col., 1994).

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl:

Tampón buffer <i>Phire</i> (5x).....	4,5 µl
DMSO.....	1,90 µl
Mezcla dNTPs (1,25 mM cada dNTP)	1,0 µl
Cebador BOXA-1R.....	1,0 µl
<i>Phire</i> Hot Start II ADN polimerasa	0,4 µl
ADN (50 ng/µl).....	1,0 µl
Agua estéril c.s.p.....	25 µl

El programa utilizado en el termociclador para realizar las reacciones de PCR fue el que se muestra a continuación:

- Desnaturalización inicial del ADN molde: 3 minutos a 95 °C.
- 30 ciclos en los que se repiten estas tres fases:
 - Desnaturalización: 2 minutos a 95 °C.
 - Hibridación de los cebadores: 3 segundos a 94 °C.
 - Elongación: 1 minuto a 40 °C.
- Elongación final: 8 minutos a 65 °C.
- Enfriamiento: las muestras se conservan a 4 °C

Los amplicones de diferentes tamaños obtenidos se observaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % en tampón TAE 1x, corridos a 12 V durante 16 horas y a 4 °C con el objetivo de producir bandas nítidas fácilmente distinguibles. Los geles se tiñieron con bromuro de etidio antes de realizar el análisis de los patrones de bandas con el software **Phoretix 1D Pro** (<http://www.cleaverscientific.com/electrophoresis-products/phoretix-1d-pro/>). Este programa trata las imágenes de los geles electroforéticos, convirtiéndolas de 24-bit (que es la que se obtiene con el captador de imágenes) a 8-bits. Se determinan las carreras electroforéticas del gel realizando una normalización mediante marcadores de pesos moleculares incluidos en el gel. A continuación se obtienen las matrices de similitud mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Finalmente, se procede a llevar a cabo el agrupamiento de los OTU's (unidad taxonómica operativa)

..... **III. Material y métodos**
mediante el algoritmo UPGMA, obteniéndose de esta manera un dendrograma.

III.6.2. Caracterización fenotípica

El estudio fenotípico incluyó características tales como la morfología, fisiología, bioquímica y nutrición de las cepas objeto de estudio.

III.6.2.1. Morfología y movilidad

La determinación de la morfología celular y la motilidad se realizó a partir de cultivos líquidos en fase exponencial (12-20 h) utilizando preparaciones en fresco y microscopía de contraste de fases, mediante un microscopio Olympus BX41 provisto de una cámara digital DP70. La morfología, tamaño y pigmentación de las colonias se observó en placas de Petri, tras el cultivo de la cepa objeto de estudio en las condiciones óptimas de crecimiento.

III.6.2.2. Pruebas fisiológicas

Para determinar el rango y el óptimo de crecimiento a diferentes concentraciones de sales, temperaturas y valores de pH de cada cepa bacteriana, las células se cultivaron, en primer lugar, en medio SW líquido conteniendo 1, 2, 3, 4, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 % de sales totales, preparados a partir del stock de sales al 30 %, y se determinó el crecimiento a 37 °C y un pH entre 7-7,5. Una vez establecida la concentración óptima de sales, se procedió a determinar el rango y el óptimo de crecimiento a diferentes valores de temperaturas. Para ello las cepas se cultivaron en medio líquido a la concentración de sales óptima establecida, y se incubaron a 4, 10, 15, 16, 17, 20, 28, 30, 37, 42, 44 y 50 °C. Por último, se determinó el rango y el óptimo de pH utilizando la concentración de sales óptima y la temperatura óptima determinadas previamente, ajustando el pH del medio a 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 7,5, 8,0, 9,0 y 10,0

con una solución de NaOH (1 M) y HCl (1 M) usando los tampones correspondientes (Sánchez-Porro y col., 2009). En todos los casos el crecimiento se determinó midiendo la densidad óptica de los cultivos a 600 nm (OD_{600}), realizando lecturas periódicas en un espectrofotómetro Lan Optics SP-1104.

Para el presente trabajo las **condiciones óptimas** para el crecimiento de las diferentes cepas del género *Salinivibrio* fueron: sales al 7,5 %, pH entre 7,2 y 7,4 a una temperatura de 37 °C y en un tiempo de incubación de 24-48 h.

El crecimiento en condiciones de anaerobiosis se determinó mediante la siembra por estrías en placas con medio SW 7,5 e incubándolas en una campana de anaerobiosis durante al menos 5 días, a 37 °C y pH 7,2-7,4. Se utilizó AnaeroGen (Oxoid) para la generación de la atmósfera anaerobia y un indicador de anaerobiosis (Oxoid) para verificarla.

III.6.2.3. Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las cepas bacterianas. Los medios empleados para las pruebas bioquímicas se prepararon utilizando como base el medio **SW 7,5** descrito previamente.

Para observar la actividad catalasa se añadieron unas gotas de una solución de H_2O_2 al 3 % (v/v) sobre células tomadas de un cultivo en medio sólido. La aparición de un burbujeo inmediato significa un resultado positivo, ya que la enzima catalasa actúa sobre el agua oxigenada descomponiéndola en agua y oxígeno (Cowan y Steel, 1965). En cuanto a la actividad oxidasa, se utilizó el reactivo tetrametil-p-feniléndiamina (Kovacs, 1956). La aparición de un color azul-violeta intenso antes de 20 segundos indica que la prueba es positiva.

La hidrólisis de la caseína, gelatina, almidón, Tween 80, ADN y esculina, la utilización de citrato de Simmons, las pruebas de Voges-Proskauer y rojo de metilo, la producción de indol, la producción de fenilalanina desaminasa, de

..... **III. Material y métodos**

fosfatasa y la reducción de nitratos y nitritos se determinaron según se describe por Cowan y Steel (1965) con la adición de la solución de sales al 7,5 % al medio.

Para determinar la producción de ácidos a partir de carbohidratos se cultivaron las distintas cepas a partir del stock de sales diluidas al 7,5 % suplementado con extracto de levadura al 0,05 %, el indicador rojo fenol y el carbohidrato en cuestión, esterilizado por filtración y adicionado al medio a una concentración final del 1 % (p/v) (Ventosa y col., 1982). Los carbohidratos estudiados fueron los siguientes: D-arabinosa, esculina, D-fructosa, D-galactosa, glicerol, D-glucosa, lactosa, D-maltosa, D-manitol, D-manosa, D-rafinosa, D-ribosa, D-sacarosa, D-trehalosa y D-xilosa. El viraje a color amarillo del indicador mostraba que el microorganismo producía ácidos a partir del carbohidrato estudiado.

III.6.2.4. Pruebas nutricionales

Para analizar la capacidad de las distintas cepas bacterianas para utilizar una amplia gama de sustratos como única fuente de carbono y energía, o como única fuente de carbono, nitrógeno y energía, se empleó el medio de Koser (1923) de acuerdo a la modificación descrita por Ventosa y col. (1982). Su composición es la siguiente (l⁻¹): 75 g NaCl, 2 g KCl, 0,2 g MgSO₄·7H₂O, 1 g KNO₃, 1 g (NH₄)H₂PO₄, 0,5 g KH₂PO₄ y 0,05 g de extracto de levadura. El pH se ajustó a 7,2-7,4. El medio se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos y el sustrato se añadió separadamente, esterilizándolo por filtración hasta alcanzar una concentración final de 1 g/l para los aminoácidos y ácidos orgánicos, y de 2 g/l para los carbohidratos. Después de inocular los medios con un volumen del 1 %, se incubaron a 37 °C y se realizaron lecturas periódicas. En todos los casos la lectura se realizó utilizando un control negativo, preparado con medio base sin sustrato e inoculado. Es importante que el cultivo a inocular fuera joven (de unas 20-24 h). Se consideró un resultado positivo si el crecimiento fue mayor que en el control, y negativo en el caso contrario. Entre los carbohidratos ensayados como única fuente de carbono y energía se encontraban: D-arabinosa, fructosa, D-galactosa, D-

glucosa, lactosa, maltosa, manosa, L-rafinosa, D-ribosa, sacarosa, D-trehalosa y D-xilosa. Los aminoácidos ensayados como únicas fuentes de carbono, nitrógeno y energía fueron: L-alanina, L-asparagina, fenilalanina, glutamina, L-isoleucina, L-lisina, L-metionina y valina.

III.6.3. Caracterización genotípica

III.6.3.1. Determinación del contenido en G+C del ADN

El contenido en Guanina más Citosina (G+C) del ADN genómico de las cepas estudiadas se determinó a partir de la temperatura media (T_m) del perfil de desnaturalización térmica (Marmur y Doty, 1962), utilizando la ecuación descrita por Owen y Hill (1979), obtenida con un espectrofotómetro Lambda 20 (Perkin-Elmer) UV-Vis, a una longitud de onda de 260 nm y equipado con un sistema Peltier PTP-1, programado para aumentar la temperatura a una velocidad constante de 1 °C/minuto (Figura III.04). La variación de la densidad óptica con la temperatura, consecuencia de la desnaturalización, se registró mediante el programa **Templab 2.0** suministrado por el fabricante. La T_m se determinó siguiendo el método gráfico descrito por Ferragut y Leclerc (1976).

El porcentaje de G+C del ADN se determinó mediante la siguiente fórmula descrita por Owen y Hill (1979) para un ADN disuelto en una solución salina citratada y agua destilada en proporción 1:10 (0,1x SSC):

$$\% \text{ G+C} = (\% \text{ G+C})_{mr} + 2,08 \times (T_{mp} - T_{mr})$$

Donde:

$(\% \text{ G+C})_{mr}$: % de G+C del ADN de una cepa de referencia

T_{mr} : temperatura media de desnaturalización de la cepa de referencia

T_{mp} : temperatura media de desnaturalización del ADN problema

..... III. Material y métodos

Como cepa de referencia se utilizó *Escherichia coli* NCTC 9001^T, cuyo ADN presenta un valor de G+C de 50,9 moles% y un valor de T_m en 0,1× SSC de 74,6 °C (Owen y Pitcher, 1985).

Esta determinación se realizó por triplicado con ADN procedente de tres extracciones distintas. El valor final de G+C del ADN se calculó determinando la media entre estos tres valores.



Figura III.04. Espectrofotómetro Lambda 20 (Perkin-Elmer) UV-Vis equipado con un sistema Peltier PTP-1.

III.6.3.2. Hibridación ADN-ADN

La hibridación ADN-ADN proporciona información acerca de la relación taxonómica existente entre microorganismos. Ésta se basa principalmente en el principio de que el grado de reasociación entre dos hebras de ADN constituye un índice cuantitativo de la semejanza que existe entre secuencias de ADN procedentes de distintas cepas microbianas. Se siguió el método de competición en filtro de membrana, descrito por Johnson (1994) que comprende una serie de procesos que incluyen la preparación del ADN problema marcado radiactivamente y de los ADNs competidores, la inmovilización del ADN problema desnaturalizado en membranas de nitrocelulosa, y por último, la hibridación propiamente dicha. El ADN utilizado debe de proceder de la misma extracción para el marcaje, para la preparación de competidores y para su adhesión a la membrana de nitrocelulosa.

Marcaje del ADN

Para marcar el ADN problema se utilizó el kit Prime- α -Gene Labelling System (Promega). El protocolo para dicho marcaje es el siguiente:

1. *Descongelar $^3\text{H-dCTP}$ (desoxi-[1',2',5'- ^3H] citidina trifosfato, Amersham Biosciences) durante 30 minutos aproximadamente.*

2. *Desnaturalizar el ADN. Para ello se calienta el ADN a 100 °C durante 5 minutos. Concluido este tiempo se coloca inmediatamente en hielo para impedir su renaturalización.*
3. *Preparar la mezcla de desoxinucleótidos (dNTPs) provistos por el kit (1,5 mM cada dNTP), a razón de 1/1/1 por desoxinucleótido (desoxiadenina, desoxiguanina y desoxitimina), excepto la desoxicitidina.*
4. *Preparar la reacción en el siguiente orden:*

Tampón de marcaje 5x..... 10 µl
Mezcla de dNTPs (0,5 mM cada dNTP).....2 µl
ADN desnaturalizado (1-100 ng/µl)..... 1-10 µl
BSA (albúmina sérica bovina) libre de nucleasas2 µl
³H-dCTP disuelto en H₂O destilada.....5 µl
ADN polimerasa I (Klenow)..... 1 µl
H₂O libre de nucleasas..... c.s.p. 50 µl

5. *Mezclar suavemente mediante pulso en microcentrifuga para homogeneizar los componentes de la reacción.*
6. *Dejar en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente.*
7. *Calentar durante 2 minutos a 100 °C.*
8. *Colocar inmediatamente en hielo.*
9. *Eliminar el ³H-dCTP libre utilizando una columna de Sephadex G-50 (NICK Column, Amersham). Esta columna permite la separación del ADN marcado de los desoxinucleótidos libres en base a la diferencia de tamaño que existe entre ellos.*
10. *Determinar la radiactividad del ADN marcado utilizando un contador de centelleo (Beckman LS3801).*
11. *Seleccionar los tubos con mayor radiactividad.*

Preparación de los ADNs competidores

1. *Tomar un volumen de ADN en función de la concentración teniendo en cuenta que debe haber cantidad suficiente para la preparación de los competidores, (en torno a 100-150 µg/competidor).*
2. *Desnaturalizar el ADN de cada una de las cepas a hibridar y de la cepa problema, una vez obtenido y purificado por el método de Marmur (1961), Para desnaturalizar se calienta al baño María a 100 °C durante 10 minutos.*

..... III. Material y métodos

3. Colocar en hielo y sonicar a 50 W mediante un homogeneizador ultrasónico LabSonic M durante tres períodos de 15 segundos.
4. Distribuir en criotubos, a razón de 100 a 150 µg por vial.
5. Congelar.
6. Liofilizar (liofilizador Virtis).

Preparación del filtro de membrana con ADN

Para preparar el filtro con el ADN problema se utilizó una membrana de nitrocelulosa (tipo 0,45 µm HAFT, Millipore), de 10 cm de diámetro acoplada a un dispositivo de filtración (Sartorius) que permite una superficie de absorción de 8 cm de diámetro. La concentración del ADN retenido en el filtro fue de 30 µg/cm², aproximadamente. El protocolo que se llevó a cabo fue el siguiente:

1. Tomar un volumen del ADN disuelto en 0,1x SSC que corresponda a una cantidad de 2000-2500 µg de ADN.
2. Desnaturalizar el ADN (100 °C, 10 minutos).
3. Enfriar rápidamente, mezclándolo con 125 ml de 6x SSC frío. Mantener esta solución en hielo.
4. Medir la DO₂₆₀ y calcular la cantidad de microgramos de ADN de la solución de acuerdo a la siguiente equivalencia:
 $DO_{260} = 1 = 50 \mu\text{g de ADN/ml}$
5. Humedecer el filtro con 6x SSC durante 2 horas (prepararlo previamente).
6. Colocar el filtro en el sistema de filtración.
7. Lavar el filtro con 100 ml de 6x SSC frío.
8. Pasar por el filtro la solución del ADN desnaturalizado obtenida en el paso 3. Medir la DO₂₆₀ del líquido filtrado para comprobar si el ADN ha quedado retenido en el filtro.
9. Lavar el filtro con 100 ml de 6x SSC y medir la DO₂₆₀ del líquido filtrado.
10. Calcular la cantidad de ADN retenido en el filtro (no debe ser inferior a 2000 µg).
11. Secar el filtro y fijar el ADN al filtro mediante calor (con una estufa a 60 °C durante toda la noche o en horno de vacío a 80 °C durante 2 horas).
12. Guardar el filtro protegido en un desecador.

Preincubación de los filtros de membrana con ADN

Una vez preparado el filtro con el ADN fijado, se cortaron a partir de él discos de 5 mm de diámetro, que se colocaron en viales de congelación conteniendo 0,3 ml de solución de Denhardt (albúmina sérica bovina al 0,02 %, polivinilpirrolidona al 0,02 %, Ficoll 400 al 0,02 % y 2x SSC c.s.p 100 ml). Estos viales se incubaron durante 2 horas a la temperatura óptima de hibridación para bloquear las zonas de unión inespecífica al filtro. La temperatura óptima de hibridación (T_{hibr}) se calculó según la fórmula de Gillis y col. (1970):

$$T_{hibr} = T_{or} - (0,72 \times \% \text{ formamida})$$

$$T_{or} = (0,51 \times \% \text{ G+C}) + 47,0 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Siendo T_{or} la temperatura óptima de renaturalización.

La temperatura de hibridación utilizada siempre estuvo dentro de los límites válidos para el método de competición en filtro de membrana (De Ley y Titjtgat, 1970).

Realización e interpretación de la hibridación ADN-ADN

Para realizar los experimentos de hibridación propiamente dichos se incubó durante 16 horas a la temperatura óptima de hibridación el ADN problema fijado al filtro de nitrocelulosa junto con el ADN competidor de cada una de las otras cepas a hibridar (incluyendo el ADN competidor de la propia cepa problema) y el ADN marcado. Por último, se determinó la radiactividad retenida en los filtros sin competidor, en los filtros con ADN competidor de otras cepas y en los filtros con ADN competidor de la cepa problema.

El protocolo seguido para llevar a cabo la hibridación ADN-ADN es el siguiente:

1. *Añadir sobre los viales liofilizados que contienen los ADNs competidores:*
 - *83 μ l de 3,4x SSC (valor ajustado para que la concentración final en la mezcla de reacción sea de 2x SSC).*
 - *discos de nitrocelulosa de 5 mm de diámetro con ADN problema preincubados.*

..... III. Material y métodos

- 42 μ l de formamida.
- 15 μ l del ADN marcado, previamente sonicado a 50 W (sonicador LabSonic M) durante dos períodos de 15 segundos.

La proporción entre las concentraciones de ADN competidor y de ADN marcado fue al menos de 150:1.

2. *Cerrar todos los viales y colocarlos en un baño María a la temperatura óptima de hibridación con agitación suave (baño con agitación Grant) durante 16 horas, de forma que el agua cubra los viales por completo.*
3. *Sacar los filtros de los viales, colocarlos en una cámara de lavado y lavarlos con 500 ml de 2x SSC, previamente calentado a la temperatura óptima de hibridación.*
4. *Sacar los filtros de la cámara de lavado, eliminar el exceso de líquido utilizando papel de filtro y colocarlos en los viales de centelleo.*
5. *Añadir 5 ml de líquido de centelleo (Ultima Gold, Beckman) y proceder a medir la radiactividad en un contador de centelleo (Beckman LS3801).*

Cada experimento de hibridación se llevó a cabo por triplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados. Se utilizaron cuatro controles al comienzo de cada hibridación, dos controles negativos (haloarquea) y dos controles positivos (ADN problema).

Una vez finalizado el proceso de la hibridación se procedió a la interpretación de los resultados. El porcentaje de hibridación ADN-ADN se calculó utilizando el método de Johnson (1994) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Hibridación} = (\beta_n/\beta) \times 100$$

$$\beta_n = (D - B) - (F_n - B)$$

$$\beta = (D - B) - (E - B)$$

Siendo:

D = Radiactividad resultante en la hibridación directa del ADN problema con un ADN heterólogo (control negativo).

B = Radiactividad asociada al filtro.

F_n = Radiactividad resultante en la hibridación directa del ADN problema con el ADN frente al que se quiere hibridar.

E = Radiactividad resultante en la hibridación directa del ADN problema con el ADN homólogo (control positivo).

La interpretación de los resultados se llevó a cabo según Wayne y col. (1987) donde se estableció que las cepas pertenecientes a la misma especie deben mostrar valores de hibridación ADN-ADN iguales o superiores al 70 %.

III.6.4. Caracterización quimiotaxonómica

Para el presente trabajo se ha analizado el perfil de ácidos grasos mediante cromatografía de gases y el proteoma mediante MALDI-TOF espectrometría de masas de las cepas objeto de estudio, por tratarse de características que puedan tener utilidad taxonómica.

El estudio de los ácidos grasos de cadena corta o ácidos grasos volátiles (VFAs, *volatile fatty acids*) se ha empleado de forma habitual para la identificación de bacterias anaerobias estrictas (Allison, 1978; Lanjekar y col., 2015). Además, en numerosos artículos científicos el contenido de los ácidos grasos de entre 9 y 20 átomos de carbono se ha utilizado para caracterizar géneros y especies de bacterias (Tan y col., 2010; Singh y col., 2016; Yang y col., 2016).

Cuando una célula bacteriana es expuesta a condiciones de estrés, ésta experimenta un cambio en las proporciones relativas de los ácidos grasos de cadena larga y de cadena corta, en los ácidos grasos de cadena lineal y ramificada, así como en los ácidos grasos saturados e insaturados de la membrana celular, con el objetivo de mantener la fluidez y sobrevivir a las condiciones adversas a las que está sometida en un momento determinado (Gomez Zavaglia y col., 2000; Li y col., 2009). Por ello, el perfil de ácidos grasos celular más estable y reproducible se logra mediante un control riguroso de las condiciones de cultivo. Numerosos estudios han puesto de manifiesto los efectos de la temperatura de incubación y el medio de cultivo

..... **III. Material y métodos**

utilizado para el crecimiento de las células en el perfil de ácidos grasos obtenido, de ahí que, para minimizar estas variables, se utilice siempre que sea posible el mismo medio de crecimiento y la misma temperatura de incubación para la determinación del perfil de ácidos grasos de todas las cepas microbianas pertenecientes a un mismo género (Ventosa y col., 2012).

El sistema de identificación *Sherlock Microbial Identification System* permite identificar especies bacterianas mediante cromatografía de gases de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMEs, *fatty acid methyl esters*) (<http://www.midi-inc.com>). La identificación microbiana mediante FAME consiste, en líneas generales, en una saponificación y esterificación de los ácidos grasos seguida de una sencilla extracción de los mismos. A continuación, los ácidos grasos se analizan por cromatografía de gases y los resultados obtenidos se comparan con una base de datos de perfiles generada a partir de cepas de referencia.

Para obtener el perfil de ácidos grasos, todos los microorganismos a comparar (incluyendo algunas cepas de referencia) se cultivaron en el mismo medio de cultivo, denominado **medio 1**, cuya composición fue descrita en el apartado III.2.1 de Material y Métodos y en las mismas condiciones (37 °C y pH 9 durante 24 horas).

El análisis de los ácidos grasos celulares de las distintas cepas bacterianas se determinó siguiendo el protocolo recomendado por MIDI Microbial Identification System (Sasser, 1990) mediante un cromatógrafo de gases Agilent 6850 y empleando el método TSBA6 (MIDI, 2008). Estos análisis se realizaron por el Servicio de Identificación de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), en Valencia.

Por otro lado, la espectrometría de masas y más concretamente la técnica de **MALDI-TOF MS** ha facilitado en gran medida la identificación de bacterias en los laboratorios de microbiología clínica, principalmente porque proporciona una gran exactitud y potencia de resolución a la hora de identificar aislados microbianos, además de una mejora en el tiempo de respuesta en comparación con los métodos convencionales (Singhal y col.,

2015). La característica quimiotaxonómica que aquí se analiza es la búsqueda de las proteínas del microorganismo.

La identificación se realiza a partir de una colonia aislada de la bacteria objeto de estudio; ésta se coloca sobre una placa de metal pulido reutilizable. Sobre dicha colonia se aplica una matriz en solución (generalmente una solución saturada de ácido alfaciano-4-hidroxicinámico, acetonitrilo y ácido trifluoroacético) que se cristaliza al dejarse secar a temperatura ambiente. Esta matriz cumple dos funciones principales: (i) exponer las proteínas intracelulares mediante la ruptura de la membrana celular y (ii) facilitar la vaporización e ionización de las proteínas mediante un haz de laser pulsante. Una vez ionizadas estas proteínas viajan por una cámara de vacío siendo detectadas al final. Dependiendo de la relación masa/carga de cada fragmento de proteína así será el tiempo que éste tarde en llegar al final por espectrometría de masas. Este "tiempo de vuelo" es utilizado para construir el espectro específico de las masas (Emonet y col., 2010). Este espectro es comparado automáticamente con una base de datos para tratar de identificar a las proteínas del microorganismo. En este estudio; la adquisición de los datos se realizó utilizando un equipo Bruker Daltonics UltrafleXtrem MALDI TOF/TOF y el software FlexControl. El manejo de los espectros se realizó con ClinProTools, programa tradicionalmente empleado para búsqueda de biomarcadores o picos diferenciales entre los grupos asignados (Pérez-Sancho y col., 2015; 2017).

Para realizar la identificación de cepas pertenecientes al género *Salinivibrio* mediante **MALDI-TOF MS**, las cepas seleccionadas objeto de estudio se cultivaron en las **condiciones óptimas** de salinidad, temperatura, pH y tiempo de incubación (descritas previamente en el apartado III.6.2.2).

El análisis por **MALDI-TOF MS** fue realizado por el Servicio de Identificación y Caracterización Microbiana del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) en la Universidad Complutense Madrid.

III.7. ANÁLISIS GENÓMICO DEL GÉNERO *SALINIVIBRIO*

III.7.1. Secuenciación de ADN genómico y control de calidad

La extracción del ADN genómico de las cepas del género *Salinivibrio* se obtuvo siguiendo la metodología descrita en el apartado III.2.1.

La tecnología 454, conocida como pirosecuenciación, fue la primera *Next Generation Sequencing* (NGS) en salir al mercado entre los años 2004 y 2005 (Margulies y col., 2005). A continuación surgieron *Illumina* (Bentley y col., 2006), basada en secuenciación por síntesis, *SOLiD*, basada en secuenciación por ligación, e *Ion Torrent* (Pennisi y col., 2010), basada en detección de pH, las cuales necesitan de la amplificación del ADN previamente a su secuenciación. Además, se han desarrollado tecnologías que no necesitan del paso inicial de amplificación, sino que secuencian directamente una sola molécula de ADN, entre las que se encuentran *Helicos*, (Harris y col., 2008) y *SMRT Pacific Biosciences* (PacBio) (Eid y col, 2009).

La obtención de la secuencia genómica de las cepas seleccionadas se realizó utilizando las plataformas de secuenciación *Illumina MiSeq* (2 x 300 pb *paired-ends*) llevado a cabo en la Universidad de Swansea (Reino Unido), *Illumina HiSeq* (2 x 100 pb *paired-ends*) y *Pacific Biosciences* (3-kb *reads*), ambos ejecutados por la empresa MacroGen (Corea). Una vez secuenciados, los genomas se analizaron mediante múltiples programas o aplicaciones bioinformáticas, algunos de los cuales se encontraban alojados en un servidor web y otros se instalaron en nuestro servidor virtual disponible en la Universidad de Sevilla.

El procesamiento y control de calidad de las secuencias se ha realizado utilizando la herramienta **FastQC**. Este programa verifica la calidad de las secuencias procedentes de diferentes plataformas de secuenciación en base a su contenido en "N", su contenido en GC, su distribución de longitudes, su duplicidad y su contenido en diferentes *Kmers*.

III.7.2. Ensamblaje de las secuencias

Todos los métodos de ensamblaje se basan en la simple suposición de que los fragmentos de ADN altamente similares se encuentran en la misma posición en el genoma. De esta manera, la semejanza entre secuencias de ADN se usa para conectar fragmentos individuales (*reads*) en secuencias contiguas más largas, denominadas *contigs* (secuencias consenso obtenidas a partir del ensamblaje de los *reads*). Para el ensamblaje de las secuencias se utilizaron diferentes ensambladores con el objetivo de ver cuál produjo un mejor resultado en función de los siguientes parámetros: N50, número de *contigs*, y tamaño de genoma.

Existen dos estrategias de ensamblaje: i) OLC (*Overlap-Layout-Consensus*), este método primero identifica todos los pares de *reads* que se solapan lo suficientemente bien y organiza esta información en un gráfico en el cual hay un nodo por cada uno de ellos y un conector por cada solapamiento entre los mismos. Esta estructura del gráfico permite el desarrollo de complejos algoritmos de ensamblaje que tienen en cuenta la relación global entre los *reads*. De esta manera se definen caminos, que corresponden con los segmentos del genoma que están siendo ensamblados. Finalmente, se reconstruye el genoma mediante la búsqueda de un único segmento que atraviese todos los nodos solo una vez.

Dentro de esta estrategia el ensamblador usado en el presente estudio fue: **Newbler** (Miller y col., 2010). En este tipo de ensamblador la longitud mínima de solapamiento es de 100 pb.

ii) Gráficos De Bruijn: Los ensambladores basados en gráficos De Bruijn modelan la relación entre subcadenas exactas de longitud k dentro de los *reads*. De manera similar al método OLC los nodos en el gráfico representan *k-mers*, y los conectores indican que *k-mers* adyacentes se solapan por $k-1$ letras, por lo que la longitud del *k-mer* correlaciona con la longitud del solapamiento que el ensamblador es capaz de detectar. En esta metodología no se modelan directamente los *reads*, sino que están implícitamente representados por los conectores en el gráfico de Bruijn. La mayoría de los ensambladores usan la información global de los *reads* para refinar la

..... **III. Material y métodos**

estructura del gráfico, resolver repeticiones y eliminar patrones no consistentes. Además, incorporan métodos de corrección de errores para mejorar la calidad del ensamblaje.

Los ensambladores empleados con esta segunda estrategia fueron: i) **SPAdes 3.0** (Bankevich y col., 2012) que utiliza una base de lecturas Illumina/IonTorrent. Este ensamblador se encuentra disponible a través del servidor web Orione Galaxy (<http://orione.crs4.it/>) (Cuccuru y col., 2014). Los parámetros que se utilizaron para el ensamblaje fueron los predeterminados, con valores de *K-mer* iguales a 21, 33 y 55. ii) **IDBA-UD** (Peng y col., 2012), constituye una mejora del ensamblador IDBA. Este conjunto de herramientas es capaz de ensamblar secuencias de lectura cortas con una cobertura superior, además reconstruye los valores *K-mer* perdidos durante el ensamblaje local y elimina los *contigs* de baja cobertura.

Paralelamente, se utilizó el protocolo iii) **A5-miseq** (Coil y col., 2015), con el que, partiendo de los datos en bruto, mediante 5 pasos se realizó tanto el filtrado como el ensamblaje de los genomas. Estos 5 pasos se resumen en: (i) filtrado, que consiste en la eliminación de los adaptadores y las regiones de baja calidad; este paso se realiza mediante la herramienta *Trimmomatic* (Lohse y col., 2012). (ii) ensamblaje de los contigs, para el cual se utiliza la herramienta IDBA-UD (Peng y col., 2012). (iii) crude scaffolding, (iv) corrección de errores de ensamblaje, y (v) scaffolding final, paso donde se reparan los *contigs* rotos y se obtiene una estadística resumen de todo el proceso.

Para el ensamblaje del genoma secuenciado por PacBio, se empleó el software **SMRT Analysis v. 2.3** (Eid y col., 2009); éste implementa el protocolo **HGAP Assembly v.2**; (Hierarchical Genome Assembly Process) que trata los siguientes pasos, (i) filtrado mediante el programa **PreAssembler Filter v1**, (ii) preensamblaje con **PreAssemble v2** (iii) ensamblaje de *novó* con **Celera v1** (Huson y col., 2001); (iv) mapeo con **BLASR v1** y (v) pulido del ensamblaje mediante el programa **Quiver**.

III.7.3. Anotación de las secuencias genómicas

La anotación de un genoma consiste en identificar la información biológica contenida en una secuencia (Cuccuru y col., 2014). Este proceso incluye la anotación estructural y la anotación funcional. La anotación estructural engloba la detección y la localización de una secuencia biológica, es decir, la predicción de genes que codifican proteínas, así como otras unidades funcionales del genoma tales como ARNs estructurales, ARNt, ARNr, pseudogenes, regiones de control, secuencias de inserción, transposones y otros elementos móviles.

La predicción de los genes se realizó mediante el programa **MetaGeneMark** (versión mejorada de GeneMark) (Zhu y col., 2010).

Por otro lado, la anotación funcional revela la función biológica de los genes y de las proteínas (Gouret y col., 2005). A su vez, la anotación tanto funcional como estructural puede realizarse de forma automática o manualmente.

Anotación automática

La anotación automática es una forma rápida de anotación que no requiere un equipo cualificado de anotadores y procesa los datos de forma consistente. Sin embargo, puede predecir menos genes de los que realmente existen, sus resultados son más generales, no son tan exactos y son más propensos a errores (Tripp y col., 2015). De hecho, para conseguir anotaciones automáticas fiables, éstas deberían ser revisadas manualmente.

En este estudio, la anotación automática y parte del análisis de los genomas se ha realizado mediante las herramientas suministradas por los servidores **RAST** (Rapid Annotation using Subsystems Technology) y **KAAS-KEGG** (Automatic Annotation Server for ortholog assignment and pathway mapping).

- **RAST**. Este servidor ofrece un conjunto de herramientas para la anotación funcional y el análisis de genomas. Identifica secuencias que codifican proteínas, genes ARNr y ARNt, utilizando bases de datos de proteínas y nucleótidos. Además, predice subsistemas

..... **III. Material y métodos**

representados en el genoma gracias a la herramienta "SEED subsystems annotation" (Overbeek y col., 2005) y utiliza esta información para reconstruir redes metabólicas.

- **KAAS-KEGG.** Este software proporciona la anotación funcional de los genes mediante BLAST o GHOST comparando con la base de datos KEGG GENES. El resultado contiene genes a los que se les ha asignado un identificador de ortólogo (KEGG Orthology) y rutas metabólicas generadas automáticamente (Moriya y col., 2007).

Mientras que para determinar el número de copias de los ARNs, se utilizó la herramienta **RNAmmer** (Lagesen y col., 2007).

Anotación manual

Dado que la anotación manual genera datos con mayor calidad y estructuras de genes más exactas que la anotación automática (Potter y col., 2004), las secuencias de las proteínas anotadas de forma automática se enfrentaron a su vez a la base de datos nr del NCBI mediante la herramienta **BLASTp**. Esta herramienta compara secuencias mediante la búsqueda en una base de datos del alineamiento más óptimo con secuencias de proteínas semejantes a la secuencia de entrada.

III.7.4. Análisis genómico y genómica comparativa

El software **biopieces** (<http://maasha.github.io/biopieces/>) calcula parámetros como la longitud de la secuencia, el contenido en G+C, el números de *contigs*, tamaño del genomas, etc. De forma paralela se encuentra el paquete de herramientas **enveomics** (Luo y col., 2013), que calcula estos mismos parámetros.

Para determinar lo completo que esta un genoma así como su nivel de contaminación, se usó la herramienta **checkM** (Parks y col., 2014). Además, esta herramienta también realiza una estimación de la calidad de un genoma mediante diferentes parámetros tales como en el porcentaje de

contaminación, la heterogeneidad o el porcentaje de completitud de un genoma.

Con intenciones de sustituir la hibridación ADN-ADN experimental, se llevó a cabo la hibridación ADN-ADN (DDH) *in silico*, para la cual se empleó la herramienta **GGDC** (Genome-to-Genome Distance Calculator) (<http://ggdc.dsmz.de/>), técnica de alta fiabilidad que calcula las distancias filogenéticas entre dos genomas secuenciados. Este método está reemplazando a la técnica de hibridación ADN-ADN tradicional, ya que los valores son emulables garantizando así la coherencia en el concepto de especie procarionta. Los valores GGDC corresponden al mismo valor de corte que para la DDH experimental siendo estos iguales o superiores al 70 % para cepas de la misma especie.

La Identidad Nucleotídica Media, más conocida como **ANI** (*Average Nucleotide Identity*), es uno de los índices de identidad más robustos que existen en la actualidad. Constituye un parámetro de gran utilidad en la taxonomía bacteriana y de arqueas; además, está sustituyendo a la técnica de hibridación ADN-ADN (Konstantinidis y Tiedje, 2005; Goris y col., 2007; Richter y Rosselló-Mora, 2009; Haley y col., 2010; Chan y col., 2012; Yi y col., 2012; Grim y col., 2013; Kim y col., 2012). El ANI representa la media de los valores de identidad/ semejanza entre las regiones genómicas homólogas compartidas entre dos genomas. De forma general se acepta que valores de ANI comprendidos entre 95 y 96 % se corresponden con un valor de DDH del 70 %, y por tanto pueden ser utilizados para la diferenciación a nivel de especies (Goris y col., 2007; Richter y Rosselló-Mora, 2009). Existen varios modelos de ANI: (i) ANI_b, basado en el algoritmo BLASTn; éste puede ser calculado online según la metodología descrita por Konstantinidis y col. (2005) (enve-omics.ce.gatech.edu/ani/) o de forma local mediante la herramienta **enveomics** así como mediante la herramienta **JSpecies** (Richter y Roselló-Mora, 2009). El otro tipo de ANI es el (ii) ANI_m, basado en la herramienta de alineación ultrarrápida MUMmer. Éste, a diferencia del ANI_b, da resultados más robustos siempre y cuando se trate de genomas completos. Su cálculo se implementa mediante la herramienta **JSpecies** (Richter y Roselló-Mora, 2009). Existe una pequeña discrepancia a la hora de

..... III. Material y métodos

decidir cuál de los dos es más adecuado. Richter y Roselló-Mora (2009), recomiendan el uso de ANIm ya que es más rápido, preciso y robusto; mientras que Li y col. (2015), se inclinan más por el ANIb, ya que mostró una mejor correlación con respecto a la técnica DDH y además concluyeron que el ANIm parecía ser un sustituto insuficiente de la T_m para las comparaciones por encima del nivel de especie.

El **OrthoANI** (*Orthologous Average Nucleotide Identity*) es una versión mejorada del ANI original. Puede ser usado para la clasificación e identificación de procariotas, y el valor de corte propuesto delimitar las especies es de alrededor del 95 %. Es ideal para estudios a gran escala. Éste algoritmo fue publicado por Lee y col. (2016) y las principales diferencias con respecto al ANI original son: (i) para el ANI original se deben obtener los valores recíprocos (ej., A->B y B->A), y calcula el valor de la media para uso taxonómico, mientras que para OrthoANI, únicamente se necesita un valor (A<->B) en base sólo a los genes ortólogos encontrados de forma bidireccional teniendo en cuenta solo el mejor *hit*; (ii) OrthoANI es más rápido; (iii) no se recomienda para comparar genomas de diferentes géneros. Su cálculo se realizó en nuestro servidor mediante la herramienta **OAT** y en la dirección <http://www.ezbiocloud.net/tools/ani>, en este último caso empleando la herramienta USEARCH en vez de BLAST.

De forma complementaria se hizo uso del programa **MyTaxa** (Konstantinidis y Tiedje, 2005). Esta herramienta representa un nuevo algoritmo que extiende el concepto de Identidad Aminoacídica media (**AAI**), índice que representa el promedio de la identidad de secuencia aminoacídica empleado fundamentalmente en microorganismos filgenéticamente distantes. **MyTaxa** sirve para identificar la afiliación taxonómica de una secuencia genómica problema, así como para clasificar secuencias que representan nuevos taxones en tres niveles, siempre que sea posible, especie, género y phylum; sin embargo la resolución a nivel de especie es más limitada debido a los eventos de transferencia horizontal de genes. **MyTaxa** considera todos los genes presentes en un secuencia desconocida (secuencia problema) y los compara con las secuencias depositadas en las bases de datos. La asignación taxonómica la realiza basándose en el análisis de *máximum-likelihood*.

Para llevar a cabo los análisis comparativos entre los genomas de las distintas cepas, con el objetivo de encontrar e identificar regiones homólogas, inserciones y reordenamientos se utilizó **Mauve** (Darling y col., 2004; 2010). Esta herramienta permite visualizar de forma interactiva la comparación de los fragmentos genómicos entre distintas cepas microbianas. Para ello siempre se usa un genoma de referencia el cual debe constituir un genoma cerrado.

Aunque algunos genes son adquiridos externamente o perdidos con el tiempo, existen genes ortólogos compartidos por varios genomas. Si dos genomas están estrechamente relacionados o comparten un ancestro común, van a compartir más genes ortólogos. En contraste, si están lejanamente relacionados o comparten un ancestro distante, el número de genes compartidos será mucho menor. Ésta es la base que se usa para inferir la filogenia basada en la información génica (como presencia/ausencia). Aquí, "gen" significa "CDS", es decir, genes codificadores de proteínas, ya que este tipo de análisis está restringido a los genes que codifican proteínas. La herramienta **Prodigal** (Prokaryotic Dynamic Programming Genefinding Algorithm) (Hyatt y col., 2010) permite hacer una búsqueda exhaustiva de los "CDS" tanto en genomas como en metagenomas.

El pangenoma es el conjunto de genes codificadores de proteínas "CDS" en un grupo de genomas dado. El pangenoma permite visualizar la variación del contenido genético entre las especies/cepas que se encuentran estrechamente relacionadas. Generalmente, para construir un pangenoma se parte de un grupo de genomas con sus genes anotados. El pangenoma comprende: (i) *core-genome*, donde se recogen únicamente los genes compartidos por el grupo de genomas objeto de estudio; (ii) *variable-genome* o genes prescindibles, constituido por los genes presentes en dos o más genomas; y (iii) *strain-specific genes* o genes únicos, aquellos que son específicos de cada genoma en particular. Debemos tener en cuenta que a medida que tenemos un pangenoma mayor, el valor del *core-genome* será menor ya que será más difícil encontrar genes presentes en todos los genomas. Para el cálculo del pangenoma, *core-genome* así como del *variable-genome* se hizo uso de la herramienta **enveomics** (Luo y col., 2013).

III.8. RECLUTAMIENTOS GENÓMICOS

El reclutamiento de los genomas de las cepas de *Salinivibrio* frente a las bases de datos metagenómicos disponibles, procedentes de diversos ambientes hipersalinos (con distintas salinidades), se llevó a cabo mediante la herramienta **BLASTn**. Se utilizó un valor de corte de un 70 % de identidad. La representación de estos reclutamientos se realizó gracias al paquete de herramientas **enveomics.R** (Luo y col., 2013).

Además de los genomas de las cepas de *Salinivibrio* aquí estudiados, se llevaron a cabo reclutamientos, utilizando como control genomas de microorganismos halófilos bien conocidos y descritos a partir de ambientes hipersalinos, siguiendo en todos los casos la misma metodología.

Los metagenomas provenientes de ambientes hipersalinos empleados en este trabajo se obtuvieron de la base de datos MG-RAST (<http://metagenomics.anl.gov/>) (Meyer y col., 2008). Las características de estas bases de datos metagenómicos se recogen en la Tabla III. 5.

Tabla III.5. Características de las bases de datos metagenómicos de los ambientes hipersalinos estudiados.

ND: no depositado.

Nombre	Localización	Tipo	Salinidad (%)	Tamaño (Mpb)	Nº de acceso/ fuente
Santa Pola_13	Alicante (España)	Agua	13	108,8	SRP028290
Santa Pola_19	Alicante (España)	Agua	19	475	SRP007685
Santa Pola_33	Alicante (España)	Agua	33	265,9	SRP028290
Santa Pola_37	Alicante (España)	Agua	37	215,2	SRP007685
IC21	Huelva (España)	Agua	21	310,0	SRP029970
lowSD	San Diego (USA)	Agua	6-8	3,9	SEED #4440437.3
MediumSD	San Diego (USA)	Agua	12-14	4,5	SEED #4440435.3
HighSD	San Diego (USA)	Agua	27-30	3,7	SEED #4440419.3
DCM3	Mar Mediterráneo	Agua	3,8	312,2	SRP002017
SMO1	Huelva (España)	Suelo	---	250	ND

Nombre	Localización	Tipo	Salinidad (%)	Tamaño (Mpb)	Nº de acceso/fuente
SMO2	Huelva (España)	Suelo	---	375	ND
Lake Thetis	LagoThetis (Australia)	Agua	34,8	9,2	AGBJ00000000
Metag_Chile	Laguna Cáhuil (Chile)	Agua	34	10,7	ND
Etoliko	Laguna Etoliko (Greece)	Agua, sedimento	28	116,9	ND
PC6	Isla Floreana (Ecuador)	Agua	6,4	11,5	JCVI_SMPL_1103283000038
Guerrero negro0_1	México	Tapete microbiano	9	8,59	JN427016
Guerrero negro1_2	México	Tapete microbiano	9	7,46	JN427017
Freshwater-fish	San Diego (USA)	Agua	3,5	37,0	18337718
Deep-sea	Hiroshima (Japón)	Agua	2,9	35,2	SRA008615
Med. bathypelagic	Italia	Agua	3,8	7,2	EF597680
Salton sea	California (USA)	Agua	3,5	5,7	EU329738
MM5	Alicante (España)	Agua	5	114,1	http://imicrobe.us/project/view/120

IV. Resultados y Discusión

IV.1. AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS DEL GÉNERO

SALINIVIBRIO

En la presente Tesis Doctoral nos hemos centrado en el estudio taxonómico, biogeográfico, y genómico comparativo del género *Salinivibrio* a partir de ambientes acuáticos hipersalinos. Para aislar cepas del género *Salinivibrio* se realizaron muestreos en salinas de distintas áreas de la geografía española (Alicante, Granada, Gran Canaria, Huelva y Mallorca) y de Puerto Rico. Estos muestreos se llevaron a cabo entre los años 2011 y 2013 en diferentes épocas del año.

Concretamente se realizaron 12 muestreos en 8 **salinas solares** diferentes y se aislaron un total de 288 cepas que posteriormente se analizaron para comprobar si pertenecían al género *Salinivibrio*. Las características de los sitios de muestreo se recogen en la Tabla III.1 de Material y Métodos.

Para el aislamiento, se inocularon 100 µl de las muestras de agua provenientes de los estanques de las salinas en los medios PS, AC y GL, extendiéndose con una espátula esterilizada previamente. Se realizaron diluciones seriadas al décimo en solución de NaCl estéril al 10 % hasta 10⁻⁴. Estas siembras también se realizaron inoculando un volumen de 100 µl por cada una de las diluciones. El pH de los medios se ajustó entre 7 y 7,5 a una salinidad del 15 % de sales totales.

Con el objetivo de aislar cepas del género *Salinivibrio* y ya que éstas son bacterias anaerobias facultativas, se siguió una metodología en paralelo, por un lado, se sembraron tres lotes de placas (uno de medio PS, otro medio GL y otro de medio AC) que se incubaron a 37 °C en presencia de oxígeno; mientras que otro conjunto de placas inoculadas en medio PS, medio GL y medio AC se introdujeron en una cámara de anaerobiosis (Oxoid) también a la misma temperatura; todas las placas se incubaron durante una semana. Las condiciones de ausencia de oxígeno se consiguieron tras la adición de AnaeroGen (Oxoid) y para verificar esta atmósfera se agregó un indicador de anaerobiosis (Oxoid). Una vez completado el periodo de incubación tanto de aerobiosis como de anaerobiosis, las colonias crecidas fueron observadas en el microscopio para seleccionar aquellas que poseían un aspecto curvado o

forma de S. Éstas se volvieron a resembrar en cultivo puro en el mismo medio de aislamiento, pero esta vez ya en presencia de oxígeno. En total obtuvimos en cultivo puro un total de 288 cepas.

Con el fin de determinar la posición filogenética de cada una de ellas y seleccionar solamente las cepas pertenecientes al género *Salinivibrio*, se llevó a cabo la amplificación y secuenciación parcial del gen ARNr 16S según la metodología descrita en los apartados III.3 y III.4 de Material y Métodos. Las secuencias parciales del gen ARNr 16S obtenidas, de aproximadamente 700 pb se compararon con las secuencias disponibles en las bases de datos con la ayuda del programa **BLAST** del servidor NCBI (National Center for Biotechnology Information) y la aplicación **EzTaxon-e**. Los resultados de esta secuenciación parcial se muestran en la Tabla IV.1.

Como se observa en la Tabla IV.1 se aislaron cepas relacionadas filogenéticamente con los géneros *Halomonas* (26 %), *Salinivibrio* (24 %), *Pseudomonas* (12 %), *Marinobacter* (11 %), *Idiomarina* (6 %) y *Cobetia* (4 %). De los géneros *Alcanivorax*, *Alteromonas*, *Bacillus*, *Halovibrio*, *Henriciella*, *Marinococcus*, *Marinomonas*, *Oceanicaulis*, *Pseudoalteromonas*, *Roseivivax*, *Ruegeria*, *Thalassospira* y *Vibrio* se aislaron menos de 10 cepas.

Como estas cepas, a excepción de las pertenecientes al género *Salinivibrio*, no son el objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral, fueron conservadas a -80 °C para poder ser estudiadas en un futuro con más profundidad, ya que hay algunas de ellas que posiblemente puedan constituir nuevos taxones.

Tabla IV.1, Colección de bacterias aisladas, longitud de secuencia amplificada del gen ARNr 16S, fecha y sitio de aislamiento y especie más relacionada filogenéticamente, según la comparación de las secuencias parciales del gen que codifica el ARNr 16S.

Las cepas que presentaron un porcentaje entre el 96 y el 100 % con respecto al género *Salinivibrio* están marcadas en negrita.

Cepa	Longitud de secuencia (pb)	Fecha de aislamiento	Sitio de aislamiento	% de semejanza	Especie más relacionada filogenéticamente
AL184	825	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	98,2	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> NCIMB 701^T
AL185	797	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	99,1	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG^T
AL205	730	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	98,7	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 ^T
AL206	770	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	99,3	<i>Halomonas almeriensis</i> M8 ^T
AL207	814	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	96,6	<i>Idiomarina fontislapidosi</i> F23 ^T
AL208	734	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	99,2	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
AL209	776	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	99,0	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG^T
AL210	810	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	99,1	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG^T
AL211	865	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	99,8	<i>Halomonas halmophila</i> ATCC 19717 ^T
AL213	709	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	96,6	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> NCIMB 701^T
AL219	785	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	99,8	<i>Halomonas halmophila</i> ATCC 19717 ^T
AL220	771	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	99,8	<i>Halomonas halmophila</i> ATCC 19717 ^T
AL221	770	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	99,8	<i>Halomonas halmophila</i> ATCC 19717 ^T
AL224	815	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	99,8	<i>Halomonas halmophila</i> ATCC 19717 ^T
AL225	820	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	99,7	<i>Halomonas halmophila</i> ATCC 19717 ^T
AL226	745	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	99,7	<i>Halomonas halmophila</i> ATCC 19717 ^T
AL227	817	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	99,7	<i>Halomonas fontilapidosi</i> 5CR ^T
AL242	819	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	99,8	<i>Halomonas halmophila</i> ATCC 19717 ^T
AL245	750	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	97,8	<i>Halomonas halmophila</i> ATCC 19717 ^T
AL246	720	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	99,8	<i>Halomonas halmophila</i> ATCC 19717 ^T
AL248	803	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	98,1	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
AL250	802	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	100	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T

Cepa	Longitud de secuencia (pb)	Fecha de aislamiento	Sitio de aislamiento	% de semejanza	Especie más relacionada filogenéticamente
AL251	735	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	97,3	<i>Marinobacter salicampi</i> ISL-40 ^T
AL201A	790	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	99,4	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 ^T
AL254	820	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	100	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> MBIC1303 ^T
AL256	818	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	99,3	<i>Thalassospira tepidiphila</i> 1-1B ^T
AL258	819	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	97,9	<i>Marinobacter salicampi</i> ISL-40 ^T
AL259	813	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	99,8	<i>Marinobacter adhaerens</i> HP15 ^T
AL260	822	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	99,8	<i>Marinobacter adhaerens</i> HP15 ^T
AL261	790	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	99,6	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T
AL262	850	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	100	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T
AL208A	799	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	98,3	<i>Halomonas halmophila</i> ATCC 19717 ^T
AL209A	801	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	98,8	<i>Halomonas halmophila</i> ATCC 19717 ^T
AL210A	795	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	98,6	<i>Halomonas halmophila</i> ATCC 19717 ^T
AL216A	799	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	98,6	<i>Marinobacter pelagius</i> HS225 ^T
AL293	810	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	99,7	<i>Halomonas halmophila</i> ATCC 19717 ^T
AL294	841	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	99,9	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
AL296	769	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	99,7	<i>Halomonas halmophila</i> ATCC 19717 ^T
AL299	802	Noviembre 2011	Santa Pola, Alicante	99,7	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
AR639	751	Mayo 2013	Aragonesas, Huelva	99,0	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
AR640	646	Mayo 2013	Aragonesas, Huelva	97,7	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> NCIMB 701^T
AR642	772	Mayo 2013	Aragonesas, Huelva	99,5	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 ^T
AR647	805	Mayo 2013	Aragonesas, Huelva	99,9	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359^T
AR654	812	Mayo 2013	Aragonesas, Huelva	99,1	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG^T
AR664	813	Mayo 2013	Aragonesas, Huelva	99,1	<i>Marinobacter pelagius</i> HS225 ^T
AR670	770	Mayo 2013	Aragonesas, Huelva	98,4	<i>Cobetia marina</i> DSM 4741 ^T
AR671	782	Mayo 2013	Aragonesas, Huelva	99,7	<i>Halomonas gomseomensis</i> M12 ^T

Cepa	Longitud de secuencia (pb)	Fecha de aislamiento	Sitio de aislamiento	% de semejanza	Especie más relacionada filogenéticamente
AR681	770	Mayo 2013	Aragonesas, Huelva	100	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T
AR682	783	Mayo 2013	Aragonesas, Huelva	98,6	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T
AR683	801	Mayo 2013	Aragonesas, Huelva	98,6	<i>Roseivivax halodurans</i> OCh 239 ^T
AR683	807	Mayo 2013	Aragonesas, Huelva	98,6	<i>Roseivivax halodurans</i> OCh 239 ^T
AR684	794	Mayo 2013	Aragonesas, Huelva	98,7	<i>Roseivivax halodurans</i> OCh 239 ^T
AR686	782	Mayo 2013	Aragonesas, Huelva	100	<i>Halomonas fontilapidosi</i> 5CR ^T
AR689	871	Mayo 2013	Aragonesas, Huelva	99,7	<i>Idiomarina fontislapidosi</i> F23 ^T
CA754	734	Septiembre 2013	Bañaderos, Gran Canaria	99,3	<i>Alteromonas stellipolaris</i> LMG21861 ^T
CA756	752	Septiembre 2013	Bañaderos, Gran Canaria	98,2	<i>Marinobacter segnicrescens</i> SS011B1-4 ^T
CA762	723	Septiembre 2013	Bañaderos, Gran Canaria	99,6	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG^T
CA769	764	Septiembre 2013	Bañaderos, Gran Canaria	98,3	<i>Vibrio azureus</i> LC2-005 ^T
CA771	744	Septiembre 2013	Bañaderos, Gran Canaria	99,5	<i>Vibrio neocaledonicus</i> NC 470 ^T
CA821	789	Septiembre 2013	Bañaderos, Gran Canaria	99,8	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> KCTC 13429 ^T
CA822	745	Septiembre 2013	Bañaderos, Gran Canaria	99,8	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> KCTC 13429 ^T
IB1	884	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	99,0	<i>Cobetia marina</i> DSM 4741 ^T
IB3	801	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	99,8	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
IB4	899	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	100	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
IB5	815	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	100	<i>Idiomarina fontislapidosi</i> F23 ^T
IB6	819	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	100	<i>Idiomarina fontislapidosi</i> F23 ^T
IB9	759	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	99,7	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
IB10	803	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	100	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
IB11	803	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	100	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
IB12	803	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	99,7	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
IB30	810	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	98,1	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
IB51	774	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	99,4	<i>Marinobacter koreensis</i> DD-M3 ^T

Cepa	Longitud de secuencia (pb)	Fecha de aislamiento	Sitio de aislamiento	% de semejanza	Especie más relacionada filogenéticamente
IB52	819	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	100	<i>Halomonas halmophila</i> ATCC 19717 ^T
IB53	800	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	99,8	<i>Halomonas halmophila</i> ATCC 19717 ^T
IB54	773	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	98,5	<i>Halomonas taeanensis</i> BH539 ^T
IB55	802	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	98,6	<i>Halomonas taeanensis</i> BH539 ^T
IB56	825	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	98,6	<i>Halomonas taeanensis</i> BH539 ^T
IB57	768	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	99,3	<i>Halovibrio denitrificans</i> HGD 3 ^T
IB58	785	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	97,3	<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425 ^T
IB61	773	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	99,6	<i>Halomonas taeanensis</i> BH539 ^T
IB62	773	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	99,6	<i>Halomonas taeanensis</i> BH539 ^T
IB63	720	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	99,4	<i>Halomonas taeanensis</i> BH539 ^T
IB64	795	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	99,8	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T
IB65	798	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	100	<i>Idiomarina fontislapidosi</i> F23 ^T
IB66	798	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	100	<i>Idiomarina fontislapidosi</i> F23 ^T
IB67	726	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	100	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
IB68	764	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	100	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
IB69	745	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	100	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
IB70	795	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	99,7	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
IB73	764	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	98,0	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
IB78	764	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	100	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T
IB79	789	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	99,8	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
IB93	807	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	98,1	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
IB106	798	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	99,1	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
IB164	770	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	99,6	<i>Halomonas taeanensis</i> BH539 ^T
IB181	733	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	99,4	<i>Marinobacter koreensis</i> DD-M3 ^T
IB203	802	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	99,1	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG^T

Cepa	Longitud de secuencia (pb)	Fecha de aislamiento	Sitio de aislamiento	% de semejanza	Especie más relacionada filogenéticamente
IB230	796	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	98,6	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
IB231	802	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	99,2	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
IB283	799	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	97,5	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> NCIMB 701^T
IB338	756	Octubre 2011	Isla Bacuta, Huelva	98,5	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG^T
IB550	825	Enero 2013	Isla Bacuta, Huelva	98,7	<i>Halomonas almeriensis</i> M8 ^T
IB557	805	Enero 2013	Isla Bacuta, Huelva	99,1	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG^T
IB560	795	Enero 2013	Isla Bacuta, Huelva	99,5	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359^T
IB561	799	Enero 2013	Isla Bacuta, Huelva	98,7	<i>Vibrio sinaloensis</i> CAIM 797 ^T
IB563	870	Mayo 2013	Isla Bacuta, Huelva	98,8	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG^T
IB574	801	Mayo 2013	Isla Bacuta, Huelva	99,8	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004^T
IB643	820	Mayo 2013	Isla Bacuta, Huelva	99,6	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359^T
IB681	770	Mayo 2013	Isla Bacuta, Huelva	100	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T
IB682	783	Mayo 2013	Isla Bacuta, Huelva	98,6	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T
IB683	801	Mayo 2013	Isla Bacuta, Huelva	98,6	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
IB684	794	Mayo 2013	Isla Bacuta, Huelva	98,7	<i>Halomonas taeanensis</i> BH539 ^T
IB829	731	Septiembre 2013	Isla Bacuta, Huelva	99,6	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T
IB843	771	Septiembre 2013	Isla Bacuta, Huelva	98,9	<i>Halomonas denitrificans</i> M29 ^T
IB845	721	Septiembre 2013	Isla Bacuta, Huelva	99,8	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG^T
IB846	748	Septiembre 2013	Isla Bacuta, Huelva	99,6	<i>Alteromonas macleodii</i> ATCC 27126 ^T
IB850	724	Septiembre 2013	Isla Bacuta, Huelva	100	<i>Pseudoaltermonas shioyasakiensis</i> SE3 ^T
IB851	742	Septiembre 2013	Isla Bacuta, Huelva	100	<i>Pseudoaltermonas shioyasakiensis</i> SE3 ^T
IB853	756	Septiembre 2013	Isla Bacuta, Huelva	98,8	<i>Marinomonas ostreitagani</i> USTD 10306-0438 ^T
IB864	714	Septiembre 2013	Isla Bacuta, Huelva	99,6	<i>Halovibrio denitrificans</i> HGD 3 ^T
IB866	793	Septiembre 2013	Isla Bacuta, Huelva	98,8	<i>Ruegeria mobilis</i> 101030 ^T
IB867	767	Septiembre 2013	Isla Bacuta, Huelva	99,7	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004^T

Cepa	Longitud de secuencia (pb)	Fecha de aislamiento	Sitio de aislamiento	% de semejanza	Especie más relacionada filogenéticamente
IB868	709	Septiembre 2013	Isla Bacuta, Huelva	99,5	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004^T
IB869	733	Septiembre 2013	Isla Bacuta, Huelva	99,7	<i>Salinivibrio siamensis</i> ND1-1^T
IB870	773	Septiembre 2013	Isla Bacuta, Huelva	99,6	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004^T
IB871	777	Septiembre 2013	Isla Bacuta, Huelva	99,5	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG^T
IB872	773	Septiembre 2013	Isla Bacuta, Huelva	99,5	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004^T
IB873	734	Septiembre 2013	Isla Bacuta, Huelva	99,7	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004^T
IB880	765	Septiembre 2013	Isla Bacuta, Huelva	99,4	<i>Vibrio sinaloensis</i> CAIM 797 ^T
IB881	717	Septiembre 2013	Isla Bacuta, Huelva	99,7	<i>Ruegeria mobilis</i> 101030 ^T
IB882	771	Septiembre 2013	Isla Bacuta, Huelva	99,7	<i>Pseudoaltermonas arabiensis</i> k53 ^T
IB883	719	Septiembre 2013	Isla Bacuta, Huelva	99,2	<i>Oceanicaulis alexandrii</i> C116-18 ^T
IC178	799	Octubre 2011	Isla Cristina, Huelva	98,7	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
IC189	789	Octubre 2011	Isla Cristina, Huelva	99,6	<i>Idiomarina loihiensis</i> L2TR ^T
IC190	754	Octubre 2011	Isla Cristina, Huelva	99,6	<i>Halomonas almeriensis</i> M8 ^T
IC192	792	Octubre 2011	Isla Cristina, Huelva	99,4	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
IC193	763	Octubre 2011	Isla Cristina, Huelva	99,6	<i>Halomonas almeriensis</i> M8 ^T
IC194	763	Octubre 2011	Isla Cristina, Huelva	98,7	<i>Halomonas almeriensis</i> M8 ^T
IC196	803	Octubre 2011	Isla Cristina, Huelva	100	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
IC197	802	Octubre 2011	Isla Cristina, Huelva	100	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
IC202	846	Octubre 2011	Isla Cristina, Huelva	99,5	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG^T
IC204	802	Octubre 2011	Isla Cristina, Huelva	99,6	<i>Halomonas almeriensis</i> M8 ^T
IC215	763	Octubre 2011	Isla Cristina, Huelva	100	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
IC317	815	Octubre 2011	Isla Cristina, Huelva	98,4	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> NCIMB 701^T
IC229	686	Octubre 2011	Isla Cristina, Huelva	97,6	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
IC236	740	Octubre 2011	Isla Cristina, Huelva	97,9	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
IC237	804	Octubre 2011	Isla Cristina, Huelva	98,3	<i>Halovibrio denitrificans</i> HGD 3 ^T

Cepa	Longitud de secuencia (pb)	Fecha de aislamiento	Sitio de aislamiento	% de semejanza	Especie más relacionada filogenéticamente
IC239	803	Octubre 2011	Isla Cristina, Huelva	100	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
IC241	746	Octubre 2011	Isla Cristina, Huelva	98,5	<i>Halovibrio denitrificans</i> HGD 3 ^T
MA339	890	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,6	<i>Cobetia marina</i> DSM 4741 ^T
MA340	780	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,3	<i>Cobetia marina</i> DSM 4741 ^T
MA342	720	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	93,4	<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425 ^T
MA344	926	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,5	<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425 ^T
MA345	884	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	98,9	<i>Halomonas arcis</i> AJ282 ^T
MA347	859	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,5	<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425 ^T
MA349	808	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,8	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
MA350	731	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	98,8	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
MA351	769	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	97,3	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359^T
MA352	735	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,4	<i>Halomonas arcis</i> AJ282 ^T
MA353	792	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,8	<i>Idiomarina fontislapidosi</i> F23 ^T
MA356	787	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	100	<i>Idiomarina fontislapidosi</i> F23 ^T
MA358	797	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	93,7	<i>Idiomarina loihiensis</i> L2TR ^T
MA359	695	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	100	<i>Halomonas alkaliphila</i> 18Bag ^T
MA360	765	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	96,5	<i>Halomonas alkaliphila</i> 18Bag ^T
MA362	750	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,5	<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425 ^T
MA363	841	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,8	<i>Idiomarina fontislapidosi</i> F23 ^T
MA366	822	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,6	<i>Idiomarina loihiensis</i> L2TR ^T
MA372	802	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,7	<i>Idiomarina fontislapidosi</i> F23 ^T
MA373	796	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	98,6	<i>Halomonas arcis</i> AJ282 ^T
MA384	763	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,6	<i>Halomonas alkaliphila</i> 18Bag ^T
MA385	979	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	100	<i>Idiomarina fontislapidosi</i> F23 ^T
MA387	729	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,8	<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425 ^T

Cepa	Longitud de secuencia (pb)	Fecha de aislamiento	Sitio de aislamiento	% de semejanza	Especie más relacionada filogenéticamente
MA388	765	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	98,2	<i>Halomonas venusta</i> DSM 4743 ^T
MA389	944	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,7	<i>Halomonas alkaliphila</i> 18Bag ^T
MA390	895	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,8	<i>Idiomarina fontislapidosi</i> F23 ^T
MA391	769	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	98,2	<i>Idiomarina loihiensis</i> L2TR ^T
MA392	850	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,5	<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425 ^T
MA394	856	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	98,8	<i>Halomonas gomseomensis</i> M12 ^T
MA396	795	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,3	<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425 ^T
MA397	705	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,1	<i>Bacillus kochii</i> WCC 4582 ^T
MA398	702	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,0	<i>Alcanivorax venustensis</i> ISO4 ^T
MA402	761	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	100	<i>Alcanivorax venustensis</i> ISO4 ^T
MA403	866	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	100	<i>Bacillus kochii</i> WCC 4582 ^T
MA406	906	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	100	<i>Halomonas alkaliphila</i> 18Bag ^T
MA410	846	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,7	<i>Marinobacter adhaerens</i> HP15 ^T
MA414	722	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,8	<i>Halomonas janggokensis</i> M24 ^T
MA415	750	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	98,7	<i>Henriciella litoralis</i> SD10 ^T
MA416	689	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	98,0	<i>Henriciella marina</i> Iso4 ^T
MA417	783	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,7	<i>Alcanivorax venustensis</i> ISO4 ^T
MA418	760	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,4	<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425 ^T
MA421	805	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	98,8	<i>Salinivibrio costicola subsp. alcaliphilus</i> DSM 16359^T
MA422	903	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,3	<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425 ^T
MA424	711	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,0	<i>Cobetia marina</i> DSM 4741 ^T
MA427	740	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	98,9	<i>Salinivibrio costicola subsp. alcaliphilus</i> DSM 16359^T
MA429	733	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,6	<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425 ^T
MA431	727	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	100	<i>Halomonas alkaliphila</i> 18Bag ^T
MA432	833	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	98,9	<i>Halomonas gomseomensis</i> M12 ^T

Cepa	Longitud de secuencia (pb)	Fecha de aislamiento	Sitio de aislamiento	% de semejanza	Especie más relacionada filogenéticamente
MA434	726	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,1	<i>Halomonas janggokensis</i> M24 ^T
MA435	746	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,3	<i>Halomonas sulfidaeris</i> ATCC BAA-803 ^T
MA439	850	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	98,2	<i>Marinobacter koreensis</i> DD-M3 ^T
MA440	802	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	98,5	<i>Salinivibrio costicola subsp. alcaliphilus</i> DSM 16359^T
MA442	786	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,1	<i>Bacillus kochii</i> WCC 4582 ^T
MA458	863	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	94,8	<i>Roseivivax halodurans</i> OCh 239 ^T
MA462	805	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,1	<i>Halomonas taeanensis</i> BH539 ^T
MA463	725	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	100	<i>Halomonas janggokensis</i> M24 ^T
MA466	759	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,6	<i>Halomonas janggokensis</i> M24 ^T
MA470	907	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,8	<i>Idiomarina fontislapidosi</i> F23 ^T
MA471	854	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	100	<i>Halomonas janggokensis</i> M24 ^T
MA472	949	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	100	<i>Halomonas fontilapidosi</i> 5CR ^T
MA475	925	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	98,4	<i>Henriciella marina</i> Iso4 ^T
MA480	832	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,8	<i>Alcanivorax venustensis</i> ISO4 ^T
MA481	943	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	99,8	<i>Idiomarina fontislapidosi</i> F23 ^T
MA483	927	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	94,6	<i>Roseivivax halodurans</i> OCh 239 ^T
MA484	851	Noviembre 2012	La Malahá, Granada	100	<i>Cobetia marina</i> DSM 4741 ^T
MA505	687	Mayo 2013	La Malahá, Granada	97,5	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T
MA510	846	Mayo 2013	La Malahá, Granada	100	<i>Marinobacter adhaerens</i> HP15 ^T
MA513	846	Mayo 2013	La Malahá, Granada	99,1	<i>Alcanivorax venustensis</i> ISO4 ^T
MA515	735	Mayo 2013	La Malahá, Granada	98,0	<i>Henriciella aquimarina</i> P38 ^T
MA519	715	Mayo 2013	La Malahá, Granada	97,5	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T
MA537	650	Mayo 2013	La Malahá, Granada	98,6	<i>Cobetia marina</i> DSM 4741 ^T
MA607	853	Mayo 2013	La Malahá, Granada	98,7	<i>Salinivibrio costicola subsp. alcaliphilus</i> DSM 16359^T
MA610	655	Mayo 2013	La Malahá, Granada	100	<i>Cobetia marina</i> DSM 4741 ^T

Cepa	Longitud de secuencia (pb)	Fecha de aislamiento	Sitio de aislamiento	% de semejanza	Especie más relacionada filogenéticamente
ML85	689	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	98,8	<i>Marinobacter salicampi</i> ISL-40 ^T
ML165	730	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	99,8	<i>Marinococcus luteus</i> YIM 91094 ^T
ML161	803	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	100	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 ^T
ML112	754	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	99,8	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T
ML167	755	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	97,6	<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425 ^T
ML168	789	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	98,7	<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425 ^T
ML198	850	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	98,1	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> NCIMB 701^T
ML199	798	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	99,3	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG^T
ML200	905	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	98,7	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> NCIMB 701^T
ML201	850	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	98,8	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359^T
ML216	819	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	98,9	<i>Marinobacter salicampi</i> ISL-40 ^T
ML233	770	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	100	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T
ML234	770	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	100	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T
ML235	770	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	99,0	<i>Halomonas sinaiensis</i> ALO Sharm ^T
ML276	786	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	96,5	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> NCIMB 701^T
ML277	850	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	99,6	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359^T
ML278	852	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	99,1	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG^T
ML279	759	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	98,9	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG^T
ML288	804	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	97,5	<i>Salinivibrio siamensis</i> ND1-1^T
ML289	832	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	98,5	<i>Salinivibrio siamensis</i> ND1-1^T
ML290	797	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	99,5	<i>Salinivibrio siamensis</i> ND1-1^T
ML315	800	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	98,8	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG^T
ML316	795	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	97,1	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG^T
ML318	850	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	97,5	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG^T
ML319	750	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	97,3	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> NCIMB 701^T

Cepa	Longitud de secuencia (pb)	Fecha de aislamiento	Sitio de aislamiento	% de semejanza	Especie más relacionada filogenéticamente
ML320	802	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	98,7	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
ML321	751	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	97,8	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
ML322	704	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	98,7	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T
ML328	654	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	97,5	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
ML328A	803	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	97,3	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
ML328B	764	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	97,9	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
ML329	741	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	98,1	<i>Salinivibrio siamensis</i> ND1-1 ^T
ML330	769	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	99,1	<i>Salinivibrio siamensis</i> ND1-1 ^T
ML331	743	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	98,7	<i>Salinivibrio siamensis</i> ND1-1 ^T
ML332	789	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	98,5	<i>Salinivibrio siamensis</i> ND1-1 ^T
ML333	801	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	97,4	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T
ML334	763	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	98,1	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
ML335	809	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	98,3	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T
ML336	810	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	98,5	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
ML337	657	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	97,8	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
ML338	637	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	97,3	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359 ^T
ML339	754	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	98,7	<i>Marinobacter salicampi</i> ISL-40 ^T
ML561	789	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	97,5	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T
ML563	763	Noviembre 2011	Es Trenc, Mallorca	99,1	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T
PR3	770	Septiembre 2013	Cabo Rojo (Puerto Rico)	100	<i>Cobetia marina</i> DSM 4741 ^T
PR4	781	Septiembre 2013	Cabo Rojo (Puerto Rico)	99,8	<i>Marinobacter koreensis</i> DD-M3 ^T
PR5	738	Septiembre 2013	Cabo Rojo (Puerto Rico)	99,7	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285 ^T
PR6	752	Septiembre 2013	Cabo Rojo (Puerto Rico)	99,2	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004 ^T
PR7	780	Septiembre 2013	Cabo Rojo (Puerto Rico)	99,8	<i>Cobetia marina</i> DSM 4741 ^T
PR11	750	Septiembre 2013	Cabo Rojo (Puerto Rico)	100	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004 ^T

Cepa	Longitud de secuencia (pb)	Fecha de aislamiento	Sitio de aislamiento	% de semejanza	Especie más relacionada filogenéticamente
PR12	677	Septiembre 2013	Cabo Rojo (Puerto Rico)	100	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285^T
PR15	688	Septiembre 2013	Cabo Rojo (Puerto Rico)	99,5	<i>Marinobacter koreensis</i> DD-M3 ^T
PR39	757	Septiembre 2013	Cabo Rojo (Puerto Rico)	99,6	<i>Cobetia marina</i> DSM 4741 ^T
PR40	788	Septiembre 2013	Cabo Rojo (Puerto Rico)	99,4	<i>Marinobacter koreensis</i> DD-M3 ^T
PR42	735	Septiembre 2013	Cabo Rojo (Puerto Rico)	99,6	<i>Cobetia amphilecti</i> KMM 1561 ^T
PR63	743	Septiembre 2013	Cabo Rojo (Puerto Rico)	99,4	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG^T
PR64	708	Septiembre 2013	Cabo Rojo (Puerto Rico)	99,5	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG^T
PR919	733	Septiembre 2013	Cabo Rojo (Puerto Rico)	100	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004^T
PR932	779	Septiembre 2013	Cabo Rojo (Puerto Rico)	99,7	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285^T
PR943	772	Septiembre 2013	Cabo Rojo (Puerto Rico)	99,4	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG^T
PR944	795	Septiembre 2013	Cabo Rojo (Puerto Rico)	98,7	<i>Cobetia amphilecti</i> KMM 1561 ^T
PR983	786	Septiembre 2013	Cabo Rojo (Puerto Rico)	99,2	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285^T

Con respecto cepas aisladas pertenecientes al género *Salinivibrio* se obtuvieron un total de 70 cepas. A continuación, se seleccionaron aquellas cepas cuyas secuencias del gen ARNr 16S presentaban unos porcentaje de semejanza con respecto a especies ya descritas del género *Salinivibrio* entre el 96 y 100 %, con la finalidad de llevar a cabo un estudio taxonómico más detallado de ellas.

Estas cepas seleccionadas están marcadas en negrita en la Tabla IV.1. En la tabla IV.2 se recogen en forma de resumen todas las bacterias aisladas de cada muestreo y las cepas pertenecientes al género *Salinivibrio*. Como puede observarse el mayor número de cepas pertenecientes al género *Salinivibrio* se aislaron de Es Trenc (Mallorca) con un total de 28 cepas, esto puede deberse a que el pH de la muestra (7,4) y la salinidad (12 % sales totales) poseen valores óptimos de crecimiento para los miembros del género *Salinivibrio*, además, la toma de muestra se realizó en Noviembre de 2011, época del año en la que llueve y por tanto los % de salinidad en las salinas son menores que en épocas estivales del año. Mientras que en las salinas de Bañaderos (Canarias) sólo se pudo obtener un aislado perteneciente a este género quizás debido a la época del año en la que se realizó el muestreo (Figura IV.01).

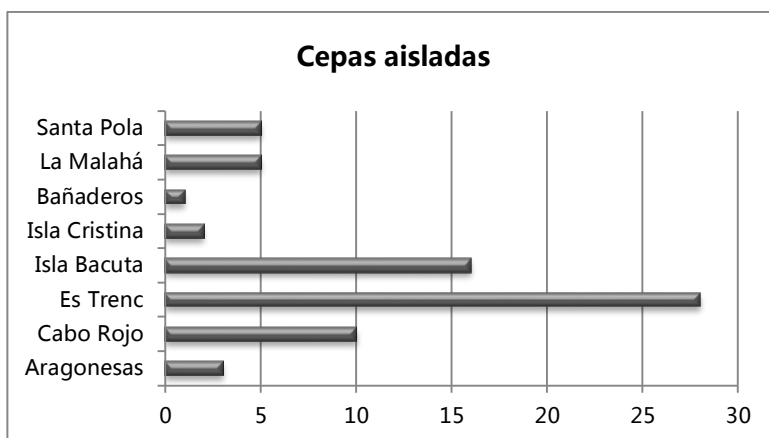


Figura IV.01. Número de cepas aisladas según su sitio de aislamiento.

Tabla IV.2. Sitio y fecha de cada muestra junto con las bacterias aisladas y las cepas relacionadas filogenéticamente con el género *Salinivibrio*.

Lugar de muestreo	Fecha de muestreo	Bacterias aisladas	Cepas pertenecientes al género <i>Salinivibrio</i>
Aragonesas (Huelva)	Mayo-2013	15	3
Isla Bacuta (Huelva)	Octubre-2011	41	3
	Enero-2013	4	2
	Mayo-2013	7	3
	Septiembre-2013	20	8
Isla Cristina (Huelva)	Octubre-2011	17	2
Santa Pola (Alicante)	Noviembre-2011	39	5
Es Trenc (Mallorca)	Noviembre-2011	44	28
La Malahá (Granada)	Noviembre-2012	67	4
	Noviembre-2013	8	1
Bañaderos (Gran Canaria)	Septiembre-2013	7	1
Cabo Rojo (Puerto Rico)	Septiembre-2013	19	10

Una vez seleccionadas las 70 cepas se procedió a realizar un estudio taxonómico detallado comenzando por la secuenciación completa del gen ARNr 16S. La colección de las 70 cepas aisladas así como su longitud de secuencia, porcentaje de semejanza y especie a la que más se parece, se recogen en la Tabla IV.3.

Tabla IV.3. Colección de cepas pertenecientes al género *Salinivibrio* con su especie más relacionada filogenéticamente, según la comparación de las secuencias casi completas del gen que codifica el ARNr 16S.

Cepa	Longitud de secuencia (pb)	% de semejanza	Especie más relacionada filogenéticamente
<i>Salinivibrio</i> sp. AL184	1435	98,1	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. AL185	1203	98,6	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> NCIMB 701 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. AL209	1438	98,8	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. AL210	1415	98,6	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. AL213	1419	99,6	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. AR640	1406	99,6	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. AR647	1469	100	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. AR654	1464	98,9	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T

Cepa	Longitud de secuencia (pb)	% de semejanza	Especie más relacionada filogenéticamente
<i>Salinivibrio</i> sp. CA762	1343	99,4	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. IB203	1455	99,1	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. IB283	1480	98,9	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. IB338	1461	98,2	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. IB557	1465	98,9	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. IB560	1440	98,9	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> NCIMB 701 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. IB563	1447	99,0	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> NCIMB 701 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. IB574	1303	98,5	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. IB643	1437	99,5	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. IB845	1426	99,4	<i>Salinivibrio siamensis</i> ND1-1 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. IB867	1393	99,1	<i>Salinivibrio siamensis</i> ND1-1 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. IB868	1475	98,9	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. IB869	1363	98,7	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. IB870	1387	99,3	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. IB871	1393	99,4	<i>Salinivibrio siamensis</i> ND1-1 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. IB872	1410	99,1	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. IB873	1453	99,3	<i>Salinivibrio siamensis</i> ND1-1 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. IC202	1478	98,9	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> NCIMB 701 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. IC317	1435	99,0	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. MA351	1323	100	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. MA421	1480	98,7	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> NCIMB 701 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. MA427	1432	99,8	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. MA440	1480	98,5	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. MA607	1425	98,8	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. ML198	1301	98,0	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. ML199	1242	99,1	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. ML200	1463	98,9	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> NCIMB 701 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. ML201	1452	98,8	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. ML276	1411	98,1	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> NCIMB 701 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. ML277	1483	98,5	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> NCIMB 701 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. ML278	1270	99,4	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. ML279	1203	98,6	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. ML288	1449	99,1	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. ML289	1245	99,3	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. ML290	1352	99,2	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> NCIMB 701 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. ML315	1447	98,9	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. ML316	1397	99,5	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. ML318	1479	99,6	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. ML319	1469	99,0	<i>Salinivibrio siamensis</i> ND1-1 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. ML320	1474	98,6	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> NCIMB 701 ^T

Cepa	Longitud de secuencia (pb)	% de semejanza	Especie más relacionada filogenéticamente
<i>Salinivibrio</i> sp. ML321	1472	99,1	<i>Salinivibrio siamensis</i> ND1-1 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. ML328	1289	98,7	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> NCIMB 701 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. ML328A	1431	99,4	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp. ML328B	1235	99,1	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp ML329	1408	95,6	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp ML330	1009	98,4	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> NCIMB 701 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp ML331	1209	99,5	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> NCIMB 701 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp ML332	1471	98,6	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp ML334	1405	99,5	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp ML336	1253	99,3	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> NCIMB 701 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp ML337	1437	99,5	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp ML338	1335	99,1	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp PR11	1367	99,5	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp PR12	1353	99,6	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp PR5	1366	98,5	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> NCIMB 701 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp PR6	1468	99,4	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp PR63	1386	99,5	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp PR64	1389	99,5	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp PR919	1395	99,7	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp PR932	1393	99,5	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285 ^T
<i>Salinivibrio</i> sp PR943	1401	99,4	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T
<i>Salinivibrio</i> sp PR983	1459	99,3	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T

De todas las cepas de *Salinivibrio* aisladas, solamente 1, *Salinivibrio* sp. ML278 presentaba una alta homología, del 99,4 %, con *Salinivibrio proteolyticus* AF-2004^T. 6 cepas presentaban una homología del 99,0 al 99,4 % con la especie *Salinivibrio siamensis* ND1-1^T; otras 6 cepas presentaban una homología del 98,5 al 99,7 % con *Salinivibrio costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T; 12 cepas mostraban una homología del 98,5 al 100 % con la especie *Salinivibrio costicola* subsp. *alcaliphilus* DSM 16359^T; 15 cepas mostraban una homología del 98,1 al 99,5 % con *Salinivibrio costicola* subsp. *costicola* NCIMB 701^T y finalmente, 30 cepas presentaban una homología del 95,6 al 99,6 % con *Salinivibrio sharmensis* BAG^T, siendo ésta la especie más predominante en base a los muestreos desarrollados (Figura IV.02).

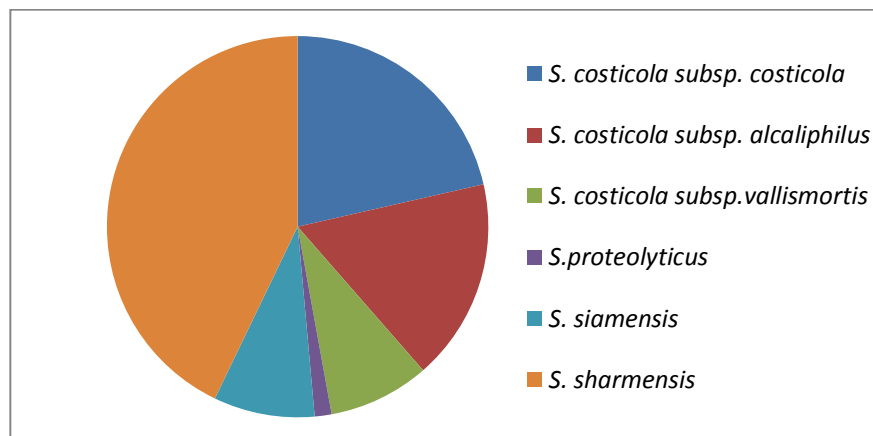


Figura IV.02. Representación del número de cepas aisladas pertenecientes a cada especie del género *Salinivibrio*.

La fuente de aislamiento de todas las cepas aisladas fueron **salinas solares**, mientras que de las cepas ya descritas fueron: en el caso de *S. costicola* subsp. *costicola* CECT 4059^T carne curada; *S. costicola* subsp. *alcaliphilus* DSM 19052^T, *S. proteolyticus* DSM 19052^T y *S. sharmensis* DSM 18182^T lagos salinos; para *S. costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T estanque hipersalino y para *S. siamensis* JCM 14472^T producto de pescado fermentado.

Por otro lado, las cepas tipo ya descrita también se secuenciaron para verificar si nuestras secuencias eran las mismas que las secuencias depositadas. En todos los casos, las secuencias eran las mismas y con la misma longitud, menos el caso de la especie *S. proteolyticus*, donde nuestra secuencia poseía una longitud mayor que la secuencia depositada (1489 pb de la cepa depositada frente a 1510 pb de nuestra cepa secuenciada). Todas estas cepas secuenciadas se depositaron en las bases de datos GenBank/EMBL/DDB.

IV.2. FILOGENIA DEL GÉNERO *SALINIVIBRIO* BASADA EN EL ANÁLISIS COMPARATIVO DE SECUENCIAS DEL GEN ARNr 16S Y GENES *HOUSEKEEPING*

Una vez obtenida la colección de setenta cepas de *Salinivibrio* y realizada la secuenciación y amplificación con el gen ARNr 16S abordamos el siguiente objetivo de la presente Tesis Doctoral. Para ello, nos disponemos a analizar la resolución de este gen para este género y de otros genes conservados, denominados genes *housekeeping* con el objetivo de verificar la actual clasificación de éste género.

IV.2.1. Análisis del gen ARNr 16S

El género *Salinivibrio* consta de cuatro especies, *S. proteolyticus*, *S. siamensis*, *S. sharmensis* y además *S. costicola* que consta de tres subespecies *S. costicola* subsp. *costicola*, *S. costicola* subsp. *alcaliphilus* y *S. costicola* subsp. *vallismortis*. Como cabría esperar, estas tres subespecies deberían agruparse en el árbol filogenético del gen ARNr 16S conformando un solo grupo; pero tal y como se observa en la Figura IV.03 estas tres subespecies no se encuentran formando un grupo mono filetico, sino que por un lado aparece *S. costicola* subsp. *costicola* asociada con *S. costicola* subsp. *alcaliphilus*, mientras que *S. costicola* subsp. *vallismortis*, aparece en otro *clúster* agrupada con la especie *S. proteolyticus* poniendo en evidencia que la clasificación de éste género necesita una reevaluación. Esta idea se ve apoyada por estudios previos realizados en el género *Salinivibrio* en los cuales se observó esta misma incoherencia (Chamroensaksri y col., 2009; Amoozegar y col., 2008, Romano y col., 2011; Gorriti y col., 2014).

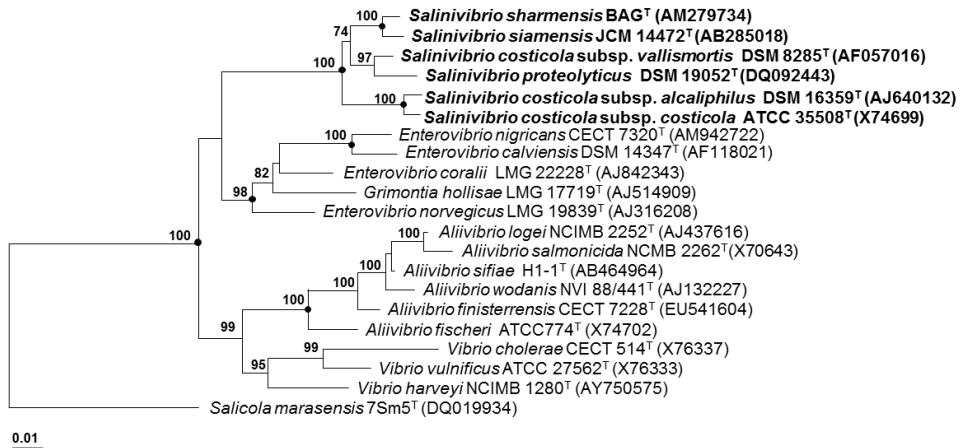


Figura IV.03. Árbol filogenético obtenido por el método *neighbour-joining* basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas tipo del género *Salinivibrio* y otros miembros de la familia *Vibrionaceae*. Los círculos negros indican los nodos que se mantienen en los árboles generados utilizando los algoritmos *maximum-parsimony* y *maximum-likelihood*. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores estimados de bootstrap iguales o superiores al 70 %. Como *outgroup* se ha utilizado la cepa tipo de *Salicola marasensis* 7Sm5^T. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

A continuación, se procedió a la construcción de los correspondientes árboles filogenéticos basados en el gen ARNr 16S de las setenta cepas aisladas y las cepas tipo de las especies descritas del género *Salinivibrio*. Como grupos externos (*outgroups*) para determinar la raíz de los árboles generados se han utilizado las secuencias del gen ARNr 16S de la especie *Vibrio cholerae* N16961^T.

Como se puede observar, en cada árbol filogenético se presenta una topología diferente, apenas existen filogrupos definidos; y en algunos casos parecen arboles caóticos; lo que sí se puede apreciar, es que las tres subespecies en ninguno de los árboles forman un grupo monofilético, reforzando la idea anteriormente expuesta de que la clasificación de éste género necesita una revisión. Los valores de soporte de rama son bajos, en la mayoría de los casos inferiores al 70 %, especialmente en los nodos más internos. Además no existe correlación entre los diferentes algoritmos *maximum-likelihood*, *neighbour-joining* y *maximum-parsimony* (Figura IV.04, IV.05 y IV.06).

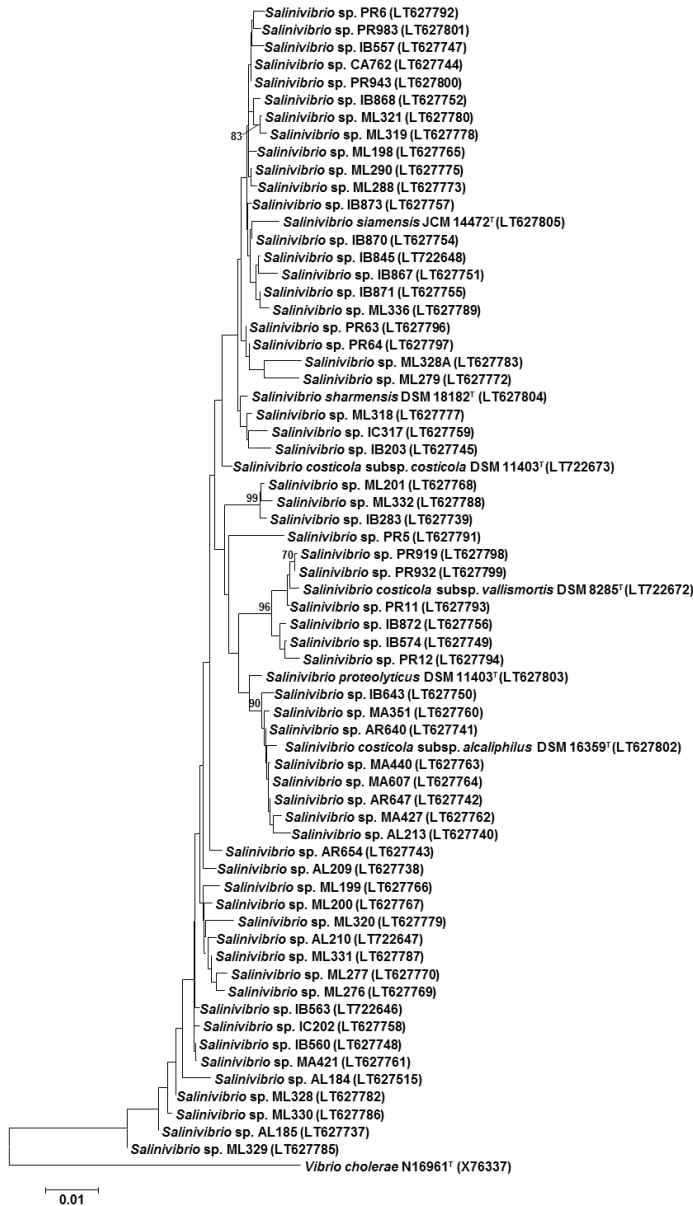


Figura IV.04. Árbol filogenético obtenido por el método *neighbour-joining* basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas aisladas y las cepas tipo del género *Salinivibrio*. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores estimados de *bootstrap* iguales o superiores al 70 %. Como *outgroup* se ha utilizado la cepa tipo de *Vibrio cholerae* N16961^T. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

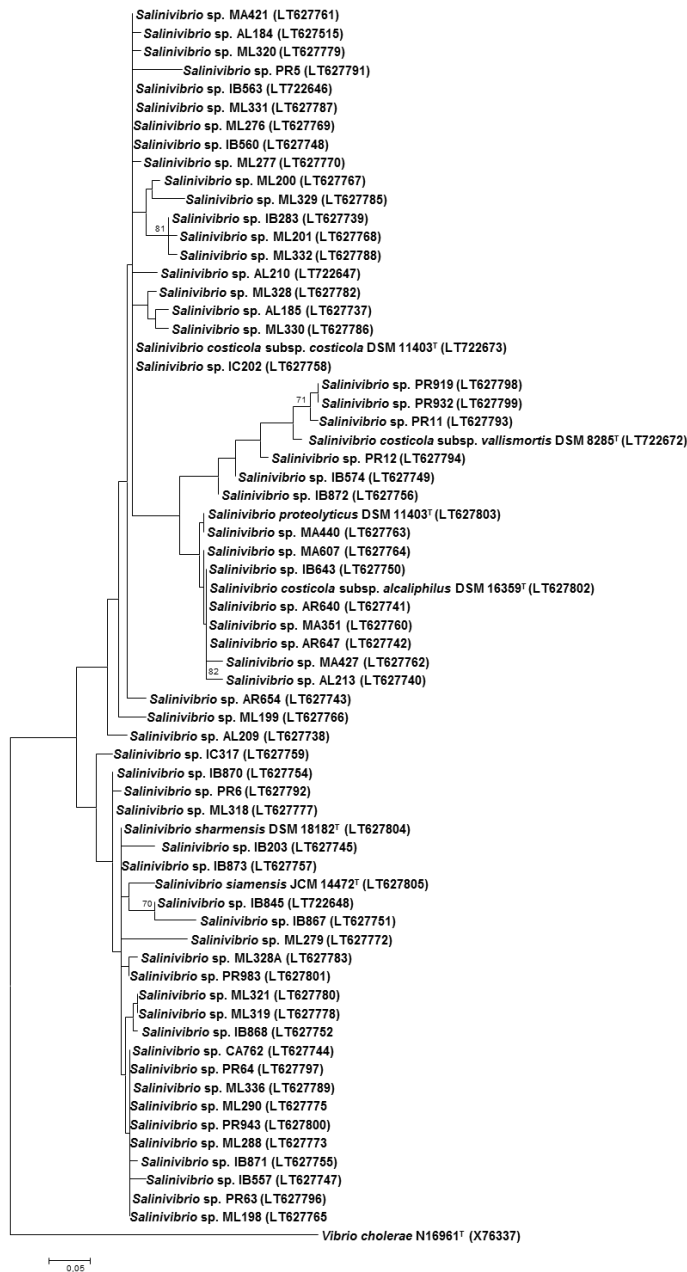


Figura IV.05. Árbol filogenético obtenido por el método *maximum-parsimony* basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas aisladas y las cepas tipo del género *Salinivibrio*. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores estimados de *bootstrap* iguales o superiores al 70 %. Como *outgroup* se ha utilizado la cepa tipo de *Vibrio cholerae* N16961^T. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

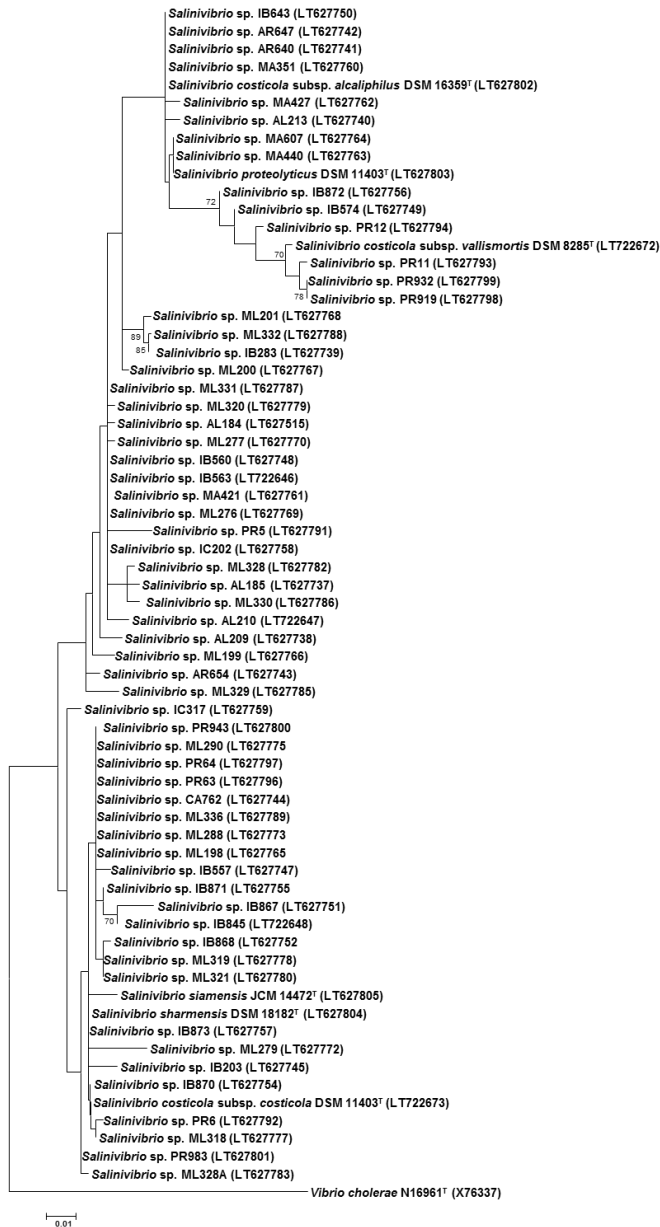


Figura IV.06. Árbol filogenético obtenido por el método *maximum-likelihood* basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas aisladas y las cepas tipo del género *Salinivibrio*. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores estimados de *bootstrap* iguales o superiores al 70 %. Como *outgroup* se ha utilizado la cepa tipo de *Vibrio cholerae* N16961^T. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

Por otro lado, en la Tabla IV.4 se muestran los porcentajes de semejanza entre las secuencias del gen ARNr 16s de las cepas aisladas así como de las cepas tipo. Está establecido que el punto de corte a nivel de especie según el gen ARNr 16S se denota en el 97 % de similitud. Como observamos en la Tabla IV.4, el porcentaje de semejanza entre las cepas objeto de este estudio y las cepas tipo oscilaba entre el 96,4 y el 100%; siendo solo tres cepas, la ML279, ML328A y ML330 las que poseían valores entre el 96,4 y el 97% (Tabla IV.4). Asimismo, los porcentajes de semejanza entre las especies y subespecies ya descritas también eran iguales o superiores al 96,4 %.

Concluyendo esto, se demuestra que el análisis de las secuencias del gen ARNr 16S junto con la topología de los árboles filogenéticos, refleja que el gen ARNr 16S no posee la suficiente resolución a nivel de especie dentro del género *Salinivibrio*.

Sin embargo, el gen ARNr 16S si permitió una buena resolución a nivel de género ya que gracias a él pudimos seleccionar las cepas para realizar un estudio en profundidad del género *Salinivibrio*.

IV.2.2. Análisis por Secuenciación Multilócica (MLSA)

Como acabamos de observar en el apartado anterior y habiéndose puesto de manifiesto en varios estudios previos, el gen ARNr 16S ha mostrado no ser un marcador filogenético útil para la familia *Vibrionaceae* (Thompson y col., 2005, 2008, Pascual y col., 2010; López-Hermoso y col., 2017a).

Para ello, se ha propuesto el uso de un Análisis por Secuenciación Multilócica para estudiar la filogenia de estos microorganismos. El MLSA es una de las técnicas que más relevancia ha adquirido en taxonomía en los últimos años debido a su gran poder de resolución a la hora de realizar clasificaciones o identificaciones e inferir relaciones filogenéticas, siendo considerada la aproximación más cercana a la hibridación ADN-ADN para la delimitación de una especie procarionta. Hasta la fecha no existe un conjunto de genes que ofrezca un poder de resolución óptimo en todos los grupos taxonómicos procariontas. De esta manera, para cada grupo taxonómico hay que definir la combinación específica de genes que resulte más óptima.

La finalidad de este apartado ha sido la búsqueda así como la evaluación del poder de resolución y la capacidad de inferir en las relaciones filogenéticas de 4 genes *housekeeping* (*gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD*). En el estudio se ha incluido la cepa de referencia de *V. cholerae* como grupo externo para enraizar los árboles generados.

Los genes seleccionados para llevar a cabo el MLSA han sido: *gyrB* (subunidad B de la ADN girasa), *recA* (recombinasa A), *rpoA* (subunidad α de la ARN polimerasa) y *rpoD* (factor σ 70 de la ARN polimerasa). La selección de los cuatro genes codificantes de proteínas utilizados en este estudio, se ha realizado en base a su éxito en estudios previos de MLSA de la familia *Vibrionaceae* (Thompson y col., 2005; 2008; Pascual y col., 2010).

En el caso del gen *gyrB*, éste fue diseñado ya que en un principio seleccionamos la secuencia de este gen en base a los estudios previamente descritos, pero no nos consiguió amplificar de forma óptima, por lo que mediante el programa **BOXSHADE 3.21** y una serie de genomas de géneros filogenéticamente cercanos al género *Salinivibrio* (*Vibrio*, *Aliivibrio*, *Photobacterium* y *Listonella*), y de *Escherichia coli* como especie

representante de la clase *Gammaproteobacteria* conseguimos seleccionar las zonas conservadas que se usaron para el diseño de los *primers* de este gen.

Inicialmente, también se seleccionaron en este estudio otros genes, tales como *atpA* (subunidad α de la ATP sintasa F1), *secA* (subunidad SecA de la proteína translocasa) y *pyrH* (uridilato quinasa) pero posteriormente se descartaron debido a la imposibilidad de obtener los amplicones correspondientes o a su bajo grado de conservación entre las distintas especies, lo que impedía su correcto alineamiento (Pascual y col., 2010; de la Haba y col., 2012).

La amplificación y secuenciación de los genes seleccionados se realizó con éxito en casi la totalidad de las cepas. Únicamente no se ha podido obtener la secuencia del gen *recA* de *Salinivibrio* sp. ML279, *Salinivibrio* sp. ML321, *Salinivibrio* sp. ML329 y *Salinivibrio* sp. ML330; del gen *rpoA* de *Salinivibrio* sp. PR63 y del gen *rpoD* de *Salinivibrio* sp. AR647, *Salinivibrio* sp. ML201Y *Salinivibrio* sp. PR12. La longitud de los alineamientos fue de 623 pb para el gen *gyrB*, 771 pb para el gen *recA*, 825 pb para el gen *rpoA* y 741 pb para el gen *rpoD*. La longitud total del alineamiento de las secuencias de los cuatro genes concatenados fue de 2981 nucleótidos.

IV.2.2.1. Análisis de los genes concatenados

Una vez obtenida la secuencia de los cuatro genes *gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD* se procedió a la concatenación de los mismos.

La secuencia concatenada de los cuatro genes mejora la calidad de la reconstrucción filogenética y optimiza la resolución taxonómica añadiendo más datos informativos y minimizando el peso de los eventos de recombinación.

En la filogenética molecular, el uso de un conjunto mínimo de genes es crucial para reducir el tiempo y el costo, así como para mejorar la precisión del análisis. Esto es de particular importancia cuando se identifican especies y se elucida la estructura y evolución de la población en un súper taxón

bacteriano como en el caso de la familia *Vibrionaceae*, que tiene más de 140 especies (Swabe y col., 2013).

Además, el uso de los genes concatenados permitió una clara delimitación en grupos monofiléticos de todas las cepas tanto aisladas como de referencia del género *Salinivibrio*.

Se realizó por tanto la concatenación de los cuatro genes *housekeeping gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD* de las setenta cepas en estudio así como las cepas tipo del género *Salinivibrio*. La concatenación de la secuencia de los cuatro genes (*gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD*) produjo una alineación de 2981 nucleótidos. El porcentaje de semejanza entre las setenta y seis cepas objeto de estudio osciló entre el 84,8 al 100% (Tabla IV.5). El árbol filogenético obtenido en el análisis de los genes concatenados mediante el algoritmo *neighbour-joining* (Figura IV.07) mostró que las setenta y seis cepas constituían cuatro filogrupos diferentes. La especie *Salinivibrio sharmensis* (con un alto valor de soporte de rama del 100%), no pudo ser incluida dentro de ningún filogrupo.

El filogrupo 1 consta de treinta y cuatro cepas. Todas ellas fueron aisladas de muestras de aguas de salinas solares: cinco de las cuales fueron aisladas de Santa Pola, Alicante; una de Aragonesas, Huelva; cinco de Isla Bacuta, Huelva; dos de Isla Cristina, Huelva; una de La Malahá, Granada y veinte de Es Trenc, Mallorca. Como se puede observar, este filogrupo posee bastante diversidad geográfica y no contiene ninguna especie previamente descrita; además aparece separada del resto con un soporte de rama del 74 % por lo que podría constituir una nueva especie del género *Salinivibrio*.

En cuanto al filogrupo 2, éste se compone de veinticinco cepas incluyendo la cepa tipo de la especie *S. siamensis*. Estas veinticinco cepas se obtuvieron de muestras de aguas de diferentes salinas solares; una de Bañaderos, Gran Canaria; ocho de Isla Bacuta, Huelva; ocho de Es Trenc, Mallorca y siete de Cabo Rojo, Puerto Rico. Este filogrupo se encuentra sustentado por un alto valor de rama del 91 %. Se deduce por tanto, que todos los aislados están filogenéticamente relacionados con la especie *S. siamensis*.

En el caso del filogrupo 3, éste se compone de nueve cepas, dentro de las cuales se incluyen dos subespecies de *S. costicola*, *S. costicola* subsp. *costicola* y *S. costicola* subsp. *alcaliphilus*. Las otras siete cepas aisladas se obtuvieron de muestras de diferentes salinas solares del territorio español: dos de Aragonesas, Huelva; cuatro de la Malahá, Granada y una de Isla Bacuta, Huelva. Este filogrupo se encuentra perfectamente definido y separado del resto, sustentado por un alto valor de rama del 100 %.

En cuanto al filogrupo 4, se constituye de siete cepas, de las cuales, una de ellas es la cepa tipo de *S. proteolyticus* y otra, *S. costicola* subsp. *vallismortis*. Las otras cinco cepas restantes fueron aisladas de muestras de aguas de diferentes salinas solares; tres de Cabo Rojo, Puerto Rico y dos de Isla Bacuta Huelva. En este filogrupo podemos observar claramente la incongruencia existente al haber una especie y una subespecie dentro de un mismo filogrupo. Esto puede ser un ejemplo de sinonimia entre especies. Este apartado se discutirá más adelante.

Como se ha podido observar, las cepas no se han agrupado según su lugar geográfico esto puede ser debido a eventos migratorios.

Este árbol mostró que las cepas incluidas en el filogrupo 3 y 4 están claramente separadas del resto, mostrando un soporte de rama muy alto (100% para ambos filogrupos). En el caso de los filogrupos 1 y 2, ambos se encuentran soportados por un alto valor de *bootstrap* (99 %), por lo que se podría pensar que los dos podrían constituir un solo filogrupo. Sin embargo, parece razonable que estas cepas se pueden congregan en dos filogrupos diferentes ya que el valor de *bootstrap* que soporta el filogrupo 2 es del 91%, constituyendo por tanto un filogrupo aparte del filogrupo 1.

También se examinó las secuencias de aminoácidos, usando el método de *neighbour-joining* con el modelo Jones-Taylor-Thornton (JTT). Como era de esperar, estas secuencias mostraron una separación menos clara entre especies debido al carácter más conservador de las secuencias de aminoácidos.

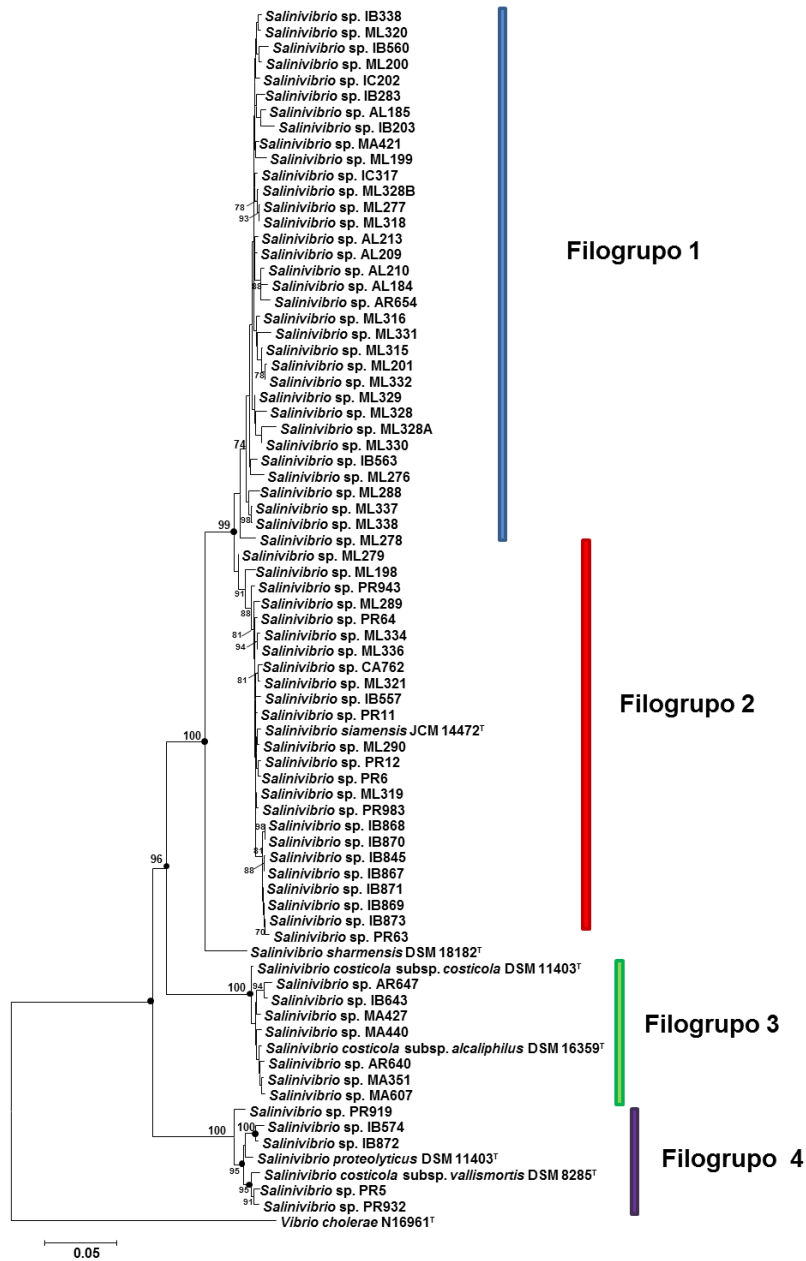


Figura IV.07. Árbol filogenético basado en la comparación de la secuencia concatenada de los genes *gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD* obtenido por el método *neighbour-joining* en el que se muestra la posición filogenética de la colección de cepas aisladas y las cepas tipo del género *Salinivibrio*. Los círculos negros indican los nodos que se mantienen en los árboles generados utilizando los algoritmos *maximum-parsimony* y *maximum-likelihood*. En los nodos se indican los valores de bootstrap superiores al 70 %. Como *outgroup* se ha utilizado la cepa tipo de *Vibrio cholerae* N16961^T. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

IV.2.2.2. Análisis de los genes individuales

En el apartado anterior se han mostrado el árbol filogenético concatenado construido por los genes *gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD*. A continuación vamos a analizar los árboles filogenéticos individuales de cada uno de estos genes.

Se construyeron árboles filogenéticos individuales para cada gen *housekeeping* utilizando los métodos *maximum-likelihood* (ML), *neighbour-joining* (NJ) y *maximum-parsimony* (MP). Estos árboles dieron agrupaciones similares, aunque el patrón de ramificación mostró algunas variaciones.

gyrB

La topología de los árboles basados en este gen está bastante bien conservada en los tres métodos utilizados para inferir filogenias. Se pueden diferenciar claramente cuatro filogrupos bien definidos y con altos valores de rama que soportan cada uno de estos filogrupos (99 % para los filogrupos 1,3 y 4; y 74 % para el filogrupo 2). Si bien, tanto los filogrupos 1 y 2 como los filogrupos 3 y 4 se consideran *sister groups*, esta observación no se contemplan en los otros genes; por lo que podría ser una diferencia evolutiva significativa para este gen en comparación con los otros. No obstante, la posición de algunas especies en estos árboles filogenéticos no está de acuerdo con respecto al árbol concatenado, como es el caso de las cepas *Salinivibrio* sp. ML277 y ML278 (ambas posicionadas en el filogrupo 2 pero que deberían estar en el filogrupo 1); *Salinivibrio* sp. IB563 (perteneciente al filogrupo 3 en vez del al 1) y *S. costicola* subsp. *costicola* (perteneciente al filogrupo 4 en vez de al 3). Esto se podría traducir en un fenómeno de transferencia horizontal de genes y posterior recombinación (Figura IV.08 [A]).

recA

Las filogenias basadas en el gen *recA* son las que muestran una topología más dispar con respecto a las de los otros genes. Los filogrupo 3 y 4 se encuentran bien definidos y conservados, con altos valores de soporte de rama. En cambio, el gen no dio buen resultado en la delimitación de los dos grupos filogenéticos 1 y 2, ambos sostenidos por un soporte de rama del 94

%, no muestran una clara diferenciación. Al igual que en el caso del gen *gyrB*, existen ciertas cepas que no se sitúan en el mismo filogrupo con respecto al árbol concatenado, como son la cepa *Salinivibrio* sp. ML198 (que se sitúa en el filogrupo 1 en vez del 2); *Salinivibrio* sp. AR654, ML279, ML288 ML337 y ML338 (que se sitúa en el filogrupo 2 cuando en el concatenado pertenecen al filogrupo 1). Estas diferencias podrían deberse a eventos de recombinación (Figura IV.08 [B]).

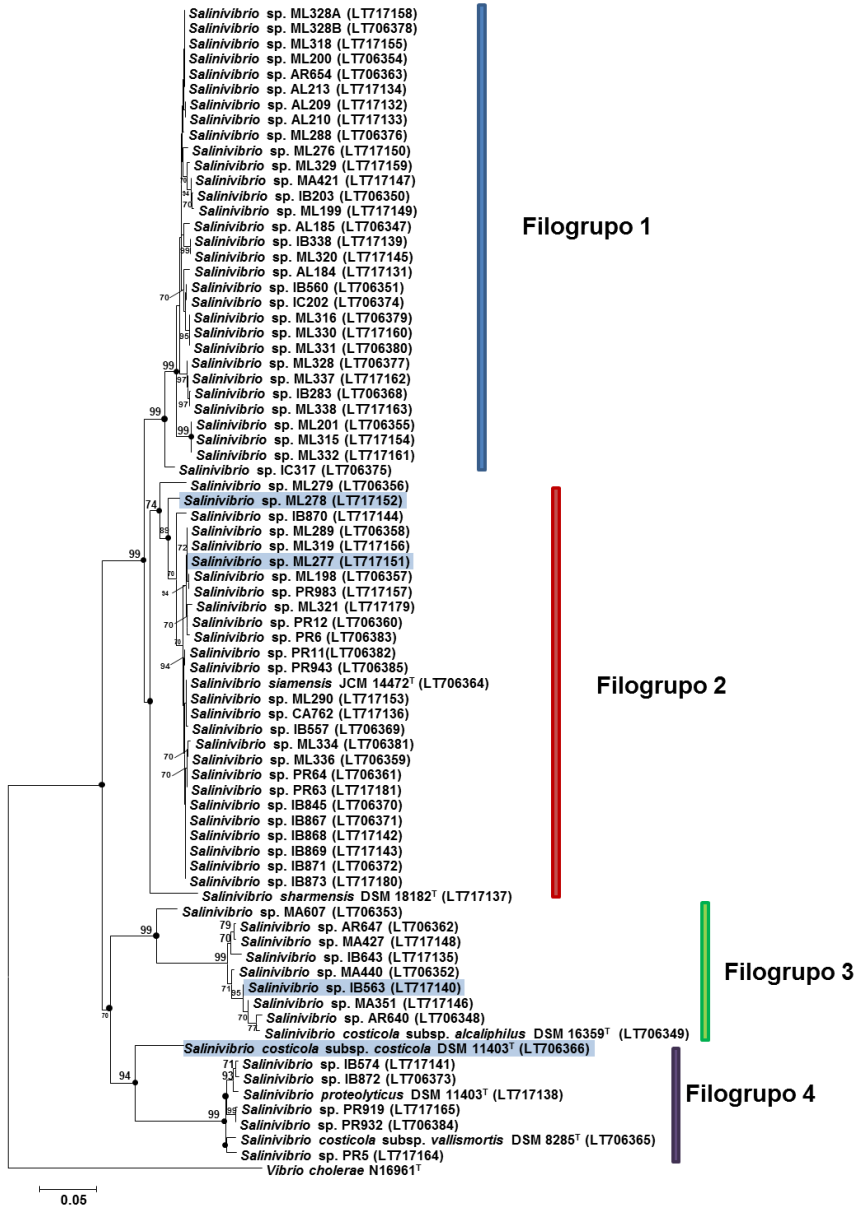
rpoA

En las filogenias obtenidas en base a este gen se pueden apreciar los filogramas 3 y 4 altamente definidos y conservados con valores de *bootstraps* elevados (99 % para ambos filogramas). Mientras que los filogramas 1 y 2 no se diferencian con claridad, aparentando ser un único filograma. Por otro lado, llama la atención que la cepa *S. sharmensis* DSM 18182^T se encuentre formando parte del filograma 2 y no en una rama aparte como ocurre en el árbol concatenado. En caso de las cepas *Salinivibrio* sp. ML279 y ML289, ambas se encuentran en el filograma 1, perteneciendo realmente al filograma 2; y la cepa *Salinivibrio* sp. ML288 que se encuentra situada en el filograma 2 en vez del 1. Todo esto debido a posibles fenómenos de recombinación (Figura IV.08 [C]).

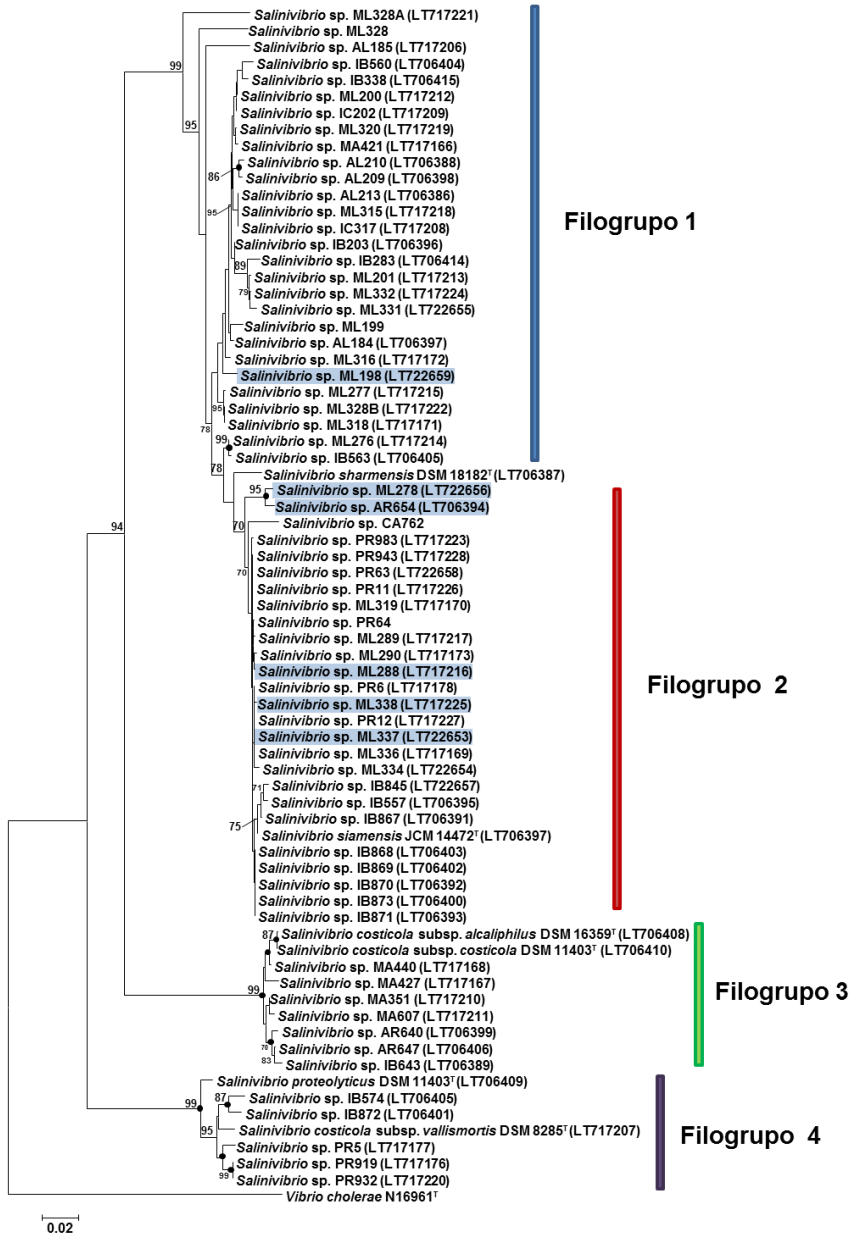
rpoD

En cuanto a la filogenia obtenida con este gen, se pueden observar cuatro filogramas, por un lado los filogramas 3 y 4 que se agrupan de forma robusta con un soporte de rama del 99 % en ambos casos. En cuanto a los filogramas 1 y 2, ambos se encuentran soportados por un *bootstrap* del 99 %, y el filograma 2 por un soporte de rama del 80%. En cuanto a eventos de transferencia horizontal se encuentran las cepas *Salinivibrio* sp. ML288, ML321 y ML331, situadas en el filograma 2 en vez del 1; y de forma especial destacar las cepas tipo *S. sharmensis* DSM 18182^T que se encuentra dentro del filograma 3 en vez de posicionarse sola; y la cepa tipo *S. costicola* subsp. *costicola* DSM 11403^T que se encuentra sola sin asociarse a ningún filograma (Figura IV.08 [D]).

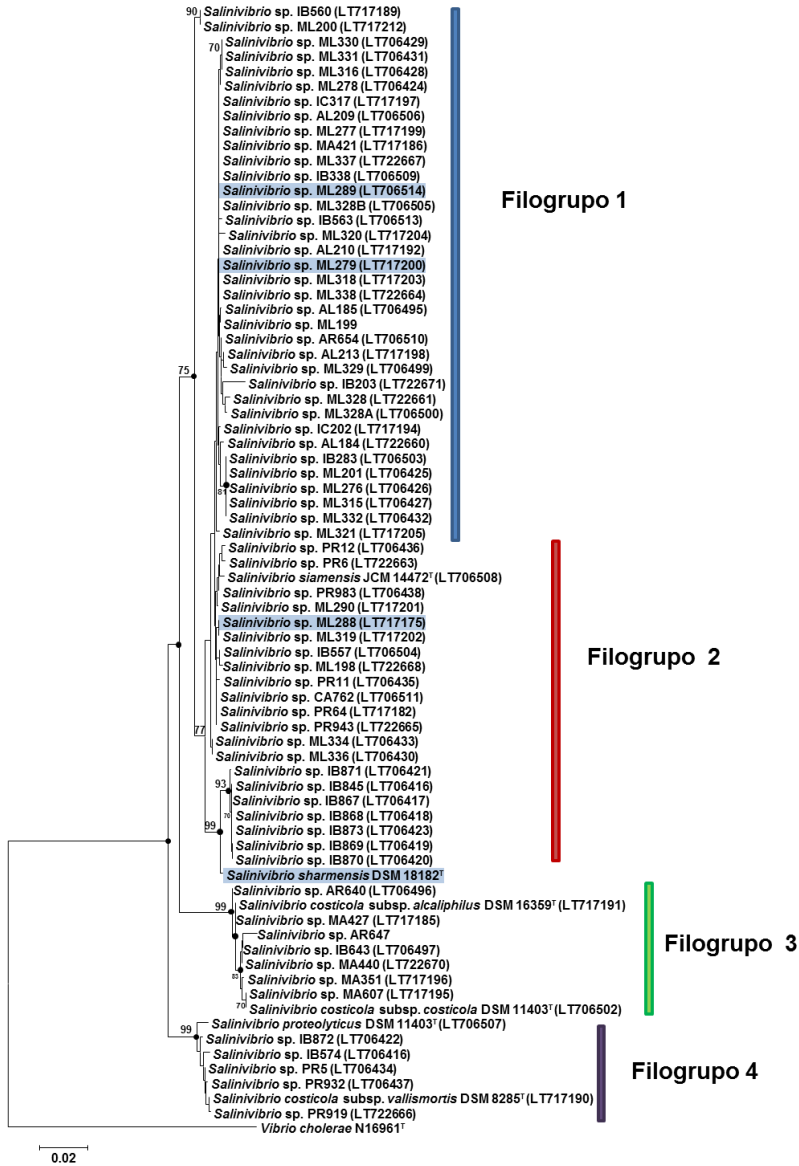
(A). *gyrB*



(B). *recA*



(C). *rpoA*



(D). *rpoD*

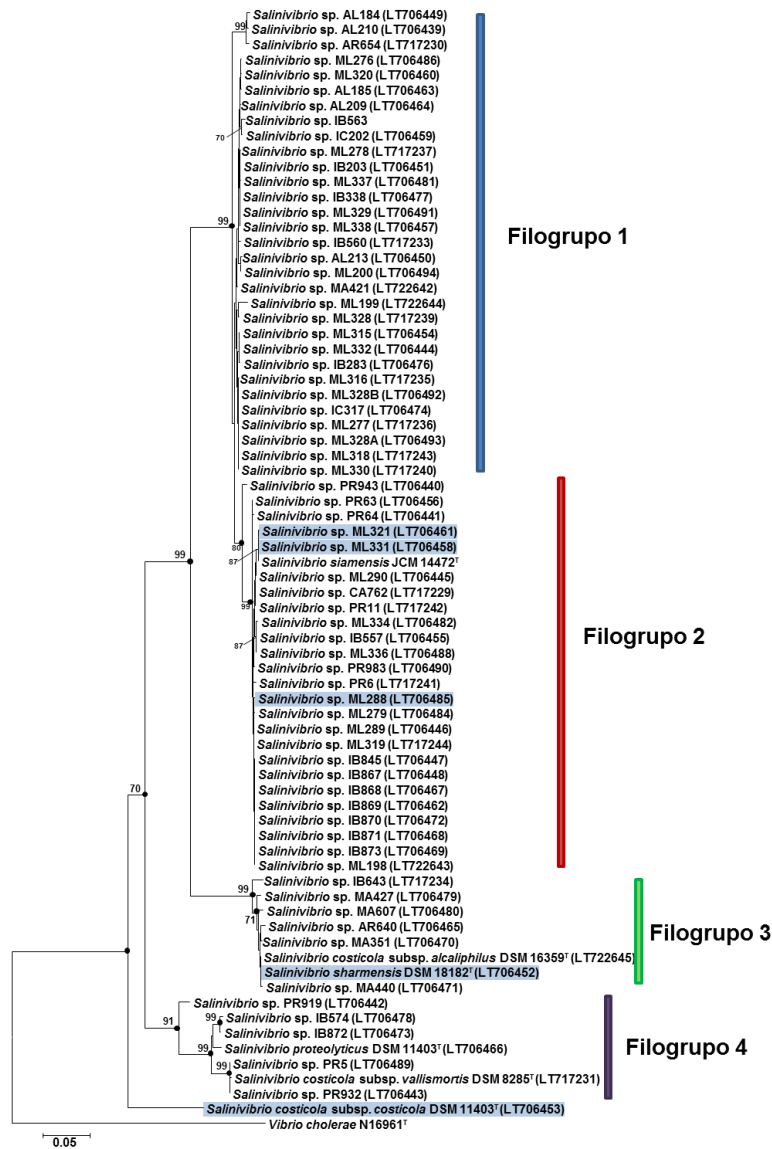


Figura IV.08. Árboles filogenéticos obtenidos por el método de *neighbour-joining* basados en la comparación de las secuencias de los genes *gyrB* (A), *recA* (B), *rpoA* (C) y *rpoD* (D), en los que se muestra la posición filogenética de las cepas aisladas y cepas tipo del género *Salinivibrio*. Los círculos negros indican los nodos que se mantienen en los árboles generados utilizando los algoritmos *maximum-parsimony* y *maximum-likelihood*. En los nodos se indican los valores de bootstrap superiores al 70 %. Como *outgroup* se ha utilizado la cepa tipo de *Vibrio cholerae* N16961^T. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

En comparación con el árbol del gen ARNr 16S, los árboles filogenéticos obtenidos de las secuencias individuales de los genes *housekeeping* presentaron, de forma general, filogrupos congruentes. Estos árboles mostraron una mayor resolución que el árbol obtenido por el gen ARNr 16S, aunque no la suficiente para ser capaz de discriminar todas las especies identificadas por el árbol concatenado. Existen algunas incongruencias entre estos árboles como por ejemplo, la relación entre los filogrupos 1 y 2, de los árboles obtenidos por los genes *recA* y *rpoA* que no mostraron una clara diferenciación. En cuanto a la relación con el filogrupo 3; ésta sigue sin resolverse. Podría deberse a la estrecha relación entre los filogrupos 1 y 2 que obligue la presencia de los filogrupos 3 y 4. Estas observaciones sugieren que ambos genes (*recA* y *rpoA*) podrían estar sujetos a eventos de transferencia horizontal de genes (HGT) durante su historia evolutiva, por lo que la filogenia de un solo gen puede confundir la identificación de taxones. Está claro que la filogenia de un solo gen *housekeeping* debe ser interpretada como tal y no debe utilizarse para representar la filogenia de los organismos.

Para cada gen individual, la filogenia se conservaba de manera general; aunque algunas cepas cambiaban de posición con respecto al árbol concatenado. Estas diferencias podrían deberse a diferentes historias evolutivas de cada uno de los genes como reordenamientos intragenómicos o transferencia horizontal de genes y eventos de recombinación. Estas variaciones están marcadas en azul en los árboles filogenéticos individuales (Figuras IV.07).

Por otro lado, se calcularon los porcentajes de semejanza nucleotídica a nivel intrafilogrupo e interfilogrupo para los distintos genes individuales y concatenados se indican en la Tabla IV.6.

Tal y como se puede observar para cada gen individual, la semejanza intrafilogrupo es bastante elevada, siendo en todos los casos, el filogrupo 1 el que mayor rango posee, lo que se traduce en que posee una mayor variabilidad intraespecie.

Tabla IV.6. Porcentajes de semejanza a nivel intrafilogrupo (negrita) e interfilogrupo para las secuencias individuales y concatenadas de los genes *gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD* de las cepas aisladas y cepas tipo del género *Salinivibrio*.

<i>gyrB</i>	1	2	<i>S. sharmensis</i>	3	4
Filogrupo 1	79,3-100 %				
Filogrupo 2	91,5-100 %	95,0-100 %			
<i>S. sharmensis</i>	81,4-93,3 %	91,7-93,3 %	--		
Filogrupo 3	76,5-98,1 %	78,0-87,3 %	79,9-85,4 %	81,7-100 %	
Filogrupo 4	79,9-81,7 %	79,5-81,1 %	81,1-81,7 %	78,9-87,5 %	97,8-100 %

<i>recA</i>	1	2	<i>S. sharmensis</i>	3	4
Filogrupo 1	84,8-100 %				
Filogrupo 2	91,9-100 %	95,0-100 %			
<i>S. sharmensis</i>	92,6-97,4 %	95,9-97,4 %	--		
Filogrupo 3	76,0-86,6 %	85,8-87,4 %	85,8-86,3 %	98,4-100 %	
Filogrupo 4	83,6-88,3 %	83,6-86 %	84,8-85,7 %	82,2-84,1 %	92,6-100 %

<i>rpoA</i>	1	2	<i>S. sharmensis</i>	3	4
Filogrupo 1	98,1-100 %				
Filogrupo 2	97,6-100 %	98,4-100 %			
<i>S. sharmensis</i>	98,0-98,9 %	98,5-99,5 %	--		
Filogrupo 3	94,1-97,6 %	95,2-96,6 %	94,9-96,1 %	99,4-100 %	
Filogrupo 4	94,7-97,0 %	95,9-97,0 %	96,1-96,6 %	94,5-95,9 %	99,1-100%

<i>rpoD</i>	1	2	<i>S. sharmensis</i>	3	4
Filogrupo 1	95,3-100 %				
Filogrupo 2	94,7-100 %	98,4-100 %			
<i>S. sharmensis</i>	86,9-88,5 %	87,4-88,1 %	--		
Filogrupo 3	81,9-88,4 %	81,8-99,9 %	87,9-100 %	80,2-100 %	
Filogrupo 4	82,2-87,0%	81,4-88,0 %	81,3-82,6 %	81,3-87,0 %	92,5-100 %

Genes concatenados	1	2	<i>S. sharmensis</i>	3	4
Filogrupo 1	97,0-100 %				
Filogrupo 2	95,0-98,8%	98,4-100%			
<i>S. sharmensis</i>	92,4-95,1 %	92-96 %	--		
Filogrupo 3	86,0-89,0 %	87,2-95,7 %	87,6-91,3 %	98,4-100%	
Filogrupo 4	84,9-88,0 %	85,7-91,6 %	86-86,8 %	84,8-88,0 %	97,0-100%

En comparación con los genes individuales, la concatenación de éstos, muestra unos valores más robustos, siendo en todos los casos superiores al

97 % dentro de un mismo filogrupo (nivel intrafilogrupo); e inferiores al 97 % entre filogrupos; se observa una excepción cuando se compara el filogrupo 1 con el 2, con un valor que supera el 97 %; 98,8 %; este valor se corresponde con una las cepas.

Según los valores de variabilidad intrafilogrupo, el gen *rpoA* es el que parece que mayor resolución posee ya que sus valores están más cercanos a los observados cuando se utilizan los cuatro genes. Pero si hacemos uso de los árboles filogenéticos, el árbol individual del gen *gyrB* es el que por topología, más se asemeja al árbol concatenado del MLSA.

IV.2.2.3. Conclusión del estudio MLSA

En el árbol concatenado, todos los filogrupos mencionados se encontraban soportados por valores de *bootstrap* más altos que en los árboles individuales; constituyendo por tanto árboles más robustos. Esto apoya la idea de Wertz y col., (2003) que defendían que, mientras más secuencias se concatenaban, la influencia de los genes con una señal inusual se reducía y por tanto la señal filogenética común se veía reforzada, como lo demuestra el aumento de los valores de soporte de rama.

En este estudio se utilizaron un total de 4 genes *housekeeping*; este número de genes se considera un equilibrio entre la confianza de los resultados y la reducción de costo y tiempo. Urbanczyk y col., (2007) propusieron un nuevo género, *Aliivibrio*, para acomodar *Vibrio fischeri* y especies estrechamente relacionadas. Para este trabajo se secuenciaron varios genes (*recA*, *rpoA*, *pyrH*, *gyrB* y ARNr 16S), la secuencia concatenada se analizó filogenéticamente, apoyando la propuesta de un nuevo taxón. Rameshkumar y col., (2008) realizaron el análisis filogenético de la secuencia concatenada de cuatro genes, (ARNr 16S, *rpoA*, *recA* y *pyrH*) para la descripción de una nueva especie, *Vibrio porteresiae*. Estos estudios son ejemplos de análisis previos de MLSA en los que se ha utilizado un pequeño número de genes *housekeeping* en la familia *Vibrionaceae*. De la Haba y col.,

(2012) realizaron un estudio MLSA en la familia *Halomonadaceae*, la cual incluye bacterias halófilas pertenecientes a la clase *Gammaproteobacteria*, y demostraron que un número reducido de genes *housekeeping* mantenía una resolución similar en los árboles filogenéticos analizados.

Por otro lado, cada una de las secuencias tanto del gen ARNr 16S como de los genes *housekeeping*, fueron depositadas, tanto de las cepas aisladas como de las cepas tipo del género *Salinivibrio*. La tabla IV.7 recoge todos los números de acceso de GenBank/EMBL/DDBJ para el gen ARNr 16S y los genes *housekeeping*.

Tabla IV.7. Relación de cepas de *Salinivibrio* utilizadas en este estudio, y número de acceso del GenBank / EMBL / DDBJ para los genes ARNr 16S, *gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD*.

En negrita se indican las cepas aisladas en este estudio. Entre paréntesis en negrita se muestran los números de acceso de las cepas tipo descritas según su referencia.

ND: no determinado.

Cepa	16S ARNr	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>rpoA</i>	<i>rpoD</i>
<i>S. costicola</i> subsp. <i>costicola</i> CECT 4059 ^T	LT722673 (X74699)	LT706366	LT706410	LT706502	LT706453
<i>S. costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 19052 ^T	LT627802 (AJ640132)	LT706349	LT706408	LT717191	LT722645
<i>S. costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285 ^T	LT722672 (AF057016)	LT706365	LT717207	LT717190	LT717231
<i>S. proteolyticus</i> DSM 19052 ^T	LT627803 (DQ092443)	LT717138	LT706409	LT706507	LT706466
<i>S. sharmensis</i> DSM 18182 ^T	LT627804 (AM279734)	LT717137	LT706387	LT722662	LT706452
<i>S. siamensis</i> JCM 14472 ^T	LT627805 (AB285018)	LT706364	LT706411	LT706508	LT717232
<i>Salinivibrio</i> sp. AL184	LT627515	LT717131	LT706397	LT722660	LT706449
<i>Salinivibrio</i> sp. AL185	LT627737	LT706347	LT717206	LT706495	LT706463
<i>Salinivibrio</i> sp. AL209	LT627738	LT717132	LT706398	LT706506	LT706464
<i>Salinivibrio</i> sp. AL210	LT722647	LT717133	LT706388	LT717192	LT706439

Cepa	16S ARNr	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>rpoA</i>	<i>rpoD</i>
<i>Salinivibrio</i> sp. AL213	LT627740	LT717134	LT706386	LT717198	LT706450
<i>Salinivibrio</i> sp. AR640	LT627741	LT706348	LT706399	LT706496	LT706465
<i>Salinivibrio</i> sp. AR647	LT627742	LT706362	LT706406	ND	ND
<i>Salinivibrio</i> sp. AR654	LT627743	LT706363	LT706394	LT706510	LT717230
<i>Salinivibrio</i> sp. CA762	LT627744	LT717136	ND	LT706511	LT717229
<i>Salinivibrio</i> sp. IB203	LT627745	LT706350	LT706396	LT722671	LT706451
<i>Salinivibrio</i> sp. IB283	LT627739	LT706368	LT706414	LT706503	LT706476
<i>Salinivibrio</i> sp. IB338	LT722650	LT717139	LT706415	LT706509	LT706477
<i>Salinivibrio</i> sp. IB557	LT627747	LT706369	LT706395	LT706504	LT706455
<i>Salinivibrio</i> sp. IB560	LT627748	LT706351	LT706404	LT717189	LT717233
<i>Salinivibrio</i> sp. IB563	LT722646	LT717140	LT706405	LT706513	ND
<i>Salinivibrio</i> IB574	LT627749	LT717141	LT706412	LT717188	LT706478
<i>Salinivibrio</i> IB643	LT627750	LT717135	LT706389	LT706497	LT717234
<i>Salinivibrio</i> IB845	LT722648	LT706370	LT722657	LT706416	LT706447
<i>Salinivibrio</i> IB867	LT627751	LT706371	LT706391	LT706417	LT706448
<i>Salinivibrio</i> IB868	LT627752	LT717142	LT706403	LT706418	LT706467
<i>Salinivibrio</i> IB869	LT627753	LT717143	LT706402	LT706419	LT706462
<i>Salinivibrio</i> IB870	LT627754	LT717144	LT706392	LT706420	LT706472
<i>Salinivibrio</i> IB871	LT627755	LT706372	LT706393	LT706421	LT706468
<i>Salinivibrio</i> IB872	LT627756	LT706373	LT706401	LT706422	LT706473
<i>Salinivibrio</i> IB873	LT627757	LT717180	LT706400	LT706423	LT706469
<i>Salinivibrio</i> IC202	LT627758	LT706374	LT717209	LT717194	LT706459

Cepa	16S ARNr	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>rpoA</i>	<i>rpoD</i>
<i>Salinivibrio</i> IC317	LT627759	LT706375	LT717208	LT717197	LT706474
<i>Salinivibrio</i> MA351	LT627760	LT717146	LT717210	LT717196	LT706470
<i>Salinivibrio</i> MA421	LT627761	LT717147	LT717166	LT717186	LT722642
<i>Salinivibrio</i> MA427	LT627762	LT717148	LT717167	LT717185	LT706479
<i>Salinivibrio</i> MA440	LT627763	LT706352	LT717168	LT722670	LT706471
<i>Salinivibrio</i> MA607	LT627764	LT706353	LT717211	LT717195	LT706480
<i>Salinivibrio</i> ML198	LT627765	LT706357	ND	LT722668	LT722643
<i>Salinivibrio</i> ML199	LT627766	LT717149	LT722659	ND	LT722644
<i>Salinivibrio</i> ML200	LT627767	LT706354	LT717212	LT717184	LT706494
<i>Salinivibrio</i> ML201	LT627768	LT706355	LT717213	LT706425	ND
<i>Salinivibrio</i> ML276	LT627769	LT717150	LT717214	LT706426	LT706486
<i>Salinivibrio</i> ML277	LT627770	LT717151	LT717215	LT717199	LT717236
<i>Salinivibrio</i> ML278	LT627771	LT717152	LT722656	LT706424	LT717237
<i>Salinivibrio</i> ML279	LT627772	LT706356	ND	LT717200	LT706484
<i>Salinivibrio</i> ML288	LT627773	LT706376	LT717216	LT717175	LT706485
<i>Salinivibrio</i> ML289	LT627774	LT706358	LT717217	LT706514	LT706446
<i>Salinivibrio</i> ML290	LT627775	LT717153	LT717173	LT717201	LT706445
<i>Salinivibrio</i> ML315	LT722649	LT717154	LT717218	LT706427	LT706454
<i>Salinivibrio</i> ML316	LT627776	LT706379	LT717172	LT706428	LT717235
<i>Salinivibrio</i> ML318	LT627777	LT717155	LT717171	LT717203	LT717243
<i>Salinivibrio</i> ML319	LT627778	LT717156	LT717170	LT717202	LT717244
<i>Salinivibrio</i> ML320	LT627779	LT717145	LT717219	LT717204	LT706460
<i>Salinivibrio</i> ML321	LT627780	LT717179	ND	LT717205	LT706461

Cepa	16S ARNr	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>rpoA</i>	<i>rpoD</i>
<i>Salinivibrio</i> ML328	LT627782	LT706377	ND	LT722661	LT717239
<i>Salinivibrio</i> ML328A	LT627783	LT717158	LT717221	LT706500	LT706493
<i>Salinivibrio</i> ML328B	LT627784	LT706378	LT717222	LT706505	LT706492
<i>Salinivibrio</i> ML329	LT627785	LT717159	ND	LT706499	LT706491
<i>Salinivibrio</i> ML330	LT627786	LT717160	ND	LT706429	LT717240
<i>Salinivibrio</i> ML331	LT627787	LT706380	LT722655	LT706431	LT706458
<i>Salinivibrio</i> ML332	LT627788	LT717161	LT717224	LT706432	LT706444
<i>Salinivibrio</i> ML334	LT722651	LT706381	LT722654	LT706433	LT706482
<i>Salinivibrio</i> ML336	LT627789	LT706359	LT717169	LT706430	LT706488
<i>Salinivibrio</i> ML337	LT627790	LT717162	LT722653	LT722667	LT706481
<i>Salinivibrio</i> ML338	LT722652	LT717163	LT717225	LT722664	LT706457
<i>Salinivibrio</i> PR11	LT627793	LT706382	LT717226	LT706435	LT717242
<i>Salinivibrio</i> PR12	LT627794	LT706360	LT717227	LT706436	ND
<i>Salinivibrio</i> PR5	LT627791	LT717164	LT717177	LT706434	LT706489
<i>Salinivibrio</i> PR6	LT627792	LT706383	LT717178	LT722663	LT717241
<i>Salinivibrio</i> PR63	LT627796	LT717181	LT722658	ND	LT706456
<i>Salinivibrio</i> PR64	LT627797	LT706361	ND	LT717182	LT706441
<i>Salinivibrio</i> PR919	LT627798	LT717165	LT717176	LT722666	LT706442
<i>Salinivibrio</i> PR932	LT627799	LT706384	LT717220	LT706437	LT706443
<i>Salinivibrio</i> sp. PR943	LT627800	LT706385	LT717228	LT722665	LT706440
<i>Salinivibrio</i> sp. PR983	LT627801	LT717157	LT717223	LT706438	LT706490

IV.3. HIBRIDACIÓN ADN-ADN (DDH)

Con el fin de validar el estudio MLSA, realizado para la identificación y clasificación especies del género *Salinivibrio*, éste debe de ser correlacionado con la hibridación ADN-ADN (DDH), técnica estándar utilizada desde la década de 1960 para determinar la relación entre cepas y que todavía se considera como el criterio más importante en la delineación de especies procariontas (Al-Saari y col., 2015, Glaeser y Kämpfer y col., 2015, Dubert y col., 2016a, b).

IV.3.1. Interpretación de los resultados de la hibridación ADN-ADN

Para este estudio se seleccionaron treinta y tres cepas, incluyendo las cepas tipo *S. costicola* subsp. *costicola* DSM 11403^T, *S. costicola* subsp. *alcaliphilus* DSM 16359^T, *S. costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T, *S. proteolyticus* DSM 11403^T, *S. sharmensis* DSM 18182^T y *S. siamensis* JCM 14472^T, así como otras cepas representativas de cada filogrupo, siguiendo el patrón obtenido por la filogenia de las secuencias concatenadas. Estas cepas se encuentran marcadas en verde en el árbol concatenado del MLSA (Figura IV.09).

La Tabla IV.8 muestra los valores de DDH para las cepas de *Salinivibrio* incluidas en este estudio. De cada filogrupo se seleccionó una cepa a la cual se le realizó el marcaje radioactivo (AL184^T para el filogrupo 1, *S. siamensis* JCM14472^T para el filogrupo 2, *S. costicola* subsp. *costicola* DSM 11403^T para el filogrupo 3 y *S. costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T para el filogrupo 4). Se realizaron un total de 4 hibridaciones, una por cada filogrupo. Los valores de DDH para las cepas dentro del mismo filogrupo siempre fueron superiores al 70%, valor establecido como límite para la delineación de especies (Wayne y col., 1987; Stackebrandt y Goebel, 1994); confirmando por tanto, que todas estas cepas conforman una misma especie. Mientras que, cuando se comparaban cepas de diferentes filogrupos los valores siempre fueron inferiores al 70%, indicando que cada uno de los filogrupos constituía especies diferentes.

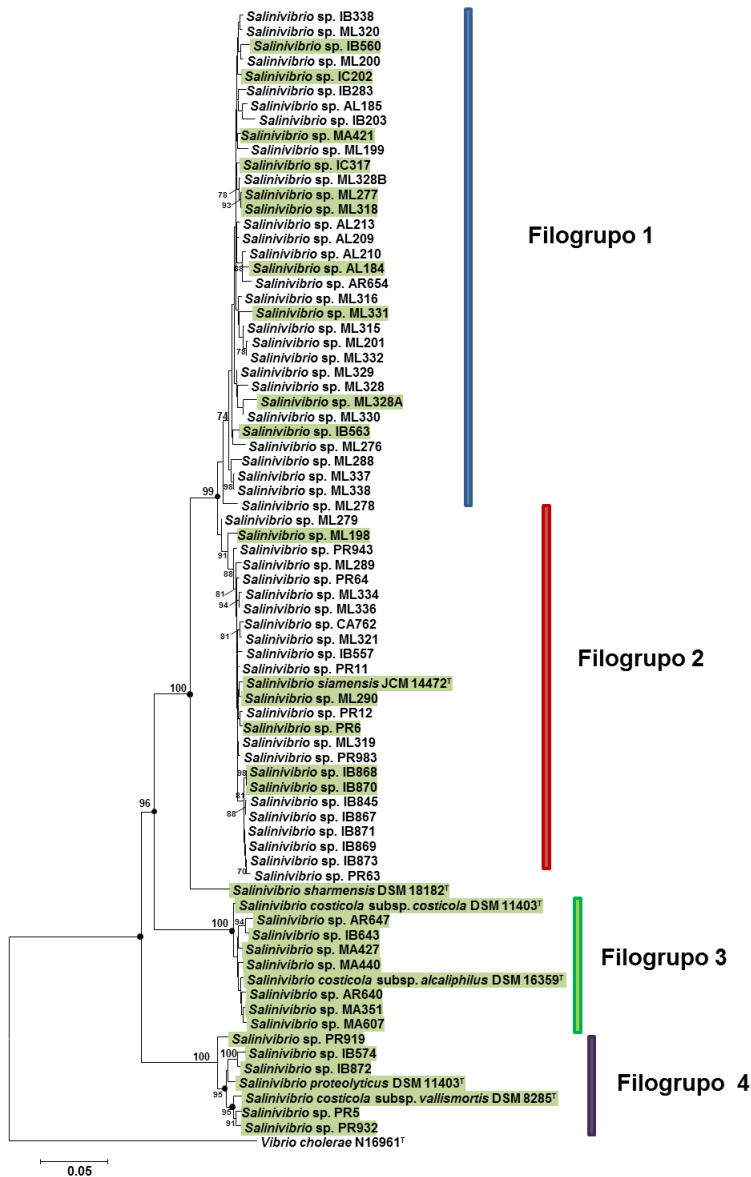


Figura IV.09. Árbol filogenético basado en la comparación de la secuencia concatenada de los genes *gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD* obtenido por el método *neighbour-joining* en el que se muestra la posición filogenética de la colección de cepas aisladas y las cepas tipo del género *Salinivibrio*. Los círculos negros indican los nodos que se mantienen en los árboles generados utilizando los algoritmos *maximum-parsimony* y *maximum-likelihood*. En los nodos se indican los valores de bootstrap superiores al 70 %. Como *outgroup* se ha utilizado la cepa tipo de *Vibrio cholerae* N16961^T. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

Tabla IV.8. Valores de la hibridación ADN-ADN dentro de cada filogrupo del género *Salinivibrio* y entre cepas representativas de cada filogrupo.

1: *Salinivibrio* sp. AL184; 2: *S. siamensis* JCM 14472^T; 3: *S. costicola* subsp. *costicola* DSM 11403^T; 4: *S. costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T.

Valores DDH dentro de cada filogrupo		Rango hibridación (%)			
Filogrupo 1	72-100				
Filogrupo 2	80-98				
Filogrupo 3	72-100				
Filogrupo 4	72-98				
Valores DDH entre cepas representativas de cada filogrupo		1	2	3	4
<i>Salinivibrio</i> sp. AL184 (Filogrupo 1)		100	35	17	44
<i>S. siamensis</i> JCM 14472 ^T (Filogrupo 2)		17	100	47	23
<i>S. sharmensis</i> DSM 18182 ^T		8	60	30	29
<i>S. costicola</i> subsp. <i>costicola</i> DSM 11403 ^T (Filogrupo 3)		28	17	100	15
<i>S. costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285 ^T (Filogrupo 4)		37	34	17	100

Según las hibridaciones ADN-ADN, se pueden diferenciar un total de cinco especies; cuatro de ellas corresponden a los filogrupos anteriormente establecidos mediante el estudio MLSA, y una especie, *S. sharmensis* DSM 18182^T, la cual no ha sido posible asociarla con ninguna cepa aislada. Por tanto, se concluye que las diez cepas pertenecientes al filogrupo 1 constituyen una nueva especie; que será descrita en el apartado X de Resultados y Discusión; las seis cepas del filogrupo 2 conforman la especie *S. siamensis* JCM 14472^T, las nueve cepas que forman el filogrupo 3 constituyen a las subespecies *S. costicola* subsp. *costicola* DSM 11403^T (cepa tipo del género *Salinivibrio*) y *S. costicola* subsp. *alcaliphilus* DSM 16359^T. Mientras que en el filogrupo 4 las siete cepas, cinco de ellas aisladas, conforman una sinomia entre las especies *S. costicola* subsp. *vallismortis*

DSM 8285^T y *S. proteolyticus* DSM 11403^T, este tema se discutirá en el apartado IV.11 de Resultados y Discusión.

IV.4. CORRELACIÓN ENTRE LA TÉCNICA MLSA Y LA DDH

Una vez obtenidos los valores de DDH, se ha calculado la correlación entre la matriz de datos de la DDH y las matrices de similitud correspondientes a los cuatro genes individuales y los cuatro genes concatenados. Estas variables correlacionadas han presentado una distribución normal de los valores, por lo que se ha aplicado únicamente el coeficiente de correlación de Pearson. En cada correlación se han analizado 33 parejas de valores. Los coeficientes obtenidos respecto a la DDH han sido: 0,48 (*gyrB*); 0,55 (*rpoD*); 0,55 (ARNr 16S); 0,78 (*rpoA*); 0,8 (*recA*) y 0,84 (cuatro genes concatenados). Este resultado apoya la idea de Konstantinidis y col., (2006) de que la concatenación de genes, en lugar de un solo gen, predice con mayor precisión las relaciones entre organismos. La relación entre la DDH y el MLSA resultado de la concatenación de cuatro genes se describió mediante un modelo de regresión lineal. La Figura IV.10 muestra un coeficiente de correlación de 0,69 entre ambas técnicas. El valor de DDH del 70 % (porcentaje establecido como valor actual de delineación de especies), se correspondía con el valor de semejanza del 97% para el MLSA. En consecuencia, la semejanza de estos cuatro genes *housekeeping* del 97 % podría considerarse como punto de corte para las especies dentro del género *Salinivibrio*, lo que sugiere que, especies con similitud de secuencia (en base a estos cuatro genes), igual o inferiores al 97 %, deberán asignarse como especies diferentes.

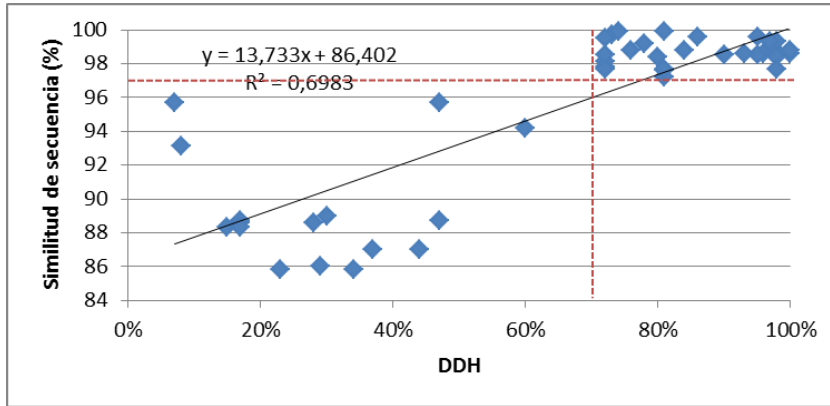


Figura IV.10. Relación entre valores de hibridación ADN-ADN y valores de similitud génica de los genes *gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD* concatenados.

Hasta la fecha, son numerosos los estudios realizados en el género *Vibrio* que hayan validado los análisis de MLSA con la técnica de hibridación ADN-ADN (Pascual y col., 2010; Al-saari y col., 2015; Dubert y col., 2016; Steinum y col., 2016; Doi y col., 2017); pero ninguno se ha realizado en el género *Salinivibrio*.

En 2008, Martens y col., validaron en el género *Ensifer*, la técnica MLSA basada en los genes *atpD*, *dnaK*, *gap*, *glnA*, *gltA*, *gyrB*, *pnp*, *recA*, *rpoB*, *thrC* y el ARNr 16S con la DDH. Los valores de correlación obtenidos fueron desde 0,78 (ARNr 16S) a 0,92 (con los genes *recA*, *rpoB*, *gyrB*, *dnaK*, *glnA*, *gltA* y *thrC* concatenados). En 2010, Pascual y col., correlacionaron la técnica MLSA basada en los genes *recA*, *rpoD*, *pyrH*, *gyrB*, *toxR*, *rctB* y el ARNr 16S con la DDH en el género *Vibrio*. Los valores de correlación oscilaron desde 0,46 (ARNr 16S) a 0,84 (con los siete genes concatenados). Un motivo por el que pueden existir discrepancias en los valores de correlación obtenidos en los diferentes estudios, incluso analizando los mismos genes, es que éstos pueden presentar historias evolutivas diferentes en los distintos grupos taxonómicos. De esta forma, si un gen ha sufrido THG, puede que el valor de correlación obtenido se vea afectado. Además, hay que tener en cuenta los diversos factores implicados en los experimentos de DDH, donde los valores obtenidos pueden variar según la metodología aplicada e incluso aplicando la misma metodología.

Nuestro estudio indica que la concatenación de los genes *housekeeping* proporciona una delineación robusta de especies que al menos es equivalente a la hibridación ADN-ADN (Martens y col., 2008, Pascual y col., 2010, Marti y Balcázar, 2015). Sin embargo, la elección de los genes *housekeeping* es de gran importancia pues no todos son realmente útiles en todos los grupos taxonómicos, sobre todo si las cepas que se están analizando pertenecen a especies muy cercanas. Este estudio ha mostrado la importancia de incluir un número razonable de cepas por especie, y no únicamente las cepas tipo, pues de esta manera se puede medir la variabilidad intraespecífica y compararla con la interespecífica.

Los rangos de las similitudes de secuencia intraespecíficas que se han obtenido han sido: 97-100 % (*gyrB*); 96.2-100 % (*recA*); 96.5-100 % (*rpoA*); 96-100% (*rpoD*) y 97,9-99,9 % (cuatro genes concatenados). Los rangos de las similitudes de secuencia interespecíficas han sido: 77,7-93,3 % (*gyrB*); 79,7-98,2 % (*recA*); 94,1-99,8 % (*rpoA*); 81,4-99,7 % (*rpoD*) y 80-97,5 % (cuatro genes concatenados). La Figura IV.11 muestra la resolución taxonómica de cada gen, definida como el grado de solapamiento o hueco que se crea entre la distancia intraespecífica máxima y la distancia interespecífica mínima, representada como porcentaje de las similitudes génicas. La concatenación de los cuatro genes *housekeeping* propuestos es la mejor elección de proceder en futuros estudios debido a la falta de resolución de los análisis de un solo gen y sus distintas posibilidades de THG.

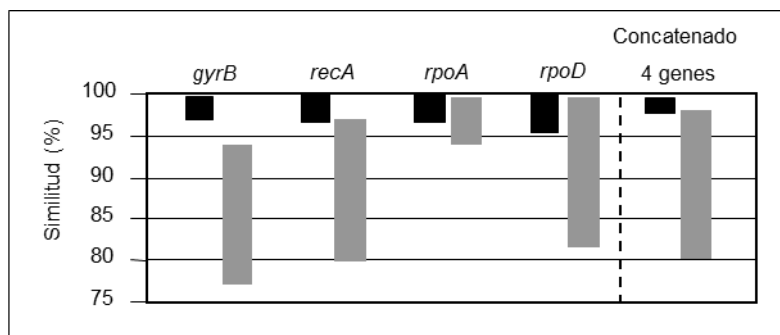


Figura IV.11. Resolución taxonómica en relación al rango de similitudes (%) intraespecíficas (negro) e interespecíficas (gris).

IV. 5. TÉCNICAS DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR

Los microorganismos extremófilos a menudo demuestran patrones de evolución que reflejan sus orígenes geográficos, esto junto con el MLSA han sido capaces de discernir influencias biogeográficas, incluso entre cepas pertenecientes a la misma especie (Papke y col., 2003; Roselló-Mora y col., 2008). Sin embargo, nuestro análisis MLSA no obtuvo un patrón geográfico convincente. Quizás una de las razones fue que la mayoría de las cepas procedían de regiones del litoral español facilitando la migración entre los sitios. Alternativamente, el MLSA no era lo suficientemente sensible como para separar, según el sitio de aislamiento, las poblaciones de *Salinivibrio*. Estudios previos han demostrado que la "huella genómica" es una herramienta útil para descifrar patrones geográficos entre las cepas (Cho y Tiedje, 2000), por lo que procedimos a realizar un análisis similar a nuestra colección de cepas de *Salinivibrio*. Además, teniendo en cuenta que tenemos pequeñas colecciones de cepas de un mismo sitio de aislamiento queríamos descartar la posibilidad de que se tratasen de clones y no de cepas distintas.

En este estudio se incluyeron las setenta cepas aisladas como las especies descritas del género *Salinivibrio*.

A partir de células crecidas en SW a 37 °C durante 24-48h se llevó a cabo la extracción, purificación y cuantificación del ADN genómico siguiendo la metodología descrita en el punto III.2.1 de Material y Métodos. Las amplificaciones y los análisis de los perfiles electroforéticos obtenidos se realizaron siguiendo la metodología expuesta en el apartado III.6.1 de Material y Métodos.

Se probaron diferentes cebadores para **rep-PCR**: (GTG)₅, ERIC y BOX-A1R. Finalmente, el que mejor resultado y reproducibilidad facilitó fue el cebador BOX-A1R, el cual seleccionamos para la realización de este estudio. Como cabe esperar, la técnica que ofrece perfiles más sencillos es la que mayor reproducibilidad presenta, de manera que las técnicas con perfiles electroforéticos más complejos presentan valores de reproducibilidad más bajos. Muchas veces, la falta de reproducibilidad en las técnicas de tipado

molecular se puede explicar por la falta de estandarización en la metodología y en el material utilizado en los estudios, por ello, es muy importante utilizar siempre el mismo programa de amplificación, *Taq polimerasa*, concentración de nucleótidos, etc., pues es la manera de poder comparar geles en diferentes condiciones. Además, la reproducibilidad también se correlaciona directamente con las condiciones de amplificación utilizadas. Cuando se utilizan condiciones poco restrictivas (baja temperatura de *annealing* y altas concentraciones de Mg^{2+}) el nivel de reproducibilidad mínima se va reduciendo puesto que se incrementan las uniones inespecíficas entre el/los cebador/es y el ADN genómico.

La reproducibilidad se ha constatado llevando a cabo por triplicado el proceso de amplificación de cada una de las 76 cepas analizadas. Los patrones de bandas fueron evaluados mediante el software **Phoretix 1D Pro** que elaboró un dendrograma UPGMA de los perfiles electroforéticos (Figura IV.12).

El análisis genómico de *fingerprinting* se realizó de manera individual para cada cepa de referencia así como para cada aislado ambiental. Nuestros resultados demostraron que, cepas estrechamente relacionadas que se encontraban en un mismo filogrupo según el análisis MLSA, mostraron patrones de bandas con considerables variaciones, muchos de las cuales eran disímiles entre sí. Desafortunadamente, los patrones de bandas obtenidos por la **rep-PCR** no diferenciaban fiablemente los mismos filogrupos obtenidos por el estudio MLSA, y además, las cepas no se agrupan según un criterio concreto, ni si quiera según su lugar de aislamiento. Debido a que esta técnica de tipificación molecular no presentaba filogrupos, es difícil concluir que en el género *Salinivibrio*, el endemismo no existe. Además, este análisis detallado de los patrones de bandas puso de manifiesto que los perfiles electroforéticos presentan algunas diferencias, lo que indicaría que no proceden de un mismo clon, tratándose de cepas distintas.

Este estudio de tipificación molecular, apunta a procesos altamente dinámicos que generan una gran variación genómica entre las cepas de *Salinivibrio*, lo que sugiere que la ganancia y pérdida de genes así como los

IV.6. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS

Dentro del estudio polifásico que se realiza para la definición de una especie procariota, se encuentra la caracterización fenotípica. Muchas de los ensayos llevados a cabo en esta caracterización pueden verse afectados por las condiciones del cultivo y de la metodología utilizada; por ello, hay que recalcar, que se debe realizar un estudio experimental comparativo con las especies objeto de estudio incluyendo la especie tipo del género y de la especie con la que se encuentra más relacionada desde un punto de vista filogenético y en las mismas condiciones experimentales (Tindall y col., 2010).

IV.6.1. Características morfológicas

Las células de éste género presentan una pared celular típica de bacterias Gram-negativas, éstas presentaron una morfología en forma de bacilos delgados y curvados con un flagelo polar en uno de los extremos lo que le concede la propiedad de móviles. El tamaño de estas células oscila en torno a 2,3–3,5 μm de longitud y con un ancho no superior a 0,8 μm . Las colonias presentan forma esférica con unas medidas inferiores a 3mm, con una pigmentación color crema en la mayoría de los casos.

IV.6.2. Características fisiológicas

Con respecto a las características fisiológicas, se determinó el crecimiento en anaerobiosis de las setenta y seis cepas comprobándose que crecen en ausencia de oxígeno, otorgándole a este género la característica de anaerobio facultativo, ya que también crecen en presencia de oxígeno. Por otro lado, se seleccionaron un grupo de cepas de cada uno de los filogrupos, las mismas a las que le realizamos la hibridación ADN-ADN en el apartado anterior, y se les determinó su rango salino, de pH y de temperatura; estos rangos se muestran en la Tabla IV.9.

Finalmente se concluyó que la **concentración óptima de sales totales** era 7,5 % (p/v); el **pH óptimo** oscilaba entre 7,2-7,4; y la **temperatura óptima** de crecimiento se fijó en 37 °C.

Tabla IV.9. Rango salino, de pH y de temperatura de una selección de cepas del género *Salinivibrio*.

	Cepa	Rango salino (%, p/v)	Rango pH	Rango temperatura (°C)
F I L O G R U P O 1	<i>Salinivibrio</i> sp. AL184	2-20	5-10	17-48
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB560	2-20	5-9	20-48
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB563	2-20	5-9	17-47
	<i>Salinivibrio</i> sp. IC202	3-19	5-10	18-48
	<i>Salinivibrio</i> sp. IC317	2-20	5-10	17-49
	<i>Salinivibrio</i> sp. MA421	2-20	5-10	17-47
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML277	3-19	5-10	19-48
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML318	3-20	5-10	20-47
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML328A	4-20	5-10	19-48
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML331	4-19	5-10	19-47
F I L O G R U P O 2	<i>Salinivibrio</i> sp. IB868	2-21	6-10	18-49
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB870	2-20	5-10	20-48
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML198	2-20	6-10	19-47
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML290	2-20	5-10	18-49
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR6	2-21	5-10	19-47
	<i>S. siamensis</i> JCM 14472 ^T	2-20	5-10	18-47
	<i>S. sharmensis</i> DSM 18182 ^T	3-20	5-10	19-46
F I L O	<i>Salinivibrio</i> sp. AR640	2-20	5-10	18-46
	<i>Salinivibrio</i> sp. AR647	2-21	5-9	19-49
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB643	3-20	6-10	19-46

Cepa	Rango salino (%, p/v)	Rango pH	Rango temperatura (°C)
G <i>Salinivibrio</i> sp. MA351	2-21	5-10	20-48
R <i>Salinivibrio</i> sp. MA427	3-19	5-9	19-49
U <i>Salinivibrio</i> sp. MA440	4-21	5-10	20-46
P <i>Salinivibrio</i> sp. MA607	3-20	5-10	18-49
O <i>S. cost.</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359 ^T	3-20	5-9	18-48
3 <i>S. cost.</i> subsp. <i>costicola</i> DSM 11403 ^T	2-20	5-10	19-46
F <i>Salinivibrio</i> sp. IB574	3-20	5-9	20-47
I			
L <i>Salinivibrio</i> sp. IB872	4-19	5-9	19-49
O			
G <i>Salinivibrio</i> sp. PR5	3-21	5-10	20-48
R			
U <i>Salinivibrio</i> sp. PR919	2-20	5-9	19-47
P <i>Salinivibrio</i> sp. PR932	2-19	5-9	18-48
O <i>S. proteolyticus</i> DSM 11403 ^T	2-20	5-10	18-47
4 <i>S. cost.</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285 ^T	2-21	5-10	19-49

Una vez realizados estos rangos se pudo concluir que el rango salino de estas cepas osciló entre 2 y 21% de sales totales; el rango de pH entre 5 y 10 y el rango de temperatura entre 17 y 49 °C. No se han observado unos rangos fijos para cada filogrupo, siendo bastantes diversos los valores dentro de cada filogrupo; mostrando así una gran variabilidad intrafilogrupal.

IV.6.3. Pruebas bioquímicas

Se llevaron a cabo las siguientes pruebas bioquímicas: catalasa, oxidasa, reducción de nitratos y nitritos; hidrólisis de almidón, esculina, ADN, caseína, gelatina y Tween 80; prueba del rojo metilo y Voges-Proskauer; citrato de Simmons, producción de indol y la fenilalanina desamina. En cuanto a la producción de ácidos a partir de carbohidratos, se emplearon los siguientes azúcares y alcoholes: D-arabinosa, esculina, fructosa, D-galactosa, glicerol, D-glucosa, Lactosa, D-maltosa, manitol, manosa, rafinosa, ribosa, sacarosa, D-trehalosa y D-xilosa.

En cuanto a las pruebas bioquímicas todas tienen las siguientes características: catalasa positiva y oxidasa positiva. No produjeron ácidos la esculina, la rafinosa y la D-xilosa. Los resultados de las pruebas bioquímicas así como de la producción de ácidos a partir de azúcares y alcoholes se muestran en las Tablas IV.10 y IV.11.

En la Tabla IV.10, se pudo observar que la hidrólisis de ADN fue positiva para las cepas pertenecientes al filogrupo 2 y 4. La hidrólisis de Tween 80 fue negativa para todas las cepas del filogrupo 2 menos el aislado ML319; y para todas las cepas del filogrupo 3. La hidrólisis de almidón fue negativa para todo el filogrupo 3 menos la cepa MA607. Citrato de Simmons fue negativa para todo el filogrupo 3 menos la cepa AR647. La fenilalanina desaminasa fue negativa para todas las cepas del filogrupo 4. La producción de indol fue negativa para todas las cepas que conforman el filogrupo 4 y el 3 menos la cepa AR647.

Como cabría esperar las cepas que forman el filogrupo 1 son las que mayor diversidad de resultados muestra debido a la gran cantidad de cepas que conforma este filogrupo, un total de 34 aislados.

Se puede concluir que, cepas aisladas del mismo sitio geográfico no poseían la misma actividad enzimática e incluso cepas pertenecientes al mismo filogrupo tampoco.

Tabla IV.10. Principales características bioquímicas diferenciales de las cepas tipo y aisladas en este estudio del género *Salinivibrio*.

+: positivo; -: negativo; +/-: reacción débil.

Cepa		Reducción de nitratos	Reducción de nitritos	Hidrólisis de ADN	Hidrólisis de almidón	Hidrólisis de caseína	Hidrólisis de esculina	Hidrólisis de gelatina	Hidrólisis de Tween 80	Rojo de metilo	Voges-Proskauer	Citrato de Simmons	Fenilalanina desaminasa	Producción de indol
F	<i>Salinivibrio</i> sp. AL184	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. AL185	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
I	<i>Salinivibrio</i> sp. AL209	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. AL210	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
L	<i>Salinivibrio</i> sp. AL213	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. AR654	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
O	<i>Salinivibrio</i> sp. IB203	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB283	-	-	+	-	+/-	-	+	-	+	-	+	-	-
G	<i>Salinivibrio</i> sp. IB338	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB560	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB563	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. IC202	+	-	+	-	+	-	+/-	-	-	+	+	+	-

Cepa		Reducción de nitratos	Reducción de nitritos	Hidrólisis de ADN	Hidrólisis de almidón	Hidrólisis de caseína	Hidrólisis de esculina	Hidrólisis de gelatina	Hidrólisis de Tween 80	Rojo de metilo	Voges-Proskauer	Citrato de Simmons	Fenilalanina desaminasa	Producción de indol
R	<i>Salinivibrio</i> sp. IC317	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. MA421	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML199	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-
U	<i>Salinivibrio</i> sp. ML200	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML201	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML276	-	-	-	+	+	-	+	+/-	-	+	+	-	-
P	<i>Salinivibrio</i> sp. ML277	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML278	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML288	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
O	<i>Salinivibrio</i> sp. ML315	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML316	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML318	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML320	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-

Cepa		Reducción de nitratos	Reducción de nitritos	Hidrólisis de ADN	Hidrólisis de almidón	Hidrólisis de caseína	Hidrólisis de esculina	Hidrólisis de gelatina	Hidrólisis de Tween 80	Rojo de metilo	Voges-Proskauer	Citrato de Simmons	Fenilalanina desaminasa	Producción de indol
1	<i>Salinivibrio</i> sp. ML328	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML328A	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML328B	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML329	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML330	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML331	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML332	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML337	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML338	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
F	<i>Salinivibrio</i> sp. CA762	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB557	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB845	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB867	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-

Cepa		Reducción de nitratos	Reducción de nitritos	Hidrólisis de ADN	Hidrólisis de almidón	Hidrólisis de caseína	Hidrólisis de esculina	Hidrólisis de gelatina	Hidrólisis de Tween 80	Rojo de metilo	Voges-Proskauer	Citrato de Simmons	Fenilalanina desaminasa	Producción de indol
I	<i>Salinivibrio</i> sp. IB868	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB869	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
L	<i>Salinivibrio</i> sp. IB870	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB871	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
O	<i>Salinivibrio</i> sp. IB873	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML198	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-
G	<i>Salinivibrio</i> sp. ML279	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML289	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-
R	<i>Salinivibrio</i> sp. ML290	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML319	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-
U	<i>Salinivibrio</i> sp. ML321	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML334	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
P	<i>Salinivibrio</i> sp. ML336	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-

Cepa		Reducción de nitratos	Reducción de nitritos	Hidrólisis de ADN	Hidrólisis de almidón	Hidrólisis de caseína	Hidrólisis de esculina	Hidrólisis de gelatina	Hidrólisis de Tween 80	Rojo de metilo	Voges-Proskauer	Citrato de Simmons	Fenilalanina desaminasa	Producción de indol
O 2	<i>Salinivibrio</i> sp. PR11	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR12	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR6	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR63	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR64	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR943	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR983	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	<i>S. siamensis</i> JCM 14472 ^T	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+
	<i>S. sharmensis</i> DSM 18182 ^T	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-
F	<i>Salinivibrio</i> sp. AR640	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
I	<i>Salinivibrio</i> sp. AR647	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
L	<i>Salinivibrio</i> sp. IB643	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
O	<i>Salinivibrio</i> sp. MA351	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-

Cepa		Reducción de nitratos	Reducción de nitritos	Hidrólisis de ADN	Hidrólisis de almidón	Hidrólisis de caseína	Hidrólisis de esculina	Hidrólisis de gelatina	Hidrólisis de Tween 80	Rojo de metilo	Voges-Proskauer	Citrato de Simmons	Fenilalanina desaminasa	Producción de indol
G R U P O 3	<i>Salinivibrio</i> sp. MA427	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. MA440	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. MA607	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
	<i>S. cost.</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359 ^T	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
	<i>S. cost.</i> subsp. <i>costicola</i> DSM 11403 ^T	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
F I L O G R U P O 4	<i>Salinivibrio</i> sp. IB574	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB872	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR5	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR919	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR932	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-
	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> DSM 11403 ^T	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-
<i>S. cost.</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285 ^T	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	

Tabla IV.11. Producción de ácidos a partir de carbohidratos y alcoholes de todas las cepas del género *Salinivibrio* objeto de este estudio.

+: positivo; -: negativo; +/-: reacción débil.

Cepa	D-arabinosa	Fructosa	D-galactosa	Glicerol	D-glucosa	Lactosa	D-maltosa	Manitol	Manosa	Ribosa	Sacarosa	D-trehalosa
F <i>Salinivibrio</i> sp. AL184	-	+	-	+	+	-	+/-	+	+	+	+/-	+
<i>Salinivibrio</i> sp. AL185	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+
<i>Salinivibrio</i> sp. AL209	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Salinivibrio</i> sp. AL210	-	+/-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
I <i>Salinivibrio</i> sp. AL213	-	+	-	+	+	-	+	+/-	-	+	+	+
<i>Salinivibrio</i> sp. AR654	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
<i>Salinivibrio</i> sp. IB203	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
<i>Salinivibrio</i> sp. IB283	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
L <i>Salinivibrio</i> sp. IB338	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+
<i>Salinivibrio</i> sp. IB560	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+
<i>Salinivibrio</i> sp. IB563	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
O <i>Salinivibrio</i> sp. IC202	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Salinivibrio</i> sp. IC317	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Salinivibrio</i> sp. MA421	+/-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Salinivibrio</i> sp. ML199	+/-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+
G <i>Salinivibrio</i> sp. ML200	+/-	-	+/-	+	-	+/-	+	+	-	+	+	+
<i>Salinivibrio</i> sp. ML201	+/-	+	+/-	+	+	+/-	+	+	-	-	+	+
<i>Salinivibrio</i> sp. ML276	+/-	+	+/-	+	+	-	+	+	-	-	+	+
R <i>Salinivibrio</i> sp. ML277	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Salinivibrio</i> sp. ML278	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Salinivibrio</i> sp. ML288	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+

Cepa		D-arabinosa	Fructosa	D-galactosa	Glicerol	D-glucosa	Lactosa	D-maltosa	Manitol	Manosa	Ribosa	Sacarosa	D-trehalosa
U P O 1	<i>Salinivibrio</i> sp. ML315	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML316	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML318	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML320	-	+	-	+	+	-	+	+	+/-	-	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML328	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML328A	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML328B	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML329	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML330	+/-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML331	+/-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+/-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML332	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML337	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML338	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
F I L O	<i>Salinivibrio</i> sp. CA762	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB557	-	-	-	+	+/-	-	+	+	-	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB845	-	-	-	+	+/-	-	+	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB867	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB868	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB869	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB870	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB871	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB873	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
<i>Salinivibrio</i> sp. ML198	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	

Cepa		D-arabinosa	Fructosa	D-galactosa	Glicerol	D-glucosa	Lactosa	D-maltosa	Manitol	Manosa	Ribosa	Sacarosa	D-trehalosa
G	<i>Salinivibrio</i> sp. ML279	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML289	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+
R	<i>Salinivibrio</i> sp. ML290	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML319	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+
U	<i>Salinivibrio</i> sp. ML321	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML334	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
P	<i>Salinivibrio</i> sp. ML336	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR11	+/-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
O	<i>Salinivibrio</i> sp. PR12	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR6	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
2	<i>Salinivibrio</i> sp. PR63	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR64	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR943	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR983	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
	<i>S. siamensis</i> JCM 14472 ^T	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>S. sharmensis</i> DSM 18182 ^T	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+
F	<i>Salinivibrio</i> sp. AR640	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+
I	<i>Salinivibrio</i> sp. AR647	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+
L	<i>Salinivibrio</i> sp. IB643	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
O	<i>Salinivibrio</i> sp. MA351	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
G	<i>Salinivibrio</i> sp. MA427	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
R	<i>Salinivibrio</i> sp. MA440	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
U	<i>Salinivibrio</i> sp. MA607	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+

Cepa	D-arabinosa	Fructosa	D-galactosa	Glicerol	D-glucosa	Lactosa	D-maltosa	Manitol	Manosa	Ribosa	Sacarosa	D-trehalosa	
P O 3	<i>S. cost.</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359 ^T	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+
	<i>S. cost.</i> subsp. <i>costicola</i> DSM 11403 ^T	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+
F I O G R U P O 4	<i>Salinivibrio</i> sp. IB574	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB872	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR5	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR919	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR932	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> DSM 11403 ^T	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
<i>S. cost.</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285 ^T	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	

El filogrupo 3 produce ácidos a partir de la D-glucosa, D-maltosa y D-trehalosa. El filogrupo 4 produce ácidos a partir del manitol, D-maltosa, ribosa y D-trehalosa. La D-arabinosa era negativa para todas las cepas del filogrupo 3 menos para el aislado MA607. La D-galactosa era negativa para todas las cepas del filogrupo 2 menos el aislado IB869 que conferió un resultado de positivo débil; mientras que para el filogrupo 3 también dio resultado negativo este azúcar para todas las cepas menos para la especie *S. cost.* subsp. *alcaliphilus* DSM 16359^T. La D-trehalosa fue positiva para todas las cepas del filogrupo 2 menos para el aislado PR64 que aportó un resultado de positivo débil.

Tal y como ocurrió en la tabla anterior, el filogrupo 1 ha presentado bastante heterogeneidad en sus resultados.

Se deduce por tanto que, cepas aisladas del mismo ambiente hipersalino no poseían la misma actividad enzimática e incluso cepas pertenecientes al mismo filogrupa tampoco.

IV.6.4. Pruebas nutricionales

Se determinó la utilización de carbohidratos, alcoholes, aminoácidos y ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía. Los resultados se muestran en las Tablas IV.X.12, IV.13 y IV.14.

Tabla IV.12. Utilización de azúcares por parte de las cepas del género *Salinivibrio* objeto de este estudio.

+: positivo; -: negativo; +/-: reacción débil.

Cepa	D-arabinosa	Fructosa	D-galactosa	D-glucosa	Lactosa	Maltosa	Manosa	Rafinosa	Ribosa	Sacarosa	D-Trehalosa	Xilosa
F <i>Salinivibrio</i> sp. AL184	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salinivibrio</i> sp. AL185	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salinivibrio</i> sp. AL209	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I <i>Salinivibrio</i> sp. AL210	+	-	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
<i>Salinivibrio</i> sp. AL213	+	-	-	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+
<i>Salinivibrio</i> sp. AR654	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
L <i>Salinivibrio</i> sp. IB203	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
<i>Salinivibrio</i> sp. IB283	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>Salinivibrio</i> sp. IB338	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
O <i>Salinivibrio</i> sp. IB560	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
<i>Salinivibrio</i> sp. IB563	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
<i>Salinivibrio</i> sp. IC202	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>Salinivibrio</i> sp. IC317	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
G <i>Salinivibrio</i> sp. MA421	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Salinivibrio</i> sp. ML199	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-

Cepa		D-arabinosa	Fructosa	D-galactosa	D-glucosa	Lactosa	Maltosa	Manosa	Rafinosa	Ribosa	Sacarosa	D-Trehalosa	Xilosa
R	<i>Salinivibrio</i> sp. ML200	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML201	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+/-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML276	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML277	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
U	<i>Salinivibrio</i> sp. ML278	+/-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML288	-	+/-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
P	<i>Salinivibrio</i> sp. ML315	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML316	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML318	+	-	-	-	-	-	+/-	+	+	-	+	+
O	<i>Salinivibrio</i> sp. ML320	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML328	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML328A	+	-	+/-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML328B	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
1	<i>Salinivibrio</i> sp. ML329	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+/-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML330	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML331	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML332	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML337	-	+	+/-	+	-	-	+	+	-	+	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML338	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
F	<i>Salinivibrio</i> sp. CA762	+	-	-	-	+	+	+/-	+	-	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB557	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB845	+/-	-	-	+	-	-	+/-	+	+	-	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB867	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+

Cepa		D-arabinosa	Fructosa	D-galactosa	D-glucosa	Lactosa	Maltosa	Manosa	Rafinosa	Ribosa	Sacarosa	D-Trehalosa	Xilosa
I	<i>Salinivibrio</i> sp. IB868	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB869	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
L	<i>Salinivibrio</i> sp. IB870	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB871	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
O	<i>Salinivibrio</i> sp. IB873	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML198	+/-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
G	<i>Salinivibrio</i> sp. ML279	+/-	-	-	+	+	-	+/-	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML289	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
R	<i>Salinivibrio</i> sp. ML290	+/-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML319	+	-	-	-	-	-	+/-	-	+	-	+	+
U	<i>Salinivibrio</i> sp. ML321	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML334	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-
P	<i>Salinivibrio</i> sp. ML336	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR11	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
O	<i>Salinivibrio</i> sp. PR12	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR6	+	+	+/-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
2	<i>Salinivibrio</i> sp. PR63	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR64	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR943	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR983	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+/-	+/-
	<i>S. siamensis</i> JCM 14472 ^T	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
	<i>S. sharmensis</i> DSM 18182 ^T	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
F	<i>Salinivibrio</i> sp. AR640	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+

Cepa		D-arabinosa	Fructosa	D-galactosa	D-glucosa	Lactosa	Maltosa	Manosa	Rafinosa	Ribosa	Sacarosa	D-Trehalosa	Xilosa
I	<i>Salinivibrio</i> sp. AR647	+/-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
L	<i>Salinivibrio</i> sp. IB643	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+/-	+	+
O	<i>Salinivibrio</i> sp. MA351	+	-	+/-	+	+	+	+	+/-	+	-	+	+
G	<i>Salinivibrio</i> sp. MA427	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
R	<i>Salinivibrio</i> sp. MA440	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
U	<i>Salinivibrio</i> sp. MA607	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
P	<i>S. cost.</i> subsp. <i>alcaliphilus</i>	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+
O	DSM 16359 ^T	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+
3	<i>S. cost.</i> subsp. <i>costicola</i>	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-
DSM	DSM 11403 ^T	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-
F	<i>Salinivibrio</i> sp. IB574	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
I	<i>Salinivibrio</i> sp. IB872	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
L	<i>Salinivibrio</i> sp. PR5	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+/-	-
O	<i>Salinivibrio</i> sp. PR919	+/-	-	+	+	-	+	+/-	+	+	-	+	-
G	<i>Salinivibrio</i> sp. PR932	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
R	<i>Salinivibrio</i> sp. PR932	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
U	<i>Salinivibrio</i> <i>proteolyticus</i>	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-
P	DSM 11403 ^T	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-
O	<i>S. cost.</i> subsp. <i>vallismortis</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
4	DSM 8285 ^T	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-

Tal y como se observa en la tabla, el filogrupo 4 utiliza tanto la maltosa, rafinosa y glucosa, en este último azúcar todas las cepas menos *S. cost.* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T, como única fuente de carbono y energía; mientras que no utiliza la D-xilosa en ninguna de sus cepas menos el aislado PR932. En el caso del filogrupo 3 todos los aislados utilizan la D-xilosa como

fuerza de carbono y energía menos la cepa *S. cost.* subsp. *costicola* DSM 11403^T. En el filogrupo 2, todas utilizan la D-trehalosa como única fuente de carbono y energía menos la cepa PR63. Tal y como se ha comentado en tablas anteriores, el filogrupo 1 presenta una gran variabilidad en sus resultados; además ha sido imposible generar una correlación por filogrupos ni por sitio de aislamiento de cada cepa.

Tabla IV.13. Utilización de aminoácidos por parte de las cepas del género *Salinivibrio* objeto de este estudio.

+: positivo; -: negativo; +/-: reacción débil.

Cepa		Alanina	Asparagina	Fenilalanina	Glutamina	Metionina	Lisina	Isoleucina	Valina
F	<i>Salinivibrio</i> sp. AL184	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. AL185	+	-	+	-	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. AL209	+	-	+	-	+	+	+	+
I	<i>Salinivibrio</i> sp. AL210	+	+	+	-	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. AL213	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. AR654	-	+	+	+	-	+	-	+
L	<i>Salinivibrio</i> sp. IB203	+	+	+	-	+	-	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB283	+	-	+	-	-	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB338	+	-	+	+	-	+	+	+
O	<i>Salinivibrio</i> sp. IB560	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB563	+	-	-	+	-	-	+/-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. IC202	+	+	+/-	+	-	+	+	+
G	<i>Salinivibrio</i> sp. IC317	+	-	-	+	-	-	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. MA421	+	-	-	+	-	-	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML199	+	+	+	-	+/-	+	+/-	+

Cepa		Alanina	Asparagina	Fenilalanina	Glutamina	Metionina	Lisina	Isoleucina	Valina
R	<i>Salinivibrio</i> sp. ML200	-	+	+	+	+	+/-	+/-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML201	+	-	+	+	-	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML276	+	+	+	+	+	+	+	+/-
U	<i>Salinivibrio</i> sp. ML277	+	+	-	-	+	-	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML278	+	-	-	+	+	-	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML288	-	+	-	+	+	+	+	-
P	<i>Salinivibrio</i> sp. ML315	+	+	+	+	+	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML316	+	+	+	+	+/-	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML318	+	+	+	+	-	-	+	+
O	<i>Salinivibrio</i> sp. ML320	+	+	+	+	+	-	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML328	-	-	+/-	+	+	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML328A	+	-	-	+	+	+	+	+
1	<i>Salinivibrio</i> sp. ML328B	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML329	+	-	-	+	+	+	+	+/-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML330	+	-	+	+	-	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML331	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML332	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML337	-	-	+	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML338	+	-	+	+	+	+	+	+
F	<i>Salinivibrio</i> sp. CA762	+	-	-	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB557	+	+	+/-	+	+	-	-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB845	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB867	+	+	+	-	-	+	+	+

Cepa		Alanina	Asparagina	Fenilalanina	Glutamina	Metionina	Lisina	Isoleucina	Valina
I	<i>Salinivibrio</i> sp. IB868	+	+	+	+	-	+	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB869	+	+	+	+	-	+	+	+
L	<i>Salinivibrio</i> sp. IB870	+	+	+	+	+	+	-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB871	+	+	-	+	+	+	+	+
O	<i>Salinivibrio</i> sp. IB873	-	+	+	+	+	+	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML198	+	-	-	-	+	+	+	-
G	<i>Salinivibrio</i> sp. ML279	-	+	+	+	-	-	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML289	+	+/-	-	-	+	-	-	-
R	<i>Salinivibrio</i> sp. ML290	+/-	+	+	+	+	-	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML319	+	+	+	+	+	-	+	-
U	<i>Salinivibrio</i> sp. ML321	+	-	+	+	-	-	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML334	-	+	+	+	+	+	+	-
P	<i>Salinivibrio</i> sp. ML336	-	-	+	+	+	+	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR11	+	+	+	+	+	-	+	+
O	<i>Salinivibrio</i> sp. PR12	+	+	+	+	+	-	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR6	-	+	+	+	+	-	-	-
2	<i>Salinivibrio</i> sp. PR63	+	-	+	+	+	+	-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR64	+	-	+	-	-	+	-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR943	+	+	+	-	-	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR983	+	-	+	-	-	-	+	-
	<i>S. siamensis</i> JCM 14472 ^T	-	+	+	+	+	-	-	-
	<i>S. sharmensis</i> DSM 18182 ^T	+	+	+	+	+	-	+	-
F	<i>Salinivibrio</i> sp. AR640	+	+	-	-	-	+	+	-

Cepa		Alanina	Asparagina	Fenilalanina	Glutamina	Metionina	Lisina	Isoleucina	Valina
I L O G R U P O 3	<i>Salinivibrio</i> sp. AR647	+	+	+	+	-	+	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB643	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. MA351	+	-	+	+	-	+/-	-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. MA427	+	-	-	-	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. MA440	+	+	+	+	-	+	-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. MA607	+	+	+	+	-	+/-	-	+
	<i>S. cost.</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359 ^T	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>S. cost.</i> subsp. <i>costicola</i> DSM 11403 ^T	+	+	-	-	-	+	+	-	
F I L O G R U P O 4	<i>Salinivibrio</i> sp. IB574	+	-	-	+	+/-	+	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB872	+/-	-	+	-	+/-	+	-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR5	-	+	+	+	+	-	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR919	+	+	+	-	-	+	-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR932	+	+	-	+/-	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> DSM 11403 ^T	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>S. cost.</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285 ^T	+	+	-	-	-	+	+	+

Tal y como se observa, la alanina es la única fuente de nitrógeno, carbono y energía que utilizan todas los aislados del filogrupo 3. De forma general se observa una gran diversidad en la utilización de aminoácidos incluso dentro de cada filogrupo, esto puede deberse a que la cepa utiliza ese sustrato en función de la necesidad en la que se encuentre, por lo que no siempre tiene porque metabolizarlo. Además tampoco se encontró una correlación de utilización de estos aminoácidos en función a su sitio de aislamiento.

Tabla IV.14. Utilización de ácidos orgánicos por parte de las cepas del género *Salinivibrio* objeto de este estudio.

+: positivo; -: negativo; +/-: reacción débil.

Cepa	Ácido Benzoico	Ácido Propiónico	Ácido Fumárico	Hipurato	Citrato	Malato	Ácido Succínico	Ácido Fórmico	L-Tartato	
F	<i>Salinivibrio</i> sp. AL184	+/-	+	+	+	-	-	+	-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. AL185	-	+	+	+	-	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. AL209	-	+	+	+	+/-	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. AL210	-	+	-	+	+	+	-	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. AL213	-	-	+	-	+	+	-	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. AR654	+	+	+	+	+	+	-	+	-
I	<i>Salinivibrio</i> sp. IB203	-	+	-	+	-	+/-	+	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB283	+/-	-	+	+	-	+	+	-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB338	+	+	+	+	+	+	-	+	-
L	<i>Salinivibrio</i> sp. IB560	+	+	+	-	+	+	-	-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB563	+	+	+	+	-	-	+/-	+	-
O	<i>Salinivibrio</i> sp. IC202	-	+	+/-	+	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. IC317	-	+	+	-	+	+	-	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. MA421	-	+	+	-	+	+	-	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML199	-	+	+	+	+	+	+	-	+
G	<i>Salinivibrio</i> sp. ML200	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML201	+	+	-	+	+	-	+	+	-
R	<i>Salinivibrio</i> sp. ML276	+	+	-	+	+	-	-	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML277	-	+	-	+	-	-	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML278	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML288	-	+	-	+	-	+	-	+	-

Cepa		Ácido Benzoico	Ácido Propiónico	Ácido Fumárico	Hipurato	Citrato	Malato	Ácido Succínico	Ácido Fórmico	L-Tartato
U P O 1	<i>Salinivibrio</i> sp. ML315	+	+	+	-	+	+	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML316	+	+	+	+	+	-	+	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML318	+	-	+		+	+	+	-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML320	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML328	-	+	+	+	-	+	+	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML328A	-	-	+/-	+	-	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML328B	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML329	-	+	-	+	+	+	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML330	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML331	+	+	+	+	+	+	-	+	+/-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML332	+	+	+	+	-	+/-	-	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML337	+	-	-	+	+	+	+	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML338	+	-	-	+	+	+	-	+	-
	F I L O	<i>Salinivibrio</i> sp. CA762	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>Salinivibrio</i> sp. IB557		+	+	-	+	-	-	+/-	+	+/-
<i>Salinivibrio</i> sp. IB845		+/-	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Salinivibrio</i> sp. IB867		+	+	+/-	+	+/-	+	+	-	-
<i>Salinivibrio</i> sp. IB868		-	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>Salinivibrio</i> sp. IB869		-	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Salinivibrio</i> sp. IB870		-	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Salinivibrio</i> sp. IB871		+	+	-	+	+/-	+	+	-	-
<i>Salinivibrio</i> sp. IB873	+	+	+	+	-	+	+	-	-	

Cepa	Ácido Benzoico	Ácido Propiónico	Ácido Fumárico	Hipurato	Citrato	Malato	Ácido Succínico	Ácido Fórmico	L-Tartato
G R U P O 2	<i>Salinivibrio</i> sp. ML198	+	-	+	+	+	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML279	-	-	+	+	+	+	-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML289	-	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML290	+	+	-	+	+	-	-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML319	+	+	+	+	+	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML321	-	+	+	+	+	+	-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML334	+	+	-	+	+	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. ML336	+	+	+	+	-	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR11	+	+	+	+	-	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR12	+	-	-	+	+	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR6	+	+	+	-	-	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR63	-	+	+	+	+	-	-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR64	+	+	-	+	+	-	+/-	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR943	+	+	+	+	-	-	-	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. PR983	-	+	-	-	-	+	+	-
<i>S. siamensis</i> JCM 14472 ^T	-	+	+	+	-	+	-	+	
<i>S. sharmensis</i> DSM 18182 ^T	+/-	-	+	-	+	+	+	+	
F I L	<i>Salinivibrio</i> sp. AR640	+	+	+	+	-	+	+	+
	<i>Salinivibrio</i> sp. AR647	+	-	-	+	+	-	+	-
	<i>Salinivibrio</i> sp. IB643	+	-	-	+	+	+	+	-

Cepa	Ácido Benzoico	Ácido Propiónico	Ácido Fumárico	Hipurato	Citrato	Malato	Ácido Succínico	Ácido Fórmico	L-Tartato
O <i>Salinivibrio</i> sp. MA351	+	-	-	+	-	+	+	-	+
G <i>Salinivibrio</i> sp. MA427	-	+	+	+	-	+	+	+	+
R <i>Salinivibrio</i> sp. MA440	-	-	+	+	+	+	-	+	+
U <i>Salinivibrio</i> sp. MA607	+	+	+	+	-	-	-	+	+
P <i>S. cost.</i> subsp. <i>alcaliphilus</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	-
O DSM 16359 ^T									
3 <i>S. cost.</i> subsp. <i>costicola</i>	-	+	+	-	+	-	+	+	+
DSM 11403 ^T									
F <i>Salinivibrio</i> sp. IB574	-	+	+	+	+	-	+	+	+
I <i>Salinivibrio</i> sp. IB872	+	+	+	+	-	+	-	+	+
L <i>Salinivibrio</i> sp. PR5	+	-	-	+	+	+	-	-	-
O <i>Salinivibrio</i> sp. PR919	+	-	-	+	+	+	+	+	+
G <i>Salinivibrio</i> sp. PR932	-	-	-	+	+	+	-	+	-
R <i>Salinivibrio proteolyticus</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	-
U DSM 11403 ^T									
P <i>S. cost.</i> subsp. <i>vallismortis</i>	+	+/-	+	-	-	+	-	-	+
O DSM 8285 ^T									
4									

Los ácidos orgánicos han presentado de forma general una gran variabilidad intrafilogenética por lo que no se ha podido sacar conclusión alguna de su metabolismo.

Debemos destacar que se observan algunas diferencias entre nuestros resultados y los datos de las descripciones originales de las especies tipo, que pueden ser debidas a la utilización de distinta metodología.

IV.7. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE GUANINA MAS CITOSINA DEL ADN

De las setenta y seis cepas que componen nuestra colección de salinivibrios, escogimos treinta y tres cepas en función de cómo se posicionaban dentro de cada filogrupo así como de su sitio de muestreo; estas cepas fueron las mismas que se seleccionaron para realizarles el estudio de la hibridación ADN-ADN y son las que se marcan en verde en la Figura IV.07. En el caso de los filogrupos 3 y 4 a todas las cepas constituyentes de estos filogrupos se les realizó la determinación del contenido en guanina más citosina (G+C) del ADN. Esta característica fue determinada a partir de la temperatura media de desnaturalización (T_m), según el método descrito en el apartado III.6.3.1 de Materiales y Métodos. Los contenidos en G+C del ADN se encuentran recogidos en la Tabla IV.15.

Tabla IV.15. Contenido en G+C de las cepas seleccionadas objeto de estudio.

Entre paréntesis se indica el contenido en G+C según el trabajo donde se ha descrito.

Cepa	G+C (T_m) (moles%)
<i>Salinivibrio</i> sp. AL184	52,5
<i>Salinivibrio</i> sp. IB560	52,5
<i>Salinivibrio</i> sp. IB563	51,9
<i>Salinivibrio</i> sp. IC202	51,9
<i>Salinivibrio</i> sp. IC317	51,9
<i>Salinivibrio</i> sp. MA421	52,5
<i>Salinivibrio</i> sp. ML277	52,5
<i>Salinivibrio</i> sp. ML318	51,9
<i>Salinivibrio</i> sp. ML328A	52,5
<i>Salinivibrio</i> sp. ML331	51,9
<i>Salinivibrio</i> sp. IB868	52,5
<i>Salinivibrio</i> sp. IB870	51,9
<i>Salinivibrio</i> sp. ML198	52,5
<i>Salinivibrio</i> sp. ML290	52,5
<i>Salinivibrio</i> sp. PR6	52,5

Cepa	G+C (<i>Tm</i>) (moles%)
<i>S. siamensis</i> JCM 14472 ^T	51,9 (49,0)
<i>S. sharmensis</i> DSM 18182 ^T	52,5 (51,0)
<i>Salinivibrio</i> sp. AR640	52,5
<i>Salinivibrio</i> sp. AR647	51,9
<i>Salinivibrio</i> sp. IB643	51,9
<i>Salinivibrio</i> sp. MA351	52,5
<i>Salinivibrio</i> sp. MA427	51,9
<i>Salinivibrio</i> sp. MA440	51,9
<i>Salinivibrio</i> sp. MA607	51,9
<i>S. cost.</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359 ^T	51,9 (49,3)
<i>S. cost.</i> subsp. <i>costicola</i> DSM 11403 ^T	52,5 (49,9)
<i>Salinivibrio</i> sp. IB574	51,9
<i>Salinivibrio</i> sp. IB872	51,9
<i>Salinivibrio</i> sp. PR5	51,9
<i>Salinivibrio</i> sp. PR919	52,5
<i>Salinivibrio</i> sp. PR932	51,9
<i>S. proteolyticus</i> DSM 11403 ^T	51,9 (49,5)
<i>S. cost.</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285 ^T	51,9 (50,0)

El rango de contenido de G+C oscila entre el 51,9 y el 52,5 %. Tal y como se observa, los valores son bastante semejantes entre ellos, no pudiéndose establecer una relación conforme a los filogrupos constituidos. Si bien, si contrastamos las cepas ya descritas, el contenido en G+C del ADN es ligeramente superior, pudiéndose ser que la metodología llevada a cabo sea diferente a la que se empleó en cada uno de los trabajos. Sin embargo, estos valores se encuentran cercanos a los descritos para las especies del género *Salinivibrio* (49,0-51,0 mol%) (Romano y col., 2011).

IV. 8. ANÁLISIS GENÓMICO DE CEPAS DEL GÉNERO *SALINIVIBRIO*

IV.8.1. Secuenciación y ensamblaje de las secuencias

El siguiente objetivo de la presente Tesis Doctoral fue la secuenciación de los genomas de un grupo de cepas seleccionadas. Para ello de nuestra colección se escogieron de cada filogrupos una serie de cepas en función de su sitio de aislamiento así como de su posición filogenética en el árbol; en el caso de los filogrupos 3 y 4, se secuenciaron todas las cepas pertenecientes a esos filogrupos. Un total de 34 cepas fueron secuenciadas mediante las tecnologías de **Illumina HiSeq** 2x100-pb *paired end* (PE) *reads*, llevado a cabo en la empresa MacroGen (Korea) e **Illumina MiSeq** 2x300-pb *paired end* (PE) *reads*, realizado en la Universidad de Swansea (Reino Unido). La lista de los 32 genomas secuenciados así como de su tecnología de secuenciación, se muestra en la tabla IV.16.

Tabla IV.16. Colección de cepas a las que se les ha secuenciado su genoma y tecnología de secuenciación usada.

Cepa	Tecnología de secuenciación
<i>S. costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 19052	Illumina HiSeq
<i>S. costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285	Illumina HiSeq
<i>S. proteolyticus</i> DSM19052	Illumina MiSeq
<i>S. sharmensis</i> DSM 18182	Illumina MiSeq
<i>S. siamensis</i> JCM 14472	Illumina MiSeq
<i>Salinivibrio</i> sp. AL184	Illumina HiSeq
<i>Salinivibrio</i> sp. AR640	Illumina MiSeq
<i>Salinivibrio</i> sp. AR647	Illumina MiSeq
<i>Salinivibrio</i> sp. IB560	Illumina MiSeq
<i>Salinivibrio</i> sp. IB563	Illumina MiSeq
<i>Salinivibrio</i> sp. IB574	Illumina MiSeq
<i>Salinivibrio</i> sp. IB643	Illumina MiSeq
<i>Salinivibrio</i> sp. IB868	Illumina MiSeq

Cepa	Tecnología de secuenciación
<i>Salinivibrio</i> sp. IB870	Illumina MiSeq
<i>Salinivibrio</i> sp. IB872	Illumina MiSeq
<i>Salinivibrio</i> sp. IC202	Illumina MiSeq
<i>Salinivibrio</i> sp. IC317	Illumina MiSeq
<i>Salinivibrio</i> sp. MA351	Illumina MiSeq
<i>Salinivibrio</i> sp. MA421	Illumina MiSeq
<i>Salinivibrio</i> sp. MA427	Illumina MiSeq
<i>Salinivibrio</i> sp. MA440	Illumina MiSeq
<i>Salinivibrio</i> sp. MA607	Illumina MiSeq
<i>Salinivibrio</i> sp. ML198	Illumina HiSeq
<i>Salinivibrio</i> sp. ML277	Illumina MiSeq
<i>Salinivibrio</i> sp. ML290	Illumina MiSeq
<i>Salinivibrio</i> sp. ML318	Illumina MiSeq
<i>Salinivibrio</i> sp. ML328A	Illumina HiSeq
<i>Salinivibrio</i> sp. ML331	Illumina HiSeq
<i>Salinivibrio</i> sp. PR5	Illumina MiSeq
<i>Salinivibrio</i> sp. PR6	Illumina MiSeq
<i>Salinivibrio</i> sp. PR919	Illumina MiSeq
<i>Salinivibrio</i> sp. PR932	Illumina MiSeq

Gracias a las nuevas tecnologías de secuenciación, así como a las metodologías computacionales, nuestro conocimiento acerca del mundo microbiano va en incremento. A pesar de ello, la evaluación manual de los conocidos como *draft genomes* (genomas incompletos) es algo que aún no está al alcance nuestra. Con el fin de establecer unos patrones de inferencia sólidos debido al creciente auge de la secuenciación de genomas, es

fundamental distinguir entre la calidad de estos *draft genomes* (Mardis y col., 2002, Chain y col., 2009).

Existen algunos parámetros que permiten evaluar la calidad del ensamblaje cuantitativamente. Se calcula generalmente la talla mínima, máxima y media de los *contigs*, así como la talla total del ensamblaje, la cual debe coincidir con el **tamaño** esperado del genoma. Pero el principal valor estadístico es el valor **N50** (Salzberg y col., 2012, Gurevich y col., 2013), el cual corresponde con el menor de los mayores *contigs* que cubren la mitad del genoma. Aunque el valor N50 constituye un indicador acerca de la contigüidad del genoma, no es una señal de precisión y calidad del genoma ensamblado.. Sin embargo, la estimación de **completitud**, es decir, cuánto de completo está el genoma objeto de estudio, así como la presencia/distribución de los marcadores moleculares en el genoma es algo que no se había tenido en cuenta hasta entonces. (Sharon y Banfield, 2013). Además, la presencia reiterada de una única copia de un gen en un genoma sirve de parámetro de estimación para saber el **nivel de contaminación** de un genoma (Albertsen y col., 2013; Soo y col., 2014; Sekiguchi y col., 2015). Otros parámetros a tener en cuenta sería el **tamaño del genoma** así como el **número de contigs**, ya que a menor número de *contigs*, más cerca estaremos de obtener un genoma cerrado/completo y por tanto la información aportada por ese genoma será de mayor fiabilidad. Otra estrategia es comparar la secuencia obtenida con otras secuencias genómicas, ya sea una secuencia de referencia, o genomas de organismos relacionados (Meader y col., 2008).

En base a todo lo descrito previamente, y con la finalidad de ver cuál de los ensambladores produjo un resultado en base a una serie de parámetros previamente descritos; se usaron cuatro ensambladores diferentes: **SPAdes 3.0**, **A5-miseq**, **Newbler** e **IDBA-UD**. En la tabla IV.17 se recogen los parámetros que se usaron para discriminar cuál de los ensambladores era mejor.

Tabla IV.17. Principales características de los genomas secuenciados según el ensamblador utilizado.

En azul: SPAdes 3.0; rojo: A5-miseq; verde: Newbler; naranja: IDBA-UD.

Cepa	Tamaño del genoma (Mpb)				N50				Nº de <i>contigs</i>			
	3,0	3,4	3,3	3,3	28945	77459	34323	74560	188	107	233	104
<i>S. costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 19052	3,0	3,4	3,3	3,3	28945	77459	34323	74560	188	107	233	104
<i>S. costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285	3,4	3,5	3,4	3,4	169875	270183	185493	196230	50	41	61	44
<i>S. proteolyticus</i> DSM19052	3,6	3,6	3,6	3,5	97833	143067	95355	74134	68	51	79	105
<i>S. sharmensis</i> DSM 18182	3,3	3,3	3,3	3,3	64917	83172	61300	117162	51	40	54	70
<i>S. siamensis</i> JCM 14472	3,4	3,4	3,4	3,4	91315	114651	64538	74026	75	61	97	102
<i>Salinivibrio</i> sp. AL184	3,4	3,4	3,3	3,4	215470	271890	178592	198024	35	27	40	43
<i>Salinivibrio</i> sp. AR640	3,2	3,3	3,2	3,2	89999	87861	77049	80811	64	60	86	90
<i>Salinivibrio</i> sp. AR647	3,3	3,3	3,3	3,2	198688	311807	186369	119924	43	22	45	60
<i>Salinivibrio</i> sp. IB560	3,5	3,5	3,5	3,4	134963	111814	73988	101755	69	65	85	86
<i>Salinivibrio</i> sp. IB563	3,3	3,5	3,3	3,4	70202	42636	23871	35671	73	173	289	259
<i>Salinivibrio</i> sp. IB574	3,5	3,6	3,6	3,5	77225	106472	44562	19949	74	69	130	300
<i>Salinivibrio</i> sp. IB643	3,0	3,1	3,1	3,1	101561	79381	53109	64225	77	91	135	155

Cepa	Tamaño del genoma (Mpb)				N50				N° de contigs			
<i>Salinivibrio</i> sp. IB868	3,4	3,4	3,4	3,4	198107	206501	137582	184167	37	30	50	47
<i>Salinivibrio</i> sp. IB870	3,4	3,4	3,4	3,4	135713	138190	112875	111947	43	41	50	72
<i>Salinivibrio</i> sp. IB872	3,4	3,6	3,6	3,4	75559	82702	52958	32646	61	102	64	236
<i>Salinivibrio</i> sp. IC202	3,6	3,6	3,5	3,5	62822	72723	62717	72394	134	111	135	171
<i>Salinivibrio</i> sp. IC317	3,2	3,3	3,2	3,2	26004	21208	15892	11547	179	236	329	489
<i>Salinivibrio</i> sp. MA351	3,3	3,3	3,3	3,2	93214	95545	87754	91793	61	59	79	81
<i>Salinivibrio</i> sp. MA421	3,4	3,5	3,5	3,5	42839	94274	72593	75642	170	70	89	110
<i>Salinivibrio</i> sp. MA427	2,8	3,2	3,2	3,2	16299	9975	8004	5459	282	513	605	95
<i>Salinivibrio</i> sp. MA440	3,3	3,4	3,4	3,4	29507	59971	57495	55003	184	102	129	136
<i>Salinivibrio</i> sp. MA607	3,3	3,3	3,3	3,3	117055	87592	75558	82549	70	68	82	97
<i>Salinivibrio</i> sp. ML198	3,4	3,4	3,3	3,4	285794	317004	187596	163752	35	31	40	44
<i>Salinivibrio</i> sp. ML277	3,5	3,4	3,4	3,4	130171	117752	88117	95048	72	73	79	89
<i>Salinivibrio</i> sp. ML290	3,5	3,5	3,5	3,5	121515	168056	101517	121263	46	36	57	69
<i>Salinivibrio</i> sp. ML318	3,3	3,3	3,3	3,3	70202	65785	45543	53892	73	96	125	149

Cepa	Tamaño del genoma (Mpb)				N50				Nº de contigs			
<i>Salinivibrio</i> sp. ML328A	3,3	3,3	3,3	3,3	258745	379693	218745	172729	30	24	35	38
<i>Salinivibrio</i> sp. ML331	3,5	3,5	3,4	3,5	169820	175001	135879	128351	55	53	58	60
<i>Salinivibrio</i> sp. PR5	3,4	3,5	3,4	3,4	59701	68288	44625	51049	100	105	141	152
<i>Salinivibrio</i> sp. PR6	3,3	3,4	3,4	3,4	40418	165099	106668	109718	169	49	71	92
<i>Salinivibrio</i> sp. PR919	3,2	3,5	3,5	3,4	55872	33984	23707	34617	99	176	253	205
<i>Salinivibrio</i> sp. PR932	3,5	3,5	3,5	3,4	102372	90599	74089	88755	70	74	93	101

Según algunos de los parámetros previamente descritos, los ensambladores **A5-miseq** y **SPAdes 3.0** son los que ofrecieron unos valores de **N50** y de **tamaño de genoma** superiores y un menor **número de contigs** de forma general; debido a que queremos llevar a cabo un estudio de genómica comparativa, decidimos decantarnos por uno de los ensambladores; el ensamblador **A5-miseq** fue el que aportó, en aproximadamente un 50 % de los genomas secuenciados, mejor resultado, por lo que éste fue el seleccionado para llevar a cabo el resto de estudio de la presente Tesis Doctoral. Una vez ensamblados éstos se depositaron en la base de datos DDBJ/ENA/GenBank.

En la Tabla IV.18 se recogen las principales características de estos genomas ensamblados con **A5-miseq**.

El tamaño de los genomas osciló entre 3.123.148 y 3.641.359 pb con un contenido en G+C entre 49,2 y 50,9 %. Las lecturas obtenidas con ambas tecnologías de Illumina se secuenciaron con una profundidad de secuenciación de 7 y 100 veces la cobertura del genoma, siendo superiores las obtenidas mediante la tecnología Illumina HiSeq en la mayoría de los casos (55-100x, menos la cepa *Salinivibrio* sp. ML198 que obtuvo una cobertura de 24xx). Los valores de N50 oscilaron entre 9.975 y 311.807. El número de contigs osciló entre 22 y 513, siendo todos igual o superiores a un tamaño de 1000 pb.

El porcentaje de contaminación era prácticamente inexistente, siendo el valor más alto el correspondiente a la cepa *Salinivibrio* sp. MA427 con un valor de 1,35 %. El porcentaje de completitud de los genomas era bastante alto oscilando entre el 96,85 y el 100%. Según Park y col., (2015) un porcentaje inferior al 5 % de contaminación junto con un valor superior al 90 % de completitud estiman que la contaminación presente es prácticamente inapreciable. En este estudio todos los genomas superan ese 90 % de completitud y poseen un porcentaje de contaminación inferior al 2 %.

IV.8.2. Características generales de los *draft genomes*

Tabla IV.18. Características principales de los 33 *draft genomes* del género *Salinivibrio*.

Cepa	Tamaño del genoma (pb)	N50	Nº de contigs	Profundidad de secuenciación	% contaminación	% completo	% GC	ORFs	Nº acceso DDBJ/ENA/GenBank
<i>S. costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 19052	3.326.316	74.560	104	74x	0	99,46	49,3	3,114	MUFR00000000
<i>S. costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285	3.478.614	196.230	44	83x	0	99,97	49,7	3,218	MUFQ00000000
<i>S. proteolyticus</i> DSM 19052	3.603.496	143.067	51	11x	0	99,97	49,8	3,338	MUFP00000000
<i>S. sharmensis</i> DSM 18182	3.326.895	229.272	40	35x	0,54	99,97	50,4	3,028	MUFC00000000
<i>S. siamensis</i> JCM 14472	3.442.185	114.651	61	17x	0	99,97	50,3	3,126	MUFB00000000
<i>Salinivibrio</i> sp. AL184	3.398.626	198.024	42	100x	0,54	99,97	50,3	3,132	MUEK00000000
<i>Salinivibrio</i> sp. AR640	3.256.021	87.861	60	31x	0	100	49,3	2,962	MUFD00000000
<i>Salinivibrio</i> sp. AR647	3.281.043	311.807	22	22x	0	100	49,3	3,002	MUFE00000000
<i>Salinivibrio</i> sp. IB560	3.492.326	111.814	65	28x	0,54	99,97	50,5	3,194	MUEM00000000
<i>Salinivibrio</i> sp. IB563	3.483.818	42.363	173	16x	0	99,97	50,5	3,276	MUEN00000000

Cepa	Tamaño del genoma (pb)	N50	Nº de contigs	Profundidad de secuenciación	% contaminación	% completo	% GC	ORFs	Nº acceso DDBJ/ENA/GenBank
<i>Salinivibrio</i> sp. IB574	3.612.537	106.472	69	9x	0	99,73	49,8	3,385	MUFN00000000
<i>Salinivibrio</i> sp. IB643	3.123.148	79.381	91	20x	0	99,82	49,4	2,898	MUFF00000000
<i>Salinivibrio</i> sp. IB868	3.440.756	206.501	30	29x	0	99,97	50,5	3,112	MUEW00000000
<i>Salinivibrio</i> sp. IB870	3.437.860	138.190	42	26x	0	99,97	50,5	3,104	MUEX00000000
<i>Salinivibrio</i> sp. IB872	3.641.359	82.702	102	11x	0	100	49,8	3,398	MUFO00000000
<i>Salinivibrio</i> sp. IC202	3.608.911	72.723	111	25x	0	99,97	50,5	3,404	MUEO00000000
<i>Salinivibrio</i> sp. IC317	3.278.261	21.208	236	8x	0,72	98,89	50,9	3,116	MUEP00000000
<i>Salinivibrio</i> sp. MA351	3.308.854	95.545	59	25x	0	100	49,3	3,000	MUFG00000000
<i>Salinivibrio</i> sp. MA421	3.535.899	94.274	70	26x	0	99,97	50,4	3,251	MUER00000000
<i>Salinivibrio</i> sp. MA427	3.263.514	9.975	513	7x	1,35	96,85	49,3	3,296	MUFH00000000
<i>Salinivibrio</i> sp. MA440	3.421.552	59.971	102	35x	0	100	49,5	3,107	MUFI00000000
<i>Salinivibrio</i> sp. MA607	3.352.168	87.592	68	26x	0	100	49,2	3,043	MUFJ00000000

Cepa	Tamaño del genoma (pb)	N50	Nº de contigs	Profundidad de secuenciación	% contaminación	% completo	% GC	ORFs	Nº acceso DDBJ/ENA/GenBank
<i>Salinivibrio</i> sp. ML198	3.433.707	163.752	44	24x	0	99,97	50,4	3,134	MUEZ00000000
<i>Salinivibrio</i> sp. ML277	3.446.273	117.752	73	31x	0	99,97	50,4	3,146	MUEL00000000
<i>Salinivibrio</i> sp. ML290	3.523.661	168.056	36	15x	0	99,97	50,2	3,224	MUEY00000000
<i>Salinivibrio</i> sp. ML318	3.361.480	65.785	96	14x	0	99,97	50,7	3,080	MUEQ00000000
<i>Salinivibrio</i> sp. ML328A	3.392.891	172.729	38	55x	0	99,97	50,5	3,124	MUEU00000000
<i>Salinivibrio</i> sp. ML331	3.545.121	128.351	60	86x	0	99,97	50,4	3,262	MUEV00000000
<i>Salinivibrio</i> sp. PR5	3.456.024	68.288	105	23x	0	99,97	49,9	3,141	MUFK00000000
<i>Salinivibrio</i> sp. PR6	3.443.918	165.099	49	28x	0	99,97	50,4	3,140	MUFA00000000
<i>Salinivibrio</i> sp. PR919	3.489.646	33.984	176	14x	0,27	100	49,9	3,269	MUFL00000000
<i>Salinivibrio</i> sp. PR932	3.497.261	90.599	74	31x	0	100	49,9	3,171	MUFM00000000

IV.8.3. Cálculo del *Average Aminoacid Nucleotide (ANI)*

En un primer enfoque filogenómico, se calcularon los valores de **ANIb** entre las cepas según la metodología de Konstantinidis y Tiedje (2005); con el fin de ratificar estos resultados; éstos se compararon con otros dos tipos de ANI; **ANIm** calculado según Rosselló-Móra y Amann (2015) y **orthoANI**, siendo éste último una mejora del ANIb (Lee y col., 2016). ANIb y ANIm son valores casi idénticos para para genomas con alto nivel de identidad (Rosselló-Móra y Amann, 2015); según este estudio, cepas de la misma especie poseen valores de ANIm superiores al 96 %; mientras que valores inferiores al 93 % corresponden a diferentes especies del mismo género. El rango de ANIm entre 93-96% implica una *fuzzy zone* donde se pueden encontrar bacterias que han sido asignadas a la misma o a diferente especie, de acuerdo con el criterio que el taxonomista seleccionó.

Tal y como se observa en la Tabla IV.19, los valores dentro de los filogrupos son siempre superiores al 95 %, valor de corte para especies estipulado por Konstantinidis y Tiedje (2005), siendo el valor más inferior 95,5 % dentro del filogrupo 4. Cuando se comparan entre si los filogrupos, los valores siempre eran inferiores al 95 % siendo el valor más alto 91 %, este valor se dio entre el aislado MA421, perteneciente al filogrupo 1, frente a las cepas IB868, ML290, PR6 y *S. siamensis* JCM 14472^T, pertenecientes al filogrupo 2. Se concluye que el **ANIb** se correlaciona con los resultados mostrados por el estudio MLSA y los estudios de hibridación ADN-ADN, en los cuales se clasificaban estas cepas en cuatro filogrupos diferentes.

Según los valores obtenidos en el **ANIm** (Tabla IV.20), esta cepas se clasifican en cuatro filogrupos diferentes, quedando aparte la especie *S. sharmensis* DSM 18182^T que no se agrupa con ninguna cepa aislada. Estos resultados se correlacionan, al igual que el ANIb, con los obtenidos en estudios previos (MLSA e hibridación ADN-ADN). Los valores eran bastante semejantes a los obtenidos mediante ANIb. El coeficiente de correlación entre ANIm y ANIb dio 0,98, valor muy cercano a 1 por lo que se concluye que existe una alta correlación entre ambos índices para este estudio.

Al igual que en los otros dos índices anteriores, los valores obtenidos con **OrthoANI** (Tabla IV.21), clasifican a estas cepas en cuatro filogrupos diferentes y dejan a la especie *S. sharmensis* DSM 18182^T aparte. Los valores son ligeramente superiores, siendo el valor intrafilogrupo más bajo del 96 %, correspondiente al filogrupo 4. Se calcularon los coeficientes de correlación con respecto a **ANIb** y a **ANIm** dando unos valores de 0,96 y 0,97 respectivamente. Observándose así, una alta correlación entre los tres tipos de índices.

De forma resumida, en la Tabla IV.22 se recogen los valores de todos los tipos de ANI pudiéndose comparar a simple vista que se respetan los cuatro filogrupos y la especie *S. sharmensis* DSM 18182^T aparte.

Tabla IV.22. Porcentajes de valores de ANI a nivel intrafilogrupo (negrita) y entre filogrupos.

ANIb	1	2	<i>S. sharmensis</i>	3	4
Filogrupo 1	97,8-100 %				
Filogrupo 2	90,4-91,0 %	97,7-100 %			
<i>S. sharmensis</i>	83,0-90,6 %	90,4-90,7%	--		
Filogrupo 3	83,0-84,2 %	82,6-83,2 %	8,8-83,2 %	97,7-100%	
Filogrupo 4	83,2-84,4 %	83,8-85,0 %	84,8-85,7 %	82,1-83,0 %	95,5-100 %

ANIm	1	2	<i>S. sharmensis</i>	3	4
Filogrupo 1	97,1-100 %				
Filogrupo 2	90,6-92,0 %	97,7-100 %			
<i>S. sharmensis</i>	90,4-91,4 %	91,4-91,6 %	--		
Filogrupo 3	83,0-86,7 %	85,1-85,7 %	85,2-85,7 %	97,7-100 %	
Filogrupo 4	83,9-87,4 %	86,8-87,7 %	87,2-87,5 %	85,1-87,5 %	95,8-100%

orthoANI	1	2	<i>S. sharmensis</i>	3	4
Filogrupo 1	97,8-100%				
Filogrupo 2	91,0-91,8 %	97,7-100 %			
<i>S. sharmensis</i>	90,7-91,2 %	90,9-91,3 %	--		
Filogrupo 3	80,0-83,0 %	81,4-82,5%	81,5-81,7 %	97,6-100 %	
Filogrupo 4	80,1-80,8 %	80,3-81,0%	86,4-87,1 %	79,1-80,4 %	95,9-100 %

Debido a que el estudio de la presente Tesis Doctoral se centra en el estudio de cepas del mismo género, el cálculo del **Average Aminoacid Identity** (AAI) era prescindible. Sin embargo, de cada uno de los filogrupos, seleccionamos una cepa tipo (AL184^T para el filogrupo 1, *S. siamensis*

JCM14472^T para el filogrupo 2, *S. costicola* subsp. *costicola* DSM 11403^T para el filogrupo 3 y *S. costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T para el filogrupo 4) y las enfrentamos entre ellas y entre la especie *Vibrio cholerae* (especies tipo del género *Vibrio*); tal y como se muestra en la Tabla IV. 23, cuando se comparan genomas cercanos, en nuestro caso cuando comparamos cepas dentro de un mismo género, los valores son superiores al 80 %, mientras que cuando se comparan cepas de diferentes géneros, éstos se encuentran en este caso cercanos al 60 %. (Rodríguez y Konstantinidis, 2014).

Tabla IV.23. Valores de AAI entre filogrupos y entre la especie *Vibrio cholerae*.

AAI	Filogrupo 1	Filogrupo 2	Filogrupo 3	Filogrupo 4
Filogrupo 1	--	--	--	--
Filogrupo 2	97,7 %	--	--	--
Filogrupo 3	89,3 %	89,7 %	--	--
Filogrupo 4	86,9 %	86,7 %	85,7 %	--
<i>Vibrio cholerae</i>	62,9 %	62,9 %	63,1 %	63,5 %

IV.8.4. Hibridación ADN-ADN *in silico*

El concepto pragmático de las especies procariontas se basa, en última instancia, en la hibridación ADN-ADN (DDH). Aunque ésta permita obtener una estimación de la similitud general entre dos cepas, esta técnica es tediosa y no se puede reproducir fácilmente entre diferentes laboratorios. Además, no puede usarse para construir incrementalmente una base de datos comparativa. (Auch y col., 2010a).

El avance tecnológico reciente en el área de la secuenciación del genoma requiere métodos bioinformáticos para reemplazar la DDH en laboratorio por la comparación del genoma *in silico*.

Gracias al programa web **GGDC**, se pueden calcular valores de hibridación ADN-ADN entre los genomas sin necesidad de experimentos en el laboratorio; **GGDC** puede utilizarse para la delineación de especies basadas en el genoma basadas en el genoma (Auch y col., 2010b; Meier-Kolthoff y col., 2013).

Se calcularon los valores de DDH *in silico* para todas las parejas de cepas a las cuales les secuenciamos el genoma. Los valores se muestran en la Tabla IV.24.

Según los valores obtenidos de la DDH *in silico*, nuestra colección de cepa se agrupan en cuatro filogrupos diferentes, marcados en diferentes colores, dejando aislada a la especie *S. sharmensis* DSM 18182^T que no ha sido asociada a ninguna cepa. El valor más bajo a nivel de intrafilogrupo lo recoge el filogrupo 4 con un valor del 70,5 %, siendo el valor de corte 70 % (Meier-Kolthoff y col., 2013). El valor más elevado a nivel de interfilogrupo es de 45,5 % y corresponden a las dos cepas *S. siamensis* JCM14472^T y *S. sharmensis* DSM 18182^T (Tabla IV.24).

De forma resumida en la Tabla IV.25 se recogen los valores de DDH *in silico* dentro de cada filogrupo y entre los filogrupos; como se observa, los valores dentro del filogrupo son siempre superiores al 70 % tal y como lo definía Meier-Kolthoff y col. (2013).

Como se puede observar, los valores de la DDH *in silico* poseen analogía con los obtenidos de los índices ANI (ANI_b, ANI_m y OrthoANI). Todos estos parámetros clasifican nuestro conjunto de cepas en cuatro filogrupos separados y la *S. sharmensis* DSM 18182^T aparte. Esto refuerza nuestra hipótesis de la existencia de cuatro filogrupos, uno de los cuales podría constituir una nueva especie y otro dentro del cual coexisten una especie y una subespecie.

Tabla IV.25. Valores de hibridación ADN-ADN *in silico* de las cepas objeto de estudio.

GGDC	1	2	<i>S. sharmensis</i>	3	4
Filogrupo 1	81,7-100 %				
Filogrupo 2	42,8-45,1 %	79,1-100 %			
<i>S. sharmensis</i>	41,6-43,0 %	42,9-45,5 %	--		
Filogrupo 3	24,5-26,3 %	23,8-2,8 %	23,9-25,1 %	80,5-100 %	
Filogrupo 4	23,2-24,5 %	23,4-24 %	23,7-24,2 %	22,1-23,8%	70,5-100 %

IV.8.5. Pangenoma del género *Salinivibrio*

Se ha argumentado que los géneros y especies bacterianas pueden describirse en términos de su **pangenoma**, es decir, la colección de todos los genes poseídos por un grupo de bacterias pertenecientes al mismo taxón (Tettelin y col., 2005). El pangenoma se define sobre la base del análisis del *cluster* de géner ortólogos (OGs) de cada genoma, y se divide en tres categorías: (i) **core-genoma** (ii) **variable-genoma** y (iii) genes únicos. En este apartado se calcularon los valores de pan y *core-genome* en base a las treinta y tres cepas de las cuales poseemos su genoma.

Por un lado, se calculó el pangenoma en base a los alineamientos nucleotídicos para el cual se lanzó un BLASTn. El valor de corte empleado fue del 70 y del 40 %, obteniéndose los mismos resultados. Éstos se encuentran recogidos en la Tabla IV.26.

Tabla IV.26. Características del pangenoma en base a alineamientos nucleotídicos.

Característica	Valor
Nº genomas	33
Pangenoma (OGs)	7098
Core-genoma (OGs)	1237
Core-genoma 90 % (OGs)	1333
Variable-genoma (OGs)	5861
Core-/pangenoma (%)	17
Media de nº OGs en un genoma	3005
Media OGs/pangenoma (5)	42
Core-genoma/media OGs	41

De forma paralela se calculó el pangenoma en base a alineamientos aminoacídicos (proteicos), para el cual se lanzó un BLASTp; el valor de corte

empleado fue del 40 %. Las características de este pangenoma se muestran en la Tabla IV.27.

Tabla IV.27. Características del pangenoma en base a alineamientos aminoacídicos.

Característica	Valor
Nº genomas	33
Pangenoma (OGs)	5305
Core-genoma (OGs)	2205
Core-genoma 90 % (OGs)	2411
Variable-genoma (OGs)	3100
Core-/pangenoma (%)	41
Media de nº OGs en un genoma	3025
Media OGs/pangenoma (5)	57
Core-genoma/media OGs	73

En este caso, el valor del core-genoma ha aumentado esto puede deberse a la mayor conservación que presentan las proteínas frente a los nucleótidos.

Como cabe esperar, a medida que aumenta el nº de genomas, el valor del pangenoma será superior ya que habrá más genes presentes, y por tanto mayor diversidad; pero el valor del core-genoma irá en descenso ya que el número de genes iguales presentes en todos los genomas será cada vez menor.

IV.8.5.1. Filogenómica del género *Salinivibrio*

Partiendo de los datos obtenidos en el apartado anterior, se calculó la filogenómica de éste género en base al core-genoma de las secuencias nucleotídicas y proteicas.

En primer lugar se realizó para las **secuencias nucleotídicas**, para ellos hemos obtenido un core-genoma de 1237, es decir, hay un conjunto de 1237 genes que están presente en los treinta y tres genomas objeto de estudio. Para ellos se elaboró un árbol filogenético que se muestra en la Figura IV.13

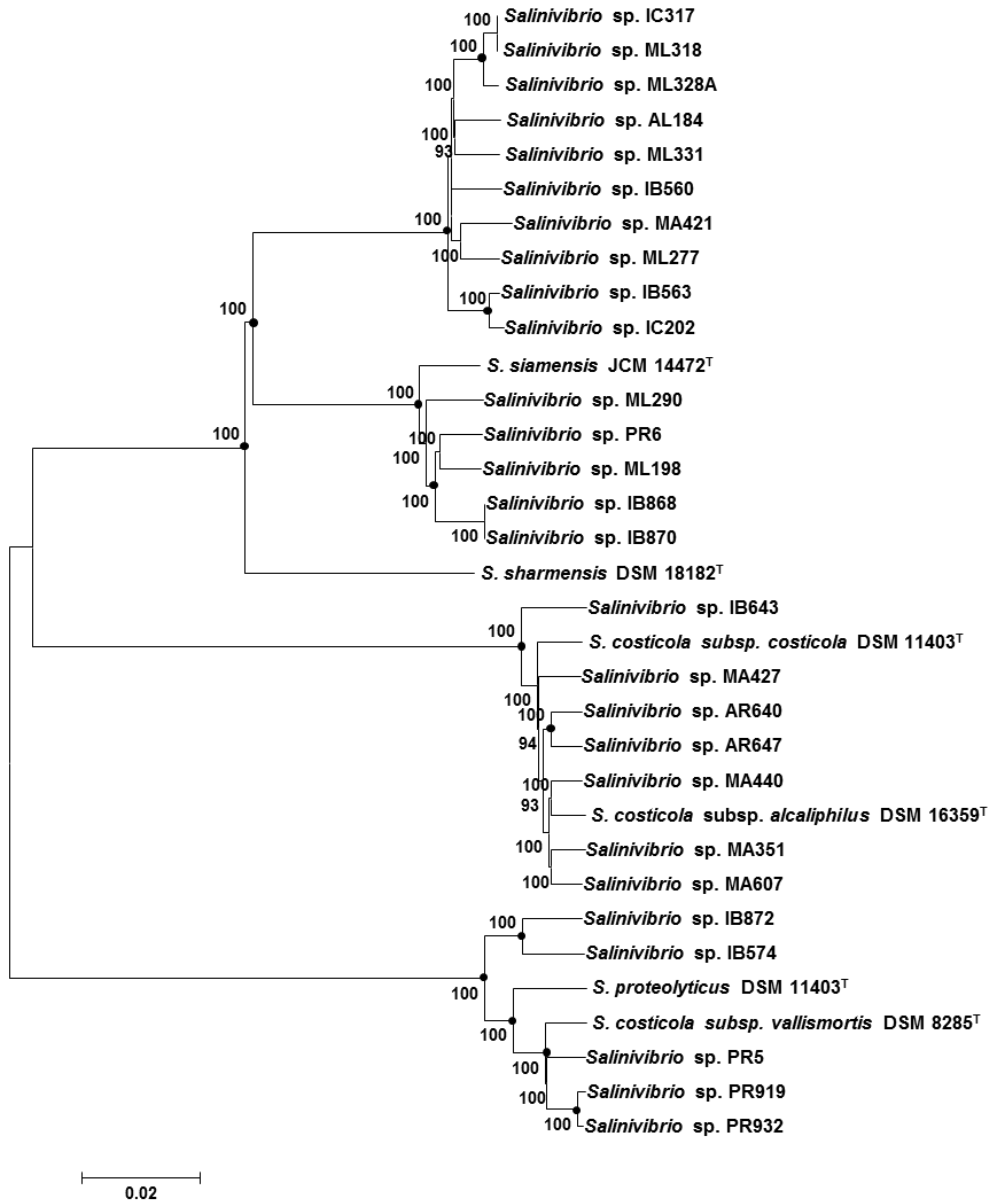


Figura IV.13. Árbol filogenético basado en el *core-genome* de las secuencias nucleotídicas de las 27 cepas aisladas y las cepas tipo del género *Salinivibrio*. Este árbol fue obtenido por el método *neighbour-joining* calculado a partir de la alineación de 1237 genes ortólogos compartidos de estos genomas. Todos los genomas fueron secuenciados en el estudio menos *S. costicola* subsp. *costicola* DSM 11403^T que fue extraído del GenBank Los círculos negros indican los nodos que se mantienen en los árboles generados utilizando los algoritmos *maximum-parsimony* y *maximum-likelihood*. En los nodos se indican los valores de bootstrap superiores al 70 %. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

Como se puede observar, en el árbol se pueden apreciar cuatro filogrupos diferentes; un primer filogrupo conformado por diez cepas *Salinivibrio* sp. AL184^T (cepa tipo del filogrupo), IB560, IB563 IC202, IC317, MA421, ML277, ML318, ML328A y ML331; las cuales han sido aisladas de diversos sitios de muestreos: Santa Pola, Alicante; Isla Bacuta e Isla Cristina, Huelva; La Malahá, Granada y Es Trenc, Mallorca. Como se puede contemplar, este filogrupo es bastante heterogéneo en cuanto a diversidad biogeográfica. Además se encuentra sustentado por un alto valor de rama (100%), así como los en la mayoría de los nodos que conforman este filogrupo. En este filogrupo no se encuentra ninguna especie ya descrita por lo que es posible que se trate de una nueva especie. Este tema se discutirá en el apartado IV.9 de Resultados y Discusión.

Un segundo filogrupo formado por seis cepas, cinco de las cuales son aisladas de diferentes salinas solares de Isla Bacuta, Huelva; Es Trenc, Mallorca y Cajo Rojo, Puerto Rico; estos aislados son *Salinivibrio* sp. IB868, IB870, ML198, ML290 y PR6; la especie que se encuentra filgenéticamente más relacionada a estas cepas es la especie *S. siamensis* JCM 14472^T. Este filogrupo se encuentra soportado por un alto valor de *bootstrap* (100 %) así como la mayoría de ramas que se encuentran dentro de este filogrupo.

De la unión de la especie *S. sharmensis* DSM 18182^T con los filogrupos primero y segundo sale un tercer filogrupo; el cual está constituido por nueve cepas, dos de las cuales son subespecies del género *Salinivibrio*, *S. costicola* subsp. *costicola* DSM 11403^T y *S. costicola* subsp. *alcaliphilus* DSM 16359^T. Las siete restantes son cepas aisladas de diferentes ambientes acuáticos hipersalinos: Aragonesas e Isla Bacuta, Huelva y La Malahá, Granada. Estas cepas son: *Salinivibrio* sp. AR640, AR647, IB643, MA351, MA427, MA440 y MA607. Este filogrupo se encuentra sustentando por un alto valor de soporte de rama (100 %), así como sus ramas internas también poseen valores de *bootstrap* bastante elevados.

Por último un cuarto filogrupo, sustentado por un alto valor de soporte de rama (100%); este filogrupo está conformado por siete cepas, cinco de las

cuales aislados de las salinas solares de Isla Bacuta, Huelva y Cabo Rojo, Puerto. Estos aislados son *Salinivibrio* sp. IB574, IB872, PR5, PR919 y PR932. Las otras cepas que conforman este filogrupo son la especie *S. proteolyticus* DSM 11403^T y la subespecie *S. costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T. Como podemos observar, una vez más, encontramos esta incongruencia donde una especie y una subespecie se encuentran asociadas en el mismo filogrupo; esta incoherencia se discutirá en el apartado IV.X. de Resultados y Discusión.

En segundo lugar se realizó el árbol filogenético en base al core-genoma pero esta vez de las **secuencias aminoacídicas**. El árbol obtenido fue bastante similar al que se produjo con las secuencias nucleotídicas (Figura IV.14); en el cual podemos diferenciar también cuatro filogrupos y un filotipo constituido por la especie *S. sharmensis* DSM 18182^T. Todos los filogrupos se encuentran sustentados por altos valores de soporte de rama (100 %). La especie *S. sharmensis* DSM 18182^T sale de la unión de los filogrupos dos primeros filogrupos como ocurría en el árbol realizado en base a las secuencias nucleotídicas. El tercer filogrupo sale de la unión de *S. sharmensis* DSM 18182^T con los filogrupos primero y segundo, y finalmente, el filogrupo cuarto, en el cual también se encuentran asociadas la especie *S. proteolyticus* DSM 11403^T y la subespecie *S. costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T.

Como acabamos de ver, ambos árboles son bastantes verosímiles, aunque en el caso en el que empleamos secuencias aminoacídicas, el número de genes implicados para realizar el árbol fue mayor, 2205 frente a los 1237 genes del core-genoma que se obtenían de las secuencias nucleótidas. Esto junto con el carácter conservador de los aminoácidos, hace que nos decantemos por el uso del segundo árbol.

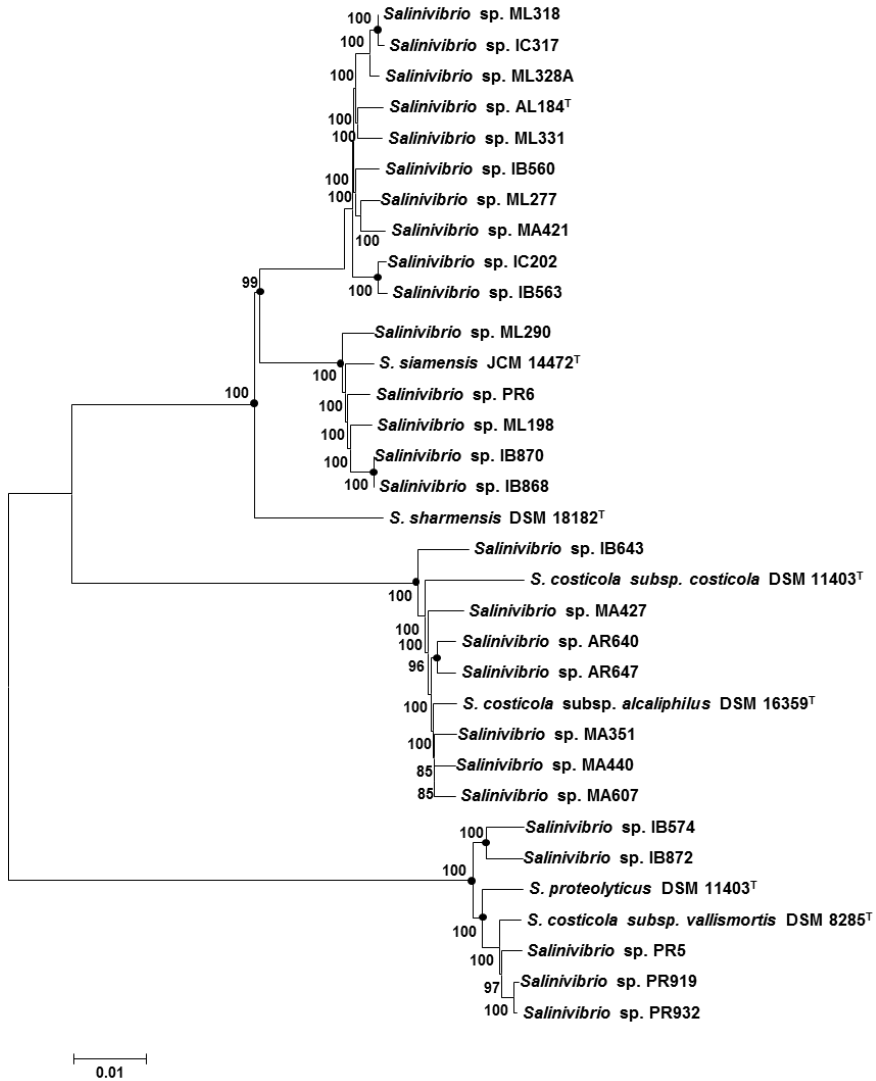


Figura IV.14. Árbol filogenético basado en el *core-genome* de las secuencias aminoacídicas de las 27 cepas aisladas y las cepas tipo del género *Salinivibrio*. Este árbol fue obtenido por el método *neighbour-joining* calculado a partir de la alineación de 2205 genes ortólogos compartidos de estos genomas. Todos los genomas fueron secuenciados en el estudio menos *S. costicola* subsp. *costicola* DSM 11403^T que fue extraído del GenBank. Los círculos negros indican los nodos que se mantienen en los árboles generados utilizando los algoritmos *maximum-parsimony* y *maximum-likelihood*. En los nodos se indican los valores de bootstrap superiores al 70 %. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

IV. 9. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DEL FILOGRUPO 1

Como se ha indicado anteriormente, un objetivo inicial de este estudio fue el aislamiento y caracterización de nuevas especies del género *Salinivibrio*. Tras haber realizado el análisis del gen ARNr 16S, un estudio MLSA completo, hibridación ADN-ADN y un estudio filogenómico con los genomas secuenciados del género *Salinivibrio*, se pudo concluir, que las cepas pertenecientes al filogrupo 1 constituían una nueva especie del género *Salinivibrio*.

Siguiendo las recomendaciones del *Ad Hoc Committee for the Re-evaluation of the Species Definition in Bacteriology* (Stackebrandt y col., 2002), la diferenciación de taxones debe estar basada en un estudio polifásico y sustentada por características fenotípicas, genotípicas y quimiotaxonómicas, además de un estudio filogenético. En este sentido, procedimos a realizar una caracterización taxonómica completa de las cepas: AL184^T, IB560, IB563, IC202, IC317, MA421, ML277, ML318, ML328A y ML331, aisladas de muestras de agua de las salinas de Santa Pola, Alicante; Isla Bacuta e Isla Cristina en Huelva; La Malahá, Granada y Es Trenc, Mallorca.

De acuerdo con el servidor EzBioCloud, las cepas AL184^T (1435 pb), IB560 (1440 pb), IB563 (1447 pb), IC202 (1478 pb), IC317 (1435 pb), MA421 (1480 pb), ML277 (1435 pb), ML318 (1479 pb), ML328A (1431 pb) y ML331 (1209 pb), estuvieron estrechamente relacionadas con *S. sharmensis* DSM 18182^T (98,2-99,6 %) y *S. costicola* subsp. *costicola* DSM 11403^T (99,0-98,1 %). La secuencia del gen ARNr 16S entre estas cepas y las de otros géneros relacionados filogenéticamente, fue inferior al 92,7%.

El porcentaje de semejanza del gen ARNr 16S entre estas diez cepas fue del 96,7 al 100 %, el valor más bajo equivale a la pareja de cepas ML328A-AL184^T. Como se puede observar en cada uno de los árboles filogenéticos obtenidos mediante los diferentes algoritmos (Figuras IV.15A, 15B, 15C), en ninguno de ellos aparecen estas diez cepas agrupadas en un solo grupo monofilético.

En el caso del árbol obtenido mediante el algoritmo de *neighbour-joining* basado en la comparación de las secuencias ARNr 16S agrupó a estas 10 cepas en dos ramas filogenéticamente distintas; por un lado las cepas AL184^T, IB560, IB563, IC202, MA421, ML277 y ML331 (marcadas en azul); y por otro lado, las cepas IC317, ML318 y ML328A (marcadas en verde); este segundo grupo con un soporte de rama superior al 70 % (Figura IV.15A).

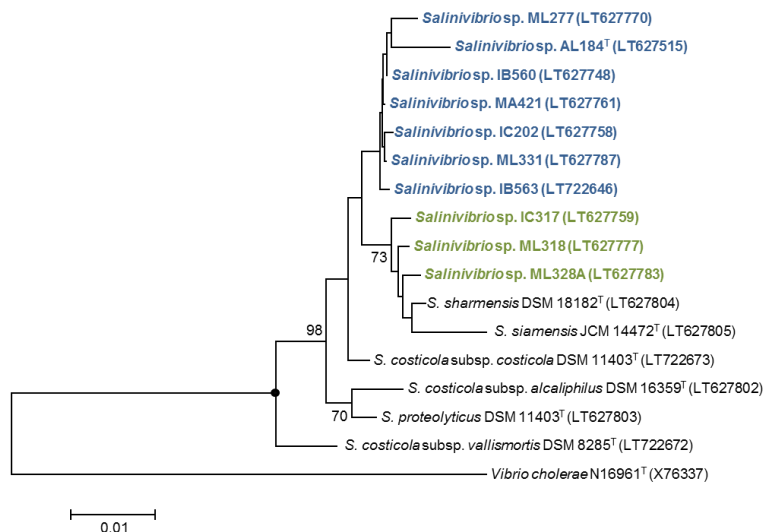


Figura IV.15A. Árbol filogenético obtenido por el método *neighbour-joining* basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas AL184^T, IB560, IB563, IC202, IC317, MA421, ML277, ML318, ML328A y ML331 y las cepas tipo del género *Salinivibrio*. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores estimados de *bootstrap* iguales o superiores al 70 %. Como *outgroup* se ha utilizado la cepa tipo de *Vibrio cholerae* N16961^T. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

Según los árboles filogenéticos obtenidos mediante los algoritmos *maximum-likelihood* y *maximum-parsimony* aparecen estas diez cepas (marcadas en negrita en el árbol) dentro del mismo filogrupo pero también se incluye la especie *S. siamensis* JCM 14472^T; por lo que, según este árbol, este grupo de cepas no conformaría una especie nueva (Figuras IV.15B, IV.15C).



Figura IV.15B. Árbol filogenético obtenido por el método *maximum-likelihood* basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas AL184^T, IB560, IB563, IC202, IC317, MA421, ML277, ML318, ML328A y ML331 y las cepas tipo del género *Salinivibrio*. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores estimados de *bootstrap* iguales o superiores al 70 %. Como *outgroup* se ha utilizado la cepa tipo de *Vibrio cholerae* N16961^T. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

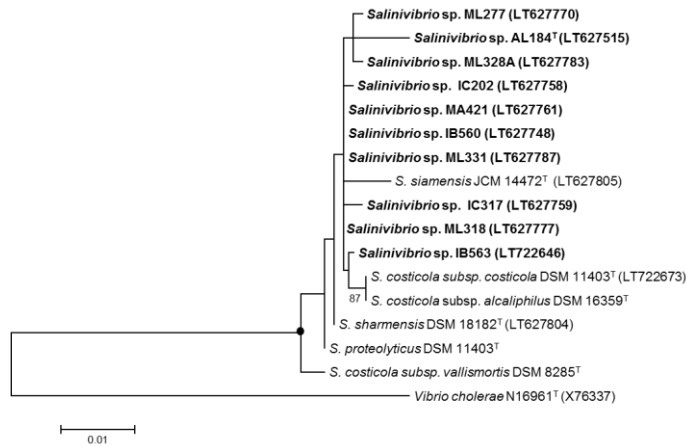


Figura IV.15C. Árbol filogenético obtenido por el método *maximum-parsimony* basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas AL184^T, IB560, IB563, IC202, IC317, MA421, ML277, ML318, ML328A y ML331 y las cepas tipo del género *Salinivibrio*. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores estimados de *bootstrap* iguales o superiores al 70 %. Como *outgroup* se ha utilizado la cepa tipo de *Vibrio cholerae* N16961^T. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

Como ya hemos puesto de manifiesto en el apartado VI.2.1.2, el gen ARNr 16S ha mostrado no ser un marcador filogenético útil para el género *Salinivibrio*, debido a la baja tasa de evolución y a la estrecha relación que existe entre las distintas especies de este género; por lo que se ha llevado a cabo un estudio filogenético basado en un análisis por secuenciación multilócica (MLSA), para el cual se emplearon los cuatro genes conservados anteriormente mencionados en el apartado VI.2.1.2: *gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD*. Los análisis de las secuencias concatenadas de los cuatro genes resultaron ser especialmente útiles en el análisis filogenético debido a que las topologías obtenidas por los tres métodos de construcción de los arboles fueron muy similares y estables. La secuencia concatenada de los genes *gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD* puso de manifiesto que las diez cepas se agrupaban formando un *cluster* independiente (Figura IV.16), relacionadas filogenéticamente con el género *Salinivibrio*. Es decir, que tanto los arboles filogenéticos basados en el análisis de los genes individuales como el concatenado, muestran que estos diez aislados no son miembros de ninguna de las especies hasta ahora descritas del género *Salinivibrio*.

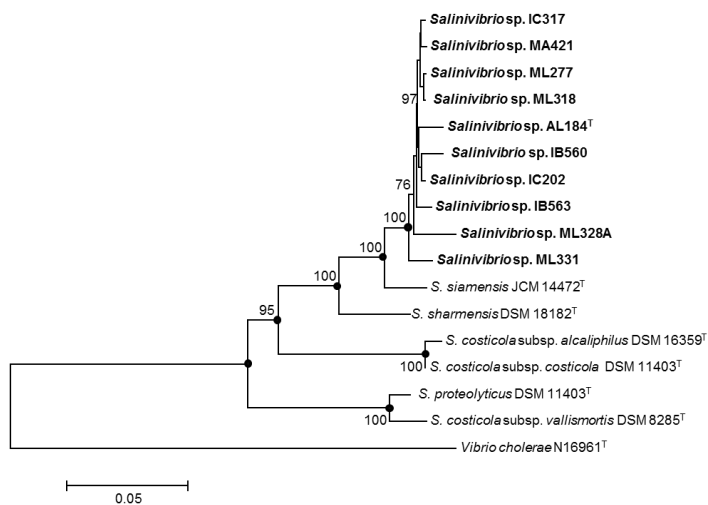


Figura IV.16. Árbol filogenético basado en la comparación de la secuencia concatenada de los genes *gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD* obtenido por el método *neighbour-joining* en el que se muestra la posición filogenética de cepas AL184^T, IB560, IB563, IC202, IC317, MA421, ML277, ML318, ML328A y ML331 y las cepas tipo del género *Salinivibrio*. Los círculos negros indican los nodos que se mantienen en los árboles generados utilizando los algoritmos *maximum-parsimony* y *maximum-likelihood*. En los nodos se indican los valores de bootstrap superiores al 70 %. Como *outgroup* se ha utilizado la cepa tipo de *Vibrio cholerae* N16961^T. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

Con respecto a la caracterización genotípica se realizaron estudios de hibridación ADN-ADN entre la cepa tipo del filogrupo, la AL184^T, y el resto de cepas de este filogrupo, y las especies descritas del género *Salinivibrio*. El porcentaje de hibridación ADN-ADN entre AL184^T y el resto de cepas del mismo filogrupo osciló entre el 74 y el 100 %, valor superior al 70 % considerado actualmente como límite para la definición de nuevas especies (Stackebrandt y col., 1994; 2002). Los valores de hibridación ADN-ADN entre la cepa AL184^T y las especies *S. costicola* subsp. *costicola* DSM 11403^T, *S. costicola* subsp. *alcaliphilus* DSM 16359^T, *S. costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T, *S. proteolyticus* DSM 11403^T, *S. sharmensis* DSM 18182^T y *S. siamensis* JCM 14472^T fue 17, 28, 44, 21, 8 y 47 %, respectivamente. Estos resultados nos permitieron concluir que estos aislados constituían un nuevo taxón (Stackebrandt y col., 1994; 2002).

El contenido en G+C del ADN determinado para las cepas AL184^T, IB560, IB563, IC202, IC317, MA421, ML277, ML318, ML328A y ML331 es de 52.5, 52.5, 51.9, 51.9, 51.9, 51.9, 52.5, 52.5, 51.9, 52.5 y 51,9 mol%, respectivamente. Estos rangos se encuentran cercanos a los descritos para las especies del género *Salinivibrio* (49,0-51,0 mol%) (Romano y col., 2011).

En la Tabla IV.28 se muestran las principales características fenotípicas y genotípicas diferenciales de diez cepas pertenecientes al filogrupo 1; mientras que en la Tabla IV.29 se recogen las principales características que diferencian a la cepa AL184^T con las especies descritas del género *Salinivibrio*.

Como se puede observar algunas de las pruebas llevadas a cabo en las cepas que conforman este filogrupo, mostraron una respuesta semejante, sin embargo, también presentaron varias diferencias con respecto al rango salino, de temperatura y de pH, así como en la reducción de nitratos, producción de indol, citrato de Simmons, fenilalanina desaminada. En cuanto a la producción de ácidos e utilización de sustratos también se mostró bastante variedad en los resultados entre estas cepas a pesar de conformar el mismo filogrupo.

Tabla IV.28. Características diferenciales entre las cepas *Salinivibrio* sp. AL184^T, IB560, IB563, IC202, IC317, MA421, ML277, ML318, ML328A y ML331.

Todas las cepas mostraron una pigmentación color crema y forma de bacilos curvados móviles. El óptimo de NaCl es de 7,5 % p/v; el óptimo de temperatura es de 37 °C y el óptimo de pH se encuentra entre 7,2-7.4. Todas las cepas crecían en condiciones de anaerobiosis. Todas dieron resultado positivo para las pruebas de la catalasa, oxidasa, hidrólisis de ADN, fosfatasa y Voges-Proskauer, así como para la producción de ácidos a partir de fructosa, maltosa y D-trehalosa; en cuanto a la utilización de sustratos, dieron positivas la fructosa, maltosa y D-trehalosa. Todas las cepas dieron negativo en la hidrólisis del Tween 80 y rojo metilo; no producía ácidos a partir de esculina, rafinosa y D-xilosa. Todos los datos son de este estudio; +: positivo; -: negativo.

Características	AL184^T	IB560	IB563	IC202	IC317	MA421	ML277	ML318	ML328A	ML331
Rango NaCl (% p/v)	2-20	2-20	2-20	3-19	2-20	2-20	3-19	3-20	4-20	4-19
Rango temperatura (°C)	17-48	20-48	17-47	18-48	17-49	17-47	19-48	20-47	19-48	19-47
Rango pH	5-10	5-9	5-9	5-10	5-10	5-10	5-10	5-10	5-10	5-10
Reducción de nitratos	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Reducción de nitritos	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Hidrólisis de:										
Esculina	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Caseína	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Gelatina	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-

Características	AL184 ^T	IB560	IB563	IC202	IC317	MA421	ML277	ML318	ML328A	ML331
Almidón	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Producción de indol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Citrato de Simmons	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
Fenilalanina desaminasa	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+
Producción de ácidos:										
D-Arabinosa	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
D-Galactosa	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Glicerol	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
D-Glucosa	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Manitol	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Manosa	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Ribosa	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+

Características	AL184 ^T	IB560	IB563	IC202	IC317	MA421	ML277	ML318	ML328A	ML331
Glutamina	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Metionina	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Lisina	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
Isoleucina	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
Valina	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Contenido en G + C del ADN (<i>Tm</i>) (mol%)	52,5	52,5	51,9	51,9	51,9	52,5	52,5	51,9	52,5	51,9
Contenido en G + C del ADN (genoma) (%)	50,2	50,5	50,5	50,5	50,9	50,4	50,4	50,7	50,5	50,4

..... IV.Resultados y Discusión

Tabla IV.29. Características diferenciales entre la cepa AL184^T y las especies descritas del género *Salinivibrio*.

Todas las cepas mostraron una pigmentación color crema y forma de bacilos curvados móviles. El óptimo de NaCl es de 7,5 % p/v; el óptimo de temperatura es de 37 °C y el óptimo de pH se encuentra entre 7,2-7,4. Todas las cepas crecían en condiciones de anaerobiosis. Todas dieron resultado positivo para las pruebas de la catalasa, oxidasa, hidrólisis de ADN. Voges-Proskauer y fosfatasa; en cuanto a la utilización de sustratos dieron positivo la lactosa, rafinosa, ribosa, D-trehalsal y D-xilosa. Todas dieron resultado negativo para la producción de indol, citrato de Simmons y rojo de metilo, y no producían ácidos a partir de la D-arabinosa, lactosa, rafinosa y xilosa. Todos los datos provienen de este estudio. Cepas: 1, AL184^T; 2, *S. sharmensis* DSM 18182^T; 3, *S. siamensis* JCM 14472^T; 4, *S. proteolyticus*; 5, *S. costicola* subsp. *alcaliphilus* DSM 16359^T; 6, *S. costicola* subsp. *costicola* DSM 11403^T; 7, *S. costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T.

Características	1	2	3	4	5	6	7
Rango NaCl (% p/v)	2- 20	3-20	2-19	2-20	3-20	2-20	4-21
Rango temperatura (°C)	17-48	19-46 ^a	18-47 ^b	18-47 ^c	18-48 ^d	19-46 ^e	19-49 ^f
Rango pH	5-10	6-10 ^g	5-10 ^h	5-10 ⁱ	5-9	5-10 ^k	5-10 ^l
Reducción de nitratos	+	+	+	+	+	-	-
Reducción de nitritos	-	-	-	+	+	-	-
Hidrólisis de:							
Esculina	-	-	-	-	+	-	-
Caseína	+	-	+	+	-	+	+
Gelatina	+	+	+	+	-	+	+
Almidón	-	+	-	+	-	-	-
Tween 80	-	-	+	-	-	-	+
Fenilalanina desaminasa	+	-	+	-	+	-	-
Producción de ácidos:							
D-Galactosa	-	-	-	-	+	-	-
Glicerol	+	-	+	-	-	-	+

Características	1	2	3	4	5	6	7
Manitol	+	-	+	+	+	+	+
Manosa	+	+	+	-	-	-	-
Ribosa	+	+	+	+	-	-	+
Utilización de:							
D-Arabinosa	-	+	+	-	+	+	-
Fructosa	-	-	-	-	-	+	-
D-Galactosa	-	+	-	+	+	+	+
D-Glucosa	+	+	-	+	+	+	+
D-Maltosa	+	+	-	+	+	+	+
Manosa	+	+	+	+	+	+	-
Sacarosa	+	-	-	+	+	+	+
Alanina	+	+	+	-	+	+	-
Contenido en G + C del ADN (<i>Tm</i>) (mol%)	52,5	51,9	51,9	51,9	51,9	52,5	51,9
Contenido en G + C del ADN (genoma) (%)	50,2	50,4	50,3	49,8	49,1	49,2	49,7

^a El rango de temperatura oscila entre 25 y 40 °C según Romano y col. (2011).

^b El rango de temperatura oscila entre 10 y 47 °C según Chamroensaksri y col. (2009).

^c El rango de temperatura oscila entre 10 y 45 °C según Amoozegar y col. (2008).

^d El rango de temperatura oscila entre 10 y 40 °C según Romano y col. (2005).

^e El rango de temperatura oscila entre 5 y 45 °C según Mellado y col. (1996).

^f El rango de temperatura oscila entre 5 y 50 °C según Huang y col. (2000).

^g El rango de pH oscila entre 6 y 10 según Romano y col. (2011).

^h El rango de pH oscila entre 5 y 9 según Chamroensaksri y col. (2009).

..... IV.Resultados y Discusión

ⁱ El rango de pH oscila entre 5 y 9.5 según Amoozegar y col. (2008).

^j El rango de pH oscila entre 7 y 10.5 según Romano y col. (2005).

^k El rango de pH oscila entre 5 y 10 según Mellado y col. (1996).

^l El rango de pH oscila entre 5 y 10 según Huang y col. (2000).

Como se ha podido observar, algunas de las características se encuentran igual para todo los miembros del género *Salinivibrio*, tales como oxidasa y catalasa positiva, utilización de la vía butanodiólica para fermentar la glucosa; utilización de bastantes carbohidratos como fuente de carbono y energía: lactosa, rafinosa, ribosa y D-trehalosa y D-xilosa; sin embargo, también se encontraron diferencias en los rangos salinos, de temperatura y de pH; los cuales no coincidieron con los descritos previamente, diferencias también en la producción de ácidos a partir de carbohidratos o incluso en la utilización de algunos sustratos.

El perfil de ácidos grasos de la cepa tipo AL184^T se determinó mediante cromatografía de gases con el Sistema de Identificación Microbiana MIDI usando el método TSBA6 (MIDI, 2008). Para obtener dicho perfil, las células se cultivaron en el medio 1 descrito anteriormente en el apartado III.1.2 de Material y Métodos, a 37 °C durante 48 h de incubación. Los ácidos grasos predominantes en la cepa AL184^T fueron C_{16:0} y C_{18:1} (Tabla IV.30). En estudios recientes realizados en el género *Vibrio* los ácidos grasos predominantes son C_{16:0} y C_{18:1} (Doi y col., 2017, Paek y col., 2017), por lo que nuestros datos coinciden con los descritos previamente.

Ya que disponíamos de los genomas secuenciados de estas diez cepas así como de las especies descritas del género *Salinivibrio*, los utilizamos para completar los datos de este estudio. Las principales características de estos genomas se recogen en la Tabla IV.18 del apartado VI.8.2. de Resultados y Discusión.

Tabla IV.30. Contenido de ácidos grasos celulares de la cepa AL184^T y las especies más estrechamente relacionadas con el género *Salinivibrio*.

Cepas; 1, AL184^T 2, *S. sharmensis* DSM 18182^T; 3, *S. siamensis* JCM 14472^T; 4, *S. proteolyticus*; 5, *S. costicola* subsp. *alcaliphilus* DSM 16359^T; 6, *S. costicola* subsp. *costicola* DSM 11403^T; 7, *S. costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T. Todos los datos fueron realizados en este estudio menos los indicados con un asterisco. Todos se han obtenido en las mismas condiciones de crecimiento, indicado en el apartado de Material y Métodos. Los valores se muestran en porcentaje total. *Datos tomados del trabajo de Romano y col. (2011).

Ácido graso (%)	1	2*	3*	4*	5*	6*	7*
C _{12:0}	3,5	3,1	12,7	6,7	10,5	7,6	10,8
C _{14:0}	2,1	4,7	9,8	7,1	2,8	3,7	7,8
C _{16:0}	23,7	54,0	29,2	21,6	27,8	19,8	18,7
C _{18:0}	2,6	1,8	1,9	3,1	7,9	2,7	2,4
C _{18:1}	14,2	9,1	14,5	33,7	12,7	31,2	28,6

Mediante el programa **GGDC** (Meier-Kolthoff, y col., 2013), se calcularon los valores de hibridación ADN-ADN *in silico* (DDH) entre las diez cepas pertenecientes al mismo filogruppo, obteniéndose un rango que osciló entre el 80 y el 100 % (Tabla IV.31) Según Thompson y col. (2013), las cepas de la misma especie comparten un valor de hibridación ADN-ADN *in silico* del 70 % o superior, esto confirma que la posición taxonómica de estas cepas constituye una especie separada a las descritas. Por otro lado, cuando se comparan estas cepas con el resto de especies tipo del género *Salinivibrio*, el valor siempre es inferior al 70 % (Tabla IV.31). Estos datos concuerdan con los datos obtenidos en la hibridación ADN-ADN experimental.

Según la metodología descrita por Konstantinidis y Tiedje (2005) y Lee y col., (2016) se calcularon los valores de **ANI_b** y **orthoANI**, respectivamente (Tabla IV.32). Para ambos índices, los rangos entre las cepas del mismo filogruppo dieron valores superiores al 95-96 % (97,7-100 % tanto para ANI_b como OrthoANI) valor propuesto por Richter y Roselló-Móra (2009) para la circunscripción a nivel de especie.

Tabla IV.31. Resultados de los cálculos del GGDC (%) entre los genomas de las diez cepas y las especies descritas del género *Salinivibrio*.

Cepa	AL184 ^T										
<i>Salinivibrio</i> sp. AL184 ^T	100	IB560									
<i>Salinivibrio</i> sp IB560	84,7	100	IB563								
<i>Salinivibrio</i> sp IB563	83,3	81,9	100	IC202							
<i>Salinivibrio</i> sp IC202	85,4	81,7	95,6	100	IC317						
<i>Salinivibrio</i> sp IC317	85,8	85,0	83,4	83,0	100	MA421					
<i>Salinivibrio</i> sp MA421	83,0	82,4	80,3	80,0	83,1	100	ML277				
<i>Salinivibrio</i> sp ML277	85,0	84,5	82,4	82,1	83,5	86,7	100	ML318			
<i>Salinivibrio</i> sp ML318	86,0	85,0	83,3	83,1	99,7	83,1	85,4	100	ML328A		
<i>Salinivibrio</i> sp ML328A	86,0	87,50	83,7	83,2	95,7	83,8	85,2	95,9	100	ML331	
<i>Salinivibrio</i> sp ML331	85,7	84,0	83,2	82,3	85,3	81,8	84,3	85,50	85,1	100	
<i>S. sharmensis</i> DSM 18182 ^T	42,7	42,9	42,6	42,6	42,9	43,0	43,0	42,9	42,8	42,8	
<i>S. siamensis</i> JCM 14472 ^T	44,5	44,8	44,6	44,6	44,6	45,0	44,8	44,6	44,5	44,6	
<i>S. proteolyticus</i> DSM 11403 ^T	23,6	23,5	23,6	23,6	24,0	23,5	23,4	23,6	23,5	23,6	
<i>S. costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359 ^T	24,5	24,5	24,9	24,8	24,7	24,7	24,6	24,5	24,5	24,4	
<i>S. costicola</i> subsp. <i>costicola</i> DSM 11403 ^T	24,5	24,6	25,1	25,1	24,8	24,8	24,6	24,6	24,6	24,6	
<i>S. costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285 ^T	23,7	23,5	23,5	23,5	24,0	23,4	23,3	23,6	23,5	23,7	

Tabla IV.32. Porcentajes de valores de ANiB y OrthoANI entre los genomas de las diez cepas y las cepas descritas del género *Salinivibrio*.

Los valores de OrthoANI se muestran entre paréntesis. El valor del 100 % es igual para ambos índices.

Cepa	AL184 ^T	IB560	IB563	IC202	IC317	MA421	ML277	ML318	ML328A	ML331
<i>Salinivibrio</i> sp. AL184 ^T	100									
<i>Salinivibrio</i> sp IB560	98,2 (98,4)	100								
<i>Salinivibrio</i> sp IB563	98,2 (98,2)	98,0 (98,1)	100							
<i>Salinivibrio</i> sp IC202	98,1 (98,2)	98,0 (98,0)	99,5 (99,4)	100						
<i>Salinivibrio</i> sp IC317	98,4 (98,4)	98,3 (98,3)	98,2 (98,2)	98,1 (98,2)	100					
<i>Salinivibrio</i> sp MA421	98,0 (98,1)	98,1 (98,1)	97,7 (97,8)	97,8 (97,8)	98,0 (98,1)	100				
<i>Salinivibrio</i> sp ML277	98,3 (98,3)	98,3 (98,3)	98,1 (98,1)	98,1 (98,1)	98,2 (98,3)	98,4 (98,5)	100			
<i>Salinivibrio</i> sp ML318	98,4 (98,4)	98,3 (98,4)	98,0 (98,2)	98,1 (98,1)	99,9 (99,9)	98,3 (98,2)	98,3 (98,4)	100		
<i>Salinivibrio</i> sp ML328A	98,3 (97,7)	98,4 (98,2)	98,3 (98,2)	98,4 (98,2)	99,5 (99,4)	98,2 (98,1)	98,2 (98,3)	98,1 (98,2)	100	
<i>Salinivibrio</i> sp ML331	98,3 (98,3)	98,1 (98,2)	98,1 (98,1)	98,0 (98,0)	98,1 (98,4)	97,8 (97,9)	98,1 (98,2)	98,3 (98,3)	98,3 (98,3)	100
<i>S. sharmensis</i> DSM 18182 ^T	90,6 (91,1)	90,4 (91,1)	90,4 (91,0)	90,3 (90,9)	90,9 (91,3)	90,4 (91,0)	90,8 (91,2)	90,4 (91,1)	90,5(91,0)	90,4 (91,1)
<i>S. siamensis</i> JCM 14472 ^T	90,8 (91,6)	90,8 (91,8)	91,0 (91,6)	90,9 (91,6)	90,7 (91,6)	91,0 (91,8)	90,3 (91,7)	90,7 (91,6)	90,9 (91,5)	90,9 (91,5)
<i>S. proteolyticus</i> DSM 11403 ^T	83,9 (80,7)	84,0 (80,5)	84,0 (80,4)	83,9 (80,5)	84,0 (80,6)	84,0 (80,5)	84,0 (80,4)	84,0 (80,5)	84,0 (80,6)	83,9 (80,8)
<i>S. costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359 ^T	83,0 (81,9)	83,3 (81,9)	84,1 (82,0)	83,3 (91,9)	83,0 (81,9)	83,3 (81,9)	83,3 (81,9)	83,0 (81,8)	83,1 (81,8)	83,0(82,0)
<i>S. costicola</i> subsp. <i>costicola</i> DSM 11403 ^T	83,0 (81,8)	82,9 (81,7)	83,9 (82,2)	83,2 (82,0)	83,0 (81,8)	83,3 (81,8)	83,3 (81,9)	83,0 (81,8)	82,9 (82,0)	83,0 (81,8)
<i>S. cost.</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285 ^T	84,05 (80,4)	83,8 (80,5)	83,5(80,5)	83,9 (80,2)	84,0(80,6)	83,8 (80,5)	84,0 (80,5)	83,8 (80,5)	84,0 (80,3)	84,0 (80,6)

IV.Resultados y Discusión

Cuando estas cepas fueron comparadas con el resto de especies descritas, el valor siempre fue inferior a 95 %, apoyando así, la propuesta de una nueva especie. Tal y como se esperaba, los valores de orthoANI son ligeramente superiores a los de ANIb (Lee y col., 2016).

Con el objetivo de cerciorar si efectivamente estas cepas pudiesen constituir una especie nueva, se estudió también su pangenoma. El conjunto de todos

los genes presentes en las diez cepas así como las especies tipo del género *Salinivibrio* proporcionó un pangenoma formado por 6041 genes; de los cuales 1230 estaban presentes en todas las cepas (*core-orthologs*). Con este valor de core-genoma se llevó a cabo una reconstrucción filogenética basada en la concatenación de todos los genes ortólogos presentes en todos los genomas, observándose que estas diez cepas conformaban un solo filogrupo separada del resto de especies descritas del género *Salinivibrio* (Figura IV.17).

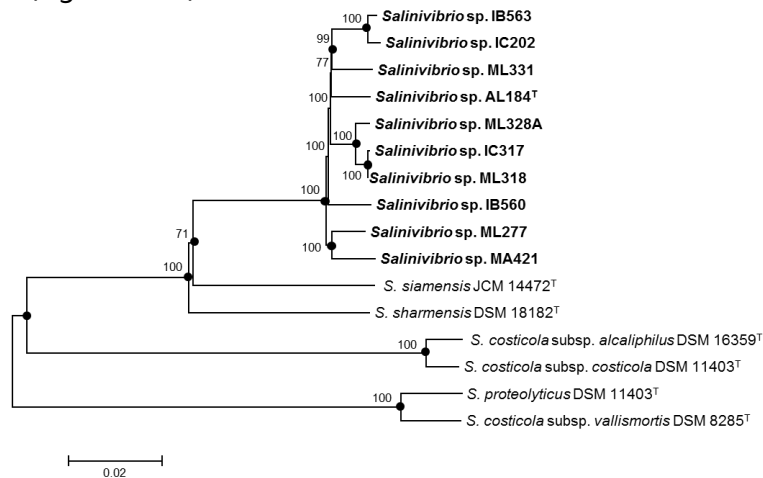


Figura IV.17. Árbol filogenético basado en el *core-genome* de las cepas AL184^T, IB560, IB563, IC202, IC317, MA421, ML277, ML318, ML328A y ML331 y las cepas tipo del género *Salinivibrio*. Este árbol fue obtenido por el método *neighbour-joining* calculado a partir de la alineación de 1230 genes ortólogos compartidos de estos genomas. Todos los genomas fueron secuenciados en el estudio menos *S. costicola* subsp. *costicola* DSM 11403^T que fue extraído del GenBank Los círculos negros indican los nodos que se mantienen en los árboles generados utilizando los algoritmos *maximum-parsimony* y *maximum-likelihood*. En los nodos se indican los valores de bootstrap superiores al 70 %. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido

Tal y como se había estudiado en el apartado X de Resultados y Discusión; aquí también se elaboró un gráfico donde se mostrase los diez subsistemas más representados en este filogrupo (Figura IV.18); siendo los genes involucrados en la síntesis y regulación flagelar los más abundantes, esto puede deberse a la motilidad que presentan las cepas de este género, gracias al flagelo polar que poseen en uno de sus extremos polares.

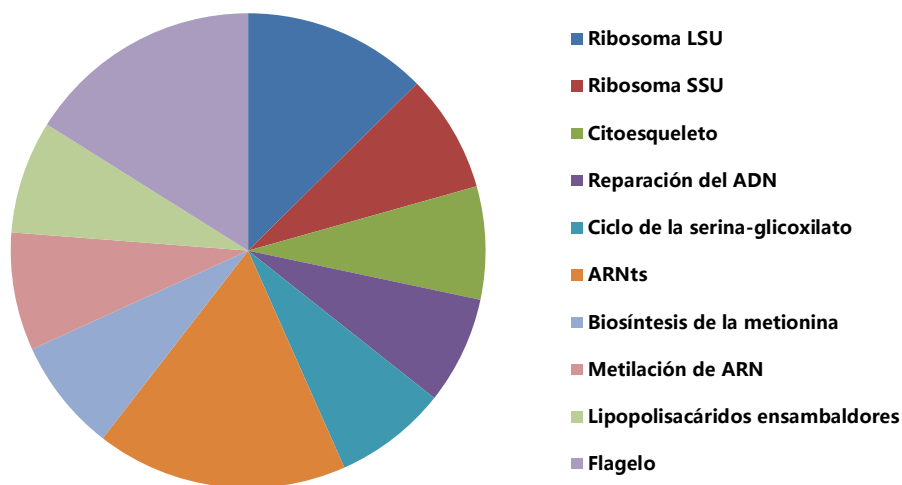


Figura IV.18. Representación de los 10 subsistemas más característicos de los genomas objeto de estudio.

Los datos filogenéticos basados en el gen ARNr 16S, el estudio MLSA y de los genomas juntos a los resultados obtenidos en la caracterización genotípica, fenotípica y quimiotaxonómica, demuestran claramente que las cepas AL184^T, IB560, IB563, IC202, IC317, MA421, ML277, ML318, ML328A y ML331 constituyen una nueva especie, dentro del género *Salinivibrio*, para la cual proponemos el nombre de *Salinivibrio kushneri* sp. nov.

IV. 9.1. Descripción de *Salinivibrio kushneri* sp. nov.

Salinivibrio kushneri (kush'ner.i. N.L. gen. n. de Kushner, en honor al profesor Donn J. Kushner, por su contribución a la microbiología y su trabajo pionero con bacterias halófilas).

..... IV.Resultados y Discusión

Las células son bacilos ligeramente curvados Gram-negativos, móviles, con un tamaño de 0,5 x 2,5-3,2 μm ; no forman ningún tipo de agrupación celular. No producen endosporas. Las colonias son circulares, de borde entero, convexas, color crema y con un diámetro de 0,9-2,1 mm en medio SW 7,5 tras 24-48 h de incubación a 37 °C. Anaerobios facultativos. Halófilos moderados. No crecen en ausencia NaCl, crecen en medio son concentración de 4 a 19 % (p/v) NaCl con el óptimo de crecimiento a 7,5 % (p/v) NaCl. El rango de temperatura en el que presenta crecimiento es de 17 a 49 °C, con un crecimiento óptimo a 37 °C. El rango de pH para crecer es de 5 a 10, con el óptimo a pH entre 7,2-7,4. Catalasa, oxidasa y fosfatasa positivas. Voges-Proskauer positivo. Reduce el nitrato a nitrito. Hidroliza el ADN pero no el Tween 80. La producción de indol es negativa para la gran mayoría. Produce ácidos a partir de fructosa, D-maltosa y D-trehalosa, pero no de esculina, lactosa, rafinosa y D-xilosa. Producen ácidos en la mayoría de los casos a partir de D-glucosa y ribosa. Los siguientes compuestos son utilizados como única fuente de carbono y energía: ribosa y sacarosa. La alanina es utilizada como única fuente de carbono, nitrógeno y energía. La utilización de D-trehalosa, glutamina es positiva para la gran mayoría. Los ácidos grasos predominantes son C_{16:0} y C_{18:1}. El contenido en G+C del ADN es 50,2-50,9 % (genoma) y 51,9-54,0 mol %

La cepa tipo es AL184^T (=CECT 9177^T =LMG 29817^T), aislada de una muestra de agua de las salinas de Bras del Port, Santa Pola (Alicante). El contenido en G+C del ADN de la cepa tipo es 50,2 % (genoma) y 52.5 moles% (T_m). Los aislados IB560, IB563, IC202, IC317, MA421, ML277, ML318, ML328A y ML331 son cepas adicionales a la especie. El número de acceso de GenBank/DDBJ/EMBL para el ARNr 16S de la cepa tipo es LT627515.

IV.10. SINONIMIA DE ESPECIES: *S. proteolyticus* y *S. costicola* subsp. *vallismortis*

En el año 2000, Huang y col., aislaron la cepa DV^T de un estanque hipersalino localizado en Valle de la Muerte, EE.UU. Tras un análisis del gen ARNr 16S y la realización de un estudio de hibridación ADN-ADN con la especie tipo del género (*Salinivibrio costicola* subsp. *costicola*), se obtuvieron valores del 97,7 % y 93 % respectivamente; pensándose por tanto que se trataría de la misma especie: sin embargo características fenotípicas tales como la halotolerancia, producción de gas, el espectro de utilización de azúcares y algunas diferencias filogenéticas hicieron pensar que la cepa DV^T se trataba de una subespecie de *Salinivibrio costicola*, a la que denominaron *Salinivibrio costicola* subsp. *vallismortis*, enmendando por tanto la especie tipo del género a *Salinivibrio costicola* subsp. *costicola*.

Amoozegar y col. (2008) aislaron una cepa designada como AF-2004^T del lago Bakhtegan, lago hipersalino localizado en Iran. Análisis basados en el ARNr 16S mostraron que poseía un porcentaje de semejanza del 99, 97 y 96, 8 % con las especies *S. costicola* subsp. *vallismortis*, con *S. costicola* subsp. *costicola* y *S. costicola* subsp. *alcaliphilus*, respectivamente. El estudio de hibridación ADN-ADN indicó un valor del 10,1 % frente a la especie tipo *S. costicola* subsp. *costicola*, pero no se realizaron frente a más especies del género *Salinivibrio*. Según Wayne y col. (1987), un valor por debajo del 70 % en hibridaciones ADN-ADN se considera que se tratan de dos especies diferentes; por lo que se propuso a la cepa AF-2004^T como nueva especie del género *Salinivibrio*; y se le asignó el nombre del *Salinivibrio proteolyticus*.

Como ya se ha comentado, el género *Salinivibrio* se compone de cuatro especies una de ellas con tres subespecies (Romano y col., 2011); como cabría esperar, estas tres subespecies debería agruparse en el árbol filogenético conformando un grupo monofiletico, pero tal y como se observa en la Figura IV.19, estas tres subespecies no se encuentran formando un solo grupo; por un lado aparece *S. costicola* subsp. *costicola* asociada con *S. costicola* subsp. *alcaliphilus* (marcado en color azul en la Figura IV.19); mientras que *S. costicola* subsp. *vallismortis*, aparece en otro cluster agrupada con la especie *S. proteolyticus* (marcado en color verde de la

IV.Resultados y Discusión

Figura IV.19) por lo que parece claro que la clasificación de éste género necesita una reevaluación. Esta idea se ve apoyada por estudios previos realizados en el género *Salinivibrio* en los cuales se observó esta misma incongruencia (Chamroensaksri y col., 2009; Amoozegar y col., 2008, Romano y col., 2011; Gorriti y col., 2014). Esta misma idea ya se planteó en el apartado IV.2.1 de Resultados y Discusión.

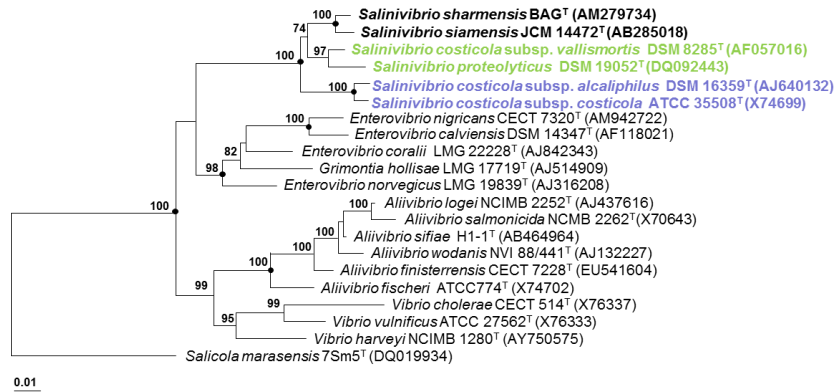


Figura IV.19. Árbol filogenético obtenido por el método *neighbour-joining* basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas tipo del género *Salinivibrio* y otros miembros de la familia *Vibrionaceae*. Los círculos negros indican los nodos que se mantienen en los árboles generados utilizando los algoritmos *maximum-parsimony* y *maximum-likelihood*. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores estimados de *bootstrap* iguales o superiores al 70 %. Como *outgroup* se ha utilizado la cepa tipo de *Salicola marasensis* 7Sm5^T. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

Inicialmente, llevamos a cabo un análisis del gen ARNr 16S de las especies descritas del género *Salinivibrio* así como un grupo de cinco cepas aisladas que, según el estudio MLSA realizado en el apartado IV.2.2, se encontraban relacionadas filogenéticamente con *Salinivibrio proteolyticus* y *S. costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T.

En modo de recordatorio, según el estudio MLSA realizado anteriormente, las cepas que conforman el filogrupo 4 son IB574, IB872, PR5, PR919 y PE932; estas cepas aparecen agrupadas a una especie *Salinivibrio proteolyticus* DSM 11403^T y a una subespecie *S. costicola* subsp.

vallismortis DSM 8285^T. En base al gen ARNr 16S estas cepas poseen un porcentaje de semejanza del 97,3 al 100 %.

De acuerdo con el servidor EzBioCloud, las cepas IB574 (1303 pb), IB872 (1410 pb), PR919 (1395 pb) y PR932 (1393 pb), estuvieron estrechamente relacionadas con *S. costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T (98,5-99,7 %); mientras que la cepa PR5 (1366 pb) estuvo relacionada filogenéticamente a *S. costicola* subsp. *costicola* DSM 11403^T (98,5 %).

Según el árbol filogenético basado en el gen ARNr 16S tanto las cepas y especies objeto de estudio en este apartado (marcadas en negrita en el árbol), se encuentran dispersas sin formar un grupo monofilético; por un lado se sitúan las cepas PR919 y PR932 formando un grupo con la subespecie *S. costicola* subsp. *vallismortis*; cuyo valor de soporte de rama es del 93 %. Las cepas IB872 e IB574 conformando otro grupo monofilético; *Salinivibrio proteolyticus* DSM 11403^T aparece sola; mientras que la cepa PR5 aparece formando un grupo con la especie *Salinivibrio kushneri*. CECT 9177^T (Figura IV.20).

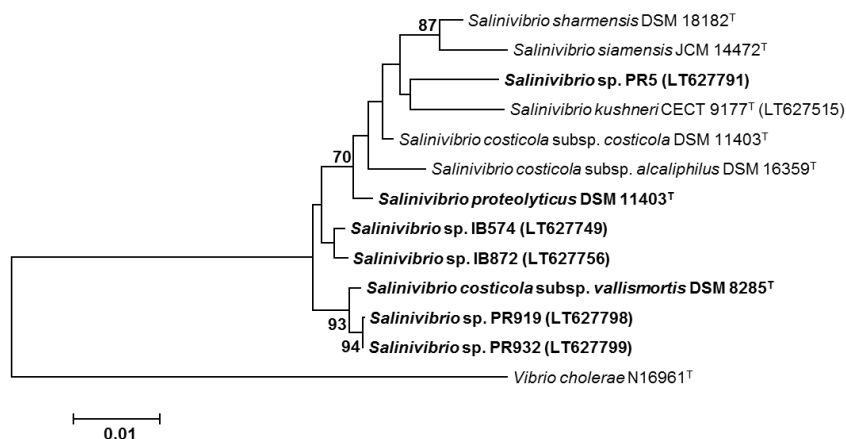


Figura IV.20. Árbol filogenético obtenido por el método *maximum-likelihood* basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas IB574, IB872, PR5, PR919 y PR932 y las cepas tipo del género *Salinivibrio*. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores estimados de *bootstrap* iguales o superiores al 70 %. Como *outgroup* se ha utilizado la cepa tipo de *Vibrio cholerae* N16961^T. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

Esto nos demuestra una vez más que el gen ARNr 16S no es un marcador filogenético útil para la familia *Vibrionaceae*, dando una baja resolución a nivel de especie (Pascual y col., 2010; Swabe y col; 2013); por ello se llevó a cabo un estudio MLSA para el cual se utilizaron los genes *housekeeping* mencionados previamente: *gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD* (Pascual y col., 2010, Sawabe y col., 2007; 2013; Thompson y col. 2001; 2004; 2005; 2007). Se realizó la secuenciación y alineamiento de estos genes y su posterior concatenación, obteniendo una secuencia concatenada de 2981 nucleótidos. Como se puede observar en la Figura IV.21, el conjunto de las cinco cepas aisladas aparece formando un grupo monofilético, separado del resto de especies del género *Salinivibrio*, sustentado por un alto valor de soporte de rama (100 %) con la especie *Salinivibrio proteolyticus* y la subespecie *S. costicola* subsp. *vallismortis*; confirmando que efectivamente éstas dos, especie y subespecie, conforman la misma especie. Además se obtuvo una topología casi similar con los tres métodos de construcción de filogenia; como cabría esperar, este estudio MLSA mostró una mayor resolución en la determinación de las relaciones a nivel de especie que el gen ARNr 16S, debido a su mayor señal filogenética gracias a la concatenación de los genes conservados *housekeeping*.

Para asegurarnos de que efectivamente *Salinivibrio proteolyticus* y la subespecie *S. costicola* subsp. *vallismortis* representaban la misma especie, se llevaron a cabo estudios de hibridación ADN-ADN mediante el método de competición en filtro de membrana. La temperatura de hibridación utilizada para este ensayo fue de 51,8 °C; dicha temperatura es inferior a los límites máximos determinados como aceptables para estos estudios (De Ley y Titjgat, 1970). El porcentaje de hibridación de la cepa *S. costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T, seleccionada como cepa de referencia de este grupo, con respecto a las cepas *Salinivibrio proteolyticus* DSM 11403^T, IB574, IB872, PR5, PR919 y PR932 fue de 73,8 %, 85,7 %, 81,4 %, 87 %, 86,9 % y 86, 5 %; estos resultados avalan que se trata de siete cepas pertenecientes a una misma especie y que tanto *S. costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T como *Salinivibrio proteolyticus* DSM 11403^T son la misma especie (Stackebrandt y col., 2002). Los valores con respecto al resto de especie del género *Salinivibrio* no superaban el 30 %.

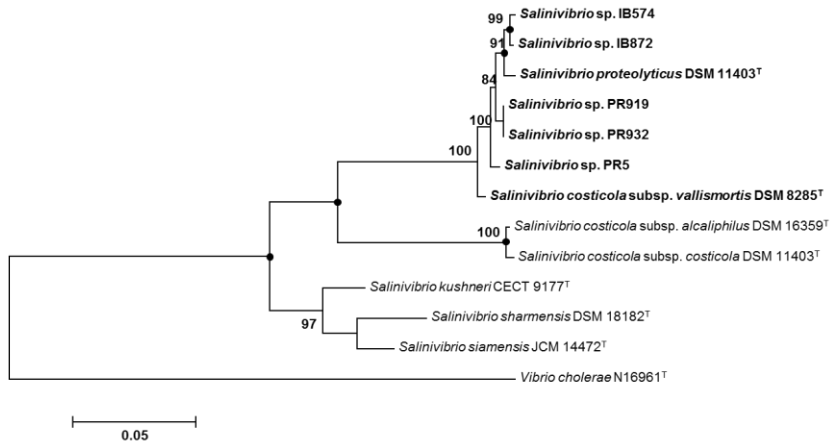


Figura IV.21. Árbol filogenético basado en la comparación de la secuencia concatenada de los genes *gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD* obtenido por el método *maximum-likelihood* en el que se muestra la posición filogenética de las cepas IB574, IB872, PR5, PR919 y PR932 y las cepas tipo del género *Salinivibrio*. Los círculos negros indican los nodos que se mantienen en los árboles generados utilizando los algoritmos *maximum-parsimony* y *neighbour-joining*. En los nodos se indican los valores de bootstrap superiores al 70 %. Como *outgroup* se ha utilizado la cepa tipo de *Vibrio cholerae* N16961^T. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

El contenido en G+C del ADN de las siete cepas se determinó calculando la temperatura media de desnaturalización (T_m), obteniéndose valores de 51,9 % para las cepas *S. costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T, *Salinivibrio proteolyticus* DSM 11403^T, IB574, IB872, PR5 y PR932 y de 52,5 % para la cepa PR919. Estos rangos se encuentran cercanos a los descritos para las especies del género *Salinivibrio* (49,0-51,0 mol%) (Romano y col., 2011).

En la Tabla IV.33 se muestran las principales características fenotípicas y genotípicas diferenciales de las siete cepas pertenecientes al filogrupo 4 y las especies descritas del género *Salinivibrio*.

Tal y como se puede observar, algunas de las pruebas son iguales tanto para las cepas que conforman el filogrupo 4 como para las especies del género previamente descritas; es el caso por ejemplo de la oxidasa y catalasa que son positivas. Además utilizan la vía butanodiólica para fermentar la glucosa.

Tabla IV.33. Características fenotípicas y genotípicas diferenciales entre las siete cepas del filogrupo 4 y el resto de especies del género *Salinivibrio*.

Todas las cepas mostraron una pigmentación color crema y forma de bacilos curvados móviles. El óptimo de NaCl es de 7,5 % p/v; el óptimo de temperatura es de 37 °C y el óptimo de pH se encuentra entre 7,2-7,4. Todas las cepas crecían en condiciones de anaerobiosis. Todas dieron resultado positivo para las pruebas de la catalasa, oxidasa, fosfatasa, Voges-Proskauer y producían ácidos a partir de la fructosa, manosa y D-trehalosa. Utilizaban rafinosa, ribosa y D-trehalosa como fuente de carbono y energía. Todas las cepas dieron negativo en la producción de indoly el rojo metilo, y no producían ácido a partir de la esculina, rafinosa y D-xilosa. Todos los datos fueron realizados en este estudio. Cepas: 1, *S.costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T; 2, *S. proteolyticus* DSM 11403^T; 3, IB574; 4, IB872; 5, PR5; 6, PR919; 7, PR932 8, *S. cost.* subsp. *costicola* DSM 11403^T; 9, *S. cost.* subsp. *alcaliphilus* DSM 16359^T; 10, *S. sharmensis* DSM 18182^T; 11, *S. siamensis* JCM 14472^T. +, positivo, -, negativo, ND, no determinado.

Características	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Rango NaCl (% p/v)	2-21	2-20	3-20	4-19	3-21	2-20	2-19	3-20	2-20	3-20	2-20
Rango temperatura (°C)	19-49	18-47	20-47	19-49	20-48	19-47	18-48	18-48	19-46	19-46	18-47
Rango pH	5-10	5-10	5-9	5-9	5-10	5-9	5-9	5-10	5-9	5-10	5-10
Hidrólisis de:											
Esculina	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
Caseína	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
Gelatina	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+
Almidón	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
Tween 80	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADN	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Fenilalanina desaminasa	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+

Características	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Lactosa	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+
D-Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Manosa	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Alanina	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
D-Xilosa	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Contenido en G + C del ADN (<i>Tm</i>) (mol%)	51,9	51,9	51,9	51,9	51,9	52,5	51,9	52,5	51,9	51,9	51,9
Contenido en G + C del ADN (genoma) (%)	49,8	49,8	49,8	49,8	49,9	49,9	49,9	49,3	49,3	50,4	50,3

Dentro del filogrupo 4, todas las cepas dieron positivo para la hidrólisis del ADN mientras que la fenilalanina desaminasa fue negativa. Producen ácidos la ribosa y el manitol; mientras que no producen a partir de la D-galactosa. Utilizan la D-maltosa, la D-glucosa y la sacarosa como principales fuentes de energía y carbono.

Romano y col. (2011) estudiaron el perfil de los ácidos grasos celulares, lípidos polares y la composición de quinonas de todas las cepas descritas del género *Salinivibrio*. Según se puede apreciar en la Tabla IV.34, las dos cepas, *S. costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T y *Salinivibrio proteolyticus* DSM 11403^T mostraron una composición de ácidos grasos bastante similar. El ácido graso predominante de ambas fue C_{18:1}; además poseían fosfatidiletanolamina (PEA) y fosfatidilglicerol (PG) como principales lípidos. El difosfatidilglicerol (DPG) estaba presente en una cantidad inferior con respecto a PEA y PG; mientras que la lipoquinona respiratoria presente fue Q-8.

Tabla IV.34. Composición de ácidos grasos, lípidos polares y quinonas respiratorias de las cepas *S. costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T y *S. proteolyticus* DSM 11403^T.

Datos tomados de Romano y col. (2011). Los valores se muestran en porcentaje total de los ácidos grasos celulares. +, presencia; -, ausencia.

Lípidos polares	<i>S.costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285 ^T	<i>S. proteolyticus</i> DSM 11403 ^T
PEA	+	+
PG	+	+
DGP	+(trazas)	+(trazas)
Ácidos grasos		
C _{12:0}	10,8	6,7
C _{14:0}	7,8	7,1
C _{16:0}	18,7	21,6
C _{16:1}	8,5	24,0
C _{18:0}	2,4	3,1
C _{18:1}	28,6	33,7
Quinona	Q-8	Q-8

Ya que poseíamos los genomas secuenciados de estas cinco cepas aisladas así como de las especies descritas del género *Salinivibrio*, decidimos completar este estudio con información filogenómica. Las

características principales de estos genomas se encuentran recogidas en la tabla IV.18 del apartado IV.8.2. de Resultados y Discusión.

El cálculo de la hibridación ADN-ADN *in silico* se realizó mediante el programa **GGDC** (Meier-Kolthoff, y col., 2013), mediante el cual los valores obtenidos entre las cinco cepas aisladas y las cepas *S.costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T y *S. proteolyticus* DSM 11403^T oscilaron entre el 72 y el 100 % (Tabla IV.35); según Thompson y col. (2013), las cepas de la misma especie comparten un valor de hibridación ADN-ADN *in silico* del 70 % o superior conforman la misma especie; cuando se comparaban estas cepas con el resto especies del género, los valores no superaban el 40 %.

Valores de **ANiB** fueron calculados siguiendo la metodología de Konstantinidis y Tiedje (2005); entre las cepas que conformaban el mismo filogrupa los valores fueron superiores al 95,8 %; estando fijado el límite de especie en el 95 % (Goris y col., 2007; Richter y Rosselló-Móra, 2009); ya que este valor estaba cerca del límite decidimos calcular también los valores de **OrthoANI** según la metodología de Lee y col. (2016).

Tabla IV.35. Relación de valores de la hibridación ADN-ADN (DDH) *in silico*, valores de ANiB y de OrthoANI de la cepa *S.costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T frente a las cepas pertenecientes al mismo filogrupa junto con las especies descritas del género *Salinivibrio*.

Todos los valores están expresados en porcentaje.

Cepa	<i>In silico</i> DDH	ANiB	OrthoANI
<i>S. proteolyticus</i> DSM 11403 ^T	81	96,7	97,1
<i>Salinivibrio</i> sp. IB574	72	95,8	96
<i>Salinivibrio</i> sp. IB872	98	95,8	96
<i>Salinivibrio</i> sp. PR5	76	98,4	98,5
<i>Salinivibrio</i> sp. PR919	81	98,4	98,8
<i>Salinivibrio</i> sp. PR932	84	98,4	98,5
<i>S. costicola</i> subsp. <i>costicola</i> DSM 11403 ^T	17	82,0	79,4
<i>S. sharmensis</i> DSM 18182 ^T	29	84,4	87,0
<i>S. siamensis</i> JCM 14472 ^T	34	84,7	80,6
<i>Salinivibrio</i> sp. AL184	37	84,0	80,4

También se estudió su pangenoma, obteniéndose un valor de 5826 genes los que conformaban el conjunto de todos los genes presentes en las siete cepas así como las especies tipo del género *Salinivibrio*; de los cuales 1255 estaban presentes en todas las cepas (*core-orthologs*). En base a este valor de core-genoma se llevó a cabo la reconstrucción filogenética basada en la concatenación de todos los genes ortólogos presentes en todos los genomas; observándose que estas siete cepas conformaban un solo filogrupo separada del resto de especies descritas del género *Salinivibrio* (Figura IV.22).

Además y tal y como se realizó en otros apartados de Resultados y Discusión, también se representaron los diez subsistemas más predominantes en este filogrupo; siendo los genes involucrados en la síntesis y regulación del flagelo los más abundantes, esto puede ser debido al flagelo polar que poseen en uno de sus extremos lo que les confiere la motilidad a los miembros de este género (Figura IV.23).

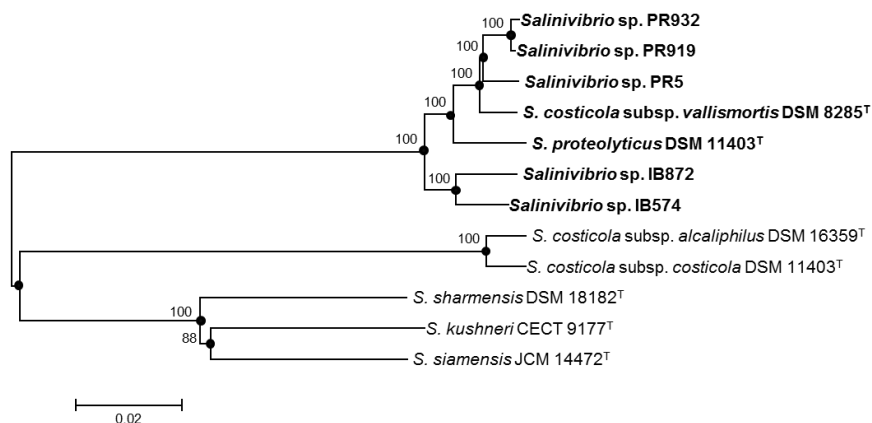


Figura IV.22. Árbol filogenético basado en el *core-genome* de las cepas IB574, IB872, PR5, PR919 y PR932 y las cepas tipo del género *Salinivibrio*. Este árbol fue obtenido por el método *neighbour-joining* calculado a partir de la alineación de 1255 genes ortólogos compartidos de estos genomas. Todos los genomas fueron secuenciados en el estudio menos *S. costicola* subsp. *costicola* DSM 11403^T que fue extraído del GenBank Los círculos negros indican los nodos que se mantienen en los árboles generados utilizando los algoritmos *maximum-parsimony* y *maximum-likelihood*. En los nodos se indican los valores de bootstrap superiores al 70 %. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

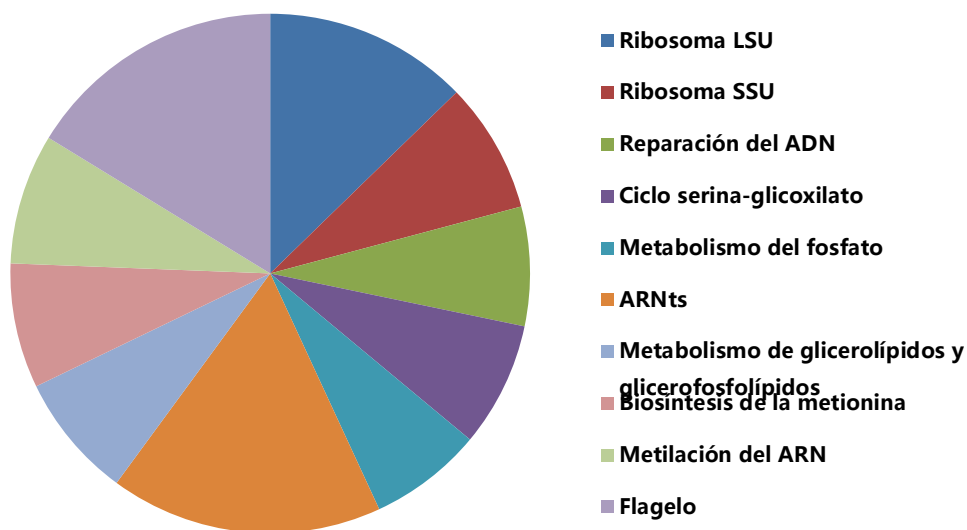


Figura IV.23. Representación de los 10 subsistemas más característicos de los genomas objeto de estudio.

Los datos filogenéticos basados en el estudio MLSA, así como la información aportada por los genomas junto a los resultados obtenidos en la caracterización genotípica, fenotípica y quimiotaxonómica demuestran claramente que las cepas *S. costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T, *Salinivibrio proteolyticus* DSM 11403^T, IB574, IB872, PR5 y PR932 y de 52,5 % para la cepa PR919 conforman una sola especie; por consiguiente, la especie *Salinivibrio proteolyticus* se considera una sinonimia posterior de *S. costicola* subsp. *vallismortis*. Los datos sustentan la redescrición de la subespecie *S. costicola* subsp. *vallismortis* como una nueva especie a la que se le propone el nombre de *Salinivibrio vallismortis* com. nov.

IV. 10.1. Corrección de la especie *Salinivibrio vallismortis* comb nov.

Salinivibrio vallismortis com. nov. (val.lis.mor'tis. L. gen. n. *vallis* del Valle; L. gen. n. *mortis* de Muerte; M. L. fem. n. *vallismortis* del Valle de la Muerte, nombre asignado por el sitio donde fue aislada la cepa, en el Valle de la muerte, California, EE.UU).

La descripción de la cepa *Salinivibrio vallismortis* com. nov. es la misma que proporcionó Huang y col. (2007), a excepción de las siguientes características: la cepa tipo de este filogrupo, *Salinivibrio vallismortis*, no hidroliza el almidón. Produce ácido a partir de manitol y ribosa. Utiliza como fuente de carbono y energía la D-galactosa, lactosa y maltosa. Además otras características fenotípicas fueron añadidas y que no se realizaron en la descripción inicial de la especie (Huang y col., 2007), hidroliza el ADN. Fue positiva para el Voges-Proskauer. Dio negativo para las pruebas de rojo metilo, fenilalanina desaminasa, reducción de nitratos y nitritos, y citrato de Simmons. Produce ácidos a partir del glicerol. Utiliza la D-xilosa como fuente de carbono y energía, mientras que no utiliza la fructosa ni la alanina.

Su contenido en G+C del ADN es 51,9 mol% (T_m) y 49,8 % cuando lo tomamos del genoma. El ácido graso que predomina es el C_{18:1}. La cepa tipo es *Salinivibrio vallismortis*, que se aisló del Valle de la Muerte, EE.UU. Los aislados IB574, IB872, PR5, PR919 y PR932 son cepas adicionales de la especie. El número de acceso de GenBank/DDBJ/EMBL para el gen ARNr 16S de la cepa tipo es LT722672

V. Conclusiones

1. Tras el aislamiento de setenta cepas pertenecientes al género *Salinivibrio* de las diferentes salinas de Alicante, Huelva, Granada, Gran Canaria, Mallorca y Puerto Rico, se realizó, junto con las cepas tipo del género, un análisis del gen ARNr 16S por el que se observaron ciertas incongruencias, tales como que la topología de los árboles no está nada conservada y no se aprecian filogrupos bien definidos; además, las tres subespecies no forman un grupo monofilético. Por lo que se concluyó que este marcador filogenético no era óptimo para este grupo taxonómico debido a la poca resolución que ha presentado.
2. La resolución óptima en los estudios de MLSA para la identificación de las especies del género *Salinivibrio*, así como para su reconstrucción filogenética, se ha obtenido con la concatenación de los cuatro genes analizados (*gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD*). La resolución de algunas cepas en los análisis de secuencias génicas individuales se ha visto afectada por fenómenos de transferencia horizontal. Este hecho refuerza la necesidad de concatenar varios genes para corregir los efectos de dicho proceso.
3. La comparación de los valores de correlación de los datos de hibridación ADN-ADN (DDH) con el estudio MLSA, es claramente favorable. Esto, unido al resto de ventajas que el MLSA presenta, permite concluir que constituye una aproximación idónea para la identificación y clasificación de este género, pudiéndose proponer como una alternativa fiable a la hibridación ADN-ADN (DDH).
4. La técnica de tipificación molecular empleada (rep-PCR) no ha ofrecido un resultado satisfactorio en la identificación de las especies del género *Salinivibrio*; además, se observaron que cepas que procedían del mismo sitio de aislamiento poseían patrones de bandas distintos. Asimismo, ha permitido cerciorar, que estas cepas no se trataban de clones.
5. El estudio polifásico (análisis fenotípico, hibridación ADN-ADN y estudio MLSA) así como la secuenciación de los genomas de las cepas AL184^T, IB560, IB563, IC202, IC317, MA421, ML277, ML318, ML328A y ML331 han permitido concluir que constituyen una nueva especie del género *Salinivibrio*, para la

que se propone el nombre de *S. kushneri* sp. nov., y la cepa AL184^T (= CECT 9177^T = LMG 29817^T) como cepa tipo.

6. La caracterización fenotípica, el estudio de MLSA, la hibridación ADN-ADN y el análisis de los genomas de las cepas *S. costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T, *S. proteolyticus* DSM 11403^T, IB574, IB872, PR5, PR919 y PR932 han permitido concluir que ambas, especie y subespecie, constituyen una única especie a la que se le enmienda con el nombre de *S. vallismortis* com. nov., ascendiendo a rango de especie la subespecie *S. costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T; siendo por tanto, la especie *S. proteolyticus* una sinonimia de *S. costicola* subsp. *vallismortis*.

7. Los reclutamientos obtenidos de diversas bases de datos metagenómicas de ambientes con salinidades intermedias, han puesto de manifiesto que el género *Salinivibrio*, a pesar de crecer rápidamente en el laboratorio y ser fácilmente aislado de ambientes hipersalinos, no constituye una población abundante en estos ambientes.

VI. Conclusions

1. Following the isolation of seventy strains belonging to the genus *Salinivibrio* from the different solar salterns of Alicante, Huelva, Granada, Gran Canaria, Mallorca and Puerto Rico, an analysis of the 16S rRNA gene was performed along with type strains of the genus. It has been observed some inconsistencies, such as that the topology of the trees is not conserved and there are no well-defined phylogroups; furthermore, the three subspecies do not form a monophyletic group. So it is to conclude that this phylogenetic marker was not optimal for this taxonomic group due to the low resolution that it has presented.
2. The optimal resolution in the MLSA studies for the identification of species of the genus *Salinivibrio*, as well as their phylogenetic reconstruction, was obtained by concatenating the four genes housekeeping (*gyrB*, *recA*, *rpoA* and *rpoD*). The resolution of some strains in analyzes of individual gene sequences has been affected by horizontal transfer phenomena. This fact reinforces the need to concatenate several genes to decrease the effects of this process.
3. Comparison of the correlation values of the DNA-DNA hybridization data (DDH) with the MLSA study is clearly favorable. This, along with the other advantages that the MLSA presents, it allows to conclude that it constitutes an ideal approximation for the identification and classification of this genus, being able to propose as a reliable alternative to DNA-DNA hybridization (DDH).
4. Molecular technique for detecting and typing of bacteria (Rep-PCR) used has not provided a satisfactory result in the identification of species of the genus *Salinivibrio*; additionally, it has been shown strains from the same isolation place had different banding patterns. Also it has been allowed to confirm that these strains were not clones.
5. Polyphasic study (phenotype analysis, DNA-DNA hybridization and MLSA study) as well as the sequencing of the genomes of the strains AL184^T, IB560, IB563, IC202, IC317, MA271, ML277, ML318, ML328A and ML331 have allowed to conclude that they constitute a new species of the genus *Salinivibrio*, for which the name of *S. kushneri* sp. nov is proposed., strain AL184^T (= CECT 9177^T = LMG 29817^T) constitute the type strain.
6. Phenotypic characterization, MLSA study, DNA-DNA hybridization and analysis of the genomes of subspecies *S. costicola* subsp. *vallismortis*

DSM 8285^T, species *S. proteolyticus* DSM 11403^T and the strains IB574, IB872, PR5, PR919 and PR932 have been allowed to conclude that both, species and subspecies, constitute a single species which is emended as *S. vallismortis* com. nov., ascending to range of species the subspecies *S. costicola* subsp. *vallismortis* DSM8285^T; so the species *S. proteolyticus* constitute later heterotypic synonym of *S. costicola* subsp. *vallismortis*.

7. Recruitments plot obtained from metagenomic databases of environments with intermediate salinities revealed that the genus *Salinivibrio*, despite growing fast in the laboratory and being easily isolated from hypersaline environments, does not constitute an abundant genus in these habitats.

VII. Summary

The genus *Salinivibrio* constitutes a separate phylogenetic lineage within the *Gammaproteobacteria* according to 16S rRNA gene sequence analysis and includes moderate halophilic bacteria. This genus was created to accommodate the species *Vibrio costicola* based on the significant phenotypic and genotypic differences between this and other species of the genus *Vibrio* (Mellado *et al.* 1996). Currently, the genus *Salinivibrio* comprises four species, one of them with three subspecies: *S. costicola* subsp. *costicola* (Smith 1938; Mellado *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 2000), *S. costicola* subsp. *vallismortis* (Huang *et al.*, 2000), *S. costicola* subsp. *alcaliphilus* (Romano *et al.*, 2005), *Salinivibrio proteolyticus* (Amoozegar *et al.*, 2008), *Salinivibrio siamensis* (Chamroensaksri *et al.*, 2009) and *Salinivibrio sharmensis* (Romano *et al.*, 2011).

This genus comprises Gram-negative, obligatory halophilic bacteria, most of them growing between 5 and 20 % NaCl, 10 and 45 °C and pH 5.0 and 9.0. They are facultative anaerobes. Moreover, *S. costicola* is considered as a model microorganism for studying osmoregulation and other physiological mechanisms in moderate halophiles (Oren 2003; Amoozegar *et al.*, 2008). Therefore, members of this genus have developed cellular mechanisms to thrive in extremophilic conditions, such as hypersalinity (Garcia *et al.*, 1987, Huang *et al.*, 2000). Also, these microorganisms are facultative anaerobes and positive for catalase and oxidase tests. The DNA G+C content ranges from 49.0 to 51.0 mol% (Mellado *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 2000; Romano *et al.*, 2005; 2011; Amoozegar *et al.*, 2008; Chamroensaksri *et al.*, 2009). Besides, members of the genus *Salinivibrio* have been isolated from a wide variety of habitats, such as marine and hypersaline water, lagoons, lake, saline soil, salterns, salted food products, animals such as *Artemia* spp., etc.

The phylogeny of the family *Vibrionaceae* based on a 16S rRNA gene approach is confusing since closely related species within the family cannot always be distinguished reliably due to the high levels of sequence conservation. Several studies have shown that the 16S rRNA gene does not provide sufficient resolution for differentiation between closely related bacterial species (Thompson *et al.*, 2005; 2008; Staley, 2006; Pascual *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2016).

The classification of the genus *Salinivibrio* needs reappraisal since the three subspecies of *Salinivibrio costicola* do not form a monophyletic group; this conclusion is supported by antecedent studies carried out in the genus *Salinivibrio* that have shown one of the subspecies, *S. costicola* subsp. *vallismortis*, is not related to the other two, but forms a monophyletic group with another species of the genus, *S. proteolyticus* (Chamroensaksri *et al.*, 2009; Amoozegar *et al.*, 2008; Romano *et al.*, 2011; Gorriti *et al.*, 2014).

So as to resolve these problems, it has been demonstrated in a number of studies that concatenating the sequences of several protein-encoding gene fragments, i.e., a multilocus sequence analysis (MLSA), provides a more robust tree topology and an improved understanding of speciation events compared to a tree based solely on 16S rRNA gene sequences (Thompson *et al.*, 2005; 2007; Sawabe *et al.*, 2013; Dubert *et al.*, 2016; González-Castillo *et al.*, 2016).

The purpose of this Doctoral Thesis has been to study in detail the phylogenetic relationships of the species of the genus *Salinivibrio* to clarify the current classification of this genus by using several molecular approaches such as MLSA studies, DNA-DNA hybridization, phenotypic characteristics and the use of genomic data.

To begin with a total of two hundred eighty-eight strains were isolated of several solar salterns of different areas of the Spanish geographic (Alicante, Huelva, Granada, Mallorca) and of Puerto Rico. After the analysis of 16S rRNA a collection of seventy strains belonging to the genus *Salinivibrio* was obtained. Besides, type strains of this genus were used in this study too. With the objective to clarify the current classification of this genus, a MLSA approach was used basing of *gyrB*, *recA*, *rpoA* and *rpoD* sequences. These genes were selected based on previous studies in the family *Vibrionaceae* (Thompson *et al.*, 2005; 2008; Pascual *et al.*, 2010).

Phylogenetic trees based on the concatenation of these four housekeeping genes show that these seventy-six strains constituted four different phylogroups, with only one strain belonging to the species *Salinivibrio sharmensis* (with a high bootstrap value of 100%), which cannot be included

within any phylogroup since we could not isolate any strain belonging to this species and, therefore, *S. sharmensis* constitutes a phylotype. In the case of the phylogroup 1, this is composed for a group of strains of different places of isolation but not from any species, therefore, this phylogroup can be possible to constitute a new species of the genus *Salinivibrio*. On the basis of this study, we have carried out a complete polyphasic investigation that has led us to propose the description of new taxa. On the other hand, the phylogroup 4 was constituted by five strains isolated from Huelva and Puerto Rico and by species *S. proteolyticus* DSM 11403^T and subspecies *S. costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T. We performed an exhaustive study to the aim to clarify the phylogenetic position of these species.

To validate MLSA study, DNA-DNA hybridization (DDH) was carried out in thirty-three strains, including the type strains. The DDH percentage values for strains within the same phylogroup were always above 70 %, a value established as cut-off for species delineation (Wayne *et al.*, 1987; Stackebrandt and Goebel, 1994), confirming that they belong to the same species. DDH analyses among phylogroups always showed values lower than 70 %, indicating that each phylogroup constitutes a different species. After confirm that there was a correlation between both studies (MLSA and DDH), a value of 97 % was proposed as a cut-off for the genus *Salinivibrio* for MLSA study.

Besides, in this investigation genome fingerprinting analysis was performed to observe if these strains constituted clones. This study showed that the environmental strains do not form clonal populations and did not cluster according to their site of cultivation.

After the MLSA analysis, an in-depth study of phylogroup 1 was carried out to the aim to verify these strains constituted a new species of the genus *Salinivibrio*. For that a polyphasic study was performed; including DNA-DNA hybridization, phenotypic characteristics and genomic data of the strains which genomes were sequenced. Afterward these studies, it was concluded that these strains constituted a new species of this genus, which name *S. kushneri* sp. nov. was proposed.

As it mentioned above, the phylogroup 4 was constituted for the subspecies *S. costicola* subsp. *vallismortis* DSM 8285^T, species *S. proteolyticus* DSM 11403^T and the strains IB574, IB872, PR5, PR919 and PR932. Following the polyphasic studies and the genomic data; it concluded that both, species and subspecies, they were a single species, which was emended as *S. vallismortis* com. nov., ascending to range of species the subspecies *S. costicola* subsp. *vallismortis* DSM8285^T; so the species *S. proteolyticus* constitute later heterotypic synonym of *S. costicola* subsp. *vallismortis*.

On the other side, a total of thirty-two strains were selected to sequence their genomes. The study of these genomes was performed, together with the type strain of the genus *Salinivibrio*, *S. costicola* subsp. *costicola* ATCC 33508, which were available from the GenBank database.

Based on different index (ANI_b, ANI_m, OrthoANI) and DDH *in silico*, these strains were classified as five different species belonging to the genus *Salinivibrio*. Each species correlated with each phylogroup from the MLSA study. Besides, phylogenomic study based on the core-genome showed a phylogenetic tree in which it was possible differentiates four phylogroup, the same as in the MLSA study.

Among the most represented subsystems of the members of the genus *Salinivibrio* are the genes involved in the synthesis and regulation of the flagellum, this is due to the polar flagellum that these strains have at one end and that allows them mobility.

In addition, this study of the genomes has permitted us to determine, using recruitments obtained from metagenomic databases of environments with intermediate salinities, that these strains are not abundant in these habitats, despite growing fast in the laboratory and being easily isolated from hypersaline environments.

VIII. Bibliografía

Abriouel, H., Benomar, N., Lucas, R., Galvez, A. y Gálvez, A. (2011). Culture-independent study of the diversity of microbial populations in brines during fermentation of naturally-fermented Aloreña green table olives. *International Journal of Food Microbiology* **144**, 487-496.

Ackermann, H. W. y Prangishvili, D. (2012). Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Archives of Virology* **157**, 1843-1849.

Aguirre-Garrido, J. F., Ramírez-Saad, H. C., Toro, N. y Martínez-Abarca, F. (2015). Bacterial diversity in the soda saline Crater Lake from Isabel Island, Mexico. *Microbial Ecology* **1**, 10.

Allen, M.A. y Cavicchioli, R. (2017). Microbial communities of aquatic environments on Heard Island characterized by pyrotag sequencing and environmental data. *Scientific Reports* **7**, 44480.

Allison, M. J. (1978). Production of branched-chain volatile fatty acids by certain anaerobic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **35**, 872-877.

Al-Saari, N., Gao, F., Rohul, A. A., Sato, K., Sato, K., Mino, S., Suda, W., Oshima, K., Hattori, M., Ohkuma, M., Meirelles, P. M., Thompson, F. L., Thompson, C., Filho, G. M., Gomez-Gil, B., Sawabe, T. y Sawabe, T. (2015). Advanced Microbial Taxonomy Combined with Genome-Based-Approaches Reveals that *Vibrio astriarenae* sp. nov., an Agarolytic Marine Bacterium, Forms a New Clade in Vibrionaceae. *PLoS One* **8**, e0136279.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410.

Amann, R. I., Ludwig, W. y Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* **59**, 143-169.

Amils, R. (2016). Lessons learned from thirty years of geomicrobiological studies of Río Tinto. *Astrobiology* **4**, 337-350.

Amoozegar, A. M., Fatemi, A. Z., Karbalaee-Heidari, H. R. y Razavi, M. R. (2007). Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. *Microbiological Research* **162**, 369-377.

Amoozegar, M. A., Schumann, P., Hajighasemi, M., Fatemi, A. Z. y Karbalaee-Heidari, H. R. (2008). *Salinivibrio proteolyticus* sp. nov., a moderately halophilic and proteolytic species from a hypersaline lake in Iran. *International Journal of Food Microbiology* **58**, 1159-1563.

Anton, J., Llobet-Brossa, E., Rodríguez-Valera, F. y Amann, R. (1999). Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environmental Microbiology* **1**, 517-523.

Antón, J., Oren, A., Benlloch, S., Rodríguez-Valera, F., Amann, R. y Rosselló-Mora, R. (2002). *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the *Bacteria* from saltern crystallizer ponds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 485-491.

Antón, J., Peña, A., Santos, F., Martínez-García, M., Schmitt-Kopplin, P., Rosselló-Mora, R. (2008). Distribution, abundance and diversity of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Saline Systems* **4**, 15.

Antón, J., Rosselló-Mora, R., Rodríguez-Valera, F. y Amann, R. (2000). Extremely halophilic *Bacteria* in crystallizer ponds from solar salterns. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 3052-3057.

Arahal, D. R. (1997). La microbiota del Mar Muerto: 50 años después. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

Arahal, D. R., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Ventosa, A. y Volcani, B. E. (1996). Phylogenetic analysis of some extremely halophilic archaea isolated from Dead Sea water, determined on the basis of their 16S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 3779-3786.

Arahal, D. R., García, M. T., Ludwig, W., Schleifer, K. H. y Ventosa, A. (2001a). Transfer of *Halomonas canadensis* and *Halomonas israelensis* to the genus *Chromohalobacter* as *Chromohalobacter Canadensis* comb. nov. and *Chromohalobacter israelensis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**, 1443-1448.

Arahal, D. R., García, M. T., Vargas, C., Cánovas, D., Nieto, J. J. y Ventosa, A. (2001b). *Chromohalobacter salexigens* sp. nov., a moderately halophilic species that includes *Halomonas elongata* DSM 3043 and ATCC 33174. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**, 1457-1462.

Arenas, M., Bañón, P. I., Copa-Patiño, J. L., Sánchez-Porro, C., Ventosa, A. y Soliveri, J. (2009). *Halomonas illicicola* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a saltern. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 578-582.

Argandoña, M. (2003). Estudio genético del metabolismo respiratorio de *Halomonas maura*, un nuevo microorganismo halófilo moderado. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

Atanasova, N. S., Oksanen, H. M. y Bamford, D. H. (2015). Haloviruses of *Archaea*, *Bacteria*, and eukaryotes. *Current Opinion in Microbiology* **25**, 40-48.

Avron, M. y Ben-Amotz, A. (1992). *Dunaliella: Physiology, Biochemistry and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton.

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A. y Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology* **19**, 455-477.

Barnard, D., Casanueva, A., Tuffin, M. y Cowan, D. (2010). Extremophiles in biofuel synthesis. *Environmental Technology* **31**, 871-888.

Baross, J. (ed.) (2007). *The Limits of Organic Life in Planetary Systems*. *National Academies Press*.

Baxter, B., Mangalea, M., Willcox, S., Sabet, S., Nagoulat, M. y Griffith, D. (2011). Haloviruses of Great Salt Lake: a model for understanding viral diversity. Ventosa, A., Oren, A. y Ma, Y. Halophiles and hypersaline environments: current research and future trends. Springer, New York, pp: 173-190.

Beblo-Vranesevic, K., Galinski, E. A., Rachel, R., Huber, H. y Rettberg, P. (2017). Influence of osmotic stress on desiccation and irradiation tolerance of (hyper)-thermophilic microorganisms. *Archives of Microbiology* **1**, 17-28.

Benlloch, S., Acinas, S. G., Antón, J., López-López, A., Luz, S. P. y Rodríguez-Valera, F. (2001). Archaeal biodiversity in crystallizer ponds from a solar saltern: Culture versus PCR. *Microbial Ecology* **41**, 12-19.

Benlloch, S., López-López, A., Casamayor, E. O., Ovreas, L., Goddard, V., Daeë, F. L., Smerdon, G., Massana, R., Joint, I., Thingstad, F., Pedrós-Alió, C. y Rodríguez-Valera, F. (2002). Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environmental Microbiology* **4**, 349–360.

Benlloch, S., Martínez-Murcia, A. y Rodríguez-Valera, F. (1995). Sequencing of bacterial and archaeal 16S rDNA genes directly amplified from a hypersaline environment. *Systematic and Applied Microbiology* **18**, 574-58

Bentley, D. R. (2006). Whole-genome re-sequencing. *Current Opinion in Genetics & Development* **16**, 545-52.

Bettarel, Y., Desnues, A. y Rochelle-Newall, E. (2010). Lytic failure in cross-inoculation assays between phages and prokaryotes from three aquatic sites of contrasting salinity. *FEMS Microbiology Letters* **311**, 113- 118.

Bidle, K., Amadio, W., Oliveira, P., Paulish, T., Hicks, S. y Earnest, C. (2005). A phylogenetic analysis of haloarchaea found in a solar saltern. *Saline Systems* **76**, 89-96.

Bodaker, I., Sharon, I., Suzuki, M. T., Feingersch, R., Shmoish, M., Andreishcheva, E., Sogin, M. L., Rosenberg, M., Maguire, M. E., Belkin, S., Oren, A. y Béjà, O. (2010). Comparative community genomics in the Dead Sea: An increasingly extreme environment. *The ISME Journal* **4**, 399-407.

Bolhuis, H., Palm, P., Wende, A., Falb, M., Rampp, M., Rodríguez-Valera, F., Pfeiffer, F. y Oesterhelt, D. (2006). The genome of the square archaeon *Haloquadratum walsbyi*. Life at the limits of water activity. *BMC Genomics* **7**, 169.

Bolhuis, H., Poele, E. M. y Rodríguez-Valera, F. (2004). Isolation and cultivation of Walsby's square archaeon. *Environmental Microbiology* **6**, 1287-1291.

Booth, I. R. y Louis, P. (1999). Managing hypoosmotic stress: Aquaporins and medianosensitive channels in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Microbiology* **2**, 166-169.

Boujelben, I., Gomariz, M., Martínez-García, M., Santos, F., Peña, A., López, C., Antón, J. y Maalej, S. (2012). Spatial and seasonal prokaryotic community dynamics in ponds of increasing salinity of Sfax solar saltern in Tunisia. *Antonie van Leeuwenhoek* **101**, 845-857.

Bowers, K. J. y Wiegel, J. (2011). Temperature and pH optima of extremely halophilic archaea: A mini-review. *Extremophiles* **15**, 119-128.

Bowers, K. J., Mesbah, N. M. y Wiegel, J. (2009). Biodiversity of poly-extremophilic Bacteria: Does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physico-chemical boundary for life? *Saline Systems* **5**, 9.

Bremer, E. y Krämer, R. (2000). Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes. Storz, G. y Hengge-Aronis, R. Bacterial Stress Responses. *ASM Press*, Washington D. C. pp 79-97.

Brock, T. D. (1979). Ecology of saline lakes. Shilo, M. Strategies of Microbial Life in Extreme Environments. *Verlag-Chemie*, Weinheim, pp. 29-47.

Brown, A. D. (1976). Microbial water stress. *Bacteriological Reviews* **40**, 803-846.

Burns, D. G., Janssen, P. H., Itoh, T., Kamekura, M., Li, Z., Jensen, G., Rodríguez-Valera, F., Bolhuis, H. y Dyall-Smith, M. L. (2007). *Haloquadratum walsbyi* gen. nov., sp. nov., the square haloarchaeon of Walsby, isolated from saltern crystallizers in Australia and Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 387-392.

Canganella, F. y Wiegel, J. (2011). Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. *Naturwissenschaften*. **98**, 253–279.

Cánovas, D., Vargas, C., Csonka, L. N., Ventosa, A. y Nieto, J. J. (1996). Osmoprotectants in *Halomonas elongata*: high affinity betaine transport system and choline-betaine pathway. *Journal of Bacteriology* **178**, 7221- 7226.

Carini, P., Steindler, L., Beszteri, S. y Giovannoni, S. J. (2013). Nutrient requirements for growth of the extreme oligotroph “*Candidatus Pelagibacter ubique*” HTCC1062 on a defined medium. *The ISME Journal* **7**, 592-602.

Casamayor, E. O., Calderón-Paz, J. I. y Pedrós-Alió, C. (2000a). 5S rRNA fingerprints of marine bacteria, halophilic archaea and natural prokaryotic assemblages along a salinity gradient. *FEMS Microbiology Ecology* **34**, 113-119.

Casamayor, E. O., Massana, R., Benlloch, S., Øvreås, L., Díez, B., Goddard, V. J., Gasol, J. M., Joint, I., Rodríguez-Valera, F. y Pedrós-Alió, C. (2002a). Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environmental Microbiology* **4**, 338-348.

Casamayor, E. O., Pedrós-Alió, C., Muyzer, G. y Amann, R. (2002b). Microheterogeneity in 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations from a stratified planktonic environment is related to temporal changes and to ecological adaptations. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 1706-1714.

Casamayor, E. O., Schäfer, H., Bañeras, L., Pedrós-Alió, C. y Muyzer, G. (2000b). Identification of and spatiotemporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 499- 508.

Casanueva, A., Galada, N., Baker, G. C., Grant, W. D., Heaphy, S., Jones, B. Yanhe, M., Ventosa, A., Blamey, J. y Cowan, D. A. (2008). Nanoarchaeal 16S rRNA gene sequences are widely dispersed in hyperthermophilic and mesophilic halophilic environments. *Extremophiles* **12**, 651-656.

Chamroensaksri, N., Tanasupawat, S., Akaracharanya, A., Visessanguan, W., Kudo, T. y Itoh, T. (2009). *Salinivibrio siamensis* sp. nov., from fermented fish (pla-ra) in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 880-885.

Chan, J. Z. M., Halachev, M. R., Loman, N. J., Constantinidou, C. y Pallen, M. J. (2012). Defining bacterial species in the genomic era: Insights from the genus *Acinetobacter*. *BMC Microbiology* **12**, 302.

Cheewinthamrongrod V., Kageyama H., Palaga T., Takabe T. y Waditee-Sirisattha R. (2016). DNA damage protecting and free radical scavenging properties of mycosporine-2-glycine from the Dead Sea cyanobacterium in A375 human melanoma cell lines. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* **164**, 289-295.

Choudhury, S. R., Bhadra, R. K. y Das, J. (1994). Genome size and restriction fragment length polymorphism analysis of *Vibrio cholerae* strains belonging to different serovars and biotypes. *FEMS Microbiology Letters* **115**, 329-334.

Coil, D., Jospin, G y, Darling, A. E. (2015). A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinformatics* **31**, 587-589.

Corcelli, A., Lattanzio, V. M. T. y Oren, A. (2004). The Archaeal cardiolipins of the extreme halophiles. In: Halophilic Microorganisms. Ventosa, A. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 205-214.

Corral P, de la Haba RR, Sánchez-Porro C, Ali Amoozegar M, Thane Papke R, Ventosa A. (2016). *Halorubrum halodurans* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a hypersaline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **1**, 435-444.

Cowan, S. T. y Steel, K. J. (1965). Manual for the Identification of Medical Bacteria. *Cambridge University Press, London*.

Cuccuru, G., Orsini, M., Pinna, A., Sbardellati, A., Soranzo, N., Travaglione, A., Uva, P., Zanetti, G. y Fotia, G. (2014). Orione, a web-based framework for NGS analysis in microbiology. *Bioinformatics* **30**, 1928- 1929.

- Danson, M. J. y Hough, D. W.** (1997). The structural basis of protein halophilicity. *Comparative Biochemistry and Physiology* **117**, 307-312.
- Darling, A. C., Mau, B., Blattner, F. R. y Perna, N. T.** (2004). Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research* **14**, 1394-1403.
- Darling, A. E., Mau, B. y Perna, N. T.** (2010). Progressive Mauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS One* **5**.
- De la Haba, R. R., Márquez, M. C., Papke, R. T. y Ventosa, A.** (2012). Multilocus sequence analysis of the family *Halomonadaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**, 520-538.
- De la Haba, R. R., Sánchez-Porro, C., Márquez, M. C. y Ventosa, V.** (2010). Taxonomy of halophiles. Horikoshi, K., Antranikian, G., Bull, A., Robb, F. y Stetter, K. *Extremophiles Handbook*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 255-309.
- De León-Lorenzana A.S., Delgado-Balbuena L., Domínguez-Mendoza C., Navarro-Noya Y.E., Luna-Guido M. y Dendooven L.** (2017). Reducing Salinity by Flooding an Extremely Alkaline and Saline Soil Changes the Bacterial Community but Its Effect on the Archaeal Community Is Limited. *Frontiers in Microbiology* **8**, 466.
- De Ley, J. y Tijtgat, R.** (1970). Evaluation of membrane filter methods for DNA-DNA hybridization. *Antonie van Leeuwenhoek* **36**, 461-474.
- Deole, R., Challacombe, J., Raiford, D. W. y Hoff, W. D.** (2013). An extremely halophilic proteobacterium combines a highly acidic proteome with a low cytoplasmic potassium content. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 581-588.
- Di Meglio, L., Santos, F., Gomariz, M., Almansa, C., López, C., Antón, J. y Nercessian, D.** (2016). Seasonal dynamics of extremely halophilic microbial communities in three Argentinian salterns. *FEMS Microbiology Ecology* **92**, 12.
- Díez, B., Antón, J., Guixa-Boixereu, N., Pedrós-Alió, C. y Rodríguez-Valera, F.** (2000). Pulsed-field gel electrophoresis analysis of virus assemblages present in a hypersaline environment. *International Microbiology* **3**, 159-164.

Dillon, J. G., Carlin, M., Gutiérrez, A., Nguyen, V. y McLain N. (2013). Patterns of microbial diversity along a salinity gradient in the Guerrero Negro solar saltern, Baja CA Sur, Mexico. *Frontiers in Microbiology* **4**, 399.

Dubert J, Balboa S, Regueira M, González-Castillo A, Gómez-Gil B, Romalde JL. (2016). *Vibrio barjaei* sp. nov., a new species of the Mediterranei clade isolated in a shellfish hatchery. *Syst Appl Microbiol.* **8**, 553-556.

Dubert J, Romalde JL, Prado S, Barja JL. (2016). *Vibrio bivalvicida* sp. nov., a novel larval pathogen for bivalve molluscs reared in a hatchery. *Systematic and Applied Microbiology* **1**, 8-13.

Dumorné, K., Córdova, D. C., Astorga-Eló, M. y Renganathan, P. (2017). Extremozymes: A Potential Source for Industrial Applications. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **4**, 649-659.

Edgerton, M. E. y Brimblecombe, P. (1981). Thermodynamics of halobacterial environments. *Canadian Journal of Microbiology* **27**, 899-909.

Eichel A., Bilstein A., Werkhäuser N. y Mösges R. (2014). Meta-analysis of the efficacy of ectoine nasal spray in patients with allergic rhinoconjunctivitis. *Journal of Allergy*, 292545.

Eisenberg, H. y Watchel, E. J. (1987). Structural studies of halophilic proteins, ribosomes, and organelles of bacteria adapted to extreme salt concentrations. *Annual Reviews of Biophysics and Biophysical Chemistry* **16**, 69-92.

Elevi Bardavid, R., Khristo, P. y Oren, A. (2008). Interrelationships between *Dunaliella* and halophilic prokaryotes in saltern crystallizer ponds. *Extremophiles* **12**, 5-14.

Emerson, J. B., Thomas, B. C., Andrade, K., Allen, E. E., Heidelberg, K. B. y Banfield, J. F. (2012). Dynamic viral populations in hypersaline systems as revealed by metagenomic assembly. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 6309-6320.

Emonet S., Shah H. N., Cherkaoui A. y Schendrel J. (2010). Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clinical Microbiology and Infection* **16**, 1604-13.

Empadinhas, N. y da Costa, M. S. (2008). Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: Distribution of compatible solutes. *International Microbiology* **11**, 151-161.

Essghaier, B., Fardeum, M. L., Cayol, J. L., Hajlaoui, M. R., Boudabous, A., Jijakli, H., Sadfi-Zouaoui, N. (2009). Biological control of grey mould in strawberry fruits by halophilic bacteria. *Journal of Applied Microbiology* **106**, 833-846.

Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* **17**, 368-376.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.

Fernández A.B., Rasuk M.C., Visscher P.T., Contreras M., Novoa F., Poire D.G., Patterson M.M., Ventosa A. y Farias M.E. (2016). Microbial Diversity in Sediment Ecosystems (Evaporites Domes, Microbial Mats, and Crusts) of Hypersaline Laguna Tebenquiche, Salar de Atacama, Chile. *Front Microbiol.* **7**, 1284.

Fernández, A. (2012). Metagenómica comparativa de la biodiversidad procariota de una salina. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

Fernández, A. B., Ghai, R., Martín-Cuadrado, A.-B., Sánchez-Porro, C., Rodríguez-Valera, F. y Ventosa, A. (2014a). Prokaryotic taxonomic and metabolic diversity of an intermediate salinity hypersaline habitat assessed by metagenomics. *FEMS Microbiology Ecology* **88**, 623-635.

Fernández, A. B., Vera-Gargallo, B., Sánchez-Porro, C., Ghai, R., Papke, R. T., Rodríguez-Valera, F. y Ventosa, A. (2014b). Comparison of prokaryotic community structure from Mediterranean and Atlantic saltern concentrator ponds by a metagenomic approach. *Frontiers in Microbiology* **5**, 196.

Fernández-Palacios, José M^a. y Delgado, Juan Manuel. (2004). Salinas interiores de Andalucía. *Salinas de Andalucía*, Sevilla, 2004, pp. 105-106.

Ferragut, C. y Leclerc, H. (1976). Etude comparative des méthodes de détermination du T_m de l'ADN bactérien. *Annals of Microbiology* **127**, 223-235.

Ferreira, C., Soares A.R., Lamosa, P., Santos, M.A., da Costa, M.S. (2016). Comparison of the compatible solute pool of two slightly halophilic planctomycetes species, *Gimesia maris* and *Rubinisphaera brasiliensis*. *Extremophiles* **20**, 811-820.

Fitch, W. M. (1971). Toward defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. *Systematic Biology* **20**, 406-416.

Forsyth, M. P. y Kushner, D. J. (1970). Nutrition and distribution of salt response in populations of moderately halophilic bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **13**, 142-147.

Fredsgaard, C., Moore, D.B., Chen, F., Clark, B.C. y Schneegurt, M.A. (2017). Prevalence of sucrotolerant bacteria in common soils and their isolation and characterization. *Antonie Van Leeuwenhoek* **13**.

Galinski, E. A. (1995). Osmoadaptation in bacteria. *Advances in Microbial Physiology* **37**, 272-328.

Galinski, E. A. y Tindall, B. J. (1992). Biotechnological prospects for halophiles and halotolerant microorganisms. Herbert, R. A. y Sharp, R. J. *Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles*. Chapman and Hall, New York, pp. 76-114.

Galinski, E. A. y Trüper, H. G. (1994). Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* **15**, 95-108.

García-Heredia, I., Martín-Cuadrado, A. B., Mojica, F. J. M., Santos, F., Mira, A., Antón, J. y Rodríguez-Valera, F. (2012). Reconstructing viral genomes from the environment using fosmid clones: The case of haloviruses. *PLoS One* **7**, e33802.

García-Torreiro, M., López-Abelairas, M., Lu-Chau, T.A. y Lema, J.M. (2017). Application of flow cytometry for monitoring the production of poly(3-hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis*. *Biotechnology Progress*. **2**, 276-284.

García-Torreiro, M., Lu-Chau, T.A. y Lema, J.M. (2016). Effect of nitrogen and/or oxygen concentration on poly(3-hydroxybutyrate) accumulation by *Halomonas boliviensis*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **9**, 1365-1374.

Ghai, R., Pašić, L., Fernández, A. B., Martín-Cuadrado, A. B., Mizuno, C. M., McMahon, K. D., Papke, R. T., Stepanauskas, R., Rodríguez-Brito, B., Rohwer, F., Sánchez-Porro, C., Ventosa, A. y Rodríguez-Valera, F. (2011). New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments. *Scientific Reports* **1**, 1-10.

Gillis, M., De Ley, J. y De Cleene, M. (1970). The determination of molecular weight of bacterial genome DNA from renaturation rates. *European Journal of Biochemistry* **12**, 829-842.

Gilmour, D. (1990). Halotolerant and halophilic microorganisms. Edwards, C. Microbiology of Extreme Environments. Open University Press, Milton Keynes, pp. 147-177.

Glaeser, S. P. y Kämpfer, P. (2015). Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Systematic and Applied Microbiology* **4**, 237-245.

Goecks, J., Nekrutenko, A. y Taylor, J. (2010). Galaxy: A comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biology* **11**, R86.

Gomez Zavaglia, A., Disalvo, E. A. y De Antoni, G. L. (2000). Fatty acid composition and freeze-thaw resistance in lactobacilli. *The Journal of Dairy Research* **67**, 241-247.

Gonzalez-Miranda, C. J. (2006). La Obra Pública: Efectivo Vehículo para Impulsar el Desarrollo Económico. Primer Simposio Comercial del Gobierno de Puerto Rico. San Juan: Estado Libre Asociado de Puerto Rico.

González-Toril, E., Santofimia, E., López-Pamo, E., García-Moyano, A., Aguilera, Á. y Amils, R. (2014). Comparative microbial ecology of the water column of an extreme acidic pit lake, Nuestra Señora del Carmen, and the Río Tinto basin (Iberian Pyrite Belt). *International Microbiology* **4**, 225-233.

González-Torres, P., Pryszcz, L. P., Santos, F., Martínez-García, M., Gaba, Idón, T. y Antón, J. (2015). Interactions between closely related bacterial strains revealed by deep transcriptome sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* **81**, 8445-8456.

Goodfellow, M. y O'Donnell, A. G. (1993). Roots of bacterial systematics. Goodfellow, M. y O'Donnell, A. G. *Handbook of New Bacterial Systematics*. London: Academic Press pp. 3-54.

Goodfellow, M., Manfio, G. P. y Chun, J. (1997). Towards a practical species concept for cultivable bacteria. Claridge, M. F. y Dawah, H. A. *Species: the Units of Biodiversity*, London: Chapman and Hall pp. 25-59.

Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P. y Tiedje, J. M. (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 81-91.

Gorlenko, V. M., Bryantseva, I. A., Rabold, S., Tourova, T. P., Rubtsova, D., Smirnova, E., Thield, V. y Imhoff, J. F. (2009). *Ectothiorhodospira variabilis* sp. nov., an alkaliphilic and halophilic purple sulfur bacterium from soda lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 658-664.

Gorriti, M. F., Dias, G. M., Chimetto, L. A., Trindade-Silva, A. E., Silva, B. S., Mesquita, M. M., Gregoracci, G. B., Farias, M. E., Thompson, C. C. y Thompson, F. L. (2014). Genomic and phenotypic attributes of novel salinivibrios from stromatolites, sediment and water from a high altitude lake. *BMC Genomics* **15**, 473.

Gouret, P., Vitiello, V., Balandraud, N., Gilles, A., Pontarotti, P. y Danchin, E. G. J. (2005). FIGENIX: Intelligent automation of genomic annotation: Expertise integration in a new software platform. *BMC Bioinformatics* **6**, 198.

Grant, W. D. (1990). General view of halophiles. Horikoshi, K. y Grant, W. D. *Superbugs. Microorganisms in Extreme Environments*. Springer, Tokyo, pp. 15-37.

Grant, W. D., Gemmell, R. T. y McGenity, T. J. (1998). Halophiles. Horikoshi, K. y Grant, W. D. *Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environments*. Wiley-Liss, New York, pp. 93-132.

Grant, W. D., Pagaling, E., Márquez, M. C., Gutierrez, M. C., Cowan, D. A., Ma, Y., Jones, B. E., Ventosa, A. y Heaphy, S. (2011). The hypersaline lakes of Inner Mongolia: The MGAtch project. Ventosa, A., Oren, A. y Ma, Y. *Halophiles and Hypersalines Environments*. Springer, New York pp. 65-107.

Grim, C. J., Kotewicz, M. L., Power, K. A, Gopinath, G., Franco, A. A., Jarvis, K. G. Yan, Q. Q., Jackson, S. A., Sathyamoorthy, V., Hu, L., Pagotto, F., Iversen, C., Lehner, A., Stephan, R., Fanning, S. y Tall, B. D. (2013). Pan-genome analysis of the emerging foodborne pathogen *Chronobacter* spp. suggests a specieslevel bidirectional divergence driven by niche adaptation. *BMC Genomics* **14**, 366.

Grimont, P. A. D., Popoff, M. Y., Grimont, F., Coynault, C. & Lemelin, M. (1980). Reproducibility and correlation study of three deoxyribonucleic acid hybridization procedures. *Current Microbiology* **4**, 325-330.

Gu, J., Cai, H., Yu, S. L., Qu, R., Yin, B., Guo, Y. F., Zhao, J. Y. y Wu, X. L. (2007). *Marinobacter gudaonensis* sp. nov., isolated from an oil-polluted saline soil in a Chinese oilfield. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 250-254.

Guindon S. y Gascuel O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* **52**, 696-704.

Gupta, R. S., Naushad, S. y Baker, S. (2015). Phylogenomic analyses and molecular signatures for the class *Halobacteria* and its two major clades: A proposal for division of the class *Halobacteria* into an emended order *Halobacteriales* and two new orders, *Haloferacales* ord. nov. and *Natrialbales* ord. nov., containing the novel families *Haloferacaceae* fam. nov. and *Natrialbaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65**, 1050-1069.

Gutell, R. R., Weiser, B., Woese, C. R. y Noller, H. F. (1985). Comparative anatomy of 16S-like ribosomal RNA. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **32**, 155-216.

Gutiérrez-Preciado, A., Vargas-Chávez, C., Reyes-Prieto, M., Ordoñez, O. F., Santos-García, D., Rosas-Pérez, T., Valdivia-Anistro, J., Rebollar, E. A., Saralegui, A., Moya, A., Merino, E., Farías, M. E., Latorre, A. y Souza, V. (2017). The genomic sequence of *Exiguobacterium chiriqhucha* str. N139 reveals a species that thrives in cold waters and extreme environmental conditions. *PeerJ*. **19**, 3162.

Haferburg, G., Gröning, J. A. D., Schmidt, N., Kummer, N. A., Erquicia, J. C., Schlömann, M. (2017). Microbial diversity of the hypersaline and lithium-rich Salar de Uyuni, Bolivia. *Microbiological Research* **19**, 19-28.

Haley, B., Grim, C., Hasan, N., Choi, S. Y., Chun, J., Brettin, T., Bruce, D., Challacombe, J., Detter, J., Han, C., Huq, A. y Colwell, R. R. (2010). Comparative genomic analysis reveals evidence of two novel *Vibrio* species closely related to *V. cholerae*. *BMC Microbiology* **10**, 154.

Hall, T. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95-98.

Harmer D. (1913). Specimens of *Artemia salina* from the Nose (a New Form of Sea Serpent). *Proceedings of the Royal Society of Medicine* **6**, 93-94.

Hartford, T. y Sneath, P. H. A. (1988). Distortion of taxonomic structure from DNA relationships due to different choice of reference strains. *Systematic and Applied Microbiology* **10**, 241-250.

He, S. T., Zhi, X. Y., Jiang, H., Yang, L. L., Wu, J. Y., Zhang, Y. G., Hozzein, W. N. y Li, W. J. (2015). Biogeography of *Nocardiopsis* strains from hypersaline environments of Yunnan and Xinjiang Provinces, western China. *Scientific Reports* **5**, 13323.

Hoefl McCann, S., Boren, A., Hernandez-Maldonado, J., Stoneburner, B., Saltikov, C. W., Stolz, J. F. y Oremland, R. S. (2016). Arsenite as an Electron Donor for Anoxygenic Photosynthesis: Description of Three Strains of *Ectothiorhodospira* from Mono Lake, California and Big Soda Lake, Nevada. *Life (Basel)* **7**, 1.

- Huang, C. Y., García, J. L., Patel, B. K. C., Cayol, J. L., Baresi, L. y Mah, R. A.** (2000). *Salinivibrio costicola* subsp. *vallismortis* subsp. nov., a halotolerant facultative anaerobe from Death Valley, and emended description of *Salinivibrio costicola*. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 615-622.
- Huson, D. H., Reinert, K., Kravitz, S. A., Remington, K. A., Delcher, A. L., Dew, I. M., Flanagan, M., Halpern, A. L., Lai, Z., Mobarry, C. M., Sutton, G. G. y Myers, E. W.** (2001). Design of a compartmentalized shotgun assembler for the human genome. *Bioinformatics* **1**, 132-139.
- Hyatt, D., Chen, G. L., Locascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W. y Hauser, L. J.** (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* **11**, 119.
- Infante-Domínguez, C., Corral, P., Sánchez-Porro, C. y Ventosa, A.** (2015). *Halovenus salina* sp. nov, an extremely halophilic archaeon isolated from a saltern. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65**, 3016-3023.
- Jančič, S., Nguyen, H. D. T., Frisvad, J. C., Zalar, P., Schroers, H. J., Seifert, K. A. y Gunde-Cimerman, N.** (2015). A taxonomic revision of the *Wallemia sebi* species complex. *PLoS One* **10**, e0125933.
- Johnson, J. L.** (1994). Similarity analysis of DNAs. Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. y Krieg, N. R. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C, pp. 655-682.
- Jones, B. E., Grant, W. D., Duckworth, A. W. y Owenson, G. G.** (1998). Microbial diversity in soda lakes. *Extremophiles* **2**, 191-200.
- Jukes, T. H. y Cantor, C. R.** (1969). Evolution of protein molecules. Munro, H. N. *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York, pp. 21-132.
- Kalb, V. F. y Bernlohr, R. W.** (1977). A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts. *Analytical Biochemistry* **82**, 362-371.

Kambura, A. K., Mwirichia, R. K., Kasili, R. W., Karanja, E. N., Makonde, H. M. y Boga, H. I. (2016). Bacteria and Archaea diversity within the hot springs of Lake Magadi and Little Magadi in Kenya. *BMC Microbiology* **1**, 136.

Kaurichev, I. S. (1980). *Prácticas de Edafología*. Mir, Moscow.

Kavembe, G. D., Franchini, P., Irisarri, I., Machado-Schiaffino, G. y Meyer, A. (2015). Genomics of Adaptation to Multiple Concurrent Stresses: Insights from Comparative Transcriptomics of a Cichlid Fish from One of Earth's Most Extreme Environments, the Hypersaline Soda Lake Magadi in Kenya, East Africa. *Journal of Molecular Biology* **4**, 90-109.

Kavembe, G. D., Kautt, A. F., Machado-Schiaffino, G. y Meyer, A. (2016). Eco-morphological differentiation in Lake Magadi tilapia, an extremophile cichlid fish living in hot, alkaline and hypersaline lakes in East Africa. *Molecular Ecology* **7**, 1610-1625.

Khemili-Talbi, S., Kebbouche-Gana, S., Akmoussi-Toumi, S., Angar, Y. y Gana, M. L. (2015). Isolation of an extremely halophilic archaeon *Natrialba* sp. C21 able to degrade aromatic compounds and to produce stable biosurfactant at high salinity. *Extremophiles* **6**, 1109-1120.

Khodadad, C. L., Wong, G. M., James, L. M., Thakrar, P. J., Lane, M. A., Catechis, J. A. y Smith, D. J. (2017). Stratosphere Conditions Inactivate Bacterial Endospores from a Mars Spacecraft Assembly Facility. *Astrobiology* **17**, 337-350.

Kim, O. S., Cho Y. J., Lee, K. yoon, S. H., Kim, M., Na, H., Park, S. C., Jeon Y. S., Lee, J. H. Yi, H., Won, S. y Chun, J. (2012). Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**, 716-721.

Kindzierski, V., Raschke, S., Knabe, N., Siedler, F., Scheffer, B., Pflüger-Grau, K., Pfeiffer, F., Oesterhelt, D., Marin-Sanguino, A. y Kunte, H. J. (2017). Osmoregulation in the Halophilic Bacterium *Halomonas elongata*: A Case Study for Integrative Systems Biology. *PLoS One* **1**, 0168818.

Köcher, S., Averhoff, B., Müller, V. (2011) Development of a genetic system for the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*: generation and characterization of mutants defect in the production of the compatible solute proline. *Environmental Microbiology* **13**, 2122-2131

Konstantinidis, K. T. y Tiedje, J. M. (2005). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 2567-72.

Koser, S. A. (1923). Utilization of the salts of organic acids by the colon-aerogenes group. *Journal of Bacteriology* **8**, 493-520.

Koser, S. A. (1923). Utilization of the salts of organic acids by the colon-aerogenes group. *Journal of Bacteriology* **8**, 493-520.

Kovacs, N. (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature* **178**, 703.

Kukkaro, P. y Bamford, D. H. (2009). Virus-host interactions in environments with a wide range of ionic strengths. *Environmental Microbiology Reports* **1**, 71-77.

Kushner, D. J. (1978). Life in high salt and solute concentrations: Halophilic bacteria. Kushner, D. J. *Microbial life in extreme environments*. Academic Press, London, pp. 317-368.

La Cono, V., Smedile, F., Bortoluzzi, G., Arcadi, E., Maimone, G., Messina, E., Borghini, M., Oliveri, E., Mazzola, S., L'Haridon, S., Toffin, L., Genovese, L., Ferrer, M., Giuliano, L., Golyshin, P. N. y Yakimov, M. M. (2011). Unveiling microbial life in new deep-sea hypersaline Lake Thetis. Part I: Prokaryotes and environmental settings. *Environmental Microbiology* **13**, 2250-2260.

Lagesen, K., Hallin, P. F., Rødland, E., Stærfeldt, H. H., Rognes, T. y Ussery, D. W. (2007). RNAMmer: consistent annotation of rRNA genes in genomic sequences. *Nucleic Acids Research* **22**.

Lai, H., Jiang, Y., Chen, X., Li, Q., Jiang, C., Jiang, Y. y Wei, X. (2017). *Haloactinomyces albus* gen. nov., sp. nov., isolated from Dead Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **10** (en prensa).

Landry, J. C. y Jaccard, J. (1984). Chimie des eaux libres dans le marais salant de Santa-Pola, salina de Bras del Port. *Revista del Instituto de Investigaciones Geológicas* **38/39**, 37-53.

Lanjekar, V. B., Marathe, N. P., Shouche Y. S. y Ranade, D. R. (2015). *Clostridium punense* sp. nov. an obligate anaerobic bacteria isolated from healthy human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65**, 4749-4756.

Lanyi, J. K. (1974). Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriological Reviews* **38**, 272-290.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.

Larsen, H. (1986). Halophilic and halotolerant microorganisms, an overview and historical perspective. *FEMS Microbiology Reviews* **39**, 3-7.

Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saiki, R. K., Myambo, K. D., Drummond, R. y Gelfand, D. H. (1989). Isolation, characterization, and expression in *E. coli* of the DNA polymerase gene from the extreme thermophile, *Thermus aquaticus*. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 6427-6437.

Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saiki, R. K., Myambo, K. D., Drummond, R. and Gelfand, D. H. (1989). Isolation, characterization, and expression in *E. coli* of the DNA polymerase gene from the extreme thermophile, *Thermus aquaticus*. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 6427-6437.

Leboulanger, C., Agogué, H., Bernard, C., Bouvy, M., Carré, C., Cellamare, M., Duval, C., Fouilland, E., Got, P., Intertaglia, L., Lavergne, C., Le Floc'h, E., Roques, C. y Sarazin, G. (2017). Microbial Diversity and Cyanobacterial Production in Dziani Dzaha Crater Lake, a Unique Tropical Thalassohaline Environment. *PLoS One* **1**, e0168879.

Lee, I., Kim, Y.O., Park, S., Chun, J. (2016) OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **66**, 110–113.

Legault, B. A., Lopez-Lopez, A., Alba-Casado, J. C., Doolittle, W. F., Bolhuis, H., Rodríguez-Valera, F. y Papke, R. T. (2006). Environmental genomics of “*Haloquadratum walsbyi*” in a saltern crystallizer indicates a large pool of accessory genes in an otherwise coherent species. *BMC Genomics* **7**, 171.

León, M. J., Fernández, A. B., Ghai, R., Sánchez-Porro, C., Rodríguez-Valera, F. y Ventosa, A. (2014). From metagenomics to pure culture: Isolation and characterization of the moderately halophilic bacterium *Spiribacter salinus* gen. nov., sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology* **80**, 3850-3857.

León, M. J., Martínez-Checa, F., Ventosa, A. y Sánchez-Porro, C. (2015). *Idiomarina aquatica* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from Spanish salterns. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **12**, 4595-4600.

León, M. J., Sánchez-Porro, C., de la Haba, R. R., Llamas, I. y Ventosa, A. (2014). *Larsenia salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Halomonadaceae* based on multilocus sequence analysis. *Systematic and Applied Microbiology* **37**, 480-487.

León, M. J., Vera-Gargallo, B., Sánchez-Porro, C. y Ventosa, A. (2016). *Spiribacter roseus* sp. nov., a moderately halophilic species of the genus *Spiribacter* from salterns. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **10**, 4218-4224.

Li, C., Zhao, J. L., Wang Y. T., Han, X. y Liu, N. (2009). Synthesis of cyclopropane fatty acid and its effect on freeze-drying survival of *Lactobacillus bulgaricus* L2 at different growth conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **25**, 1659-1665.

Li, X., Huang, Y. y Whitman, W. B. (2015). The relationship of the whole genome sequence identity to DNA hybridization varies between genera of prokaryotes. *Antonie Van Leeuwenhoek* **107**, 241-249.

Liao, Y., Williams, T. J., Walsh, J. C., Ji, M., Poljak, A., Curmi, P. M., Duggin, I. G. y Cavicchioli, R. (2016). Developing a genetic manipulation system for the Antarctic archaeon, *Halorubrum lacusprofundi*. investigating acetamidase gene function. *Life (Basel)* **3**, 511-534.

Litchfield, C. D., Irby, A. y Vreeland, R. H. (1999). The microbial ecology of solar salt plants. In: Microbiology and biogeochemistry of hypersaline environments. Oren, A. CRC Press, Boca Raton, pp. 39-52.

Llamas, I., Sánchez, M. J., Argandoña, M., Béjar, V., Quesada, E. y del Moral, A. (2002). Analysis of the genome of the moderate halophile *Halomonas eurihalina*. *Curr Microbiol.* **45**, 233-239.

López-García, P., Abad, J. P., Smith, C. y Amils, R. (1992). Genomic organization of the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. physical map of the chromosome. *Nucleic Acids Research* **20**, 2459-2464.

López-Pérez, M., Ghai, R., León, M. J., Rodríguez-Olmos, Á., Copa-Patiño, J. L., Soliveri, J., Sánchez-Porro, C., Ventosa, A. y Rodríguez-Valera, F. (2013). Genomes of "Spiribacter", a streamlined, successful halophilic bacterium. *BMC Genomics* **14**, 787.

Ludwig, W. y Schleifer, K. H. (1994). Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Letters* **15**, 155-173.

Ludwig, W. y Schleifer, K. H. (1999). Phylogeny of bacteria beyond the 16S rRNA standard. *ASM News* **65**,752-757.

Ludwig, W. y Strunk, O. (1997). ARB: A software environment for sequence data. *Nucleic Acid Research* **32**, 1363-1371.

Ludwig, W. y Strunk, O. (1997). ARB: A software environment for sequence data. *Nucleic Acid Research* **32**, 1363-1371.

Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M. y Schleifer, K. H. (1998). Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**, 554-568.

Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M. y Schleifer, K. H. (1998). Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**, 554-568.

Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H. Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lüssmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A. y Schleifer, K. H. (2004). ARB: A software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* **32**, 1363-1371.

Luo, C., Rodríguez-R L. M. y Konstantinidis, K. T. (2013). A user's guide to quantitative and comparative analysis of metagenomic datasets. *Methods in Enzymology* **521**, 525-547.

Luque, R., Béjar, V., Quesada, E. y Llamas, I. (2014) Diversity of halophilic bacteria isolated from Rambla Salada, Murcia (Spain). *Canadian Journal of Microbiology* **60**, 839-846.

Luque, R., González-Domenech, C. M., Llamas, I., Quesada, E. y Béjar, V. (2012). Diversity of culturable halophilic archaea isolated from Rambla Salada, Murcia (Spain). *Extremophiles* **16**, 205-213.

Ma, B. y Gong, J. (2013). A meta-analysis of the publicly available bacterial and archaeal sequence diversity in saline soils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **29**, 2325-2334.

Maes, A. y Verschaeve, L. (2016). Genetic damage in humans exposed to extremely low-frequency electromagnetic fields. *Archives of Toxicology* **10**, 2337-2348.

Margesin, R. y Schinner, F. (2001) Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* **5**, 73-83.

Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y. J., Chen, Z., Dewell, S. B., Du, L., Fierro, J. M., Gomes, X. V., Godwin, B. C., He, W., Helgesen, S., Ho, C. H., Irzyk, G. P., Jando, S. C., Alenquer, M. L., Jarvie, T. P., Jirage, K. B., Kim, J. B., Knight, J. R., Lanza, J. R., Leamon, J. H., Lefkowitz, S. M., Lei, M., Li, J., Lohman, K. L., Lu, H., Makhijani, V. B., McDade, K. E., McKenna, M. P., Myers, E. W., Nickerson, E., Nobile, J. R., Plant, R., Puc, B. P., Ronan, M. T., Roth, G. T., Sarkis, G. J., Simons, J. F., Simpson, J. W., Srinivasan, M., Tartaro, K. R., Tomasz, A., Vogt, K. A., Volkmer, G. A., Wang, S. H., Wang, Y., Weiner, M. P., Yu, P., Begley, R. F. Rothberg, J. M. (2006). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **7057**, 376-380.

Marini, A., Reinelt, K., Krutmann, J. y Bilstein, A. (2014). Ectoine-containing cream in the treatment of mild to moderate atopic dermatitis: a randomised, comparator-controlled, intra-individual double-blind, multicenter trial. *Skin Pharmacol Physiol* **27**, 57-65.

Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *Journal of Molecular Biology* **3**, 208-218.

Marmur, J. y Doty, P. (1962). Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *Journal of Molecular Biology* **5**, 109-118.

Marti, E. y Balcázar, J. L. (2015). *Aeromonas rivipollensis* sp. nov., a novel species isolated from aquatic samples. *Journal of Basic Microbiology* **55**, 1435-1439.

McGenity, T. J. y Oren, A. (2012). Life in saline environments. Bell, E. M. Life at Extremes. Environments, Organisms and Strategies for Survival. *CABI International*, 402-437.

Mehrshad, M., Amoozegar, M. A., Makhdoumi, A., Shahzadeh, Fazeli S. A., Farahani, H., Asadi, B., Schumann, P. y Ventosa, A. (2015). *Halosiccatus urmianus* gen. nov., sp. nov., a novel haloarchaeon from a salt lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **66**, 725-730

Meier-Kolthoff, J. P., Hahnke, R. L., Petersen, J., Scheuner, C., Michael, V., Fiebig, A., Rohde, C., Rohde, M., Fartmann, B., Goodwin, L.A., Chertkov, O., Reddy, T., Pati, A., Ivanova, N.N., Markowitz, V., Kyrpides, N. C., Woyke, T., Göker, M. y Klenk, H-P. (2014). Complete genome sequence of DSM 30083^T, the type strain (U5/41T) of *Escherichia coli*, and a proposal for delineating subspecies in microbial taxonomy. *Standards in Genomic Sciences* **10**, 2.

Mellado, E. y Ventosa, A. (2003). Biotechnological potential of moderately and extremely halophilic microorganisms. Barredo, J. L. *Microorganisms for health care, food and enzyme production*. Research Signpost, Kerala pp. 233-256.

Mellado, E., García, M. T., Nieto, J. J., Kaplan, S. y Ventosa, A. (1997). Analysis of the genome of *Vibrio costicola*: pulsed-field gel electrophoretic analysis of the genome size and plasmid content. *Systematic and Applied Microbiology* **20**, 20-26.

Mellado, E., García, M. T., Roldan, E., Nieto, J. J. y Ventosa, A. (1998). Analysis of the genome of the Gram-negative moderate halophiles *Halomonas* and *Chromohalobacter* by using pulsed-field gel electrophoresis. *Extremophiles* **2**, 435-438.

Mellado, E., Moore, E. R. B., Nieto J. J. y Ventosa, A. (1996). Analysis of 16S rRNA gene sequences of *Vibrio costicola* strains: description of *Salinivibrio costicola* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **46**, 81.

Mesbah, N. M. y Wiegel, J. (2008). Life at extreme limits: The anaerobic halophilic alkalithermophiles. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1125**, 44-57. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 2042-2048.

Mesbah, N. M. y Wiegel, J. (2012). Life under multiple extreme conditions: Diversity and physiology of the halophilic alkalithermophiles. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 4074-4082.

Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E. M., Kubal, M., Paczian, T., Rodriguez, A., Stevens, R., Wilke, A., Wilkening, J. y Edwards, R. A. (2008). The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* **19**, 386.

Miller, J. R., Koren, S. y Sutton, G. (2010). Assembly algorithms for next-generation sequencing data. *Genomics* **95**, 315-327.

Mirete, S., Mora-Ruiz, M. R., Lamprecht-Grandío, M., de Figueras, C. G., Rosselló-Móra, R. y González-Pastor, J. E. (2015). Salt resistance genes revealed by functional metagenomics from brines and moderate-salinity rhizosphere within a hypersaline environment. *Frontiers in Microbiology* **6**, 1121.

Mokhtarnejad, L., Arzanlou, M., Babai-Ahari, A., Di Mauro, S., Onofri, A., Buzzini, P., Turchetti, B. (2016). Characterization of basidiomycetous yeasts in hypersaline soils of the Urmia Lake National Park, Iran. *Extremophiles* **6**, 915-928.

Montalvo-Rodríguez, R., López-Garriga, J., Vreeland, R. H., Oren, A., Ventosa, A. y Kamekura, M. (2000) *Haloterrigena thermotolerans* sp. nov., a halophilic archaeon from Puerto Rico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 1065-1071

Montalvo-Rodríguez, R., Vreeland, R. H., Oren, A., Kessel, M., Betancourt, C. y López-Garriga, J. (1998). *Halogeometricum borinquense* gen. nov., sp. nov., a novel halophilic archaeon from Puerto Rico. *International Journal of Systematic Bacteriology* **4**, 1305-1312.

Moreno, M. L., García, T., Ventosa, A. y Mellado, E. (2009) Characterization of *Salicola* sp. IC10, a lipase- and protease-producing extreme halophile. *FEMS Microbiology Ecology* **68**, 59-71.

Moreno, M. L., García, M. T., Ventosa, A., Iglesias-Guerra, F. y Mellado, E. (2010). The extremely halophilic bacterium *Salicola marasensis* IC10 accumulates the compatible solute betaine. *Systematic and Applied Microbiology* **33**, 308-310.

Moriya, Y., Itoh, M., Okuda, S., Yoshizawa, A. y Kanehisa M. (2007). KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Research* **35**, 182-185.

Morón Monge, M^a del Carmen. Aproximación a la evolución reciente (1980-1994) de las marismas del poniente onubense. Evaluación de la incidencia de la actividad antrópica en la evolución natural de las marismas de los ríos Odiel, Piedras y Guadiana-Carreras. Estimación de espacios-hábitats para colonias de espátulas ("Platalea leucorodia") de Marismas del Odiel. 99-157.

Mota, R. R., Márquez, M. C., Arahál, D. R., Mellado, E. y Ventosa, A. (1997). Polyphasic taxonomy of *Nesterenkonia halobia*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 1231-1235.

Motlagh, A. M., Bhattacharjee, A. S., Coutinho, F. H., Dutilh, B. E., Casjens, S.R. y Goel, R. K. (2017). Insights of Phage-Host Interaction in Hypersaline Ecosystem through Metagenomics Analyses. *Frontiers in Microbiology* **8**, 352

Müller, V. y Köcher, S. (2011). Adapting to changing salinities: biochemistry, genetics, and regulation in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*. Horikoshi, K. *Extremophiles Handbook*. Springer-Verlag, Heidelberg. Vol 1. pp. 384-400.

Müller, V. y Oren, A. (2003). Metabolism of chloride in halophilic prokaryotes. *Extremophiles* **7**, 261-266.

Mullis, K. B. y Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**, 335-350.

Muyzer, G., De Waal, E. C. y Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 695-700.

Najnin, T., Siddiqui, K. S., Taha, T., Elkaid, N., Kornfeld, G., Curmi, P. M. y Cavicchioli, R. (2016). Characterization of a temperature-responsive two component

regulatory system from the Antarctic archaeon, *Methanococcoides burtonii*. *Scientific Reports* **6**, 24278.

Namsaraev, Z., Akimov, V., Tsapin, A., Barinova, E., Nealson, K. y Gorlenko, V. (2009). *Marinospirillum celere* sp. nov., a novel haloalkaliphilic, helical bacterium isolated from Mono Lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 2329-2332.

Narasingarao, P., Podell, S., Ugalde, J. A., Brochier-Armanet, C., Emerson, J. B., Brocks, J. J., Heidelberg, K. B., Banfield, J. F. y Allen, E. E. (2012). *De novo* metagenomic assembly reveals abundant novel major lineage of *Archaea* in hypersaline microbial communities. *The ISME Journal* **6**, 81-93.

Navarro-Noya, Y. E., Valenzuela-Encinas, C., Sandoval-Yuriar, A., Jiménez-Bueno, N. G., Marsch, R. y Dendooven, L. (2015). Archaeal communities in a heterogeneous Hypersaline-Alkaline soil. *Archaea* **2015**, 646820.

O'Connor, E. M, y Shand, R. F. (2002). Halocins and sulfolobocins: the emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **28**, 23–31.

Oh, D., Porter, K., Russ, B., Burns, D. y Dyall-Smith, M. (2010). Diversity of *Haloquadratum* and other *haloarchaea* in three, geographically distant, Australian saltern crystallizer ponds. *Extremophiles* **14**, 161-169.

Oliveira, L. C., Ramos, P. L., Marem, A., Kondo, M. Y., Rocha, R. C., Bertolini, T., Silveira, M. A., da Cruz, J. B., de Vasconcellos, S. P., Juliano, L. y Okamoto, D. N. (2015). Halotolerant bacteria in the São Paulo Zoo composting process and their hydrolases and bioproducts. *Brazilian Journal of Microbiology* **46**, 347-354.

Oren, A. (1983). Population dynamics of halobacteria in the Dead Sea water column. *Limnology Oceanography* **28**, 1094-1103.

Oren, A. (1988). The microbial ecology of the Dead Sea. K. C. Marshall. *Advances in Microbial Ecology*, vol. 10. Plenum Publishing, New York, pp. 193-229.

- Oren, A.** (1999). Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**, 334-348.
- Oren, A.** (2002). Molecular ecology of extremely halophilic *Archaea* and *Bacteria*. *FEMS Microbiology Ecology* **39**, 1-7.
- Oren, A.** (2002b). Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **28**, 58-63.
- Oren, A.** (2006). Life at high salt concentrations. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer K. H. y Stackebrandt, E., The prokaryotes. *A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology and Biochemistry*, vol. 2. Springer, New York, pp. 263-282.
- Oren, A.** (2007). Life in the Dead Sea - past, present and future. Navon, O. Salt of the Earth, vol. 3. Magnes Press, Jerusalem.
- Oren, A.** (2008). Microbial life at high salt concentrations: Phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* **4**, 2.
- Oren, A.** (2010a). Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental Technology* **31**, 825-834.
- Oren, A.** (2010b). Diversity of halophiles. Horikoshi, K., Antranikian, G., Bull, A., Robb, F. y Stetter, K. Extremophiles Handbook. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Oren, A.** (2011). Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations. *Environmental Microbiology* **13**, 1908-1923.
- Oren, A.** (2012). Taxonomy of the family *Halobacteriaceae*: A paradigm for changing concepts in prokaryote systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**, 263-271.
- Oren, A.** (2013). Life at high salt concentrations, intracellular KCl concentrations, and acidic proteomes. *Frontiers in Microbiology* **4**, 315.

Oren, A. (2015). Comments on: "A polyphasic approach leading to the revision of the genus *Planktothrix* (Cyanobacteria) and its type species, *P. agardhii*, and proposal for integrating the emended valid botanical taxa, as well as three new species, *Planktothrix paucivesiculata* sp. nov.(ICNP), *Planktothrix tepida* sp. nov.(ICNP), and *Planktothrixserta* sp. nov.(ICNP), as genus and species names with nomenclature standing under the ICNP," by V. Gaget, M. Welker, R. Rippka, and N. Tandeau de Marsac, *Syst. Appl. Microbiol.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2015.02.004>. *Systematic and Applied Microbiology* **3**, 159-160.

Oren, A. (2015). Halophilic microbial communities and their environments. *Current Opinion in Biotechnology* **33C**, 119-124.

Oren, A., Arahál, D. R. y Ventosa, A. (2009). Emended descriptions of genera of the family *Halobacteriaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 637-642.

Oueriaghli, N., González-Domenech, C. M., Martínez-Checa, F., Muyzer, G., Ventosa, A., Quesada, E. y Béjar, V. (2014). Diversity and distribution of *Halomonas* in Rambla Salada, a hypersaline environment in the southeast of Spain. *FEMS Microbiology Ecology* **87**, 460-474.

Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A. R., Xia, F. y Stevens, R. (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research* **42**, 206-214

Owen, R. J. y Hill, L. R. (1979). The estimation of base compositions, base pairing and genome size of bacterial deoxyribonucleic acids. Skinner, F. A. y Lovelock D. W. *Identification Methods for Microbiologists*, 2nd edition. Academic Press, London, United Kingdom, pp. 217-296.

Owen, R. J. y Pitcher, D. (1985). Current methods for estimating DNA base composition and levels of DNA-DNA hybridization. Goodfellow, M. y Minnikinn, D. E. *Chemical Methods in Bacterial Systematic*. Academic Press, London, pp. 67-93.

- Pandit, A. S., Joshi, M. N., Bhargava, P., Shaikh, I., Ayachit, G. N., Raj, S. R., Saxena, A. K. y Bagatharia, S. B.** (2015). A snapshot of microbial communities from the Kutch: one of the largest salt deserts in the World. *Extremophiles* **19**, 973-987.
- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P. Tyson, G. W.** (2014). Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research* **25**, 1043-1055.
- Pascual, J., Macián, M. M., Arahál, D. R., Garay, E. y Pujalte, M. J.** (2010). Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes. *International Journal of Systematic Bacteriology* **60**, 154-165.
- Pašić, L., Rodríguez-Mueller, B., Martin-Cuadrado, A. B., Mira, A., Rohwer, F. y Rodríguez-Valera, F.** (2009). Metagenomic islands of hyperhalophiles: the case of *Salinibacter ruber*. *BMC Genomics* **10**, 570.
- Pastor, J. M., Salvador, M., Argandoña, M., Bernal, V., Reina-Bueno, M., Csonka, L. N., Iborra, J. L., Vargas, C., Nieto, J. J. y Cánovas, M.** (2010). Ectoines in cell stress protection: Uses and biotechnological production. *Biotechnology Advances* **28**, 782-801.
- Pedrós-Alió, C., Calderón-Paz, J. I., Maclean, M. H., Medina, G., Marrasé, C., Gasol, J. M. y Guixa-Boixereu, N.** (2000). The microbial food web along salinity gradients. *FEMS Microbiology Ecology* **32**, 143-155.
- Peña, A., Teeling, H., Huerta-Cepas, J., Santos, F., Yarza, P., Brito-Echeverría, J., Lucio, M., chmitt-Kopplin, P., Meseguer, I., Schenowitz, C., Dossat, C., Barbe, V., Dopazo, J., Rosselló-Mora, R., Schüler, M., löckner, F. O., Amann, R., Gabaldón, T. y Antón, J.** (2010). Fine-scale evolution: genomic, phenotypic ecological differentiation in two coexisting *Salinibacter ruber* strains. *ISME Journal* **4**, 882-895.
- Peng, Y., Leung, H. C., Yiu, S. M. y Chin, F. Y.** (2012). IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics* **28**, 1420-1428.

Penny, D. y Poole, A. (1999). The nature of the last universal common ancestor. *Current Opinion in Genetics and Development* **9**, 672-677.

Pérez, D., Martín, S., Fernández-Lorente, G., Filice, M., Guisán, J. M., Ventosa, A., García, M. T. y Mellado, E. (2011). A novel halophilic lipase, LipBL, showing high efficiency in the production of eicosapentaenoic acid (EPA). *PLoS One* **6**, 1-11.

Pérez-Davó, A., Aguilera, M., Ramos-Cormenzana, A. y Monteoliva-Sánchez M. (2014). *Alkalibacillus almallahensis* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from an inland solar saltern. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**, 2066-2067.

Pérez-Sancho, M., Vela, A. I., García-Seco, T., González, S., Domínguez, L. y Fernández-Garayzábal, J. F. (2017). Usefulness of MALDI-TOF MS as a Diagnostic Tool for the Identification of Streptococcus Species Recovered from Clinical Specimens of Pigs. *PLoS One*. **1**, e0170784.

Pérez-Sancho, M., Vela, A. I., García-Seco, T., Gottschalk, M., Domínguez, L. y Fernández-Garayzábal, J. F. (2015). Assessment of MALDI-TOF MS as alternative tool for *Streptococcus suis* identification. *Frontiers in Public Health* **3**, 202.

Pietilä, M. K., Demina, T. A., Atanasova, N. S., Oksanen, H. M. y Bamford, D. H. (2014). Archaeal viruses and bacteriophages: Comparisons and contrasts. *Trends in Microbiology* **22**, 334-344.

Pikuta, E. V. y Hoover, R. B. (2007). Microbial extremophiles at the limits of life. *Critical Reviews in Microbiology* **33**, 183-209.

Podell, S., Ugalde, J. A, Narasingarao, P., Banfield, J. F., Heidelberg, K. B. y Allen, E. E. (2013). Assembly-driven community genomics of a hypersaline microbial ecosystem. *PLoS One* **8**, e61692.

Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* **25**, 1253-1256.

Post, F. J. (1977). The microbial ecology of the Great Salt Lake. *Microbial Ecology* **3**, 143-165.

Potter, S. C., Clarke, L., Curwen, V., Keenan, S., Mongin, E., Searle, S. M., Stabenau, A., Storey, R. y Clamp, M. (2004). The ensembl analysis pipeline. *Genome Research* **14**, 934-941.

Prangishvili, D. (2013). The wonderful world of archaeal viruses. *Annual Review of Microbiology* **67**, 565-585.

Purdy, K. J., Cresswell-Maynard, T. D., Nedwell, D. B., McGenity, T. J., Grant, W. D., Timmis, K. N. y Embley, T. M. (2004). Isolation of *haloarchaea* that grow at low salinities. *Environmental Microbiology* **6**, 591-595.

Quesada, E., Ventosa, A., Rodríguez-Valera, F. y Ramos-Cormenzana, A. (1982). Types and properties of some bacteria isolated from hypersaline soils. *Journal of Applied Bacteriology* **53**, 155-161.

R Amils R, Fernández-Remolar D, The Ipbst Team. (2014). Río tinto: a geochemical and mineralogical terrestrial analogue of Mars. *Life* (Basel). **3**, 511-534.

Rademaker, J. L. W. y de Bruijn, F. J. (1997). Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. Caetano-Anollés, G., y Gresshoff, P. M. *DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews* Vol. USA, pp. 151-171.

Ram Mohan, N., Fullmer, M. S., Makkay, A. M., Wheeler, R., Ventosa, A., Naor, A., Gogarten, J. P. y Papke, R. T. (2014). Evidence from phylogenetic and genome fingerprinting analyses suggests rapidly changing variation in *Halorubrum* and *Haloarcula* populations. *Frontiers in Microbiology* **5**, 143.

Rameshkumar, N., Fukui, Y., Sawabe, T. y Nair, S. (2008). *Vibrio porteresiae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a mangrove-associated wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka). *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**, 1608-1615.

Ramos-Cormenzana, A. (1989). Ecological distribution and biotechnological potential of halophilic microorganisms. Da Costa, M. S., Duarte, J. C. y Williams, R. A. D. *Microbiology of Extreme Environments and its Potential for Biotechnology*. Elsevier Applied Science, London pp. 289-309.

Raveendran, S., Palaninathan, V., Nagaoka, Y., Fukuda, T., Iwai, S., Higashi, T., Mizuki, T., Sakamoto, Y., Mohanan, P. V., Maekawa, T. y Kumar, D. S. (2015). Extremophilic polysaccharide nanoparticles for cancer nanotherapy and evaluation of antioxidant properties. *International Journal of Biological Macromolecules* **76**, 310-319.

Raymann, K., Brochier-Armanet, C. y Gribaldo, S. (2015). The two-domain tree of life is linked to a new root for the Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 6670-6675.

Reina-Bueno, M., Argandoña, M., Salvador, M., Rodríguez-Moya, J., Iglesias-Guerra, F., Csonka, L. N., Nieto, J. J. y Vargas, C. (2012). Role of trehalose in salinity and temperature tolerance in the model halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *PLoS One* **7**, e33587.

Richter, M. y Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 19126- 19131.

Riemann, L., Steward, G. F., Fandino, L. B., Campbell, L., Landry, M. R. y Azam, F. (1999). Bacterial community composition during two consecutive NE Monsoon periods in the Arabian Sea studied by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of rRNA genes. *Deep Sea Research* **2**, 1791-1811.

Roberts, M. F. (2004). Osmoadaptation and osmoregulation in archaea: Update 2004. *Frontiers in Bioscience* **9**, 1999-2019.

Rodríguez-Moya, J., Argandoña, M., Reina-Bueno, M., Nieto, J. J., Iglesias-Guerra, F., Jebbar, M. y Vargas, C. (2010). Involvement of EupR, a response regulator of the NarL/FixJ family, in the control of the uptake of the compatible solutes ectoines by the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *BMC Microbiology* **10**, 256.

Rodríguez-Valera, F. (1988). Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. Rodríguez-Valera, F. *Halophilic Bacteria*. CRC Press, Boca Raton, pp. 3-30.

- Rodríguez-Valera, F.** (1992). Biotechnological potential of halobacteria. *Biochemical Society Symposia* **58**,135-147.
- Rodríguez-Valera, F.** (1993). Introduction to saline environments. Vreeland, R. H. y Hochstein, L.. *The Biology of Halophilic Bacteria*. CRC Press, Boca Raton, pp. 1-23.
- Rodríguez-Valera, F. y Ruiz-Berraquero, F.** (1983). Halobacterias. Investigación y Ciencia **80**, 94 102.
- Rodríguez-Valera, F., Ventosa, A., Juez, G. y Imhoff, J. F.** (1985). Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern. *Microbial Ecology* **11**, 107-115.
- Romano, I., Gambacorta, A., Lama, L., Nicolaus, B. y Giordano, A.** (2005) *Salinivibrio costicola* subsp. *alcaliphilus* subsp. nov., a haloalkaliphilic aerobe from Campania Region (Italy). *Systematic and Applied Microbiology* **28**, 34-42.
- Rosselló-Móra, R. A., Lalucat, J. y Garcia-Valdes, E.** (1994). Comparative biochemical and genetic analysis of naphthalene degradation among *Pseudomonas stutzeri* strains. *Applied Environmental Microbiology* **60**, 966- 972.
- Rosselló-Mora, R. y Amann, R.** (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.* **1**, 39-67.
- Rothschild, L. J. y Mancinelli R.** (2001). Life in extreme environments. *Nature* **409**, 1092-1101.
- Russell, N. J.** (1989). Adaptive modifications in membranes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **21**, 93-113.
- Russell, N. J. y Kogut, M.** (1985). Haloadaptation: Salt sensing and cellenvelope changes. *Microbiological Sciences* **2**, 345-350.
- Ryzhow, V. y Fenselau, C.** (2001). Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. *Analytical Chemistry* **4**, 746-50.
- Saitou, N. y Nei, M.** (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425.

Salar-García, M. J., Bernal, V., Pastor, J. M., Salvador, M., Argandoña, M., Nieto, J. J., Vargas, C. y Cánovas, M. (2017). Understanding the interplay of carbon and nitrogen supply for ectoines production and metabolic overflow in high density cultures of *Chromohalobacter salexigens*. *Microbial Cell Factories* **1**, 23.

Salvador, M., Argandoña, M., Pastor, J. M., Bernal, V., Cánovas, M., Csonka, L. N., Nieto, J. J. y Vargas, C. (2015). Contribution of RpoS to metabolic efficiency and ectoines synthesis during the osmo- and heat-stress response in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *Environmental Microbiology Reports* **2**, 301-311.

Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sánchez-Nieves, R., Facciotti, M. T., Saavedra-Collado, S., Dávila-Santiago, L., Rodríguez-Carrero, R. y Montalvo-Rodríguez, R. (2016b). Draft genome sequence of *Halorubrum tropicale* strain V5, a novel halophilic archaeon isolated from the solar salterns of Cabo Rojo, Puerto Rico. *Genom Data* **7**, 284-286.

Sánchez-Nieves, R., Facciotti, M., Saavedra-Collado, S., Dávila-Santiago, L., Rodríguez-Carrero, R. y Montalvo-Rodríguez, R. (2017). Draft genome of *Haloarcula rubripromontorii* strain SL3, a novel halophilic archaeon isolated from the solar salterns of Cabo Rojo, Puerto Rico. *Genom Data* **7**, 287-289.

Sánchez-Porro, C., Amoozegar, M. A., Rohban, R., Hajighasemi, M. y Ventosa, A. (2009) *Thalassobacillus cyri* sp. nov., a moderately halophilic Gram-positive bacterium from a hypersaline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 2565–2570.

Sánchez-Porro, C., de la Haba, R. R., Soto-Ramírez, N., Márquez, M. C., Montalvo-Rodríguez, R. y Ventosa A. (2009). Description of *Kushneria aurantia* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Halomonadaceae, and a proposal for reclassification of *Halomonas marisflavi* as *Kushneria marisflavi* comb. nov., of *Halomonas indalinina* as *Kushneria indalinina* comb. nov. and of *Halomonas avicenniae* as *Kushneria avicenniae* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 397-405

Santos, F. Yarza, P., Parro, V., Meseguer, I. Inmaculada, Rosselló-Móra, R. y Antón, J. (2012). Culture-independent approaches for studying viruses from hypersaline environments. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 1635-1643.

Sarvari, S., Seyedjafari, E., Amoozgar, M. A. y Bakhshandeh, B. (2015). The effect of moderately halophilic bacteria supernatant on proliferation and apoptosis of cancer cells and mesenchymal stem cells. *Cellular and Molecular Biology* **3**, 30-4.

Sasser, M. (1990). Identification of *bacteria* by gas chromatography of cellular fatty acids, *MIDI Technical*

Saum, S. H., Pfeiffer, F., Palm, P., Rampp, M., Schuster, S. C., Müller, V. y Oesterhelt, D. (2012). Chloride and organic osmolytes: a hybrid strategy to cope with elevated salinities by the moderately halophilic, chloride-dependent bacterium *Halobacillus halophilus*. *Environmental Microbiology* **15**, 1619-1633

Sawabe, T., Kita-Tsukamoto, K. y Thompson, F. L. (2007). Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis. *Journal of Bacteriology* **189**, 7932-7936.

Sawabe, T., Ogura, Y., Matsumura, Y., Feng, G., Amin, A. R., Mino, S., Nakagawa, S., Sawabe, T., Kumar, R., Fukui, Y., Satomi, M., Matsushima, R., Thompson, F. L., Gómez-Gil, B., Christen, R., Maruyama, F., Kurokawa, K. y Hayashi, T. (2013). Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. *Frontiers in Microbiology* **4**, 14.

Schapira, M., Buscot, M., Leterme, S. C., Pollet, T., Chapperon, C. y Seuront, L. (2009). Distribution of heterotrophic bacteria and virus-like particles along a salinity gradient in a hypersaline coastal lagoon. *Aquatic Microbial Ecology* **54**, 171-183.

Schwibbert, K., Marin-Sanguino, A., Bagyan, I., Heidrich, G., Lentzen, G., Seitz, H., Rampp, M., Schuster, S. C., Klenk, H. P., Pfeiffer, F., Oesterhelt, D. y Kunte, H. J. (2011) A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581T. *Environmental Microbiology* **13**, 1973-1994.

Selvarajan, R., Sibanda, T., Tekere, M., Nyoni, H. y Meddows-Taylor, S. (2017). Diversity Analysis and Bioresource Characterization of Halophilic Bacteria Isolated from a South African Saltpan. *Molecules* **4**.

Severin, J., Wohlfarth, A., Galinski, E. A. (1992). The predominant role of the recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of the halophilic eubacteria. *Journal General Microbiology* **138**, 1629-1638.

Shen, P. S., Domek, M. J., Sanz-Garcia, E., Makaju, A., Taylor, R. M., Hoggan, R., Cumber, M. D., Oberg, C. J., Breakwell, D. P., Prince, J. T. y Belnap, D. M. (2012). Sequence and structural characterization of Great Salt Lake bacteriophage CW02, a member of the T7-Like supergroup. *Journal of Virology* **86**, 7907- 7917.

Sikorski, J., Rosselló-Móra, R. & Lorenz, M. G. (1999). Analysis of genotypic diversity and relationships among *Pseudomonas stutzeri* strains by PCR-based genomic fingerprinting and multilocus enzyme electrophoresis. *Systematic and Applied Microbiology* **22**, 393-402.

Sime-Ngando, T., Lucas, S., Robin, A., Tucker, K.P., Colombet, J., Bettarel, Y., Desmond, E., Gribaldo, S., Forterre, P., Breitbart, M. y Prangishvili, D. (2011). Diversity of virus-host systems in hypersaline Lake Retba, Senegal. *Environmental Microbiology* **13**, 1956-1972.

Singh, R. y Reynolds, K. A. (2016). Identification and Characterization of FabA from the Type II Fatty Acid Synthase of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Natural Products* **79**, 240-243.

Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K. y Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology* **6**, 791.

Sneath, P. H. A. (1989). Numerical taxonomy. Williams, S. T., Sharpe, M. E. y Holt, J. G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, MD: Williams and Wilkins. Vol 4, pp. 2303-2305.

Sneath, P. H. A. y Sokal, R. R. (1973). Numerical Taxonomy. San Francisco, CA: W.H. Freeman and Company.

Soto-Ramírez, N., Sánchez-Porro, C., Rosas, S., González, W., Quiñones, M., Ventosa, A. y Montalvo-Rodríguez, R. (2007). *Halomonas avicenniae* sp. nov., isolated from the salty leaves of the black mangrove *Avicennia germinans* in Puerto Rico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **5**, 900-905.

Soto-Ramírez, N., Sánchez-Porro, C., Rosas-Padilla, S., Almodóvar, K., Jiménez, G., Machado-Rodríguez, M., Zapata, M., Ventosa, A. y Montalvo-Rodríguez, R. (2008). *Halobacillus mangrovi* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from the black mangrove *Avicennia germinans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **1**, 125-130.

Srinivas, T. N. R., Anil Kumar, P., Sasikala, Ch., Ramana, Ch. V. y Imhoff, J. F. (2007). *Rhodobium gokarnense* sp. nov., a novel phototrophic alphaproteobacterium from a saltern. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 932-935.

Stackebrandt, E. y Goebel, B. M. (1994). Taxonomic Note: a place for DNADNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **44**, 846-849.

Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A. D., Kämpfer, P., Maiden, M. C. J., Nesme, X., Rosselló-Móra, R., Swings, J., Trüper, H. G., Vauterin, L., Ward, A. C. y Whitman, W. B. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 1043-1047.

Staley, J. T. (2006). The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept. *Philosophical Transactions of the Royal Society. B.* **361**, 1899-1909.

Stan-Lotter, H. (2012). Physico-chemical boundaries of life, In *Adaptation of Microbial Life to Environmental Extremes*. Stan-Lotter, H. y Fendrihan, S. Springer Verlag, pp. 1-19.

Stein, L. (2001) Genome annotation: from sequence to biology. *Nature Reviews Genetics* **2**, 493-503.

Strillinger, E, Grötzinger, S. W., Allers, T., Eppinger, J. y Weuster-Botz, D. (2015). Production of halophilic proteins using *Haloferax volcanii* H1895 in a stirred-tank bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **3**, 1183-1195.

Subov, N. N. (1931). Oceanographical tables. Commissariat of agriculture of URSS. Hydro-Meteorological Committee of URSS. Moscow: Oceanographical Institute of URSS.

Sutton, G. C., Russell, N. J. y Quinn, P. J. (1991). The effect of salinity on the phase behaviour of total lipid extracts and binary mixtures of the major fosfolipids isolated from a moderately halophilic eubacterium. *Biochimica et Biophysica Acta* **1061**, 235-246.

Talon, R., Coquelle, N., Madern, D. y Girard, E. (2014). An experimental point of view on hydration/solvation in halophilic proteins. *Frontiers in Microbiology* **5**, 66.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. y Kumar, S. (2013), MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 2725-2729.

Tan, Y., Wu, M., Liu, H., Dong, X., Guo, Z., Song, Z., Li Y., Cui Y., Song Y., Du, Z. y Yang, R. (2010). Cellular fatty acids as chemical markers for differentiation of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Letters in Applied Microbiology* **50**, 104-111.

Thomas, J. M., Ghebrendrias, N. y Rawat, M. (2017). Genome Sequences of Two Spore-Forming Bacteria Isolated from the Shore of Mono Lake, California. *Genome Announcements* **5**,10.

Thompson, C. C., Amaral, G. R., Campeão, M., Edwards, R. A., Polz, M. F., Dutilh, B. E., Ussery, D. W., Sawabe, T., Swings, J. y Thompson, F. L. (2015). Microbial taxonomy in the post-genomic era: rebuilding from scratch? *Archives of Microbiology* **3**, 359-370.

Thompson, C. C., Thompson, F. L. y Vicente, A. C. (2008). Identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* by multilocus sequence analysis (MLSA). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**, 617-621.

Thompson, F. L., Gevers, D., Thompson, C. C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B., Munn, C. B. y Swings, J. (2005). Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 5107-5115.

Thompson, F. L., Gomez-Gil, B., Ribeiro-Vasconcelos, A. T. y Sawabe, T. (2007). Multilocus sequence analysis reveals that *Vibrio harveyi* and *Vibrio campbellii* form distinct species. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 4279-4285

Thompson, F. L., Iida, T. y Swings, J. (2004). Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**, 403-431.

Thompson, F. y Hoste, B. (2001). Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. *Systematic and Applied Microbiology* **24**, 520-538.

Tindall, B. J. (1988). Prokaryotic life in the alkaline, saline, athalassic environment. Rodríguez-Valera, F. Halophilic bacteria. CRC Press, Boca Raton, pp. 31-67.

Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H. J., Ludwig, W. y Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**, 249-266.

Tripp, H. J., Sutton, G., White, O., Wortman, J., Pati, A., Mikhailova, N., Ovchinnikova, G., Payne, S. H., Kyrpides, N. C. y Ivanova, N. (2015). Toward a standard in structural genome annotation for prokaryotes. *Standards in Genomic Sciences* **10**, 45.

Trüper, H. G. y Galinski, E. A. (1986). Concentrated brines as habitats for microorganisms. *Experientia* **42**, 1182-1187.

Trüper, H. G. y Schleifer, K. H. (1992). Prokaryote characterization and identification. Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. y Schleifer, K. H. The Prokaryotes Second Edition. Berlin: Springer-Verlag pp. 126-148.

Tschitschko, B., Williams, T. J., Allen, M. A., Zhong, L., Raftery, M. J. y Cavicchioli, R. (2016). Ecophysiological Distinctions of Haloarchaea from a Hypersaline Antarctic Lake as Determined by Metaproteomics. *Applied and Environmental Microbiology* **11**, 3165-3173.

Urbanczyk, H., Ast, J. C., Higgins, M. J., Carson, J. y Dunlap, P. V. (2007). Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 2823-2829.

Ursing, J. B., Rosselló-Móra, R., García-Valdes, E. y Lalucat, J. (1995). Taxonomic note: a pragmatic approach to the nomenclature of phenotypically similar genomic groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **45**, 604.

Valderrama, M. J., Quesada, E., Bejar, V., Ventosa, A., Gutiérrez, M. C., Ruiz-Berraquero, F. y Ramos-Cormenzana, A. (1991). *Deleya salina* sp. nov., a moderately halophilic gram-negative bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* **41**, 377-384.

Van Regenmortel, M. H., Bishop, D. H., Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J. & Calisher, C. H. (1997). Guidelines to the demarcation of virus species. *Archives of Virology* **142**, 1505-1518.

Vandamme, P. y Peeters, C. (2014). Time to revisit polyphasic taxonomy. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **1**, 57-65.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews* **60**, 407-438.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. y Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews* **60**, 407-438.

Vargas, C., Argandoña, M., Reina-Bueno, M., Rodríguez-Moya, J., Fernández-Aunión, C. y Nieto, J. J. (2008). Unravelling the adaptation responses to osmotic and

temperature stress in *Chromohalobacter salexigens*, a bacterium with broad salinity tolerance. *Saline Systems* **4**, 14.

Vargas, C., Calderón, M. I., Capote, N., Carrasco, R., García, R., Morón, M. J., Ventosa, A. y Nieto, J. J. (2004). Genetics of osmoadaptation by accumulation of compatible solutes in the moderate halophile *Chromohalobacter salexigens*. Its potential in agriculture under osmotic stress conditions. A. Ventosa. Halophilic Microorganisms. Springer-Verlag, Berlin, pp. 135-153.

Vauclare, P., Marty, V., Fabiani, E., Martinez, N., Jasnin, M., Gabel, F., Peters, J., Zaco, G. y Franzetti, B. (2015). Molecular adaptation and salt stress response of *Halobacterium salinarum* cells revealed by neutron spectroscopy. *Extremophiles* **19**, 1099-1107.

Ventosa, A. (1988). Taxonomy of moderately halophilic heterophilic eubacteria. F. Rodríguez-Valera. Halophilic Bacteria. CRC Press, Boca Raton, pp. 71-84.

Ventosa, A. (1993). Taxonomy of Gram-positive moderately halophilic cocci. *Experientia* **49**, 1055-1058.

Ventosa, A. (1994). Taxonomy and phylogeny of moderately halophilic bacteria. Priest, F. G., Ramos-Cormenzana, A. y Tindall, B. J. Bacterial Diversity and Systematics. Plenum Press, New York, pp. 231-242.

Ventosa, A. (2006). Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environments. Logan, N. A., Lappin-Scott, H. M. y Oyston, P. C. F. Prokaryotic Diversity: Mechanism and Significance. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 223-253.

Ventosa, A. y Arahall, D. R. (2002a). Halophily (halophilism and halophilic microorganisms). Gerday, C. y Glansdorff, N. (eds.). *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. UNESCO Publishing-Eolss Publishers, Oxford, pp. 10010-10019.

Ventosa, A. y Arahall, D. R. (2002b). Physico-chemical characteristics of hypersaline environments and their biodiversity. Gerday, C. y Glansdorff, N. *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. UNESCO Publishing-Eolss Publishers, Oxford, pp. 10020-10031.

Ventosa, A. y Nieto, J. J. (1995). Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **11**, 85-94.

Ventosa, A., de la Haba, R. R., Sánchez-Porro, C. y Papke, R. T. (2015). Microbial diversity of hypersaline environments: A metagenomic approach. *Current Opinion in Microbiology* **25**, 80-87.

Ventosa, A., Fernández, A. B., León, M. J., Sánchez-Porro, C. y Rodríguez-Valera, F. (2014). The Santa Pola saltern as a model for studying the microbiota of hypersaline environments. *Extremophiles* **18**, 811-824.

Ventosa, A., Gutierrez, M. C., Garcia, M. T. y Ruiz-Berraquero, F. (1989). Classification of *Chromobacterium marismortui* in a new genus, *Chromohalobacter* gen. nov., as *Chromohalobacter marismortui* comb. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* **39**, 382-386.

Ventosa, A., Márquez, M. C., Ruiz-Berraquero, F. y Kocur, M. (1990). *Salinicoccus roseus* gen. nov., sp. nov., a new moderately halophilic Gram-Positive coccus. *Systematic and Applied Microbiology* **13**, 29-33.

Ventosa, A., Márquez, M. C., Sánchez-Porro, C. y De la Haba, R. R. (2012). Taxonomy of Halophilic *Archaea* and *Bacteria*. Vreeland, R. H. *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms*, Springer, Belle Haven, VA, USA, pp. 59-80.

Ventosa, A., Mellado, E., Sánchez-Porro, C. y Márquez, M. C. (2008). Halophilic and Halotolerant Micro-Organisms from Soils. Dion, P. y Nautiyal, C. S. *Microbiology of Extreme Soils*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 87-115.

Ventosa, A., Quesada, E., Rodríguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F. y Ramos-Cormenzana, A. (1982). Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. *Journal of General Microbiology* **128**, 1959- 1968.

Versalovic, J., Koeth, T. y Lupski, R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* **19**, 6823-6831.

Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. y Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* **5**, 25-40.

Viver, T., Cifuentes, A., Díaz, S., Rodríguez-Valdecantos, G., González, B., Antón, J. y Rosselló-Móra, R. (2015). Diversity of extremely halophilic cultivable prokaryotes in Mediterranean, Atlantic and Pacific solar salterns: Evidence that unexplored sites constitute sources of cultivable novelty. *Systematic and Applied Microbiology* **38**, 266-275.

Volcani, B. E. (1940). Studies on the microflora of the Dead Sea. PhD Thesis. The Hebrew University of Jerusalem.

Vreeland, R. H. (1987). Mechanisms of halotolerance in microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology* **14**, 311-356.

Wang, X., Liu, X., Zhao, C., Ding Y. y Xu, P. (2011). Biodiesel production in packed-bed reactors using lipasenanoparticle biocomposite. *Bioresource Technology* **102**, 6352-6355.

Wang, Y. N., Cai, H., Chi, C. Q., Lu, A. H., Lin, X. G., Jiang, Z. F. y Wu, X. L. (2007). *Halomonas shengliensis* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, crude-oil-utilizing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 1222-1226.

Ward, D. M. (1998). A natural species concept for prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology* **1**, 271-277.

Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. y Truper, H. G. (1987). Report of the ad hoc Committee on reconciliation of approaches to Bacterial Systematics. *International journal of systematic bacteriology* **37**, 463-464.

Welsh, D. T. (2000). Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: From single cells to global climate. *FEMS Microbiology Reviews* **24**, 263-290.

Werkhäuser, N., Bilstein, A. y Sonnemann, U. (2014) Treatment of allergic rhinitis with ectoine containing nasal spray and eye drops in comparison with azelastine containing nasal spray and eye drops or with cromoglycic Acid containing nasal spray. *Journal of Allergy*, 176597.

Wertz, J. E., Goldstone, C., Gordon, D. M. y Riley, M. A. (2003). A molecular phylogeny of enteric bacteria and implications for a bacterial species concept. *Journal of Evolutionary Biology* **6**, 1236-1248.

Widderich, N., Höppner, A., Pittelkow, M., Heider, J., Smits, S. H. y Bremer, E. (2014). Biochemical properties of ectoine hydroxylases from extremophiles and their wider taxonomic distribution among microorganisms. *PLoS One* **4**, e93809.

Williams, T. J., Allen, M. A., Demaere, M. Z., Kyrpides, N. C., Tringe, S. G., Woyke, T. y Cavicchioli, R. (2014). Microbial ecology of an Antarctic hypersaline lake: Genomic assessment of ecophysiology among dominant haloarchaea. *The ISME Journal* **8**, 1-14.

Williams, T. J., Liao, Y., Ye, J., Kuchel, R. P., Poljak, A., Raftery, M. J. y Cavicchioli, R. (2017). Cold adaptation of the Antarctic haloarchaea *Halohasta litchfieldiae* and *Halorubrum lacusprofundi*. *Environmental Microbiology* (en prensa).

Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *FEMS Microbiology Letters* **51**, 221-271.

Woese, C. R. y Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5088-5090.

Woese, C. R., Fox, G. E., Zablen, L., Uchida, T., Bonen, L., Pechman, K., Lewis, B. J. y Stahl, D. (1975). Conservation of primary structure in 16s ribosomal RNA. *Nature* **254**, 83-86.

Woese, C. R., Kandler, O. y Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eukarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 4576-4579.

Wohlfarth, A., Severin, J. y Galinski, E. A. (1990). The spectrum of compatible solutes in heterotropic halophilic eubacteria of the family *Halomonadaceae*. *Journal of general microbiology Society for general microbiology* **136**, 705-712.

Wood, J. M. (2011). Bacterial Osmoregulation: A paradigm for the study of cellular homeostasis. *Annual Review of Microbiology* **65**, 215-238.

Yakimov, M. M., Giuliano, L., Chernikova, T. N., Gentile, G., Abraham, W. R., Lunsdorf, H., Timmis, K. N. y Golyshin, P. N. (2001). *Alcalilimnicola halodurans* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, moderately halophilic and extremely halotolerant bacterium, isolated from sediments of soda-depositing Lake Natron, East Africa Rift Valley. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**, 2133-2143.

Yakimov, M. M., La Cono, V., Spada, G. L., Bortoluzzi, G., Messina, E., Smedile, F., Arcadi, E., Borghini, M., Ferrer, M., Schmitt-Kopplin, P., Hertkorn, N., Cray, J. A., Hallsworth, J. E., Golyshin, P. N. y Giuliano, L. (2015). Microbial community of the deep-sea brine Lake Kryos seawater-brine interface is active below the chaotropicity limit of life as revealed by recovery of mRNA. *Environmental Microbiology* **2**, 364-382.

Yancey, P.H. (1994). Compatible and counteracting solutes, p. 81-109. Strange, K. Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation. Boca Raton: CRC Press.

Yang, X., Liu, X., Chen, S., Liu, G., Wu, S. y Wan, C. (2016). Volatile Fatty Acids Production from Codigestion of Food Waste and Sewage Sludge Based on β -Cyclodextrins and Alkaline Treatments. *Archaea* 1683-1639.

Yi, H., Cho Y. J. Yoon, S. H., Park, S. C. y Chun, J. (2012). Comparative genomics of *Neisseria weaver* clarifies the taxonomy of this species and identifies genetic determinants that may be associated with virulence. *FEMS Microbiology Letters* **328**, 100-105.

Yoo, H. Y., Simkhada, J. R., Cho, S. S., Park, D. H., Kim, S. W., Seong, C. N. y Yoo, J. C. (2011). A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production. *Bioresource Technology* **102**, 6104-6111.

Yoo, H. Y., Simkhada, J. R., Cho, S. S., Park, D. H., Kim, S. W., Seong, C. N. y Yoo, J. C. (2011). A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production. *Bioresource Technology* **102**, 6104-6111.

Zhu, D., Cui, S. y Nagata, S. (2008). Isolation and characterization of salt-sensitive mutants of the moderately halophilic bacterium *Salinivibrio costicola* subsp. *yaniae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **72**, 1977-1982.

Zhu, W., Lomsadze, A. y Borodovsky, M. (2010). Ab initio gene identification in metagenomic sequences. *Nucleic Acids Research* **38**, 132.

Zhuang, Y., Clamp, J. C., Yi, Z. y Ji, D. (2016). A new Peritrich Ciliate from a Hypersaline Habitat in Northern China. *Zootaxa* **1**, 179-186.

