

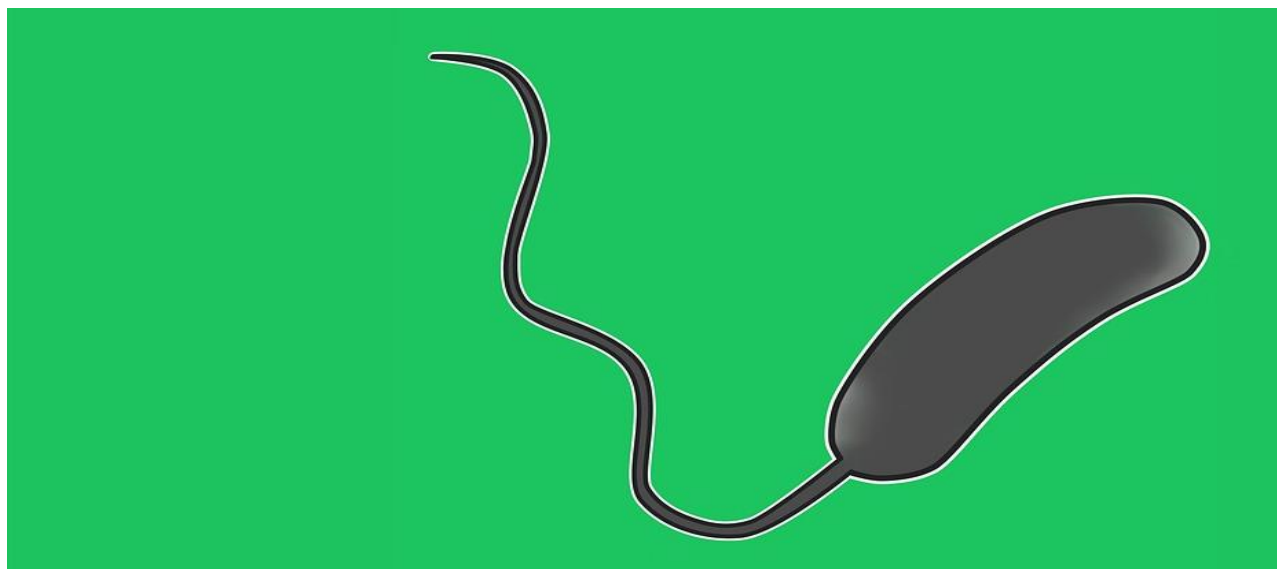


Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

Trabajo Fin de Grado Experimental
Doble Grado en Farmacia y Óptica y Optometría

CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA Y FILOGENÓMICA DE *SALINIVIBRIO SOCOMPENSIS* SP. NOV.



Cristina Galisteo Gómez

Sevilla, junio 2018



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

Trabajo Fin de Grado Experimental

**CARACTERIZACIÓN
TAXONÓMICA Y FILOGENÓMICA DE
SALINIVIBRIO SOCOMPENSIS SP. NOV.**

Cristina Galisteo Gómez

Doble Grado en Farmacia y Óptica y Optometría

Departamento de Microbiología y Parasitología

Tutores: Cristina Sánchez-Porro Álvarez Fdo.:

Antonio Ventosa Ucero Fdo.:

Sevilla, junio de 2018

RESUMEN

Se conocen como bacterias halófilas aquellas que requieren condiciones salinas para crecer y que presentan un óptimo de crecimiento al 5-15% de sales, pudiendo además existir otros factores extremos. Entre estos microorganismos encontramos al género *Salinivibrio*, caracterizado por ser bacilos curvados Gram-negativos, anaerobios facultativos, móviles, con crecimiento en un rango de salinidad de 1-20%, un rango de pH de 5-10 y un rango de temperatura de 5-45°C. El contenido en G+C del ADN es de 49,4-50,5 moles%. Actualmente, cuenta con cinco especies y dos subespecies. El trabajo de Gorriti et al. (2014) describe una cepa que podría constituir una posible nueva especie aislada del lago alcalino Socompa (Argentina). En el presente estudio se ha llevado a cabo una completa caracterización polifásica de dicha cepa. Para ello, se ha comparado el gen ARNr 16S con las secuencias presentes en las bases de datos y posteriormente se realizó un estudio del core-genoma de dicho microorganismo que sugiere que constituye una nueva especie del género *Salinivibrio*. Dicho estudio se completó mediante el cálculo de los índices ANIb, ANIm e hibridación ADN-ADN *in silico*. Simultáneamente, se realizó una caracterización fenotípica que ha permitido determinar que presenta un óptimo de NaCl del 7-7,5%, un óptimo de pH de 7,5-8, y que coincide con las otras especies del género en su capacidad para producir catalasa y oxidasa y otras características bioquímicas, pero presenta diferencias con respecto a dichas especies. Por último, cuenta con un perfil de ácidos grasos donde C16:0 y C18:1 son mayoritarios, al igual que otras especies del género *Salinivibrio*. Los resultados obtenidos indican que la cepa S35 constituye una nueva especie para la que proponemos la denominación de *Salinivibrio socompensis* sp. nov.

Palabras claves: *Salinivibrio*, taxonomía bacteriana, bacterias halófilas, *Salinivibrio socompensis*.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. AMBIENTES EXTREMOS.....	7
1.1.1. Ambientes hipersalinos	7
1.2. MICROORGANISMOS HALÓFILOS	7
1.2.1. Clasificación	8
1.2.2. Mecanismos de osmorregulación	8
1.2.3. Aplicaciones industriales.....	9
1.3. CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA	9
1.3.1. Caracterización fenotípica	10
1.3.2. Caracterización filogenética	10
1.3.3. Caracterización genómica.....	10
1.3.4. Caracterización quimiotaxonómica	11
1.4. GÉNERO <i>SALINIVIBRIO</i>	11
1.5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y GENÓMICO DEL GÉNERO <i>SALINIVIBRIO</i>	11
1.6. RODOPSINAS	13
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL Y MÉTODOS	15
3.1. MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	15
3.2. MEDIOS DE CULTIVO	15
3.2.1. Preparación de stock de sales	15
3.2.2. Medio SW7,5	15
3.2.3. Medio 1	16
3.3. CONSERVACIÓN DE CEPAS	16
3.4. CARACTERIZACIÓN POLIFÁSICA	16
3.4.1. Caracterización filogenética	16
3.4.1.1. Extracción de ADN	16
3.4.1.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	16
3.4.1.3. Electroforesis en gel de agarosa	16
3.4.1.4. Purificación del ADN	17
3.4.1.5. Secuenciación del ADN.....	17
3.4.1.6. Análisis de la secuencia del gen ARNr 16S	17
3.4.2. Caracterización genómica	18
3.4.2.1. Obtención de genomas.....	18
3.4.2.2. Core-genoma	18

3.4.2.3. Determinación de los índices ANI.....	18
3.4.2.4. Hibridación ADN-ADN <i>in silico</i> (GDDC).....	18
3.4.3. Caracterización fenotípica.....	19
3.4.3.1. Morfología y motilidad.....	19
3.4.3.2. Características fisiológicas	19
3.4.3.3. Características bioquímicas	19
3.4.3.4. Características nutricionales	22
3.4.4. Caracterización quimiotaxonómica.....	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
4.1. CULTIVO Y COMPROBACIÓN DE LAS CEPAS	24
4.2. CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA.....	24
4.3. CARACTERIZACIÓN GENÓMICA	25
4.3.1. Core-genoma	26
4.3.2. Índices ANI	26
4.3.3. Hibridación ADN-ADN <i>in silico</i> (GDDC)	27
4.4. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	27
4.4.1. Morfología y motilidad	27
4.4.2. Características fisiológicas.....	27
4.4.2.1. Rango y óptimo salino.....	27
4.4.2.2. Rango y óptimo de pH.....	28
4.4.2.3. Rango y óptimo de temperatura.....	29
4.4.3. Características bioquímicas.....	29
4.4.4. Características nutricionales.....	30
4.5. CARACTERIZACIÓN QUIMIOTAXONÓMICA	31
4.6. DESCRIPCIÓN DE <i>SALINIVIBRIO SOCOMPENSIS</i> SP. NOV.	31
5. CONCLUSIONES	32
6. BIBLIOGRAFÍA	33

1. INTRODUCCIÓN

1.1. AMBIENTES EXTREMOS

El concepto de ambiente extremo fue definido por Brock (1979) como “ambientes en los que existe una escasa diversidad de especies y en los que están ausentes algunos grupos taxonómicos”. En la actualidad, se ha demostrado que la diversidad es mayor de lo que se pensaba. Aunque sigue sin ser fácil definirlo, se puede considerar aquel ambiente con valores extremos en uno o varios de los siguientes parámetros ambientales: temperatura, pH, radiación solar, concentración de nutrientes o metales tóxicos, oxígeno disuelto, presión hidrostática, potencial redox y actividad de agua o salinidad (Ventosa, 2006).

1.1.1. Ambientes hipersalinos

Entre los ambientes extremos encontramos los ambientes hipersalinos, en los cuales el elemento limitante principal es la alta concentración de sales. Sus habitantes son conocidos como “microorganismos halófilos”. A este se le pueden sumar otros factores como son la baja concentración de oxígeno disuelto, temperaturas extremas (ya sean muy altas o muy bajas), valores de pH muy alcalinos, pocos nutrientes en el medio o la presencia de compuestos tóxicos y metales pesados (Rodríguez-Valera, 1988). Hay casos en los que los microorganismos están adaptados a más de un ambiente extremo, y se les denomina “poliextremófilos” (Rothschild y Mancinelli, 2001).

Los ambientes hipersalinos más importantes son los sistemas acuáticos (lagos salinos y salinas) y los suelos hipersalinos, siendo los primeros los más estudiados (Ventosa et al., 2008). Además, también pueden encontrarse microorganismos halófilos en diversos hábitats de alta salinidad como son depósitos de sales, alimentos sazonados (pescados, carnes) o fermentados y pieles de animales (Ventosa, 2006). Centrándonos en los ambientes acuáticos, se consideran hipersalinos cuando la concentración de sales totales es igual o mayor a 3,5% (p/v) (Edgerton y Brimblecome, 1981). Se pueden clasificar en dos tipos: aguas talasosalinas y aguas atalasalinas. Las primeras poseen una composición similar al agua de mar ya que tienen un origen marino. Consecuentemente, predominan los iones monovalentes Cl^- y Na^+ (de la Haba et al., 2010). En cambio, las aguas atalasalinas tienen como origen la disolución de depósitos continentales y, en general, predominan los iones divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} . Son más heterogéneas que las atalasalinas (Rodríguez-Valera, 1993).

1.2. MICROORGANISMOS HALÓFILOS

Los microorganismos halófilos son aquellos que requieren ciertas cantidades de sales para crecer y que no sólo sobreviven, sino que prosperan en ambientes salinos o hipersalinos (Oren, 2002; Ventosa, 2006).

1. Introducción

1.2.1. Clasificación

Los microorganismos halófilos se clasificaron por Kushner y Kamekura (1988) atendiendo a la concentración de sal a la que su crecimiento es óptimo en las siguientes categorías:

- No halófilos: Presentan crecimiento óptimo en medios con una concentración de NaCl menor a 0,2 M (aprox. 1%). Algunos pueden tolerar concentraciones superiores y son conocidos como halotolerantes. Si esta concentración es superior a 2,5 M se denominan halotolerantes extremos.
- Halófilos débiles: Para estos microorganismos el crecimiento óptimo se alcanza a 0,2-0,5 M de NaCl (aprox. 1-3%).
- Halófilos moderados: Crecen de forma óptima en medios con 0,5-2,5 M (aprox. 3-15%) de NaCl.
- Halófilos extremos: El crecimiento óptimo se da a concentraciones de 2,5-5,2 M (aprox. 15-32%, saturación) de NaCl.

De forma clásica se han dividido los microorganismos halófilos en dos grupos: arqueas aerobias halófilas extremas (haloarqueas) y bacterias halófilas moderadas (de la Haba et al., 2010). Tradicionalmente las haloarqueas sólo incluían una familia (*Halobacteriaceae*) (Grant et al., 2001), pero en los últimos tiempos se ha propuesto una reclasificación y actualmente el orden *Halobacteriales* incluye tres familias: *Halobacteriaceae*, *Halococcaceae* y *Haloarculaceae* (Gupta et al., 2016). En cambio, las bacterias halófilas moderadas se encuentran en ocho phyla de los veintiocho en los que se divide el dominio *Bacteria*: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes*, *Bacteroidetes*, *Thermotoga*, *Cyanobacteria* y *Tenericutes* (de la Haba et al., 2010). Las especies más representativas se encuentran dentro de los géneros *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Salinibacter*, *Salinivibrio*, *Bacillus* y otros géneros relacionados (*Halobacillus*, *Virgibacillus*, *Lentibacillus*), *Salinicoccus*, *Halanaerobium*, *Spiribacter*, etc. (Ventosa, 2006; de la Haba et al., 2010). También se han descrito la presencia de bacterias halófilas extremas, siendo uno de sus máximos representantes las especies del género *Salinibacter* (Antón et al., 2002).

1.2.2. Mecanismos de osmorregulación

Los microorganismos halófilos requieren para su supervivencia concentraciones de sales considerables, lo cual, a su vez, las somete a diferentes tipos de estrés. Así pues, es necesaria una adaptación que les permita regular la presión osmótica de su interior respecto a la del exterior para evitar la deshidratación y consecuente ruptura celular (Wood, 2011).

Se conocen dos mecanismos de osmorregulación: *salt-in* y *salt-out*. El primer mecanismo consiste en mantener la concentración de sales inorgánicas en el citoplasma tan alta como la del exterior. La sal más frecuente es KCl. Este mecanismo es el más frecuentemente utilizado por

las arqueas halófilas extremas y algunas bacterias halófilas extremas. El mecanismo *salt-out*, que es el que presentan la mayoría de las bacterias halófilas moderadas, consiste en la acumulación de compuestos orgánicos específicos de bajo peso molecular, muy solubles y de carga neutra, que no interfieren con el metabolismo de la bacteria, que son conocidos como solutos compatibles (Brown, 1976).

1.2.3. Aplicaciones industriales

Los microorganismos halófilos cuentan con unas características fisiológicas y bioquímicas que les otorgan un gran potencial biotecnológico (Rodríguez-Valera, 1992). Entre las aplicaciones más interesantes se encuentra la producción de enzimas extracelulares (amilasas, lipasas, nucleasas, nucleotidasas y proteasas) (Ventosa et al., 2005), la biodegradación de contaminantes orgánicos (Borgne et al., 2008), la síntesis de exopolisacáridos, de interés en biopolímeros (Rodríguez-Valera, 1992; Ventosa et al., 1998) y la producción de halocinas (Rodríguez-Valera et al., 1982).

1.3. CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA

Se conoce como taxonomía a la ciencia que identifica, nombra y clasifica a los organismos según un criterio definido. La identificación permite situar a un organismo dentro de un taxón previamente descrito. Se entiende la clasificación como la organización de organismos en grupos cada vez más inclusivos en base a su parecido fenotípico o su parentesco evolutivo, siendo el grupo menos concreto el dominio, y el más concreto, la especie. Se habla de nomenclatura para referirse al proceso de asignar nombre a los grupos taxonómicos. Es el único de los tres procesos que está reglamentado, siguiendo las normas del *International Code of Nomenclature of Prokaryotes*. La taxonomía es una ciencia en constante movimiento por lo que es complicada una clasificación estable. La clasificación más aceptada por los microbiólogos son las que se presentan en las publicaciones *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* y *The Prokaryotes*. Actualmente, se puede consultar la nomenclatura válida a través de la red: *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* (<http://www.bacterio.net>), y *Bacterial Nomenclature Up-to-Date* (<http://www.dsmz.de>). La revista oficial encargada de publicar nuevas descripciones y los nuevos nombres de procariotas es el *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

En los últimos años, la taxonomía de procariotas (bacterias y arqueas) ha sufrido una gran evolución en sus métodos. Actualmente, se basa en estudios polifásicos de modo que se obtengan distintos tipos de información que permitan una visión amplia del microorganismo (Madigan et al., 2014). Se divide en cuatro metodologías: caracterización fenotípica, caracterización genómica, caracterización filogenética y caracterización quimiotaxonómica (López-Hermoso, 2017).

1. Introducción

1.3.1. Caracterización fenotípica

Las características fenotípicas incluyen características morfológicas como el aspecto de la colonia aislada, el tamaño y la forma celular, la movilidad, si produce o no endoesporas, etc. También lo son las características bioquímicas (fermentación de azúcares, necesidad de factores de crecimiento) y las fisiológicas (rangos y óptimos de temperatura, pH y concentración de sal para el crecimiento, respuesta al oxígeno) (Madigan et al., 2014). Para que sea posible su reproducibilidad, las pruebas deben seguir un protocolo estandarizado. Además, dado que los procariotas como *Salinivibrio* cuentan con características poco complejas (Schleifer, 2009), es interesante analizar el mayor número posible de características fenotípicas (Sneath, 1989).

1.3.2. Caracterización filogenética

Esta caracterización se refiere a la evolución de los organismos a lo largo de la historia (Madigan et al., 2014). Durante años, se ha estudiado el gen ARNr 16S como punto comparativo debido a su gran conservación (Ludwig y Schleifer, 1999) pero también presenta ciertos inconvenientes que están desplazando su uso por otras técnicas como el *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) o la secuenciación genómica completa. Este tipo de secuenciación permite la creación de árboles filogenéticos que representan la evolución histórica del microorganismo.

1.3.3. Caracterización genómica

Tradicionalmente la hibridación ADN-ADN (DDH) ha sido la técnica utilizada para poder clasificar a una cepa dentro de un taxón determinado, se considera que para que dos cepas estén filogenéticamente relacionadas a nivel de especie, el valor de hibridación entre ambas debe de ser igual o superior al 70% (Wayne et al., 1987; Stackebrandt y Goebel, 1994). Esta técnica presenta como inconveniente que su realización conlleva mucho trabajo y tiempo de realización y en los últimos tiempos está siendo sustituida, siempre que dispongamos de los genomas de las cepas de estudio y de referencia, por la herramienta bioinformática (hibridación ADN-ADN *in silico*) (Rosselló-Móra, 2006).

Otras alternativas al método experimental son los índices de Identidad Aminoacídica Media (AAI, Average Aminoacid Identity) e Identidad Nucleótida Media (ANI, Average Nucleotide Identity). El primero se centra en la relación filogenética mientras que el segundo determina la distancia filogenética. Para que dos cepas se consideren de la misma especie es necesario que el valor de este parámetro sea igual o superior al 95%. Es decir, el 95% equivale al 70% de la DDH (Richter y Roselló-Mora, 2009). Existen varios tipos de índices ANI: ANIb, que utiliza el algoritmo BLAST en genomas completos o incompletos (Konstantinidis y Tiedje, 2005) y ANIm, basado en el software MUMmer y trabaja con fragmentos grandes de material genético.

1.3.4. Caracterización quimiotaxonómica

Esta caracterización analiza la información sobre la constitución química de la bacteria. Al igual que en el análisis fenotípico es necesario que se realice en condiciones estandarizadas de cultivo para que las variaciones obtenidas se deban exclusivamente a diferencias genéticas (Goodfellow y O'Donnell, 1993).

1.4. GÉNERO *SALINIVIBRIO*

El género *Salinivibrio* pertenece a la familia *Vibrionaceae*, dentro del orden *Vibrionales*, de la clase *Gammaproteobacteria*, en el phylum *Proteobacteria* (Ventosa, 2015). En 1938, Smith aisló por primera vez la bacteria *Vibrio costicola* a partir de costillas de cerdo en salazón. Más tarde, también se aisló a partir de ambientes acuáticos hipersalinos (Ventosa et al., 1982). En 1996, Mellado et al. encontraron diferencias fenotípicas relevantes entre esta bacteria y otras del mismo género, además de una pobre relación filogenética entre ellas, por lo que se reclasificó en un nuevo género, *Salinivibrio*. Actualmente, el número de especies conocidas de este género ha aumentado, e incluye cinco especies: *Salinivibrio costicola*, con dos subespecies: *S. costicola* subsp. *costicola* (Smith, 1938; Mellado et al., 1996; Huang et al., 2000) y *S. costicola* subsp. *alcaliphilus* (Romano et al., 2005); hasta hace unos meses esta especie incluía también otra subespecie, *S. costicola* subsp. *vallismortis* (Huang et al., 2000), pero un reciente trabajo de nuestro grupo de investigación ha demostrado que realmente se trataba de una cepa perteneciente a la especie *S. proteolyticus* (López-Hermoso et al., 2018a); *S. proteolyticus* (Amoozegar et al., 2008), *S. siamensis* (Chamroensakri et al., 2009), *S. sharmensis* (Romano et al., 2011) y *S. kushneri* (López-Hermoso et al., 2018b).

Los miembros del género *Salinivibrio* se caracterizan por ser bacilos curvados Gram-negativos (0.5-0.6 x 1.0-3.2 µm). Pueden encontrarse aislados, en parejas o agrupados en forma de S o en espirales. Presentan un flagelo polar que permite su movilidad y no producen endoesporas. Son halófilos moderados, es decir, su concentración óptima de NaCl se encuentra entre 2,5-10% y su rango salino oscila entre el 1-20%. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, teniendo un rango entre 5-50°C. El pH óptimo está entre 7,3-7,5. Se trata de microorganismos anaerobios facultativos. Su ADN presenta un contenido de G+C de 49.4-50.5 moles% (Ventosa, 2015).

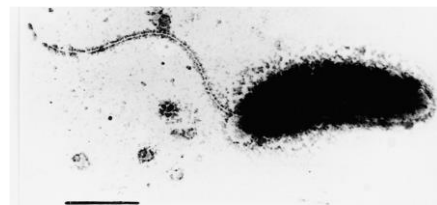


Figura 1. *Salinivibrio costicola* observado al microscopio electrónico (García et al., 1987).

1.5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y GENÓMICO DEL GÉNERO *SALINIVIBRIO*

López-Hermoso (2017) en su Tesis Doctoral llevó a cabo una profunda revisión del género *Salinivibrio*, habitante habitual de las salinas solares. Tras numerosos muestreos y aislamientos,

1. Introducción

a partir de diferentes ambientes hipersalinos, se obtuvo una colección de 70 cepas pertenecientes a este género. Además del estudio inicial basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S de estas cepas, junto con las cepas tipo de las especies y subespecies del género, se llevó a cabo un estudio de secuenciación multilócica MLSA (*MultiLocus Sequence Analysis*), basado en las secuencias individuales y concatenadas de los genes *gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD*, que permitió clasificarlas en cuatro filogrupos diferentes, a excepción de la cepa tipo de la especie *Salinivibrio sharmensis*, que no pudo ser incluida en ningún filogrupo, constituyendo, por tanto, un filotipo independiente del resto.

Con la finalidad de poder emplear este esquema MLSA con fines taxonómicos en la descripción de nuevas especies de *Salinivibrio*, se realizó una comparación y posterior validación de este estudio MLSA frente a los datos de hibridación ADN-ADN (DDH). En todos los casos, los valores de DDH confirmaron los filogrupos obtenidos en base al MLSA, constituyendo cada uno de ellos una especie diferente. Con estos resultados propuso una correlación entre los valores de MLSA y DDH, considerando un 97 % de semejanza entre la secuencia concatenada de los cuatro genes empleados como valor de corte para la delimitación de especies del género *Salinivibrio*. Para completar el estudio secuenció los genomas de 33 de estas cepas pertenecientes a distintos filogrupos y, según los diferentes índices de relación genómica (ANIb, ANIm, OrthoANI y DDH *in silico*) y tras un análisis filogenómico, se confirmaron nuevamente los filogrupos definidos anteriormente en base al MLSA (López-Hermoso et al., 2017). Estos estudios han llevado a la reclasificación de la especie *Salinivibrio costicola* subsp. *vallismortis*, como una sinonimia de la especie *S. proteolyticus* (López-Hermoso et al., 2018a), y a la descripción de una nueva especie, *Salinivibrio kushneri*, constituida por 10 cepas representativas (Figura 2) (López-Hermoso et al., 2018b).

En 2014, Gorriti et al. publicaron un trabajo en el que incluía un estudio comparativo de los genomas de tres cepas, designadas S34, S35 y S10B, pertenecientes al género *Salinivibrio* pero que no fueron caracterizadas taxonómicamente ni descritas formalmente como una nueva especie dentro de este género. El análisis de los genomas de estas tres cepas ha puesto de manifiesto la presencia de genes relacionados con rodopsinas en dichos genomas (ver apartado 1.6). En el trabajo se muestra el árbol filogenético del gen ARNr 16S de estas cepas y las más

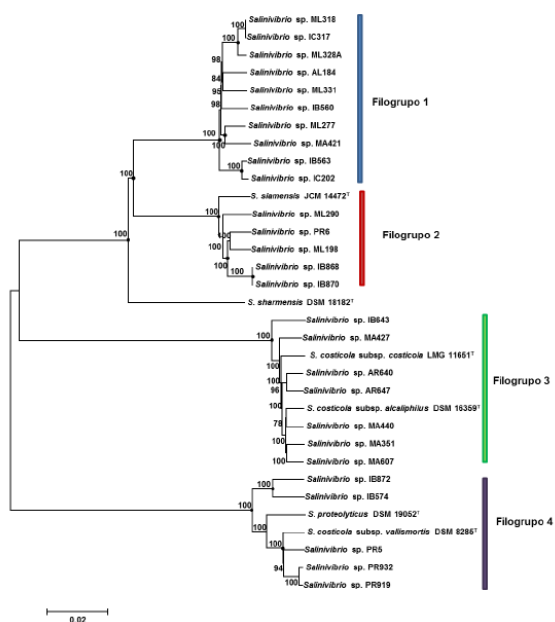


Figura 2. División en filogrupos de cepas del género *Salinivibrio* basado en el core-genoma (López-Hermoso, 2017).

relacionadas filogenéticamente (Figura 3). El análisis de este árbol muestra que estas tres cepas (S34, S35 y S10B) se encuentran dentro del género *Salinivibrio* pero en una rama lo suficientemente separada del resto y con un elevado valor de *bootstrap* que muestra que estas tres cepas podrían constituir una nueva especie dentro de este género. Dichas bacterias se aislaron del lago Socompa, un lago hipersalino andino, localizado en la base del volcán Socompa a 3.570 metros de altitud al noroeste de Argentina. Además de su elevada salinidad, este lago se caracteriza por su alcalinidad (pH 8,5) y un alto contenido en arsénico.

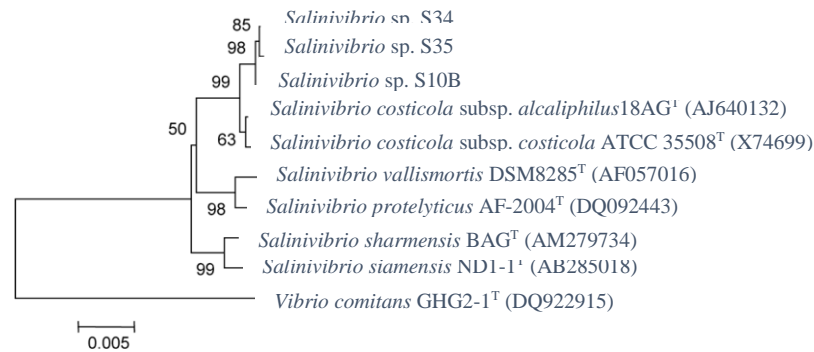


Figura 3. Árbol filogenético basado en el gen ARNr 16S y donde se observa que las nuevas cepas forman un filogruppo claramente diferenciado (Gorriti et al., 2014).

1.6. RODOPSINAS

Las rodopsinas son moléculas proteicas pigmentadas ancladas en la membrana. Están formadas por un solo polipéptido con siete hélices transmembrana y un cromóforo retiniano (Brown, 2014). Se conocen dos familias en la naturaleza: rodopsinas visuales y rodopsinas de arqueas y bacterias que contienen distintas secuencias y distinto origen. Las primeras mantienen una función sensorial en el reino animal. En cambio, las segundas se encuentran presentes en procariontes halófilos. Hay tres tipos de rodopsinas de arqueas: bacteriorrodopsinas, halorrodopsinas y rodopsinas sensoriales. Sus funciones son de bomba de protones, de bomba de cloruro y fotorrecepción, respectivamente (Oesterhelt y Stoeckenius, 1971; Hoff et al., 1997; Grigorieff et al., 1996; Lanyi, 1998). Otra forma de clasificar las rodopsinas consiste en dividir las rodopsinas sensoriales y rodopsinas de bombas de protones. Las sensoriales detectan la presencia de luz (Spudich, 2006) mientras que las de bomba de protones se encargan de la transferencia de iones regulada por la luz (Brown, 2014).

La identificación de rodopsinas de arqueas se realiza mediante el análisis de la secuencia genómica y se complementa con análisis bioquímico (Maresca et al., 2006). Esto es así porque la función fisiológica de la proteína no puede conocerse con seguridad únicamente por su secuencia genómica (Brown, 2014; Ugalde et al., 2011).

Por otra parte, se ha descrito rodopsinas de bacterias, encuadradas en los grupos: xantorrodopsinas, proteorrodopsinas y actinorrodopsinas (Ugalde et al., 2011; Gorriti et al., 2014).

2. OBJETIVOS

Basándonos en los recientes estudios sobre taxonomía del género *Salinivibrio*, el presente Trabajo Fin de Grado tiene como objetivo principal la caracterización polifásica completa de las nuevas cepas aisladas por Gorriti et al. (2014) y determinar si las mismas constituyen una nueva especie del género *Salinivibrio*. Concretamente los objetivos del presente Trabajo Fin de Grado son los siguientes:

1. Cultivo en condiciones de laboratorio y confirmación de que se trata de un cultivo puro de las cepas S34, S35 y S10B.
2. Caracterización filogenética basada en el gen ARNr 16S de la cepa S35, seleccionada como cepa tipo del grupo.
3. Caracterización genómica de la cepa S35.
4. Caracterización fenotípica de la cepa S35.
5. Caracterización quimiotaxonómica de la cepa S35.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MUESTRAS BIOLÓGICAS

En el presente Trabajo Fin de Grado se han utilizados las cepas de *Salinivibrio* que se muestran en la Tabla 1, procedentes de distintas colecciones de cultivo (CECT: Colección Española de Cultivo Tipo; DSM: German Collection of Microorganisms; JCM: Japan Collection of Microorganisms), y que se conservan en la colección de microorganismos halófilos del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla.

Las cepas S34, S35 y S10B fueron enviadas por la Doctora María E. Farías, del Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas de Lagunas Andinas (LIMLA), en Tucumán (Argentina) para su caracterización.

Tabla 1. Cepas utilizadas en este estudio.

CEPAS	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> CECT 4059 ^T	REFERENCIAS	Mellado et al. (1996)
	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359 ^T		Romano et al. (2005)
	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> DSM 19052 ^T		Amoozegar et al. (2008)
	<i>Salinivibrio siamensis</i> JCM 14472 ^T		Chamroensaksri et al. (2009)
	<i>Salinivibrio sharmensis</i> DSM 18182 ^T		Romano et al. (2011)
	<i>Salinivibrio kushneri</i> AL184 ^T		López-Hermoso et al (2018)
	Cepa S34		Gorriti et al. (2014)
	Cepa S35 ^T		Gorriti et al. (2014)
	Cepa S10B		Gorriti et al. (2014)

3.2. MEDIOS DE CULTIVO

3.2.1. Preparación de stock de sales

Para la preparación de los medios de cultivo se ha partido de un **stock de sales al 30%** (SW30), (Subov, 1931) a partir del cual se han realizado diluciones para obtener las concentraciones deseadas a las que posteriormente se añaden los nutrientes para la preparación de los medios de cultivo. La composición de este stock de sales se detalla a continuación:

NaCl	234,0 g
MgCl·6H ₂ O	39,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	61,0 g
KCl	6,0 g
NaBr	0,7 g
NaHCO ₃	0,2 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,0 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

3.2.2. Medio SW7,5

La concentración de sales óptima para el crecimiento de las cepas resultó de ser del 7,5%. Por ello, para su cultivo rutinario de las cepas se utilizó un medio con dicha concentración salina. Para su preparación, se diluyeron las sales SW30 hasta el 7,5% y se suplementó con extracto de levadura al 0,5%. En caso de desear que el medio fuese sólido, se adiciona agar al 2%. El medio así formulado se denomina medio SW7,5.

3. Material y métodos

3.2.3. Medio 1

Para la caracterización quimiotaxonómica se utilizó el medio 1, descrito por Romano et al. (2011).

3.3. CONSERVACIÓN DE CEPAS

Las cepas se conservaron rutinariamente en glicerol al 50% mediante congelación a -80°C . Para recuperarlas, se dejaron descongelar brevemente a temperatura ambiente. De cada vial se tomaron 20 μL y se depositan en una placa de Petri con medio SW7,5. Se sembraron en estrías y se incubaron a 37°C durante 7 días para darle tiempo suficiente para crecer. Posteriormente, se comprobó que solo creció un tipo de colonia, es decir, que se trataba de un cultivo puro.

3.4. CARACTERIZACIÓN POLIFÁSICA

3.4.1. Caracterización filogenética

3.4.1.1. Extracción de ADN

Para realizar la extracción de ADN de la cepa S35, se cultivó en medio SW7,5 líquido, a 37°C durante 48 horas y se utilizó el kit comercial G-spin™ Total DNA Extraction Kit (INtRON Biotechnology), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.4.1.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la amplificación del gen ARNr 16S de la cepa S35 se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando los cebadores que se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Cebadores utilizados en la reacción de PCR.

Cebador	Secuencia	Tm
16F27	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	60°C
16R1488	5'-CGGTTACCTTGTAGACTTCACC-3'	72°C

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL como se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición de la reacción de PCR.

Producto	Volumen
Tampón de la reacción 10X	5,0 μL
MgCl ₂	2,5 μL
dNTPs (1,25 mM cada dNTP)	8,0 μL
Cebador directo 16F27 (12 μM)	2,5 μL
Cebador reverso 16R1488 (12 μM)	2,5 μL
ADN muestra(250 ng/ μl)	1,0 μL
Taq ADN polimerasa	0,5 μL
Agua miliQ	28,0 μL

Las condiciones de la PCR se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de la PCR.

Fase	Duración, temperatura
Desnaturalización inicial	5 min, 95°C
25 x (Desnaturalización, Hibridación de los cebadores, Elongación)	25 x (1 min; 94°C, 1 min, 50°C, 2 min, 72°C)
Elongación final	10 min, 72°C

3.4.1.3. Electroforesis en gel de agarosa

Para comprobar tanto que la extracción del ADN como la amplificación del gen ARNr 16S se efectuó de manera correcta, se analizó una alícuota de la misma en gel de agarosa.

El gel de agarosa se preparó al 1% en tampón TAE 1x (Tris, acetato, EDTA) y se utilizó RedSafe (INtRON Biotechnology) para visualizar el ADN. Se “cargó” en el gel una alícuota de 3 µL de ADN o producto de PCR mezclada con tampón de carga (azul de bromofenol 0,25 % p/v y glicerol 30 %). Se sometió a una diferencia de potencial, y el ADN que está cargado negativamente migrará por el gel. Como marcador de pesos moleculares se utilizó 5 µL del marcador 1kb ladder.

3.4.1.4. Purificación del ADN

Una vez amplificado se procedió a la purificación del producto de PCR mediante el kit comercial MEGAquick-spin™ Plus (INtRON Biotechnology) y se siguió el protocolo facilitado por el fabricante. Se comprobó la purificación visualizándolo en gel de agarosa como se ha descrito en el apartado anterior.

3.4.1.5. Secuenciación del ADN

El fragmento del gen ARNr 16S amplificado se envió a la empresa Stab Vida, Oeiras, Portugal para su secuenciación. Para ello, además de los oligonucleótidos 16F27 y 16R1488 se utilizaron los oligonucleótidos 16R343 (ACTGCTGCCTCCCGTA) y 16F530 (GTGCCAGCAGCCGCGG), para obtener la secuencia completa de dicho gen.

Una vez secuenciado, se visualizó la secuencia mediante el programa ChromasPro Versión 1.5 (Technelysium Pty Ltd) y se hizo una corrección manual de los errores y/o posiciones ambiguas. Posteriormente se hizo el ensamblaje de las cadenas con este mismo programa. De esta forma, se obtuvo la secuencia casi completa del gen ARNr 16S.

3.4.1.6. Análisis de la secuencia del gen ARNr 16S

La secuencia obtenida se comparó con las depositadas en las bases de datos, disponible mediante la aplicación EzBioCloud.net.

Mediante el programa ARB y la base de datos LTPs_106_SSUse realizaron los alineamientos correspondientes entre las secuencias de la cepa S35 y las cepas más relacionadas filogenéticamente (Ludwig et al., 2004), los cuales se revisaron manualmente. A partir de las secuencias alineadas se obtuvo la matriz de distancia y se construyeron los correspondientes árboles filogenéticos utilizando el filtro “termini”. Para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizaron tres algoritmos: *neighbour-joining* (Saitou y Nei, 1987), *maximum-parsimony* (Fitch, 1971) y *maximum-likelihood* (Felsenstein, 1981).

3. Material y métodos

3.4.2. Caracterización genómica

3.4.2.1. Obtención de genomas

Los números de acceso de los genomas de las cepas tipo de las especies del género *Salinivibrio* así como de las cepas S34, S35 y S10B se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Número de acceso en Gen Bank del genoma de las cepas estudiadas.

CEPA	NÚMERO DE ACCESO
Cepa S34	GCA_000513735.1
Cepa S35	GCA_000513715.1
Cepa S10B	GCA_000565325.1
<i>S.costicola</i> subsp. <i>costicola</i> CECT 4059 ^T	GCA_000565345.1
<i>S. costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359 ^T	GCA_001996185.1
<i>S. proteolyticus</i> DSM 19052 ^T	GCA_001996165.1
<i>S. siamensis</i> JCM 14472 ^T	GCA_001996005.1
<i>S. sharmensis</i> DSM 18182 ^T	GCA_001995985.1
<i>S. kushneri</i> AL184 ^T	GCA_001995725.1

3.4.2.2. Core-genoma

El pangenoma (conjunto de todos los genes que posee un grupo de bacterias pertenecientes al mismo taxón) se define sobre la base del análisis del cluster de genes ortólogos (OGs) de cada genoma y se divide en tres categorías: (i) core-genoma, (ii) genoma variable y (iii) genes únicos. Para la determinación del core-genoma de las especies y cepas del género *Salinivibrio* se llevó a cabo una serie de *script de bash* personalizados para obtener una matriz con los genes ortólogos utilizando el algoritmo Markov Cluster. A continuación, se utilizó el script: *ogs.stats.rb*, que extrae las características del grupo de genes ortólogos, para seguidamente alinearlos mediante el programa Muscle. Los archivos generados se concatenaron con el script: *Aln.cat.rb*. Por último, se utilizó el archivo concatenado generado para construir el árbol filogenómico utilizando el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis Versión 7.0 (MEGA7) en base a las coincidencias de todos los genomas estudiados.

3.4.2.3. Determinación de los índices ANI

Los índices ANI (tanto ANIb como ANIm) se calcularon utilizando la herramienta bioinformática JSpeciesWS. La diferencia entre los parámetros reside en el algoritmo utilizado, considerándose el ANIm como el más rápido, preciso y robusto (Richter y Roselló-Mora, 2009).

3.4.2.4. Hibridación ADN-ADN *in silico*(GGDC)

Buscando sustituir la laboriosa técnica experimental de hibridación ADN-ADN, se ha llevado a cabo mediante un análisis bioinformático. Para ello, se ha utilizado la herramienta GGDC (Genome-to-Genome Distance Calculator) (Roselló-Móra, 2006).

3.4.3. Caracterización fenotípica

3.4.3.1. Morfología y motilidad

Las colonias se observaron a simple vista en placas de Petri con medio SW7,5 sólido en cultivos crecidos a su pH óptimo. La morfología y motilidad se determinó mediante microscopía de contraste de fases en preparación en fresco a partir de un cultivo líquido joven con las mismas características que el cultivo sólido. El microscopio utilizado fue Olympus BX41 con una cámara digital DP70.

3.4.3.2. Características fisiológicas

3.4.3.2.1. *Rango y crecimiento óptimo salino*

Se prepararon medios líquidos a distintas concentraciones salinas a partir del stock de sales al 30%. Para llevar a cabo la curva de crecimiento, los diferentes medios se inocularon de forma simultánea con 200 μ L de preinóculos preparados el día anterior de la cepa S35 (crecidos en medio SW7,5). Posteriormente, se realizaron



Figura 4. Medios a distintas concentraciones salinas incubados a 37°C con agitación.

medidas periódicas de absorbancia con un espectrofotómetro (ThermoSpectronics Spectronic 20D+) a 600 nm. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Las concentraciones salinas estudiadas fueron: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7,5, 8, 9, 10, 11, 12, 12,5, 13, 14, 15, 16, 17, 17,5, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25%.

3.4.3.2.2. *Rango y óptimo de pH*

Se siguió el mismo procedimiento que en el apartado anterior pero manteniendo constante la concentración de sal óptima en todos los medios (7,5%) y variando el pH de los medios de cultivo. Los pH estudiados fueron: 4, 5, 6, 7, 7,5, 8, 9 y 10.

3.4.3.2.3. *Rango y óptimo de temperatura*

Se prepararon medios líquidos del medio SW7,5 y se incubaron a 4°C, 15°C, 28°C, 37°C, 40°C, 45°C y 48°C para determinar el rango de crecimiento y el óptimo de temperatura.

3.4.3.2.4. *Crecimiento en anaerobiosis*

La cepa S35 se inoculó en medio SW7,5 sólido y se incubó en anaerobiosis utilizando campanas GasPak durante dos semanas.

3.4.3.3. Características bioquímicas

En todas las pruebas bioquímicas se utilizó el medio base SW7,5, al cual se ajustó el pH a 7,5 y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos. A las pruebas que se realizaron en medio

3. Material y métodos

sólido se les añadió agar hasta el 2%. Tras la inoculación a partir de un cultivo joven, se incubó a 37°C durante 5 días antes de realizar la lectura.

3.4.3.3.1. *Catalasa*

El objetivo de esta prueba es conocer si el microorganismo en cuestión posee la enzima catalasa. De ser así, al poner en contacto el cultivo joven con unas gotas de agua oxigenada al 3% (v/v), aparecerá burbujeo debido a la descomposición en agua y oxígeno (Cowan y Steel, 1965).

3.4.3.3.2. *Oxidasa*

En este caso se busca la enzima citocromo c oxidasa. Para comprobar su actividad, se utiliza el reactivo de Kovacs (1956), de modo que, al actuar la enzima, el compuesto adquiere una coloración azul violácea.

El cultivo joven se extiende sobre un papel de filtro con ayuda de un palillo estéril. Se depositan unas gotas del reactivo de Kovacs. Para que la prueba sea positiva, la coloración debe aparecer antes de 10 segundos.

3.4.3.3.3. *Hidrólisis de la gelatina*

Esta prueba permite detectar la presencia de la enzima gelatinasa. Para ello, se utilizó el método de Frazier (1926) modificado en placa y se empleó el medio recomendado por Sneath y Collins (1974) para cepas halófilas moderadas. Para la lectura se añadió a la placa el reactivo de Frazier (1926). La prueba es positiva si aparece un halo transparente alrededor del crecimiento.

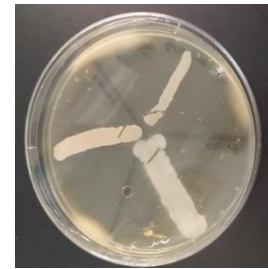


Figura 5. Prueba de hidrólisis de la gelatina positiva.

3.4.3.3.4. *Hidrólisis del almidón*

Se pretende determinar la presencia de enzimas amilasas, necesarias para hidrolizar el almidón a glucosa. Si la prueba es positiva aparecerá un halo transparente alrededor del crecimiento al añadir lugol a la placa (Cowan y Steel, 1965).



Figura 6. Prueba de hidrólisis del almidón con resultado negativo a la izquierda y positivo y la derecha y abajo.

3.4.3.3.5. *Hidrólisis del Tween 80*

Esta prueba permite determinar la capacidad de la bacteria para hidrolizar el Tween 80. El resultado es positivo si alrededor del cultivo se genera un precipitado (Sierra, 1957).

3.4.3.3.6. *Hidrólisis del ADN*

El objetivo es determinar si el microorganismo tiene actividad ADNasa. La prueba se considera positiva cuando aparece un halo de aclaramiento alrededor del crecimiento (Jeffries et al., 1957).

3.4.3.3.7. *Producción de indol*

Los microorganismos que cuentan con el complejo triptofanasa originan indol como producto de su actividad sobre el triptófano. Para la lectura, se adicionaron unas gotas de reactivo de Kovacs (1928). Pasado un minuto, se observó el color del anillo superficial. Si el anillo es rosa, indica que hay presencia de indol (prueba positiva). La prueba es negativa cuando el anillo tiene color amarillo.

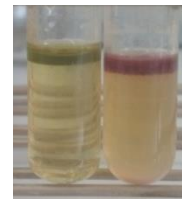


Figura 7. Prueba de la producción de indol positiva (derecha) y negativa (izquierda).

3.4.3.3.8. *Rojo de metilo*

El objetivo de esta prueba es determinar si el microorganismo utiliza la vía de fermentación ácido mixta de la degradación de la glucosa. Para ello, se pretende detectar la presencia de ácidos fuertes derivados del metabolismo, usando el rojo de metilo como indicador (Cowan y Steel, 1982).



Figura 8. Prueba de rojo metilo positiva (izquierda) y negativa (derecha).

3.4.3.3.9. *Voges-Proskauer*

En este caso se pretende determinar si la fermentación de la glucosa se lleva a cabo mediante la vía butanodiólica. Para ello, se busca la presencia de uno de los compuestos intermedios de dicha ruta metabólica. El medio utilizado fue el mismo que para la prueba de rojo de metilo pero con distinto método de lectura. La presencia de coloración anaranjada a los 20 minutos tras la adición de los reactivos correspondientes indica que la prueba es positiva (Barritt, 1936).

3.4.3.3.10. *Citrato de Simmons*

Esta prueba permite determinar si el microorganismo es capaz de utilizar el citrato sódico como única fuente de carbono y energía. Si el color del medio vira a azul, se considera que la prueba es positiva. En cambio, si se mantiene verde, se considera negativa (Harrigan y McCance, 1979).

3.4.3.3.11. *Reducción de nitratos y nitritos*

Mediante esta prueba se pretende conocer la capacidad de los microorganismos para reducir nitratos y nitritos. El primer paso de la lectura es observar la presencia de gas en la campana de Durham (prueba positiva para la utilización de nitratos y nitritos mediante desnitrificación). En caso de ausencia de gases, se añaden, en este orden, unas gotas de solución al 0,8% de ácido sulfanílico en ácido acético 5 N y de solución al 0,5% de α -naftilamina en ácido acético 5 N. Si el medio se torna de color rojo dentro de los primeros 5 minutos, indica la presencia de nitritos (prueba positiva para la reducción de nitratos pero no de nitritos). Por último, en los tubos que no se hayan tornado rojo, se añade limaduras de cinc. De nuevo, debe



Figura 9. Prueba de reducción de nitratos y nitritos negativa (izquierda) y positiva (derecha).

3. Material y métodos

tomar color rojo, lo cual indica que hay nitratos presentes en el medio (prueba negativa para la reducción de nitratos y nitritos) (Skerman, 1967).

3.4.3.3.12. *Ureasa*

El objetivo es comprobar la presencia de la enzima encargada de hidrolizar la urea. Siguiendo el método de Christensen (1946), la prueba se considera positiva cuando el medio adquiere una coloración rosa debido a la alcalinización de los productos de la hidrólisis de la urea.

3.4.3.3.13. *Fenilalanina desaminasa*

El objetivo de esta prueba es determinar si la bacteria posee fenilalanina desaminasa, encargada de convertir la fenilalanina en ácido fenilpirúvico.

Para la lectura, se adicionaron unas gotas de FeCl_3 al 10% sobre la superficie del cultivo. En caso de que la prueba sea positiva, el ácido fenilpirúvico reaccionará con el FeCl_3 y dará lugar a una coloración verde intensa (Ewing et al., 1957).

3.4.3.3.14. *Producción de ácidos a partir de carbohidratos*

Esta prueba se realizó para los siguientes carbohidratos: D-arabinosa, D-fructosa, D-galactosa, glicerol, D-glucosa, lactosa, maltosa, D-sacarosa, D-trehalosa y D-xilosa. Los hidratos de carbono se adicionan esterilizando mediante filtración al medio esterilizado para obtener una concentración final del 1%. La prueba se considera positiva cuando el indicador varía de rojo a amarillo debido a la producción de ácidos derivada de la metabolización de los azúcares (Cowan y Steel, 1982).

3.4.3.4. Características nutricionales

3.4.3.4.1. *Utilización de carbohidratos y alcoholes como única fuente de carbono y energía*

Los microorganismos tienen la capacidad de utilizar distintos compuestos como única fuente de carbono y energía (Stainer et al., 1966). Para esta prueba se utilizó el medio clásico de Koser (1923) modificado por Ventosa et al. (1982). Al igual que en las pruebas bioquímicas, las cepas se incubaron a 37°C durante 5 días. La prueba se consideró positiva si el crecimiento es mayor que en el control negativo. Se determinó la capacidad para utilizar los compuestos que se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Carbohidratos y alcoholes utilizados como única fuente de carbono y energía en las pruebas nutricionales.

Carbohidratos (0,2% p/v)	D-arabinosa	D-glucosa	Manosa	Salicina	Alcoholes (0,1% p/v)	Glicerol
	Fructosa	Lactosa	D-rafinosa	D-trehalosa		
	D-galactosa	Maltosa	Sacarosa	D-xilosa		

3.4.3.4.2. Utilización de aminoácidos y derivados como única fuente de carbono y energía

Se siguió el mismo procedimiento que en la prueba anterior, pero teniendo en cuenta que el medio Koser a utilizar no incluyera ninguna fuente de nitrógeno. Los compuestos utilizados en esta prueba se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Aminoácidos utilizados como única fuente de carbono y energía en las pruebas nutricionales.

Aminoácidos (0,1% p/v)	Alanina	Aspártico	L-fenilalanina	L-lisina	Ornitina
	Arginina	Cisteína	Glutamina	Metionina	Serina

3.4.4. Caracterización quimiotaconómica

Se determinó la composición de los ácidos grasos de la membrana de la cepa S35. El medio utilizado fue el medio 1 (véase composición en el apartado 3.2. Medios de cultivo) ya que es el que se ha utilizado para determinar la composición de ácidos grasos de las cepas tipo de las distintas especies del género y así poder comparar los resultados. La determinación de la composición de ácidos grasos se llevó a cabo siguiendo el protocolo recomendado por MIDI Microbial Identification System (Sasser, 1990). Mediante un cromatógrafo de gases Agilent 6850, con el Sistema de Identificación Microbiana MIDI usado en el método TSBA6 se obtuvo el contenido celular de ácidos grasos (MIDI, 2008). Esta determinación se llevó a cabo en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Valencia.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CULTIVO Y COMPROBACIÓN DE LAS CEPAS

Las cepas S34, S35 y S10B se sembraron en medio SW7,5 líquido y se incubaron a 37°C hasta su crecimiento. Tras múltiples intentos para su cultivo, solo conseguimos crecimiento de la cepa S35. Por lo tanto, continuamos el trabajo con esta cepa. Hemos vuelto a recibir las cepas S34 y S10B del Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas de Lagunas Andinas (LIMLA) (Tucumán, Argentina) pero ya no nos ha dado tiempo de incluir los resultados en el presente Trabajo Fin de Grado.

4.2. CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA

En primer lugar, se procedió a comprobar que la cepa S35 era efectivamente la descrita por Gorriti et al.(2014). Para ello, una vez crecida la cepa se procedió a la extracción del ADN de la misma, se comprobó su concentración en gel de agarosa y se amplificó el gen ARNr 16S (ver Material y métodos).El resultado de la secuenciación se visualizó y se ensambló, utilizando el programa ChromasPro Versión 1.5 (Technelysium Pty Ltd). Se obtuvo una secuencia de 1519 pb. En la Figura 10 podemos observar una banda de aproximadamente 1500 pb, correspondiente al gen ARNr 16S de la cepa S35.

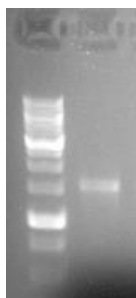


Figura 10. Gel de agarosa al 1% tras realizar la electroforesis.
Pocillo 1: Marcador de pesos moleculares.
Pocillo 2: Muestra de la PCR de la cepa S35.

La secuencia del gen ARNr 16S de la cepa S35 se comparó con las secuencias disponibles en las bases de datos utilizando el programa EzBioCloud.net y se obtuvo una semejanza del 99,7% con la secuenciación descrita por Gorriti et al. (2014), con lo cual confirmamos que se trataba de la cepa correcta ya que estos autores habían depositado previamente la secuencia del gen ARNr 16S de dicha cepa.

En la Tabla 8 se muestran los porcentajes de semejanza de la cepa S35 con respecto a las especies del género *Salinivibrio*, así como con las cepas S34 y S10B.

Tabla 8. Relación entre la cepa S35 y las especies filogenéticamente más próximas, en base a la comparación de las secuencias del gen que codifica el ARNr 16S.

Cepa	% semejanza
Cepa S34	100
Cepa S10B	99,7
<i>S.costicola</i> subsp. <i>costicola</i>	99,2
<i>S. costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i>	99,4
<i>S. proteolyticus</i>	97,7
<i>S. siamensis</i>	97,7
<i>S. sharmensis</i>	97,9
<i>S. kusheri</i>	98,9

Como podemos observar, los porcentajes de semejanza entre la cepa S35 y el resto de las especies del género *Salinivibrio*, así como con las cepas S34 y S10B oscilan entre el 97,7-100%. Estos porcentajes tan elevados muestran que efectivamente la cepa S35 pertenece al género *Salinivibrio*, si bien no permite determinar si se trata de una nueva especie.

Posteriormente realizamos el árbol filogenético del gen ARNr 16S de las cepas S34, S35 y S10B y el resto de las especies del género *Salinivibrio* tal y como se describe en el apartado de Material y métodos (Figura 11).

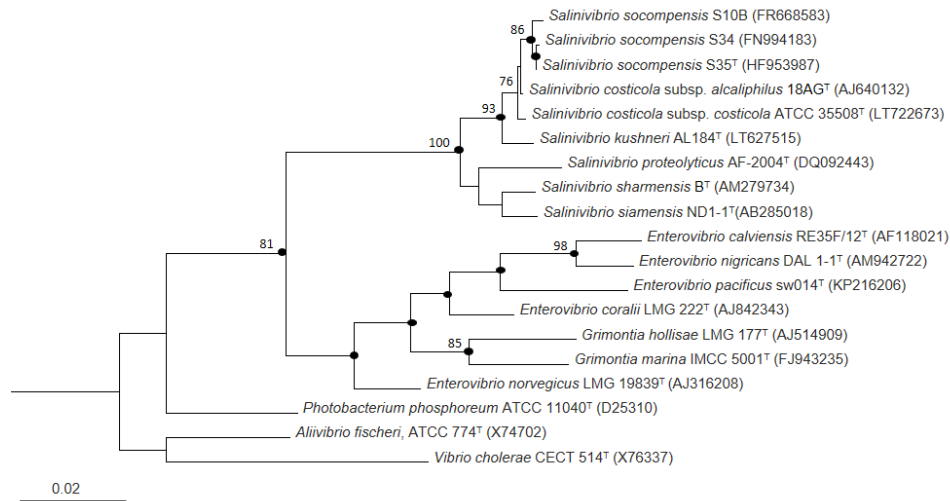


Figura 11. Árbol filogenético obtenido mediante el algoritmo *maximum parsimony* a partir de las secuencias del gen ARNr 16S, donde se muestran las relaciones entre los miembros de *Salinivibrio* y otros géneros de la familia *Vibrionaceae*. Los círculos negros indican los nodos que se mantienen en los árboles generados utilizando los algoritmos *maximum likelihood* y *neighbour joining*. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se muestran entre paréntesis. Únicamente se muestran los valores de *bootstrap* superiores al 70%. La escala muestra la distancia correspondiente a un 2% de divergencia.

Como podemos comprobar las cepas S34, S35 y S10B están incluidas dentro del grupo que incluye las especies del género *Salinivibrio*, confirmando así que se trata de cepas pertenecientes a este género. Además, estas tres cepas se encuentran a su vez constituyendo una rama separada del resto de las especies del género *Salinivibrio* con un valor de *bootstrap* elevado, por lo que nos hace pensar que efectivamente las tres cepas podrían constituir una nueva especie.

Estudios previos realizados por nuestro grupo han puesto de manifiesto que el gen ARNr 16S no es un buen marcador filogenético a la hora de circunscribir las especies del género *Salinivibrio*, y que es necesario o bien el uso de otros marcadores filogenéticos como los genes *housekeeping* o bien el análisis del genoma completo como se detalla a continuación (López-Hermoso et al., 2017).

4.3. CARACTERIZACIÓN GENÓMICA

Al disponer de los genomas secuenciados tanto de las cepas S34, S35 y S10B como del resto de las cepas tipo de las especies del género *Salinivibrio* podemos utilizarlos para construir un árbol basado en los genes compartidos o core-genoma, entre todas las cepas y así la filogenia

4. Resultados y discusión

mostrada no estará basada en un solo gen, como es el caso del gen ARNr 16S, ni en un grupo de ellos, como en el caso de los genes *housekeeping* que se utilizaron en el análisis MLSA, sino en todos los genes comunes, lo que dará una gran robustez a los resultados.

4.3.1. Core-genoma

Según la metodología descrita en el apartado anterior se ha construido el árbol basado en el core-genoma en el que se han utilizado 780 genes comunes a las 9 cepas objeto de este estudio.

En la Figura 12 se observa como la cepa S35, junto con las cepas S10B y S34, forman un filigrupo suficientemente separado de las demás cepas como para constituir una nueva especie.

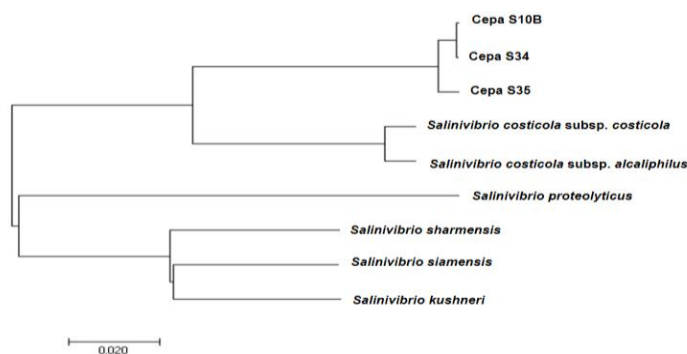


Figura 12. Árbol filogenómico basado en la concatenación de las secuencias nucleotídicas del core-genoma (780 genes) de las cepas S34, S35 y S10B y cepas tipo de las especies del género *Salinivibrio*. La escala representa las sustituciones por nucleótido.

4.3.2. Índices ANI

Con el fin de confirmar que efectivamente las cepas S34, S35 y S10B constituyen una nueva especie dentro del género *Salinivibrio* procedimos a determinar los parámetros genómicos ANIb y ANIm así como a determinar la hibridación ADN-ADN (DDH) *in silico* tal y como se describe en el apartado de Material y métodos.

En la Tabla 9 se muestran los porcentajes de los índices ANIb y ANIm entre las cepas objeto de estudio. En ambos casos los porcentajes son superiores al 95% entre las nuevas cepas S34, S35 y S10B e inferiores (iguales o inferiores al 98,8%) con el resto de las especies descritas del género. Este valor de 95% ha sido validado como porcentaje de corte, estableciéndose que porcentajes por encima del 95% indican que las cepas pertenecen a la misma especie y porcentajes por debajo del mismo que pertenecen a especies diferentes (Konstantinidis y Tiedje, 2005). Por lo tanto, según estos porcentajes las cepas S34, S35 y S10B constituyen una nueva especie dentro del género *Salinivibrio*.

Tabla 9. Porcentajes de ANIb y ANIm de la cepa S35 con respecto a las cepas S34, S10B y resto de las especies del género *Salinivibrio*.

Cepa	ANIb	ANIm
	Cepa S35	Cepa S35
Cepa S34	98,6	98,8
Cepa S10B	98,6	98,8
<i>S. costicola</i> subsp. <i>costicola</i>	87,8	88,9
<i>S. costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i>	87,9	88,6
<i>S. proteolyticus</i>	78,1	84,6
<i>S. sharmensis</i>	80,4	84,5
<i>S. siamensis</i>	80,6	84,6
<i>S. kushneri</i>	80,6	84,7

4.3.3. Hibridación ADN-ADN *in silico* (GGDC)

Desde la secuenciación masiva de genomas, siempre que dispongamos de los genomas de las cepas a estudiar, así como de los genomas de las cepas de referencia se ha sustituido la realización de la hibridación ADN-ADN (DDH) experimental (muy costosa y tediosa) por la realización de la GGDC. Por lo tanto, al disponer de los genomas de las cepas en estudio realizamos la GGDC de la cepa S35 con respecto a las cepas S34 y S10B y al resto de las cepas tipo de las especies del género *Salinivibrio*. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 10. Como podemos observar la cepa S35 presenta un porcentaje de hibridación del 89 y 90%, respectivamente con las cepas S34 y S10B. Se ha establecido que el valor de corte de la GGDC (al igual que para la DDH experimental) para cepas de la misma especie es de 70%. Es decir, cepas con porcentaje de hibridación superiores al 70% pertenecerán a la misma especie y cepas con porcentaje de hibridación inferiores al 70% pertenecerán a especies diferentes (Kim et al., 2014). Por lo tanto, las cepas S34, S35 y S10B pertenecen a la misma especie, pero esta no es ninguna de las especies descritas hasta la fecha ya que el porcentaje de hibridación de la cepa S35 con el resto de las especies del género es inferior al 70%.

Tabla 10. Porcentajes de GGDC de la cepa S35 con respecto a las cepas S34, S10B y al resto de cepas de *Salinivibrio*.

GGDC	Cepa S35
Cepa S34	89
Cepa S10B	90
<i>S. costicola</i> subsp. <i>costicola</i>	35
<i>S. costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i>	35
<i>S. proteolyticus</i>	22
<i>S. sharmensis</i>	23
<i>S. siamensis</i>	24
<i>S. kushneri</i>	24

4.4. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

4.4.1. Morfología y motilidad

Las colonias de la cepa S35 (Figura 13) presentan pigmentación rosa y forma esférica con un diámetro menor a 3 mm cuando se cultivan en medio SW7,5. Respecto a su morfología celular, se trata de bacilos delgados y curvados, no esporulados y presentan motilidad. Esta descripción coincide con la que muestran otras especies de *Salinivibrio* (Romano et al., 2011; Gorriti et al., 2014).

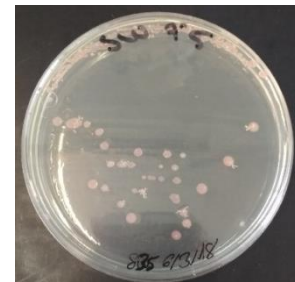


Figura 13. Colonias de la cepa S35 en placa de medio SW7,5.

4.4.2. Características fisiológicas

4.4.2.1. Rango y óptimo salino

Se realizó el crecimiento de la cepa S35 diferentes concentraciones salinas para determinar tanto el rango como la concentración salina óptima de dicha cepa. Los datos se muestran en la Figura 14. La cepa S35 es capaz de crecer entre 6-11% de NaCl, siendo el valor óptimo al 7-7,5%. Por lo tanto, según la clasificación de Kushner y Kamekura (1988) se trata de una bacteria halófila moderada.

4. Resultados y discusión

A partir de este momento, el resto de la caracterización fenotípica se realizó 7,5% de salinidad (medio SW7,5). Estos datos concuerdan con los obtenidos para las otras especies del género, siendo todas halófilas moderadas (Tabla 11).

Tabla 11. Comparación de los rangos y óptimos salinos de los distintos miembros del género *Salinivibrio*.

1. Cepa S35; 2. *S. costicola* subsp. *costicola* DSM 11403^T; 3. *S. costicola* subsp. *alcaliphilus* DSM 16359^T; 4. *S. proteolyticus* DSM 19052^T; 5. *S. siamensis* JCM 14472^T; 6. *S. sharmensis* DSM 18182^T; 7. *S. kushneri* AL184^T.

^a Mellado et al. (1996). ^bRomano et al. (2005). ^cAmoozegar et al. (2008). ^dChamroensaksri et al. (2009). ^eRomano et al. (2011). ^fLópez-Hermoso et al. (2018b).

Característica	1	2	3	4	5	6	7
Rango NaCl (% p/v)	6-11	0,5-20 ^a	2-25 ^b	1-17 ^c	1-22 ^d	6-16 ^e	2-20 ^f
Óptimo NaCl (%p/v)	7-7,5	10 ^a	10 ^b	5 ^c	10 ^d	10 ^e	7,5 ^f

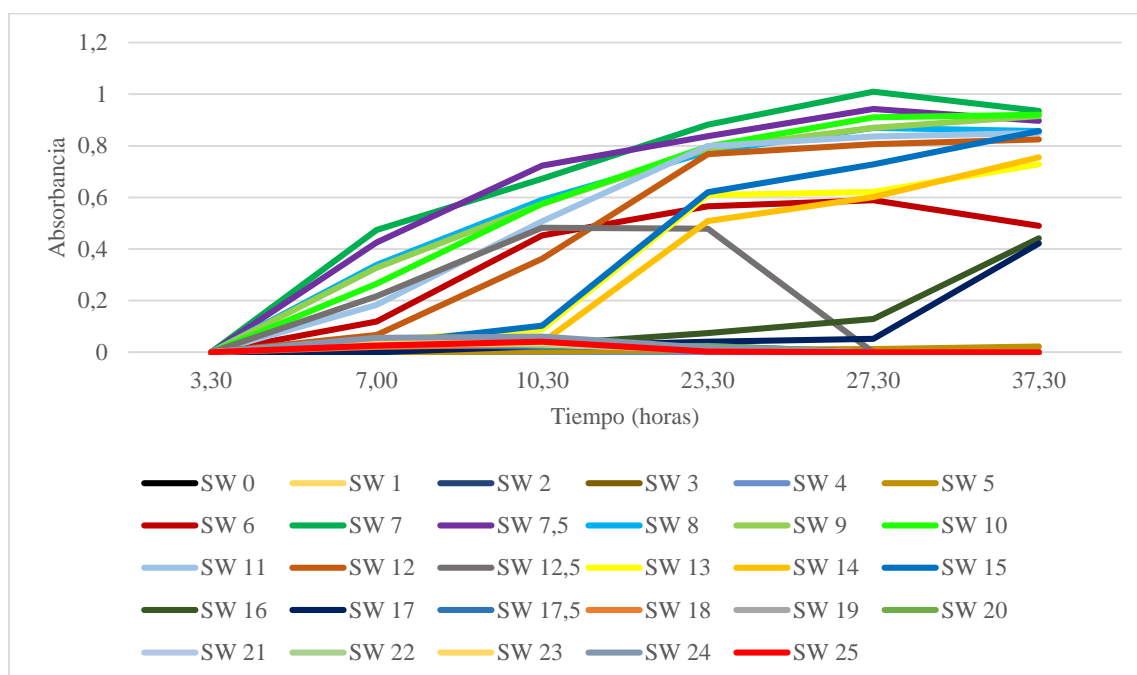


Figura 14. Curva de crecimiento de la cepa S35 a distintas concentraciones salinas.

4.4.2.2. Rango y óptimo de pH

Posteriormente se realizó la determinación del rango y pH óptimo para el crecimiento de la cepa S35. La cepa S35 es capaz de crecer en pH comprendido entre 6-10, siendo su óptimo alrededor de 7,5-8,0. Por lo que a partir de ahora utilizaremos pH 7,5 para esta cepa. Estos datos también están dentro de los descritos para estas especies, si bien las especies *S. costicola* subsp. *alcaliphilus* y *S. sharmensis* son un poco más alcalinas presentando un pH óptimo de 9. Como se puede observar en la Tabla 12, el rango y óptimo de pH de la cepa en estudio está dentro del perfil del resto de especies de *Salinivibrio*.

4. Resultados y discusión

Tabla 12. Comparación de los rangos y óptimos de pH de los distintos miembros del género *Salinivibrio*.

1. Cepa S35; 2. *S. costicola* subsp. *costicola* DSM 11403^T; 3. *S. costicola* subsp. *alcaliphilus* DSM 16359^T; 4. *S. proteolyticus* DSM 19052^T; 5. *S. siamensis* JCM 14472^T; 6. *S. sharmensis* DSM 18182^T; 7. *S. kushneri* AL184^T.

^a Mellado et al. (1996). ^bRomano et al. (2005). ^cAmoozgar et al. (2008). ^dChamroensaksri et al. (2009). ^eRomano et al. (2011).

^fLópez-Hermoso et al. (2018b).

Característica	1	2	3	4	5	6	7
Rango pH	6-10	5-10 ^a	7-10.5 ^b	5-9.5 ^c	5-9 ^d	6-10 ^e	5-10 ^f
Óptimo pH	7,5-8	7,5 ^a	9 ^b	8 ^c	8 ^d	9 ^e	7,2-7,4 ^f

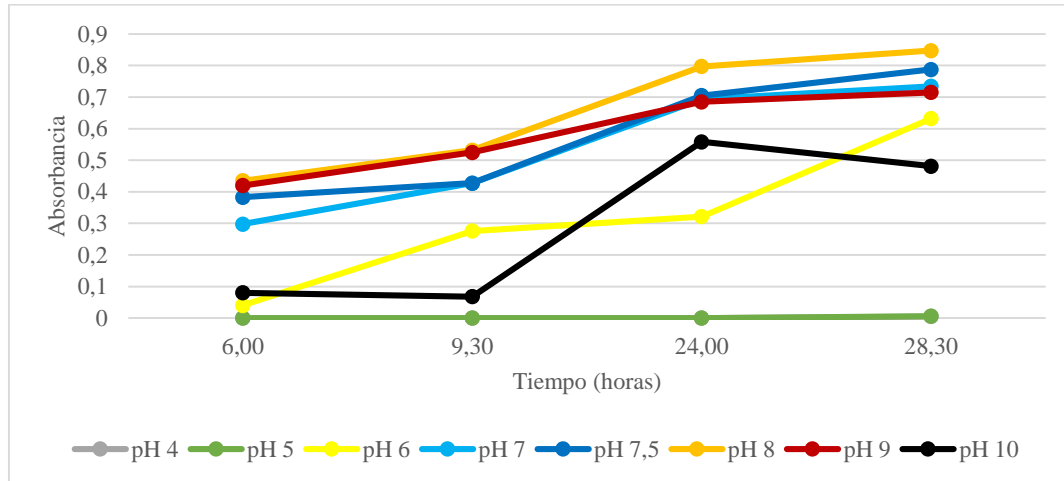


Figura 15. Curva de crecimiento de la cepa S35 a distintos valores de pH.

4.4.2.3. Rango y óptimo de temperatura

Y por último se llevó a cabo la determinación de la temperatura óptima para el crecimiento de la cepa S35. Para ello se incubaron medio líquido SW 7,5 a distintas temperaturas y se observó el crecimiento durante 7 días. La cepa S35 es capaz de crecer entre 10 y 42 °C, presentando un óptimo de crecimiento a 37°C. En la Tabla 13 se compara este rango de crecimiento con el descrito para el resto de las especies de *Salinivibrio*, estando dentro del rango descrito para las mismas.

Característica	1	2	3	4	5	6	7
Rango Temperatura (°C)	10-42	5-45 ^a	10-40 ^b	10-45 ^c	10-47 ^d	25-40 ^e	17-49 ^f
Óptimo Temperatura (°C)	37	37 ^a	30 ^b	35 ^c	37 ^d	35 ^e	37 ^f

Tabla 13. Comparación de los rangos y óptimos de temperatura de los distintos miembros del género *Salinivibrio*.

1. Cepa S35; 2. *S. costicola* subsp. *costicola* DSM 11403^T; 3. *S. costicola* subsp. *alcaliphilus* DSM 16359^T; 4. *S. proteolyticus* DSM 19052^T; 5. *S. siamensis* JCM 14472^T; 6. *S. sharmensis* DSM 18182^T; 7. *S. kushneri* AL184^T.

^a Mellado et al. (1996). ^bRomano et al. (2005). ^cAmoozgar et al. (2008). ^dChamroensaksri et al. (2009). ^eRomano et al. (2011).

^fLópez-Hermoso et al. (2018b).

4.4.3. Características bioquímicas

Se realizaron diversas pruebas bioquímicas tanto de la cepa S35, como de las cepas tipo de las especies del género *Salinivibrio* para que todas se obtuvieran en las mismas condiciones y poder así compararlas.

Todas las cepas fueron negativas para las pruebas de Vogues-Proskauer, citrato de Simmons, ureasa y fenilalanina desaminasa y producción de ácidos a partir de D-arabinosa, y positivas

4. Resultados y discusión

para la catalasa y la oxidasa, además de para la hidrólisis de la gelatina y el ADN y la producción de ácidos a partir de glicerol, D-glucosa y D-trehalosa. Los resultados del resto de pruebas bioquímicas se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Resultados de las pruebas bioquímicas.

1. Cepa S35; 2. *S. costicola* subsp. *costicola* DSM 11403^T; 3. *S. costicola* subsp. *alcaliphilus* DSM 16359^T; 4. *S. proteolyticus* DSM 19052^T; 5. *S. siamensis* JCM 14472^T; 6. *S. sharmensis* DSM 18182^T; 7. *S. kushneri* AL184^T.

Características	1	2	3	4	5	6	7
Hidrólisis del almidón	-	+	-	+	+	+	+
Hidrólisis del Tween 80	-	+	-	+	-	-	-
Producción de indol	-	-	-	-	+	-	-
Rojo de metilo	+	-	-	-	-	-	-
Reducción de nitratos y nitritos	+	+	+	-	+	+	+
Producción de ácidos a partir de carbohidratos							
D-fructosa	+	+	+	-	+	+	+
D-galactosa	+	-	+	-	-	-	-
Lactosa	+	-	+	-	-	-	-
Maltosa	-	-	+	+	+	+	-
D-sacarosa	+	+	+	+	+	-	+
D-xilosa	-	+	+	-	-	-	-

4.4.4. Características nutricionales

El resultado de las pruebas de utilización de diferentes compuestos como única fuente de carbono y energía fue negativo para todas las cepas en el caso de D-galactosa, lactosa, lisina y metionina. El resto de las pruebas de utilización de carbohidratos, alcoholes y aminoácidos se encuentran en las Tablas 15 y 16.

Tabla 15. Resultados de las pruebas nutricionales para hidratos de carbono y alcoholes.

1. Cepa S35; 2. *S. costicola* subsp. *costicola* DSM 11403^T; 3. *S. costicola* subsp. *alcaliphilus* DSM 16359^T; 4. *S. proteolyticus* DSM 19052^T; 5. *S. siamensis* JCM 14472^T; 6. *S. sharmensis* DSM 18182^T; 7. *S. kushneri* AL184^T.

Características	1	2	3	4	5	6	7
Carbohidratos							
D-arabinosa	-	-	-	+	+	-	-
Fructosa	-	-	-	-	+	+	-
D-glucosa	-	-	-	+	+	+	+
Maltosa	+	-	-	+	+	+	+
Manosa	-	+	+	+	+	+	+
D-rafinosa	-	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	-	-	+	+	+	+
D-trehalosa	-	-	-	+	+	-	-
D-xilosa	+	-	-	+	+	+	-
Alcoholes							
Glicerol	+	-	-	+	+	+	+

Tabla 16. Resultado de las pruebas nutricionales para aminoácidos.

1. Cepa S35; 2. *S. costicola* subsp. *costicola* DSM 11403^T; 3. *S. costicola* subsp. *alcaliphilus* DSM 16359^T; 4. *S. proteolyticus* DSM 19052^T; 5. *S. siamensis* JCM 14472^T; 6. *S. sharmensis* DSM 18182^T; 7. *S. kushneri* AL184^T. ND, no determinado.

Características	1	2	3	4	5	6	7
Aminoácidos							
Alanina	+	-	-	+	+	+	+
Arginina	+	-	-	+	+	+	+
Aspártico	-	-	-	+	+	-	+
Cisteína	-	-	-	+	+	-	+
L-fenilalanina	-	-	-	+	+	+	+
Glutamina	-	-	-	ND	+	-	-
Ornitina	+	-	-	ND	+	+	+
Serina	-	-	-	-	+	-	-

4.5. CARACTERIZACIÓN QUIMIOTAXONÓMICA

Se determinó el perfil de ácidos grasos de la cepa S35 tal y como se describe en el apartado de Material y métodos y los datos obtenidos se muestran en la Tabla 17. En dicha tabla se muestra también el perfil de los ácidos grasos de las especies del género *Salinivibrio* realizados todos en las mismas condiciones para poder ser comparables. El perfil de ácidos grasos de la cepa S35 es muy similar al de resto de especies de *Salinivibrio*, siendo predominantes los ácidos grasos C16:0 (20,8 %) y C18:1 (14,4 %). Según Doi et al. (2017) y Peak et al. (2017), estos dos ácidos grasos son los predominantes en el género *Vibrio*, incluido dentro de la familia *Vibrionaceae* al igual que *Salinivibrio*.

Tabla 17. Composición de ácidos grasos de las distintas especies del género *Salinivibrio* y de la cepa en estudio.

1. Cepa S35; 2. *S. costicola* subsp. *costicola* DSM 11403^T; 3. *S. costicola* subsp. *alcaliphilus* DSM 16359^T; 4. *S. proteolyticus* DSM 19052^T; 5. *S. siamensis* JCM 14472^T; 6. *S. sharmensis* DSM 18182^T; 7. *S. kushneri* AL184^T.

Ácido graso (%)	1	2	3	4	5	6	7
C _{12:0}	4,9	3,5 ^a	3,1 ^b	12,7 ^c	6,7 ^d	10,5 ^e	7,6 ^f
C _{14:0}	1,0	2,1 ^a	4,7 ^b	9,8 ^c	7,1 ^d	2,8 ^e	3,7 ^f
C _{16:0}	20,8	23,7 ^a	54,0 ^b	29,2 ^c	21,6 ^d	27,8 ^e	19,8 ^f
C _{18:0}	4,2	2,6 ^a	1,8 ^b	1,9 ^c	3,1 ^d	7,9 ^e	2,7 ^f
C _{18:1}	14,4	14,2 ^a	9,1 ^b	14,5 ^c	33,7 ^d	12,7 ^e	31,2 ^f

En base a todos los resultados obtenidos, la cepa S35 constituye una nueva especie del género *Salinivibrio*, para la cual proponemos la denominación de *Salinivibrio socompensis* sp. nov. A continuación, se realiza la descripción taxonómica de esta nueva especie.

4.6. DESCRIPCIÓN DE *SALINIVIBRIO SOCOMPENSIS* SP. NOV.

Salinivibrio socompensis (en referencia al Lago Socompa en Argentina, de donde fue aislada).

Las células son bacilos delgados y curvados, móviles y Gram-negativos. No presenta agrupaciones celulares, ni formación de endosporas. Las colonias presentan una forma esférica, de borde entero y convexas con pigmentación rosa y un diámetro inferior a 3 mm. Anaerobio facultativo y halófilo moderado, dado que crecen en un rango salino de 6-11% (p/v) NaCl, siendo el óptimo a 7-7,5% (p/v) NaCl. Crece en un rango de pH entre 6-10, con un óptimo de pH de 7,5-8. El rango de temperatura abarca de 10 a 42 °C, siendo el óptimo a 37°C. Produce catalasa y oxidasa. Hidroliza la gelatina y el ADN pero no el Tween 80 ni el almidón. Reduce los nitratos y nitritos con desprendimiento de gases. Utiliza la vía de fermentación ácido mixta de degradación de la glucosa pero no la butanodiólica (Voges Proskauer negativo). No produce ureasa, ni fenilalanina desaminasa. Las pruebas citrato de Simmons y producción del indol son negativas. Produce ácidos a partir del glicerol, D-fructosa, D-galactosa, D-glucosa, lactosa, D-sacarosa y D-trehalosa pero no de maltosa o D-xilosa. Utiliza la maltosa, sacarosa, D-xilosa, glicerol, alanina, arginina y ornitina como única fuente de carbono y energía, pero no la D-arabinosa, fructosa, D-galactosa, D-glucosa, lactosa, manosa, D-rafinosa, D-trehalosa, aspártico, cisteína, L-fenilalanina, glutamina, lisina, metionina y serina. Los ácidos grasos más abundantes son C16:0 y C18:1. La cepa tipo es la cepa S35 (= CECT 9634 = BNM 535).

5. CONCLUSIONES

1. La secuencia del gen ARNr 16S de la cepa S35 obtenida en este estudio confirma que se trata de la cepa correcta y que se ha trabajado con un cultivo puro.
2. La caracterización filogenética, basada en la comparación del gen ARNr 16S y el análisis filogenético basado en la comparación de los 780 genes comunes (core-genoma) han permitido determinar que la cepa S35 pertenece al género *Salinivibrio* y que constituye una nueva especie de dicho género.
3. Los resultados de los índices ANIb y ANIm, así como los de hibridación ADN-ADN *in silico* confirman que la cepa S35 constituye una nueva especie de *Salinivibrio*.
4. Las características fenotípicas y quimiotaxonómicas han contribuido a la descripción de la cepa S35 como nueva especie.
5. En conjunto, los resultados del estudio polifásico permiten concluir que la cepa S35 constituye una nueva especie, para la que se propone la denominación *Salinivibrio socompensis* sp. nov.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Amoozegar MA, Schumann P, Hajighasemi M, Fatemi AZ, Karbalaeei-Heidari HR. *Salinivibrio proteolyticus* sp. nov., a moderately halophilic and proteolytic species from a hypersaline lake in Iran. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008; 58: 1159-1163.
- Antón J, Oren A, Benlloch S, Rodríguez-Valera F, Amann R, Rosselló-Mora R. *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the *Bacteria* from saltern crystallizer ponds. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002; 52: 485-491.
- Barritt MM. The intensification of the Voges Proskauer reaction by the addition of α -naphthol. *J Pathol.* 1936; 42(2): 441-454.
- Borgne SL, Paniagua D, Vázquez-Duhalt R. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2008; 15(2-3): 74–92.
- Brock TD. Ecology of saline lakes. En: Shilo M, editor. *Strategies of Microbial Life in Extreme Environments.* Weinheim: Verlag-Chemie; 1979. p.29-47.
- Brown AD. Microbial water stress. *Bacteriol Rev.* 1976; 40(4): 803-846.
- Brown LS. Eubacterial rhodopsins – Unique photosensors and diverse ion pumps. *BBA Bioenergetics.* 2014; 1837(5): 553–561.
- Chamroensakri N, Tanasupawat S, Akaracharanya A, Visessanguan W, Kudo T, Itoh T. *Salinivibrio siamensis* sp. nov., from fermented fish (pla-ra) in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009; 59: 880-885.
- Christensen WB. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *J Bacteriol.* 1946; 52(4): 461-466.
- Cowan ST, Steel KJ. *Manual for the identification of medical bacteria.* 3^a ed. London: Cambridge University Press; 1965.
- De la Haba RR, Sánchez-Porro C, Márquez MC, Ventosa V. Taxonomy of halophiles. En: Horikoshi K, Antranikian G, Bull A, Robb F, Stetter K, editores. *Extremophiles Handbook.* Heidelberg: Springer-Verlag; 2010. p.255-309.
- Doi H, Osawa I, Adachi H y Kawada M. *Vibrio japonicus* sp. nov., a novel member of the *Nereis* clade in the genus *Vibrio* isolated from the coast of Japan. *PLoS One.* 2017; 12(2): e0172164.
- Edgerton ME, Brimblecombe P. Thermodynamics of halobacterial environments. *Can J Microbiol.* 1981; 27(9): 899-909.
- Ewing WH, Davis BR, Reavis RW. Phenylalanine and malonate media and their use in enteric bacteriology. *Publ Health Lab.* 1957; 15(6): 153-167.

6. Bibliografía

- Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J Mol Evol.* 1981; 17: 368-376.
- Fitch WM. Toward defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. *Syst Biol.* 1971; 20(4): 406-416.
- Frazier WC. A Method for the detection of changes in gelatine dueto bacteria. *J Infect Dis.* 1926; 39(4): 302-309.
- García MT, Ventosa A, Ruíz-Berraquero, F, Kocur M. Taxonomic study and amended description of *Vibrio costicola*. *Int J Syst Bacteriol.* 1987; 37(3): 251-256.
- Goodfellow M, O'Donnell AG. Roots of bacterial systematics. En: Goodfellow M, O'Donnell AG, editores. *Handbook of New Bacterial Systematics*. Londres: Academic Press; 1993. p.3-54.
- Gorriti MF, Dias GM, Chimento LA, Trindade-Silva AE, Silva BS, Mesquita MMA et al. Genomic and phenotypic attributes of novel salinivibrios from stromatolites, sediment and water from a high altitude lake. *BMC Genomics.* 2014; 15: 473.
- Grant WD, Kamekura M, McGenity TJ, Ventosa A. Class III. *Halobacteria* class nov. En: Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM, editores. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 1. 2ª ed. New York: Springer; 2001. p.294–301.
- Grigorieff N, Ceska TA, Downing KH, Baldwin JM, Henderson R. Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin. *J Mol Biol.* 1996; 259(3): 393-421.
- Gupta RS, Naushad S, Fabros R, Adeolu, M. A phylogenomic reappraisal of family-level divisions within the class *Halobacteria*: proposal to divide the order *Halobacteriales* into the families *Halobacteriaceae*, *Haloarculaceae* fam. nov., and *Halococcaceae* fam. nov., and the order *Haloferacales* into the families, *Haloferacaceae* and *Halorubraceae* fam nov. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2016; 109: 565-587.
- Harrigan WF, McCance ME. *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. Rev ed. New York: Academic Press; 1979.
- Hoff WD, Jung KH, Spudich JL. Molecular mechanism of photosignaling by archaeal sensory rhodopsins. *Annu Rev Biophys.* 1997; 26: 223-258.
- Huang CY, García JL, Patel BKC, Cayol JL, Baresi L, Mah RA. *Salinivibriocosticola* subsp. *vallismortis* subsp. nov., a halotolerant facultative anaerobe from Death Valley, and emended description of *Salinivibriocosticola*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000; 50: 615-622.
- Jeffries CD, Holtman DF, Guse DG. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. *J Bacteriol.* 1957; 73(4): 590-591.

- Kim M, Oh HS, Park SC y Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014; 64: 346-351.
- Konstantinidis KT, Tiedje JM. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102(7): 2567-2572.
- Koser SA. Utilization of the salts of organic acids by the colon-aerogenes group. *J Bacteriol.* 1923; 8(5): 493-520.
- Kovacs N. Eine vereinfachte Methode zum Nachweis der Indolbildung durch Bakterien. *Z Immunitats Allergieforsch.* 1928; 55: 311-315.
- Kovacs N. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature.* 1956; 178(4535): 703.
- Kushner DJ, Kamekura M. Physiology of halophilic eubacteria. En: Rodríguez Valera F, editor. *Halophilic Bacteria*, vol. 1. Boca Ratón: CRC Press; 1988. p.109–138.
- Lanyi JK. Understanding structure and function in the light-driven proton pump bacteriorhodopsin. *J Struct Biol.* 1998; 124(2-3): 164-179.
- López-Hermoso C. Análisis filogenético y genómico del género *Salinivibrio*. (Tesis doctoral). Sevilla: Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla; 2017.
- López-Hermoso C, de la Haba RR, Sánchez-Porro C, Papke RT, Ventosa A. Assessment of MultiLocus Sequence Analysis as a valuable tool for the classification of the genus *Salinivibrio*. *Front Microbiol.* 2017; 8:1107.
- López-Hermoso C, de la Haba RR, Sánchez-Porro C, Ventosa A. Emended description of *Salinivibrio proteolyticus*, including *Salinivibrio costicola* subsp. *vallismortis* and five new isolates. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2018a; 68(5): 1599-1607.
- López-Hermoso C, de la Haba RR, Sánchez-Porro C, Ventosa A. *Salinivibrio kushneri* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from salterns, *Syst. Appl. Microbiol.* 2018b; 41(3): 159-166.
- Ludwig W, Schleifer KH. Phylogeny of bacteria beyond the 16S rRNA standard. *ASM News.* 1999; 65(11): 752-757.
- Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar, et al. ARB: A software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32(4): 1363-1371.
- Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA, Brock TD. *Brock Biology of Microorganisms*. 14ª ed. New York: Pearson; 2014.
- Maresca JA, Keffer JL, Miller KJ. Biochemical analysis of microbial rhodopsins. *Curr Protoc Microbiol.* 2016; 6: 41.

6. Bibliografía

- Mellado E, Moore ERB, Nieto JJ, Ventosa A. Analysis of 16S rRNA gene sequences of *Vibrio costicola* strains: description of *Salinivibrio costicola* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1996; 46(3): 817-821.
- MIDI. Sherlock Microbial Identification System Operating Manual, version 6.1. Newark: MIDI Inc; 2008.
- Oesterhelt D, Stoeckenius W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat New Biol.* 1971; 233(39): 149-152.
- Oren A. Halophilic microorganisms and their environments. 1ª ed. Dordrecht: Springer; 2002.
- Paek J, Shin JH, Shin Y, Park IS, Kim H, Kook JK, et al. *Vibrio injenensis* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2017; 110(1): 145-152.
- Richter M, Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106(45): 19126-19131.
- Rodríguez-Valera F, Juez G, Kushner DJ. Halocins: salt-dependent bacteriocins produced by extremely halophilic rods. *Can J Microbiol.* 1982; 28(1): 151–154.
- Rodríguez-Valera F. Biotechnological potential of halobacteria. *Biochem Soc Symp.* 1992; 58: 135–147.
- Rodríguez-Valera F. Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. En: Rodríguez Valera F, editor. *Halophilic Bacteria*, vol. 1. Boca Raton: CRC Press; 1988. p. 3–30.
- Rodríguez-Valera F. Introduction to saline environments. En: Vreeland RH, Hochstein L, editores. *The Biology of Halophilic Bacteria*. Boca Ratón: CRC Press; 1993. p. 1-23.
- Romano I, Gambacorta A, Lama L, Nicolaus B, Giordano A. *Salinivibrio costicola* subsp. *alcaliphilus* subsp. nov., a haloalkaliphilic aerobe from Campania Region (Italy). *Syst Appl Microbiol.* 2005; 28(1): 34-42.
- Romano I, Orlando P, Gambacorta A, Nicolaus B, Dipasquale L, Pascual J et al. *Salinivibrio sharmensis* sp. nov., a novel haloalkaliphilic bacterium from a saline lake in Ras Mohammed Park (Egypt). *Extremophiles.* 2011; 15(2): 213-220.
- Rosselló-Móra R. DNA-DNA reassociation methods applied to microbial taxonomy and their critical evaluation. En: Stackebrandt E, editor. *Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes*. Berlin: Springer; 2006. p. 23–50.
- Rothschild LJ, Mancinelli RL. Life in extreme environments. *Nature.* 2001; 409: 1092–1101.
- Sasser M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids, MIDI Technical Note 101. Newark: MIDI Inc; 1990.

- Saitu N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987; 4(4): 406-425.
- Schleifer KH. Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. *Syst Appl Microbiol.* 2009; 32(8): 533-42.
- Sierra G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1957; 23(1): 15–22.
- Skerman, VBD. A Guide to the identification of the genera of bacteria. 1^a ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Co.; 1967.
- Smith FB. An investigation of a taint in rib bones of bacon. The determination of halophilic vibrios (n. spp.). *Proc R Soc Qd.* 1938; 49: 29-52.
- Sneath PHA, Collins VG. A study in test reproducibility between laboratories: report of a *Pseudomonas* working party. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1974; 40: 481-527.
- Sneath, PHA. A study in test reproductibility between laboratories. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1989; 40: 481-527.
- Spudich JL. The multitasking microbial sensory rhodopsins. *Trends Microbiol.* 2006; 14(11): 480-487.
- Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic Note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1994; 44: 846-849.
- Stainer RY, Palleroni NJ, Douforoff M. The aerobic Pseudomonads: a taxonomic study. *J Gen Microbiol.* 1966; 43(2): 159-271.
- Subov NN. Oceanographical tables. Commissariat of agriculture of URSS. Hydro-Meteorological Committee of URSS. Moscú: Oceanographical Institute of URSS; 1931.
- Ugalde JA, Podell S, Narasingarao P, Allen EE. Xenorhodopsins, an enigmatic new class of microbial rhodopsins horizontally transferred between archaea and bacteria. *Biol Direct.* 2011; 6: 52.
- Ventosa A, Mellado E, Sánchez-Porro C, Márquez MC. Halophilic and halotolerant micro-organisms from soils. En: Dion P, Nautiyal, CS, editores. *Microbiology of Extreme Soils.* Berlin: Springer-Verlag; 2008. p. 87-115.
- Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998; 62(2): 504–544.
- Ventosa A, Quesada E, Rodríguez-Valera F, Ruiz-Berraquero F, Ramos-Cormenzana A. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. *J Gen Microbiol.* 1982; 128: 1959-1968.

6. Bibliografía

- Ventosa A, Sánchez-Porro C, Martín S, Mellado E. Halophilic archaea and bacteria as a source of extracellular hydrolytic enzymes. En: Gunde-Cimerman N, Oren A, Plemenitas A, editores. *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*. Dordrecht: Springer; 2005, p.337–354.
- Ventosa A. *Salinivibrio*. En: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, editores. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, vol. 2. New York: Springer; 2015. p. 552-556.
- Ventosa A. Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environments. En: Logan NA, Lappin-Scott HM, Oyston PCF, editores. *Prokaryotic Diversity: Mechanisms and Significance*. Cambridge: Cambridge University Press; 2006. p. 223-254.
- Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, et al. Report of the ad hoc Committee on reconciliation of approaches to Bacterial Systematics. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1987; 37(4): 463-464.
- Wood JM. Bacterial osmoregulation: A paradigm for the study of cellular homeostasis. *Annu Rev Microbiol*. 2011; 65: 215-238.