

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA



Departamento de Microbiología y Ecología

Colección Española de Cultivos Tipo

Doctorado en Biotecnología

Biodiversidad bacteriana marina: nuevos taxones cultivables

Directores de Tesis

David Ruiz Arahal

M^a Jesús Pujalte Domarco

M^a Carmen Macián Rovira

Teresa Lucena Reyes

Tesis Doctoral

Valencia, 2012

Dr. David Ruiz Arahal, Profesor Titular del Departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia,

Dra. María Jesús Pujalte Domarco, Catedrática del Departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia, y

Dra. M^a Carmen Macián Rovira, Técnico Superior de Investigación de la Colección Española de Cultivos Tipo de la Universidad de Valencia,

CERTIFICAN:

Que Teresa Lucena Reyes, Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Biodiversidad bacteriana marina: nuevos taxones cultivables”, que presenta para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad de Valencia.

Y para que conste, en el cumplimiento de la legislación vigente, firman el presente certificado en Valencia, a.

David Ruiz Arahal

M^a Jesús Pujalte Domarco

M^a Carmen Macián Rovira

Relación de publicaciones derivadas de la presente Tesis Doctoral

Lucena T, Pascual J, Garay E, Arahal DR, Macián MC, Pujalte MJ (2010). *Haliea mediterranea* sp. nov., a marine gammaproteobacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 1844-8.

Lucena T, Pascual J, Giordano A, Gambacorta A, Garay E, Arahal DR, Macián MC, Pujalte MJ (2010). *Euzebyella saccharophila* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium of the family *Flavobacteriaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 2871-6.

Lucena T, Ruvira MA, Pascual J, Garay E, Macián MC, Arahal DR, Pujalte MJ (2011). *Photobacterium aphoticum* sp. nov., isolated from coastal water. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 1579-84.

Lucena T, Pujalte MJ, Ruvira MA, Garay E, Macián MC, Arahal DR (2012). *Tropicibacter multivorans* sp. nov., an aerobic Alphaproteobacterium isolated from surface seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 844-848.

Lucena T, Ruvira MA, Garay E, Macián MC, Arahal DR, Pujalte MJ (2012). *Actibacterium mucosum* gen. nov., sp. nov., a new marine Alphaproteobacterium from Mediterranean seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* doi:10.1099/ijs.0.038026-0.

Lucena T, Ruvira MA, Arahal DR, Macián MC, Pujalte MJ. *Vibrio aestivus* sp. nov. and *Vibrio quintilis* sp. nov., related to *Marisflavi* and *Gazogenes* clades, respectively. *System Appl Microbiol* (En revisión)

Ruvira MA, Lucena T, Garay E, Pujalte MJ, Arahal DR, Macián MC. *Marinifilum flexuosus* sp. nov., a new Bacteroidetes isolated from coastal Mediterranean Sea water and emended description of the genus *Marinifilum* Na et al., 2009. *System Appl Microbiol* (En revisión)

Agradecimientos

Este trabajo de Tesis no se podría haber realizado sin el esfuerzo de muchas personas. Me gustaría agradecerles a todas ellas el apoyo recibido.

En primer lugar, a mis directores por transmitirme su amor por la ciencia y en concreto por la microbiología. Por el apoyo personal recibido en todo momento, por ser tan cercanos.

Al DR. David R. Arahal, por haber confiado en mí desde el principio. Por transmitirme su entusiasmo y buena praxis.

A la Dra. M^a Jesús Pujalte por su valioso conocimiento en bacteriología y por concederme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación.

A la Dra. M^a Carmen Macián, por su infinita paciencia y enseñarme a desenvolverme en el laboratorio. Por compartir su mesa conmigo, por entenderme.

A todos mis compañeros de la colección Adrián, Ana, Aurora, Bea, Begoña, Chemi, Inma, Jordi, Laura, M^a José, Mapy, María Rosa y Rosa, sin vuestra ayuda el trabajo habría sido más largo y pesado. Gracias por esos almuerzos al sol. Por supuesto, agradecer a nuestra directora Esperanza el haberme acogido en la CECT y haber hecho de la colección lo que es ahora.

Sobre todo, agradecer a Amparo ser más que una compañera, por aguantarme y ser mi apoyo diario. Espero ser de la misma utilidad.

Por último, a mis compañeros de departamento Alberto, Amparo, David, Eva, Javi y Paco, por sus consejos y estar ahí en las horas muertas.

Gracias a todos aquellos que de una manera u otra han hecho posible esta Tesis.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Taxonomía de procariontes	1
1_1. Fuentes de información en taxonomía de procariontes	5
1_2. Publicación efectiva de propuestas taxonómicas.....	7
1_3. Papel de las colecciones de cultivo en taxonomía de procariontes	8
1_4. Aproximaciones metodológicas utilizadas en taxonomía de procariontes	9
Caracterización fenotípica.....	9
Caracterización genotípica.....	12
Análisis filogenético basado en secuencias génicas.....	15
Filogenómica.....	20
2. Diversidad bacteriana marina	23
2_1. Principales grupos bacterianos quimioheterótrofos marinos.....	24
Filo <i>Proteobacteria</i>	24
Filo " <i>Bacteroidetes</i> ".....	50
Otros filos que albergan taxones marinos.....	55
OBJETIVOS	57
MATERIAL Y MÉTODOS	59
1. Material Biológico: cepas bacterianas	59
Cepas de referencia	61
2. Caracterización fenotípica	63
2_1. Características morfológicas celulares y coloniales.....	63
2_2. Caracterización bioquímica y fisiológica	65
2_3. Pruebas nutricionales.....	70
2_4. Caracterización quimiotaxonómica	72
2_5. MALDI-TOF MS	73
3. Caracterización genotípica	74
3_1. Extracción de DNA.....	74
3_2. Determinación del contenido en Guanina y Citosina (G+C) del DNA	74
3_3. Secuenciación del gen 16S rRNA.....	74
3_4. Secuenciación de otros genes esenciales	76
4. Análisis de secuencias	78
5. Secuenciación genómica	78
6. Comparación de los genomas parciales	79

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
1. Identificación presuntiva de los aislados	81
1.1. Cepas de agua de mar de la playa de la Malvarrosa	81
1.2. Cepas de agua de mar y de ostra de la costa de Vinaroz	88
2. Selección de las cepas de interés	90
3. Caracterización taxonómica de las cepas seleccionadas	92
Estudio de la cepa 7SM29: <i>Haliea mediterranea</i> sp. nov.	93
Estudio de la cepa 7SM30: <i>Euzebyella saccharophyla</i> gen. nov., sp. nov.	100
Estudio de la cepa M46: <i>Photobacterium aphoticum</i> sp. nov.	108
Estudio de la cepa MD5: <i>Tropicibacter multivorans</i> sp. nov.	120
Estudio de la cepa R46: <i>Actibacterium mucosum</i> gen. nov. sp. nov.	127
Estudio de la cepa M30: <i>Marinifilum flexuosus</i> sp. nov.	137
Estudio de las cepas M22, M61 y M62: <i>Vibrio aestivus</i> sp. nov. y <i>Vibrio quintilis</i> sp. nov.	147
Estudio de las cepas M17, M49, M76, M15Ø-3, 2OM6 y R37: <i>Phaeomarinomonas mediterranea</i> gen. nov., sp. nov. y <i>Phaeomarinomonas costicola</i> sp. nov.	160
Estudio de la cepa 4SM10: <i>Roseovarius litoralis</i> sp. nov.	170
CONCLUSIONES	177
BIBLIOGRAFÍA	179
ANEXO I	203
ANEXO II	213

Índice de Tablas

Tabla 1.	Clasificación jerárquica de los filos <i>Proteobacteria</i> y <i>Bacteroidetes</i> (http://www.bacterio.cict.fr).....	36
Tabla 2.	Cepas procedentes de la campaña llevada a cabo en la Playa de la Malvarrosa, Valencia, en julio de 2008.....	59
Tabla 3.	Relación de cepas estudiadas.....	60
Tabla 4.	Cepas de referencia utilizadas durante el estudio.....	61
Tabla 5.	Crioprotectores utilizados distintos al inositol.....	62
Tabla 6.	Relación de los programas utilizados en la comparación de las secuencias con las bases de datos públicas.....	75
Tabla 7.	Genes, productos génicos y cebadores utilizados en el estudio de MLSA.....	77
Tabla 8.	Clasificación taxonómica preliminar de las cepas de la campaña de 2008 y los géneros filogenéticamente más próximos, según la comparación de las secuencias parciales del gen 16S rRNA.....	82
Tabla 9.	Distribución de las 178 cepas procesadas en la identificación presuntiva por afiliación taxonómica (filo, clase y género), indicando además las condiciones de cultivo.....	87
Tabla 10.	Clasificación taxonómica de los 48 aislados de la campaña de 1989-1990 en función a la similitud de secuencia del 16S rRNA.....	88
Tabla 11.	Distribución de las 48 cepas procesadas en la identificación presuntiva por afiliación taxonómica (filo, clase y género).....	90
Tabla 12.	Posición filogenética de las 17 cepas bacterianas seleccionadas para realizar un estudio más detallado, basada en la comparación de las secuencias (~ 1400 pb) del gen que codifica el 16S rRNA.....	91
Tabla 13.	Afiliación taxonómica de las 17 cepas bacterianas.....	92
Tabla 14.	Porcentajes de semejanza obtenidos al comparar las secuencias del gen 16S rRNA de la cepa 7SM29 ^T con las secuencias del mismo gen relacionadas filogenéticamente	93
Tabla 15.	Características diferenciales entre especies de <i>Haliea</i> y <i>Congregibacter</i>	96

Tabla 16.	Composición de ácidos grasos de la cepa 7SM29 ^T y las cepas tipo de las especies pertenecientes al género <i>Halieta</i> y <i>Congregibacter litoralis</i>	97
Tabla 17.	Porcentajes de semejanza obtenidos al comparar la secuencia casi completa (1450 pb) del gen 16S rRNA de la cepa 7SM30 ^T con las secuencias del mismo gen relacionadas filogenéticamente.....	100
Tabla 18.	Composición de los ácidos grasos celulares de la cepa 7SM30 ^T y las especies filogenéticamente relacionadas.....	102
Tabla 19.	Características fenotípicas diferenciales entre la cepa 7SM30 ^T y las especies filogenéticamente relacionadas.....	104
Tabla 20.	Porcentajes de semejanza obtenidos al comparar la secuencia casi completa del gen 16S rRNA de la cepa M46 ^T con las secuencias del mismo gen relacionadas filogenéticamente.....	108
Tabla 21.	Características fenotípicas diferenciales entre la cepa M46 ^T y las especies de <i>Photobacterium</i> filogenéticamente relacionadas.....	116
Tabla 22.	Comparación de la composición de los ácidos grasos de <i>Photobacterium aphoticum</i> M46 ^T y otras especies del género <i>Photobacterium</i>	117
Tabla 23.	Porcentajes de semejanza obtenidos al comparar las secuencias del gen 16S rRNA de la cepa MD5 ^T con las cepas tipo más relacionadas filogenéticamente.....	120
Tabla 24.	Características diferenciales entre la cepa MD5 ^T (= CECT 7557 ^T) y <i>T. naphthalenivorans</i> CECT 7648 ^T	122
Tabla 25.	Comparación en la composición de los ácidos grasos celulares de <i>Tropicibacter multivorans</i> MD5 ^T (= CECT 7557 ^T) y las especies filogenéticamente relacionadas.....	124
Tabla 26.	Porcentajes de semejanza obtenidos al comparar las secuencias del gen 16S rRNA de la cepa R46 ^T con las cepas tipo más relacionadas filogenéticamente.....	127
Tabla 27.	Características diferenciales entre la cepa R46 ^T , <i>Actibacterium mucosum</i> CECT 7668 ^T , y especies relacionadas.....	131
Tabla 28.	Comparación de la composición de los ácidos grasos de la cepa <i>Actibacterium mucosum</i> R46 ^T y las especies relacionadas.....	133

Tabla 29.	Porcentajes de semejanza obtenidos al comparar la secuencia del gen 16S rRNA de la cepa M30 ^T con las cepas tipo más relacionadas filogenéticamente.....	137
Tabla 30.	Relación de valores ANI obtenidos por comparación de genomas entre la cepa <i>M. flexuosus</i> M30 ^T (= CECT 7448 ^T) y <i>M. fragile</i> CECT 7942 ^T	139
Tabla 31.	Características fenotípicas diferenciales entre la cepa M30 ^T y las especies filogenéticamente relacionadas.....	142
Tabla 32.	Comparación de la composición de los ácidos grasos de cepa M30 ^T (<i>Marinifilum flexuosus</i> CECT 7448 ^T), cepa <i>Marinifilum fragile</i> CECT 7942 ^T y <i>Cytophaga fermentans</i> CECT 7602 ^T	143
Tabla 33.	Porcentajes de semejanza obtenidos al comparar la secuencia casi completa del gen 16S rRNA de las cepas M22 ^T y M61 con las cepas tipo relacionadas filogenéticamente.....	147
Tabla 34.	Porcentajes de semejanza obtenidos al comparar la secuencia casi completa del gen 16S rRNA de la cepa M62 ^T con las cepas tipo más relacionadas filogenéticamente.....	148
Tabla 35.	Características diferenciales entre <i>V. aestivus</i> sp. nov. (M22 ^T y M61), <i>V. marisflavi</i> CECT 7928 ^T y <i>V. stylophorae</i> KTW-12 ^T	150
Tabla 36.	Características diferenciales entre <i>V. quintilis</i> sp. nov. (M62 ^T) y las cepas tipo de otros miembros del clado 'Gazogenes'.....	151
Tabla 37.	Comparación de la composición de los ácidos grasos de <i>Vibrio aestivus</i> y otras especies relacionadas.....	152
Tabla 38.	Comparación de la composición de los ácidos grasos de <i>Vibrio quintilis</i> y otras especies relacionadas.....	153
Tabla 39.	Relación de valores ANI obtenidos por comparación de genomas entre <i>V. aestivus</i> sp. nov. (M22 ^T y M61) y <i>V. aerogenes</i> CECT 7928 ^T	155
Tabla 40.	Relación de valores ANI obtenidos por comparación de genomas entre <i>V. quintilis</i> sp. nov. (M62 ^T) y <i>V. aerogenes</i> CECT 7868 ^T	156

Tabla 41.	Porcentajes de semejanza obtenidos al comparar las secuencias del gen 16S rRNA de las cepas M17 ^T , M49, M76, M15Ø-3, 2OM6 y R37 ^T con las secuencias del mismo gen de la especie relacionadas filogenéticamente.....	160
Tabla 42.	Relación de valores ANI obtenidos por comparación de genomas entre las cepas M17 ^T , M49, M15Ø-3, 2OM6 y R37 ^T	162
Tabla 43.	Características diferenciales entre las cepas M17 ^T , M49, M76, M15Ø-3, 2OM6 y R37 ^T y las especies filogenéticamente relacionadas.....	163
Tabla 44.	Comparación en la composición de los ácidos grasos celulares de las cepas M17 ^T , M49, M76, M15Ø-3, 2OM6, R37 ^T y las especies filogenéticamente relacionadas.....	165
Tabla 45.	Porcentajes de semejanza obtenidos al comparar la secuencia casi completa del gen 16S rRNA de la cepa 4SM10 ^T con las secuencias del mismo gen relacionadas filogenéticamente.....	170
Tabla 46.	Relación de valores ANI obtenidos por comparación de genomas entre <i>Roseovarius litoralis</i> 4M10 ^T , <i>R. nubinhibens</i> CECT 7750 ^T y <i>R. aestuarii</i> CECT 7745 ^T	172
Tabla 47.	Comparación de la composición de los ácidos grasos de <i>Roseovarius litoralis</i> 4SM10 ^T y otras especies del género <i>Roseovarius</i>	173
Tabla 48.	Características fenotípicas diferenciales entre la cepa <i>Roseovarius litoralis</i> 4SM10 ^T y las especies de <i>Roseovarius</i> filogenéticamente relacionadas.....	174

Índice de Figuras

Fig. 1.	Multiinoculador DenLey Multipoint Inoculator.....	70
Fig. 2.	Placa de BMA inoculada mediante multiinoculador.....	71
Fig. 3.	Árbol filogenético basado en la secuencia casi completa del gen 16S rRNA mediante el algoritmo NJ en el que se muestra la posición de la cepa <i>Halilea mediterranea</i> sp. nov. 7SM29 ^T (= CECT 7447 ^T) y las especies más cercas...	94
Fig. 4.	Imágenes de la morfología celular de la cepa 7SM29 ^T obtenidas con microscopio electrónico de barrido.....	95
Fig. 5.	Árbol filogenético de MP basado en la secuencia casi completa del gen 16S rRNA de la cepa tipo <i>Euzebyella saccharophila</i> gen. nov. sp. nov. 7SM30 ^T (= CECT 7477 ^T) y las especies relacionadas más cercanas.....	101
Fig. 6.	Aspecto que presentan las colonias de la cepa 7SM30 ^T cuando crecen en MA	106
Fig. 7.	Árboles filogenético obtenidos mediante <i>Neighbour Joining</i> basados en las secuencias parciales de los genes 16S rRNA, <i>recA</i> y <i>gyrB</i> de manera individual, así como con sus secuencias concatenadas, en los que se muestra la posición de la cepa <i>Photobacterium aphoticum</i> M46 ^T (= CECT 7614 ^T) y las especies más cercanas.....	112
Fig. 8.	Cultivos de <i>P. aphoticum</i> CECT 7614 ^T , <i>P. ganghwense</i> CECT 7641 ^T , <i>P. halotolerans</i> CECT 5860 ^T y <i>P. rosenbergii</i> CECT 7644 ^T crecidas en LM (28 °C, 2 días).....	115
Fig. 9.	Árbol filogenético basado en la secuencia casi completa del gen 16S rRNA mediante el algoritmo MP en el que se muestra la posición de la cepa <i>Tropicibacter multivorans</i> MD5 ^T (= CECT 7557 ^T) y las especies más cercanas.....	121
Fig. 10.	Micrografías electrónicas de barrido y transmission que muestran la morfología celular de la cepa MD5 ^T	122
Fig. 11.	Perfil de los lípidos polares de las cepas MD5 ^T y <i>Tropicibacter naphthalenivorans</i> CECT 7648 ^T mediante TLC.....	123

Fig. 12.	Dendrograma de distancias obtenido por análisis de MALDI-TOF MS de <i>T. naphthalenivorans</i> CECT 7648 ^T , <i>P. inhibens</i> CECT 7251 ^T , <i>P. gallaeciensis</i> CECT 7277 ^T , <i>P. daeponensis</i> CECT 7309 ^T , <i>S. marina</i> CECT 7688 ^T y <i>N. italica</i> CECT 7645 ^T en la que se muestra la posición de <i>Tropicibacter multivorans</i> MD5 ^T (= CECT 7557 ^T).....	125
Fig. 13.	Árboles obtenidos mediante MP basados en a) la secuencia (1412 bp) del gen 16S rRNA y b) la secuencia parcial (~900 nt) del gen <i>gyrB</i> de la cepa <i>Actibacterium mucosum</i> R46 ^T (= CECT 7668 ^T) y las especies relacionadas más cercanas.....	128
Fig. 14.	Micrografía electrónica de barrido que muestra la morfología celular de la cepa R46 ^T	130
Fig. 15.	Dendrograma de distancias realizado mediante el análisis con MALDI-TOF MS de la cepa R46 ^T , <i>Actibacterium mucosum</i> CECT 7668 ^T y las especies relacionadas.....	134
Fig. 16.	Árbol filogenético obtenido mediante ML basado en la secuencia del gen 16S rRNA en el que se muestra la posición de la cepa <i>Marinifilum flexuosus</i> M30 ^T (= CECT 7448 ^T).....	138
Fig. 17.	Micrografías electrónicas de barrido que muestran la morfología celular, material extracelular y estructuras esféricas de la cepa M30 ^T	140
Fig. 18.	Fotografías que muestran la morfología de las acumulaciones cremosas de crecimiento lento de la cepa M30 ^T	141
Fig. 19.	Dendrograma de distancias realizado mediante el análisis de MALDI-TOF MS de la cepa <i>M. flexuosus</i> M30 ^T (= CECT 7448 ^T) y las especies relacionadas.....	144
Fig. 20.	Árbol filogenético obtenido mediante NJ basado en la secuencia parcial del gen 16S rRNA en el que se muestra la posición de las cepas <i>Vibrio aestivus</i> M22 ^T (= CECT 7558 ^T), <i>V. aestivus</i> M61 (=CECT 7559) y <i>Vibrio quintilis</i> M62 ^T (= CECT 7734 ^T) dentro del género <i>Vibrio</i>	149
Fig. 21.	Dendrograma de distancias realizado mediante el análisis con MALDI-TOF MS de las cepas M22 ^T , M61 (<i>Vibrio aestivus</i> CECT 7558 ^T , CECT 7559), M62 ^T (<i>Vibrio quintilis</i> CECT 7734 ^T) y las especies relacionadas.....	154

Fig. 22	Árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16S rRNA mediante el algoritmo NJ en el que se muestra la posición de las cepas M17 ^T , M49, M76, M15Ø-3, 2OM6, R37 ^T y las especies más cercanas	161
Fig. 23	Microfotografías de contraste de fases de las cepas M17 ^T (izda) y R37 ^T (dcha).....	165
Fig. 24	Dendrograma de distancias obtenido por análisis de MALDI-TOF MS en la que se muestra la posición de las cepas M17 ^T , M49, M76, M15Ø-3, 2OM6, R37 ^T y las especies más cercanas.....	165
Fig. 25	Aspecto que presentan las colonias de la cepa M17 ^T cuando crecen en MA.....	167
Fig. 26	Aspecto que presentan las colonias de la cepa R37 ^T cuando crecen en MA.....	168
Fig. 27	Árbol filogenético de MP basado en la secuencia casi completa del gen 16S rRNA de la cepa 4SM10 ^T (<i>Roseovarius litoralis</i> sp. nov. CECT 7450 ^T) y las especies relacionadas más cercanas.....	171
Fig. 28	Dendrograma de distancias obtenido por análisis de MALDI-TOF MS en la que se muestra la posición de la cepa <i>Roseovarius litoralis</i> 4SM10 ^T y las especies más cercanas del género <i>Roseovarius</i>	175

Abreviaturas, siglas y acrónimos

AAI	<i>Average Amino acid Identity</i> (Identidad aminoacídica media)
ANI	<i>Average Nucleotide Identity</i> (Identidad nucleotídica media)
ADH	Arginina dihidrolasa
ASW	<i>Artificial Sea Water</i> (Agua de mar artificial)
BM	<i>Basal Medium</i> (Medio basal)
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
°C	Grado centígrado
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DDH	<i>DNA-DNA hybridization</i> (Hibridación DNA-DNA)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
DPG	Difosfatidilglicerol
DS	<i>Double strand</i> (cadena doble)
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i> (Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares)
ECL	<i>Equivalent chain length</i> (Longitud de cadena equivalente)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAME	<i>Fatty Acid Methyl Ester</i> (Ésteres metilados de ácidos grasos)
Fig.	Figura
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases)
g	Gramo
gen.	Género
GN	Gram negativo
h	Hora
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta resolución)
ICSP	<i>International Committee on Systematics of Prokaryotes</i>
IJSEM	<i>International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology</i>
IUMS	<i>International Union of Microbial Societies</i>
K2P	<i>Kimura's 2 parameter</i> (Parámetro 2 de Kimura)
LDC	Lisina descarboxilasa
MA	<i>Marine agar</i> (Agar marino)
MB	<i>Marine broth</i> (Caldo marino)
MCS	<i>Marine Cation Supplement</i> (Suplemento de cationes marinos)
min.	Minuto
MK	Menaquinona
MK6	Menaquinona con 6 unidades isoprenoides
MK7	Menaquinona con 7 unidades isoprenoides
MLSA	<i>Multilocus sequence analysis</i> (Análisis de secuencias multigénicas)
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i> (Tipado de secuencias multilócicas)
ML	<i>Maximum Likelihood</i> (Máxima verosimilitud)
mM	Milimolar
MP	<i>Maximum Parsimony</i> (Máxima parsimonia)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

NJ	<i>Neighbor joining</i>
nov.	Novus/nova (Nuevo/a)
ODC	Ornitina descarboxilasa
pb	Pares de bases
PB	<i>Phosphate buffer</i> (Tampón fosfato)
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i> (Tampón fosfato salino)
PC	<i>Phosphatidylcholine</i> (Fosfatidilcolina)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
PE	<i>Phosphatidylethanolamine</i> (Fosfatidiletanolamina)
PG	<i>Phosphatidylglycerol</i> (Fosfatidilglicerol)
PGL	<i>Phosphoglycolipid</i> (Fosfoglicolípido)
PHB	Poli-β-hidroxitirato
PL	<i>Phospholipid</i> (Fosfolípido)
p/v	Peso/Volumen
RDP	<i>Ribosomal database project</i> (Proyecto de base de datos ribosómicos).
rpm	Revoluciones por minuto
SCSIE	Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (Universidad de Valencia)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Dodecil sulfato sódico)
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i> (Microscopía Electrónica de Barrido)
sp.	Especie
SS	<i>Single strand</i> (Cadena simple)
STA	<i>Salt Tolerance Agar</i> (Agar de tolerancia a la sal)
T	Cepa tipo
TBE	Tris-borato-EDTA
TCBS	<i>Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar</i> (Agar tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa)
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i> (Microscopía Electrónica de Transmisión)
THG	Transferencia horizontal de genes
Tm	<i>Melting temperature</i> (Temperatura de fusión)
Tris-HCl	<i>Tris-hydroxymethyl-aminomethane hydrochloride</i> (Clorhidrato de Tris-hidroximetil-aminometano)
TSA	Trypticase Soy Agar (Agar tripticasa de soja)
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
U	Unidad(es) de actividad
UV	Ultravioleta
V	Voltio
v/v	Volumen/volumen
VP	Voges-Proskauer

INTRODUCCIÓN

1. Taxonomía de procariontes

La **sistemática** es el estudio de la diversidad de los organismos y sus relaciones mutuas. Asocia la filogenia, historia evolutiva de un grupo de organismos, con la taxonomía, en la que dichos organismos son caracterizados, nombrados y agrupados conforme a sus relaciones naturales (Brenner y col., 2005a; Madigan y col., 2009). La sistemática no solo incluye la taxonomía, además engloba evolución, ecología, bioquímica, genética, patología, biología molecular y microscopía (Trüper & Schleifer, 2006).

La **taxonomía** es la ciencia de la clasificación de los organismos y está constituida por 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 procariontes son áreas que no están formalmente reguladas y en las que han tenido lugar numerosos cambios en los últimos 50 años.

Rangos taxonómicos

La Regla 5 del *International Code of Nomenclature of Bacteria* (Lapage y col., 1992) establece las siguientes categorías taxonómicas: clase, orden, familia, género y especie, y otros niveles opcionales: subclase, suborden, subfamilia, tribu, subtribu y subgénero. Además, a pesar de no estar recogidos en el Código Bacteriológico, se utilizan dos niveles más por encima de clase: filo y dominio.

En la práctica en la clasificación de procariontes, como en el Bergey's Manual, se usan diversos niveles o rangos. El mayor de ellos es el que divide a los procariontes en dos dominios o reinos: *Archaea* (o

Archaeobacteria) y *Bacteria* (o *Eubacteria*). Cada uno de estos dominios se subdivide en diversas categorías taxonómicas: filo, clase, orden, familia, género, especie y subespecie. A los nombres de estos grupos, desde clase hasta subespecie, se les da un reconocimiento formal ("*standing in nomenclature*") mientras que los rangos inferiores a subespecie sólo son reconocidos para ciertas especies bacterianas (Brenner y col., 2005a). Para cada rango jerárquico se establece una nomenclatura tipo:

- orden tipo para filo, clase y subclase;
- género tipo para orden, suborden, familia, subfamilia;
- especie tipo para género;
- cepa tipo para especie y subespecie.

El nombre de la especie queda vinculado a la cepa tipo que es utilizada como cepa de referencia en estudios comparativos.

A excepción de la especie, todos los demás rangos taxonómicos jerárquicos establecidos en los sistemas de clasificación procariota (género y superiores), son rangos abstractos y artificiales.

El grupo taxonómico básico y más importante en sistemática bacteriana es la especie (Brenner y col., 2005a). El concepto de especie bacteriana está menos definido que en organismos superiores, ya que no se utilizan los mecanismos de reproducción sexual que se manejan en eucariotas superiores para delimitar especies, además la simplicidad morfológica de muchos organismos procariotas aporta poca información útil en taxonomía. En consecuencia, el término especie aplicado en bacterias permite diferentes aproximaciones. Se ha definido la especie como un grupo de cepas que poseen unas características distintivas, que guardan un estrecho parecido entre ellas en las características esenciales que definen a ese grupo o taxón. No se debe por tanto establecer una especie, a menos que pueda ser identificada por caracteres fenotípicos determinativos e identificativos (Rosselló-Móra y Amann, 2001). También ha sido definida 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" (Wayne y col., 1987; Rosselló-Móra y Amann, 2001; Stackebrandt y col., 2002). Esta

definición tiene una base filofenética y se fundamenta en una aproximación polifásica, aunque su utilización se restringe a aquellos microorganismos cultivados en cultivo puro (Vandamme y col., 1996).

Descripción de nuevas especies y géneros bacterianos

Actualmente se acepta que para obtener un sistema adecuado de clasificación de los procariotas, y principalmente en los rangos taxonómicos inferiores como son la especie y el género, es necesaria una aproximación polifásica combinando tantas técnicas y tipos de datos diferentes como sea posible (Vandamme y col., 1996; Goodfellow y col., 1997; Stackebrandt y col., 2002).

El *International Code of Nomenclature of Bacteria* (Lapage y col., 1992) recoge la recomendación de ajustarse a los niveles mínimos (*minimal standards*) establecidos para un grupo o taxón concreto cuando se propone la descripción de un nuevo miembro de ese grupo. Estas características mínimas las elaboran los diversos subcomités especializados en el grupo de bacterias en cuestión del *International Committee on Systematics of Prokaryotes* (ICSP). Cuando estas directrices no existen, se recomienda seguir las normas establecidas para los taxones estrechamente relacionados (Stackebrandt y col., 2002). Cabe destacar el caso de la familia *Flavobacteriaceae*, cuyo subcomité en "Taxonomy of *Flavobacterium* and *Cytophaga*-like Bacteria" publicó en 2002 unas guías para facilitar la correcta descripción de sus miembros (Bernardet y col., 2002). Otros ejemplos son las propuestas para la familia *Halomonadaceae* (Arahal y col., 2007), o para el orden *Halobacteriales* (Oren y col., 1997).

Recientemente, se ha publicado el artículo "*Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes*" (Tindall y col., 2010) donde se proponen unas guías adicionales para la correcta descripción de aislados procariotas. El propósito de la publicación es el de subrayar los elementos clave para la caracterización de los procariotas, aportando un serie de indicaciones y recomendaciones para la publicación de nuevos taxones. Entre otras indicaciones proporciona ciertas directrices para guiar a los taxónomos a la hora de establecer los límites entre especies u otros taxones. La secuencia del gen 16S rRNA por sí sola no describe una especie, pero sí aporta las primeras indicaciones sobre su novedad taxonómica. Se acepta que por norma general dos cepas que comparten menos del 97% de similitud de secuencia en el gen 16S

rRNA no son miembros de la misma especie. Sin embargo, cuando la similitud de secuencia de dicho gen sobrepasa el valor de 97% se deben utilizar otros métodos, como la hibridación DNA-DNA (DDH) o análisis de secuencias génicas con una mayor resolución, para establecer la novedad taxonómica de las cepas. Estos métodos además deben corresponderse con la caracterización basada en pruebas fenotípicas (Tindall y col, 2010).

La información presentada en la descripción formal de un nuevo taxón debe de ser lo más completa posible. Las propiedades a investigar variarán en función de si se trata de la descripción de un nuevo género, es decir, las propiedades indicadas como específicas del género, o de una nueva especie, en cuyo caso se trataría del conjunto de características ya indicadas para discriminar entre las especies descritas para el género (Trüper & Schleifer, 2006). Se debe presentar una caracterización morfológica y ultraestructural, especialmente para aquellas especies que representen nuevos géneros. Además, se deben incluir datos de condiciones de aislamiento, abarcando desde la localización del lugar de aislamiento (incluyendo referencias geográficas como datos de latitud y longitud o coordenadas GPS, cuando sea posible), la designación de la cepa (incluyendo los números de acceso de las colecciones de cultivo) y la información asociada del ambiente en que fue aislada la cepa (e.g., pH, salinidad, temperatura, composición química, profundidad en la columna de agua o del perfil del suelo,...etc.). Por otro lado, se debe indicar el tipo de movilidad, las características coloniales, las condiciones óptimas de crecimiento y la composición de bases del DNA (Trüper & Schleifer, 2006; Tindall, 2010).

Un caso especial es el estatus *Candidatus*. Es un estatus provisional aceptado por el ICSP y propuesto por Murray y Schleifer (1994), Murrau y Stackebrandt (1995) para clasificar taxones procariotas que no han podido ser cultivados axénicamente, por presentar requerimientos especiales (por ejemplo patógenos obligados intracelulares y endosimbiontes), y de los que se posee cierta información sobre secuencias génicas y/o caracteres fenotípicos, pero no la suficiente como para definirlo formalmente como taxón. Mediante la secuencia génica (16S rRNA) estas cepas pueden ser ubicadas en un marco filogenético.

1_1. Fuentes de información en taxonomía de procariontas

Entre las obras más utilizadas en taxonomía de procariontas se encuentran el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* y el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.

El *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* se publicó por primera vez en 1923 por David Bergey, catedrático de bacteriología de la Universidad de Pennsylvania, y cuatro colaboradores más. Posteriormente, el manual se ha actualizado a lo largo de los años con varias ediciones hasta la novena y última edición en 1994. El manual es un compendio de características fenotípicas de bacterias utilizado para la identificación bacteriana.

En 1984, se publicó la primera edición de otro manual más enfocado a la clasificación que a la identificación: el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. La clasificación propuesta por esta primera edición que constaba de cuatro volúmenes se basaba en la tinción de Gram y agrupaba todas las bacterias en un solo reino, Procarionta. Además, las bacterias se distribuían en base a caracteres descriptivos morfológicos y metabólicos, por ejemplo, espiroquetas, cocos y bacilos aerobios gramnegativos, cocos grampositivos, etc.

En 2001 se publicó el primero de los cinco volúmenes de la segunda edición (The *Archaea* and the deeply branching and phototrophic *Bacteria*). El volumen 2 (The *Proteobacteria*), publicado en 2005, está subdividido en tres partes, Part A, The Introductory Essays; Part B, The *Gammaproteobacteria*; y Part C, The *Alpha-*, *Beta-*, *Delta-*, and *Epsilonproteobacteria*. En 2009 se publicó el tercer volumen, The *Firmicutes*. Por último, en 2010 se ha publicado el cuarto de los cinco volúmenes, The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* (*Mollicutes*), *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*. El último volumen, The *Actinobacteria*, aún no ha sido publicado. Esta segunda edición del manual ha incorporado el marco general surgido de la secuenciación y análisis del gen de la subunidad pequeña del RNA ribosómico (SSU rRNA) y de los estudios genómicos, y compagina esta información con la abundante información fenotípica. Presenta una organización filogenética y no por grupos funcionales, dando mayor relevancia a los aspectos ecológicos que en la versión anterior.

Una tercera referencia esencial sobre la diversidad procariota es “*The Prokaryotes*” publicado por primera vez en 1981 (Starr y col.). La segunda edición se publicó en 1992 (Balows y col.) y consta de seis partes. La parte I dedicada a ensayos introductorios que se ocupan de los aspectos más generales de la microbiología, mientras que la parte II contiene los capítulos generales que abarcan los ciclos de vida, el comportamiento de procariotas, el crecimiento anaeróbico, y una serie de capítulos que describen los grupos familiares organizados fenotípicamente. Las partes III y IV consisten en capítulos dedicados a géneros, familias y taxones superiores organizados filogenéticamente. La Parte V abarca los microorganismos con relaciones simbióticas, mientras que la parte VI cubre géneros aún no asignados filogenéticamente. En general, este trabajo proporciona información detallada sobre el enriquecimiento, aislamiento y cultivo de numerosos grupos de bacterias y arqueas. Presenta un tratamiento de la información diferente al del *Bergey’s Manual* con capítulos transversales y recopilados por grupos de microorganismos. Combina datos filogenéticos y sistemáticos con conocimientos sobre la genética, la fisiología y la aplicación. Sin embargo, la sistemática no es del todo completa y el tratamiento de los distintos taxones no es equilibrado. Por otro lado, a partir de la segunda edición, tiene la ventaja de haberse publicado primero en su versión *on line*, de manera que la información actualizada es accesible más rápido no teniendo que esperar a su publicación en papel. Este trabajo consta de siete volúmenes en su tercera edición (Dworkin y col., 2006). El volumen 1 trata sobre asociaciones simbióticas, biotecnología y sobre microbiología aplicada. El volumen 2 se centra en la ecofisiología y la bioquímica. Por último, los volúmenes 3 y 4 comienza con los grupos taxonómicos, arqueas y bacterias: *Firmicutes*, *Actinomycetes* y *Cyanobacteria*, mientras que los volúmenes 5, 6 y 7 están dedicados a *Proteobacteria* exclusivamente. La cuarta edición ya está en proyecto.

Naturalmente, además de las obras compendio, la literatura sobre taxonomía procariota es extensa y está repartida en múltiples fuentes incluyendo revistas especializadas. También es muy importante señalar el papel que los recursos en línea juegan en la sociedad de la información en que vivimos. Probablemente el más destacado en bacteriología sea: *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (LPNS, <http://www.bacterio.cict.fr>).

1_2. Publicación efectiva de propuestas taxonómicas

El 1 de enero de 1980 se estableció un nuevo punto de partida de la nomenclatura bacteriana tras la publicación de las *Approved Lists of Bacterial Names* (Skerman y col., 1980). Estas listas contienen todos los nombres de bacterias con validez en nomenclatura hasta enero de 1980, unos 2.500 nombres de bacterias. Todos aquellos nombres no incluidos en las listas perdieron su estatus taxonómico, pues resultó imposible predecir con exactitud a qué tipo de bacterias hacían referencia los nombres registrados hasta entonces en la literatura. Estos nombres fueron aprobados (AL, approved lists) para retenerlos en la nueva nomenclatura bacteriológica (Sneath y Brenner, 1992).

Actualmente, la nomenclatura de bacterias y arqueas está regida por el *International Code of Nomenclature of Bacteria* creado en 1975 y revisado en 1990 (Lapage y col., 1992), que garantiza que los taxones sean correctamente nombrados. Contiene una serie de reglas acerca de los distintos rangos taxonómicos, de cómo se han de nombrar los taxones, tipos de nomenclatura y su designación; reglas acerca de la prioridad y la publicación de nombres; cómo citar a los autores y los nombres de bacterias; modificaciones en la nomenclatura de los taxones como resultado de la transferencia, unión o cambio de rango; reglas sobre nombres ilegítimos,..etc. (Trüper & Schleifer, 2006).

Cuando se describe un nuevo taxón, para que el nombre alcance la validación taxonómica, se debe publicar una descripción detallada de las características y rasgos diferenciales del nuevo taxón y se debe designar el tipo del mismo observando otros requisitos formales como dar la etimología, respetar el principio de prioridad, etc. La publicación puede hacerse en cualquier medio, si tiene lugar en el *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM) el nombre tiene validez el momento en que se hace la publicación efectiva ya que esta revista es la publicación periódica oficial del ICSP, comité de la *International Union of Microbial Societies* (IUMS) constituido por expertos en taxonomía y sistemática de procariotas. Si la descripción del nuevo organismo es publicada en una revista distinta, se debe solicitar la validación del nombre y su aceptación formal de modo que el nuevo nombre aparezca en las listas de validación. Por ello, se habla de nombres válidos cuando la propuesta ha sido publicada en IJSEM (VP, validly published) o cuando se

recoge en una lista de validación si la publicación efectiva ha tenido lugar en cualquier otro medio (VL, validation list).

1_3. Papel de las colecciones de cultivo en taxonomía de procariotas

Una singularidad del código bacteriológico, frente a otros códigos de nomenclatura biológica, es el concepto de tipo, que liga cada nombre a un representante del conjunto delimitado por dicho nombre. Además, en el caso de la especie (y la subespecie) su tipo es una cepa designada a tal efecto por los autores que proponen el nombre. Esto hace que en definitiva, toda la clasificación descansa sobre especímenes que deben mantenerse viables y disponibles sin restricciones para la comunidad científica.

Las cepas tipo representan la referencia para la caracterización taxonómica, para la identificación de nuevos aislados, para la reclasificación de taxones ya conocidos o para la descripción de los nuevos (Labeda, 2005). La cepa tipo debe mantenerse en cultivo puro y sus características fenotípicas y genómicas deben coincidir con las características definidas en la descripción de la especie.

El depósito de la cepa tipo en dos colecciones de cultivo de dos países diferentes, es un requisito indispensable para la publicación válida de nuevos taxones que garantiza su disponibilidad y accesibilidad pública para la realización de futuros estudios.

Las colecciones de cultivo son fundamentales en sistemática procariota ya que son depositarias de la diversidad microbiana actuando no solo como centros receptores sino que además catalogan, intercambian y suministran cepas de referencia utilizadas en ensayos de laboratorio, al tiempo que mantienen la trazabilidad mediante la conservación y el almacenamiento de microorganismos depositados. Dentro de estos están las cepas tipo. También sirven como centros de excelencia en la investigación en sistemática y taxonomía ya que son depositarios de las cepas de referencia utilizadas en la investigación taxonómica. En gran parte, la identificación y caracterización de las cepas son funciones de las colecciones, y la disponibilidad de una gran colección de cepas es esencial para este tipo de investigaciones (Labeda, 2005).

Según los últimos datos disponibles del Directorio Mundial de Colecciones de Cultivos (<http://wdcm.nig.ac.jp/statistics.html>), en abril de 2012 había 593 colecciones de cultivos en la Federación Mundial

de Colecciones de Cultivos (WFCC) distribuidas en 68 países que conservan más de 1,3 millones de cepas microbianas. En España se encuentra el Banco Español de Algas, BEA, especializada en microalgas y cianobacterias (<http://bea.marinebiotechnology.org>); y la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, <http://www.cect.org/>) que identifica, caracteriza, conserva y suministra bacterias, arqueas, levaduras y hongos filamentosos.

1_4. Aproximaciones metodológicas utilizadas en taxonomía de procariotas

En la práctica, la taxonomía procariota utiliza métodos fenotípicos y genotípicos para la identificación y descripción de sus taxones. La caracterización fenotípica examina los rasgos morfológicos, metabólicos, fisiológicos y químicos de la célula. La caracterización genotípica considera aspectos comparativos de las células al nivel de su genoma. Estos dos tipos de análisis agrupan a los organismos según sus parecidos. Se complementan con el análisis filogenético, que intenta situar a los organismos en el marco de sus relaciones evolutivas. En taxonomía de procariotas la historia evolutiva de los microorganismos se lleva a cabo en base a los datos genéticos, principalmente del gen 16S rRNA (Trüper & Schleifer, 2006).

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

La caracterización fenotípica incluye, entre otras cosas, las características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas de los microorganismos y son aspectos útiles en la identificación rutinaria. La mayoría de los procariotas no posee características morfológicas complejas ni presenta ciclos de vida con diferentes estadios morfológicos. La reproducibilidad de los datos fenotípicos inter- e intralaboratorio solo se consigue usando pruebas estandarizadas (medio de cultivo, temperatura de incubación, etc.).

La caracterización fenotípica se basa tanto en metodologías convencionales como en kits comerciales miniaturizados y automatizados, sistemas multiprueba como las galerías API (biomérieux) o Biolog (Biolog Inc.), destinados a grupos específicos de microorganismos que pueden complementar el estudio fenotípico y permitir una rápida diferenciación de los taxones.

Algunas de las características de valor taxonómico se indican a continuación (Madigan y col., 2009):

Morfología y movilidad: reacción a la tinción de Gram, tipo de movilidad, presencia y patrón de distribución de flagelos; tamaño y forma de la célula; presencia de esporas, cuerpos de inclusión (gránulos de PHB, vesículas gaseosas, magnetosomas); pedúnculos o apéndices; formación de cuerpos fructíferos. Características culturales como el aspecto, forma y dimensiones de las colonias, pigmentación, *swarming*, etc.

Fisiología y bioquímica: rangos y óptimos de crecimiento para distintos parámetros físico-químicos como el pH, la temperatura o la salinidad; requerimientos iónicos específicos; relación con el oxígeno (aerobio, anaerobio, facultativo); presencia de catalasa u oxidasa; producción de enzimas extracelulares, etc.

Metabolismo: mecanismos de conservación de la energía (fotótrofo, quimioorganótrofo, quimiolitótrofo), utilización de compuestos de carbono, nitrógeno o azufre; fermentación de azúcares, fijación de nitrógeno, requerimiento de factores de crecimiento.

Otros aspectos: análisis de proteínas, sensibilidad a antibióticos, luminiscencia, análisis de componentes celulares, como lípidos polares, ácidos grasos, quinonas isoprenoides; pigmentos (bacterioclorofila, carotenoides, etc.); peptidoglicano; ácidos teicoicos; poliaminas, etc. Estos últimos quedan incluidos dentro de la quimiotaxonomía, o taxonómica química, que aunque muchas veces es tratada de manera independiente, debe ser considerada como otro tipo de análisis fenotípico, puesto que los parámetros estudiados son un reflejo directo de la expresión de la información genómica de un organismo bajo unas condiciones ambientales.

Caracterización Quimiotaxonómica: se define como el estudio de las variaciones químicas de los organismos vivos y el uso de estas características en la clasificación y la identificación de los mismos. Cuando se realiza un análisis quimiotaxonómico es necesario estandarizar las condiciones de cultivo, ya que la expresión de muchos de los componentes celulares puede variar según las condiciones ambientales. 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).

Composición de **ácidos grasos**. Los tipos y las proporciones relativas de ácidos grasos presentes en la membrana citoplasmática de las células son rasgos fenotípicos esenciales. La técnica empleada para caracterizar estos ácidos grasos se denomina análisis *Fatty Acid Methyl Ester* (FAME), donde los ácidos grasos extraídos de cultivos incubados en condiciones estándar son modificados para formar sus ésteres metílicos correspondientes. Los ácidos grasos se modifican por saponificación con hidróxido de sodio de modo que se convierten en compuestos volátiles (Krieg, 2005) que pueden ser identificados por cromatografía de gases (GC). Se obtiene un cromatograma que muestra los tipos y cantidades de ácidos grasos de la bacteria pudiéndose comparar con bases de datos de perfiles de ácidos grasos de otras bacterias cultivadas en las mismas condiciones. El análisis FAME requiere una estricta estandarización ya que el perfil de ácidos grasos puede variar en función de la temperatura, la composición del medio y la fase de crecimiento (exponencial frente a estacionaria). Por tanto, el uso de este análisis se limita a aquellos organismos capaces de crecer en las condiciones estandarizadas (Busse y col., 1996).

Análisis de **quinonas y lípidos polares**. La mayoría de las bacterias contienen quinonas isoprenoides, ya sean menaquinonas, ubiquinonas o ambas. Estos componentes celulares tienen en ocasiones un alto valor taxonómico. Las quinonas son componentes de la membrana citoplasmática con un importante papel en muchas de las reacciones de oxidorreducción que se producen en las células bacterianas, como por ejemplo, el sistema de transporte de electrones de la cadena respiratoria o la fosforilación oxidativa. Las quinonas se pueden extraer mediante una mezcla cloroformo/etanol y se pueden separar fácilmente por cromatografía en capa fina (TLC) o cromatografía líquida de alta presión (HPLC), aunque existen muchos métodos para su estudio.

Los lípidos polares más comunes son los fosfolípidos, aunque también encontramos glicolípidos y aminolípidos. Los fosfolípidos son componentes esenciales de la membrana celular y están relacionados con su permeabilidad. Los fosfolípidos más ampliamente distribuidos son: fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol y difosfatidilglicerol. La extracción de los lípidos polares de las bacterias con solventes orgánicos y su análisis mediante TLC permite obtener un patrón característico con valor taxonómico (Tindall y col., 2007).

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

El estudio del genotipo bacteriano se ha venido desarrollando desde la segunda mitad del siglo XX. Una de las primeras técnicas en ser utilizadas fue la determinación de la composición de bases complementarias de los genomas (G+C). La evolución de ésta y otras técnicas ha permitido profundizar en el estudio del contenido genómico del DNA, pero destaca la técnica de hibridación DNA-DNA (Schildkraut y col., 1961; Brenner y col., 1969), que sigue siendo en la actualidad la técnica estándar para la circunscripción de las especies bacterianas.

Contenido en Guanina y Citosina (G+C) del DNA. La composición de bases de una molécula de DNA se puede definir como la abundancia relativa de los nucleótidos guanina y citosina en dicha molécula:

$$\frac{G+C}{A+T+G+C} \times 100(\text{mol}\%)$$

Normalmente se utiliza en la descripción de nuevas especies y géneros, ya que permite diferenciar entre cepas fenotípicamente similares pero diferentes genómicamente (Goodfellow y O'Donnell, 1993).

El contenido de G+C puede variar entre 24 y 76 mol% en los genomas procariotas (Tamaoka y Komagata 1984; Vandamme y col., 1996). A mayor divergencia en el contenido de G+C entre dos microorganismos, menor relación entre ellos. Empíricamente, se ha demostrado que microorganismos que difieren en más de un 10 mol%, no pertenecen habitualmente al mismo género, y si difieren en más de un 5 mol% pertenecen a especies distintas (Vandamme y col., 1996). Sin embargo, el contenido de G+C no tiene en cuenta la secuencia lineal de bases en el DNA, por lo que valores próximos entre dos microorganismos no necesariamente indican que exista una estrecha relación entre ellos. Por lo tanto, este criterio sólo se utiliza de modo excluyente.

Hibridación DNA-DNA (DDH, *DNA-DNA hybridization*)

Una característica del DNA de doble cadena es su capacidad de reasociación o hibridación tras ser desnaturalizado a altas

temperaturas. Cuando la temperatura baja entre 25 y 30 °C respecto a su punto de desnaturalización, las cadenas complementarias pueden reasociarse de nuevo hasta formar la estructura dúplex nativa en función de la similitud de sus secuencias nucleotídicas (Brenner y col., 2005a). Esta técnica genera una medida indirecta del grado de similitud de secuencia genómica a nivel de la estructura primaria entre parejas de genomas y se expresa normalmente como porcentaje de reasociación o de hibridación (Goodfellow y O'Donnell, 1993). No existe una correlación lineal entre la similitud de las secuencias (estructura primaria) y los valores de hibridación, por lo que no se habla de homología al referirse a los valores de hibridación sino de similitud genómica, a mayor reasociación DNA-DNA más emparentados están los microorganismos.

El proceso de hibridación DNA-DNA (DDH) se puede medir mediante dos parámetros: la tasa relativa de unión o *relative binding ratio* (RBR) y la diferencia en el punto medio de las curvas de desnaturalización térmica del DNA homodúplex y heterodúplex (ΔT_m). El RBR refleja la proporción relativa de hibridación entre DNA heterólogos en comparación con la hibridación obtenida entre DNA homólogos, asumiendo que los valores de hibridación obtenidos con el homodúplex representan el 100% de reasociación. La desnaturalización del DNA de doble cadena depende del contenido en G+C (mol%), de la fuerza iónica de la solución en el que está disuelto el DNA y de la temperatura. En una curva de desnaturalización térmica de un DNA de doble cadena, la temperatura a la que el 50% de las cadenas están desnaturalizadas, es lo que se conoce como punto medio de desnaturalización térmica o *melting temperature* (T_m). En la medida en que los DNA heterodúplex tienen menos apareamientos de bases que los DNA 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 DNA-DNA es el ΔT_m entre la T_m de DNA homodúplex y la T_m de los DNA 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. Por el contrario, cuando se comparan valores de DDH basados en la RBR, es importante tener en cuenta la metodología seguida pues el resultado puede variar (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 DDH entre el 0% y el 100% (Goodfellow y O'Donnell, 1993; Roselló-Móra, 2006).

La DDH, se trata de una técnica laboriosa y costosa, que no permite generar una base de datos escalable de manera similar a la de las secuencias nucleotídicas, ya que los resultados se obtienen por parejas de microorganismos y su reproducibilidad depende de la metodología empleada. Sin embargo, a pesar de las limitaciones, es una medida de la similitud genómica que puede ser aplicada a todos los procariotas cultivables siendo la técnica estándar para delimitar la especie procariota (Goodfellow y col., 1997). Cuando dos cepas presentan valores de DDH elevados, se considera que están filogenéticamente relacionadas. Los datos experimentales obtenidos con esta técnica presentan una elevada correlación con los de otras aproximaciones. 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 DDH están por encima del 70% o cuyo ΔT_m es inferior a 5 °C (Wayne y col., 1987; Ward, 1998).

Debido a los inconvenientes que presenta la DDH, se han realizado estudios de correlación entre ésta y otras técnicas (por ejemplo secuencias génicas del 16S rRNA), con el fin de proponerlas como complementarias o alternativas para delimitar especies procariotas. Sin embargo, y dado que no existe una correlación lineal entre el porcentaje de DDH y el porcentaje de similitud de secuencias del 16S rRNA, la definición de especie procariota no puede basarse únicamente en este último parámetro (Stackebrandt y Goebel, 1994). Sin embargo, sí permite obtener con bastante precisión la situación filogenética de los microorganismos (Goodfellow y col., 1997). Empíricamente se ha visto que cepas con similitudes de secuencia del gen 16S rRNA inferiores al 97% siempre muestran valores de DDH inferiores al 70% y por consiguiente pueden ser consideradas de diferente especie sin necesidad de realizar estudios de DDH. Por otro lado, cuando dos cepas presentan valores de similitud de secuencia por encima del 97% e incluso del 100% pueden o no pertenecer a la misma especie. En este caso, es necesario realizar estudios de DDH

para dilucidar la vinculación entre las cepas (Stackebrandt y Goebel, 1994).

ANÁLISIS FILOGENÉTICO BASADO EN SECUENCIAS GÉNICAS

Los avances en el conocimiento del DNA y el desarrollo de nuevas técnicas moleculares evidenciaron que la secuencia nucleotídica de determinados genes (y la aminoacídica en los que codifican proteínas) podían reflejar la evolución de los microorganismos, al actuar como relojes moleculares, como es el caso del citocromo c de los eucariotas.

El análisis de secuencias génicas posee un serie de ventajas respecto a otras técnicas utilizadas en taxonomía procariota ya que los datos pueden estar disponibles en bases de datos públicas a disposición de la comunidad científica; a diferencia de la mayoría de técnicas de tipificación molecular los resultados obtenidos son reproducibles intra- e interlaboratorio; el análisis de datos es escalable, permitiendo comparar secuencias de estudios independientes; y además, el análisis de secuencias puede ser realizado en los tres dominios del árbol de la vida: *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*.

Los rRNA y los genes que los codifican fueron los primeros marcadores moleculares utilizados para establecer las relaciones filogenéticas en los procariotas (Sogin y col., 1971; Woese y col., 1974). El rRNA tiene una función universal y constante que ha presentado un elevado grado de conservación desde las primeras etapas de la evolución. Una característica del análisis del rRNA es la relativa simplicidad que supone alinear sus secuencias, gracias a la estructura secundaria común que presentan sus moléculas (Embley y Stackebrandt, 1997; Ludwig y col., 1998). Además, los genes ribosómicos son buenos marcadores moleculares por presentar distinta tasa de evolución a lo largo de sus secuencias, de modo que hay alternancia de regiones conservadas y variables.

En procariotas, las moléculas de rRNA se nombran por su coeficiente de sedimentación como 23S, 16S y 5S, con longitudes aproximadas de 2900, 1540 y 120 nucleótidos, respectivamente. A mediados de los 60 surge un método para obtener catálogos de oligonucleótidos (Sanger y col., 1965) y durante más de una década el método es explorado con moléculas de rRNA sobre todo por Carl Woese y sus colaboradores quienes concluyeron que puede ser utilizado para

alcanzar una filogenia universal (Fox y col., 1977; Woese, 1987). A mediados de los 80 y gracias a las mejoras en los métodos de secuenciación (Lane y col., 1985) se impone la secuenciación (casi) completa de la fracción del 16S rRNA, que al ser una molécula considerablemente mayor que el 5S, contiene más información genética. Aunque el tamaño del 23S rRNA es aún mayor su uso en taxonomía no se ha popularizado tanto porque el esfuerzo de secuenciación por el método de Sanger es también mayor (Ludwig y Schleifer, 1994; Ludwig y col., 1998).

En su momento, el análisis de las secuencias de rRNA permitió revelar información tan novedosa como el reconocimiento de *Archaea* (*Archaeobacteria*) como linaje independiente de *Bacteria* (*Eubacteria*) así como un importante reordenamiento del esquema general de clasificación procariota (Woese y Fox, 1977, Woese, 1992; Wheelis y col., 1992).

A la hora de utilizar los rRNA o cualquier otra secuencia génica como marcador molecular para deducir la filogenia hay que considerar que:

- no haya sufrido transferencia horizontal de genes (THG), para que reflejen realmente las relaciones evolutivas entre microorganismos;
- la similitud entre las secuencias génicas sea un reflejo de la similitud que presentan los genomas completos y por tanto de la distancia evolutiva entre los microorganismos;
- las secuencias tengan un tamaño adecuado, ni demasiado pequeño, para que tenga suficiente información genética, ni demasiado grande, para que se pueda secuenciar con facilidad;
- la tasa de evolución del gen a analizar vaya pareja al poder de resolución al que se quiere llegar,
- los genes seleccionados, a ser posible, presenten una única copia en el genoma.

Aunque este último punto no siempre se cumple con los genes ribosómicos, en la práctica se ha demostrado que la existencia de múltiples operones de rRNA tiene poca repercusión en la inferencia filogenética por ser todas las copias genómicas muy semejantes salvo en algunos pocos taxones.

Los denominados genes *housekeeping* también cumplen bien con los requisitos anteriores y por ello han sido utilizados para establecer las relaciones filogenéticas de los microorganismos. Algunos ejemplos son la subunidad beta de la DNA girasa (*gyrB*), el factor sigma 70 de la RNA polimerasa (*rpoD*), la uridilato quinasa (*pyrH*), la subunidad beta de la ATP sintetasa (*atpD*), proteínas de recombinación (*recA* y *recN*), los factores de elongación EF-G (*fusA*), etc. (Ludwig y Schleifer, 1994; Zeigler, 2003; Le Roux y col., 2005; Arahal y col. 2008).

Además, en los últimos años se han popularizado los estudios multigénicos o MLSA, que consisten en el análisis de las secuencias de dos o más genes concatenados (Pascual y col., 2010, Martínez-Murcia y col., 2011, de la Haba y col., 2012). Las ventajas con respecto al análisis de un único gen son claras pues al incluir varios genes, la cantidad de nucleótidos analizados es mayor y en principio el poder de resolución también es mayor; además, se pueden seleccionar genes con una determinada tasa de evolución según el poder de resolución al que se quiere llegar. Por otro lado, 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, razón por la que se seleccionan genes con una amplia distribución física en el genoma.

▪ Alineamiento de las secuencias

Es una manera de representar y comparar dos o más secuencias nucleotídicas o aminoacídicas para resaltar zonas de similitud que pueden indicar relaciones funcionales o evolutivas entre los genes o proteínas comparadas. Se puede trabajar con secuencias pertenecientes a un solo gen o a varios genes concatenados en el caso de un estudio multigénico. Si dos secuencias comparten un ancestro común, las diferencias pueden interpretarse como mutaciones puntuales y los huecos como resultado de mutaciones de inserción o deleción. El alineamiento se basa en la aplicación de un conjunto de algoritmos en los datos de secuencia y se facilita utilizando la pauta de lectura si la secuencia nucleotídica es codificante o la estructura secundaria, en el caso de tenerla como ocurre en los rRNA. En este último caso se cuenta además con la ventaja de la existencia de bases de datos públicas que permiten trabajar con secuencias ya alineadas, facilitando la elaboración de árboles filogenéticos. Un ejemplo es *The All-Species Living Tree*

Project, que se trata de una extensa base de datos pública de secuencias del gen 16S rRNA de alta calidad y con una longitud mínima de 1200 pb. (Yarza, y col., 2010; Munoz y col., 2011). En agosto de 2011 se hizo pública la versión actualizada LTPs106_SSU.

▪ Relaciones entre los taxones

Una vez alineadas las secuencias se pueden establecer las relaciones entre los taxones. Las secuencias pueden ser analizadas como datos de distancias o como datos de caracteres.

Los métodos de distancias utilizan el alineamiento de secuencias para calcular una matriz de distancias de acuerdo a un modelo de evolución entre taxones para posteriormente representar las relaciones en un árbol. Las distancias génicas son expresadas como la fracción de sitios que difieren entre dos secuencias en un alineamiento múltiple. Así, cuanto más distantes estén dos taxones evolutivamente, más diferencias nucleotídicas cabe esperar y por consiguiente mayor distancia génica. En este trabajo se ha utilizado el método de distancia Neighbor Joining.

Neighbor Joining (NJ) se basa en el principio de mínima evolución y por ello mejor árbol es aquél que menor longitud total (suma de las longitudes de todas las ramas) presenta de acuerdo con la matriz de distancias. El método agrupa en cada paso a los taxones vecinos (el par de nodos que están más cercanos entre sí respecto al resto). NJ es un método que genera árboles no enraizados, por lo que una manera de enraizar el árbol es incluir en el análisis un *outgroup* o grupo externo.

Los métodos basados en caracteres hacen uso de la información de cada columna (sitio, posición) del alineamiento múltiple para establecer la mejor hipótesis. En este trabajo se han utilizado los métodos de caracteres Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud.

Máxima Parsimonia (MP) considera que el árbol más probable es aquél que requiere menor número de cambios para explicar los datos del alineamiento. Este método utiliza únicamente los “*sitios informativos*”. Un sitio informativo es aquél en el que al menos hay dos estados de carácter diferentes y en el que cada uno de los estados está representado en al menos dos de las entidades. De esta manera, se estudia cada uno de los sitios informativos en cada posible árbol y se cuenta el número de cambios requeridos para

generar cada árbol, siendo el más “parsimonioso” aquél que requiere un menor número de cambios.

Máxima Verosimilitud (ML, *Maximum Likelihood*) es un método estadístico que requiere un modelo de evolución explícito para el cálculo de las probabilidades. El mejor árbol es aquél que explica con una probabilidad mayor la evolución de una serie de caracteres dado un modelo evolutivo. Se basa en encontrar la probabilidad de que se hayan generado los datos a partir de un árbol y un modelo de evolución determinado.

Los datos filogenéticos se usan en taxonomía bacteriana para complementar la información fenotípica y genotípica. Además, el análisis filogenético permite encuadrar a los organismos en un sistema de clasificación estructurado conforme a sus relaciones evolutivas, que es uno de los objetivos esenciales de la sistemática microbiana. Por tanto, los datos filogenéticos son un componente clave de la taxonomía polifásica. El análisis filogenético empezó, como ya se ha mencionado, utilizando genes individuales y de forma muy destacada el 16S rRNA.

Una de las técnicas moleculares que más relevancia ha alcanzado en la taxonomía procariota es el *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA), técnica que se ha propuesto como herramienta para delimitar una especie procariota desde un punto de vista genómico y filogenético. Sin embargo, 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 DDH o genomas secuenciados (Stackebrandt y col., 2002). Una de las ventajas que tiene el MLSA respecto a otras técnicas como la DDH, es su bajo coste, reproducibilidad intra- e interlaboratorio, y la capacidad de establecer las relaciones filogenéticas de una manera más precisa. La tecnología de la secuenciación es rápida, barata y reproducible.

El principal problema que existe 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 ser utilizados en los estudios de MLSA nunca serán los mismos para todos los taxones y han de establecerse para cada grupo bacteriano.

En los últimos años se han desarrollado nuevas herramientas moleculares e informáticas que permiten la secuenciación completa de los genomas y su análisis. A partir de este nivel de información genómica se podrán estimar las similitudes genómicas completas entre cepas (inter- e intraespecífica), establecer de manera inequívoca las verdaderas relaciones evolutivas entre las cepas (filogenómica), dilucidar qué caracteres fenotípicos son análogos, etc. 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.

FILOGENÓMICA

Debido a su pequeño tamaño, el primer organismo vivo en ser secuenciado al completo fue la bacteria *Haemophilus influenzae* Rd (Fleischmann y col., 1995). Este hito dio pie a otros muchos proyectos, algunos tan ambiciosos como el proyecto Genoma Humano, que elevaron la demanda de secuenciación de bajo coste, lo que a su vez propició el desarrollo de nuevas tecnologías de **secuenciación de alto rendimiento**. El impacto de las mismas en múltiples disciplinas científicas, y por tanto en la sociedad, es enorme. Así, en Bacteriología es factible hablar de pangenomas de especies, estudios metagenómicos de ambientes o secuenciación de una sola célula. A finales de 2009 se sobrepasó la cifra de 1000 genomas procariotas completos en las bases de datos públicas (Lagesen y col., 2010), mientras que en febrero de 2012 *Genomes Online Database* (<http://www.genomesonline.org/>) mostraba más de 12500 proyectos de procariotas (y casi 3000 de ellos completos).

Todo este flujo de información ha posibilitado nuevas metas pero también ha supuesto nuevos retos, siendo el más importante el tratamiento eficiente de un volumen de datos en crecimiento constante. En el campo de la taxonomía bacteriana, como era de suponer, se ha tratado de ver la correlación entre los valores obtenidos por DDH y la semejanza a nivel de genoma completo (Konstantinidis y Tiedje, 2005a,b; Roselló-Móra, 2005, 2006; Goris y col., 2007; Auch y col., 2010a,b). Así, un método alternativo al DDH para delinear especies procariotas es la utilización de los parámetros ANI (identidad nucleotídica media) y AAI (identidad aminoacídica media). Ambos son parámetros derivados de la comparación de parejas de genomas (cepas), que representan el promedio de la identidad de secuencia que muestran todos los genes ortólogos

compartidos (aminoácidos o nucleótidos, respectivamente). Proporcionan una medida robusta de la similitud genómica que presentan las cepas, pudiendo ser utilizados con la misma finalidad que la DDH y delimitar la especie. Se ha visto empíricamente que valores de aproximadamente el 95% de ANI equivalen al valor 70% de DDH utilizado para definir la especie procariota (Richter y Rosselló-Móra, 2009). Estos parámetros 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 ANI y AAI presentan diferentes niveles de resolución, el primero para microorganismos filogenéticamente relacionados y el segundo para microorganismos distantes (Konstantinidis y Tiedje, 2005a,b; Roselló-Móra, 2005, 2006). Un aspecto pragmático nada desdeñable es la posibilidad de automatizar la comparación de genomas y eludir pasos que puedan alargar innecesariamente el análisis e incluso introducir sesgos, como por ejemplo la anotación de genes, cosa que se puede conseguir con los parámetros aludidos.

Otro parámetro propuesto es el cálculo del coeficiente de correlación en la frecuencia de uso de oligonucleótidos (Bohlin y col., 2008), sobre todo tetranucleótidos (índice TETRA) por ofrecer un buen balance entre cantidad de información (señal específica) y consumo computacional (memoria de procesador). En este caso, además, se trata de un parámetro no dependiente de alineamiento, aunque como contrapartida supone una reducción de información al eliminar la secuencia primaria.

Recientemente han surgido programas de distribución libre y plataformas para obtener estos parámetros a partir de datos crudos de secuencias genómicas, incluso borradores (genomas no completos). Se ha propuesto que, con fines taxonómicos, estos análisis pueden ser llevados a cabo con confianza si se cuenta con al menos un 20% de cobertura sobre los genomas de las cepas comparadas (Richter y Rosselló-Móra, 2009).

No menos importante que el disponer de técnicas de secuenciación de bajo coste y de aproximaciones metodológicas consensuadas para comparar genomas útiles en Taxonomía bacteriana, es el hecho de contar con una buena base de datos que incluya los organismos de referencia, es decir, las cepas tipo. Si bien durante más de una década los proyectos de secuenciación se establecían con un sesgo

antropocéntrico (los organismos escogidos lo eran en la mayoría de los casos por su importancia clínica y/o biotecnológica) la tendencia ha ido cambiando para incluir cepas que expandan la biodiversidad abarcada con estos métodos. En este sentido es muy destacable la labor del proyecto GEBA (*Genomic Encyclopedia for Bacteria and Archaea*). Este es el primer proyecto que utiliza el árbol de la vida de forma sistemática para seleccionar las cepas de interés. El objetivo a largo plazo de GEBA es el de generar genomas de referencia de todos los grupos de arqueas y bacterias, lo que podría representar unos 5000 genomas que se pondrían a disposición de la comunidad científica a través de la web del JGI (*Joint Genome Institute*, <http://www.jgi.doe.gov/>) y las base de datos de secuencias génicas del NCBI (Genbank, DDBJ y EMBL).

2. Diversidad bacteriana marina

El mar constituye el mayor hábitat de la biosfera, contiene más de un 97% del total de agua que forma la hidrosfera y es el ecosistema más extenso del planeta pues cubre alrededor de 70% de la superficie de la Tierra, albergando la mayor abundancia y diversidad de microorganismos acuáticos.

El agua de mar es salada por la concentración de sales minerales disueltas que contiene (35‰ o 3,5%). Los iones más abundantes son el cloruro (Cl^-) y el sodio (Na^+), aunque también forman parte de su composición: sulfato (SO_4^{2-}), magnesio (Mg^{2+}), bicarbonato (HCO_3^-), calcio (Ca^{2+}), bromuro (Br^-), potasio (K^+), flúor (F^-), estroncio (Sr^{2+}), ácido bórico (H_3BO_3) y cantidades traza de otros elementos químicos. Esta salinidad es lo que hace del mar un biotopo especial y es la causa de que la gran mayoría de animales y plantas marinos sólo puedan vivir en este medio. El agua oceánica es ligeramente alcalina, su pH está entre 7,5 y 8,4 y varía en función de la temperatura, de la salinidad, de la presión o profundidad y de la actividad de los organismos marinos (Margalef, 1998).

Los océanos difieren en muchos aspectos de los ambientes de agua dulce, en particular en la salinidad, la temperatura media, la profundidad y el estado nutricional. Además, existe una diferencia clara entre los microorganismos que habitan en mar abierto y los procedentes de las profundidades marinas (Madigan y col., 2009). En el mar abierto, en la llamada zona pelágica, suele haber poca cantidad de nutrientes en comparación con muchos ambientes de agua dulce, especialmente en el caso de los nutrientes inorgánicos clave para los microorganismos fotótrofos: el nitrógeno, el fósforo y el hierro. Además, la temperatura del agua de mar es más fría y estacionalmente más constante que las de la mayor parte de los lagos de agua dulce. La salinidad es más o menos constante en la zona pelágica, pero es más variable en las zonas costeras. Las aguas costeras normalmente contienen mayores cantidades de microorganismos que las aguas pelágicas debido a la afluencia de nutrientes u otros contaminantes procedentes del drenaje de la tierra cercana y de la actividad humana (Madigan y col., 2009).

1_1. Principales grupos bacterianos quimioheterótrofos marinos

La mayoría de las bacterias quimioheterótrofas localizadas en la columna de agua son Gram-negativas. Normalmente las bacterias marinas presentan requerimiento de sodio y son productoras de enzimas extracelulares. Muchos de estos organismos producen colonias pigmentadas en medio sólido y utilizan preferentemente aminoácidos como fuente única de carbono y energía frente a los azúcares.

Las bacterias autóctonas del medio marino se encuentran incluidas en distintos grupos filogenéticos y presentan características fenotípicas muy diversas. La gran mayoría de las bacterias heterótrofas marinas aerobias o anaerobias facultativas cultivables se incluye dentro de los filos *Proteobacteria*, concretamente en las clases *Alfaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*, y "*Bacteroidetes*", clase *Flavobacteria*.

▪ Filo *Proteobacteria*

Las proteobacterias (Garrity y col., 2005a) representan el grupo filogenético más extenso y con mayor diversidad fisiológica del dominio *Bacteria*, con más de 900 géneros (901 a 05.08.11) de los más de 1700 géneros procariontes descritos hasta la fecha (1792 a 12.01.12), es además uno de los grupos que más se ha expandido en la última década.

Proteobacteria etimológicamente procede del griego *Proteus*, dios del mar, capaz de adoptar diferentes formas, debido a la diversidad morfológica encontrada entre las bacterias que forman el filo, desde bacilos, cocos, espirilos y filamentos hasta géneros con prosteca e incluso cuerpos fructíferos. Muchas se mueven utilizando flagelos, pero algunas lo hacen por deslizamiento.

Este grupo de microorganismos fue conocido como "las bacterias púrpuras" hasta que en 1988 fue propuesto como Clase *Proteobacteria* por Stackebrandt y col. (1988). La nueva clase se organizó en cuatro 'subclases' que agrupaban géneros en su mayoría heterótrofos (Kerstens y col., 2006).

En 2001, Garrity y Holt propusieron elevar la clase al rango de filo, como se conoce actualmente, y llevar a cabo una división filogenética

basada en la secuencia del gen 16S rRNA, de manera que pasó a tener cinco grupos con el rango de clase:

- *Alphaproteobacteria* (α)
- *Betaproteobacteria* (β)
- *Gammaproteobacteria* (γ)
- *Deltaproteobacteria* (δ)
- *Epsilonproteobacteria* (ϵ)

Las proteobacterias incluyen la mayoría de las bacterias conocidas con importancia médica, veterinaria, agrícola o industrial. Las bacterias de las distintas clases presentan a menudo rasgos fisiológicos en común. Son todas Gram negativas y muestran enorme diversidad de mecanismos de generación de energía, incluyendo especies quimiolitotrofas (e.g., bacterias oxidantes del azufre como *Thiobacillus*, o del amonio como *Nitrosomonas*), quimioorganotrofas (e.g., *Escherichia coli*) y fototrofas (e.g., *Chromatium*, *Rhodospirillum*...etc.). Son también muy diversas fisiológicamente con especies anaerobias, microaerobias y aerobias facultativas (Kersters y col., 2006).

Clase *Alphaproteobacteria*

La clase *Alphaproteobacteria* (Garrity y col., 2006) está organizada en 10 órdenes, 26 familias y cerca de trescientos géneros. (Tabla 1). La mayoría de *Alphaproteobacteria* presentan una morfología bacilar, aunque también hay cocos, espirilos, formas prostecadas, etc. Dentro de la diversidad metabólica, se encuentran bacterias fototrofas rojas no del azufre (RNS) como *Rhodospirillum* y *Rhodobacter*, mientras que otras son quimiolitotrofas (e.g., *Nitrobacter*) o quimioorganotrofas (e.g., *Sphingomonas* y *Brucella*).

El orden ***Caulobacterales*** (Henrici y Johnson, 1935) orden tipo de la clase, está formado por bacterias oligotrofas y quimioorganotrofas, con un metabolismo estrictamente aerobio. Comprende dos familias, *Caulobacteraceae* y *Hyphomonadaceae* (Lee y col., 2005; Jung y col., 2011a), ampliamente distribuidas en ambientes marinos (e.g., *Hellea*, *Henriciella*, *Maribaculum*, *Maricaulis* o *Robiginitomaculum*), especialmente en aguas oligotrofas, pero también en aguas dulces (e.g., *Caulobacter*, *Asticcacaulis*, *Brevundimonas*). La mayoría de los miembros de este orden forman prostecas e hifas, aunque contienen

algunas excepciones como el género *Phenylobacterium*, cuyas especies no son móviles ni prostecadas.

El orden ***Kiloniellales*** fue propuesto por Wiese y col. (2009) para albergar nuevos aislados marinos. Contiene una única especie quimioheterótrofa y mesófila acomodada en el género *Kiloniella*, y en la familia *Kiloniellaceae*. Bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas, que utilizan el nitrato como aceptor de electrones y que presentan una halofilia débil típica de bacterias marinas.

El orden ***Kordiimonadales*** (Kwon y col., 2005), al igual que ocurre en *Kiloniellales*, está formado por una sola familia, "*Kordiimonadaceae*", de bacterias halófilas moderadas y aeróbicas obligadas, aislada de sedimentos marinos.

El orden "***Parvularculales***" alberga a la familia "*Parvularculaceae*" y al género *Parvularcula* (Cho y Giovannoni, 2003) compuesto por bacilos aeróbicos estrictos, móviles por flagelo y con requerimientos salinos para crecer. Produce pigmentos tipo carotenoides, que dan una coloración amarilla o naranja a las colonias. Las especies hasta ahora descritas han sido aisladas de fuentes termales costeras y del mar de los Sargazos.

El orden ***Rhizobiales*** (Kuykendall, 2006) destaca por ser el orden que mayor número de familias agrupa del filo *Proteobacteria*, trece en total, por lo que muestra una gran heterogeneidad fenotípica y metabólica. Se encuentran representantes marinos en varias familias como *Methylocystaceae* (Bowman, 2006a), bacterias metanotrofas obligadas capaces de utilizar metano y metanol como fuentes únicas de carbono y energía. La familia *Hyphomicrobiaceae*, incluye organismos fotosintéticos, quimioautótrofos facultativos, metilótrofos facultativos y quimioheterótrofos, cuenta con algunos ejemplos marinos en los géneros: *Cucumibacter*, *Filomicrobium*, *Hyphomicrobium*, *Pelagibacterium* o *Zhangella* (Xu y col., 2011). También en la familia *Rhodobiaceae* (Garrity y col., 2006), cuyos miembros pueden crecer como fotótrofos y como quimiorganótrofos, en función de si están en presencia de luz o no; destaca el género *Rhodobium*, aislado de ambientes marinos e hipersalinos, o el género *Afifella* (Urdiain y col., 2009) al que pertenece una de las especies de bacterias fotótrofas púrpuras más comunes en medio marino: *Afifella marinum*.

El orden **Rhodobacterales** (Garrity y col., 2006), incluye una única familia, *Rhodobacteraceae*, de gran diversidad fenotípica, metabólica y ecológica, que alberga más de 90 géneros. Entre sus más de 190 especies, incluye fotoheterótrofos (e.g., *Rhodovulum*, *Rubrimonas*), que también pueden crecer de manera fotoautótrofa (*Rhodobacter*) o quimiotrofa (e.g., *Amaricoccus*, *Paracoccus*) bajo las condiciones ambientales apropiadas, quimiorganotrofos con metabolismo respiratorio tanto aerobio estricto (e.g., *Sulfitobacter*) como anaerobio facultativo (e.g., *Ketogulonicigenium*), organismos fermentadores facultativos y metilótrofos facultativos (e.g., *Methylarcula*, *Paracoccus*). Algunos miembros son desnitrificantes, como *Rhodobacter* o *Paracoccus*, y en su mayoría son hábitats marinos (e.g., *Ahrensia*, *Methylarcula*, *Octadecabacter*, *Rhodovulum*, etc.) e hipersalinos (e.g., *Rhodothalassium*, *Rubrimonas*), muchos de los cuales requieren NaCl para crecer. Dentro de esta familia, el llamado grupo *Roseobacter* es uno de los más abundantes, cuenta con más de 50 géneros (LTPs106_SSU), la mayoría de origen marino como *Jannaschia*, *Nautella*, *Oceanicola*, *Phaeobacter*, *Thalassobius* o *Tropicibacter*, entre muchos otros.

El orden **Rhodospirillales** (Garrity y col., 2006) contiene las familias *Rhodospirillaceae* y *Acetobacteraceae*. Es un orden morfológica y metabólicamente diverso, incluye organismos quimioorganotrofos (e.g., *Acetobacter*), quimilitrofos (e.g., *Acidiphilium*) y fotoheterótrofos facultativos (e.g., *Rhodopila*), aunque también alberga algunos ejemplos de fotoautótrofos (e.g., *Roseococcus*) y metilótrofos. Ejemplos de bacterias marinas que requieren NaCl o sales marinas para poder crecer se encuentran principalmente en la familia *Rhodospirillaceae*, en géneros como *Oceanibaculum*, *Rhodospira*, *Roseospirillum*, *Rhodovibrio* o *Pelagius* y de aguas termales saladas en *Tistlia* o lagos salinos en *Phaeovibrio*.

El orden **Rickettsiales** (Garrity y col., 2006) está compuesta por tres familias que se diferencian fundamentalmente por el tipo de organismo que actúa como huésped: la familia *Rickettsiaceae*, asociada a artrópodos; la familia *Anaplasmataceae*, asociada a células de mamíferos, y por último, la familia *Holosporaceae* que es específica de especies de *Paramecium*. No tiene ejemplos de especies marinas.

El orden **Sneathiellales**, propuesto en base a la secuencia del gen 16S rRNA por Kurahashi y col. (2008), alberga dos nuevas especies

marinas recientemente descritas *Sneathiella chinensis* y *Sneathiella glossodoripedis*. Se trata de bacilos Gram-negativos, móviles, mesófilos y aerobios estrictos.

El orden **Sphingomonadales** (Garrity y col., 2006) está formado por bacterias aerobias quimioheterótrofas, a excepción del género *Zymomonas*, que es anaerobia facultativa y fermentadora estricta. Algunas especies sintetizan bacterioclorofila *a* y son fototrofos facultativos, como especies del género *Sphingomonas*. Este orden contiene dos familias, *Erythrobacteraceae*, que agrupa a los géneros *Erythrobacter*, *Erythromicrobium* y *Porphyrobacter*, que son bacterias aerobias quimioorganotrofas aisladas de ambiente marino y agua dulce; y la familia *Sphingomonadaceae*, cuyas especies se caracterizan por la presencia de esfingoglicolípidos en sus envolturas celulares, y forman un grupo versátil de bacteria aerobias distribuidas en diferentes ambientes, como suelo, agua, ambientes contaminados y especies clínicas. Concretamente alberga varios ejemplos de especies marinas, como *Novosphingobium indicum* (Yuan y col., 2009), especies del género *Sphingopyxis*, como *Sphingopyxis baekryungensis* (Yoon y col., 2005), *Sphingopyxis marina* y *Sphingopyxis litoris* (Kim y col., 2008) o el género *Stakelama* (Chen y col., 2010).

Clase Betaproteobacteria

La clase **Betaproteobacteria** (Garrity y col., 2006) está organizada en 7 órdenes y 13 familias, siendo *Burkholderiales* el orden tipo. La familia *Comamonadaceae* es la que agrupa mayor número de representantes, 33 géneros, seguido de *Neisseriaceae* con 31 géneros hasta la fecha. La clase **Betaproteobacteria** presenta una gran diversidad en el metabolismo mostrado por las especies que alberga, además de encontrarse ampliamente distribuida en numerosos hábitats. Los miembros de esta clase contienen ubiquinona con 8 unidades isoprenoides (Q-8), aunque algunos presenten además la menaquinona MK8 (Tindall, 2005).

El orden tipo **Burkholderiales** (Garrity y col., 2006) incluye bacterias quimioorganotrofas aerobias estrictas y anaerobias facultativas, quimiolitotrofos obligados y facultativos, bacterias fijadoras de nitrógeno (como *Burkholderia vietnamiensis*, *Azoarcus indigenus* o *Alcaligenes faecalis*) y patógenos de humanos, animales y plantas (*Ralstonia* o *Neisseria*, entre otros géneros). En los cultivos frescos se

puede observar movilidad en todas las especies. Entre los distintos hábitats de los que se han aislado especies del orden *Burkholderiales* se encuentra el agua (*Burkholderia norimbergensis*), los lagos de agua dulce y sedimentos marinos, como el género *Oxalobacter* perteneciente a la familia *Oxalobacteraceae*.

En general se conocen pocos representantes marinos entre las especies del orden *Burkholderiales*. Además, la mayoría de especies marinas clasificadas dentro de la familia *Alcaligenaceae* han sido reclasificadas y transferidas al género *Halomonas* dentro de *Gammaproteobacteria* (Baumann y col., 1983; Akagawa y Yamasato, 1989; Dobson y Franzmann, 1996).

Dentro del orden ***Hydrogenophilales*** (Garrity y col., 2006) sí que se encuentran especies marinas. Este orden agrupa a microorganismos quimiolitotrofos obligados o facultativos, que pueden utilizar el H₂ (*Hydrogenophilus*) como donante de electrones o reducir compuestos de azufre (*Thiobacillus*). Entre los géneros que agrupa se encuentra *Hydrogenophilus*, bacterias termófilas con óptimos de crecimiento de 60-65 °C. El género *Thiobacillus*, de amplia distribución en suelos, en agua dulce y ambientes marinos, especialmente en zonas de alta concentración en azufre, engloba a bacterias aerobias obligadas y desnitrificantes facultativos.

El orden ***Mehtylophilales*** (Garrity y col., 2006) alberga especies con un metabolismo respiratorio aerobio, que oxidan metanol pero no metano. Se han aislado de diferentes hábitats entre los que no se encuentra el hábitat marino.

Dentro del orden ***Neisseriales*** (Garrity y col., 2006) encontramos algunos ejemplos de bacterias de agua dulce pero no de ambientes marinos. Todas las especies son aerobias y mesófilas. La mayoría de los géneros producen colonias no pigmentadas, con la excepción de *Vogesella* y *Chromobacterium*. No presentan flagelos ni movilidad natatoria.

El orden ***Nitrosomonadales*** (Garrity y col., 2006) contiene 3 familias *Nitrosomonadaceae*, *Gallionellaceae* y *Spirillaceae*. Incluye organismos quimiolitótrofos, mixotrofos y quimioorganotrofos. La familia *Nitrosomonadaceae* son bacterias litoautótrofas que oxidan amonio, como los géneros *Nitrosomonas* o *Nitrosospira*, aislados de ambientes marinos. La familia *Gallionellaceae* es microaerófila, quimiolitótrofa oxidadora de hierro, habitual de fuentes termales

ferrosas, y la familia *Spirillaceae* también es microaerófila y se aísla de aguas dulces.

El orden ***Rhodocyclales*** (Garrity y col., 2006) incluye bacterias fotoheterótrofas, aerobias, anaerobias y anaerobias facultativas, organismos fermentadores y fijadores de nitrógeno. Su hábitat se restringe a lagos de agua dulce y aguas residuales.

Clase *Gammaproteobacteria*

La clase ***Gammaproteobacteria*** (Garrity y col., 2005b) contiene las bacterias fotosintéticas púrpuras dependientes del azufre (como es el caso de *Chromatiaceae* y *Ectothiorhodospiraceae*) junto con un gran número de géneros y familias quimioorganotrofas, como las familias *Enterobacteriaceae*, *Legionellaceae*, *Pasteurellaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Vibrionaceae*, y también algunas quimiolitotrofas, la mayoría oxidadoras de hierro o de azufre.

La clase se organiza en 15 órdenes, siendo el orden tipo ***Pseudomonadales*** que incluye uno de los géneros más numerosos del filo *Proteobacteria*, *Pseudomonas*, que cuenta con cerca de 130 especies. El orden "***Enterobacteriales***" está formado por la familia, *Enterobacteriaceae*, que agrupa a más de 50 géneros por lo que es la familia más numerosa de la clase *Gammaproteobacteria*. Sin embargo, a pesar de albergar gran cantidad y variedad de organismos, no contiene apenas especies aisladas de ambientes marinos. Lo mismo ocurre con los órdenes ***Acidithiobacillales***, ***Cardiobacteriales***, ***Legionellales*** y ***Xanthomonadales***.

El orden ***Aeromonadales*** (Martin-Carnahan y Joseph, 2005) contiene dos familias, *Aeromonadaceae* y *Succinivibrionaceae*, de bacilos rectos Gram-negativos, anaerobios facultativos que incluyen especies móviles por flagelo polar y especies no móviles, así como especies mesófilas y psicrófilas. Habitan ambientes de agua dulce, marina (e.g., *Aeromonas*, *Oceanimonas*, *Oceanispharea*) y especialmente estuarios, a menudo asociados a animales acuáticos.

El orden ***Alteromonadales*** (Bowman y McMeekin 2005) está formado por bacilos rectos y curvados, Gram-negativos, móviles por flagelación polar. Acomoda un conjunto de bacterias marinas en 9 familias, 8 de ellas propuestas por Ivanova y col. (2004) *Alteromonadaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Colwelliaceae*, *Idiomarinaceae*, *Shewanellaceae*, *Moritellaceae*, *Ferrimonadaceae*,

Psychromonadaceae, y recientemente se ha propuesto una familia nueva, *Celerinatantimonadaceae* (Cramer y col., 2011).

El metabolismo de los miembros del orden *Alteromonadales* es bastante variado. Son organismos quimiheterótrofos tanto anaerobios facultativos como aerobios estrictos (como *Alteromonas*, *Haliea* y *Pseudoalteromonas*). En el caso de crecer en anaerobiosis pueden crecer por respiración y, menos común, por fermentación (*Colwellia*, *Moritella*, y algunas especies de *Shewanella*), o solo por respiración (como *Ferrimonas* y la mayoría de especies de *Shewanella*). La mayoría de especies crece óptimamente en medios con agua de mar y presentan requerimiento de iones sodio. Muchas especies son capaces de utilizar amonio como fuente de nitrógeno. Algunas especies presentan requerimientos de aminoácidos. En su mayoría son marinas y se han encontrado en un amplio rango de ecosistemas oceánicos, desde agua superficial, hielo marino hasta sedimentos abisales.

El orden ***Chromatiales*** (Imhoff, 2005) contiene bacterias fotótrofas anoxigénicas, conocidas como bacterias fotótrofas púrpuras del azufre, capaces de realizar la fotosíntesis bajo condiciones anóxicas sin producir oxígeno. Además, microorganismos quimiótrofos, como especies del género *Arhodomonas* o *Thiocystis* pertenecen a este orden. Las especies marinas y halófilas se albergan en las familias *Chromatiaceae* (en géneros como *Halochromatium*, *Isochromatium*, *Marichromatium*, *Rhabdochromatium*, *Thioalkalicoccus*, *Thioflavicoccus*, *Thiohalocapsa*, *Thiorhodococcus* o *Thiorhodovibrio*) y *Ectothiorhodospiraceae* (e.g., *Ectothiorhodospira*, *Nitrococcus*, *Thioalkalivibrio*).

El orden ***Methylococcales*** (Bowman, 2005) está formado por bacilos y cocos Gram-negativos, aerobios estricto, presentan un metabolismo respiratorio con el oxígeno como aceptor de electrones. Utilizan el metano como fuente de carbono y energía. Los miembros de este orden se encuentran ampliamente distribuidos y se han aislado de hábitats como marismas, ríos, lagos, mar abierto y aguas residuales, entre otros.

El orden ***Oceanospirillales*** (Garrity y col., 2005a) está formado por 7 familias que albergan bacterias quimiorganótrofas, aerobias, microaerobias, anaerobias o anaerobias facultativas, halotolerantes o halófilas, móviles por flagelo, excepto para *Alcanivorax* que no presenta movilidad. Presentan un metabolismo estrictamente

respiratorio, excepto *Neptunomonas* que es capaz de fermentar. Han sido aisladas de ambientes de agua dulce (e.g., *Balneatrix*) y de ambientes marinos la mayoría de los miembros de las familias *Hahellaceae*, *Halomonadaceae*, *Oceanospirillaceae* y *Oleiphilaceae* (Garrity y col., 2005a) o las más recientes "*Saccharospirillaceae*" (Garrity y col., 2005a) y *Litoricolaceae* (Kim y col., 2007).

El orden ***Pasteurellales*** (Garrity y col., 2005a) alberga bacilos y cocos Gram-negativos, no móviles, quimioorganotrofos aerobios, con diferentes grados de microaerofilia, o anaerobios facultativos ya que pueden presentar metabolismo respiratorio y fermentativo. Está formado por una sola familia, *Pasterellaceae*, de parásitos obligados en vertebrados. No tiene ejemplo de organismos marinos.

El orden "***Salinisphaerales***" (Crespo-Medina y col., 2009) contiene cocos y bacilos cortos Gram-negativos, con uno o más flagelos. Mesófilos, halotolerantes, aerobios o anaerobios facultativos. Presentan metabolismo heterótrofo y quimiolitotótrofo, con tiosulfato y oxígeno como donador y aceptor de electrones respectivamente. La única especie conocida ha sido aislada de ambiente marino.

El orden ***Thiotrichales*** (Garrity y col., 2005a) incluye parásitos intracelulares obligados de peces (*Piscirickettsia*), insectos, arácnidos, y del hombre (*Francisella*). También incluye organismos quimioorganotrofos, metilótrofos y quimiolitótrofos oxidadores de sulfuro. De las tres familias que forman el orden, *Francisellaceae* no contiene especies marinas, mientras que *Piscirickettsiaceae* y *Thiotrichaceae* se aíslan predominantemente de ambientes marinos (e.g., *Piscirickettsia*, *Achromatium*, *Beggiatoa*, *Thiobacterium*, *Thiomargarita*, *Thiospira*, etc.).

El orden "***Vibrionales***" contiene una sola familia, *Vibrionaceae* (Veron, 1965), que es una de las más numerosas en géneros y especies de la clase *Gammaproteobacteria*. Incluye bacilos y bacilos curvados Gram-negativos, anaerobios facultativos con un metabolismo fermentativo. No forman endoesporas ni microcistos. La familia *Vibrionaceae* comprende los géneros *Aliivibrio*, *Catenococcus*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, *Photobacterium*, *Salinivibrio* y *Vibrio* (www.bacterio.cict.fr) que presentan una amplia distribución geográfica asociada a ambientes acuáticos, principalmente agua marina y agua salobre (Farmer III y Janda, 2005). La mayor parte de bacterias capaces de emitir luz, bioluminiscencia, están clasificadas

en este orden, en concreto en los géneros *Photobacterium* (*Photobacterium phosphoreum*, *Photobacterium leiognathi*, *Photobacterium aquimaris*, *Photobacterium kishitanii* y *Photobacterium ganghwense*), *Aliivibrio* (*Aliivibrio fischeri*, *Aliivibrio logei*) y *Vibrio* (*Vibrio orientalis*, *Vibrio splendidus*, *Vibrio harveyi*).

El género *Photobacterium* (Beijerinck, 1889) contiene más de 15 especies, aisladas de agua de mar y de animales marinos. Son anaerobias facultativas y halófilas moderadas entre las que se encuentran patógenos de animales marinos, como *Photobacterium damsela* y especies psicrófilas, la mayoría aisladas de aguas profundas (*Photobacterium indicum*, *Photobacterium frigidophilum*, *Photobacterium aplysiae*, *Photobacterium lipolyticum*). Son organismos quimioorganótrofos con metabolismo tanto respiratorio como fermentativo. Son capaces de crecer con D-glucosa como única fuente de carbono y energía, y NH_4^+ como única fuente de nitrógeno. La mayoría acumula gránulos de poli- β -hidroxibutirato.

El género *Vibrio* (Farmer III y col., 2005) está compuesto por organismos quimioorganotrofos, mesófilos, anaerobios facultativos y capaces de reducir nitratos a nitritos. Son móviles por uno o varios (3-12) flagelos polares envainados. Son capaces de crecer en un medio que contenga D-glucosa como única fuente de carbono y energía y NH_4^+ como única fuente de nitrógeno. La mayoría de las especies crece bien en medios que contienen una base de agua de mar. Todas las especies fermentan D-glucosa produciendo ácido, y raramente gas (e.g., *Vibrio aerogenes*, *Vibrio gazogenes*, *Vibrio ruber*). Los vibrios son microorganismos asociados fundamentalmente a ambientes acuáticos, cuya distribución depende de la concentración de Na^+ y de nutrientes en el medio, así como de la temperatura. Están presentes en agua salada, estuarios y en algunos casos en agua dulce, viviendo de forma planctónica o asociados a animales acuáticos.

El género *Salinivibrio* (Mellado y col., 1996, Ventosa, 2005) contiene organismos mesófilos y halófilos moderados, que no crecen en ausencia de NaCl. Presentan un metabolismo quimioorganotrofo y son anaerobios facultativos. Se han aislado de ambientes hipersalinos (*Salinivibrio proteolyticus*) y de alimentos salados o fermentados (e.g., *Salinivibrio siamensis*).

El género *Enterovibrio* fue propuesto por Thompson y col. (2002) para acomodar un grupo de cepas aisladas de larvas de *Scophthalmus maximus* y que compartían caracteres fenotípicos con las especies del género *Vibrio*. Los miembros del género *Enterovibrio*, a diferencia de *Photobacterium* y *Salinivibrio*, producen indol y no producen acetoina. También se pueden diferenciar del género *Salinivibrio* porque carecen de actividad gelatinasa. La mayoría de las especies del género *Vibrio* y *Aliivibrio* reducen el nitrato (excepto *V. cyclitrophicus*, *V. gazogenes*, *V. metschnikovii* y *A. salmonicida*) y utilizan el piruvato (excepto *V. haliotocoli* y *V. tapetis*) mientras que las especies del género *Enterovibrio* no.

El género *Aliivibrio* (Urbanczyk y col., 2007 emend. Beaz-Hidalgo y col., 2010) comprende especies fermentadoras y capaces de utilizar glucosa o acetato (excepto *A. fischeri*) como fuente única de carbono y energía. Las especies de *Aliivibrio* se han aislado de hábitats marinos, y a menudo se encuentran asociadas con animales, algunas especies como simbioses mutualistas y otras como patógenas de animales marinos.

Clase Deltaproteobacteria

La clase ***Deltaproteobacteria*** (Kuever y col., 2006) comprende bacterias Gram-negativas, no esporuladas, morfológicamente muy diversas, que pueden presentar crecimiento aerobio y anaerobio. Está compuesta por 9 órdenes y 22 familias, con una amplia representación de bacterias marinas, que pueden agruparse en función a tres fenotipos característicos:

- Bacterias anaerobias estrictas reductoras de azufre y de sulfato (Kuever y col., 2005), como el orden ***Desulfurellales*** que contiene la familia *Desulfurellaceae*, bacterias termófilas moderadas con rangos de temperatura de 45 a 75-80 °C; el orden ***Desulfovibrionales*** que alberga los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfomonas* o *Desulfothermus*, que además de crecer a altas temperaturas requieren NaCl y MgCl₂ para crecer. El orden ***Desulfobacterales*** con tres familias que albergan cerca de 30 géneros, en su mayoría aislados de ambiente marino, como *Nitrospina*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacter* o *Desulfospira*, entre muchos otros. Cabe destacar el género *Desulfuromonadales* que alberga géneros como *Desulfuromonas* y *Pelobacter*. Todas las cepas del género *Pelobacter* (Schink, 2006) han sido aisladas de

sedimentos marinos y de agua dulce, son bacilos Gram-negativos, anaerobios estrictos, no esporulados, que utilizan un espectro muy limitado de sustratos y no son capaces de fermentar azúcares.

- Bacterias depredadoras de otros microorganismos, donde cabe destacar el orden **Bdellovibrionales** (Garrity y col., 2006), que alberga géneros como *Bacteriovorax*, *Peredibacter*, *Vampirovibrio* o *Bdellovibrio*. Se han aislado cepas halófilas y halotolerantes de *Bdellovibrio* de ambientes marinos como estuarios, sedimentos de la costa marina, mar abierto y superficies sumergidas.
- Por último, el grupo de las mixobacterias (Reichenbach, 2005; Shimkets y col., 2006) que forman el orden tipo de la clase, **Myxococcales** que a su vez está organizado en tres subórdenes: *Cystobacterineae*, *Nannocystineae* y *Sorangineae*. Las mixobacterias son bacilos Gram-negativos, que carecen de flagelos pero capaces de moverse por deslizamiento en contacto con una superficie. Pueden producir cuerpos fructificantes, dentro del cual algunas de las células se pueden convertir en células de resistencia o mixosporas en condiciones extremas. Las mixobacterias se han aislado de ambientes marinos, entre otros, como *Myxococcus*, *Haliangium*, *Enhygromyxa*, etc.

Clase **Epsilonproteobacteria**

La clase **Epsilonproteobacteria** (Garrity y col., 2006) alberga dos órdenes: el orden tipo de la clase, **Campylobacterales**, que engloba bacterias patógenas como *Campylobacter* y *Helicobacter*, así como bacterias que son particularmente abundantes en la interfase aerobia-anaerobia de ambientes ricos en azufre. Y el orden **Nautiliales** (Miroshnichenko y col., 2004), cuya familia *Nautiliaceae* agrupa bacilos Gram-negativos, marinos termófilos, no esporulados, anaerobios obligados o microaerófilos (i.e. *Caminibacter*, *Nautilia*). Para crecer en anaerobiosis utilizan sulfuro o nitrato como aceptores de electrones. También contienen organismos quimolitotróficos como *Nitratiruptor* o *Nitratifactor* (Nakagawa y col., 2005) y algunos ejemplos de mixótrofos.

Recientemente (Emerson y col., 2010) se ha propuesto una nueva clase "**Zetaproteobacteria**" (ζ) dentro del filo *Proteobacteria*, para acomodar un nuevo género, *Mariprofundus*, de bacilos litótrofos obligados que requieren Fe^{2+} como fuente de energía. Son dependientes del oxígeno y necesitan sales marinas para crecer.

Tabla 1: Clasificación jerárquica de los filos *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* (<http://www.bacterio.cict.fr/classifphyla.html>).

Filo "Proteobacteria"**Clase Alphaproteobacteria****Orden Caulobacterales**

Familia *Caulobacteraceae*:

Asticcacaulis, *Brevundimonas*, *Caulobacter*, *Phenylobacterium*

Familia *Hyphomonadaceae*:

Hellea, *Henriciella*, *Hirschia*, *Hyphomonas*, *Litorimonas*, *Maribaculum*,
Maricaulis, *Oceanicaulis*, *Ponticaulis*, *Robiginitomaculum*, *Woodsholea*

Orden Kiloniellales

Familia *Kiloniellaceae*:

Kiloniella

Orden Kordiimonadales

Familia "Kordiimonadaceae":

Kordiimonas

Orden "Parvularculales"

Familia "Parvularculaceae":

Parvularcula

Orden Rhizobiales

Familia "Aurantimonadaceae":

Aurantimonas, *Aureimonas*, *Fulvimarina*, *Martelella*

Familia *Bartonellaceae*:

Bartonella, *Grahamella*, *Rochalimaea*

Familia *Beijerinckiaceae*:

Beijerinckia, *Camelimonas*, *Chelatococcus*, *Methylocapsa*, *Methylocella*,
Methyloferula, *Methylovirgula*

Familia *Bradyrhizobiaceae*:

Afipia, *Agromonas*, *Balneimonas*, *Blastobacter*, *Bosea*, *Bradyrhizobium*,
Nitrobacter, *Oligotropha*, *Rhodoblastus*, *Rhodopseudomonas*, *Salinarimonas*

Familia *Brucellaceae*:

Brucella, *Crabtreeella*, *Daeguia*, *Mycoplana*, *Ochrobactrum*, *Paenochrobactrum*,
Pseudochrobactrum

Familia *Cohaesibacteraceae*:

Cohaesibacter

Familia *Hyphomicrobiaceae*:

<i>Ancalomicrobium</i>	<i>Devosia</i>	<i>Maritalea</i>	<i>Rhodomicrobium</i>
<i>Angulomicrobium</i>	<i>Dichotomicrobium</i>	<i>Methylorhabdus</i>	<i>Rhodoplanes</i>
<i>Aquabacter</i>	<i>Filomicrobium</i>	<i>Pedomicrobium</i>	<i>Seliberia</i>
<i>Blastochloris</i>	<i>Gemmiger</i>	<i>Pelagibacterium</i>	<i>Zhangella</i>
<i>Cucumibacter</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Prosthecomicrobium</i>	

Familia *Methylobacteriaceae*:

Meganema, Methylobacterium, Microvirga, Protomonas

Familia *Methylocystaceae*:

Albibacter, Hansschlegelia, Methylocystis, Methylopila, Methylosinus, Pleomorphomonas, Terasakiella

Familia *Phyllobacteriaceae*:

Aminobacter, Aquamicrobium, Chelativorans, Defluviobacter, Hoeflea, Mesorhizobium, Nitratireductor, Phyllobacterium, Pseudaminobacter

Familia *Rhizobiaceae*:

Agrobacterium, Allorhizobium, Carbophilus, Chelatobacter, Ensifer, Kaistia, Rhizobium, Sinorhizobium

Familia *Rhodobiaceae*:

Afifella, Anderseniella, Parvibaculum, Rhodobium, Roseospirillum, Tepidamorphus

Familia *Xanthobacteraceae*:

Ancylobacter, Azorhizobium, Labrys, Pseudolabrys, Pseudoxanthobacter, Starkeya, Xanthobacter

Rhizobiales no clasificados: *Amorphus, Bauldia, Vasilyevaea*

Orden *Rhodobacterales*

Familia *Rhodobacteraceae*:

<i>Agaricicola</i>	<i>Loktanella</i>	<i>Primorskyibacter</i>	<i>Salinihabitans</i>
<i>Ahrensia</i>	<i>Lutimaribacter</i>	<i>Pseudorhodobacter</i>	<i>Salipiger</i>
<i>Albimonas</i>	<i>Mameliella</i>	<i>Pseudoruegeria</i>	<i>Sediminimonas</i>
<i>Albidovulum</i>	<i>Maribius</i>	<i>Pseudovibrio</i>	<i>Seohaecicola</i>
<i>Amaricoccus</i>	<i>Marinovum</i>	<i>Rhodobaca</i>	<i>Shimia</i>
<i>Antarctobacter</i>	<i>Maritimibacter</i>	<i>Rhodobacter</i>	<i>Silicibacter</i>
<i>Catellibacterium</i>	<i>Marivita</i>	<i>Rhodotalassium</i>	<i>Staleyia</i>
<i>Celeribacter</i>	<i>Methylarcula</i>	<i>Rhodovulum</i>	<i>Stappia</i>
<i>Citreicella</i>	<i>Nautella</i>	<i>Roseibaca</i>	<i>Sulfitobacter</i>
<i>Citreimonas</i>	<i>Nereida</i>	<i>Roseibacterium</i>	<i>Tateyamaría</i>
<i>Dinoroseobacter</i>	<i>Nesiotobacter</i>	<i>Roseibium</i>	<i>Thalassobacter</i>
<i>Donghicola</i>	<i>Oceanibulbus</i>	<i>Roseicitreum</i>	<i>Thalassobius</i>
<i>Gaetbulicola</i>	<i>Oceanicola</i>	<i>Roseicyclus</i>	<i>Thalassococcus</i>
<i>Gemmobacter</i>	<i>Octadecabacter</i>	<i>Roseinatronobacter</i>	<i>Thioclava</i>
<i>Haematobacter</i>	<i>Pacificibacter</i>	<i>Roseisalinus</i>	<i>Thiosphaera</i>
<i>Hwanghaecicola</i>	<i>Palleronia</i>	<i>Roseivivax</i>	<i>Tranquillimonas</i>
<i>Jannaschia</i>	<i>Pannonibacter</i>	<i>Roseobacter</i>	<i>Tropicibacter</i>
<i>Jhaorihella</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Roseovarius</i>	<i>Tropicimonas</i>
<i>Ketogulonicigenium</i>	<i>Pelagibaca</i>	<i>Rubellimicrobium</i>	<i>Vadicella</i>
<i>Labrenzia</i>	<i>Pelagicola</i>	<i>Rubribacterium</i>	<i>Wenxinia</i>
<i>Leisingera</i>	<i>Phaeobacter</i>	<i>Rubrimonas</i>	<i>Yangia</i>
<i>Litoreibacter</i>	<i>Pontibaca</i>	<i>Ruegeria</i>	
<i>Litorimicrobium</i>	<i>Ponticoccus</i>	<i>Sagittula</i>	

Orden Rhodospirillales

Familia Acetobacteraceae:

<i>Acetobacter</i>	<i>Asaia</i>	<i>Neoasaia</i>	<i>Saccharibacter</i>
<i>Acidicaldus</i>	<i>Belnapia</i>	<i>Neokomagataea</i>	<i>Stella</i>
<i>Acidiphilium</i>	<i>Craurococcus</i>	<i>Paracraurococcus</i>	<i>Swaminathania</i>
<i>Acidisoma</i>	<i>Gluconacetobacter</i>	<i>Rhodopila</i>	<i>Tanticharoenia</i>
<i>Acidisphaera</i>	<i>Gluconobacter</i>	<i>Rhodovarius</i>	<i>Teichococcus</i>
<i>Acidocella</i>	<i>Granulibacter</i>	<i>Roseococcus</i>	<i>Zavarzinia</i>
<i>Acidomonas</i>	<i>Kozakia</i>	<i>Roseomonas</i>	
<i>Ameyamaea</i>	<i>Muricoccus</i>	<i>Rubritepida</i>	

Familia Rhodospirillaceae:

<i>Azospirillum</i>	<i>Fodinicurvata</i>	<i>Pelagibius</i>	<i>Skermanella</i>
<i>Caenispirillum</i>	<i>Inquilius</i>	<i>Phaeospirillum</i>	<i>Telmatospirillum</i>
<i>Conglomeromonas</i>	<i>Insolitospirillum</i>	<i>Phaeovibrio</i>	<i>Thalassobaculum</i>
<i>Constrictibacter</i>	<i>Magnetospirillum</i>	<i>Rhodocista</i>	<i>Thalassospira</i>
<i>Defluviococcus</i>	<i>Nisaea</i>	<i>Rhodospira</i>	<i>Tistlia</i>
<i>Desertibacter</i>	<i>Novispirillum</i>	<i>Rhodospirillum</i>	<i>Tistrella</i>
<i>Dongia</i>	<i>Oceanibaculum</i>	<i>Rhodovibrio</i>	
		<i>Roseospira</i>	

Orden Rickettsiales

Familia Anaplasmataceae:

Aegyptianella, *Anaplasma*, *Cowdria*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Wolbachia*

Familia Holosporaceae:

Holospora

Familia Rickettsiaceae:

Orientia, *Rickettsia*

Rickettsiales no clasificadas:

Lyticum, *Pseudocaedibacter*, *Symbiotes*, *Tectibacter*

Orden Sneathiellales

Familia Sneathiellaceae:

Sneathiella

Orden Sphingomonadales

Familia Erythrobacteraceae:

Altererythrobacter, *Croceicoccus*, *Erythrobacter*, *Erythromicrobium*,
Porphyrobacter

Familia Sphingomonadaceae:

Blastomonas, *Erythromonas*, *Novosphingobium*, *Sandaracinobacter*,
Sandarakinorhabdus, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis*,
Sphingosinicella, *Stakelama*, *Zymomonas*

Alphaproteobacteria no clasificadas:

Breoghania, *Elioraea*, *Geminicoccus*, *Reyranella*, *Rhizomicrobium*

Clase Betaproteobacteria

Orden Burkholderiales

Familia Alcaligenaceae:

<i>Achromobacter</i>	<i>Brackiella</i>	<i>Oligella</i>	<i>Pigmentiphaga</i>
<i>Advenella</i>	<i>Candidimonas</i>	<i>Paenalcaligenes</i>	<i>Pusillimonas</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Castellaniella</i>	<i>Paralcaligenes</i>	<i>Taylorella</i>
<i>Azohydromonas</i>	<i>Derxia</i>	<i>Parapusillimonas</i>	<i>Tetrathioabacter</i>
<i>Bordetella</i>	<i>Kerstesia</i>	<i>Pelistega</i>	

Familia Burkholderiaceae:

Burkholderia, *Chitinimonas*, *Cupriavidus*, *Lautropia*, *Limnobacter*, *Pandoraea*, *Paucimonas*, *Polynucleobacter*, *Ralstonia*, *Thermothrix*, *Wautersia*

Familia Comamonadaceae:

<i>Acidovorax</i>	<i>Delftia</i>	<i>Malikia</i>	<i>Schlegelella</i>
<i>Albidiferax</i>	<i>Diaphorobacter</i>	<i>Ottowia</i>	<i>Simplicispira</i>
<i>Alicyclophilus</i>	<i>Giesbergeria</i>	<i>Pelomonas</i>	<i>Tepidicella</i>
<i>Brachymonas</i>	<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Polaromonas</i>	<i>Variovorax</i>
<i>Caenimonas</i>	<i>Hylemonella</i>	<i>Pseudacidovorax</i>	<i>Verminephrobacter</i>
<i>Caenibacterium</i>	<i>Kinneretia</i>	<i>Pseudorhodoferax</i>	<i>Xenophilus</i>
<i>Caldimonas</i>	<i>Lampropedia</i>	<i>Ramlibacter</i>	
<i>Comamonas</i>	<i>Limnohabitans</i>	<i>Rhodoferax</i>	
<i>Curvibacter</i>	<i>Macromonas</i>	<i>Roseateles</i>	

Familia Oxalobacteraceae:

Collimonas, *Duganella*, *Glaciimonas*, *Herbaspirillum*, *Hermiimonas*, *Janthinobacterium*, *Massilia*, *Naxibacter*, *Oxalicibacterium*, *Oxalobacter*, *Telluria*, *Undibacterium*

Familia Sutterellaceae: *Parasutterella*, *Sutterella*

Burkholderiales no clasificadas:

<i>Aquabacterium</i>	<i>Leptothrix</i>	<i>Piscinibacter</i>	<i>Tepidimonas</i>
<i>Aquicola</i>	<i>Methylibium</i>	<i>Rivibacter</i>	<i>Thiobacter</i>
<i>Ideonella</i>	<i>Mitsuaria</i>	<i>Rubrivivax</i>	<i>Thiomonas</i>
<i>Inhella</i>	<i>Paucibacter</i>	<i>Sphaerotilus</i>	<i>Xylophilus</i>

Orden Hydrogenophilales

Familia Hydrogenophilaceae:

Hydrogenophilus, *Petrobacter*, *Sulfuricella*, *Tepidiphilus*, *Thiobacillus*.

Orden Methylophilales

Familia Methylophilaceae:

Methylobacillus, *Methylophilus*, *Methylotenera*, *Methylovorus*

Orden Neisseriales

Familia Neisseriaceae:

<i>Alysiella</i>	<i>Chromobacterium</i>	<i>Jeongeupia</i>	<i>Prolinoborus</i>
<i>Andreprevotia</i>		<i>Kingella</i>	<i>Pseudogulbenkiania</i>
<i>Aquaspirillum</i>	<i>Conchiformibius</i>	<i>Laribacter</i>	<i>Silvimonas</i>
<i>Aquitalea</i>	<i>Deefgea</i>	<i>Leeia</i>	<i>Simonsiella</i>
<i>Bergeriella</i>	<i>Eikenella</i>	<i>Microvirgula</i>	<i>Stenoxybacter</i>
<i>Chitinibacter</i>	<i>Formivibrio</i>	<i>Morococcus</i>	<i>Uruburuella</i>
<i>Chitinilyticum</i>	<i>Gulbenkiania</i>	<i>Neisseria</i>	<i>Vitreoscilla</i>
<i>Chitiniphilus</i>	<i>Iodobacter</i>	<i>Paludibacterium</i>	<i>Vogesella</i>

Orden Nitrosomonadales

Familia Gallionellaceae:

Gallionella

Familia Nitrosomonadaceae:

Nitrosolobus, *Nitrosomonas*, *Nitrospira*

Familia Spirillaceae:

*Spirillum***Orden "Procabacteriales"**

Familia "Procabacteriaceae":

*"Procabacter"***Orden Rhodocyclales**

Familia Rhodocyclaceae:

<i>Azoarcus</i>	<i>Dechlorosoma</i>	<i>Propionibacter</i>	<i>Sterolibacterium</i>
<i>Azonexus</i>	<i>Denitratisoma</i>	<i>Propionivibrio</i>	<i>Sulfuritalea</i>
<i>Azospira</i>	<i>Ferribacterium</i>	<i>Quatronicoccus</i>	<i>Thauera</i>
<i>Azovibrio</i>	<i>Georgfuchsia</i>	<i>Rhodocyclus</i>	<i>Uliginosibacterium</i>
<i>Dechloromonas</i>	<i>Methyloversatilis</i>	<i>Shinella</i>	<i>Zoogloe</i>

Clase Deltaproteobacteria or Deltabacteria**Orden Bdellovibrionales**

Familia Bacteriovoraceae:

Bacteriovorax, *Peredibacter*

Familia Bdellovibrionaceae:

Bdellovibrio, *Micavibrio*, *Vampirovibrio***Orden Desulfarculales**

Familia Desulfarculaceae:

Desulfarculus

Orden Desulfobacterales

Familia Desulfobacteraceae:

<i>Desulfatibacillum</i>	<i>Desulfobacula</i>	<i>Desulfofrigus</i>	<i>Desulfosalsimonas</i>
<i>Desulfatiferula</i>	<i>Desulfobotulus</i>	<i>Desulfoluna</i>	<i>Desulfosarcina</i>
<i>Desulfatirhabdium</i>	<i>Desulfocella</i>	<i>Desulfomusa</i>	<i>Desulfospira</i>
<i>Desulfobacter</i>	<i>Desulfococcus</i>	<i>Desulfonema</i>	<i>Desulfotignum</i>
<i>Desulfobacterium</i>	<i>Desulfofaba</i>	<i>Desulforegula</i>	

Familia Desulfobulbaceae:

Desulfobulbus, *Desulfocapsa*, *Desulfofustis*, *Desulfopila*, *Desulforhopalus*,
Desulfotalea, *Desulfurivibrio*

Familia Nitrospinaceae:

Nitrospina

Orden Desulfovibrionales

Familia Desulfohalobiaceae:

Desulfohalobium, *Desulfonatronospira*, *Desulfonatronovibrio*, *Desulfonauticus*,
Desulfothermus, *Desulfovermiculus*

Familia Desulfomicrobiaceae:

Desulfomicrobium

Familia Desulfonatronaceae:

Desulfonatronum

Familia Desulfovibrionaceae:

Bilophila, *Desulfocurvus*, *Desulfomonas*, *Desulfovibrio*, *Lawsonia*

Orden Desulfurellales

Familia Desulfurellaceae:

Desulfurella, *Hippea*

Orden Desulfuromonadales

Familia Desulfuromonadaceae:

Desulfuromonas, *Desulfuromusa*, *Malonomonas*, *Pelobacter*

Familia Geobacteraceae:

Geoalkalibacter, *Geobacter*, *Geopsychrobacter*, *Geothermobacter*,
Trichlorobacter

Orden Myxococcales

Suborden Cystobacterineae

Familia Cystobacteraceae:

Anaeromyxobacter, *Archangium*, *Cystobacter*, *Hyalangium*, *Melittangium*,
Stigmatella

Familia Myxococcaceae:

Angiococcus, *Corallococcus*, *Myxococcus*, *Pyxidicoccus*

Suborden Nannocystineae

Familia "Haliangiaceae":

Haliangium

Familia Kofleriaceae:

Kofleria

Familia Nannocystaceae:

Enhygromyxa, Nannocystis, Plesiocystis

Suborden Sorangiineae

Familia Phaselicystidaceae:

Phaselicystis

Familia Polyangiaceae:

Byssovorax, Chondromyces, Jahnella, Polyangium, Sorangium

Orden Syntrophobacterales

Familia Syntrophaceae:

Desulfobacca, Desulfomonile, Smithella, Syntrophus

Familia Syntrophobacteraceae:

Desulfacinum, Desulfoglaeba, Desulforhabdus, Desulfosoma, Desulfovirga, Syntrophobacter, Thermodesulforhabdus

Orden Incertae Sedis

Familia Syntrophorhabdaceae: *Syntrophorhabdus*

Clase Epsilonproteobacteria**Orden Campylobacterales**

Familia Campylobacteraceae:

Arcobacter, Campylobacter, Dehalospirillum, Sulfurospirillum

Familia Helicobacteraceae:

Helicobacter, Sulfuricurvum, Sulfurimonas, Sulfurovum, Thiovulum, Wolinella

Familia "Hydrogenimonaceae":

Hydrogenimonas

Orden Nautiliales

Familia Nautiliaceae:

Caminiibacter, Lebetimonas, Nautilia, Nitratifactor, Nitratiruptor, Thioreductor

Clase Gammaproteobacteria**Orden Acidithiobacillales**

Familia Acidithiobacillaceae:

Acidithiobacillus

Familia Thermithiobacillaceae:

Thermithiobacillus

Orden Aeromonadales

Familia Aeromonadaceae:

Aeromonas, Oceanimonas, Oceanisphaera, Tolumonas, Zobellella

Familia Succinivibrionaceae:

Anaerobiospirillum, Ruminobacter, Succinatimonas, Succinimonas, Succinivibrio

Orden Alteromonadales

Familia Alteromonadaceae:

Aestuariibacter, Agarivorans, Aliagarivorans, Alishewanella, Alteromonas, Bowmanella, Catenovulum, Glaciecola, Haliea, Marinimicrobium, Marinobacter, Marinobacterium, Melitea, Microbulbifer, Saccharophagus, Salinimonas

Familia Celerinatantimonadaceae:

Celerinatantimonas

Familia Colwelliaceae:

Colwellia, Thalassomonas

Familia Ferrimonadaceae:

Ferrimonas, Paraferomonas

Familia Idiomarinaceae:

Idiomarina, Pseudidiomarina

Familia Moritellaceae:

Moritella, Paramoritella

Familia Pseudoalteromonadaceae:

Algicola, Pseudoalteromonas, Psychrosphaera

Familia Psychromonadaceae:

Psychromonas

Familia Shewanellaceae:

Shewanella

Alteromonadales no clasificados: *Pseudoteredinibacter, Teredinibacter*

Orden Cardiobacteriales

Familia Cardiobacteriaceae:

Cardiobacterium, Dichelobacter, Suttonella

Orden Chromatiales

Familia Chromatiaceae:

<i>Allochromatium</i>	<i>Marichromatium</i>	<i>Thiobaca</i>	<i>Thiolamproyum</i>
<i>Amoebobacter</i>	<i>Nitrosococcus</i>	<i>Thiocapsa</i>	<i>Thiopedia</i>
<i>Chromatium</i>	<i>Pfennigia</i>	<i>Thiococcus</i>	<i>Thiophageococcus</i>
<i>Halochromatium</i>	<i>Rhabdochromatium</i>	<i>Thiocystis</i>	<i>Thiorhodococcus</i>
<i>Isochromatium</i>	<i>Rheinheimera</i>	<i>Thiodictyon</i>	<i>Thiorhodovibrio</i>
<i>Lamprobacter</i>	<i>Thermochromatium</i>	<i>Thioflavococcus</i>	<i>Thiospirillum</i>
<i>Lamprocystis</i>	<i>Thioalkalicoccus</i>	<i>Thiohalocapsa</i>	

Familia *Ectothiorhodospiraceae*:

Acidiferrobacter, Alkalilimnicola, Alkalispirillum, Aquisalimonas, Arhodomonas, Ectothiorhodosinus, Ectothiorhodospira, Halorhodospira, Natronocella, Nitrococcus, Thioalbus, Thioalkalivibrio, Thiohalospira, Thiorhodospira

Familia *Granulosicoccaceae*:

Granulosicoccus

Familia *Halothiobacillaceae*:

Halothiobacillus, Thioalkalibacter, Thiofaba, Thiovirga

Familia *Thioalkalspiraceae*:

Thioalkalispira, Thiohalophilus, Thioprofundum

Orden "Enterobacteriales"

Familia *Enterobacteriaceae*:

<i>Arsenophonus</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Obesumbacterium</i>	<i>Shigella</i>
<i>Biostraticola</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Shimwellia</i>
<i>Brenneria</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Pectobacterium</i>	<i>Sodalis</i>
<i>Buchnera</i>	<i>Ewingella</i>	<i>Photorhabdus</i>	<i>Tatumella</i>
<i>Budvicia</i>	<i>Gibbsiella</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Thorsellia</i>
<i>Buttiauxella</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Pragia</i>	<i>Trabulsiella</i>
<i>Calymmatobacterium</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Wigglesworthia</i>
<i>Cedecea</i>	<i>Kluyvera</i>	<i>Providencia</i>	<i>Xenorhabdus</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Leclercia</i>	<i>Rahnella</i>	<i>Yersinia</i>
<i>Cosenzaea</i>	<i>Leminorella</i>	<i>Raoultella</i>	<i>Yokenella</i>
<i>Cronobacter</i>	<i>Levinea</i>	<i>Saccharobacter</i>	
<i>Dickeya</i>	<i>Mangrovibacter</i>	<i>Salmonella</i>	
<i>Edwardsiella</i>	<i>Moellerella</i>	<i>Samsonia</i>	
	<i>Morganella</i>	<i>Serratia</i>	

Orden *Legionellales*

Familia *Coxiellaceae*:

Aquicella, Coxiella, Diplorickettsia.

Familia *Legionellaceae*:

Fluoribacter, Legionella, Sarcobium, Tatlockia.

Legionellales no clasificadas: *Rickettsiella.*

Orden *Methylococcales*

Familia *Crenotrichaceae*:

Crenothrix

Familia *Methylococcaceae*:

Methylobacter, Methylocaldum, Methylococcus, Methylogaea, Methylohalobius, Methylochromium, Methylomonas, Methylosarcina, Methylosoma, Methylosphaera, Methylothermus, Methylovulum

Orden Oceanospirillales

Familia Alcanivoraceae:

Alcanivorax, Fundibacter, Kangiella

Familia Hahellaceae:

Endozoicomonas, Hahella, Halospina, Kistimonas, Zooshikella

Familia Halomonadaceae:

Aidingimonas, Carnimonas, Chromohalobacter, Cobetia, Deleya, Halomonas, Halotalea, Halovibrio, Kushneria, Modicisalibacter, Salinicola, Volcaniella, Zymobacter

Familia Litoricolaceae:

Litoricola.

Familia Oceanospirillaceae:

Amphritea, Balneatrix, Bermanella, Marinomonas, Marinospirillum, Neptuniibacter, Neptunomonas, Nitrincola, Oceaniserpentilla, Oceanobacter, Oceanospirillum, Oleibacter, Oleispira, Pseudospirillum, Reinekea, Thalassolituus

Familia Oleiphilaceae:

Oleiphilus.

Familia "Saccharospirillaceae":

Saccharospirillum

UnClassified Oceanospirillales: *Salicola, Spongiispira*

Orden Pasteurellales

Familia Pasteurellaceae:

Actinobacillus, Aggregatibacter, Avibacterium, Basfia, Bibersteinia, Bisgaardia, Chelonobacter, Gallibacterium, Haemophilus, Histophilus, Lonepinella, Mannheimia, Necropsobacter, Nicoletella, Pasteurella, Phocoenobacter, Volucribacter

Orden Pseudomonadales

Familia Moraxellaceae:

Acinetobacter, Alkanindiges, Branhamella, Enhydrobacter, Moraxella, Paraperlucidibaca, Perlucidibaca, Psychrobacter

Familia Pseudomonadaceae:

Azomonas, Azomonotrichon, Azorhizophilus, Azotobacter, Cellvibrio, Chryseomonas, Flavimonas, Mesophilobacter, Pseudomonas, Rhizobacter, Rugamonas, Serpens

UnClassified Pseudomonadales: *Dasania*

Orden "Salinisphaerales"

Familia "Salinisphaeraceae":

Salinisphaera

Orden Thiotrichales

Familia *Francisellaceae*:
Francisella

Familia *Piscirickettsiaceae*:

Cycloclasticus, *Hydrogenovibrio*, *Methylophaga*, *Piscirickettsia*, *Sulfurivirga*,
Thioalkalimicrobium, *Thiomicrospira*

Familia *Thiotrichaceae*:

Achromatium, *Beggiatoa*, *Leucothrix*, *Thiobacterium*, *Thiomargarita*, *Thioploca*,
Thiospira, *Thiothrix*

Thiotrichales no clasificados: *Caedibacter*, *Fangia*

Orden "Vibrionales"

Familia *Vibrionaceae*:

Allivibrio, *Catenococcus*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, *Photobacterium*, *Salinivibrio*,
Vibrio

Orden Xanthomonadales

Familia *Sinobacteraceae*:

Alkanibacter, *Hydrocarboniphaga*, *Nevskia*, *Singularimonas*, *Sinobacter*,
Steroidobacter

Familia *Xanthomonadaceae*:

<i>Aquimonas</i>	<i>Fulvimonas</i>	<i>Pseudofulvimonas</i>	<i>Thermomonas</i>
<i>Arenimonas</i>	<i>Ignatzschineria</i>	<i>Pseudoxanthomonas</i>	<i>Wohlfahrtiimonas</i>
<i>Aspromonas</i>	<i>Luteibacter</i>	<i>Rhodanobacter</i>	<i>Xanthomonas</i>
<i>Dokdonella</i>	<i>Luteimonas</i>	<i>Rudaea</i>	<i>Xylella</i>
<i>Dyella</i>	<i>Lysobacter</i>	<i>Silanimonas</i>	
<i>Frateuria</i>	<i>Panacagrimonas</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	

Gammaproteobacteria no clasificadas:

<i>Alkalimonas</i>	<i>Gilvimarinus</i>	<i>Porticoccus</i>	<i>Thiohalomonas</i>
<i>Arenicella</i>	<i>Marinicella</i>	<i>Sedimenticola</i>	<i>Thiohalorhabdus</i>
<i>Cocleimonas</i>	<i>Methylohalomonas</i>	<i>Simiduia</i>	<i>Umboniibacter</i>
<i>Congregibacter</i>	<i>Methylonatrum</i>	<i>Solimonas</i>	<i>Zhongshania</i>
<i>Eionea</i>	<i>Orbus</i>	<i>Spongiibacter</i>	
<i>Gallaecimonas</i>	<i>Plasticicumulans</i>	<i>Thiohalobacter</i>	

Clase "Zetaproteobacteria"

Orden "*Mariprofundales*"

Familia "*Mariprofundaceae*":
Mariprofundus

Filo "**Bacteroidetes**"

Clase **Bacteroidia**

Orden **Bacteroidales**

Familia *Bacteroidaceae*:

Acetofilamentum, *Acetomicrobium*, *Acetothermus*, *Anaerorhabdus*, *Bacteroides*, *Capsularis*

Familia *Marinilabiaceae*:

Alkaliflexus, *Anaerophaga*, *Marinilabilia*

Familia *Porphyromonadaceae*:

Barnesiella, *Butyricimonas*, *Dysgonomonas*, *Odoribacter*, *Oribaculum*, *Paludibacter*, *Parabacteroides*, *Petrimonas*, *Porphyromonas*, *Proteiniphilum*, *Tannerella*

Familia *Prevotellaceae*:

Hallella, *Paraprevotella*, *Prevotella*, *Xylanibacter*

Familia *Rikenellaceae*:

Alistipes, *Rikenella*

Bacteroidales no clasificadas: *Phocaeicola*, *Sunxiuqinia*

Clase **Cytophagia**

Orden **Cytophagales**

Familia *Cyclobacteriaceae*:

Algoriphagus, *Aquiflexum*, *Belliella*, *Chimaereicella*, *Cyclobacterium*, *Echinicola*, *Fontibacter*, *Hongiella*, *Indibacter*, *Nitritalea*, *Rhodonellum*

Familia *Cytophagaceae*:

Adhaeribacter, *Arcicella*, *Cytophaga*, *Dyadobacter*, *Effluviibacter*, *Ekhidna*, *Emticicia*, *Fibrella*, *Fibrisoma*, *Flectobacillus*, *Flexibacter*, *Hymenobacter*, *Larkinella*, *Leadbetterella*, *Litoribacter*, *Meniscus*, *Microscilla*, *Persicitalea*, *Pontibacter*, *Rhodocytophaga*, *Rudanella*, *Runella*, *Siphonobacter*, *Spirosoma*, *Sporocytophaga*

Familia *Flammeovirgaceae*:

Aureibacter, *Cesiribacter*, *Fabibacter*, *Flammeovirga*, *Flexithrix*, *Fulvivirga*, *Limibacter*, *Marinicola*, *Marinoscillum*, *Marivirga*, *Perexilibacter*, *Persicobacter*, *Rapidithrix*, *Reichenbachella*, *Roseivirga*, *Sediminitomix*, *Thermonema*

Familia "*Rhodothermaceae*":

Rhodothermus, *Rubricoccus*, *Salinibacter*, *Salisaeta*

Clase **Flavobacteriia**

Orden **Flavobacteriales**

Familia *Blattabacteriaceae*:

Blattabacterium

Familia *Cryomorphaeae*:

Brumimicrobium, *Crocinitomix*, *Cryomorpha*, *Fluviicola*, *Lishizhenia*,
Owenweeksia, *Wandonia*

Familia *Flavobacteriaceae*:

<i>Actibacter</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Mariniflexile</i>	<i>Sandarakinotalea</i>
<i>Aequorivita</i>	<i>Formosa</i>	<i>Maritimimonas</i>	<i>Sediminibacter</i>
<i>Aestuariicola</i>	<i>Fulvibacter</i>	<i>Marixanthomonas</i>	<i>Sediminicola</i>
<i>Algibacter</i>	<i>Gaetbulibacter</i>	<i>Meridianimari-</i>	<i>Sejonia</i>
<i>Aquimarina</i>	<i>Gaetbulimicrobium</i>	<i>bacter</i>	<i>Snuella</i>
<i>Arenibacter</i>	<i>Galbibacter</i>	<i>Mesoflavibacter</i>	<i>Soonwooa</i>
<i>Bergeyella</i>	<i>Gangjina</i>	<i>Mesonia</i>	<i>Stanierella</i>
<i>Bizionia</i>	<i>Gelidibacter</i>	<i>Muricauda</i>	<i>Stenothermobacter</i>
<i>Capnocytophaga</i>	<i>Gillisia</i>	<i>Muriicola</i>	<i>Subsaxibacter</i>
<i>Cellulophaga</i>	<i>Gilvibacter</i>	<i>Myroides</i>	<i>Subsaximicrobium</i>
<i>Chryseobacterium</i>	<i>Gramella</i>	<i>Nonlabens</i>	<i>Tamlana</i>
<i>Cloacibacterium</i>	<i>Hyunsoonleella</i>	<i>Olleya</i>	<i>Tenacibaculum</i>
<i>Coenonia</i>	<i>Jejuia</i>	<i>Ornithobacterium</i>	<i>Ulvibacter</i>
<i>Costertonia</i>	<i>Joostella</i>	<i>Persicivirga</i>	<i>Vitellibacter</i>
<i>Croceibacter</i>	<i>Kaistella</i>	<i>Pibocella</i>	<i>Wautersiella</i>
<i>Croceitalea</i>	<i>Kordia</i>	<i>Planobacterium</i>	<i>Weeksella</i>
<i>Dokdonia</i>	<i>Kriegella</i>	<i>Polaribacter</i>	<i>Winogradskyella</i>
<i>Donghaeana</i>	<i>Krokinobacter</i>	<i>Pontirhabdus</i>	<i>Yeosuana</i>
<i>Elizabethkingia</i>	<i>Lacinutrix</i>	<i>Pseudozobellia</i>	<i>Zeaxanthinibacter</i>
<i>Empedobacter</i>	<i>Leeuwenhoekiiella</i>	<i>Psychroflexus</i>	<i>Zhouia</i>
<i>Epilithonimonas</i>	<i>Leptobacterium</i>	<i>Psychroserpens</i>	<i>Zobellia</i>
<i>Eudoraea</i>	<i>Lutaonella</i>	<i>Riemerella</i>	<i>Zunongwangia</i>
<i>Euzebyella</i>	<i>Lutibacter</i>	<i>Robiginitalea</i>	
<i>Flagellimonas</i>	<i>Lutimonas</i>	<i>Salinimicrobium</i>	
<i>Flaviramulus</i>	<i>Maribacter</i>	<i>Salegentibacter</i>	

Familia *Schleiferiaceae*:

Schleiferia

Clase *Sphingobacteriia***Orden *Sphingobacteriales***Familia *Chitinophagaceae*:

Balneola, *Chitinophaga*, *Ferruginibacter*, *Filimonas*, *Flaviumibacter*,
Flavisolibacter, *Flavitalea*, *Gracilimonas*, *Hydrotalea*, *Lacibacter*, *Niabella*,
Niastella, *Parasegetibacter*, *Sediminibacterium*, *Segetibacter*, *Terrimonas*

Familia "*Saprospiraceae*":

Aureispira, *Haliscomenobacter*, *Lewinella*, *Saprospira*

Familia *Sphingobacteriaceae*:

Mucilagibacter, *Nubsella*, *Olivibacter*, *Parapedobacter*, *Pedobacter*,
Pseudosphingobacterium, *Solitalea*, *Sphingobacterium*

"Bacteroidetes" no clasificados: *Marinifilum*, *Ohtaekwangia*, *Prolixibacter*, *Toxothrix*

▪ Filo “*Bacteroidetes*”

El filo “*Bacteroidetes*” (Krieg y col., 2010) es un filo fenotípica, fisiológica y metabólicamente muy diverso compuesto por bacilos Gram-negativos que no forman endosporas. Hasta el año 2010, los *Bacteroidetes* se habían clasificado en tres clases, *Bacteroidia*, *Flavobacteria* y *Sphingobacteria* cada una de ellas compuesta por un solo orden. El número de géneros pertenecientes al filo “*Bacteroidetes*” se ha ido incrementado considerablemente en los últimos años. En la actual versión del *Bergey's Manual* el filo “*Bacteroidetes*” se ha organizado en cuatro grupos filogenéticos bien delimitados en base a las secuencias del gen 16S rRNA, de manera que se subdivide en cuatro clases: *Bacteroidia*, *Cytophagia*, *Flavobacteriia* y *Sphingobacteriia*. Además, los géneros *Marinifilum*, *Ohtaekwangia*, *Prolixibacter* y *Toxothrix* están estrechamente relacionados con este filo aunque no han sido incorporados a ninguna de las cuatro clases descritas hasta el momento.

Clase *Bacteroidia*

La clase *Bacteroidia* (Krieg y col., 2010; Krieg, 2012) está formada por cocobacilos y bacilos rectos, fusiformes o delgados, no esporulados. En su mayoría son anaerobios, aunque también anaerobios facultativos, son sacarolíticos si bien también pueden utilizar proteínas y otros sustratos. Los productos más habituales de la fermentación son el succinato y el acetato. No son móviles, excepto en algún caso en el que presentan movilidad por deslizamiento. Presentan un contenido en G+C que oscila entre 30 y 60 mol%. Los ácidos grasos mayoritarios normalmente son C_{15:0} iso y anteiso. La quinona respiratoria predominante en *Bacteroidia* es la menaquinona con 8 a 13 unidades isoprenoides.

Esta clase alberga cinco familias: *Bacteroidaceae*, “*Marinilabiaceae*”, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae* y *Rikenellaceae*. El orden tipo es *Bacteroidales*. Entre los cerca de 30 géneros que reúne la clase se encuentran algunos de importancia clínica, como *Bacteroides* o *Alistipes* que forman parte habitual de la microbiota intestinal del hombre, y como *Porphyromonas* que comprende patógenos humanos que colonizan la cavidad bucal. También se han descrito numerosas especies aisladas de aguas residuales, como *Bacteroides* o *Acetofilamentum*, y de sedimentos marinos, como *Marinilabilia*, o de lagos salinos alcalinos, como *Alkaliflexus*. Estos últimos presentan

requerimientos salinos para crecer. Se trata mayoritariamente de bacterias mesófilas, aunque se encuentran algunos ejemplos de termofilia, como es el caso de *Acetothermus* o *Acetomicrobium* que crecen entre 50 y 70 °C.

Clase *Cytophagia*

La clase ***Cytophagia*** (Reichenbach, 2006; Nakagawa, 2012) contiene un solo orden, *Cytophagales* (Leadbetter, 1974) que actualmente se organiza en cuatro familias: *Cyclobacteriaceae*, *Cytophagaceae*, *Flammeovirgaceae* y "*Rhodothermaceae*". La clase alberga a bacilos Gram-negativos, que en ocasiones forman filamentos. Algunos géneros presentan células que forman anillos, o con forma de coma o de S. No esporulados, excepto el género *Sporocytophaga*. No son habitualmente móviles, y si presentan movimiento lo hacen por deslizamiento, aunque también se ha descrito un género con flagelos, *Balneola*. Son quimioorganótrofos, normalmente aerobias estrictas, aunque algunos miembros son microaerófilos o anaerobios. Las colonias suelen presentar pigmentos amarillos, naranjas, rosas o rojos del tipo carotenoide y/o flexirrubina. La quinona respiratoria mayoritaria es la menaquinona con 6 o 7 unidades isoprenoides. El contenido en G+C del DNA oscila entre 31 y 65 mol%.

La clase *Cytophagia* se encuentran ampliamente distribuida en la naturaleza. Se han encontrado en grandes cantidades en hábitats ricos en materia orgánica, pero también se adaptan a niveles muy bajos de nutrientes ya que pueden subsistir degradando macromoléculas. La mayoría de especies son capaces de degradar uno o varios tipos de macromoléculas orgánicas, como proteínas: caseína, como es el caso de *Effluviibacter* y gelatina, como *Spirosoma* o *Reichenbachia*, lípidos (e.g., Tween), esculina, celulosa, almidón, pectina, agar, o quitina, como es el caso de *Algoriphagus*.

Además se encuentran en ambientes de agua dulce, sobre todo en las estaciones frías, y en ambientes marinos cerca de las orillas. Muchos géneros agrupan organismos marinos que requieren sales marinas para su crecimiento, como *Flammeovirga* y *Persicobacter* que además son agarolíticas. Dentro de esta clase, cabe destacar a la familia "*Rhodothermaceae*" que agrupa géneros extremófilos, *Rhodothermus*, *Thermonema*, *Hymenobacter* y *Salinibacter*. Son bacterias Gram-negativas, aerobias obligadas, quimioheterótrofos y con pigmentación roja o amarilla (Oren, 2006). Los dos primeros

géneros son termófilos, con una temperatura óptima de crecimiento entre 60 y 65 °C, pudiendo crecer hasta 80 °C. *Hymenobacter* es un género que alberga bacterias oligotrofas aisladas de ambientes fríos, concretamente del Antártico. El género *Salinibacter* (Anton y col., 2002), aislado de esteros de salinas, está formado por bacterias rojas, extremadamente halófilas. Es una de las bacterias más halotolerantes y con mayores requerimientos salinos de todo el dominio Bacteria, requiere al menos 150 g de sal por litro para crecer. Es de especial interés por su gran capacidad de adaptación osmótica, comparte muchas características con el orden de arqueas *Halobacteriales*.

Clase *Flavobacteriia*

La clase *Flavobacteriia* (Cavalier-Smith, 2002; Bernadet, 2012) está formada por el orden *Flavobacteriales* (Bernadet, 2012) propuesto en base al análisis filogenético de la secuencia del gen 16S rRNA. Este orden está compuesto por tres familias: *Blattabacteriaceae*, *Cryomorphaceae* y *Flavobacteriaceae*. Recientemente se ha propuesto una nueva familia, *Schleiferiaceae* para albergar a un nuevo género, *Schleiferia* (Albuquerque, 2011).

El orden *Flavobacteriales* comprende bacilos o filamentos Gram-negativos, no esporulados, desprovistos de vesículas de gas y de gránulos intracelulares de poli- β -hidroxibutirato, que normalmente se dividen por bipartición. La familia *Blattabacteriaceae*, sólo alberga un género *Blattabacterium*, que no presenta flagelo ni movilidad. Se trata de un aislado no cultivable, simbionte intracelular de insectos poco caracterizado. Por otro lado, las familias *Flavobacteriaceae* y *Cryomorphaceae* albergan quimioorganótrofos, aerobios estrictos o anaerobios facultativos con metabolismo respiratorio (la fermentación solo la llevan a cabo algunos miembros de la familia *Flavobacteriaceae*), no son móviles y si lo son, es por deslizamiento. Las colonias son amarillas o naranjas debido a la producción de pigmentos tipo carotenoides y/o flexirrubina.

La familia *Flavobacteriaceae* (Bernadet & Nakagawa, 2006; Bernadet, 2012) está ampliamente distribuida en tierra, en agua dulce, agua de mar o aguas salobres, en áreas polares, tropicales o templadas, mientras que las especies cultivables de la familia *Cryomorphaceae* están restringidas a hábitats marinos de baja temperatura. Muchos miembros de estas familias requieren NaCl o sales marinas para crecer. Alberga organismos quimioorganótrofos.

La familia *Flavobacteriaceae* representa la mayor rama del filo “*Bacteroidetes*”, anteriormente conocido como el grupo o filo “*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*”. Agrupa a casi 100 géneros que crecen normalmente en aerobiosis, aunque algunas especies pueden presentar microaerofilia (como *Coenonia* o *Sejongia*, entre otros) o crecer en anaerobiosis (como *Gaetbulibacter*, *Muricauda* o *Zobelia*). La quinona respiratoria de todos los miembros de la familia es la menaquinona con 6 unidades isoprenoides (MK6). El contenido de G+C del DNA oscila entre 31 y 45 mol%. No presentan flagelos, a excepción de *Polaribacter irgensii*, que a pesar de tener flagelo no se ha observado movilidad. Normalmente no son capaces de reducir los nitratos, salvo unos pocos géneros como *Zobelia* o *Ulvibacter* que sí lo hacen, ni de reducir los nitritos, con la única excepción de *Flavobacterium denitrificans*, un anaerobio facultativo que crece por desnitrificación en medio mineral. La presencia de oxidasa y catalasa es habitual. Suelen producir pigmentos amarillos o anaranjados, no difusibles, aunque algunos géneros pueden formar colonias no pigmentadas como *Bergeyella*.

Algunos miembros de la familia *Flavobacteriaceae* son patógenos de humanos (como los géneros *Capnocytophaga*, *Elizabethkingia* o *Weeksella*), de peces (como *Flavobacterium* o *Tenacibaculum*), de aves (como *Riemerella*, *Ornithobacterium* o *Coenonia*) y otros animales.

La familia *Flavobacteriaceae* (Bowman, 2006b; Bernadet, 2012) incluye a un complejo grupo de organismos halófilos, muchos de los cuales son además psicrófilos. Este conjunto de organismos, al que se ha llamado en ocasiones “clado marino”, presenta diversas propiedades fenotípicas comunes. Son bacilos, aerobios estrictos (con muy pocas excepciones capaces de crecer en anaerobiosis, como *Formosa*, *Muricauda* o *Polaribacter*), quimioheterótrofos, halófilos, Gram-negativos, que son o bien inmóviles o móviles por deslizamiento, capaces de producir colonias pigmentadas desde amarillas hasta naranja oscuro. Algunas especies pueden formar filamentos, aunque la formación de filamentos muy largos (>100 µm) no es habitual. Algunas de las especies de este clado marino requieren fuentes orgánicas de nitrógeno para crecer y, en muchos otros casos, requieren factores de crecimiento no identificados pero que se encuentran en el extracto de levadura. Muchas especies pueden utilizar un amplio rango de carbohidratos, que incluyen la D-

glucosa, algunos ácidos orgánicos y algunos aminoácidos. Los azúcares tipo alcoholes, compuestos aromáticos y compuestos nitrogenados (como las poliaminas) son raramente utilizados para crecer. Además, son capaces de descomponer y utilizar una fracción importante de las sustancias orgánicas producidas en las aguas superficiales de los océanos y ambientes costeros (entre otros, almidón, agar, alginato, quitina, esculina, DNA,...etc.). Por otro lado, las especies adaptadas al frío producen enzimas activas a bajas temperaturas y otros componentes de gran utilidad en la industria química y farmacéutica. También se conoce el potencial de las cepas con capacidad algicida como biocontrol para los *blooms* de algas tóxicas que plagan algunas líneas de costa causando serios problemas a la acuicultura, la salud humana y graves consecuencias en la degradación de los ambientes costeros marinos.

Clase *Sphingobacteriia*

Clase ***Sphingobacteriia*** (Kämpfer, 2012) constituida por el Orden *Sphingobacteriales* y tres familias: *Chitinophagaceae*, *Saprospiraceae* y *Sphingobacteriaceae*. Los alrededor de 30 géneros incluidos, y principalmente *Sphingobacterium*, contienen altas concentraciones de esfingofosfolípidos como componente lipídico celular. Presentan un contenido en G+C del DNA de 33-53 mol%. Las células presentan una morfología bacilar y normalmente son inmóviles. Son aerobias o anaerobias facultativas. La capacidad para fermentar está restringida a unos pocos géneros. La quinona respiratoria mayoritaria es la menaquinona con 7 unidades isoprenoides (MK7). Dentro de *Sphingobacteriia* se encuentran ejemplos de aislados de zonas litorales y de lagos de agua dulce, como es el caso de la familia *Chitinophagaceae*, que presenta la capacidad de hidrolizar la quitina, en ocasiones la celulosa, pero no el agar. En la familia *Saprospiraceae* (Krieg, 2012), los géneros *Saprospira*, *Aurespira* y *Lewinella* han sido aislados de hábitats marinos y poseen requerimientos salinos para crecer, además presentan movilidad por deslizamiento y colonias de color rosa, amarillo o naranja. Sin embargo, el género *Haliscomenobacter* aislado de agua dulce y de aguas residuales, carece de estos requerimientos salinos y no presenta movilidad.

▪ Otros filos que albergan taxones marinos

Cianobacterias

Las cianobacterias constituyen un gran grupo de bacterias fotótrofas muy heterogéneo ecológica y morfológicamente. Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza en hábitats terrestres, de agua dulce y marina. La mayoría son halotolerantes pudiendo crecer tanto en agua de mar como en agua dulce, otras en cambio presentan requerimientos de sodio, magnesio, calcio y cloro. Se encuentran en fuentes termales, lagos salinos e hipersalinos (*Aphanothece*). Actualmente está organizado en cinco órdenes (Waterbury, 2006): **Chroococcales**, que cuenta con alrededor de 30 especies; **Gloeobacterales**, con una única especie: *Gloeobacter*; **Nostocales**, que alberga 4 familias: *Microchaetaceae*, *Nostocaceae*, *Rivulariaceae* y *Scytonemataceae*; **Oscillatoriales**, también con cerca de 30 especies; **Pleurocapsales**, que consta de 3 familias: *Prochloraceae*, *Prochlorococcaceae* y *Prochlorotrichaceae*; y por último el orden **Stigonematales** que alberga una docena de especies.

Cabe destacar los géneros *Synechococcus*, del orden *Chroococcales*, y *Prochlorococcus*, del orden *Pleurocapsales*, que son cianobacterias pequeñas y unicelulares, generalmente inmóviles, que se encuentran en abundancia en la zona fótica de los océanos, donde llevan a cabo la fotosíntesis siendo responsables de un porcentaje significativo del CO₂ que se fija en la Tierra.

Planctomyces

El filo *Planctomycetes* (Ward, 2010) está compuesto por dos clases: Clase **Planctomycetia** (Ward, 2010) que a su vez alberga dos órdenes *Planctomycetales* y "*Brocadiales*".

El orden "*Candidatus Brocadiales*" alberga a la familia "*Candidatus Brocadiaceae*" de bacterias no móviles, anaerobias obligadas y quimiolitautótrofas que utilizan amonio y nitritos para crecer (Bowman, 2006b).

El orden **Planctomycetales** alberga a una sola familia, *Planctomycetaceae*, con 10 géneros: *Aquisphaera*, *Blastopirellula*, *Gemmata*, *Isosphaera*, *Pirellula*, *Planctomyces*, *Rhodopirellula*, *Schlesneria*, *Singulisphaera* y *Zavarzinella*. Son bacterias pedunculadas que se caracterizan por presentar un ciclo de vida particular y por carecer de peptidoglicano en la pared celular. Mayoritariamente quimiótrofos anaerobios facultativos que presentan

tanto metabolismo respiratorio como fermentativo a partir de azúcares (*Planctomyces*) o estrictamente aerobias (*Blastopirellula*). La quinona respiratoria mayoritaria es la menaquinona con 6 unidades isoprenoides (MK6). El hábitat es fundamentalmente acuático, tanto de agua dulce como de agua marina, e incluso de fuentes termales (*Isosphaera*).

Clase **Phycisphaerae** (Fukunaga y col., 2010) alberga al orden **Phycisphaerales** con una única familia, *Phycisphaeraceae*, y un solo género, *Phycisphaera* de células esféricas Gram-negativas, móviles anaerobias facultativas. También presenta como quinona respiratoria mayoritaria la menaquinona MK6.

Verrucomicrobia

El filo *Verrucomicrobia* (Hedlund, 2010, 2012) se ha definido en base al análisis filogenético del gen 16S rRNA de cepas cultivables y de secuencias de clones ambientales obtenidas de una gran diversidad de ambientes. Los miembros cultivables del filo son bacterias Gram-negativas; muchas contienen compartimentos intracelulares recubiertos por membranas internas. La quinona respiratoria mayoritaria es la menaquinona, no se han detectado ubiquinonas. Muchos miembros son quimioheterótrofos, que prefieren los carbohidratos incluyendo los polisacáridos. Alguno de los aislados más recientes son termoacidófilos metilótrofos. Hasta la fecha se reconocen 7 clases en el filo: tres clases formalmente descritas **Verrucomicrobiae**, **Spartobacteria** y **Opitutae** y cuatro clases denominadas clase 3, clase 6, clase 5 no cultivable y clase 7 no cultivable.

Las clases *Verrucomicrobiae*, *Opitutae*, 3 y 5 (no cultivable) se asocian a hábitats marinos. La clase **Verrucomicrobiae** contiene un solo orden, **Verrucomicrobiales**, que alberga tres familias: *Akkermansiaceae*, *Rubritaleaceae* y *Verrucomicrobiaceae*. Las dos primeras incluyen un único género cada una, *Akkermansia* y *Rubritalea* respectivamente, y *Verrucomicrobiaceae* tiene 6 géneros, *Haloferula*, *Luteolibacter*, *Persicirhabdus*, *Prostheco bacter*, *Roseibacillus* y *Verrucomicrobium*. La clase **Opitutae** contiene dos órdenes, **Opitiales** que alberga a la familia *Opitutaceae* y los géneros *Alterococcus* y *Opitutus*; y el orden **Puniceicoccales**, que alberga a la familia *Puniceicoccaceae* y los géneros *Cerasicoccus*, *Coraliomargarita*, *Pelagicoccus* y *Puniceicoccus*.

El presente proyecto de Tesis Doctoral se enmarca dentro del proyecto de investigación que lleva por título **Taxonomía, filogenia y conservación de bacterias marinas (CGL-2005-02292)** y su continuación **Taxonomía, filogenia y conservación de bacterias marinas-2010 (CGL-2010-18132)**.

El objetivo general de estos proyectos es el análisis de la diversidad, caracterización, descripción y depósito en colecciones de cultivo de nuevos taxones (géneros y especies) de aislados bacterianos quimioheterótrofos marinos.

OBJETIVOS

Los objetivos concretos de este trabajo han sido los siguientes:

1. Estudio de la diversidad cultivable de un ambiente marino perteneciente a la costa valenciana empleando técnicas de cultivo tradicionales.
2. Identificación mediante secuenciación parcial (~1000 nt) del gen 16S rRNA, de los aislados bacterianos quimioheterótrofos procedentes de agua de mar superficial de la playa de la Malvarrosa, y tanto de carne de ostra como del agua circundante de un criadero de ostras ubicado frente a la costa de Vinaroz.
3. Priorización y selección de las bacterias heterótrofas marinas atendiendo a su novedad taxonómica.
4. Caracterización polifásica de las cepas seleccionadas para su descripción en extenso y su propuesta formal como nuevos taxones.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material Biológico: cepas bacterianas

Las cepas utilizadas durante el presente estudio proceden de dos campañas realizadas por el grupo de investigación:

1. Muestreo realizado en **Valencia**, julio de 2008, a partir de agua de mar de la playa de la Malvarrosa. El aislamiento a partir de agua marina superficial próxima a la playa de la Malvarrosa (Valencia) se hizo utilizando medios de cultivo sólidos de diferente composición y contenido nutritivo: Agar marino (*Marine Agar*, MA), MA diluido 1/100, R2A marino, R2A marino diluido 1/50 y agar agua de mar, todos ellos incubados a dos temperaturas (15 y 26 °C) y en condiciones de oscuridad.

El R2A marino se preparó con agar R2A (Difco) utilizando agua de mar filtrada y envejecida, en lugar de agua destilada. Se llevó a cabo una siembra del agua de mar (directa o diluciones 10^{-1} , 10^{-2} o 10^{-3} , realizadas en agua de mar estéril envejecida). Los distintos medios se incubaron a 15 y a 26 °C. Posteriormente, se llevó a cabo el aislamiento y purificación de todas las colonias crecidas en cada medio a los 4, 8, 16 y 21 días.

En total se purificaron 194 colonias en el mismo medio y condiciones de cultivo (Tabla 2).

Tabla 2: Designación de las cepas procedentes de la campaña llevada a cabo en la Playa de la Malvarrosa, Valencia, en julio de 2008. MA; MD, MA diluido 1/100; R2A, R2A marino; RD, R2A marino diluido 1/50.

Designación de cepas	Condiciones de aislamiento			Nº total cepas secuenciadas
	Medio	Tª (°C)	Incubación	
M1 – M76	MA	26	0 – 4 días	70
M77 – M85			5 – 8 días	
M86 – M88			9 – 16 días	
MD1 – MD19	MD		0 – 21 días	14
M15Ø_1 – M15Ø_34	MA	15	0 – 6 días	27
R1 – R35	R2A	26	0 – 4 días	39
R36 – R47			5 – 8 días	
R48			9 – 16 días	
RD1 – RD18	RD		0 – 21 días	12
R15Ø_1 – R15Ø_18	R2A	15	0 – 6 días	16

2. Muestréos realizados en **Vinaroz** (Castellón) en el periodo de junio de 1989 a mayo de 1990. Se llevaron a cabo once muestréos de agua marina superficial alejada de la costa de Vinaroz (Castellón). Se tomaron las muestrás a 10 metros de profundidad y a 5-6 km de la costa donde se situaba un criadero experimental de ostra (*Ostrea edulis*). Las muestrás fueron extraídas mensualmente tomando cada vez varios ejemplares tanto de carne de ostra como del agua circundante. Las muestrás se transportaron en refrigeración (5-10 °C) hasta el laboratorio de análisis, donde fueron procesadas.

Se llevó a cabo la siembra de diluciones del agua de mar y de carne de ostra utilizando como medio sólido MA (Difco). Se inocularon las placas con 0,1 ml y se extendió sobre el agar con un asa Digralesky estéril. Los cultivos se inocularon a 25 ± 1 °C tomándose como definitivos los cultivos a los 10 días (Ortigosa, 1995).

Corresponden a este muestréo 48 cepas que aparecen detalladas en la Tabla 3 y que han sido incluidas en el trabajo de Tesis.

Tabla 3: Relación de cepas estudiadas. Las condiciones de aislamiento fueron las mismas en todos los casos (MA a 25 ± 1 °C durante 10 días).

Designación cepas	Aislamiento	Origen
1SM8, 1SM10	Enero 1990	Agua de mar
2OM6, 2OM14	Febrero 1990	Carne de ostra
2SM5, 2SM6, 2SM9, 2SM14, 2SM15, 2SM19, 2SM21, 2SM25	Febrero 1990	Agua de mar
3SM5, 3SM6, 3SM9, 3SM13, 3SM14, 3SM17, 3SM19, 3SM20, 3SM24, 3SM25, 3SM29	Marzo 1990	Agua de mar
4OM3	Abril 1990	Carne de ostra
4SM2, 4SM4, 4SM10	Abril 1990	Agua de mar
5OM2, 5OM8	Mayo 1990	Carne de ostra
5SM10, 5SM12, 5SM21, 5SM24, 5SM25, 5SM31, 5SM32, 5SM33, 5SM4, 5SM5	Mayo 1990	Agua de mar
6SM1	Junio 1989	Agua de mar
6OM36	Junio 1989	Carne de ostra
7SM6, 7SM29, 7SM30, 7SM33	Julio 1989	Agua de mar
8SM26	Agosto 1989	Agua de mar
9SM8, 9SM23	Septiembre 1989	Agua de mar

Cepas de referencia

Además de los aislados propios se han incorporado las cepas de referencia que aparecen en la Tabla 4 con fines comparativos.

Tabla 4: Cepas de referencia utilizadas durante el estudio.

Especie	Cepa	Referencia
<i>Alphaproteobacteria</i>		
<i>Jannaschia donghaensis</i>	CECT 7802	Yoon y col., 2007
<i>Jannaschia helgolandensis</i>	DSM 14858	Wagner-Döbler y col., 2003
<i>Jannaschia rubra</i>	CECT 5088	Macián y col., 2005
<i>Jannaschia seosinensis</i>	CECT 7799	Choi y col., 2006
<i>Maribius salinus</i>	CECT 7800	Choi y col., 2007
<i>Nautella italica</i>	CECT 7645	Vandecandelaere y col., 2009
<i>Oceanicola nanhaiensis</i>	CECT 7831	Gu y col., 2007
<i>Oceanicola pacificus</i>	CECT 7832	Yuan y col., 2009
<i>Palleronia marisminoris</i>	CECT 7066	Martínez-Checa y col., 2005
<i>Phaeobacter daeponensis</i>	CECT 7309	Yoon y col., 2007
<i>Phaeobacter gallaeciensis</i>	CECT 7277	Martens y col., 2006
<i>Phaeobacter inhibens</i>	CECT 7251	Martens y col., 2006
<i>Pseudoruegeria aquimaris</i>	CECT 7680	Yoon y col., 2007
<i>Roseobacter denitrificans</i>	CECT 5011	Shiba, 1991
<i>Roseobacter litoralis</i>	CECT 5395	Shiba, 1991
<i>Roseovarius aesturarii</i>	CECT 7745	Yoon y col., 2008
<i>Roseovarius crassostreae</i>	CECT 7676	Boettcher y col., 2005
<i>Roseovarius nubinhibens</i>	CECT 7750	González y col., 2003
<i>Roseovarius tolerans</i>	CECT 7738	Labrenz y col., 1999
<i>Ruegeria atlantica</i>	CECT 4292	(Rüger y Höfle, 1992); Uchino y col., 1999
<i>Ruegeria lacuscaerulensis</i>	CECT 5319	(Petursdottir y Kristjansson, 1999); Yi y col., 2007
<i>Ruegeria pomeroyi</i>	CECT 7647	(González y col., 2003) Vandecandelaere y col., 2008
<i>Shimia marina</i>	CECT 7688	Choi y Cho, 2006
<i>Thalassobacter stenotrophicus</i>	CECT 5294	Macián y col., 2005
<i>Tropicibacter naphthalenivorans</i>	CECT 7648	Harwatti y col., 2007
<i>Gammaaproteobacteria</i>		
<i>Photobacterium angustum</i>	CECT 5690	Reichelt y col., 1979
<i>Photobacterium ganghwense</i>	CECT 7641	Park y col., 2006
<i>Photobacterium halotolerans</i>	CECT 5860	Rivas y col., 2006
<i>Photobacterium leiognathi</i>	CECT 4191	Boisvert y col., 1967
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	CECT 4192	Beijerinck, 1889
<i>Photobacterium rosenbergii</i>	CECT 7644	Thompson y col., 2005
<i>Vibrio aerogenes</i>	CECT 7868	Shieh y col., 2000
<i>Vibrio gazogenes</i>	CECT 5068	Baumann y col., 1981
<i>Vibrio mangrovi</i>	CECT 7927	Rameshkumar y col., 2011
<i>Vibrio marisflavi</i>	CECT 7928	Wang y col., 2011
<i>Vibrio stylophorae</i>	CECT 7929	Sheu y col., 2011

Tabla 4: (Continuación)

Especie	Cepa	Referencia
<i>Bacteroidetes</i>		
<i>Congregibacter litoralis</i>	DSM 17192	Spring y col., 2009
<i>Cytophaga fermentans</i>	CECT 7602	Bachmann, 1955
<i>Haliea rubra</i>	DSM 19751	Urios y col., 2009
<i>Haliea salexigens</i>	CECT 7478	Urios y col., 2008
<i>Kriegella aquimaris</i>	CECT 7617	Nedashkovskaya y col., 2008
<i>Marinifilum fragile</i>	CECT 7942	Na y col., 2009
<i>Pseudozobellia thermophila</i>	CECT 7618	Nedashkovskaya y col., 2009
<i>Zobellia russellii</i>	CECT 7505	Nedashkovskaya y col., 2004
<i>Zobellia uliginosa</i>	CECT 4277	Barbeyrony col., 2001

Condiciones de cultivo y conservación

Las cepas se conservaron en el laboratorio mediante los siguientes métodos:

Cultivos activos: MA semisólido (0,2% agar) inoculado por picadura y conservado en tubos de tapón de rosca a temperatura ambiente y oscuridad.

Congelación: suspensión de células preparada con Caldo Marino (MB) adicionado con el 20% de glicerol y conservados a -80 °C.

Liofilización: suspensión de células preparada con el crioprotector adecuado para cada aislado, sometida a congelación y vacío. Tras desecación, el liofilizado se mantiene en ampollas de vidrio selladas al vacío. Se utilizó inositol al 5% como crioprotector habitual, excepto en aquellos casos en los que el aislado mostraba poca viabilidad tras la liofilización. En tales casos se utilizaron como crioprotectores leche descremada, glutámico, trehalosa u otras combinaciones de crioprotector y medio de cultivo (Tabla 5).

Tabla 5. Crioprotectores utilizados distintos al inositol.

Crioprotector	Cepa
Inositol al 5% más MB (2:1 v/v)	<i>O. nanhaiensis</i> CECT 7831 ^T
Leche descremada al 10% más MB (1:1 v/v)	<i>Z. uliginosa</i> CECT 4277 ^T
Leche descremada al 10% más MB (2:1 v/v)	<i>P. phosphoreum</i> CECT 4192 ^T
	<i>P. marisminoris</i> CECT 7066 ^T
Leche descremada al 10%	<i>T. stenotrophicus</i> CECT 5294 ^T
	<i>P. leiognathi</i> CECT 4191 ^T
Glutámico 0,067 M	<i>R. tolerans</i> CECT 7738 ^T
Trehalosa al 20% más MB	<i>Vibrio mangrovi</i> CECT 7927 ^T
	<i>Vibrio stylophorae</i> CECT 7929 ^T

La cepa *Cytophaga fermentans* CECT 7602^T sólo se pudo conservar por congelación. Las cepas *Congregibacter litoralis* DSM 17192^T, *Haliea rubra* DSM 19751^T y *Jannaschia helgolandensis* DSM 14858^T eran cultivos activos en préstamo con fines para la investigación y no han sido conservados.

2. Caracterización fenotípica

La composición de los medios de cultivo, reactivos y colorantes, así como los sustratos de los sistemas miniaturizados utilizados durante este estudio se encuentran en el Anexo I.

Las condiciones de incubación se ajustaron a las preferencias de cada cepa, aunque siempre entre los 20 y 30 °C, con la única excepción de los ensayos para determinar el rango de temperatura de crecimiento. Los medios comerciales y diluyentes se suplementaron con 2% NaCl, *Marine Cation Supplement* (MCS) o con *Artificial Sea Water* (ASW) a la mitad de concentración para satisfacer las necesidades salinas de los aislados.

2_1. Características morfológicas celulares y coloniales

Morfología y tamaño celular

Microscopía óptica

La morfología bacteriana, así como el tamaño celular y las agrupaciones típicas de cada cepa, se determinaron por observación directa al microscopio óptico de contraste de fases (Leica DMRB fluorescence microscopy) a partir de una suspensión en ASW a la mitad de concentración de células en fase logarítmica de crecimiento en MA.

Movilidad y flagelos

La movilidad, incluyendo la movilidad por deslizamiento (*gliding motility*), de cada una de las cepas estudiadas, se determinó por observación directa al microscopio óptico. Como control positivo para la movilidad por deslizamiento se utilizó *Zobellia russellii* CECT 7505^T.

La presencia de flagelos se analizó tiñendo suspensiones celulares con el colorante de Ruy (Heimbrook y col., 1989). A partir de cultivos de 24 h en medio sólido, se prepararon montajes húmedos en los que se confirmó la movilidad del cultivo al microscopio de contraste de fases. A continuación se depositaron 1 o 2 gotas de la solución

colorante en el borde del cubreobjetos, permitiendo la difusión hacia la muestra. Transcurridos 5 minutos se observaron los flagelos teñidos de violeta oscuro en microscopía de campo claro.

Acumulación de gránulos de poli- β -hidroxibutirato (PHB)

Se determinó la presencia de gránulos de PHB mediante la observación en fresco al microscopio óptico de cultivos crecidos en medio basal adicionado con 0,2% (p/v) de la fuente única de carbono y energía que permite mayor crecimiento de la cepa, según el ensayo que se describe más adelante. La presencia de gránulos de PHB se analizó tiñendo con el colorante Nile Blue A (Smibert y Krieg, 2007). La prueba se consideró positiva cuando se observaron mediante microscopía de fluorescencia gránulos refringentes en las células de la preparación. Como control positivo se utilizaron las cepas *Photobacterium angustum* CECT 5690^T, *Tropicibacter naphthalenivorans* CECT 7648^T y *Pseudoruegeria aquimaris* CECT 7680^T.

Microscopía electrónica

Se han utilizado dos tipos de microscopios electrónicos, el microscopio de barrido Hitachi S-4100, con cañón de emisión de campo (FEG) con una resolución de 1,5 nm a 30 kV, detector BSE AUTRATA, detector de RX RÖNTEC y sistema de captación digital mediante el programa QUANTAX 200, y el microscopio electrónico de transmisión JEM-1010 JEOL de 100 kV con cámara digital MegaView III y Software de adquisición de imágenes "Analysis".

Para su observación mediante **SEM (Scanning Electron Microscopy)**, las muestras se fijaron con una solución de glutaraldehído 2,5% (v/v) preparada con ASW a mitad de concentración filtrada (0,22 μ m de diámetro de poro). Tras un periodo de 24 h a 4 °C se filtraron las muestras por membranas de policarbonato Isopore GTTP 2500 previamente esterilizadas en autoclave. Las muestras adheridas a la membrana y montadas en un soporte metálico se deshidrataron gradualmente, al menos durante 1 minuto, en series de etanol al 50%, al 80% y finalmente en etanol absoluto.

La deshidratación por Punto Crítico con CO₂ (TOUSIMIS mod. Autosamdri-814); el posterior recubrimiento con oro-paladio, así como la observación de las muestras se llevó a cabo en el Servicio Central

de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia.

En el caso de usar **TEM (Transmission Electron Microscopy)** las muestras se fijaron con glutaraldehído 2,5% (v/v) y a continuación se realizó una tinción negativa con 2% (p/v) de ácido fosfotúngstico a pH 6,9 sobre Rejilla TEM.

Características culturales: morfología colonial, swarming, pigmentación y luminiscencia

La morfología colonial se observó tras incubación en medio MA.

El crecimiento invasivo sobre agar o *swarming* se observó a distintos intervalos de tiempo en placas de MA incubadas hasta 7 días (Baumann y Baumann, 1981).

La producción de pigmentos se analizó en placas de MA incubadas hasta 15 días. Para determinar si el pigmento pertenece o no al tipo flexirrubina se utilizó una solución de KOH al 20% (Bernardet y col., 2002).

El carácter luminiscente de las bacterias se comprobó observando en oscuridad los cultivos crecidos durante 24h en MA o Luminous medium (LM).

Medio Tiosulfato Citrato Sales Biliares Sacarosa (TCBS)

Se observó el crecimiento y la producción de ácido a partir de la sacarosa en este medio selectivo y diferencial para vibrios (Oxoid).

2_2. Caracterización bioquímica y fisiológica

Determinación de Gram mediante lisis en KOH

Se realizó según el método descrito por Buck (1982). Sobre una gota de solución acuosa de KOH al 3% (p/v) se transfiere una cantidad visible del cultivo bacteriano con un asa estéril y se realiza una suspensión del cultivo sobre la gota. Si se aprecia viscosidad debida a la lisis celular, el cultivo es Gram negativo, en caso contrario se considera Gram positivo.

Catalasa y Oxidasa

Se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Gerhardt y col. (1994).

La prueba de la catalasa se realizó añadiendo unas gotas de agua oxigenada al 3% (v/v) sobre un cultivo joven del microorganismo. La aparición inmediata de un burbujeo de O₂ evidencia la actividad de la enzima catalasa, en este caso la prueba se consideró como positiva.

La prueba de la oxidasa se ensayó realizando una extensión de un cultivo de 24-48 h sobre un papel de filtro impregnado con el reactivo para la oxidasa. La formación de un color azul intenso en menos de 10 segundos se consideró como prueba positiva.

Enzimas hidrolíticas extracelulares

Almidón

La presencia de amilasas se evaluó en placas de MA suplementado con almidón soluble (Panreac) al 0,2% (p/v). Para la lectura del resultado se adicionó lugol. La aparición de una zona no teñida alrededor del crecimiento indicó la presencia de amilasas.

Alginato sódico

La hidrólisis del alginato se ensayó en placas de MA suplementado con alginato sódico (Sigma) al 2% (p/v). La aparición de halos transparentes alrededor de las colonias se consideró como una prueba positiva.

Caseína

Se empleó el medio MA suplementado con leche descremada al 1% (v/v). Tras 7 días de incubación, la aparición de halos transparentes alrededor de las colonias se consideró como una prueba positiva.

DNA

Se analizó en el medio agar DNAsa (Oxoid) suplementado con MCS. Tras 5-6 días de incubación se añadió a las placas HCl 1N para revelar el resultado. La aparición de halos claros fue indicativo de la presencia de la enzima desoxirribonucleasa.

Gelatina

Se utilizó MB suplementado con gelatina (Oxoid) al 12% (p/v). Los tubos se inocularon por picadura y se mantuvieron 7 días en incubación. Para la lectura, los tubos se mantuvieron una hora a 4 °C junto a un control negativo sin inocular. En estas condiciones, solo los tubos en los que la gelatina se ha hidrolizado se mantienen líquidos.

Esta prueba también se determinó en algunos casos como parte de los sistemas miniaturizados API 20E y API 20NE.

Lecitina

Se utilizó el medio MA suplementado con una emulsión estéril de yema de huevo a una concentración final del 5% (v/v). La emulsión se preparó mezclando una yema de huevo en agua destilada 1:1 (v/v). La aparición de un halo opaco alrededor de las colonias se consideró como resultado positivo.

Tween 80

La presencia de lipasas se determinó por la aparición de un precipitado de cristales blancos (halos opacos) alrededor de las colonias crecidas en agar Tween 80 suplementado con MCS.

L-arginina dihidrolasa (ADH) de Thornley

Se realizó en el medio de Thornley (Thornley, 1960) modificado por Baumann y Baumann (1981). Los tubos se inocularon por picadura y se sellaron con vaselina estéril. Al cabo de tres días de incubación la prueba se consideró positiva cuando se detectaba alcalinización del medio mediante el viraje del indicador rojo fenol.

L-arginina dihidrolasa (ADH) de Moeller

Al medio basal de Moeller (Difco) adicionado con MCS se le añadió L-arginina al 0,5% (p/v) (Lee y Donovan, 1985). Tras inocular y sellar con vaselina estéril, los cultivos se incubaron hasta 7 días. Los tubos con acidificación debido a la fermentación de la glucosa se consideraron negativos, mientras que los cultivos con alcalinización y turbidez se consideraron positivos.

La presencia de ADH también se determinó como parte de los sistemas miniaturizados API 20E y API 20NE.

L-lisina y L-ornitina descarboxilasa (LDC y ODC)

Se determinaron en el medio basal de Moeller (Difco) adicionado con MCS al que se añadió el correspondiente aminoácido al 0,5% (p/v) (Lee y Donovan, 1985). Los cultivos se incubaron hasta 7 días sellados con vaselina estéril. Los resultados se leyeron de la misma forma que la indicada para la ADH de Moeller.

La presencia de LDC y ODC también se determinó como parte del sistema miniaturizado API 20E.

Producción de indol a partir de triptófano

Se analizó sembrando las cepas en MB. Después de un periodo de incubación de 48 h se adicionaron unas gotas del reactivo de Kovacs para el indol (Kovacs, 1956). La aparición de un anillo rojo en la parte superior del tubo evidencia la capacidad del microorganismo de producir indol a partir del triptófano.

Esta prueba también se determinó como parte de los sistemas miniaturizados API 20E y API 20NE.

Reducción de nitratos

La capacidad de reducir nitratos a nitritos se ensayó con cultivos crecidos durante 3-5 días en caldo nitrato suplementado con MCS y con campana Durham para la recogida de gases.

Los resultados se revelaron posteriormente con los reactivos de Griess 1 y 2 (Smibert y Krieg, 2007). Se confirmaron los tubos negativos añadiendo zinc en polvo. El zinc es un agente reductor que reduce el nitrato a nitrito, por lo que el cultivo negativo para la reducción de nitratos tomará coloración roja. Si esto no sucede significa que el microorganismo ha sido capaz de reducir los nitritos hasta formas gaseosas (N_2 , nitrógeno molecular y óxidos nítrico/nitroso) detectadas en la campana invertida, en cuyo caso se considera la cepa como positiva para la desnitrificación.

Esta prueba también se determinó como parte del sistema miniaturizado API 20NE.

Voges Proskauer (VP)

Se determinó siguiendo la metodología de Furniss y col. (1978). El medio semisólido inoculado se incubó durante 24-48 h. La prueba se reveló añadiendo 0,5 ml de KOH al 40% (p/v) y 0,5 ml de solución alcohólica de α -naftol. Al cabo de 15 minutos la prueba se consideró positiva cuando se había desarrollado en el reactivo un color rojo.

Metabolismo Oxidativo-Fermentativo de glucosa (O/F)

Se empleó el medio basal O/F (Difco) rehidratado con ASW a la mitad de concentración y suplementado con glucosa al 1% (p/v). En algunos casos también se han utilizado otros carbohidratos como galactosa maltosa, manosa, arabinosa o lactosa, siempre al 1% (p/v).

Se inocularon por picadura dos tubos por cepa, sellándose uno de ellos con vaselina estéril. Los tubos se incubaron hasta 7 días. El viraje a amarillo del indicador en ambos tubos se asoció a un

metabolismo de tipo fermentador y se tomó como prueba positiva. El viraje en superficie del tubo no sellado se asoció a un metabolismo oxidativo y la ausencia de viraje a la no utilización del carbohidrato.

Rangos de tolerancia a la temperatura y a la salinidad

Las cepas sembradas en placas de MA fueron incubadas a 4 y 15 °C hasta 15 días y a 28, 37, 40, 42 y 45 °C durante 48 h.

El crecimiento a distintas salinidades se determinó en placas de MA. Para establecer la concentración mínima de sales requerida, se diluyó el medio MA con agua destilada hasta obtener una concentración de sales totales de 0,34, 0,68, 0,85, 1,02, 1,36, 1,7, 2,04, 2,55 y 3,06% (p/v) (factor de dilución 0,1, 0,2, 0,25, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,75 y 0,9, respectivamente). La disminución en la concentración de nutrientes y de agar por la dilución, se compensó adicionando las cantidades adecuadas de peptona, extracto de levadura y agar.

Para determinar el valor umbral máximo de salinidad a la que puede crecer cada cepa se adicionó NaCl al MA para obtener concentraciones finales de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15 y 18% (p/v) (Macián y col., 2005).

Requerimientos iónicos específicos

Los requerimientos iónicos se determinaron en el medio de tolerancia a la sal (STA, *Salt Tolerance Agar*) que contiene 1% (p/v) de triptona, 0,3% (p/v) de extracto de levadura y 1,5% de agar (p/v) más las siguientes cantidades (p/v) de sales:

- i_ 0% sales
- ii_ 2% KCl
- iii_ 2% NaCl
- iv_ 2% NaCl y 0,9% MgCl₂·6H₂O
- v_ 2% NaCl y 0,2% CaCl₂·2H₂O
- vi_ 2% NaCl y 0,06% KCl
- vii_ 2% NaCl, 0,9% MgCl₂·6H₂O y 0,2% CaCl₂·2H₂O
- viii_ 2% NaCl, 0,9% MgCl₂·6H₂O, 0,2% CaCl₂·2H₂O y 0,06% KCl
- ix_ 2% NaCl, 0,9% MgSO₄·7H₂O, 0,2% CaCl₂·2H₂O y 0,06% KCl

Las placas se incubaron a la temperatura óptima de cada cepa hasta 14 días.

Producción de gas en la fermentación de carbohidratos

Se ensayó en tubos de caldo glucosado (MB + 1% glucosa) provistos de campana Durham.

Crecimiento en anaerobiosis con atmósfera modificada

El crecimiento en anaerobiosis se determinó mediante la siembra en placa y tubo e incubando con bolsa generadora de anaerobiosis (GENbag anaer, Biomérieux).

2_3. Pruebas nutricionales

Utilización de sustratos orgánicos como fuente única de carbono y energía

El estudio del espectro nutricional de las cepas se llevó a término utilizando medio basal (BM) suplementado con agar purificado al 1,0% (p/v) y el sustrato correspondiente (Baumann y col., 1984). Se ensayaron 54 compuestos (Anexo I), incluyendo carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos y aminas, que se añadieron a una concentración final de 0,1% (p/V), a excepción de los carbohidratos que fueron al 0,2%.

En el estudio se incluyeron un control positivo compuesto por BM, suplementado con 1,0% (p/v) de agar purificado y 0,5% (p/v) de extracto de levadura y un control negativo compuesto únicamente por BM y 1,0% (p/v) de agar purificado. Las placas se incubaron hasta 15 días tras su inoculación mediante el multiinoculador DenLey Multipoint Inoculator.

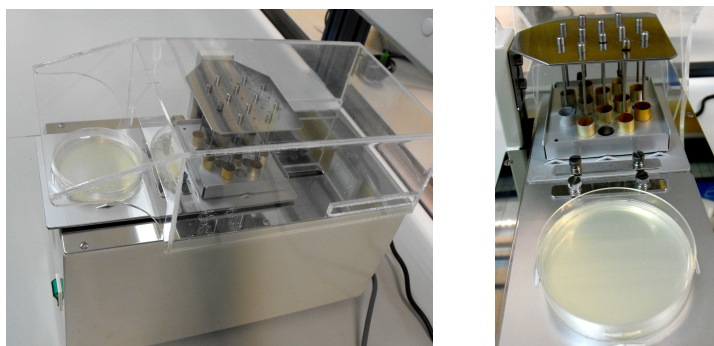


Figura 1: Multiinoculador DenLey Multipoint Inoculator.

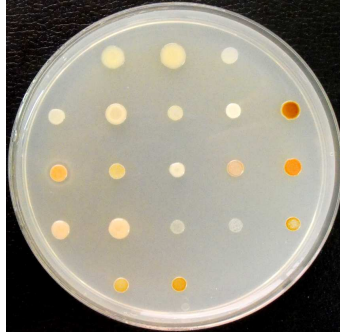


Figura 2: Placa de BMA inoculada mediante multiinoculador.

Sistemas miniaturizados

Biolog

El estudio del espectro nutricional de las cepas se complementó con el sistema Biolog, que determina la capacidad de los microorganismos para oxidar un total de 95 sustratos diferentes como fuente única de carbono y energía (Anexo I).

Las cepas se sembraron en placas de MA y tras un periodo de incubación de 24-48 h, según la tasa de crecimiento de cada bacteria, se procedió a resuspender las bacterias en 20 ml de ASW a mitad de concentración. Para ello se utilizaron hisopos de algodón estériles evitando arrastrar medio de cultivo. La concentración de la suspensión se determinó por transmitancia (50 ± 2) que equivale a una concentración de 6×10^8 células/ml. La inoculación de las microplacas de 96 pocillos específicas para bacterias Gram negativas (GN2) se realizó mediante el uso de una pipeta multicanal de 8 canales (Biolog), inoculando 100 μ l de suspensión bacteriana a cada pocillo. Las placas se incubaron a la temperatura óptima para a cada microorganismo durante 48 h. La lectura de los resultados se hizo a las 24-48 h mediante un lector de placas (Biolog) que mide la absorbancia de los pocillos a 590 nm.

Galerías API

Las cepas se sembraron en placas de MA y tras un periodo de incubación de 24-48 h, según el crecimiento de cada bacteria, se procedió a resuspender las células en suspensión salina al 0,85% (p/v). Para las cepas con requerimientos iónicos se utilizó MCS como suplemento iónico de la suspensión celular.

En este trabajo se han utilizado los siguientes sistemas miniaturizados:

API 50CHE. Contiene 50 pruebas de fermentación de carbohidratos y tras la inoculación se incuba la galería durante 24-48 h a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo. El cambio de coloración del tubo como consecuencia de la acidificación del medio se considera positivo.

API 20NE. Compuesta por 20 pruebas, 12 de ellas destinadas a la asimilación de carbohidratos y 5 a pruebas enzimáticas. El resto de pruebas detectan la reducción de nitratos a nitritos y/o N_2 , la producción de indol a partir de triptófano y la fermentación de glucosa. Se incuba durante 24h, y se interpretan los resultados siguiendo las indicaciones del fabricante.

API 20E. Contiene 20 pruebas, 9 de ellas destinadas a detectar la fermentación de carbohidratos y 7 a pruebas enzimáticas. El resto de pruebas detectan la producción de H_2S , la producción de indol a partir de triptófano, la producción de acetoina a partir de piruvato sódico (VP) y la utilización de citrato. Se incuba durante 24h, y se interpretan los resultados siguiendo las indicaciones del fabricante.

API ZYM. Contiene 19 actividades enzimáticas. En este caso la incubación a la temperatura óptima de crecimiento es de 4 h. La interpretación de los resultados es cualitativa, dándole a cada prueba un valor numérico del 1 al 5 según la intensidad de la coloración alcanzada en la cúpula respecto al control negativo. Los valores superiores o iguales a 3 se consideran positivos.

2_4. Caracterización Quimiotaxonómica

Composición de ácidos grasos

Los ácidos grasos se extrajeron y prepararon en la CECT de acuerdo con los protocolos estándar descritos por **MIDI**, *Microbial Identification System* (Sasser, 1990). La biomasa fue obtenida a partir de placas de MA incubadas en aerobiosis durante 24 o 48 h y a 26 o 30 °C. El contenido en ácidos grasos celulares fue analizado por Cromatografía de Gases (GC), con el sistema MIDI utilizando el método TSBA6 (MIDI, 2008) y la unidad cromatográfica Agilent 6850. Los ácidos grasos se identificaron mediante el paquete informático *Microbial Identification Sherlock software package*.

En algunos casos los ácidos grasos fueron analizados por los servicios de identificación de la colección de cultivos alemana (DSMZ, Braunschweig, Alemania) mediante cromatografía de gases siguiendo la metodología descrita por Kämpfer y Kroppenstedt (1996). La

biomasa fue obtenida a partir de placas de MA que se habían incubado durante 24 h a 26 °C y en condiciones aerobias.

Análisis de quinonas y lípidos polares

El análisis de quinonas y de lípidos polares se llevó a cabo en el Servicio de Identificación de la DSMZ (Braunschweig, Alemania) utilizando material celular obtenido en la CECT.

En algunos casos, el análisis de lípidos polares se llevó a cabo íntegramente en la CECT siguiendo la metodología previamente descrita por Tindall y col. (2007). Para ello, se extrajeron los lípidos polares a partir de 100 mg de material celular liofilizado utilizando dos solventes, cloroformo: metanol: NaCl 0,3% (1: 2: 0.8 v/v/v) y cloroformo: NaCl 0,3% (1:1 v/v). Los lípidos polares se separaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) bidimensional. El primer solvente para la cromatografía es una mezcla de cloroformo: metanol: agua (65: 25: 4 v/v/v) y el segundo de cloroformo: metanol: ácido acético: agua (80: 12: 15: 4 v/v/v/v).

El material lipídico total fue teñido con ácido molibdofosfórico seguido de una fase de calentamiento a 150 °C durante 15 minutos para revelar la presencia de fosfolípidos y otros lípidos presentes en la muestra. Para visualizar grupos funcionales específicos se utilizaron alfa-naftol/ácido sulfúrico para visualizar glicolípidos, ninhidrina para visualizar aminolípidos, azul de molibdeno para fosfolípidos y reactivo de Dragendorff para revelar compuestos con nitrógeno cuaternario.

2_5. MALDI-TOF MS

La preparación de la muestra para el análisis de proteínas por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS, matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) se realizó en la CECT siguiendo el protocolo de extracción con etanol/ácido fórmico recomendado por Bruker Daltonics (<http://www.bdal.de>). MALDI-TOF MS se llevó a cabo usando un espectrómetro de masas Reflex IV (Bruker Daltonics) equipado con un láser de N₂. Todos los espectros fueron obtenidos en modo ion lineal positivo. El voltaje de aceleración fue 20 kV. Los espectros se obtuvieron como la suma de 240 disparos por diana, 2x8 spots por cepa. El rango de masa utilizado para el análisis fue de 2.000-20.000 Da. El programa utilizado para el procesamiento de datos fue el BioTyper 1.1 (Bruker Daltonics) tal y como se describe en Maier y col. (2006).

3. Caracterización genotípica

3_1 Extracción de DNA

El DNA se extrajo a partir de células cultivadas en MA a 26 °C, con un sistema de extracción por columnas *Ultraclean DNA Isolation Kit* (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante.

En el caso de que el DNA fuese para secuenciación masiva (*shotgun*), la extracción de DNA se llevó a cabo a partir de células cultivadas en MA a 26 °C, con un sistema de extracción fisicoquímica *Real Pure Spin Kit* (Durviz S.L. Parque Tecnológico de Valencia, Paterna, España) siguiendo las indicaciones del fabricante. Además, se examinó la pureza del DNA extraído mediante espectrofotometría comprobando que presentaran un ratio A_{260}/A_{280} superior a 1,7-1,8 y una concentración de DNA superior a 500 ng/μl.

3_2 Determinación del contenido en Guanina y Citosina (G+C) del DNA

El análisis del contenido de G+C genómico se realizó mediante HPLC en el Servicio de Identificación de la DSMZ siguiendo la metodología descrita por Tamaoka & Komagata (1984) y Mesbah y col. (1989), usando DNA extraído y liofilizado en la CECT.

El contenido de G+C genómico es un dato fácilmente alcanzable y con mayor precisión si la cepa ha sido sometida a secuenciación masiva aun tratándose de una cobertura parcial del genoma. Por ello este dato se proporciona para todas las cepas que han sido objeto de secuenciación genómica al azar como se explica en el apartado 6 (Comparación de los genomas parciales).

3_3 Secuenciación del gen 16S rRNA

Los cebadores utilizados para amplificar el fragmento de unas 1000 pb del gen ribosómico 16S fueron 616V y 699R. Las posiciones de unión de estos cebadores son 8-25 y 1099-1113, respectivamente (numeración de *Escherichia coli*).

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Genius (Techne, Burlington, NJ, USA) y el cóctel de amplificación utilizado (50 μl) estaba compuesto por 1 μl (50 pmol/μl) de cada uno de los cebadores directo y reverso; 0,5 μl (2 U/μl) de Taq DNA polimerasa (DFS-Taq DNA polymerase, BIORON, Germany), 5 μl del tampón de

reacción de PCR 10x; 0,75 µl de MgCl₂ 100 mM, 1 µl de dNTP 10 mM (Roche, Basel, Switzerland), 35,75 µl de agua estéril filtrada (Milli-Q, Millipore, USA) y 5 µl (50 ng/µl) de DNA. Se utilizaron las condiciones de la reacción de PCR descritas por Arahal y col. (2008).

La amplificación de los fragmentos se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón 0,5x TBE durante 25 minutos a 135 V. La visualización de las bandas se hizo mediante tinción con bromuro de etidio e iluminación con luz UV.

Para completar el gen 16S rRNA hasta aproximadamente unas 1450 pb, se amplificó un fragmento de unos 650 pb en el extremo 3'. Para ello se siguieron los mismos pasos y se utilizaron las mismas condiciones que las utilizadas para el extremo 5', anteriormente descritas. Los cebadores en este caso fueron P609D y P1525R (Lucena y col., 2010), cuyas posiciones de unión son 785-802 y 1525-1541, respectivamente (numeración de *E. coli*).

Los productos de amplificación fueron purificados mediante el sistema *Ultraclean PCR Clean-up Kit* (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, USA) y resuspendidos en 50 µl Tris HCl 10 mM pH 7,5.

La secuenciación de los amplicones se llevó a cabo utilizando el secuenciador automático ABI PRISM 3730 y los reactivos ABI PRISM *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready* (Applied Biosystems, Foster City, CA; USA) en el Servicio de Secuenciación de ADN y Análisis Molecular del SCSIE de la Universidad de Valencia, empleando los mismos cebadores que en la reacción de amplificación pero diluidos diez veces (5 pmol/µl).

Análisis de las secuencias corregidas

Las secuencias parciales corregidas se compararon mediante las herramientas en línea, que se muestran en la tabla siguiente, frente a sus respectivas bases de datos, con el fin de buscar las secuencias más próximas y situarlas en un contexto filogenético que permitiera orientar el trabajo posterior.

Tabla 6. Relación de los programas utilizados en la comparación de las secuencias con las bases de datos públicas.

Herramienta	Dirección web	Referencia
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Zhang y col., 2000
LeBiBi	http://pbi.univ-lyon1.fr/bibi	Devulder y col., 2003
EzTaxon	http://147.47.212.35:8080/	Chun y col., 2007

Se seleccionaron aquellas cepas con porcentajes de semejanza de secuencia inferiores al 98% respecto a las cepas tipo de especies descritas. Este es un límite más conservador que el propuesto por Stackebrandt y Ebers (2006) para diferenciar especies procariontas (98,7-99%) pero lo encontramos conveniente teniendo en cuenta que los fragmentos secuenciados en esta etapa del trabajo suponían aproximadamente dos tercios de la longitud total del gen 16S r RNA. Tras la selección, las cepas se ordenaron de menor a mayor similitud de secuencia, respecto a la especie más cercana, correspondiendo con un interés taxonómico creciente.

Una vez realizado el cribado de los aislados iniciales, se procedió a completar las secuencias, amplificando y secuenciando el extremo 3'.

Las nuevas secuencias fueron corregidas y ensambladas junto a las obtenidas previamente para el extremo 5', dando una longitud total entre 1450 y 1500 nucleótidos, tras lo cual fueron comparadas nuevamente con las secuencias públicas de la base de datos EMBL usando el programa BLAST (Nacional Center for Biotechnology Information; <http://ncbi.nlm.nih.gov/>) y el programa EzTaxon (<http://147.47.212.35:8080/>). Cuando fue necesario se reasignaron las prioridades entre las cepas teniendo en cuenta los datos de semejanza de las secuencias completas.

3_4 Secuenciación de otros genes esenciales

Además del gen 16S rRNA, se han estudiado algunos de los denominados genes *housekeeping* como la subunidad beta de la DNA girasa (*gyrB*), la recombinasa A (*recA*), o la uridilato quinasa (*pyrH*). Los cebadores utilizados para la amplificación así como las características más relevantes de los amplicones obtenidos se muestran en la Tabla 7.

En todos los casos el cóctel de reacción se realizó en un volumen final de 50 µl, y estaba compuesto por 5 µl de tampón de PCR 10x, 1 µl de dNTP 10 mM (Roche, Basel, Switzerland), 35,75 µl de agua estéril filtrada (Milli-Q, Millipore, Billerica, MA, USA), 0,75 µl de MgCl₂ (100 mM), 1 µl de cada cebador, directo y reverso (50 pM), 0,5 µl de Taq polimerasa (2 U/µl) (DFS-Taq DNA polymerase, BIORON, Germany) y 5 µl de DNA (50 ng/µl). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Genius (Techne, Burlington, NJ, USA). El proceso de amplificación consistió en (i) 5 min a 95 °C; (ii) 3 ciclos de 1 min a 95 °C, 2 min 15 s a 55 °C y 1 min 15 s a 72 °C; (iii) 30 ciclos

de 95 °C durante 35 s, 1 min 15 s a 55 °C y 1 min 15 s a 72 °C; (iv) y una extensión final de 7 min a 72 °C.

Tabla 7: Genes y cebadores utilizados en el estudio de MLSA.

Gen	Cebadores	Secuencia de los cebadores (5' → 3')
<i>recA</i>	recA-01-F recA-02-R	TGARAARCARTTYGGTAAAGG TCRCCNTRTAGCTRACC
<i>pyrH</i>	pyrH-04-F pyrH-02-R	ATGASNACBAAYCCWAAACC GTRAABGCNGMYARRTCCA
<i>gyrB</i>	up1E up2AR	GTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYRA GGTACGGATGTGCGAGCCRTCACRATCNGCRCTCNGYCAT
16S rRNA	616 V 699 R P609 D P1525 R	AGAGTTTGATYMTGGCTCA AGGGTTGCGCTCGTTGC GGMTTAGATACCCBDGTA WAGGAGGTRATCCADCC

En todos los casos el cóctel de reacción se realizó en un volumen final de 50 µl, y estaba compuesto por 5 µl de tampón de PCR 10x, 1 µl de dNTP (10 mM), 0,75 µl de MgCl₂ (100 mM), 1 µl de cada cebador, directo y reverso (50 pM), 0,5 µl de Taq polimerasa (5 U/µl) (Genotag), 35,75 µl de H₂O estéril y 5 µl de DNA (50 ng/µl). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Genius (Techne, Burlington, NJ, USA). El proceso de amplificación consistió en (i) 5 min a 95 °C; (ii) 3 ciclos de 1 min a 95 °C, 2 min 15 s a 55 °C y 1 min 15 s a 72 °C; (iii) 30 ciclos de 95 °C durante 35 s, 1 min 15 s a 55 °C y 1 min 15 s a 72 °C; (iv) y una extensión final de 7 min a 72 °C.

Los amplicones se examinaron en un gel de agarosa (1,0% (p/v) en TBE) y se tiñeron en bromuro de etidio para su visualización con UV. Posteriormente, los productos de amplificación se purificaron con el *Ultraclean PCR Clean-up Kit* (Mo Bio Laboratories), y se secuenciaron utilizando el secuenciador automático ABI PRISM 3730 y los reactivos ABI PRISM *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready* (Applied Biosystems, Foster City, CA; USA) en el Servicio de Secuenciación de ADN y Análisis Molecular del SCSIE de la Universidad de Valencia. Los cebadores utilizados para la secuenciación fueron los mismos que los utilizados en la reacción de amplificación pero diluidos 10 veces (5 pmol).

4. Análisis de secuencias

Para el análisis filogenético propiamente dicho, se utilizó el paquete informático ARB (Ludwig y col., 2004) (<http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de>) y la base de datos SILVA (versiones 100-106, <http://www.arb-silva.de>). El alineamiento de las secuencias obtenidas en este trabajo se hizo automáticamente con la opción PT_server y luego manualmente con el editor de secuencias ARB_EDIT, apoyado por los alineamientos de las secuencias cercanas en la propia base de datos y la información de las estructuras secundarias.

El alineamiento múltiple de las secuencias se realizó usando el paquete informático ARB, teniendo en cuenta el correspondiente alineamiento de aminoácidos en los genes que codifican proteínas. Los alineamientos de las secuencias nucleotídicas se revisaron automáticamente con la opción PT_server y luego manualmente con el editor de secuencias ARB_EDIT. Puesto que las secuencias de los genes codificantes de proteínas presentan diferente pauta de lectura, se alinearon cada uno de los genes de manera individual, concatenando posteriormente las secuencias.

Para la reconstrucción de árboles filogenéticos se emplearon los tres métodos mencionados anteriormente (Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud y Neighbor-Joining) así como filtros posicionales y métodos de remuestreo, todos ellos disponibles en ARB.

5. Secuenciación genómica

La secuenciación *shotgun* de los DNA genómicos bacterianos se realizó en dos lugares diferentes y con plataformas distintas. En una primera aproximación se utilizaron los servicios de Life Sequencing S.L. (Parc Científic Universidad de València, edif. 2, Paterna, Valencia), donde se llevó a cabo la secuenciación del DNA genómico de doce cepas mediante la técnica de la pirosecuenciación con el equipo GS-FLX Titanium de 454 Life Sciences/Roche, previa fragmentación de las muestras por nebulización con nitrógeno y titulación de las librerías.

Los dos siguientes ensayos se realizaron en el Servicio de Secuenciación de ADN y Análisis Molecular del SCSIE de la Universidad de Valencia. Para elaborar la librerías se empleó 600 ng de DNA genómico y se fragmentó con el COVARIS según el protocolo Frag_DNA_400. La distribución de tamaños fragmentados se verificó

mediante el Bioanalizador de Agilent (rango 550-700 pb). Se obtuvieron las librerías siguiendo el protocolo *Rapid Library* de Roche, añadiendo adaptadores específicos (códigos de barras) para cada muestra. Las librerías se cuantificaron para obtener una mezcla equimolar de las mismas. Se partió de 10 μ l de una mezcla de 10^{-6} moléculas/ μ l y se realizó una única PCR en emulsión de las librerías conjuntamente. Tanto la PCR en emulsión como el enriquecimiento de la misma se llevó a cabo según el sistema GS-Junior de Roche.

Los datos de cada una de las carreras fueron objeto de control de calidad automatizado y posterior ensamblado con el programa GS De Novo Assembler 2.6. Además, con aquellas cepas que entraron en dos o tres carreras con el fin de incrementar el total de lecturas, se realizó también el ensamblado conjunto de todas las lecturas primarias. De este modo, los ficheros más importantes para el trabajo posterior fueron los de ensamblado (ficheros AllContigs), aunque también se manejaron los de ensamblados de gran tamaño (LargeContigs), lecturas únicas sin ensamblar (Singles) y lecturas totales (AllReads).

6. Comparación de los genomas parciales

Para el procesado de los datos obtenidos se ha utilizado el software JSpecies (<http://www.imedeia.uib.es/jspecies/index.html>) que es una herramienta para medir la probabilidad de que dos genomas pertenezcan o no a la misma especie. El programa permite analizar y comparar genomas calculando los parámetros ANI y TETRA. El parámetro ANI se puede calcular basándose en el algoritmo BLAST (ANiB) o basándose en el algoritmo MUMer (ANIm). MUMmer (<http://mummer.sourceforge.net/manual/>) es un paquete informático que permite alinear de forma rápida secuencias muy grandes de DNA o de aminoácidos sin ser manipuladas. En ambos casos el valor umbral para considerar que dos organismos pertenecen a la misma especie es una identidad >95%. Por último el parámetro TETRA (<http://www.megx.net/tetra>) permite calcular cómo se correlaciona el patrón de tetranucleótidos en las secuencias de DNA comparadas.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

1. Identificación presuntiva de los aislados

Inicialmente, se realizó una secuenciación parcial del gen 16S rRNA (616V-699R) de las cepas para determinar su posición filogenética y obtener una identificación presuntiva. Las secuencias obtenidas se compararon con las disponibles en las bases de datos públicas (EMBL, GenBank y DDBJ) con la ayuda del programa Blast del servidor del NCBI y de las aplicaciones LeBIBI y EzTaxon Server (Tabla 6).

1.1. Cepas de agua de mar de la playa de la Malvarrosa

La distribución de las cepas procedentes de este muestreo puntual, que se procesó en diversos medios y condiciones de cultivo, figura en la Tabla 2. En esta tabla se observan las diferencias en la abundancia de aislados obtenidos entre los medios y las condiciones de cultivo utilizados. El factor de dilución de los nutrientes así como la temperatura de incubación (medios diluidos y 15 °C) dio lugar a un menor número de aislados totales que en el caso de utilizar medios no diluidos y temperaturas más altas. El medio MA incubado a 26 °C es el medio del que mayor número de aislados se obtuvieron, seguido de R2A marino incubado a 26 °C.

Aunque originalmente se obtuvieron 194 aislados, en adelante se consideran 178 dado que el resto de aislados se perdieron durante el procesamiento. La identificación presuntiva de los 178 aislados se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8: Clasificación taxonómica preliminar de las cepas de la campaña de 2008, según la comparación de las secuencias parciales del gen 16S rRNA. Los nombres de las cepas hacen referencia al medio de aislamiento: M, MA; R, R2A marino; MD, MA diluido; RD, R2A marino diluido, 15 \emptyset , 15 ^\circ C oscuridad.

Cepa	Cepa tipo más próxima		Semejanza (%)
M1	<i>Vibrio nigripulchritudo</i>	ATCC 27043 ¹	99,7
M2	<i>Ruegeria atlantica</i>	IAM 14463 ¹	99,5
M4	<i>Bacillus algicola</i>	KMM 3737 ¹	99,8
M5	<i>Idiomarina homiensis</i>	DSM 17923 ¹	98,6
M6	<i>Vibrio hepatarius</i>	LMG 20362 ¹	98,3
M8	<i>Vibrio shilonii</i> *	AK1 ¹	99,0
M9	<i>Vibrio shilonii</i> *	AK1 ¹	99,3
M10	<i>Pseudoalteromonas phenolica</i>	O-BC30 ¹	97,5
M11	<i>Vibrio mediterranei</i>	CIP 103203 ¹	99,8
M12	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	DSM 13468 ¹	99,5
M13	<i>Vibrio shilonii</i> *	AK1 ¹	99,3
M14	<i>Labrenzia alexandrii</i>	DFL-11 ¹	99,5
M15	<i>Ruegeria atlántica</i>	IAM 14463 ¹	99,8
M16	<i>Thalassomonas ganghwensis</i>	JC2041 ¹	97,5
M17	<i>Thalassobius mediterraneus</i>	XSM19 ¹	96,0
M18	<i>Vibrio shilonii</i> *	AK1 ¹	99,8
M19	<i>Ruegeria atlántica</i>	IAM 14463 ¹	99,6
M20	<i>Vibrio shilonii</i> *	AK1 ¹	99,3
M22	<i>Vibrio agarivorans</i>	CECT 5085 ¹	96,4
M23	<i>Ruegeria atlantica</i>	IAM 14463 ¹	99,7
M26	<i>Bacillus humi</i>	LMG 22167 ¹	96,7
M28	<i>Vibrio harveyi</i>	ATCC 14126 ¹	99,6
M29	<i>Thalassobius gelatinovorans</i>	IAM 12617 ¹	97,7
M30	<i>Cytophaga fermentans</i>	ATCC 19072 ¹	89,8
M31	<i>Brevundimonas diminuta</i>	ATCC 11568 ¹	98,5
M32	<i>Ruegeria atlantica</i>	IAM 14463 ¹	98,5
M33	<i>Brevundimonas diminuta</i>	ATCC 11568 ¹	98,3
M34	<i>Vibrio rotiferianus</i>	LMG 21460 ¹	98,8
M35	<i>Photobacterium damsela</i>	ATCC 33539 ¹	100
M36	<i>Vibrio shilonii</i> *	AK1 ¹	99,8
M37	<i>Pseudomonas indoloxydans</i>	IPL-1 ¹	99,2
M38	<i>Photobacterium damsela</i>	ATCC 33539 ¹	99,6
M39	<i>Ruegeria atlantica</i>	IAM 14463 ¹	99,8
M40	<i>Enterovibrio norvegicus</i>	LMG 19839 ¹	97,8
M41	<i>Ruegeria atlantica</i>	IAM 14463 ¹	99,8
M42	<i>Bacillus mojavensis</i>	IFO 15718 ¹	100
M43	<i>Ruegeria atlantica</i>	IAM 14463 ¹	99,7
M44	<i>Vibrio campbellii</i>	ATCC 25920 ¹	99,9
M46	<i>Photobacterium halotolerans</i>	MACL01 ¹	97,3
M47	<i>Vibrio harveyi</i>	ATCC 14126 ¹	99,6
M48	<i>Vibrio hepatarius</i>	LMG 20362 ¹	99,5
M49	<i>Phaeobacter inhibens</i>	T5 ¹	96,3
M51	<i>Photobacterium lutimaris</i>	DF-42 ¹	98,2
M52	<i>Vibrio rotiferianus</i>	LMG 21460 ¹	99,7
M53	<i>Vibrio hepatarius</i>	LMG 20362 ¹	98,9

Cepa	Cepa tipo más próxima		Semejanza (%)
M54	<i>Vibrio comitans</i>	GHG21 ^T	99,9
M55	<i>Vibrio comitans</i>	GHG21 ^T	100
M56	<i>Sporosarcina macmurdoensis</i>	CMS 21w ^T	98,1
M57	<i>Photobacterium lutimaris</i>	DF-42 ^T	99,1
M58	<i>Bacillus firmus</i>	NCIMB 9366 ¹	98,1
M59	<i>Vibrio campbellii</i>	ATCC 25920 ^T	100
M60	<i>Vibrio comitans</i>	GHG21 ^T	99,9
M61	<i>Vibrio agarivorans</i>	CECT 5085 ¹	96,8
M62	<i>Vibrio brasiliensis</i>	LMG 20546 ^T	97,3
M63	<i>Vibrio harveyi</i>	ATCC 14126 ^T	99,9
M64	<i>Vibrio tubiashii</i>	ATCC 19109 ^T	99,6
M67	<i>Photobacterium lutimaris</i>	DF-42 ^T	99,0
M68	<i>Pseudomonas xanthomarina</i>	KMM 1447 ¹	99,0
M69	<i>Shimia marina</i>	CL-TA03 ¹	97,9
M70	<i>Vibrio hepatarius</i>	LMG 20362 ¹	99,4
M71	<i>Ruegeria atlantica</i>	IAM 14463 ^T	99,5
M72	<i>Vibrio comitans</i>	GHG21 ^T	99,9
M73	<i>Vibrio campbellii</i>	ATCC 25920 ^T	100
M74	<i>Vibrio harveyi</i>	ATCC 14126 ^T	99,9
M75	<i>Vibrio mediterranei</i>	CIP 103203 ^T	99,8
M76	<i>Thalassobius mediterraneus</i>	XSM19 ^T	96,5
M82	<i>Microbulbifer thermotolerans</i>	JAMB A94 ¹	96,9
M84	<i>Erythrobacter aquimaris</i>	SW-110 ^T	99,5
M85	<i>Erythrobacter aquimaris</i>	SW-110 ^T	99,5
M86	<i>Pseudoalteromonas spongiae</i>	UST010723-006 ^T	99,9
M15Ø_1	<i>Vibrio harveyi</i>	ATCC 14126 ^T	99,7
M15Ø_2	<i>Pseudoalteromonas phenolica</i>	O-BC30 ^T	99,6
M15Ø_3	<i>Ruegeria pomeroyi</i>	DSS-3 ¹	95,9
M15Ø_4	<i>Shimia marina</i>	CL-TA03 ¹	98,8
M15Ø_5	<i>Vibrio rotiferianus</i>	LMG 21460 ¹	98,7
M15Ø_6	<i>Vibrio ponticus</i>	CECT 5869 ¹	98,5
M15Ø_8	<i>Ruegeria atlantica</i>	IAM 14463 ¹	99,1
M15Ø_9	<i>Vibrio neptunius</i>	LMG 20536 ^T	97,6
M15Ø_10	<i>Ruegeria atlantica</i>	IAM 14463 ^T	99,0
M15Ø_11	<i>Marinomonas communis</i>	LMG 2864 ^T	99,2
M15Ø_12	<i>Vibrio rotiferianus</i>	LMG 21460 ^T	99,8
M15Ø_13	<i>Ruegeria atlantica</i>	IAM 14463 ¹	99,3
M15Ø_16	<i>Vibrio breoganii</i>	LMG 23858 ¹	99,8
M15Ø_17	<i>Vibrio agarivorans</i>	CECT 5085 ^T	99,7
M15Ø_18	<i>Vibrio diabolicus</i>	HE800 ^T	97,1
M15Ø_19	<i>Bacillus lentus</i>	IAM 12466 ^T	98,5
M15Ø_20	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	LMG 20984 ^T	97,4
M15Ø_21	<i>Vibrio campbellii</i>	ATCC 25920 ^T	100
M15Ø_22	<i>Vibrio rotiferianus</i>	LMG 21460 ^T	99,7
M15Ø_23	<i>Amphritea balenae</i>	JAMM 1525 ¹	97,3
M15Ø_24	<i>Vibrio ponticus</i>	CECT 5869 ¹	100
M15Ø_26	<i>Vibrio comitans</i>	GHG21 ^T	99,7
M15Ø_27	<i>Vibrio rotiferianus</i>	LMG 21460 ^T	100
M15Ø_28	<i>Marinobacter litoralis</i>	SW-45 ^T	98,8
M15Ø_31	<i>Vibrio mediterranei</i>	CIP 103203 ^T	99,7
M15Ø_33	<i>Halomonas indalinina</i>	CG2.1 ¹	98,9
M15Ø_34	<i>Ruegeria atlantica</i>	IAM 14463 ^T	99,6

Cepa	Cepa tipo más próxima		Semejanza (%)
MD1	<i>Vibrio fluvialis</i>	ATCC 35843 ^T	97,8
MD2	<i>Janibacter terrae</i>	CS12 ^T	98,6
MD3	<i>Photobacterium lutimaris</i>	DF-42 ^T	97,9
MD5	<i>Tropicibacter naphthalenivorans</i>	C02 ^T	97,1
MD6	<i>Ruegeria pomeroyi</i>	DSS-3 ^I	96,7
MD7	<i>Vibrio campbellii</i>	ATCC 25920 ^I	99,0
MD9	<i>Vibrio harveyi</i>	ATCC 14126 ^T	99,7
MD10	<i>Shimia marina</i>	CL-TA03 ^T	98,4
MD12	<i>Vibrio brasiliensis</i>	LMG 20546 ^T	98,9
MD13	<i>Vibrio mediterranei</i>	CIP 103203 ^T	99,5
MD15	<i>Photobacterium lutimaris</i>	DF-42 ^T	97,8
MD16	<i>Vibrio mediterranei</i>	CIP 103203 ^T	99,0
MD18	<i>Enterobacter ludwigii</i>	DSM 16688 ^I	99,3
MD19	<i>Vibrio mediterranei</i>	CIP 103203 ^I	98,9
R1	<i>Vibrio rotiferianus</i>	LMG 21460 ^I	99,9
R2	<i>Vibrio rotiferianus</i>	LMG 21460 ^T	99,7
R3	<i>Vibrio harveyi</i>	ATCC 14126 ^T	99,8
R4	<i>Janibacter terrae</i>	CS12 ^T	98,6
R6	<i>Vibrio tubiashii</i>	ATCC 19109 ^I	98,4
R7	<i>Vibrio brasiliensis</i>	LMG 20546 ^I	99,8
R8	<i>Kocuria rizophila</i>	DSM 11926 ^I	99,9
R9	<i>Pseudoalteromonas rubra</i>	ATCC 29570 ^I	97,9
R10	<i>Vibrio harveyi</i>	ATCC 14126 ^I	99,9
R11	<i>Vibrio harveyi</i>	ATCC 14126 ^T	99,8
R12	<i>Vibrio harveyi</i>	ATCC 14126 ^T	99,7
R13	<i>Vibrio rotiferianus</i>	LMG 21460 ^T	100
R14	<i>Vibrio harveyi</i>	ATCC 14126 ^T	99,8
R15	<i>Enterovibrio norvegicus</i>	LMG 19839 ^T	97,7
R16	<i>Pseudoalteromonas phenolica</i>	F12-50-A1 ^I	97,8
R17	<i>Vibrio mediterranei</i>	CIP 103203 ^T	99,8
R18	<i>Aestuariibacter halophilus</i>	JC2043 ^T	95,9
R19	<i>Vibrio tubiashii</i>	ATCC 19109 ^T	99,6
R20	<i>Vibrio brasiliensis</i>	LMG 20546 ^T	99,1
R21	<i>Aestuariibacter halophilus</i>	JC2043 ^T	94,8
R22	<i>Pseudidiomarina marina</i>	PIM1 ^T	98,4
R23	<i>Vibrio tubiashii</i>	ATCC 19109 ^I	99,2
R24	<i>Aestuariibacter halophilus</i>	JC2043 ^T	95,6
R25	<i>Aestuariibacter halophilus</i>	JC2043 ^T	95,7
R26	<i>Phaeobacter arcticus</i>	20188 ^T	98,8
R27	<i>Vibrio rotiferianus</i>	LMG 21460 ^T	98,8
R29	<i>Vibrio shilonii*</i>	AK1 ^T	99,8
R30	<i>Aestuariibacter halophilus</i>	JC2043 ^T	95,9
R31	<i>Pannonibacter phragmitetus</i>	C6/19 ^I	99,5
R32	<i>Vibrio rotiferianus</i>	LMG 21460 ^I	98,8
R33	<i>Vibrio rotiferianus</i>	LMG 21460 ^I	97,8
R35	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	LMG 20984 ^I	99,5
R36	<i>Labrenzia alexandrii</i>	DFL-11 ^T	97,1
R37	<i>Thalassobius mediterraneus</i>	XSM19 ^T	97,7
R39	<i>Demequina aestuarii</i>	JC2054 ^T	99,0
R40	<i>Sphingopyxis flavimaris</i>	SW-151 ^T	99,5
R42	<i>Vibrio campbellii</i>	ATCC 25920 ^T	100
R46	<i>Thalassobius aestuarii</i>	JC2049 ^T	96,3

Cepa	Cepa tipo más próxima		Semejanza (%)
R47	<i>Phaeobacter inhibens</i>	T5 ^T	97,3
RD2	<i>Shimia marina</i>	CL-TA03 ^T	96,3
RD6	<i>Vibrio campbellii</i>	ATCC 25920 ^T	100
RD7	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580 ^T	98,3
RD9	<i>Isoptericola halotolerans</i>	YIM 70177 ^T	98,7
RD10	<i>Marinomonas communis</i>	LMG 2864 ^T	98,3
RD12	<i>Vibrio campbellii</i>	ATCC 25920 ^T	98,9
RD13	<i>Ruegeria atlantica</i>	IAM 14463 ^T	99,8
RD14	<i>Ruegeria pomeroyi</i>	DSS-3 ^T	96,0
RD15	<i>Vibrio harveyi</i>	ATCC 14126 ^T	99,8
RD16	<i>Vibrio harveyi</i>	ATCC 14126 ^T	99,9
RD17	<i>Vibrio brasiliensis</i>	LMG 20546 ^T	99,9
RD18	<i>Vibrio rotiferianus</i>	LMG 21460 ^T	99,9
R15Ø_1	<i>Vibrio harveyi</i>	LMG 4404 ^T	100
R15Ø_2	<i>Photobacterium damsela</i>	ATCC 33539 ^T	100
R15Ø_3	<i>Marinobacter litoralis</i>	SW-45 ^T	99,8
R15Ø_5	<i>Vibrio harveyi</i>	LMG 4404 ^T	100
R15Ø_6	<i>Vibrio rotiferianus</i>	LMG 21460 ^T	99,7
R15Ø_7	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i>	F423 ^T	99,5
R15Ø_8	<i>Vibrio rotiferianus</i>	LMG 21460 ^T	98,8
R15Ø_9	<i>Bacillus gibsonii</i>	DSM 8722 ^T	99,7
R15Ø_10	<i>Vibrio rotiferianus</i>	LMG 21460 ^T	99,7
R15Ø_11	<i>Vibrio fluvialis</i>	ATCC 35843 ^T	97,7
R15Ø_12	<i>Vibrio areninigræ</i>	J74 ^T	100
R15Ø_13	<i>Vibrio mediterranei</i>	CIP 103203 ^T	99,7
R15Ø_14	<i>Vibrio harveyi</i>	LMG 4404 ^T	99,8
R15Ø_16	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	DSM 8801 ^T	99,9
R15Ø_17	<i>Vibrio mediterranei</i>	CIP 103203 ^T	99,7
R15Ø_18	<i>Photobacterium leiognathi</i>	ATCC 25521 ^T	99,1

**Vibrio mediterranei* (Thompson y col., 2001)

La diversidad taxonómica detectada siguió la misma tendencia que la observada para la abundancia, así, según se puede observar en la Tabla 9, se detectaron 18 géneros diferentes en MA, 13 géneros en R2A marino, 9 géneros en MA a 15 °C, 7 en R2A 15 °C y los que menor número de géneros presentaron, con 8 y 6 géneros respectivamente, fueron MA diluido 1/100 y R2A diluido 1/50.

Es importante señalar que 12 de los géneros aislados sólo estaban presentes en MA: *Amphritea*, *Brevundimonas*, *Cytophaga*, *Enterobacter*, *Halomonas*, *Idiomarina*, *Microbacterium*, *Microbulbifer*, *Pseudomonas*, *Sporosarcina*, *Thalassomonas* y *Tropicibacter*. De la misma manera 9 géneros: *Aestuariibacter*, *Brevibacterium*, *Demequina*, *Isoptricola*, *Kocuria*, *Pannonibacter*, *Pseudoidiomarina*, *Pseudovibrio* y *Sphingopyxis*, sólo se han aislado del R2A marino. En MA diluido se han aislado miembros de 8 géneros, 3 de ellos no se han aislado en MA: *Enterobacter*, *Janibacter* y *Tropicibacter*. Además, *Enterobacter* y *Tropicibacter* no se han aislado en ningún otro medio utilizado en el estudio.

Cabe destacar el género *Vibrio* que con 88 aislados, casi la mitad del total (49%), fue el único presente en todos los medios ensayados siendo el más abundante y el que mayor número de especies presentó (Tabla 9).

Independientemente de las condiciones de cultivo, las 178 cepas pertenecen a 35 géneros distintos agrupados en 4 filos (Tabla 9).

Proteobacteria es el filo más abundante en cuanto a número de cepas aisladas, 162 de los 178 aislados. Además, es el que presenta mayor diversidad ya que 26 de los 35 géneros y 53 de las 68 especies que hay en total. Dentro de *Proteobacteria* sólo se encuentran representantes de dos de las cinco clases que lo forman: *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*. A ésta última pertenecen 122 de los 178 aislados totales del muestreo, en parte debido a que engloba a la familia *Vibrionaceae*. Como ya se había dicho el género mayoritario es *Vibrio* (88 aislados), seguido de *Ruegeria* (17), y *Photobacterium* (10). Le siguen, *Bacillus* (7), *Aestuariibacter*, *Pseudoalteromonas* y *Thalassobius* (5), *Shimia* (4) y *Phaeobacter* (3).

Tabla 9: Distribución de las 178 cepas procesadas en la identificación presuntiva por afiliación taxonómica (filo, clase y género), indicando además las condiciones de cultivo.

Afiliación taxonómica	MA 26 °C	MD 26 °C	MA 15 °C	R2A 26 °C	RD 26 °C	R2A 15 °C	Total
Proteobacteria	63	13	26	36	10	14	162
Alphaproteobacteria	20	3	6	7	3	1	40
<i>Brevundimonas</i>	2						2
<i>Erythrobacter</i>	2						2
<i>Labrenzia</i>	1			1			2
<i>Pannonibacter</i>				1			1
<i>Phaeobacter</i>	1			2			3
<i>Pseudovibrio</i>	1					1	2
<i>Ruegeria</i>	9	1	5		2		17
<i>Shimia</i>	1	1	1		1		4
<i>Sphingopyxis</i>				1			1
<i>Thalassobius</i>	3			2			5
<i>Tropicibacter</i>		1					1
Gammaproteobacteria	43	10	20	29	7	13	122
<i>Aestuariibacter</i>				5			5
<i>Marinobacter</i>			1			1	2
<i>Microbulbifer</i>	1						1
<i>Thalassomonas</i>	1						1
<i>Enterobacter</i>		1					1
<i>Halomonas</i>			1				1
<i>Idiomarina</i>	1						1
<i>Pseudoidiomarina</i>				1			1
<i>Amphritea</i>			1				1
<i>Marinomonas</i>			1		1		2
<i>Pseudoalteromona</i>	2		1	2			5
<i>Pseudomonas</i>	2						2
<i>Enterovibrio</i>				1			1
<i>Photobacterium</i>	6	2				2	10
<i>Vibrio</i>	30	7	15	20	6	10	88
Bacteroidetes	1	-	-	-	-	-	1
<i>Cytophaga</i>	1						1
Actinobacteria	1	1	-	3	1	1	7
<i>Brevibacterium</i>						1	1
<i>Demequina</i>				1			1
<i>Janibacter</i>		1		1			2
<i>Microbacterium</i>	1						1
<i>Kocuria</i>				1			1
<i>Isoptericola</i>					1		1
Firmicutes	5	-	1	-	1	1	8
<i>Bacillus</i>	4		1		1	1	7
<i>Sporosarcina</i>	1						1
Total cepas	70	14	27	39	12	16	178

1.2. Cepas de agua de mar y de ostra de la costa de Vinaroz.

A las cepas obtenidas en el muestreo de agua de mar de la playa de la Malvarrosa se han añadido una serie de aislados cuya identificación taxonómica estaba pendiente (Tabla 3).

Dichas cepas fueron sometidas a la misma identificación presuntiva (secuencia parcial del gen 16S rRNA con los cebadores 616V/699R) cuyos resultados de los porcentajes de semejanza de secuencia parcial del gen 16S rRNA obtenidos se muestran en la Tabla 10. Estos valores están comprendidos entre el 90 y el 100% de similitud.

Tabla 10: Clasificación taxonómica de los 48 aislados de la campaña de 1989-1990 en función de la similitud de secuencia parcial del gen 16S rRNA.

Cepa	Cepa tipo más próxima		Semejanza (%)
1SM8	<i>Psychrobacter celer</i>	SW238 ^T	99,8
1SM10	<i>Micrococcus luteus</i>	DSM 20030 ^T	100
2OM6	<i>Phaeobacter inhibens</i>	T5 ^T	97,3
2OM14	<i>Ruegeria atlantica</i>	NBRC 15792 ^T	99,9
2SM14	<i>Erythrobacter flavus</i>	SW-46 ^T	99,1
2SM15	<i>Arthrobacter oryzae</i>	KV-651 ^T	98,5
2SM19	<i>Winogradskyella thalassocola</i>	KMM 3907 ^T	96,8
2SM21	<i>Erythrobacter citreus</i>	RE35F/1 ^T	98,7
2SM25	<i>Labrenzia alba</i>	CECT 5094 ^T	98,9
2SM5	<i>Pseudomonas pertucinogena</i>	IFO 14163 ^T	96,8
2SM6	<i>Pseudomonas pertucinogena</i>	IFO 14163 ^T	97,3
2SM9	<i>Ruegeria atlantica</i>	NBRC 15792 ^T	99,7
3SM5	<i>Joostella marina</i>	En5 ^T	99,7
3SM6	<i>Mesonion algae</i>	KMM 3909 ^T	99,7
3SM9	<i>Joostella marina</i>	En5 ^T	99,9
3SM13	<i>Joostella marina</i>	En5 ^T	99,6
3SM14	<i>Psychrobacter nivimaris</i>	88/2-7 ^T	99,9
3SM17	<i>Marinobacter vinifirmus</i>	FB1 ^T	99,7
3SM19	<i>Joostella marina</i>	En5 ^T	99,8
3SM20	<i>Joostella marina</i>	En5 ^T	99,8
3SM24	<i>Joostella marina</i>	En5 ^T	99,9
3SM25	<i>Marinobacter vinifirmus</i>	FB1 ^T	99,9
3SM29	<i>Joostella marina</i>	En5 ^T	99,4
4OM3	<i>Kytococcus sedentarius</i>	DSM 20547 ^T	99,6
4SM2	<i>Erythrobacter citreus</i>	RE35F/1 ^T	98,7
4SM4	<i>Erythrobacter citreus</i>	RE35F/1 ^T	99,2
4SM10	<i>Roseovarius nubinhibens</i>	DSM 15170 ^T	96,6
5OM2	<i>Bacillus anthracis</i>	ATCC 14578 ^T	99,5
5OM8	<i>Labrenzia alba</i>	CECT 5094 ^T	99,8
5SM4	<i>Bacillus cereus</i>	CCM 2010 ^T	97,8

Tabla 10: (Continuación)

Cepa	Cepa tipo más próxima		Semejanza (%)
5SM5	<i>Bacillus cereus</i>	CCM 2010 ^T	99,4
5SM10	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	DSM 6963 ^T	99,2
5SM12	<i>Bacillus cereus</i>	CCM 2010 ^T	98,6
5SM21	<i>Bacillus cereus</i>	CCM 2010 ^T	99,7
5SM24	<i>Bacillus cereus</i>	CCM 2010 ^T	99,7
5SM25	<i>Bacillus cereus</i>	CCM 2010 ^T	99,8
5SM31	<i>Bacillus silvestris</i>	HR3-23 ^T	99,6
5SM32	<i>Bacillus cereus</i>	CCM 2010 ^T	99,8
5SM33	<i>Bacillus cereus</i>	CCM 2010 ^T	99,7
6OM36	<i>Labrenzia alba</i>	CECT 5094 ^T	98,8
6SM1	<i>Psychrobacter submarinus</i>	KMM 225 ^T	99,1
7SM6	<i>Chromohalobacter israelensis</i>	ATCC 43985 ^T	99,4
7SM29	<i>Haliea salexigens</i>	3X/A02/235 ^T	94,7
7SM30	<i>Zobellia russellii</i>	KMM 3677 ^T	93,1
7SM33	<i>Erythrobacter flavus</i>	SW-46 ^T	99,3
8SM26	<i>Erythrobacter citreus</i>	RE35F/1 ^T	99,1
9SM8	<i>Erythrobacter citreus</i>	RE35F/1 ^T	99,6
9SM23	<i>Erythrobacter citreus</i>	RE35F/1 ^T	99,9

Dichas cepas fueron sometidas a la misma identificación presuntiva (secuencia parcial del gen 16S rRNA con los cebadores 616V/699R) cuyos resultados de los porcentajes de semejanza de secuencia parcial del gen 16S rRNA obtenidos se muestran en la Tabla 10. Estos valores están comprendidos entre el 90 y el 100% de similitud.

Los 48 aislados analizados pertenecen a 19 géneros repartidos en 4 filos. El filo con mayor número y mayor variedad de representantes es *Proteobacteria*, pues agrupa a 25 de los 48 aislados pertenecientes a 13 especies distintas como se muestra en la Tabla 11.

El género mayoritario es *Bacillus* con 10 aislados, le sigue *Erythrobacter* con 8 y *Joostella* con 7; *Labrenzia* y *Psychrobacter* tienen 3 representantes cada uno, y *Marinobacter*, *Pseudomonas* y *Ruegeria* 2. Los 10 géneros restantes, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Chromohalobacter*, *Haliea*, *Kytococcus*, *Mesonnia*, *Micrococcus*, *Phaeobacter*, *Roseovarius*, *Winogradskyella* y *Zobellia* tienen un solo representante. No obstante, la estimación de la diversidad cultivable y abundancia de cada grupo taxonómico en este caso está sesgada, pues se trata de una pequeña parte de todos los aislados obtenidos en el 89/90.

Tabla 11: Distribución de las 48 cepas procesadas en la identificación presuntiva por afiliación taxonómica (filo, clase y género).

Afiliación taxonómica	Total
Proteobacteria	25
Alphaproteobacteria	15
<i>Erythrobacter</i>	8
<i>Labrenzia</i>	3
<i>Phaeobacter</i>	1
<i>Roseovarius</i>	1
<i>Ruegeria</i>	2
Gammaproteobacteria	10
<i>Acinetobacter</i>	1
<i>Chromohalobacter</i>	1
<i>Halilea</i>	1
<i>Marinobacter</i>	2
<i>Psychrobacter</i>	3
<i>Pseudomonas</i>	2
Bacteroidetes	10
<i>Joostella</i>	7
<i>Mesonía</i>	1
<i>Winogradskyella</i>	1
<i>Zobellia</i>	1
Actinobacteria	3
<i>Arthrobacter</i>	1
<i>Micrococcus</i>	1
<i>Kytococcus</i>	1
Firmicutes	10
<i>Bacillus</i>	10
Total cepas	48

2. Selección de las cepas de interés

Del total de cepas estudiadas inicialmente, se seleccionaron aquellas cepas con porcentajes de semejanza de las secuencias parciales del gen 16S rRNA igual o inferior al 98% respecto a las cepas tipo de especies conocidas por entender que este dato garantiza su novedad como especie (Stackebrandt y Goebel, 1994; Stackebrandt y Ebers, 2006). Se ha sugerido un valor de 95% (Ludwig y col., 1998) como referencia para la diferenciación a nivel de género. Dado que se obtuvieron varias cepas cuyas secuencias parciales presentaban porcentajes de semejanza inferiores al 95%, se planteó la posibilidad de que pudiera tratarse de nuevos géneros.

Una vez seleccionadas las cepas, se procedió primero a completar las secuencias del gen 16S rRNA hasta obtener alrededor de 1400 pb. En la Tabla 12 se muestra la selección de cepas con los porcentajes de similitud de secuencia del gen 16S rRNA completo con la especie descrita más cercana. Al analizar la secuencia completa los porcentajes de similitud, así como la cepa tipo más próxima a cada cepa, pueden variar respecto de los obtenidos con las secuencias parciales. Así, por ejemplo, la cepa M22, originalmente identificada como *Vibrio agarivorans* con un 96,4% de similitud de secuencia, queda ahora con un 97,1% de similitud con la secuencia de la cepa tipo de *Vibrio marisflavi*.

Tabla 12. Posición filogenética de las 17 cepas bacterianas seleccionadas para realizar un estudio más detallado, basada en la comparación de las secuencias (~ 1400 pb) del gen que codifica el 16S rRNA.

Cepas	Cepa tipo más cercana	Similitud (%)
M22, M61	<i>Vibrio marisflavi</i>	97,1 - 97,2
M30	<i>Cytophaga fermentans</i>	90,0
M46	<i>Photobacterium halotolerans</i>	96,8
M17, M49, M76, M15Ø_3, R37	<i>Phaeobacter inhibens</i>	95,9 - 96,3
M62	<i>Vibrio aerogenes</i>	97,6
MD5	<i>Tropicibacter naphthalenivorans</i>	96,9
R46	<i>Pseudoruegeria aquimaris</i>	94,3
2OM6	<i>Phaeobacter gallaeciensis</i>	96,6
2SM19	<i>Winogradskyella earensi</i>	97,2
4SM10	<i>Roseovarius nubinhibens</i>	97,5
7SM29	<i>Haliae salexigens</i>	95,0
7SM30	<i>Pseudozobellia thermophila</i>	94,8

A continuación se realizó el correspondiente análisis filogenético basado en el estudio comparativo de las secuencias utilizando el paquete informático ARB (Ludwig y col., 2004) (<http://www.arb-home.de>), para posteriormente completar la descripción del potencial nuevo taxón con el estudio genotípico y fenotípico, junto a las cepas de referencia pertinentes.

3. Caracterización taxonómica de las cepas seleccionadas

A continuación se muestran los resultados obtenidos con respecto a cada una de las cepas que han sido seleccionadas para ser estudiadas y caracterizadas con más detalle.

Tabla 13. Afiliación taxonómica de las 17 cepas bacterianas.

Afiliación taxonómica	Cepas
<i>Proteobacteria</i>	
<i>Alphaproteobacteria</i>	MD5, R46, M17, M49, M76, M15Ø_3, R37, 2OM6, 4SM10
<i>Gammaproteobacteria</i>	7SM29, M46, M22, M61, M62
<i>Bacteroidetes</i>	
<i>Flavobacteriia</i>	7SM30, 2SM19
<i>Sin clasificar</i>	M30

Los estudios descriptivos se han desarrollado con una cronología que no se ajusta necesariamente a las relaciones filogenéticas. Esto se traduce en que algunos de los nuevos taxones estudiados ya han sido publicados conforme al código bacteriológico, mientras que otros están en curso. En las secciones siguientes se respeta esa cronología.

▪ **Estudio de la cepa 7SM29: *Haliea mediterranea* sp. nov.**

La cepa 7SM29^T fue aislada de una muestra de agua obtenida en la costa de Vinaroz, Castellón, en julio de 1989. La cepa se ha mantenido conservada por congelación en una suspensión de MB suplementada con glicerol al 20% a -80 °C y se ha crecido de forma rutinaria en MB y MA a 26 °C durante 48-72 h para preparar inóculo y muestra.

En primer lugar, se realizó un estudio filogenético con el objetivo de situar la cepa en un grupo concreto de microorganismos. La secuencia casi completa (1489 pb) del gen 16S rRNA de la cepa 7SM29^T corregida manualmente se alineó mediante el editor de secuencias del programa ARB EDIT y se comparó con respecto a otras secuencias publicadas en la base de datos EMBL. Con la matriz de semejanza obtenida se pudo establecer una relación de los porcentajes de similitud de secuencia (Tabla 14) y elaborar el árbol filogenético mediante el algoritmo NJ (Fig. 3).

Tabla 14: Porcentajes de semejanza obtenidos al comparar la secuencia del gen 16S rRNA de la cepa 7SM29^T con las de las cepas tipo relacionadas filogenéticamente.

Cepa	Nº acceso de secuencia	7SM29 ^T (% similitud)
7SM29 ^T	FN398053	100
<i>Haliea rubra</i> CM41_15a ^T	EU161717	95,2
<i>Haliea salexigens</i> 3X/A02/235 ^T	AY576769	95,0
<i>Congregibacter litoralis</i> KT71 ^T	AAOA01000004	94,8
<i>Spongiibacter marinus</i> HAL40b ^T	AM117932	91,2
<i>Melitea salexigens</i> 5IX/A01/131 ^T	AY576729	90,7

Los resultados del estudio mostraron que la cepa 7SM29^T formaba un clado bien definido con las dos cepas descritas del género *Haliea* (Urios y col., 2008) con las que mostró los valores más altos de similitud de secuencia del gen 16S rRNA: 95,2% con respecto a *Haliea rubra* CM41_15a^T y 95,0% con respecto a *Haliea salexigens* 3X/A02/235^T. Estos microorganismos pertenecen a una rama dentro de las gammaproteobacterias marinas que corresponde al llamado clado NOR5. Este clado, formado por numerosas secuencias del gen 16S rRNA, contiene pocos representantes cultivables y descritos taxonómicamente (Yan y col., 2009).

El clado NOR5 es de particular interés ya que alberga a *Congregibacter litoralis* KT71^T, la primera gammaproteobacteria cultivable aerobia fotosintética (Spring y col., 2009). Hasta su descripción formal, la producción de bacterioclorofila *a* (Bchl *a*) por organismos aerobios estrictos solo se había descrito en la clase *Alphaproteobacteria*. Con esta cepa la distribución de fotoheterótrofos facultativos se ampliaba a las gammaproteobacterias marinas.

En términos de similitud de secuencia, *C. litoralis* es el taxón más cercano al género *Haliea*. Por tanto, durante la caracterización fenotípica se utilizaron las tres especies, *H. rubra*, *H. salexigens* y *C. litoralis*, como cepas de referencia a la hora de describir la cepa 7SM29^T como un nuevo taxón cercano al género *Haliea*.

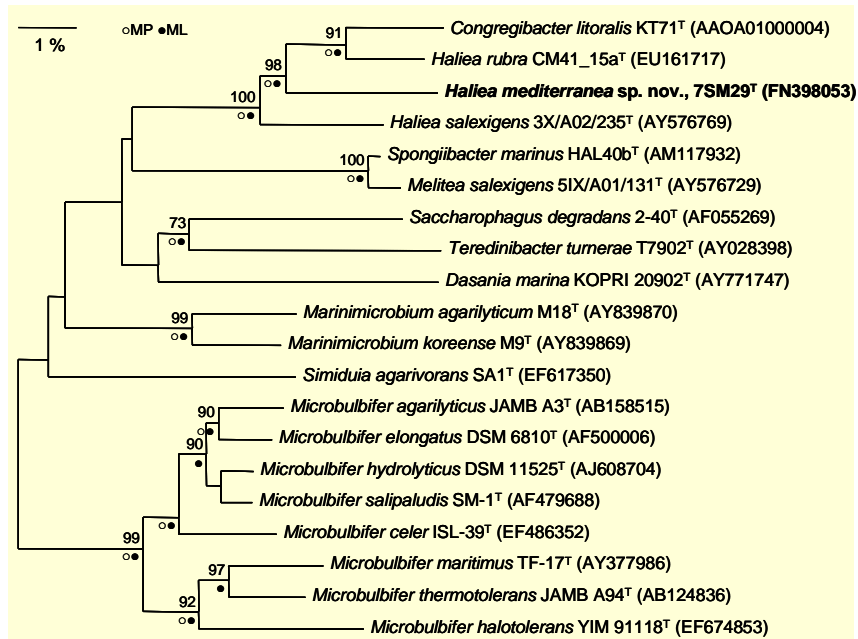


Figura 3: Árbol filogenético basado en la secuencia casi completa del gen 16S rRNA mediante el algoritmo *Neighbour Joining* (NJ) en el que se muestra la posición de la cepa *Haliea mediterranea* sp. nov. 7SM29^T (= CECT 7447^T) y las especies más cercanas. El número de acceso de las secuencias se muestra entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o superiores a 70% como porcentaje de 1000 réplicas. Los nodos que coinciden en los árboles de Máxima Parsimonia (MP) y Máxima verosimilitud (ML) se indican con un círculo blanco y un círculo negro, respectivamente. Barra, número de sustituciones por 100 posiciones nucleotídicas.

La caracterización genotípica de la cepa 7SM29^T se llevó a cabo en el Servicio de Identificación de la DSMZ. El contenido en bases G+C del DNA de la cepa 7SM29^T es de 62,1 mol%, valor comprendido dentro del rango descrito para el género *Haliea* (61,4-64,8 mol%).

La caracterización fenotípica de la cepa 7SM29^T incluyó el estudio de las características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y nutricionales.

La morfología celular, movilidad y flagelos se observó en el microscopio de contraste de fases pudiendo determinar que se trataba de bacilos regulares móviles por flagelos polares. El tamaño celular de la cepa 7SM29^T (Fig. 4) se determinó mediante microscopía electrónica de barrido (SCSIE, Universidad de Valencia).



Figura 4: Imágenes de la morfología celular de la cepa 7SM29^T obtenidas con microscopio electrónico de barrido

Con el fin de determinar si la cepa 7SM29^T era capaz de producir Bchl a cuando crece en un medio mínimo, se analizaron los extractos celulares de células crecidas en BMA con una fuente de carbono para sustentar el crecimiento (como putrescina, acetato o propionato) e incubadas en oscuridad. El espectro de absorbancia de los extractos se analizó utilizando un espectrofotómetro Beckman Coulter DU-800 como describe Takaichi y col., (1991). El espectro de absorbancia de la cepa 7SM29^T no reveló ningún pico correspondiente a la bacterioclorofila.

Los resultados de la caracterización fenotípica se detallan en la posterior descripción de la cepa y en la Tabla 15, donde se muestran las características que diferencian a la cepa MD5^T de las especies más cercana filogenéticamente, *H. rubra* CM41_15a^T, *H. salexigens* 3X/A02/235^T y *C. litoralis* KT71^T.

Tabla 15. Características diferenciales entre las especies de *Haliea* y *Congregibacter*.

Cepas: 1, 7SM29^T (este estudio); 2, *H. salexigens* (Urios y col., 2008); 3, *H. rubra* (Urios y col., 2009); 4, *Congregibacter litoralis* (Spring y col., 2009). +, positivo; -, negativo; d, débil; ND, no determinado.

	1	2	3	4
Movilidad por flagelos	+	+	-	+
Tamaño celular (µm)	0,4-0,5 × 1,1-1,3	0,3-0,7 × 1,3-1,9	0,5 × 2,7	0,4-0,7 × 0,5-4,5
Rango de salinidad (g/L)	3,5-150	7-70	7-42	10-70
Producción Bchl a	-	ND	ND	+
Crecimiento a 40 °C	+	-	+	-
Crecimiento a 10-12%	+	-	-	+
Hidrólisis de:				
Caseína, gelatina, almidón	+	ND	ND	-
Utilización de*:				
α-D-Glucosa	-	-	+	-
Glicerol	-	+	-	+
L-Leucina	+	+	-	ND
L-Alanina	+	-	-	+
Acetato	+	-	-	d
Piruvato	+	+	-	+
Propionato	+	-	-	d
Succinato	-	+	-	+

* Los datos de *H. salexigens* y *H. rubra* corresponden al sistema Biolog GN2, *C. litoralis* a crecimiento en fuentes únicas de carbono, mientras que para *H. mediterranea* se utilizaron ambos métodos.

Por último, como parte de la caracterización fenotípica, se realizó la caracterización quimiotaxonómica en el Servicio de Identificación de la DSMZ. Se llevó a cabo el análisis de ácidos grasos, quinonas y lípidos polares. La cepa 7SM29^T presentó como quinona mayoritaria la ubiquinona con 8 unidades isoprenoides (Q-8), al igual que todas las cepas incluidas en el estudio. Los lípidos polares detectados fueron: fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol y fosfatidiletanolamina, además de dos aminolípidos no identificados y un glicolípido atípico. La composición de los ácidos grasos se muestra en la Tabla 16.

Tabla 16. Composición de ácidos grasos de la cepa 7SM29^T y las cepas tipo de las especies pertenecientes al género *Haliea* y *Congregibacter litoralis*.

Cepas: 1, 7SM29^T (este estudio); 2, *H. salexigens* (Urios y col., 2008); 3, *H. rubra* (Urios y col., 2009); 4, *Congregibacter litoralis* (Spring y col., 2009). –, no detectado; tr, trazas (<1%).

Ácidos grasos (%):	1	2	3	4
Hydroxilados				
C _{10:0} 3OH	tr	1,8	–	2,1
C _{11:0} 3OH	2,0	3,3	–	tr
C _{12:0} 3OH	1,0	1,1	–	tr
C _{12:0} 2OH	–	–	1,1	-
C _{12:1} 3OH	–	–	3,5	-
C _{11:0} ISO 3OH	–	3,3	–	tr
Saturados				
C _{11:0}	1,5	1,0	–	1,0
C _{12:0}	1,1	1,6	–	2,2
C _{13:0}	1,8	1,3	–	1,0
C _{14:0}	2,5	1,3	tr	2,0
C _{15:0}	-	4,5	1,2	4,9
C _{16:0}	11,2	2,0	13,0	5,4
C _{17:0}	7,5	9,3	1,0	3,1
Insaturados				
C _{15:1} ω6c	tr	5,8	tr	2,0
C _{16:1} ω6c	–	–	–	6,5
C _{16:1} ω7c	17,2	21,2	30,5	23,1
C _{17:1} ω6c	-	2,7	1,1	2,8
C _{17:1} ω8c	19,0	23,9	2,0	8,1
C _{18:1} ω7c	22,6	17,5	40,2	29,7

Los valores de similitud de secuencia del gen 16S rRNA sugerían que este nuevo taxón podía considerarse una nueva especie de *Haliea* o *Congregibacter* e incluso un nuevo género cercano a ambos. El análisis filogenético, que situaba la cepa 7SM29^T en el género *Haliea*, se confirmó por los resultados fenotípicos incluyendo la composición en quinona respiratoria y lípidos polares, perfil de ácidos grasos, actividades enzimáticas y preferencia nutricional por ácidos orgánicos y aminoácidos, así como el contenido en G+C, debido a la semejanza entre la cepa 7SM29^T y las dos especies de *Haliea*, mientras que se diferencia de *C. litoralis* KT71^T que es capaz de sintetizar Bchl *a* y crecer fotoheterotróficamente con bajas concentraciones bajas de

nutrientes. Por tanto, se concluyó que la cepa 7SM29^T representaba una nueva especie del género *Haliea*, proponiéndose el nombre de *Haliea mediterranea* sp. nov. (Lucena y col., 2010a).

Descripción de *Haliea mediterranea* sp. nov.

Haliea mediterranea (me.di.te.rra'.ne.a, L. fem. adj., *mediterranea*, perteneciente al mar Mediterráneo).

Se trata de células Gram negativas, bacilos cortos de 0,4-0,5 µm de ancho y 1,1-1,3 µm de largo y móviles, pues contiene entre uno y tres flagelos polares. Crece en MA formando colonias regulares con una pigmentación de color amarillo pálido.

Es capaz de crecer en un rango de temperatura que oscila entre 15 y 40 °C, pero no se observa crecimiento a 4 ni 45 °C. Requiere Na⁺ para crecer, obteniéndose un buen crecimiento adicionando entre 3,5 hasta 120 g/L de sales marinas en el medio de cultivo, pero no con 180 g/L. Es una bacteria aerobia quimioheterótrofa estricta, no es capaz de fermentar. La cepa 7SM29^T no produce bacterioclorofila *a*, es oxidasa y catalasa positiva, reduce nitratos a nitritos, pero no hasta N₂. Es negativa para arginina dihidrolasa, lisina y ornitina decarboxilasas, ureasa e indol a partir de triptófano. Es capaz de hidrolizar gelatina, caseína, almidón, Tween-80, DNA o esculina, pero no lecitina, alginato o agar. Las fuentes únicas de carbono y energía que utiliza para crecer en BMA son preferentemente ácidos orgánicos y aminoácidos: acetato, piruvato, propionato, butirato, 3-hidroxibutirato, L-leucina, L-treonina, L-arginina, L-alanina, L-aspartato, L-glutamato, L-lisina y putrescina. Los carbohidratos por lo general no los utiliza, aunque se observa crecimiento tras una semana de incubación en alguno de ellos: D-celobiosa, salicina, amigdalina y D-glucuronato, así como en D,L-lactato, L-tirosina y γ-aminobutirato (GABA). No se observa crecimiento con otros carbohidratos ni con malato, succinato, fumarato, 2-oxoglutarato, citrato, t-aconitato, glicina, L-serina, L-ornitina, L-citrulina, L-histidina o L-sarcosina.

Las siguientes actividades son positivas en API ZYM: fosfatasa ácida y alcalina, esterasa lipasa (C8) (débil), leucina y valina arilamidasa, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa y N-acetil β-glucosaminidasa (débil). Se oxidaron los siguientes sustratos en la microplacas de Biolog GN2 tras 48h de incubación: Tween 40 y 80, metil-piruvato, acetato, ácido α-hidroxi-butírico, propionato, alanil-amida, L-alanina, L-alanil-glicina,

L-asparagina, L-glutamato, ácido glicil-L-aspártico, ácido glicil-L-glutámico, hidroxil-L-prolina, L-leucina, L-prolina, y feniletilamina.

Los lípidos polares mayoritarios son PG, DPG y PE. La quinona respiratoria es Q8. Los ácidos grasos mayoritarios son monoinsaturados C₁₆, C₁₇ y C₁₈ y de los hidroxilados el C_{11:0} 3OH.

El contenido molar de G+C es 62 mol%.

La cepa tipo aislada de agua de mar del Mar Mediterráneo occidental, es 7SM29^T y ha sido depositada en dos colecciones de cultivo, CECT 7447^T y DSM 21924^T.

▪ **Estudio de la cepa 7SM30: *Euzebyella saccharophyla* gen. nov., sp. nov.**

Esta cepa se aisló a partir de la muestra de agua de mar recogida a 10 m de profundidad en la costa de Vinaroz, en Castellón, en julio de 1989. El agua de mar se diluyó diez veces en agua de mar estéril y se incubó en MA a 20-22 °C hasta 10 días. El mantenimiento de las células se hizo en MB suplementado con glicerol al 20% a -80 °C (Ortigosa y col., 1994).

Recientemente se ha recuperado esta cepa para completar su descripción taxonómica. El análisis comparativo de la secuencia casi completa del gen 16S rRNA (1450 pb) de la cepa 7SM30^T y su alineamiento con respecto a otras secuencias publicadas, sitúa esta cepa dentro del filo "*Bacteroidetes*", concretamente en la familia *Flavobacteriaceae* (Reichenbach, 1992; emend. por Bernardet y col., 2002).

Tabla 17: Porcentajes de semejanza obtenidos al comparar la secuencia casi completa (1450 pb) del gen 16S rRNA de la cepa 7SM30^T con las secuencias de las cepas tipo relacionadas filogenéticamente.

Cepa	Nº acceso de secuencia	7SM30 ^T (% similitud)
7SM30 ^T	FN554868	100
<i>Pseudozobellia thermophila</i> KMM 3531 ^T	AB084261	94,8
<i>Zobellia russellii</i> KMM 3677 ^T	AB121976	94,3
<i>Kriegella aquimaris</i> KMM 3665 ^T	AB084262	93,3
<i>Zobellia galactinivorans</i> Dsij ^T	AF208293	93,1
<i>Zobellia uliginosa</i> ATCC 14397 ^T	M62799	92,3

La cepa 7SM30^T presentó los valores más altos de similitud de secuencia del gen 16S rRNA con los géneros *Pseudozobellia*, *Kriegella* y *Zobellia*, siendo éstos inferiores al 95%.

Los porcentajes de similitud de secuencia junto con los valores de *bootstrap*, la estabilidad de los nodos y la topología de los árboles filogenéticos obtenidos mediante tres métodos alternativos, MP (Fig. 5), NJ y ML (Anexo II) permitieron proponer la cepa 7SM30^T para su caracterización taxonómica formal y describirla como un nuevo género dentro de la familia *Flavobacteriaceae*. Para ello se llevó a cabo una caracterización polifásica de la cepa utilizando las especies de la Tabla 17 como cepas de referencia con fines comparativos.

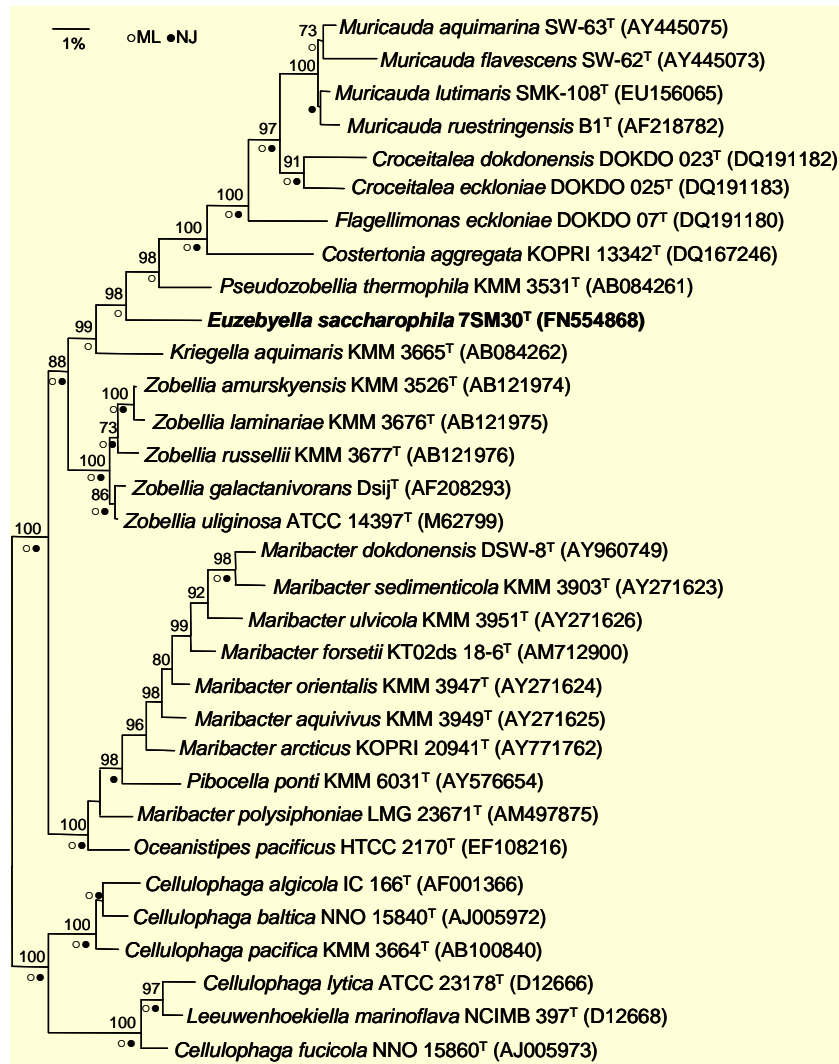


Figura 5: Árbol filogenético de Máxima Parsimonia basado en la secuencia casi completa del gen 16S rRNA de la cepa tipo *Euzebyella saccharophila* gen. nov. sp. nov. 7SM30^T (= CECT 7477^T) y las especies relacionadas más cercanas. Los números de acceso de secuencia se muestran entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o superiores a 70% como porcentaje de 1000 réplicas. Los nodos coincidentes con los obtenidos por Máxima Verosimilitud (ML) y Neighbour Joining (NJ) se indican por un círculo blanco y un círculo negro, respectivamente. Barra, número de sustituciones por 100 posiciones nucleotídicas.

La composición global de bases del genoma se determinó en el Servicio de Identificación de la DSMZ mediante HPLC y en el Instituto di Chimica Biomolecolare, CNR Italia, utilizando la metodología descrita por Poli y col. (2009). La diferencia entre ambas determinaciones del contenido en G+C mol% del DNA (1,7% unidades) se atribuyó a las diferencias en la metodología aplicada. Se concluyó, por tanto, que el contenido en bases G+C de la cepa 7SM30^T es de alrededor de 40 mol%, en concordancia con la descripción de otros miembros de la familia.

Como parte de la caracterización fenotípica de la cepa 7SM30^T se llevó a cabo la caracterización quimiotaxonómica (análisis de la composición de ácidos grasos, de quinonas y lípidos polares) en el Servicio de Identificación de la DSMZ.

Tabla 18. Composición de los ácidos grasos celulares de la cepa 7SM30^T y las especies filogenéticamente relacionadas.

Cepas: **1**, *Euzebyella saccharophila* 7SM30^T (este estudio); **2**, *P. thermophila* (Nedashkovskaya y col., 2009); **3**, *K. aquimaris* (Nedashkovskaya y col., 2008); **4**, *Zobellia* spp. (cinco especies) (Nedashkovskaya y col., 2004, 2009). –, no detectable; tr, trazas (<1%).

Ácidos grasos (%)	1	2	3	4
Hidroxilados:				
C _{15:0} iso 3OH	2,9	5,2	3,2	4,6-8,3
C _{16:0} iso 3OH	tr	tr	tr	-
C _{17:0} iso 3OH	11,5	22,6	12,8	15,1-25,9
Saturados:				
C _{14:0}	tr	-	tr	0-1,0
C _{15:0} iso	35,0	30,8	12,3	16,8-22,5
C _{15:0}	11,0	3,0	11,1	7,5-14,4
C _{16:0}	tr	-	tr	-
C _{16:0} iso	tr	tr	tr	0,7-2,6
Insaturados:				
C _{15:1} iso G	14,7	14,8	19,7	8,8-14,9
C _{15:1} ω6c	3,0	tr	2,5	1,1-3,2
C _{17:1} ω6c	tr	-	tr	0-1,2
C _{17:1} ω9c	5,0	5,4	6,4	2,4-5,1
*Sum In Feature:				
3 (C _{16:1} ω7c/C _{15:0} iso 2OH)	6,8	6,9	9,4	9,9-15,5
4 (C _{17:1} iso I/C _{17:1} anteiso B)	1,0	-	1,0	-

**Summed features* representan grupos de dos o tres ácidos grasos que no se han podido separar mediante GC por MIDI.

El tipo de quinona respiratoria de la cepa 7SM30^T es la menaquinona con 6 unidades isoprenoides (MK6), de acuerdo con la descripción de otros géneros pertenecientes a la familia *Flavobacteriaceae*.

El análisis de los lípidos polares detectó PE y cuatro lípidos no identificados (uno de ellos fosfolípido). Los ácidos grasos mayoritarios son C_{15:0}, C_{15:1} y C_{17:0} iso 3OH, como se muestra en la Tabla 18.

La cepa 7SM30^T fue positiva para la prueba de la oxidasa y la catalasa. No fermentó D-glucosa, D-galactosa, L-arabinosa, sacarosa, amigdalina, melibiosa o lactosa en el medio O/F (suplementado con MCS) y no creció en MA en condiciones anaerobias (GENbag anaer, bioMérieux). No redujo el nitrato a nitritos en el caldo nitratos ni en la tira API 20NE. La hidrólisis extracelular de agar, alginato y Tween 80 fue negativa al cabo de una semana de incubación, positiva para caseína y almidón, y para la DNAsa se obtuvo un resultado positivo débil. En la descripción de la especie, en la Tabla 19 y en la tabla suplementaria 1 (Anexo II) se muestran otras actividades de la cepa, los resultados de los sistemas miniaturizados en API ZYM, API 20NE, API 50CHE y Biolog GN2 realizados por duplicado. La cepa 7SM30^T creció en BMA suplementado con extracto de levadura al 0,5% (control positivo) y con varios de los carbohidratos, presentando en este caso un crecimiento mucoso. Las fuentes de carbono utilizadas se indican en la descripción de la especie.

Tabla 19. Características fenotípicas diferenciales entre la cepa 7SM30^T y las especies filogenéticamente relacionadas.

Cepas: **1**, *Euzebyella saccharophila* 7SM30^T (este estudio); **2**, *P. thermophila* (Nedashkovskaya y col., 2009); **3**, *K. aquimaris* (Nedashkovskaya y col., 2008); **4**, *Zobellia* spp. (cinco especies) (Nedashkovskaya y col., 2004, 2009). +, positivo; –, negativo; V, variable entre especies.

	1	2	3	4
Tamaño celular (µm)	0,4 × 1,3-5,2	0,2-0,4 × 1,0-3,2	0,4-0,5 × 1,2-1,4	0,2-0,5 × 1,2-8,0
Pigmento tipo flexirrubina	–	+	+	+
Movilidad por deslizamiento	–	+	+	+
Crecimiento:				
37 °C	+	+	–	V
0,35% salinidad	+	+*	–*	+ [†]
10% salinidad	+	–*	–*	– [†]
Requerimiento de magnesio	+	+*	+*	– [§]
Requerimiento de calcio	–	–*	+*	– [§]
Reducción de nitrato	–	–	–	+
Hidrólisis de:				
Agar	–	+	–	+
Alginato	–	+	–	+ [‡]
Tween-80	–	–	+	– [†]
Gelatina	–	+	–	+
Actividades enzimáticas:				
α-fucosidasa	–	+	–	– [†]

* Datos obtenidos en este estudio.

[†] Datos obtenidos en este estudio para *Z. uliginosa* CECT 4277^T y *Z. russellii* CECT 7505^T.

[‡] Negativo para *Z. laminariae*.

[§] Datos obtenidos en este estudio para *Z. uliginosa* CECT 4277^T y *Z. russellii* CECT 7505^T: ambas especies requieren cationes divalentes de forma no específica ya que pueden crecer tanto con Ca²⁺ como con Mg²⁺.

El conjunto de datos obtenidos apoyan la propuesta de un nuevo género y una nueva especie para la que se propone el nombre de *Euzebyella saccharophila* gen. nov. sp. nov., siendo 7SM30^T (= CECT 7477^T = KCTC 22655^T) la cepa tipo (Lucena y col., 2010b).

Descripción de *Euzebyella* gen. nov.

Euzebyella (Eu.ze.byel'.la. N.L. fem. n. *Euzebyella*, en referencia al microbiólogo francés Jean Paul Euzéby, por su contribución a la nomenclatura de Procariotas y a la taxonomía bacteriana en general).

Bacteria aerobia, Gram negativa, mesófila, quimioorganótrofa, halófila moderada y pigmentada. Las células son bacilos rectos no móviles. No se observó crecimiento en ausencia de agua de mar o sin la adición de cationes marinos al medio. El pigmento que produce no pertenece al tipo flexirrubina. Las pruebas de la oxidasa y la catalasa son positivas. No es capaz de reducir nitratos. La quinona respiratoria es la menaquinona 6 (MK6).

Los ácidos grasos predominantes son C_{15:0}, C_{15:1} y C_{17:0} iso 3OH. Contiene el lípid polar PE y otros lípidos no identificados. El contenido en G+C es de alrededor de 40 mol%. La cepa tipo es *Euzebyella saccharophila*.

Descripción of *Euzebyella saccharophila* sp. nov.

Euzebyella saccharophila (sac.cha.ro'.phi.la, Gr. n. *saccharon*, sacarosa; N.L. adj. *philus* -a -um (de Gr. adj. *philos* -ê -on), amigo, amante; N.L. fem. adj. *saccharophila*, amante de la sacarosa).

Además de las características descritas para el género, la especie presenta los siguientes rasgos: células de 0,4 µm de ancho por 1,4-5 µm de largo, aproximadamente. Crece en MA formando colonias regulares con una pigmentación no difusible de color amarillo anaranjado, además presenta una textura mucosa en medios que contienen azúcares. El rango de temperatura de crecimiento comprende desde los 15 a los 37 °C, pero no crece a 4 ni a 40 °C. Se obtiene buen crecimiento en medios con 3,5 hasta 100 g/L de sales marinas, pero no crece a 150 g/L. Requiere iones sodio y magnesio para crecer.

La cepa 7SM30^T no produce arginina dihidrolasa, lisina ni ornitina descarboxilasas, tampoco produce ureasa o indol a partir de triptófano. Hidroliza esculina y DNA (débilmente), sin embargo, no es capaz de hidrolizar gelatina, caseína, alginato, agar, almidón o Tween 80. No produce ácido en medio O/F (con MCS) a partir de D-glucosa, D-galactosa, glucosa, L-arabinosa, amigdalina ni D-melibiosa, tanto en condiciones aerobias como anaerobias.

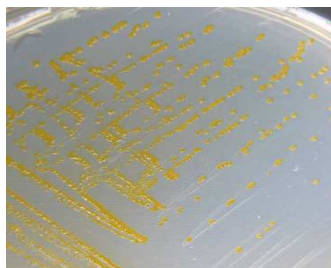


Figura 6: Aspecto que presentan las colonias de la cepa 7SM30^T cuando crecen en MA.

Las fuentes únicas de carbono y energía que permiten un crecimiento abundante en BMA son preferentemente carbohidratos: L-arabinosa, D-xilosa, D-glucosa, D-fructosa, D-galactosa, D-trehalosa, D-manosa, L-ramnosa (débil), maltosa, D-celobiosa, glucosa, lactosa, D-melibiosa, salicina, D-gluconato y N-acetil-D-glucosamina. No utiliza los siguientes ácidos orgánicos, aminoácidos y carbohidratos: acetato, piruvato, propionato, butirato, citrato, t-aconitato, 2-oxoglutarato, succinato, fumarato, malato, lactato, 3-hidroxi-butirato, glicina, L-leucina, L-serina, L-treonina, L-glutamato, L-alanina, L-arginina, L-tirosina, L-ornitina, L-citrulina, γ -aminobutirato, L-aspartato, L-lisina, L-histidina, L-sarcosina, putrescina, D-ribosa, amigdalina, D-glucuronato, D-galacturonato, D-glicerol, D-manitol, D-sorbitol, *m*-inositol, D-glicerato y D-sacarato.

Las siguientes actividades en API ZYM son positivas: fosfatasa ácida y alcalina, esterasa lipasa (C8), leucina arilamidasa, valina arilamidasa, α -galactosidasa, β -galactosidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, N-acetil β -glucosaminidasa y α -manosidasa. Esterasa (C4), tripsina y naftol-AS-BI-fosfohidrolasa dan resultados débiles, mientras que lipasa (C14), cistina arilamidasa, α -quimotripsina, β -glucuronidasa y α -fucosidasa son negativas.

En la tira API 20NE da respuesta positiva para la hidrólisis de esculina, β -galactosidasa y la asimilación de D-glucosa, L-arabinosa, N-acetil-glucosamina y D-maltosa. La respuesta con gluconato y piruvato es débil. La reducción de nitrato, la producción de indol, la fermentación de D-glucosa, la arginina dihidrolasa, ureasa, la hidrólisis de gelatina y la asimilación de D-manitol, caprato, adipato, malato, citrato y fenilacetato son negativas.

La cepa 7SM30^T es capaz de acidificar los siguientes carbohidratos en el sistema miniaturizado API 50CHE (48h): D-arabinosa, L-arabinosa, D-xilosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, L-ramnosa, metil- α -D-manopiranosido, N-acetilglucosamina, amigdalina, arbutina,

esculina, salicina, D-celobiosa, D-maltosa y D-lactosa. Se observa una ligera acidificación de D-ribosa, metil- β -D-xilopiranosido, D-galactosa, metil- α -D-glucopiranosida, L-sorbosa, D-melibiosa, D-trehalosa, inulina, D-rafinosa, almidón y D-lixosa. Para el resto de sustratos es negativo: glicerol, eritritol, L-xilosa, D-adonitol, dulcitol, inositol, D-manitol, D-sorbitol, D-melezitosa, glicogeno, xilitol, gentiobiosa, D-turanosa, D-tagatosa, D-fucosa, L-fucosa, D-arabitol, L-arabitol, gluconato, 2-ketogluconato, 5-ketogluconato.

Los sustratos oxidados en microplacas de Biolog GN2 tras 48h de incubación fueron: α -ciclodextrina, dextrina, glicógeno, Tween 40, N-acetil-D-galactosamina, celobiosa, N-acetil-D-glucosamina, L-arabinosa, D-fructosa, D-galactosa, gentiobiosa, α -D-glucosa, α -D-lactosa, lactulosa, maltosa, D-manosa, D-melibiosa, β -metil-D-glucosamina, D-psicosa, D-rafinosa, D-sorbitol, sacarosa, D-trehalosa, turanosa, ácido D-glucónico y glucosa-1-fosfato. Se obtuvieron respuestas débiles para los siguientes sustratos: adonitol, *m*-inositol, L-ramnosa, xilitol, ácido D-galacturónico, ácido α -cetoglutárico, ácido succinámico, L-asparagina, ácido L-aspártico, ácido L-glutámico, ácido glicil-L-glutámico, L-ornitina, inosina, uridina, DL-glicerol- α -fosfato y glucosa-6-fosfato.

Se obtuvo respuesta negativa con: Tween 80, D-arabitol, *i*-eritritol, L-fucosa, D-manitol, metil-piruvato, mono-metil succinato, ácido acético, ácido cis-aconítico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido D-galactónico lactona, ácido D-glucosamínico, ácido D-glucurónico, ácido α -hidroxibutírico, ácido β -hidroxibutírico, ácido γ -hidroxibutírico, ácido *p*-hidroxifenil acético, ácido itacónico, ácido α -cetobutírico, ácido α -cetovalérico, ácido DL-láctico, ácido malónico, ácido propiónico, ácido quínico, ácido D-sacárico, ácido sebácico, ácido succínico, ácido bromosuccínico, glucuronamida, alaninamida, D-alanina, L-alanina, L-alanil-glicina, ácido glicil-L-aspártico, L-histidina, hidroxil L-prolina, L-leucina, L-fenilalanina, L-prolina, ácido L-piroglutámico, D-serina, L-serina, L-treonina, DL-carnitina, ácido γ -aminobutírico, ácido urocánico, timidina, feniletilamina, putrescina, 2-aminoetanol, 2,3-butanodiol y glicerol.

El contenido molar en G+C es 39,5 mol% (HPLC) o 41,2 mol% (desnaturalización térmica).

La cepa tipo es 7SM30^T (= CECT 7477^T = KCTC 22655^T) y ha sido aislada de agua de mar del Mediterráneo occidental.

▪ **Estudio de la cepa M46: *Photobacterium aphoticum* sp. nov.**

La cepa M46^T fue aislada de una muestra de agua de mar superficial procedente de la playa de la Malvarrosa (Latitud 39° 28' 29" N; Longitud 0° 19' 23" W; temperatura 25 °C; pH 8) en Valencia, en julio de 2008. La cepa M46^T se aisló en MA tras cuatro días de incubación a 26 °C.

El análisis comparativo de la secuencia del gen 16S rRNA (1529 pb) respecto a otras secuencias publicadas relacionó la cepa M46^T con el género *Photobacterium* (Beijerinck, 1889).

Tabla 20: Porcentajes de semejanza obtenidos al comparar la secuencia casi completa del gen 16S rRNA de la cepa M46^T con las secuencias de las cepas tipo más relacionadas filogenéticamente.

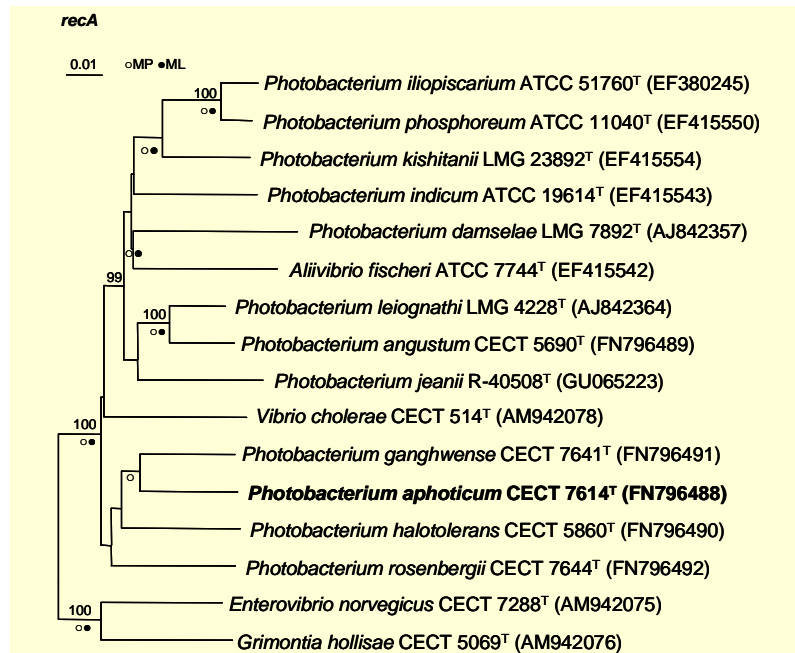
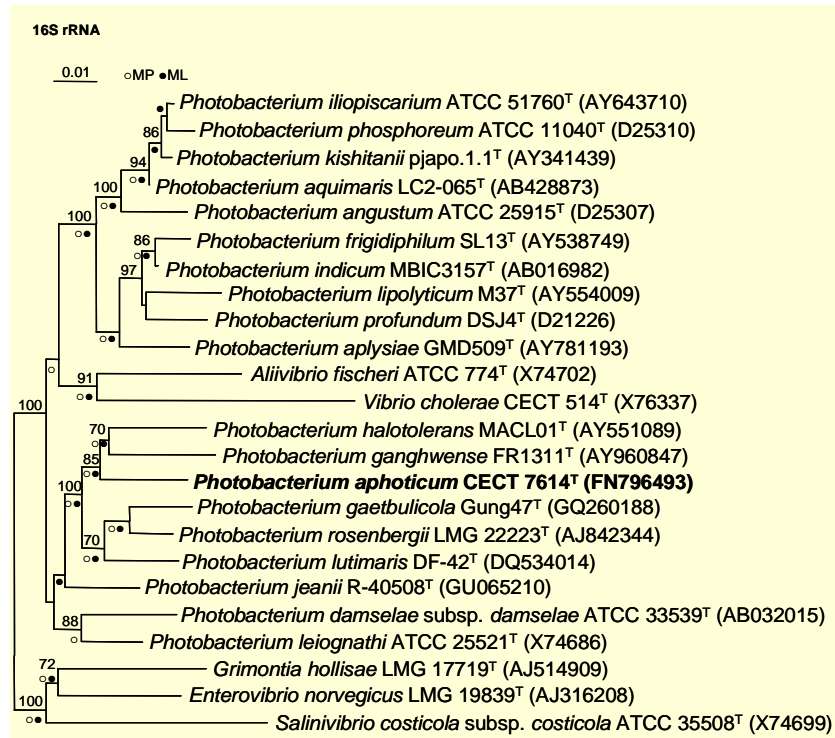
Cepa	Nº acceso de secuencia	M46 ^T (% similitud)
M46^T	FN796493	100
<i>Photobacterium rosenbergii</i> LMG 22223 ^T	AJ842344	96,8
<i>Photobacterium halotolerans</i> CECT 5860 ^T	AY551089	96,4
<i>Photobacterium lutimaris</i> DF-42 ^T	DQ534014	96,3
<i>Photobacterium ganghwense</i> CECT 7641 ^T	AY960847	96,0
<i>Photobacterium jeanii</i> R-40508 ^T	GU065210	95,7
<i>Photobacterium leiognathi</i> ATCC 25521 ^T	X74686	95,6
<i>Photobacterium indicum</i> MBIC3157 ^T	AB016982	95,4
<i>Photobacterium gaetbulicola</i> Gung47 ^T	GQ260188	95,3
<i>Photobacterium angustum</i> CECT 5690 ^T	D25307	95,2
<i>Aliivibrio fischeri</i> ATCC 774 ^T	X74702	95,2
<i>Photobacterium aplysiae</i> GMD509 ^T	AY781193	95,1
<i>Photobacterium aquimaris</i> LC2-065 ^T	AB428873	95,0
<i>Photobacterium iliopiscarium</i> ATCC 51760 ^T	AY643710	94,9
<i>Photobacterium kishitanii</i> pjapo.1.1 ^T	AY341439	94,8
<i>Photobacterium damselae</i> LMG 7892 ^T	AJ842357	94,7
<i>Photobacterium frigidiphilum</i> SL13 ^T	AY538749	94,5
<i>Photobacterium phosphoreum</i> ATCC 11040 ^T	D25310	94,4
<i>Photobacterium profundum</i> DSJ4 ^T	D21226	94,3
<i>Photobacterium lipolyticum</i> M37 ^T	AY554009	94,3

Las relaciones intragenéricas de *Photobacterium* spp. generalmente distribuye las especies en 3 clados (Jung y col., 2007; Park y col., 2006; Rivas y col., 2006; Yoshizawa y col., 2009), el primero contiene las especies *P. phosphoreum*, *P. iliopiscarium*, *P. angustum*, *P. aquimaris* y *P. kishitanii*. El segundo clado contiene la especie *P.*

profundum junto con otras especies psicrófilas, la mayoría aisladas de aguas profundas, *P. indicum*, *P. frigidophilum*, *P. aplysiae* y *P. lipolyticum*; y finalmente un tercer clado que agrupa *P. ganghwense*, *P. rosenbergii*, *P. halotolerans* y *P. lutimaris*. Las especies *P. damsela* y *P. leiognathi* muestran una relación inestable con el grupo *P. phosphoreum*. Durante el estudio de la cepa M46^T se describieron dos nuevas especies de *Photobacterium*, *P. gaetbulicola* y *P. jeanii* (Kim y col., 2010; Chimetto y col., 2010), relacionadas con el tercer clado, y por ello fueron incluidas en el estudio filogenético.

La secuencia del gen 16S rRNA de la cepa M46^T, así como las secuencias de los genes *recA* y *gyrB* de las cepas M46^T, *P. angustum* CECT 5690^T, *P. halotolerans* CECT 5860^T, *P. ganghwense* CECT 7641^T y *P. rosenbergii* CECT 7644^T se obtuvieron y amplificaron como se describe en Lucena y col. (2010a) y en Pascual y col. (2010). Las nuevas secuencias fueron analizadas con el programa ARB para elaborar los árboles filogenéticos mediante los tres métodos alternativos NJ (Fig. 6), MP y ML (Anexo II) para cada gen de forma individual y con los tres genes concatenados. La topología y robustez de los árboles confirmó que la cepa M46^T pertenece al género *Photobacterium*, relacionándola con el tercer clado y con *P. ganghwense* CECT 7641^T y *P. halotolerans* CECT 5860^T como vecinos filogenéticos más cercanos.

El porcentaje de similitud de secuencia del gen 16S rRNA más alto (96,8%) se encuentra por debajo del 97% establecido por Stackebrandt y Goebel (1994) para delimitar especies. Además, los valores de similitud de secuencia obtenidos en el análisis del gen *recA*, el porcentaje más alto fue de 87,4% con *P. ganghwense*, se encuentra dentro del rango de valores que presentan las especies ya descritas en el género: 78,3% entre *P. rosenbergii* y *P. damsela* subsp. *damsela* y 95,5% entre *P. phosphoreum* y *P. illiopiscarium*. Lo mismo ocurre en el caso del gen *gyrB*, cuyo valor máximo de similitud de secuencia fue de 85,0% también con *P. ganghwense*, inferior al obtenido para otros pares de especies como *P. kishitanii* y *P. frigidophilum* que comparten 98,0%, y los otros pares posibles que compartían entre el 85,0 y el 91,0% de similitud de secuencia. Estos resultados permitían proponer la cepa M46^T como una nueva especie dentro del género *Photobacterium*, por lo que se abordó el estudio polifásico de la misma para su propuesta formal.



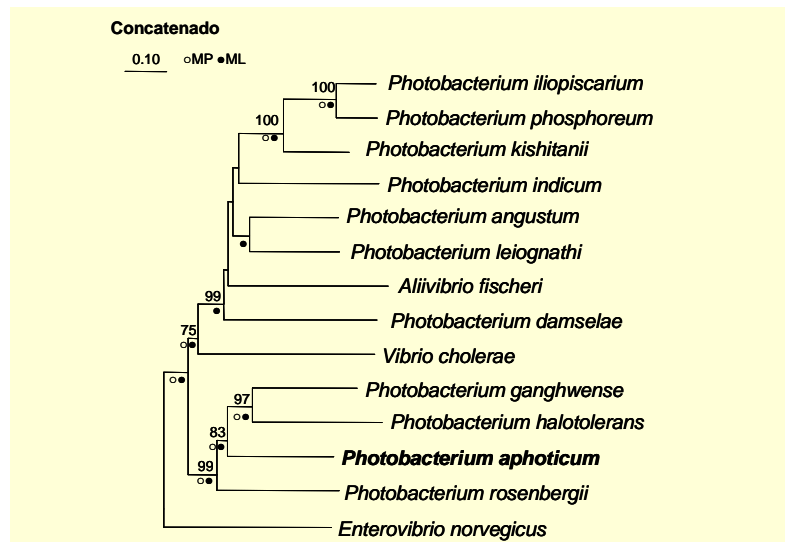
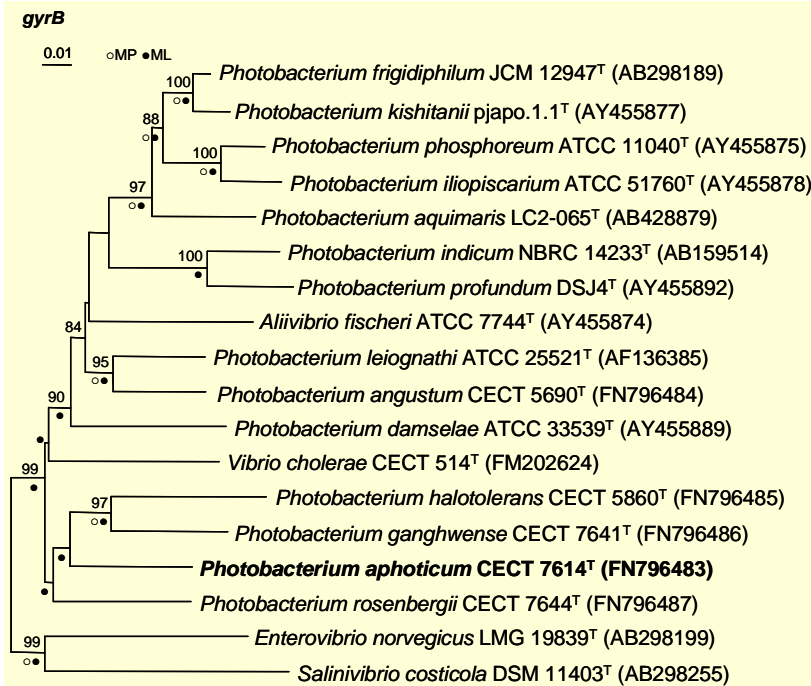


Figura 7: Árboles filogenéticos obtenidos mediante *Neighbour Joining* basados en las secuencias parciales de los genes 16S rRNA, *recA* y *gyrB* de manera individual, así como con sus secuencias concatenadas, en los que se muestra la posición de la cepa *Photobacterium aphoticum* M46^T (= CECT 7614^T) y las especies más cercanas. El número de acceso de las secuencias se muestra entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o superiores a 70% como porcentaje de 1000 réplicas. Los nodos coincidentes con los obtenidos por MP y ML se indican mediante un círculo blanco y un círculo negro, respectivamente. Barra, el número se corresponde con el número de cambios nucleotídicos por sitio.

La topología observada en los árboles obtenidos con las secuencias del gen 16S rRNA utilizando los algoritmos MP y ML (Anexo II) es diferente a la obtenida mediante NJ. En todos los casos se observa la organización de las especies del género *Photobacterium* en 3 clados, sin embargo, como se ha indicado anteriormente, existen diferencias en las posiciones relativas dentro del árbol de las especies *P. leiognathi*, *P. damselae* subsp. *damselae* y la recientemente incluida, *P. jeanii*. También existen variaciones en las relaciones con los géneros *Aliivibrio* y *Vibrio* (representados por la especie tipo de cada género), mientras que las posiciones de otros representantes de la familia *Vibrionaceae*, *Grimontia*, *Enterovibrio* y *Salinivibrio*, siempre se mantienen como *outgroup*. En todos los árboles la cepa M46^T aparece asociada a las especies *P. halotolerans* y *P. ganghwense*.

Los árboles filogenéticos de NJ obtenidos al analizar las secuencias de los genes *recA* y *gyrB* (Fig. 7) también presentan la cepa M46^T con *P. ganghwense* y *P. halotolerans* como vecinos más próximos. De la misma manera, el árbol de NJ basado en las secuencias de los tres genes concatenados (solo se han incluido las especies que tenían las secuencias de los tres genes disponibles) muestra la misma posición relativa de la cepa M46^T con sus vecinos filogenéticos más próximos.

Aunque no se observó luminiscencia, se comprobó la presencia de genes *lux* en el genoma de la cepa M46^T. Se amplificó y secuenció el gen *luxA* como describe Wimpee y col. (1991) con los cebadores modificados *luxAD*, CTWYTRGATCAAATGTCAAAAAGGWCGT y *luxAR*, CTTGGTTTTYGAAGCRAAYGGTTCWGA. Se utilizaron como cepas de referencia: *P. phosphoreum* CECT 4192^T, *P. leiognathi* CECT 4191^T, *P. halotolerans* CECT 5860^T y *P. ganghwense* CECT 7641^T. Se obtuvo un producto un de PCR de 700 bp para la cepa M46^T, *P. phosphoreum* CECT 4192^T dio un amplicón de 750 bp y *P. ganghwense* de 650 bp; mientras que para *P. leiognathi* CECT 4191^T siempre se obtuvo dos productos de PCR (de 500 y 1300 bp) inespecíficos, y en el caso de *P. halotolerans* CECT 5860^T no se obtuvo amplificado.

Los análisis realizados en BLAST revelaron que las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la cepa M46^T no presentaban similitud de secuencia con el gen *luxA* de otras especies de *Photobacterium*, mientras que *P. phosphoreum* CECT 4192^T dio el resultado esperado, el gen *luxA*, de acuerdo con su descripción (Wimpee y col., 1991). La secuencia aminoacídica de la cepa M46^T se relacionó con una

proteína de resistencia a acriflavina y otros transportadores de membrana de diversas especies de *Vibrio*, *Aliivibrio* y *Photobacterium*. Resultados similares se han observado en el caso de *P. iliopiscarium* (Ast y Dunlap, 2005), una especie no luminiscente de *Photobacterium*. La ausencia de producto del gen *luxA* es consistente con la ausencia de luminiscencia de la cepa M46^T.

La cepa M46^T fue crecida de forma rutinaria en MA y MB a 28 °C y todos los medios utilizados para la descripción fenotípica se suplementaron con ASW a mitad de concentración o con MCS. Las características fenotípicas se determinaron siguiendo métodos descritos previamente (Macián y col., 2001). Los requerimientos iónicos y el rango de salinidades, se determinaron como describe Macián y col. (2005). Además de los rasgos fenotípicos clásicos se utilizaron los siguientes sistemas miniaturizados: API ZYM, API 20E, API 50CHE y Biolog GN2. Las cepas tipo de *P. ganghwense* CECT 7641^T, *P. halotolerans* CECT 5860^T y *P. rosenbergii* CECT 7644^T fueron incluidas en la caracterización con fines comparativos. Los resultados de la caracterización fenotípica se detallan en la descripción de la especie y en la Tabla 21 (características diferenciales).

En MA y en LM las colonias de la cepa M46^T son de color beige y producen un pigmento marrón difusible observable en la primera estría tras 24 h de crecimiento, expandiéndose a todo el cultivo después de 48 h de incubación. El crecimiento en LM produjo colonias más opacas y el pigmento marrón más oscuro que el observado en MA. En el mismo medio (LM) la cepa tipo de *P. ganghwense* mostró un pigmento rosa que no se había observado en MA. La figura 8 muestra la producción de pigmentos de las cuatro cepas tipo utilizadas en el estudio comparativo.

La cepa M46^T creció en TCBS produciendo colonias verdes, por lo que se concluye que no es capaz de fermentar la sacarosa.



Figura 8: Cultivos de *P. aphoticum* CECT 7614^T, *P. ganghwense* CECT 7641^T, *P. halotolerans* CECT 5860^T y *P. rosenbergii* CECT 7644^T crecidas en LM (28 °C, 2 días). *P. aphoticum* y *P. ganghwense* producen un pigmento difusible marrón y rosa, respectivamente.

Otros carbohidratos (D-glucosa, D-galactosa y D-melibiosa) fueron fermentados en el medio OF medium. No se observó luminiscencia tanto en MA como en LM tras 24 h de incubación. La cepa M46^T tiene requerimientos de factores de crecimiento por lo que no creció en BMA con ninguno de los carbohidratos ensayados, mientras que presentó buen crecimiento en el control positivo, BMA con 5 g/L de extracto de levadura.

Tabla 21. Características fenotípicas diferenciales entre la cepa M46^T y las especies de *Photobacterium* filogenéticamente relacionadas.

Cepas: 1, M46^T; 2, *P. halotolerans* CECT 5860^T; 3, *P. ganghwense* CECT 7641^T; 4, *P. rosenbergii* CECT 7644^T; 5, *P. lutimaris* KCTC 12723^T; 6, *P. jeanii* LMG 25436^T y 7, *P. gaetbulicola* KCTC 22804^T. Todos los datos proceden de este estudio excepto para 5 (Jung y col., 2007), 6 (Chimetto y col., 2010) y 7 (Kim y col., 2010). +, positivo; –, negativo; nd, no determinado.

	1	2	3	4	5	6	7
Crecimiento a 4 °C	–	+	–	–	+	–	–
Crecimiento a 40 °C	–	–	+	–	+	–	+
Arginina dihidrolasa (API 20E)	+	–	+	+	+	+	–
Producción de indol (API 20E)	–	–	+	+	+	–	nd
Gelatinasa (API 20E)	–	+	+	–	–	+	–
Producción de ácido (API 20E):							
Inositol	–	–	+	+	+	–	+
Ramnosa	–	–	+	+	–	–	–
Sacarosa	–	+	–	+	+	–	+
Arabinosa	–	+	–	–	–	–	–
Melibiosa	+	–	–	+	–	+	+
Manitol	+	+	+	+	–	–	+
Fermentación de (API 50CH):							
D-xilosa	+	+	–	–	+	nd	nd
Esculina	+	–	–	+	nd	nd	nd
Salicina	–	–	+	+	nd	nd	nd
D-celobiosa	–	–	–	+	+	nd	nd
Actividades enzimáticas (API ZYM):							
Esterasa lipasa (C8)	–	–	+	+	+	+	nd
Cistina arilamidasa	–	–	–	–	+	–	–
Substratos oxidados en Biolog GN:							
Tween 40, Tween 80	–	+	+	+	+	nd	nd
Maltosa, D-manitol, D-trehalosa	–	+	+	+	+	nd	nd
Ác. cítrico, ác. succínico, glicerol	–	+	+	+	+	nd	nd
D-alanina, L-alanina, L-alanil-glicina, L-asparagina, ác. L-glutámico, L-prolina, L-serina, inosina, timidina	–	+	+	+	+	nd	nd

El análisis de ácidos grasos fue llevado a cabo en la CECT utilizando el método TSBA6 (MIDI, 2008). Las cepas M46^T, *P. ganghwense* CECT 7641^T, *P. halotolerans* CECT 5860^T y *P. rosenbergii* CECT 7644^T se incubaron en MA a 28 °C durante 24 h. Los ácidos grasos mayoritarios para las cuatro cepas fueron C_{16:1} ω7c (o ω6c), 37,2%; C_{18:1} ω7c (o ω6c), 13,4% y C_{16:0}, 10,1% (Tabla 22).

Tabla 22. Comparación de la composición de ácidos grasos de *Photobacterium aphoticum* M46^T y otras especies del género *Photobacterium*.
Cepas: 1, *P. aphoticum* M46^T; 2, *P. halotolerans* CECT 5860^T; 3, *P. ganghwense* CECT 7641^T; 4, *P. rosenbergii* CECT 7644^T; 5, *P. lutimaris* KCTC 12723^T; 6, *P. jeanii* LMG 25436^T y 7, *P. gaetbulicola* KCTC 22804^T. Todos los datos proceden de este estudio excepto para 5 (Jung y col., 2007), 6 (Chimetto y col., 2010) y 7 (Kim y col., 2010). –, no detectado; tr, traza (<1%).

Ácidos grasos (%):	1	2	3	4	5	6	7
Hidroxilados:							
C _{11:0} 2OH	-	-	-	-	-	-	2,8
C _{12:0} 3OH	2,5	6,8	3,9	3,2	2,6	3,2	2,8
C _{15:0} iso 3OH	1,0	tr	tr	1,1	-	-	-
Saturados:							
C _{12:0}	2,3	5,6	4,5	2,6	2,4	3,2	1,7
C _{13:0} iso	1,8	tr	tr	1,2	-	-	-
C _{14:0}	3,3	1,0	4,2	2,6	2,4	4,0	4,2
C _{15:0} iso	2,6	tr	tr	3,0	5,0	1,0	6,9
C _{15:0} anteiso	1,5	-	-	tr	-	-	-
C _{15:0}	-	-	-	-	2,1	-	2,9
C _{16:0} iso	1,7	1,9	tr	1,3	-	2,7	tr
C _{16:0}	10,1	16,5	14,7	10,4	13,1	20,7	14,0
C _{17:0} iso	1,5	tr	tr	3,8	1,8	-	3,5
C _{17:0} anteiso	2,4	tr	-	tr	-	-	-
C _{17:0}	1,1	2,7	1,2	1,5	-	-	1,0
Insaturados:							
C _{15:1} iso F	1,6	-	-	tr	-	-	-
C _{15:1} ω8c	2,5	tr	tr	tr	-	-	-
C _{16:1} ω7c alcohol	-	-	tr	-	1,2	-	tr
C _{17:1} ω8c	1,4	2,8	tr	1,3	-	-	tr
Sum In Feature:							
1 (C _{15:1} iso H / C _{13:0} 3OH)	1,1	1,0	tr	tr	-	-	-
2 (C _{14:0} 3OH/C _{16:1} iso I)	3,2	4,9	5,0	3,6	3,0	3,0	3,7
3 (C _{16:1} ω7c/C _{16:1} ω6c)	37,2	31,6	38,3	38,0	43,0	41,1	33,6
8 (C _{18:1} ω7c/C _{18:1} ω6c)	13,4	18,2	20,5	19,7	13,0	-	13,4 [†]
9 (C _{16:0} 10-metil/C _{17:1} iso ω9c)	2,2	-	tr	1,3	1,8 [†]	-	1,4 [†]

[†]Esto valores corresponden a la suma de las cantidades individuales aportadas en la bibliografía para cada ácido graso de la *sum in feature* 8 y 9, respectivamente.

Los resultados obtenidos a lo largo del estudio polifásico permiten proponer la cepa M46^T como una nueva especie del género *Photobacterium* y para la que se propone el nombre de *Photobacterium aphoticum* sp. nov. (Lucena y col., 2011).

Descripción de *Photobacterium aphoticum* sp. nov.

Photobacterium aphoticum (a.pho'ti.cum, Gr. pref. a no; Gr. n. *photo* luz; *aphoto* sin luz; M. L. *aphoticum*, referente al carácter no luminiscente de la especie).

Las células son Gram-negativas, bacilos móviles de 0,7-1,1 µm de ancho por 2,2-3,3 µm de largo. Quimioorganotrofo y anaerobio facultativo. Fermenta glucosa, así como galactosa y melibiosa, sin producir gas. Es positivo para la prueba de la oxidasa y la catalasa. La cepa crece en MA produciendo colonias regulares de 1,5-2 mm de diámetro tras 24 h a 28 °C con la producción de un pigmento marrón. No se observa luminiscencia en MA ni en LM. Crece en agar sacarosa con TCBS produciendo colonias verdes (sacarosa negativo). La cepa M46^T crece entre 15 y 37 °C y no a 4 o 40 °C. No se observa crecimiento en ausencia de NaCl. La cepa muestra buen crecimiento en el rango de 0,85 a 7% de sales totales, y no crece con 0,35% o menos, ni con 8% o más de salinidad. Reduce nitratos a nitritos, pero no a N₂. La cepa es positiva para arginina dihidrolasa (ADH), ONPG (orto-Nitrofenil-β-galactosido i.e. actividad β-galactosidasa) y para la hidrólisis de esculina y DNA, pero es negativa para la producción de indol a partir de triptófano, ureasa, Voges-Proskauer y la hidrólisis de gelatina, caseína, almidón, alginato, agar y Tween-80.

Produce ácido a partir de los siguientes carbohidratos (API 20E y API 50CHE): D-ribosa, D-xilosa, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, D-manitol, N-acetil D-glucosamina, D-maltosa, D-melibiosa y almidón.

Presenta las siguientes actividades enzimáticas en API ZYM: fosfatasa ácida y alcalina, leucina arilamidasa, β-galactosidasa y N-acetil-β-glucosaminidasa. La actividad α-glucosidasa es variable entre las réplicas.

No es capaz de asimilar ninguno de los sustratos incluidos en la tira API 20NE ni tampoco crece en ninguna de las fuentes únicas de carbono y energía ensayadas en BMA, que incluyeron 26

carbohidratos, 12 ácidos orgánicos y 16 aminoácidos, lo que indica que tiene requerimientos nutricionales que se cubren con el agar levadura del control positivo donde sí creció. Los sustratos oxidados en las placas Biolog GN2 tras 24 h de incubación son N-acetil-D-glucosamina, D-fructosa, D-glucosa y D-manosa. El resto de sustratos dan respuestas inconsistentes (D-galactosa y dextrina) o dan reacciones negativas.

Los ácidos grasos más abundantes son $C_{16:1}$ $\omega 7c/\omega 6c$ (37,2%); $C_{18:1}$ $\omega 7c/\omega 6c$ (13,4%) y $C_{16:0}$, (10,1%). Contiene cantidades menores (2-4%) de $C_{12:0}$ 3OH, $C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{15:1}$ $\omega 8c$, iso- $C_{15:0}$, anteiso- $C_{17:0}$, $C_{14:0}$ 3OH/iso- $C_{16:1}$ I y $C_{16:0}$ metil/iso- $C_{17:1}$ $\omega 9c$).

La cepa tipo es M46^T aislada de agua de mar costera y ha sido depositada en dos colecciones de cultivos, CECT 7614^T y KCTC 23057^T.

▪ **Estudio de la cepa MD5: *Tropicibacter multivorans* sp. nov.**

Esta cepa se aisló de una muestra de agua de mar superficial procedente de la playa de la Malvarrosa (Latitud 39° 28' 29" N; Longitud 0° 19' 23" W; temperatura 25 °C; pH 8) en Valencia, en julio de 2008. La cepa se aisló en MA diluido 1/100 [0,04% MB, 1,2% agar bacteriológico y agua de mar filtrada y envejecida para mantener la concentración de sales].

Después de completar la secuencia del gen 16S rRNA de la cepa MD5^T (1405 pb) se llevó a cabo el estudio filogenético mediante el análisis comparativo de la secuencia y su alineamiento con respecto a otras secuencias publicadas. Todo ello permitió obtener una matriz de semejanza de la que se han extraído los porcentajes superiores al 95% de similitud y que se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 23: Porcentajes de semejanza obtenidos al comparar las secuencias del gen 16S rRNA de la cepa MD5^T con las secuencias de las cepas tipo más relacionadas filogenéticamente.

Cepa	Nº acceso de secuencia	MD5 ^T (% similitud)
MD5 ^T	FR727679	100
<i>Tropicibacter naphthalenivorans</i> CO2 ^T	AB302370	96,9
<i>Phaeobacter inhibens</i> T5 ^T	AY177712	96,2
<i>Phaeobacter gallaeciensis</i> BS107 ^T	Y13244	96,1
<i>Phaeobacter daeponensis</i> TF-218 ^T	DQ981486	96,1
<i>Phaeobacter caruleus</i> LMG 24369 ^T	AM943630	96,1
<i>Shimia marina</i> CL-TA03 ^T	KCCM 42117	95,9
<i>Nautella italica</i> LMG 24365 ^T	AM904562	95,7
<i>Marinovum algicola</i> ATCC 51440 ^T	X78315	95,7
<i>Leisingera aquimarina</i> LMG 24366 ^T	AM900415	95,6
<i>Phaeobacter articus</i> 20188 ^T	DQ514304	95,2

La cepa MD5^T mostró el valor más alto de similitud de secuencia del gen 16S rRNA, 96,9%, con *T. naphthalenivorans* CO2^T por lo que se ha descrito y caracterizado como un nuevo miembro del género *Tropicibacter*. El género *Tropicibacter* (Harwati y col., 2009) que pertenece a la familia *Rhodobacteraceae*, está formado por una única especie, *Tropicibacter naphthalenivorans* CO2^T, aislada a partir de agua de mar en Indonesia.

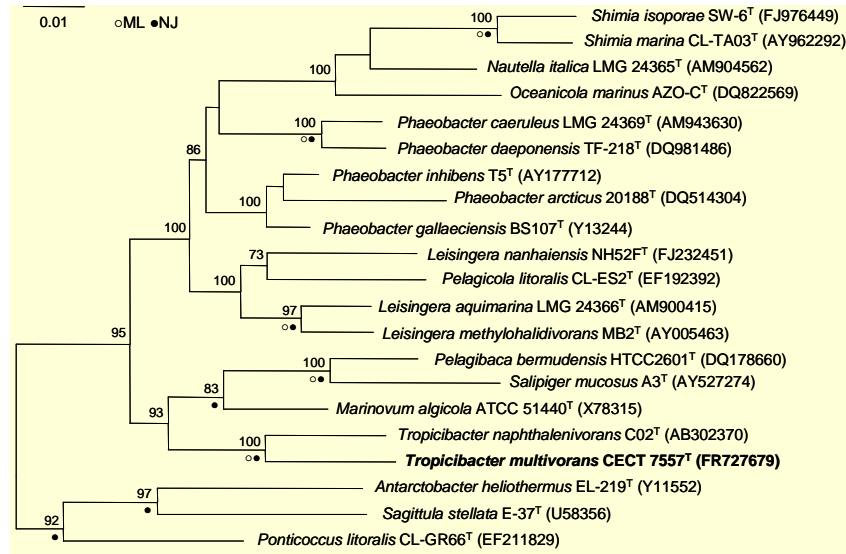


Fig.9: Árbol filogenético basado en la secuencia casi completa del gen 16S rRNA mediante el algoritmo Máxima Parsimonia (MP) en el que se muestra la posición de la cepa *Tropicibacter multivorans* MD5^T (= CECT 7557^T) y las especies más cercanas. El número de acceso de las secuencias se muestra entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o superiores a 70% como porcentaje de 1000 réplicas. Los nodos coincidentes con los obtenidos por ML y NJ se indican por un círculo blanco y un círculo negro, respectivamente. Barra, número de cambios nucleotídicos por sitio.

Dentro de la caracterización genotípica se analizó la composición global de bases del genoma. Este análisis se llevó a cabo en el Servicio de Identificación de la DSMZ. El contenido en bases G+C del DNA de la cepa MD5^T fue de 60,7 mol%.

La caracterización fenotípica de la cepa MD5^T incluyó la caracterización quimiotaxonómica, además del estudio de las características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y nutricionales.

La morfología celular, movilidad y flagelos se observó en el microscopio de contraste de fases pudiendo precisar que se trataba de bacilos regulares móviles por flagelos polares. El tamaño celular se determinó mediante microscopía electrónica de barrido (SCSIE, Universidad de Valencia). Además, las muestras se examinaron en el microscopio electrónico de transmisión (Fig. 10).

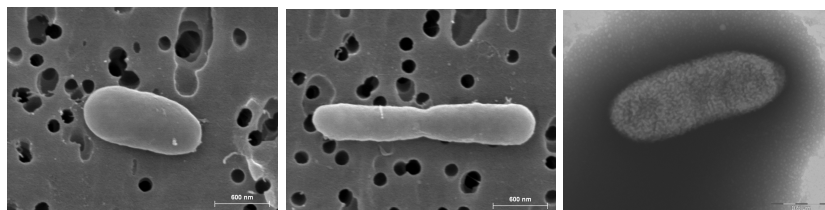


Figura 10: Micrografías electrónicas de barrido y transmisión que muestran la morfología celular de la cepa MD5^T.

Los resultados de la caracterización fenotípica se detallan en la posterior descripción de la cepa y en la Tabla 24, donde se muestran las características que diferencian a la cepa MD5^T de la especie más cercana filogenéticamente, *T. naphthalenivorans*.

Tabla 24: Características diferenciales entre MD5^T y *T. naphthalenivorans* CECT 7648^T. Todos los resultados proceden de este estudio. +, positivo; -, negativo.

Cepas: 1, Cepa MD5^T; 2, *T. naphthalenivorans* CECT 7648^T.

	1	2
Crecimiento a 40 °C	-	+
Requerimiento específico de Mg ²⁺	-	+
Asimilación (API 20NE):		
D-glucosa	+	-
D-maltosa	+	-
Adipato	+	-
Malato	+	-
Actividades enzimáticas (API ZYM):		
α-glucosidasa	+	-
β-glucosidasa	-	+
Fuentes únicas de carbono y energía (BMA):		
D-ribosa, D-xilosa, D-manosa, D-celobiosa, D-manitol, D-sorbitol, <i>m</i> -inositol	+	-
Acetato, piruvato, propionato, butirato, malato, 3-hidroxiacetato	+	-
L-leucina, L-treonina, L-glutamato, L-alanina, L-arginina, L-ornitina, L-aspartato, L-histidina	+	-

El análisis para determinar la composición de quinonas se llevó a cabo en el Servicio de Identificación de la DSMZ. El tipo de quinona respiratoria de la cepa MD5^T fue la ubiquinona con diez unidades isoprenoides (Q-10), que es el tipo de quinona descrita en la única especie que forma el género *Tropicibacter* (Harwati y col., 2009).

El perfil de ácidos grasos se determinó en la CECT usando el método RTSBA6 del sistema MIDI. Las cepas se cultivaron en MA y fueron incubadas a 28 °C durante 48 h. Los ácidos grasos mayoritarios para las cepas MD5^T y *T. naphthalenivorans* CECT 7648^T fueron C_{18:1}ω7c y/o C_{18:1}ω6c. Sin embargo el perfil de ácidos grasos de la cepa MD5^T permite diferenciarla de *T. naphthalenivorans* CECT 7648^T como se muestra en la Tabla 25 ya que contiene los ácidos grasos C_{10:0} 3OH, C_{12:0} 3OH y C_{16:0} 2OH pero no C_{12:1} 3OH ni C_{18:1} ω9c.

La determinación de los lípidos polares de las cepas MD5^T y *T. naphthalenivorans* CECT 7648^T también se realizó en la CECT. Ambas cepas muestran un perfil muy similar siendo la fosfatidiletanolamina, el fosfatidilglicerol y la fosfatidilcolina los componentes mayoritarios (Fig. 11).

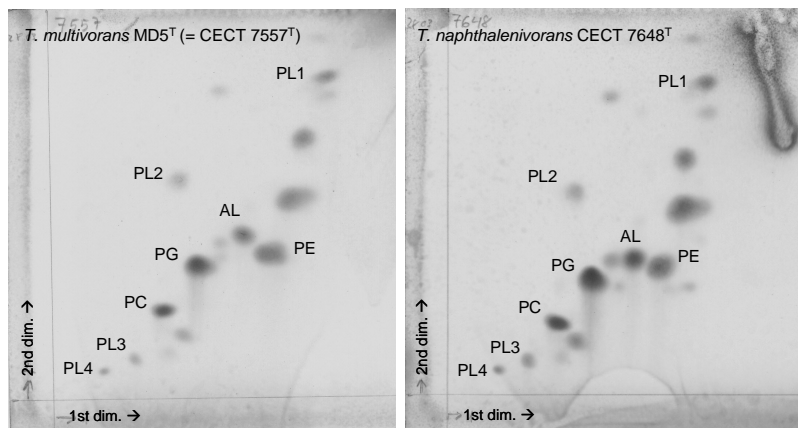


Figura 11: Perfil de los lípidos polares de las cepas MD5^T y *T. naphthalenivorans* CECT 7648^T mediante TLC. PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; PG, fosfatidilglicerol; AL, aminolípido; PL1-4, fosfolípidos no conocidos. El resto de manchas corresponden a lípidos que no reaccionan de forma específica con los reactivos utilizados.

Tabla 25. Comparación en la composición de ácidos grasos celulares de *Tropicibacter multivorans* MD5^T y las especies filogenéticamente relacionadas (crecidas en MA, 48h, 28 °C). Todos los datos obtenidos proceden de este estudio. -, no detectado; tr, cantidades traza (<1%). No se muestran los ácidos grasos con cantidades traza o no detectables en todas las cepas.

Cepas: 1, *T. multivorans* MD5^T; 2, *T. naphthalenivorans* CECT 7648^T; 3, *Phaeobacter inhibens* CECT 7251^T; 4, *P. gallaeciensis* CECT 7277^T; 5, *P. daeponensis* CECT 7309^T; 6, *Shimia marina* CECT 7688^T y 7, *Nautella italica* CECT 7645^T.

Ácidos grasos (%)	1	2	3	4	5	6	7
Hidroxilados:							
C _{10:0} 3OH	4,8	-	2,4	2,6	2,5	9,5	2,9
C _{12:0} 3OH	1,0	-	1,8	2,4	2,4	2,4	2,4
C _{12:1} 3OH	-	3,4	-	-	-	-	-
C _{16:0} 2OH	3,8	-	1,7	3,4	3,1	-	1,2
C _{18:0} 3OH	-	-	-	-	-	1,1	-
Saturados:							
C _{9:0}	tr	1,5	-	tr	-	-	-
C _{14:0}	tr	2,1	tr	tr	tr	tr	tr
C _{16:0}	8,2	7,4	7,2	9,0	2,3	6,2	4,0
C _{18:0}	2,7	6,9	1,7	3,3	1,0	1,9	1,2
C _{18:0} iso	-	-	-	tr	3,8	-	4,7
Insaturados:							
C _{18:1} ω7c 11-methyl	5,3	1,8	8,6	8,1	9,7	2,2	1,3
C _{18:1} ω9c	-	1,3	-	-	-	-	-
Sum In Feature:							
8 (C _{18:1} ω7c/C _{18:1} ω6c)	70,9	73,5	73,7	68,0	71,6	69,5	81,0

Dentro del estudio polifásico del nuevo aislado, se realizó el análisis de proteínas por espectrometría de masas, MALDI-TOF MS en la CECT. El dendrograma obtenido (Fig. 12) muestra la separación clara de las cepas MD5^T y *T. naphthalenivorans* CECT 7648^T, tanto entre ellas como del resto de géneros relacionados, *Phaeobacter*, *Nautella* y *Shimia*.

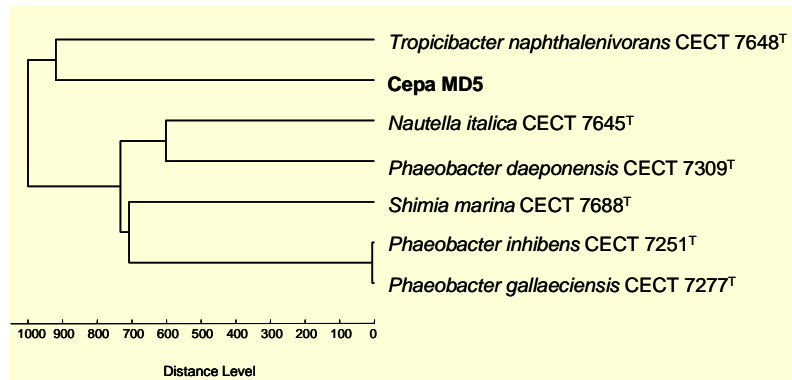


Figura 12: Dendrograma de distancias obtenido por análisis de MALDI-TOF MS de *T. naphthalenivorans* CECT 7648^T, *P. inhibens* CECT 7251^T, *P. gallaeciensis* CECT 7277^T, *P. daeponensis* CECT 7309^T, *S. marina* CECT 7688^T y *Nautella italica* CECT 7645^T en la que se muestra la posición de la cepa MD5^T (= *Tropicibacter multivorans* CECT 7557^T).

El conjunto de datos obtenidos permiten sostener que la cepa MD5^T es una nueva especie dentro del género *Tropicibacter* para la que se propone el nombre de *Tropicibacter multivorans* sp. nov. (Lucena y col., 2012).

Descripción de *Tropicibacter multivorans* sp. nov.

Tropicibacter multivorans (mul'ti.vor.ans. L. adj. *multus* muchos, numerosos; L. v. *vorare* devorar; N. L. part. adj. *multivorans*, referido a la utilización de numerosos sustratos diferentes para crecer).

Se trata de células Gram negativas, móviles por flagelos polares y de forma bacilar (2-2,5 µm de largo y 0,5-1 µm de ancho). Es aerobia y quimioorganótrofa. Oxidasa y catalasa positiva. La cepa MD5^T no produce ácido en el medio O/F (adicionado con MCS) a partir de D-glucosa tanto en condiciones aerobias como anaerobias. Las células no contienen polihidroxibutirato (PHB). No fermenta carbohidratos y es negativo para la reducción de nitratos.

La cepa crece en MA produciendo colonias regulares de 1 mm de diámetro tras 24 h de incubación a 28 °C. Es capaz de crecer entre 15 y 37 °C pero no a 4 o 40 °C. Necesita Na⁺ y cationes divalentes (Mg²⁺ o Ca²⁺) para crecer, obteniéndose un buen crecimiento entre el 1,7 y el 7% de sales totales en el medio. Sin embargo, no se observa crecimiento con 0,35% o menos, ni con el 8% o más de salinidad.

No es capaz de hidrolizar gelatina, caseína, almidón, alginato, agar y Tween-80 después de 1 semana de incubación. La hidrólisis de DNA se produjo en medio agar DNasa suplementado con MCS, aunque los halos de hidrólisis que se observaron eran pequeños.

En las tiras API 20NE es positiva para la hidrólisis de urea y esculina, la enzima β -galactosidasa (PNPG), la asimilación de D-glucosa, D-maltosa, adipato y malato; y negativa para la reducción de nitratos, la producción de indol a partir de triptófano, fermentación de D-glucosa, arginina dihidrolasa (ADH), hidrólisis de gelatina y asimilación de L-arabinosa, D-manosa, N-acetil-glucosamina, gluconato y caprato. La asimilación de D-manitol, citrato y fenilacetato es variable.

Presenta las siguientes actividades enzimáticas en API ZYM: fosfatasa ácida y alcalina, leucina arilamidasa y α -glucosidasa. El resto de actividades son negativas.

Utiliza los siguientes compuestos como fuentes únicas de carbono y energía en agar BMA: D-ribosa, D-xilosa, D-glucosa, D-fructosa, D-galactosa, D-manosa, D-celobiosa, D-glicerol, D-manitol, D-sorbitol, *m*-inositol, acetato, piruvato, propionato, butirato, citrato, 2-oxoglutarato, succinato, fumarato, malato, lactato, 3-hidroxi-butilato, L-leucina, D-serina, L-treonina, L-glutamato, L-alanina, L-arginina, L-tirosina, L-ornitina, L-aspartato y L-histidina. No utiliza los siguientes ácidos orgánicos, aminoácidos y carbohidratos como fuentes únicas de carbono y energía: L-arabinosa, D-trehalosa, L-ramnosa, maltosa, sacarosa, lactosa, D-melibiosa, amigdalina, salicina, N-acetil-D-glucosamina, D-gluconato, D-glucuronato, D-galacturonato, D-glicerato, D-sacarato, t-aconitato, glicina, L-citrulina, γ -aminobutirato, L-lisina, L-sarcosina y putrescina.

La oxidación de sustratos en las microplacas de Biolog GN2 tras 48h de incubación fue negativa o dudosa para todos los sustratos.

Los ácidos grasos mayoritarios son $C_{18:1} \omega 7c / C_{18:1} \omega 6c$ (70,9%); $C_{16:0}$ (8,2%); 11-metil $C_{18:1} \omega 7c$ (5,3%) y $C_{10:0} 3OH$ (4,8%).

Los lípidos polares mayoritarios detectados incluyen la fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, un aminolípido y cuatro fosfolípidos no identificados. La quinona respiratoria es Q-10.

El contenido en bases G+C del DNA es 60,7 mol% (HPLC).

La cepa tipo aislada de agua de mar superficial en la playa de la Malvarrosa es MD5^T = CECT 7557^T = KCTC 23350^T.

▪ **Estudio de la cepa R46: *Actibacterium mucosum* gen. nov., sp. nov.**

La cepa R46^T se aisló de agua de mar superficial recogida en la playa de la Malvarrosa (Valencia, Latitud 39° 28' 29" N; Longitud 0° 19' 23" W; temperatura 25 °C; pH 8,0) en julio de 2008. El agua de mar se sembró directamente en R2A marino a 26 °C durante 8 días. Transcurrido este tiempo se seleccionaron y aislaron las colonias resemebrándolas en el mismo medio hasta obtener el cultivo puro.

El análisis de la secuencia del gen 16S rRNA (1412 bp) de la cepa R46^T sugería que la cepa podría representar un nuevo taxón dentro de *Alphaproteobacteria* junto a otras especies de *Roseobacter* spp. y otras bacterias marinas relacionadas, por lo que el nuevo aislado fue sometido a un estudio polifásico incluyendo la caracterización clásica, bioquímica y fisiológica, así como análisis quimiotaxonómicos y filogenéticos.

Tabla 26: Porcentajes de semejanza obtenidos al comparar la secuencia del gen 16S rRNA de la cepa R46^T con las secuencias de las cepas tipo más relacionadas filogenéticamente.

Cepa	Nº acceso de secuencia	R46 ^T (% similitud)
R46 ^T	HE590855	100
<i>Pseudoruegeria aquimaris</i> SW-255 ^T	DQ675021	94,3
<i>Jannaschia donghaensis</i> DSW-17 ^T	EF202612	94,1
<i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL 12 ^T	AJ534211	93,8
<i>Jannaschia seosinensis</i> CL-SP26 ^T	AY906862	93,7
<i>Litoreibacter albidus</i> KMML-3842 ^T	AB518881	93,7
<i>Celeribacter neptunius</i> H14 ^T	FJ535354	93,6
<i>Roseovarius crassostreae</i> CV919-312 ^T	AF114484	93,6
<i>Jannaschia rubra</i> 4SM3 ^T	AJ748747	93,3
<i>Jannaschia helgolandensis</i> Hel 10 ^T	AJ438157	93,3
<i>Thalassobacter stenotrophicus</i> CECT 5294 ^T	AJ631302	93,3
<i>Maribius salinus</i> CL-SP27 ^T	AY906863	93,2
<i>Palleronia marisminoris</i> B33 ^T	AY926462	93,1

En primer lugar se realizaron los análisis filogenéticos empleando los algoritmos MP, ML y matrices de distancia utilizando herramientas específicas de ARB (Ludwig y col., 2004) y la secuencia casi completa (1412 bp) del gen 16S rRNA y parcial (1000 bp) del gen

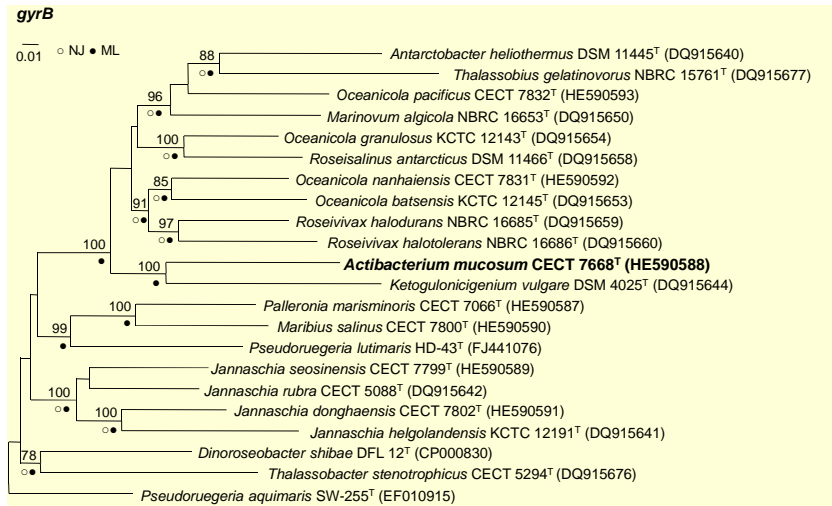
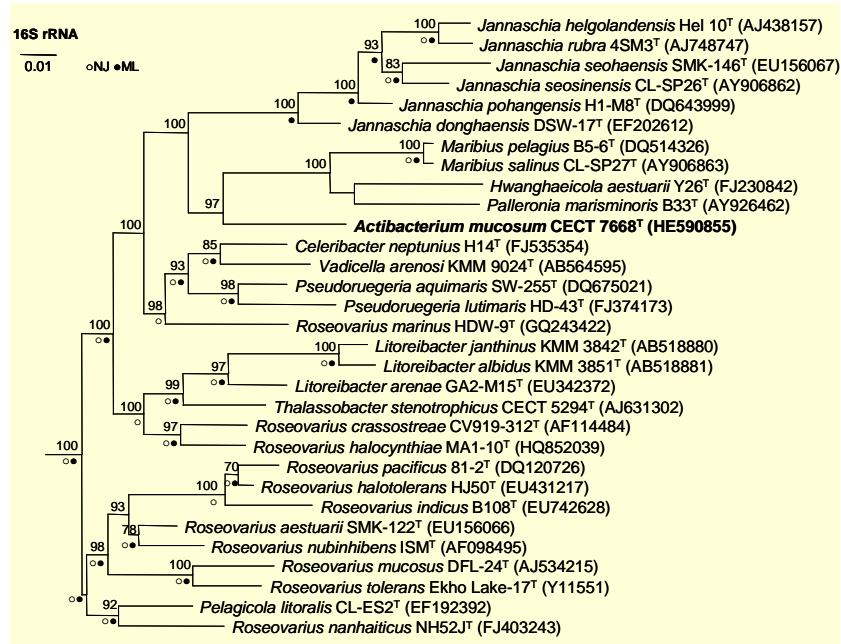
gyrB. Para ello también se amplificó y secuenció el gen *gyrB* de las cepas *Palleronia marisminoris* CECT 7066^T, *Jannaschia seosinensis* CECT 7799^T, *Maribius salinus* CECT 7800^T; *Jannaschia donghaensis* CECT 7802^T, *Oceanicola nanhaiensis* CECT 7831^T y *Oceanicola pacificus* CECT 7832^T, cuyas secuencias fueron depositadas en la base de datos EMBL (HE590587-HE590593).

El análisis de la secuencia del gen 16S rRNA evidenció que la cepa tipo *Pseudoruegeria aquimaris* SW-255^T mostraba el mayor porcentaje de similitud de secuencia, 94,3%, con la cepa R46^T, mientras que *J. donghaensis* DSW-17^T mostraba el 94,1%. El resto de miembros de la familia *Rhodobacteraceae* presentaban similitudes inferiores al 94,0%. Por otro lado, la secuencia del gen *gyrB* de la cepa R46^T mostró similitudes inferiores al 80,0% al comparar con las secuencias disponibles del gen *gyrB* para especies pertenecientes a la familia *Rhodobacteraceae*, con la excepción de *R. nubinihibens*, que fue del 80,3%.

Los análisis filogenéticos llevados a cabo mediante los tres algoritmos (NJ, MP and ML) de los dos genes, 16S rRNA y *gyrB* genes, sitúan en todos los casos la cepa R46^T como una rama separada del resto. Fig. 13 muestra el árbol obtenido mediante el algoritmo MP, mientras que los árboles obtenidos por NJ y ML se encuentran en el Anexo II.

Las siguientes cepas tipo fueron incluidas en el estudio y analizadas en las mismas condiciones metodológicas: *Jannaschia rubra* CECT 5088^T, *Thalassobacter stenotrophicus* CECT 5294^T, *P. marisminoris* CECT 7066^T, *Pseudoruegeria aquimaris* CECT 7680^T, *J. seosinensis* CECT 7799^T, *J. donghaensis* CECT 7802^T, *M. salinus* CECT 7800^T y *Jannaschia helgolandensis* DSM 14858^T.

Figura 13: Árboles obtenidos mediante MP basados en la secuencia (1412 bp) del gen 16S rRNA y la secuencia parcial (~900 nt) del gen *gyrB* de la cepa *Actibacterium mucosum* R46^T (=CECT 7668^T) y especies relacionadas. Los números de acceso de las secuencias se muestran entre paréntesis. Los valores de bootstrap superiores al 70% se muestran (porcentaje de 1000 réplicas) junto a los nodos. Además, los nodos coincidentes con los árboles de ML y NJ se indican por un círculo negro y un círculo blanco, respectivamente. Barra, número de sustituciones por posición.



La morfología celular y la movilidad de la cepa R46^T se observó en fresco con el microscopio de contraste de fases. La suspensión utilizada se hizo en ASW a mitad de concentración. Las células crecidas en MA durante 48 h presentaban una morfología bacilar y no eran móviles. No se observó acumulación de gránulos de PHB cuando se realizó la tinción con Nile Blue A (Smibert and Krieg, 2007) en células crecidas en MA y en BMA más piruvato durante 7 días a 25 °C. Se utilizó la cepa *T. stenotrophicus* CECT 5294^T como control positivo.

El tamaño y morfología celular también se determinó mediante microscopía electrónica de barrido (SCSIE, Universidad de Valencia). La cepa R46^T mostró una morfología celular entre ovoide y bacilar (Fig. 14), con una tendencia moderada a la agregación. El tamaño celular fue de 0,2-0,5 µm de ancho y 0,6-1,4 µm de largo.

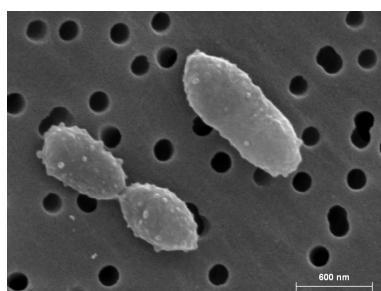


Figura 14: Micrografía electrónica de barrido que muestra la morfología celular de la cepa R46^T.

Las células se lisaron fácilmente cuando fueron resuspendidas en una solución de KOH al 3% (p/v), indicando que se trataba de una cepa Gram negativa. La cepa R46^T creció en MA formando colonias regulares, mucosas, no pigmentadas y no luminescentes.

El perfil bioquímico y fisiológico de la cepa, así como de las cepas tipo de referencia, se analizó por duplicado en dos ensayos independientes. La habilidad para crecer a diferentes temperaturas se comprobó en MA incubado a 4 y 15 °C (15 días), 28, 37, 40 y 45 °C (48 h). La cepa creció entre 15 y 37 °C de temperatura, mientras que no se observó crecimiento a 4 °C ni a 40 °C. Los requerimientos iónicos se estudiaron en STA suplementado con una combinación de sales que evidenció unos requerimientos complejos por parte de la cepa R46^T, ya que no crecía en medios adicionados sólo con NaCl o KCl, ni con las combinaciones de Na⁺ y Mg⁺, Na⁺ y Ca²⁺ o Na⁺ y K⁺ clorados. Se obtuvo buen crecimiento STA suplementado con NaCl, CaCl₂, KCl y MgSO₄ o con la combinación de sales marinas completa

(como en MA o medios basados en seawater). El rango de salinidad que permitió el crecimiento en MA fue 1-5% (p/v) salinidad total.

Tabla 27. Características diferenciales entre la cepa R46^T y especies relacionadas.

Cepas: 1, *Actibacterium mucosum* R46^T; 2, *P. aquimaris* CECT 7680^T; 3, *J. donghaensis* CECT 7802^T; 4, *J. helgolandensis* DSM 14858^T; 5, *J. rubra* CECT 5088^T; 6, *J. seosinensis* CECT 7799^T; 7, *P. marisminoris* CECT 7066^T y 8, *M. salinus* CECT 7800^T. Todos los datos proceden de este estudio.

	1	2	3	4	5	6	7	8
Color de la colonia	Beige	Amarillo	Naranja	Naranja	Rojo	Rojo	Rosa	Beige
Movilidad	-	-	-	-	+	+	-	-
Crecimiento a 37 °C	+	+	-	-	+	+	+	+
Crecimiento a 0,25% salinidad	-	+	-	+	+	+	+	+
Crecimiento a 6% salinidad	-	+	-	-	+	+	+	+
Asimilación (API 20NE):								
D-Glucosa	-	+	-	-	+	-	-	-
D-Mannosa	-	+	-	-	+	-	-	-
D-Manitol	-	+	-	+	+	-	+	-
D-Maltosa	-	+	-	-	-	-	+	-
Adipato	-	+	-	-	+	-	+	-
Malato	-	+	-	+	-	-	+	-
Citrato	-	+	-	+	-	-	+	-
Hidrólisis de:								
DNA	-	-	-	+	-	+	-	-
Almidón	-	-	-	+	-	+	-	-
Gelatina	+	-	-	-	-	-	-	-
Actividad enzimática:								
Fosfatasa alcalina	+	+	+	+	+	+	+	-
Fosfatasa ácida	-	+	+	+	+	-	+	-
α-Galactosidasa	-	-	-	-	+	-	-	-
N-Acetil-β-glucosaminidasa	-	+	-	-	-	-	-	-
α-Glucosidasa	-	-	-	-	+	-	+	-
DNA G+C (mol%)	61,3	67 [†]	65,2 [†]	63,1 [‡]	64,6 [§]	63,0	64,2 [¶]	66,7 [#]

Datos de [†]Yoon y col. (2007a); [‡]Yoon y col. (2007b); [§]Wagner-Döbler y col. (2003); ^{||}Macián y col. (2005b); [¶]Choi y col. (2006); [#]Martínez-Checa y col. (2005); [#]Choi y col. (2007).

La cepa R46^T fue positiva para las pruebas de la catalasa y la oxidasa. Por otro lado, no fue capaz de fermentar glucosa en el medio O/F suplementado con ASW, ni de producir ácido a partir de glucosa en condiciones aeróbicas. El resto de resultados de características

fenotípicas se detallan en la descripción de la especie y en las Tablas 27 y 28.

El contenido en bases G+C del DNA y la composición de quinonas y de lípidos polares de la cepa R46^T se llevó a cabo en el Servicio de Identificación de la DSMZ. El contenido en G+C del DNA es 61,3 mol%. El tipo de quinona respiratoria de la cepa R46^T es la ubiquinona con diez unidades isoprenoides (Q-10), lo que está en consonancia con los datos bibliográficos de otros miembros del clado *Roseobacter*. El análisis de los lípidos polares reveló fosfatidilglicerol y siete lípidos no identificados.

La composición de los ácidos grasos se llevó a cabo en la CECT usando el método RTSBA6 del sistema MIDI. Las cepas se cultivaron en MA y fueron incubadas a 28 °C durante 48 h. Se detectaron doce ácidos grasos diferentes en la cepa R46^T, dos hidroxilados, seis saturados y cuatro insaturados. El componente mayoritario fue C_{18:1}, que suponía un 75,3% del total, concordante con todas las especies analizadas en el grupo *Roseobacter*. El resto de componentes se muestran en la Tabla 28, junto con los resultados obtenidos en paralelo para otras especies filogenéticamente relacionadas. La presencia de C_{12:0} 3OH en una cantidad apreciable (4,6%) es un rasgo distintivo del perfil de ácidos grasos de la cepa R46^T (*Actibacterium mucosum* CECT 7668^T).

Tabla 28. Comparación de la composición de los ácidos grasos de la cepa *Actibacterium mucosum* R46^T y las especies relacionadas (crecidas en MA, 48h, 28 °C). Todos los datos obtenidos proceden de este estudio. -, no detectable; tr, cantidades traza (<1%). No se muestran los ácidos grasos con cantidades traza o no detectable en todas las cepas.

Cepas: 1, *Actibacterium mucosum* R46^T; 2, *P. aquimaris* CECT 7680^T; 3, *J. donghaensis* CECT 7802^T; 4, *J. helgolandensis* DSM 14858^T; 5, *J. rubra* CECT 5088^T; 6, *J. seosinensiss* CECT 7799^T; 7, *P. marisminoris* CECT 7066^T; 8, *M. salinus* CECT 7800^T y 9, *T. stenotrophicus* CECT 5294^T.

Ácidos grasos (%)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Hidroxilados									
C _{10:0} 3OH	8,1	4,5	4,0	7,2	3,5	3,4	3,8	6,1	5,0
C _{12:0} 3OH	4,6	-	-	-	-	-	-	-	-
Saturados									
C _{9:0}	-	-	-	1,1	tr	-	-	-	-
C _{12:0}	1,0	tr	-	tr	tr	-	-	Tr	tr
C _{14:0}	tr	tr	-	1,7	tr	-	1,4	-	1,0
C _{16:0}	8,3	tr	tr	3,2	2,5	1,0	2,7	4,3	1,7
C _{17:0}	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	1,6	2,2
C _{18:0}	1,4	4,1	5,4	9,6	7,9	6,0	3,1	2,3	2,8
C _{18:0} iso	-	-	tr	-	tr	-	1,9	-	19,6
C _{19:0}	-	-	2,6	1,0	-	tr	-	-	-
C _{19:0} cyclo ω8c	-	1,4	-	15,1	-	-	14,7	5,4	-
Insaturados									
C _{17:1} iso ω5c	-	tr	-	-	-	-	-	-	-
C _{17:1} iso ω9c	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2
C _{18:1} ω7c 11-methyl	1,3	3,0	3,9	4,9	tr	-	-	4,0	2,5
C _{18:1} iso H	-	-	-	-	8,8	-	-	-	-
C _{18:1} ω9c	-	-	-	-	-	-	-	-	2,7
C _{20:1} ω7c	tr	tr	2,8	tr	tr	tr	-	-	-
C _{20:1} ω6,9c	-	-	-	1,2	tr	-	1,0	-	-
Sum In Feature:									
2 (C _{14:0} 3OH / C _{16:1} iso I)	-	-	-	2,5	tr	1,6	-	-	-
3 (C _{16:1} ω7c / C _{16:1} ω6c)	tr	tr	-	-	tr	tr	-	Tr	1,0
7 (C _{19:1} ω7c / C _{19:1} ω6c)	-	-	1,4	1,3	-	-	-	1,6	tr
8 (C _{18:1} ω7c / C _{18:1} ω6c)	73,1	81,9	77,1	49,2	72,1	85,5	70,7	73,4	59,0

El dendrograma obtenido mediante MALDI-TOF MS evidencia que la cepa R46^T (*Actibacterium mucosum* CECT 7668^T) se separa claramente de las siguientes cepas tipo filogenéticamente relacionadas: *J. helgolandensis* DSM 14858^T, *J. rubra* CECT 5088^T, *J. seosinensis* CECT 7799^T, *J. donghaensis* CECT 7802^T, *M. salinus* CECT 7800^T, *P. marisminoris* CECT 7066^T, *Phaeobacter inhibens* CECT 7251^T, *Phaeobacter gallaeciensis* CECT 7277^T, *Phaeobacter daeponensis* CECT 7309^T, *Roseobacter litoralis* CECT 5395^T, *Roseobacter denitrificans* CECT 5011^T, *Roseovarius crassostreae* CECT 7676^T, *Roseovarius aestuarii* CECT 7745^T, *Roseovarius tolerans* CECT 7738^T, *Roseovarius nubinhibens* CECT 7750^T, *P. aquimaris* CECT 7680^T y *T. stenotrophicus* CECT 5294^T, como se observa en la Fig. 15.

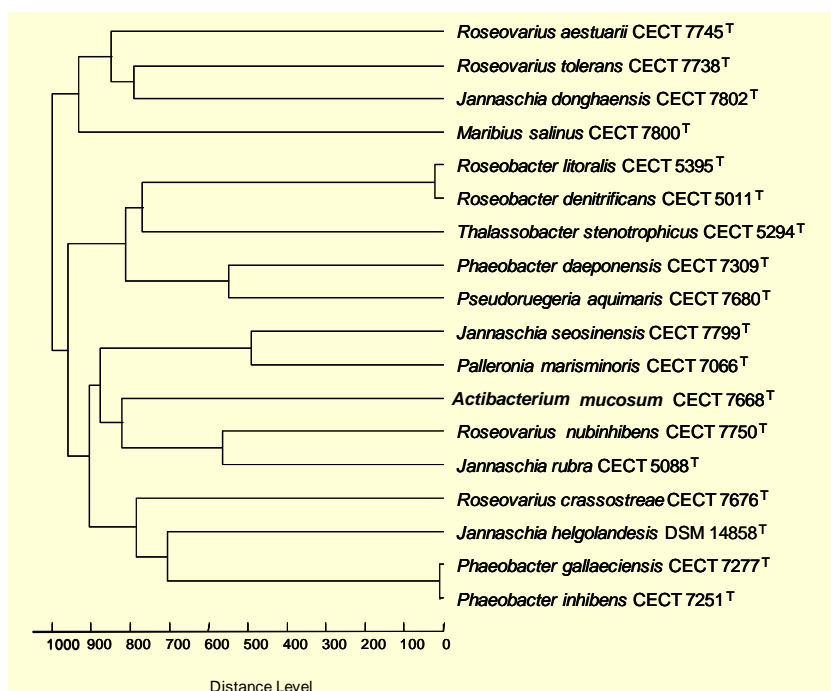


Figura 15: Dendrograma de distancias realizado mediante del análisis de MALDI-TOF MS de la cepa R46^T (*Actibacterium mucosum* CECT 7668^T) y las especies relacionadas.

El conjunto de datos obtenidos apoyan la propuesta de un nuevo género y una nueva especie siendo *Actibacterium mucosum* gen. nov. sp. nov. el nombre propuesto y la cepa R46^T (= CECT 7668^T = KCTC 23349^T) la cepa tipo (Lucena y col., 2012b).

Descripción de *Actibacterium* gen. nov.

Actibacterium (Ac.ti.bac.te'rium. L. n. *acta,ae*, costa, orilla; -i- vocal conectora; L. neut. n. *bacterium*, bacilo. N.L. masc. n. *Actibacterium*; bacilo procedente de la costa).

Aeróbio quimioorganótrofo con requerimientos iónicos complejos. Es positivo para la prueba de la oxidasa y la catalasa. No acumula PHB. El lípido polar mayoritario es fosfatidil glicerol y los ácidos grasos mayoritarios son C_{18:1} ω7c/C_{18:1} ω6c. La quinona respiratoria es Q10. El contenido molar en G+C de la especie tipo es 61,3 mol%.

La especie tipo es *Actibacterium mucosum*.

Descripción de *Actibacterium mucosum* sp. nov.

Actibacterium mucosum (mu.co'sum. L. masc. adj. *mucosum*, viscoso, mucoso, una propiedad de las colonias).

Además de las características incluidas en la descripción del género, la especie muestra los siguientes rasgos: las células no son móviles y presentan una forma bacilar ovalada (0,6 - 1,4 μm de largo y 0,2 - 0,5 μm de ancho). Crece en MA formando colonias regulares mucosas no pigmentadas que miden 2 mm de diámetro tras 4 días de incubación a 28 °C. Se observa crecimiento entre 15 y 37 °C pero no a 4 o 40 °C. Para un crecimiento óptimo requiere de iones Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ y SO₄²⁻ o la adición agua de mar al medio de cultivo. El rango de salinidad en el que se observó crecimiento en MA es del 1,7% al 5%, no se produjo crecimiento al 6% o más ni por debajo del 1% de salinidad.

No es capaz de fermentar carbohidratos ni de reducir nitratos a nitritos o N₂. También es negativo para las siguientes actividades: arginina dihidrolasa (ADH), producción de indol a partir de triptófano, PNPG, ureasa, hidrólisis de esculina, caseína, almidón, alginato, lecitina, DNA, esterasa (C4), esterasa lipasa (C8), lipasa (C14), cistina arilamidasa, tripsina, α-quimiotripsina, fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa, α-galactosidasa, β-galactosidasa, β-glucuronidasa, α-glucosidasa, N-acetil-β-glucosaminidasa, α-

manosidasa y α -fucosidasa. Hidroliza la gelatina tras 2 días de incubación. Es positivo o débilmente positivo para la fosfatasa alcalina y la leucina arilamidasa.

La cepa R46^T es capaz de crecer en BMA utilizando las siguientes fuentes de carbono y energía: D-ribosa, D-xilosa, D-glucosa, D-fructosa, D-galactosa, D-manosa, D-celobiosa, glicerol, D-glicerato, *m*-inositol, acetato, piruvato, propionato, butirato, citrato, 2-oxoglutarato, succinato, fumarato, malato, lactato, 3-hidroxi-butirato y L-tirosina. Su capacidad para crecer utilizando sacarosa, lactosa, D-melibiosa, D-sorbitol, L-alanina y L-glutamato es variable. No se obtuvo crecimiento con las siguientes fuentes únicas de carbono y energía: L-arabinosa, L-ramnosa, salicina, amigdalina, N-acetil-D-glucosamina, D-gluconato, D-glucuronato, D-galacturonato, D-manitol, sacarato, t-aconitato, glicina, L-leucina, L-serina, L-treonina, L-arginina, L-ornitina, L-citrulina, L- γ -aminobutirato, L-aspartato, L-lisina, L-histidina, L-sarcosina y putrescina.

Los lípidos polares mayoritarios son fosfatidil glicerol, dos fosfolípidos no identificados, un aminolípido no identificado, tres lípidos no identificados y un glicolípido no identificado.

Los ácidos grasos mayoritarios son C_{18:1} ω 7c/ ω 6c (73%), C_{16:0} (8%), C_{10:0} 3OH (8%) y C_{12:0} 3OH (5%). Además, C_{12:0}, C_{18:0} y C_{18:1} ω 7c 11-metil se detectan en baja proporción (1%)

El contenido molar en G+C es 61,3 mol%.

La cepa tipo aislada de agua de mar superficial en la playa de la Malvarrosa es R46^T (= CECT 7668^T = KCTC 23349^T).

▪ **Estudio de la cepa M30: *Marinifilum flexuosus* sp. nov**

La cepa M30^T fue aislada de una muestra de agua de mar superficial procedente de la playa de la Malvarrosa (Latitud 39° 28' 29" N; Longitud 0° 19' 23" W; temperatura 25 °C; pH 8) en Valencia, en julio de 2008. La cepa se aisló en MA tras 4 días de incubación a 26 °C, y se resembró en el mismo medio hasta obtener un cultivo puro. La suspensión celular se ha mantenido en MB adicionado con 20% glicerol a -80 °C.

El análisis comparativo de la secuencia del gen 16S rRNA (1478 pb) situó la cepa M30^T en el filo "*Bacteroidetes*" y relacionarla con el género *Marinifilum* (Na y col., 2009) puesto que *Marinifilum fragile* JC2469^T presentó el valor más alto de similitud de secuencia con un 97%, mientras que la similitud con el resto de secuencias fue inferior al 90%.

Tabla 29: Porcentajes de semejanza obtenidos al comparar la secuencia casi completa del gen 16S rRNA de la cepa M30^T con las secuencias del mismo gen relacionadas filogenéticamente.

Cepa	Nº acceso de secuencia	M30 ^T (% similitud)
M30 ^T	HE613737	100
<i>Marinifilum fragile</i> JC2469 ^T	FJ394546	97,0
<i>Cytophaga fermentans</i> ATCC 19072 ^T	M58766	89,3
<i>Alkaliflexus imshenetski</i> Z-7010 ^T	DQ534014	87,1
<i>Prolixibacter bellariivorans</i> F2 ^T	AY918928	86,5
<i>Cytophaga xylanolytica</i> DSM 6779 ^T	FR733683	86,1
<i>Mangroviflexus xiamenensis</i> P2 ^T	HQ697914	85,7
<i>Marinilabilia salmonicolor</i> NBRC 15948 ^T	AB517713	85,7
<i>Anaerophaga thermohalophila</i> Fru22 ^T	AJ418048	85,6

"*Marinilabiliaceae*" se ha propuesto recientemente como una nueva familia dentro de la clase "*Bacteroidia*" (Ludwig y col., 2011), para albergar tres géneros, *Marinilabilia* (Nakagawa y Yamasato, 1996), *Alkaliflexus* (Zhilina y col., 2004) y *Anaerophaga* (Denger y col., 2002), junto con la especie *Cytophaga fermentans*. Recientemente, en octubre de 2011, se ha propuesto un nuevo género de la familia, '*Mangroviflexus*' (Zao y col., doi: 10.1099/ijls.0.036137-0). Los miembros de la familia "*Marinilabiliaceae*" presentan diferentes grados de tolerancia al oxígeno, desde anaerobios estrictos como *Anaerophaga thermohalophila*, pasando por anaerobios facultativos,

Marinilabilia salmonicolor, hasta bacterias anaerobias tolerantes al oxígeno, como *Alkaliflexus imshenetskii*. Recientemente, Na y col. (2009) propusieron el género *Marinifilum*, con una única especie, *Marinifilum fragile*, anaerobia facultativa y filogenéticamente muy cercana a *Cytophaga fermentans*.

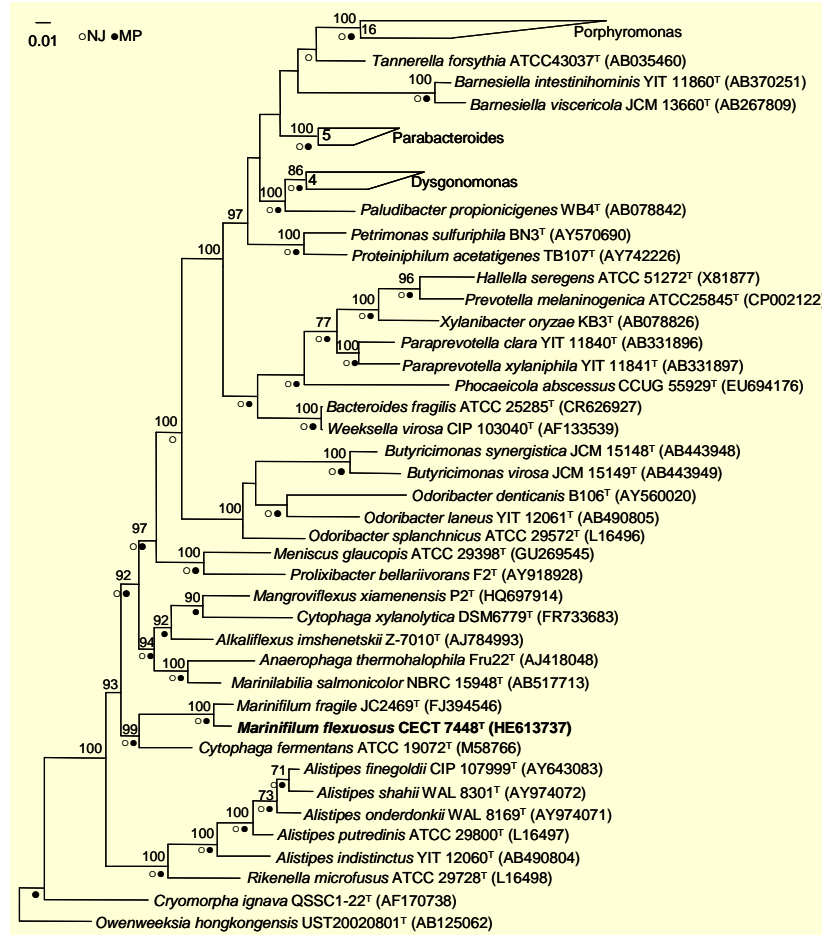


Figura 16: Árbol filogenético obtenido mediante ML basado en la secuencia del gen 16S rRNA en el que se muestra la posición de la cepa *Marinifilum flexuosus* M30^T (= CECT 7448^T). El número de acceso de las secuencias se muestra entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de bootstrap iguales o superiores a 70% como porcentaje de 1000 réplicas. Los nodos coincidentes con los obtenidos por NJ y MP se indican mediante un círculo blanco y un círculo negro, respectivamente. Barra, el número se corresponde con el número de cambios nucleotídicos por sitio.

Se analizaron las secuencias del gen 16S rRNA de las cepas filogenéticamente relacionadas a la de la cepa M30^T utilizando el programa ARB y los alineamientos de la última versión de la base de datos SILVA y LTP como referencia (Pruesse y col., 2007; Yarza y col., 2010; Munoz y col., 2011). Los tres árboles obtenidos (Fig.16 ML y Anexo II NJ y MP) confirman que la cepa M30^T pertenece al género *Marinifilum*, formando un clado estable con la secuencia de la cepa *M. fragile* (JC2469), y con *C. fermentans* (M58766) como vecino más próximo.

La especie *M. fragile* aparece como vecina más próxima de la cepa M30^T (97,0%) con la que forma un clado bien definido y robusto (Fig.16 ML y Anexo II NJ y MP). Con el resto de géneros presenta menos del 90% de similitud de secuencia. Para cerciorarnos de que la cepa M30^T se tratase de una nueva especie distinta de *M. fragile* se llevó a cabo la secuenciación masiva de los genomas de las dos cepas y calcular el índice ANI y TETRA (Tabla 30).

Tabla 30: Relación de valores ANI y TETRA obtenidos por comparación de genomas entre la cepa *M. flexuosus* M30^T y *M. fragile* CECT 7942^T.

ANiB

Cepa	M30 ^T	CECT 7942 ^T
M30 ^T	---	88,8
<i>M. fragile</i> CECT 7942 ¹	89,0	---

ANIm

Cepa	M30 ^T	CECT 7942 ^T
M30 ^T	---	90,5
<i>M. fragile</i> CECT 7942 ¹	90,5	---

TETRA

Cepa	M30 ^T	CECT 7942 ^T
M30 ¹	---	0,997
<i>M. fragile</i> CECT 7942 ¹	0,997	---

Tanto el valor de ANiB como el de ANIm están muy por debajo del valor establecido de 95%, resultados que corroboran que la cepa M30^T es una especie distinta de *M. fragile*. Sin embargo, el valor de TETRA, aunque menos fiable, está por encima del 0,99 recomendado.

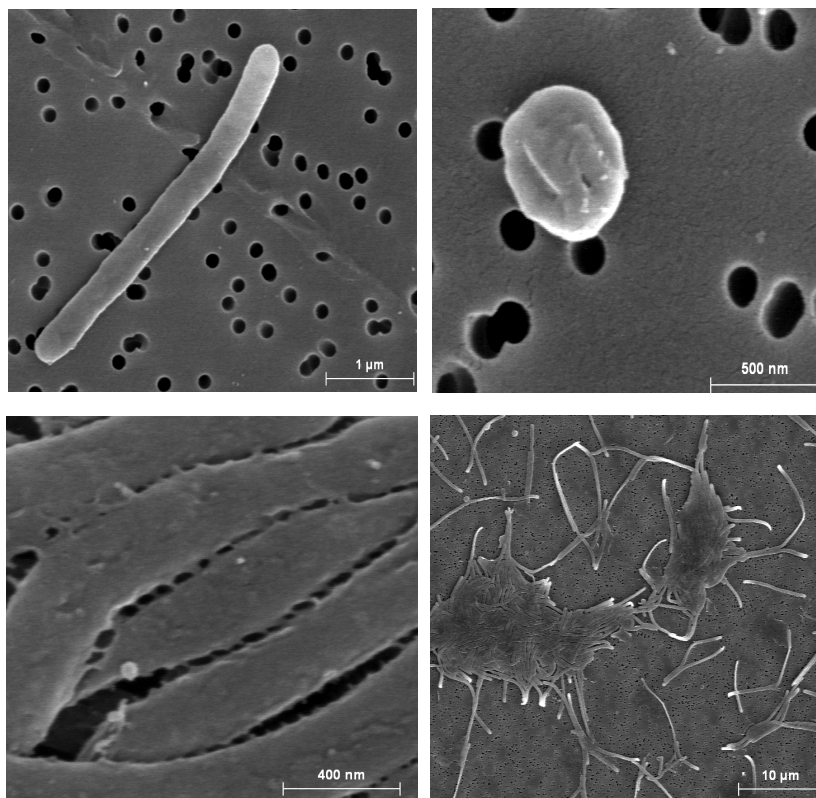


Figura 17: Micrografías electrónicas de barrido que muestran la morfología celular, material extracelular y estructuras esféricas de la cepa M30^T.

La caracterización fenotípica de la cepa M30^T se realizó siguiendo los métodos descritos por Macián y col. (2001, 2005) y Lucena y col. (2010). Se han utilizado las cepas tipo *Marinifilum fragile* CECT 7942^T y *Cytophaga fermentans* CECT 7602^T con fines comparativos.

La morfología celular y la movilidad se observó en el microscopio de contraste de fases. El tamaño celular se determinó mediante microscopía electrónica de barrido (SCSIE, Universidad de Valencia), observándose bacilos y filamentos con abundante material extracelular conectando células entre sí, así como estructuras esféricas del mismo ancho que los filamentos (Fig. 17). No se observó movilidad ni se pudo evidenciar la presencia de flagelos, cuya tinción se llevó a cabo según el método de Heimbrook y col. (1989). Tampoco se observó movilidad por deslizamiento.

La cepa M30^T en MA, a 28 °C y en aerobiosis, crece formando colonias pequeñas, regulares y no pigmentadas, casi transparentes. No se ha observado *swarming*, pero tras incubaciones prolongadas (1 mes) aparecen acumulaciones de aspecto cremoso y de crecimiento lento en los bordes de las estrías, a veces acompañadas de colonias satélites (Fig. 18).

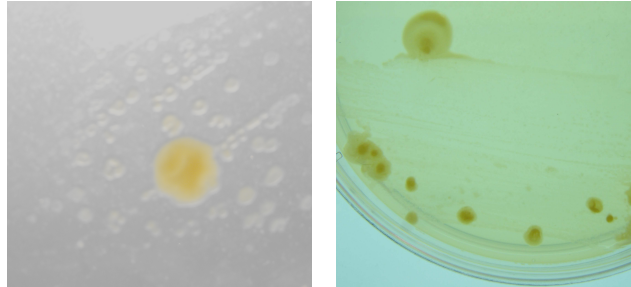


Figura 18: Fotografías que muestran la morfología de las acumulaciones cremosas de crecimiento lento de la cepa M30^T.

La cepa M30^T no es capaz de reducir nitratos a nitritos (ni a gas) ni en Caldo Nitratos ni en la tira API 20NE. Es negativo para la ADH en el medio de Thornley e incapaz de crecer en el medio descarboxilasa de Moeller con arginina, lisina u ornitina. El indole es positivo débil en MB positivo en API 20E y API 20NE. La cepa M30^T no fermenta D-glucosa, arabinosa, manosa ni maltosa en O/F medium (preparado con ASW) mientras que algunos azúcares sí que se fermentaron en las tiras API 50CHB/E.

La capacidad de oxidar compuestos en Biolog GN2 (inoculado utilizando una suspensión basada en ASW) se realizó por duplicado dos veces. Los resultados para las tres cepas (M30^T, *M. fragile* CECT 7942^T y *C. fermentans* CECT 7602^T) fueron inconsistentes incluso comparando entre réplicas de la misma cepa inoculadas con la misma suspensión celular. La habilidad para utilizar componentes como fuente única de carbono y energía se realizó de forma paralela bajo condiciones aerobias y condiciones de capnofilia en dos réplicas independientes. La cepa M30^T no creció en ninguno de los 54 sustratos (incluyendo carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos) ni en el control positivo, BMA adicionado con extracto de levadura. Los resultados de la cepa M30^T obtenidos en los sistemas

miniaturizados API ZYM, API 20NE y API 50CHE, realizados en condiciones aerobias por duplicado, se detallan en la posterior descripción de la especie y en la Tabla 31. La habilidad de oxidar los compuestos en las microplacas de Biolog GN2 (inoculadas utilizando una suspensión basada en ASW a mitad de concentración) se realizó también por duplicado.

Tabla 31. Características fenotípicas diferenciales entre la cepa M30^T y las especies filogenéticamente relacionadas.

Cepas: 1, *M. flexuosus* M30^T; 2, *M. fragile* CECT 7942^T y 3, *C. fermentans* CECT 7602^T. +, positivo; -, negativo; d, débil; nd, no determinado.

	1	2	3
Color de la colonia	beige	beige	amarillo
Oxidasa	d	d	-
Indol (API 20NE)	+	-	-
Hidrólisis de:			
DNA	+	+	-
Alginato	-	-	d
Fermentación (API 50CHB/E)de:			
Esculina	+	-	nd
Celobiosa	+	-	nd
Glucógeno	+	-	nd
Actividad enzimáticas (API ZYM):			
tripsina	+	+	-
β-galactosidasa	-	-	+
N-acetil-β-glucosaminidasa	+	+	-
Presencia de ácidos grasos:			
C _{13:0} iso	3,8	5,5	tr
C _{15:1} iso F	5,4	14,2	1,2
C _{15:0} anteiso	1,8	tr	20,9
G+C mol%	35,7 (ANI) 32,9 (HPLC)	35,9 (ANI) 45,0 [†] (HPLC)	39,0*

*Datos de Nakagawa, 2011

[†]Datos de Na y col., 2009

El perfil de ácidos grasos se determinó en la CECT usando el método RTSBA6 del sistema MIDI. Las cepas se cultivaron en MA y fueron incubadas a 30 °C durante 72 h. El ácido graso mayoritario para las tres cepas fue C_{15:0} iso. Sin embargo, el perfil de ácidos grasos de la

cepa M30^T muestra un patrón diferente que permite diferenciarla de *Marinifilum fragile* CECT 7942^T y *Cytophaga fermentans* CECT 7602^T. El perfil de las cepas M30^T y *M. fragile* CECT 7942^T presenta los ácidos grasos C_{13:0} iso and C_{15:1} iso F en cantidades mayores a *C. fermentans* CECT 7602^T. Además, el segundo ácido graso mayoritario de *C. fermentans* es C_{15:0} anteiso (20,9%) mientras que las cepas M30^T y *M. fragile* sólo presentan un 1,8% y trazas, respectivamente (Tabla 32).

Tabla 32. Comparación de la composición de los ácidos grasos de cepa M30^T (*Marinifilum flexuosus* CECT 7448^T), cepa *Marinifilum fragile* CECT 7942^T y *Cytophaga fermentans* CECT 7602^T.

Cepas: 1, *M. flexuosus* M30^T; 2, *M. fragile* CECT 7942^T y 3, *C. fermentans* CECT 7602^T. Todos los datos proceden de este estudio. –, no detectado; tr, traza (<1%).

Ácidos grasos (%):	1	2	3
Hidroxilados:			
C _{15:0} 2OH	-	-	2,3
C _{15:0} iso 3OH	15,2	11,1	8,7
C _{16:0} iso 3OH	-	-	2,3
C _{17:0} iso 3OH	5,9	3,7	10,4
Saturados:			
C _{12:0}	2,5	tr	tr
C _{13:0} iso	3,8	5,5	tr
C _{14:0}	3,4	tr	tr
C _{15:0} iso	41,3	42,2	34,4
C _{15:0} anteiso	1,8	tr	20,9
C _{16:0}	5,6	1,0	1,7
C _{17:0} iso	-	-	1,5
C _{18:0}	3,5	1,6	tr
Insaturados:			
C _{15:1} iso F	5,4	14,2	1,2
C _{18:1} ω9c	2,5	-	tr
C _{18:1} ω5c	2,1	3,6	1,2
Sum In Feature:			
1 (C _{15:1} iso H/C _{13:0} 3OH)	1,2	3,6	tr
9 (C _{16:0} 10-metil/C _{17:1} iso ω9c)	5,3	9,2	2,7

El análisis de la quinona respiratoria, de lípidos polares y la composición global de bases del genoma se determinó en el Servicio de Identificación de la DSMZ. La cepa M30^T contiene menaquinona con siete unidades isoprenoides (MK7). El análisis de los lípidos polares detectó PE y seis lípidos no identificados (un aminofosfolípido, tres fosfolípidos, un aminolípido no identificado y un lípido). El contenido en G+C es de 32,9 mol% (HPLC) y de 35,8 mol% (secuenciación genómica).

La preparación de las muestras para el análisis de proteínas mediante MALDI-TOF MS se realizó en la CECT siguiendo el protocolo de extracción con etanol/ácido fórmico recomendado por Bruker Daltonics como se describe en Lucena y col. (en prensa). El dendrograma obtenido muestra que la cepa M30^T y *M. fragile* CECT 7942^T forman una rama bien diferenciada de *C. fermentans* CECT 7602^T y otros géneros del filo “*Bacteroidetes*” (Fig. 19).

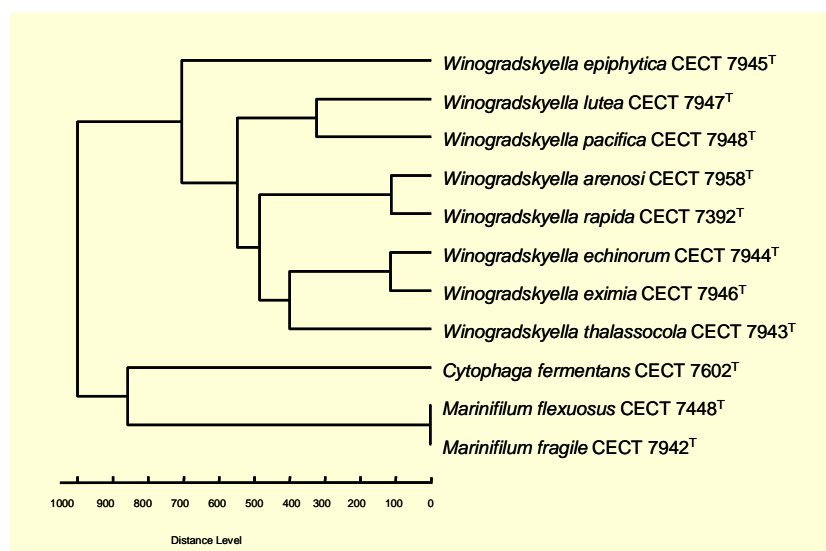


Figura 19: Dendrograma de distancias realizado mediante del análisis de MALDI-TOF MS de la cepa *M. flexuosus* M30^T (= CECT 7448^T) y las especies relacionadas.

Descripción de *Marinifilum flexuosus* sp. nov.

Marinifilum flexuosus (fle'xu.o.sus. L. adj. *flexuos* flexible).

La cepa M30^T es una bacteria filamentosa Gram-negativa, anaerobia facultativa, no móvil y no pigmentada. Las células tiene 0,3-0,4 µm de ancho por 2,6 a 30 µm de largo, presenta una morfología filamentosa durante el crecimiento exponencial y de bacilo en la fase estacionaria. Crece óptimamente entre 20 y 28 °C pero no crece a 15 °C o a más de 37 °C. Presenta requerimientos iónicos complejos, no crece sólo con NaCl. Para crecer óptimamente requiere la presencia de iones Na⁺ y Mg₂. El rango de salinidad oscila entre el 2 y 5%. Es positiva para la catalasa y la oxidasa, no reduce nitratos. No produce la enzima arginina dihidrolasa. No es capaz de crecer en el medio descarboxilasa de Moeller con arginina, lisina u ornitina. Es positiva para la prueba del indol, pero da una respuesta débil. No se detecta fermentación de glucosa, arabinosa, manosa ni maltosa en medio O/F. Hidroliza débilmente en aerobiosis caseína y almidón, pero no lecitina, alginato o celulosa. Cuando se utilizan condiciones de capnofilia, la cepa es capaz de hidrolizar claramente caseína, almidón y DNA. Las siguientes actividades en API ZYM son positivas: fosfatasa ácida y alcalina, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa, N-acetil-β-glucosaminidasa, tripsina y α-quimotripsina, mientras que β-galactosidasa y leucina arilamidasa son positivos débiles. La tira API 20NE muestra respuestas positivas para indol, esculina, PNPG y para la hidrólisis de gelatina. En API 20E es positivo para ONPG e indol, así como para la hidrólisis de gelatina tras 72 h de incubación. Fermenta esculina, D-celibiosa, D-lactosa, almidón y glucógeno en API 50CH B/E tras 48 h de incubación.

El análisis de ácidos grasos fue llevado a cabo en la CECT utilizando el método TSBA6 (MIDI, 2008). Las cepas M30^T, *M. fragile* CECT 7942^T y *C. fermentans* CECT 7602^T se incubaron en MA a 28 °C durante 24 h. Los ácidos grasos mayoritarios en los tres casos fueron C_{15:0} iso C_{16:1} ω7c (o ω6c), 37,2%; C_{18:1} ω7c (o ω6c), 13,4% y C_{16:0}, 10,1% (Tabla 32).

La quinona respiratoria mayoritaria es la menaquinona con 7 unidades isoprenoides (MK7). El lípido polar mayoritario es la PE, y además se detectaron otros seis lípidos no identificados (un aminofosfoglicolípido, tres fosfolípidos, un aminolípido y un lípido).

Los ácidos grasos mayoritarios son C_{15:0} iso (41,3 %); C_{15:0} iso 3OH (15,2 %), C_{16:0} (5,6 %), C_{15:1} isoF (5,4 %), y *Sum In Feature 9* (5.3 %).

La cepa tipo aislada de agua de mar superficial en el oeste del mar Mediterráneo es la cepa M30^T (= CECT 7448^T = DSM 21950^T). El contenido en G+C del DNA de la cepa tipo es 32,9 mol% (por HPLC) o 35,7 mol% (por secuenciación masiva).

▪ **Estudio de las cepas M22, M61 y M62: *Vibrio aestivus* sp. nov. y *Vibrio quintilis* sp. nov.**

Las cepas M22^T, M61 y M62^T fueron aisladas de una muestra de agua de mar superficial procedente de la playa de la Malvarrosa (Latitud 39° 28' 29" N; Longitud 0° 19' 23" W; temperatura 25 °C; pH 8) en Valencia, en julio de 2008.

El análisis comparativo de la secuencia del gen 16S rRNA de las cepas M22^T, M61 y M62^T (1463, 1508 y 1473 pb, respectivamente) y su alineamiento con respecto a otras secuencias publicadas, permitió situar las cepas dentro del género *Vibrio* (Farmer III y col., 2005). Las secuencias de las tres cepas fueron corregidas manualmente y alineadas con el editor de secuencias del programa ARB EDIT. Posteriormente se compararon dichas secuencias con respecto a otras del mismo gen publicadas en la base de datos EMBL. Con la matriz de semejanza obtenida se estableció una relación de los porcentajes de similitud de secuencia (Tabla 33 y Tabla 34).

Tabla 33: Porcentajes de semejanza obtenidos al comparar la secuencia casi completa del gen 16S rRNA de las cepas M22^T y M61 con las cepas tipo relacionadas filogenéticamente.

Cepa	Nº acceso secuencia	M22 ^T (%)	M61 (%)
M22 ^T	HE613734	100	100
M61	HE613735	100	100
<i>Vibrio marisflavi</i> WH134 ^T	FJ847833	97,1	97,2
<i>Vibrio variabilis</i> R-40492 ^T	GU929924	97,0	97,1
<i>Vibrio maritimus</i> R-40493 ^T	GU929925	96,6	96,8
<i>Vibrio stylophorae</i> KTW-12 ^T	GQ281380	96,2	96,2
<i>Vibrio caribbeanicus</i> N384 ^T	GU223601	96,0	96,1
<i>Vibrio brasiliensis</i> CAIM 495 ^T	AJ316172	95,9	96,0
<i>Vibrio fortis</i> R-15032 ^T	AJ514916	95,8	95,9
<i>Vibrio tubiashii</i> ATCC 19109 ^T	X74725	95,7	95,8
<i>Vibrio sinaloensis</i> CAIM 797 ^T	DQ451211	95,7	95,8
<i>Vibrio nigripulcritudo</i> ATCC 27043 ^T	X74717	95,7	95,8
<i>Vibrio porteresiae</i> MSSRF30 ^T	EF488079	95,3	95,4
<i>Vibrio penaeicida</i> KH-1 ^T	AJ421444	95,2	95,4
<i>Vibrio rumoiensis</i> S-1 ^T	AB013297	94,6	94,7
M62 ^T	X74702	93,6	93,6

Tabla 34: Porcentajes de semejanza obtenidos al comparar la secuencia casi completa del gen 16S rRNA de la cepa M62^T con las cepas tipo más relacionadas filogenéticamente.

Cepa	Nº acceso secuencia	M62 ^T (%)
M62 ^T	HE613736	100
<i>Vibrio aerogenes</i> FG1 ^T	AF124055	97,6
<i>Vibrio mangrovi</i> MSSRF38 ^T	EU144014	96,0
<i>Vibrio ruber</i> VR1 ^T	AF462458	95,7
<i>Vibrio rhizosphaerae</i> MSSRF3 ^T	DQ847123	95,6
<i>Vibrio variabilis</i> R-40492 ^T	GU929924	95,4
<i>Vibrio gazogenes</i> PB1 ^T	X74705	95,1
<i>Vibrio penaeicida</i> KH-1 ^T	AJ421444	95,0

Tras elaborar los árboles filogenéticos mediante los algoritmos NJ (Fig. 20), MP y ML (Anexo II) se ha observado en primer lugar que *V. stylophorae* KTW-12^T es el vecino más próximo de las cepas M22^T y M61 con las tres aproximaciones filogenéticas, presentando un 96,2% de similitud de secuencia. Además, junto a *V. marisflavi* WH134^T (97,2-97,1% de similitud), las cuatro cepas forman un clado bien definido dentro del género *Vibrio*. El resto de cepas que presentaban un porcentaje de similitud de secuencia del gen 16S rRNA entre el 97,1 y el 96,0%, *V. variabilis* R-40492^T, *V. maritimus* R-40493^T, *V. caribbeanicus* N384^T y *V. brasiliensis* CAIM 495^T, no se asociaban en ninguno de los tres casos a las cepas en estudio (Fig. 20 y Anexo II).

En segundo lugar, la cepa M62^T que presenta los valores de similitud de secuencia del gen 16S rRNA más altos con *V. aerogenes* (97,6%) y con *V. mangrovi* (96,0%), se sitúa dentro del clado 'Gazogenes'. El análisis filogenético permitió confirmar la inclusión de la cepa dentro de este clado ya que los árboles filogenéticos elaborados mediante los algoritmos NJ (Fig. 20), MP y ML (Anexo II) la sitúan entre *V. aerogenes* FG1^T, *V. mangrovi* MSSRF38^T, *V. ruber* VR1^T, *V. rhizosphaerae* MSSRF3^T y *V. gazogenes* PB1^T, como vecinos más próximos, formando un clado estable y robusto.

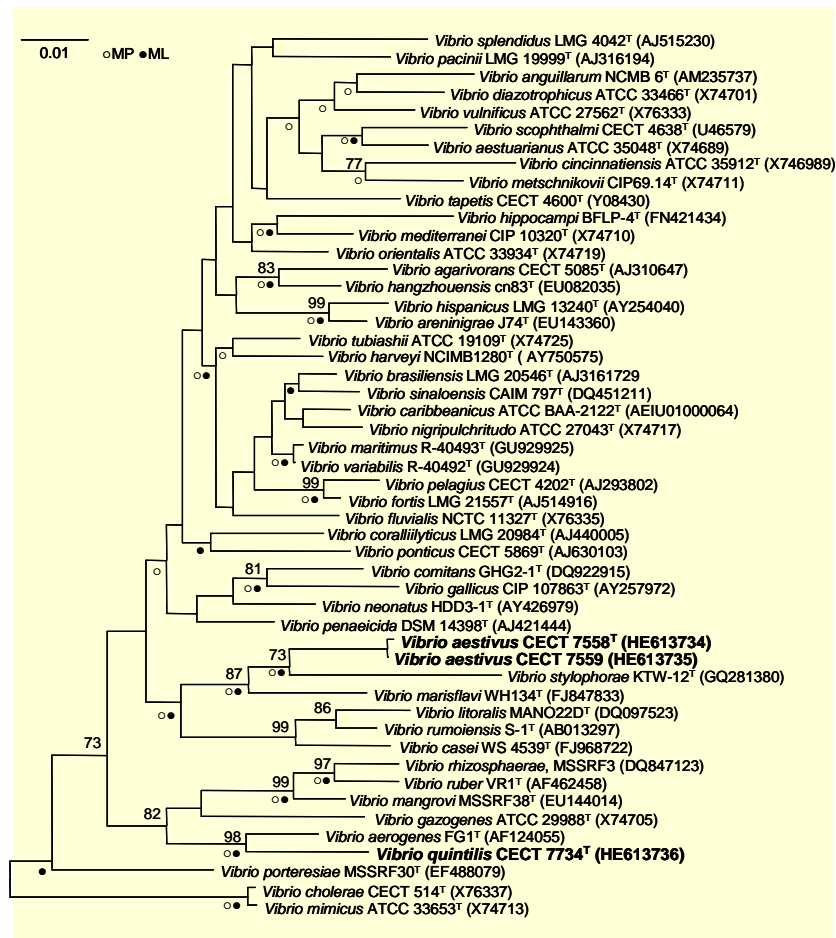


Figura 20: Árbol filogenético obtenido mediante *Neighbour Joining* basado en la secuencia parcial del gen 16S rRNA en el que se muestra la posición de las cepas *Vibrio aestivus* M22^T (= CECT 7558^T), *V. aestivus* M61 (=CECT 7559) y *Vibrio quintilis* M62^T (= CECT 7734^T) dentro del género *Vibrio*. Se muestra un sub-árbol del obtenido con las cepas tipo de las 90 especies del género *Vibrio* descritas. El número de acceso de las secuencias se muestra entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o superiores a 70% como porcentaje de 1000 réplicas. Los nodos coincidentes con los obtenidos por MP y ML se indican mediante un círculo blanco y un círculo negro, respectivamente. Barra, el número se corresponde con el número de cambios nucleotídicos por sitio.

A partir de los resultados obtenidos, se planteó la caracterización polifásica de M22^T, M61 y M62^T utilizando las cepas *V. gazogenes* CECT 5068^T, *V. aerogenes* CECT 7868^T, *V. rhizosphaerae* CECT 7877^T, *V. ruber* CECT 7878^T, *V. mangrovi* CECT 7927^T, *V. marisflavi* CECT 7928^T y *V. stylophorae* CECT 7929^T como cepas de referencia con fines comparativos para la caracterización taxonómica formal y proponer dos nuevas especies dentro del género *Vibrio*.

Las cepas M22^T, M61 y M62^T fueron crecidas de forma rutinaria en MA y MB a 28 °C y todos los medios utilizados para la descripción fenotípica se suplementaron con ASW a mitad de concentración o con MCS. Las características fenotípicas así como los requerimientos iónicos y el rango de salinidades se determinaron como describe Macián y col. (2001, 2005). Además de los rasgos fenotípicos clásicos se llevaron a cabo los siguientes sistemas miniaturizados: API ZYM, API 20E y API 50CH. Los resultados de la caracterización fenotípica se detallan en las descripciones de las especies y en las Tablas 35 y 36 (características diferenciales).

Tabla 35. Características diferenciales entre *V. aestivus* sp. nov. (M22^T y M61), *V. marisflavi* CECT 7928^T y *V. stylophorae* KTW-12^T. +, positivo; -, negativo; nd, no detectado; nc: sin crecimiento.

Cepas: 1, *V. aestivus* M22^T = CECT 7558^T y M61 = CECT 7559; 2, *V. marisflavi* CECT 7928^T; 3, *V. stylophorae* CECT 7929^T.

	1	2	3
TCBS	-	+	nc
ONPG (API 20E)	+	+	-
Hidrólisis de gelatina (API 20E):	-	+	-
DNAse	-	+	+
Fermentation of (API 20E, 50CHE):			
D-manitol	-	-	+
D-sorbitol	-	-	+
Sacarosa	-	+	-
D-xilosa	-	+	-
D-galactosa	+	+	-
D-manosa	-	+	+
D-trehalosa	+	+	-
Actividades enzimáticas (API ZYM):			
Fosfatasa ácida	-	+	+
N-acetil-β-glucosaminidasa	-	-	+
G+C mol%	44,5-41,1	42,5 [†]	47,8 [‡]

[†]Wang y col., 2011; [‡]Sheu y col., 2011.

Tabla 36. Características diferenciales entre *V. quintilis* sp. nov. (M62^T) y las cepas tipo de otros miembros del clado 'Gazogenes'. Todas las especies son negativas para la prueba de la oxidasa, no son capaces de crecer en agar TCBS, son positivas para VP y la producción de gas. Todas fermentan D-manitol, sacarosa, D-celobiosa, D-xilosa, D-manosa y amigdalina. +, positivo; -, negativo; nd, no detectado.

Cepas: **1**, *V. quintilis* M62^T=CECT 7734^T; **2**, *V. aerogenes* CECT 7868^T; **3**, *V. gazogenes* CECT 5068^T; **4**, *V. ruber* CECT 7878^T; **5**, *V. rhizosphaerae* CECT 7877^T; **6**, *V. mangrovi* CECT 7927^T.

	1	2	3	4	5	6
Pigmento (prodigiosina)	-	-	+	+	+	+
Reducción de nitratos a nitritos	-	-	-	+	-	+
ONPG (API20E)	-	v	+	+	+	+
Hidrólisis de Gelatina (API 20E)	-*	+	+	+	+	+
Crecimiento al 10% salinidad	-	-	+	+	+	-
Crecimiento a 40 °C	-	-	+	+	+	nd
Amilasa	+	+	+	+	+	-
Fermentación:(API 20E,						
m-inositol	-	+	-	-	-	-
L-ramnosa	-	-	-	-	-	+
L-arabinosa	-	-	+	+	+	+
D-melibiosa	-	-	-	+	-	+
D-galactosa	-	+	nd	+	+	+
Fuente única de C y energía:						
D-galactosa	-	+	nd	nd	Nd	nd
Acetato	+	-	nd	nd	nd	nd
Malato	+	-	nd	nd	nd	nd
C _{12:1} 3OH (%)	tr	-	15,1	19,8	5,2	5,2
G+C mol%	45,0	45,9 [†]	47,1 [†]	45,8 [§]	51,3	45,4 [¶]

*La gelatinasa es positiva en MB+12% gelatina, pero negativa en API 20E.

[†]Shieh y col., 2000; [§]Shieh y col., 2003; ^{||}RameshKumar y Fair, 2007 y

[¶]Rameshkumar y col., 2010.

El análisis de ácidos grasos se llevó a cabo en la CECT utilizando el método TSBA6 (MIDI, 2008). Las cepas M22^T, M61, M62^T, *V. gazogenes* CECT 5068^T, *V. aerogenes* CECT 7868^T, *V. rhizosphaerae* CECT 7877^T, *V. ruber* CECT 7878^T, *V. mangrovi* CECT 7927^T, *V. marisflavi* CECT 7928^T y *V. stylophorae* CECT 7929^T se incubaron en MA a 26 °C durante 24 h.

Los ácidos grasos mayoritarios para las tres cepas fueron $C_{16:1} \omega 7c/C_{16:1} \omega 6c$ (Summed in Features 3) que representan alrededor del 40% y $C_{18:1} \omega 7c/C_{18:1} \omega 6c$ (Summed in Features 8) que representan alrededor del 18% del total de ácidos grasos detectados (Tabla 37 y 38).

Tabla 37. Comparación de la composición de los ácidos grasos de *Vibrio aestivus* y otras especies relacionadas. –, no detectado; tr, traza (<1%).

Cepas: 1, *V. aestivus* M22^T; 2, *V. aestivus* M61; 3, *V. stylophorae* CECT 7929^T y 4, *V. marisflavi* CECT 7928^T.

Ácidos grasos (%):	1	2	3	4
Hidroxilados:				
$C_{12:0} 3OH$	3,0	2,8	5,1	3,5
Saturados:				
$C_{12:0}$	4,0	3,9	2,2	4,3
$C_{13:0}$ iso	tr	1,6	-	tr
$C_{13:0}$	tr	tr	-	3,2
$C_{14:0}$	6,3	7,1	17,7	3,2
$C_{15:0}$ iso	1,4	3,5	-	tr
$C_{16:0}$ iso	2,1	1,6	-	tr
$C_{16:0}$	12,8	10,5	16,0	16,0
$C_{17:0}$ iso	tr	1,4	-	tr
$C_{17:0}$ anteiso	tr	1,3	-	tr
$C_{17:0}$	tr	tr	-	5,5
$C_{18:0}$	tr	tr	1,4	tr
Insaturados:				
$C_{15:1} \omega 8c$	tr	tr	-	1,3
$C_{16:1} \omega 9c$	-	-	9,7	-
$C_{17:1} \omega 8c$	1,9	1,4	-	6,0
$C_{18:1} \omega 9c$	-	tr	1,5	-
Sum In Feature:				
1 ($C_{15:1}$ iso H / $C_{13:0} 3OH$)	tr	tr	-	2,7
2 ($C_{14:0} 3OH/C_{16:1}$ iso I)	2,7	2,7	4,7	3,8
3 ($C_{16:1} \omega 7c/C_{16:1} \omega 6c$)	39,6	41,2	32,9	28,9
8 ($C_{18:1} \omega 7c/C_{18:1} \omega 6c$)	16,0	12,4	7,2	14,4

Tabla 38. Comparación de la composición de los ácidos grasos de *Vibrio quintilis* y otras especies relacionadas. –, no detectado; tr, traza (<1%).

Cepas: 1, *V. quintilis* M62^T; 2, *V. aerogenes* CECT 7868^T; 3, *V. gazogenes* CECT 5068^T; 4, *V. ruber* CECT 7878^T; 5, *V. mangrovi* CECT 7927^T y 6, *V. rhizosphaerae* CECT 7877^T.

Ácidos grasos (%):	1	2	3	4	5	6
Hidroxilados:						
C _{10:0} 3OH	tr	tr	1,8	1,3	tr	tr
C _{12:0} 2OH	–	–	1,7	1,7	1,7	tr
C _{12:0} 3OH	5,2	4,8	6,0	7,6	4,5	5,7
C _{12:1} 3OH	tr	–	15,1	19,7	5,2	5,2
Saturados:						
C _{10:0}	–	–	tr	1,5	–	–
C _{12:0}	5,8	5,9	5,3	4,4	5,1	6,1
C _{14:0}	4,3	4,4	8,0	4,6	8,2	8,3
C _{16:0} iso	–	–	tr	tr	tr	tr
C _{16:0}	17,4	20,0	19,3	11,3	19,7	20,0
C _{17:0}	–	tr	tr	tr	tr	tr
C _{18:0}	tr	tr	–	1,3	tr	tr
Insaturados:						
C _{18:1} ω9c	–	–	tr	tr	tr	1,2
Sum In Feature:						
2 (C _{14:0} 3OH/C _{16:1} iso I)	4,6	5,6	5,6	6,8	4,7	6,4
3 (C _{16:1} ω7c/C _{16:1} ω6c)	42,9	37,9	26,0	18,9	31,5	28,4
8 (C _{18:1} ω7c/C _{18:1} ω6c)	18,4	17,1	7,5	16,2	13,0	13,0

Dentro del estudio polifásico del nuevo aislado, en la CECT se realizó el análisis de proteínas por espectrometría de masas, MALDI-TOF MS. El dendrograma obtenido (Fig. 21) muestra la separación clara de las cepas M22^T, M61, M62^T, *V. gazogenes* CECT 5068^T, *V. aerogenes* CECT 7868^T, *V. rhizosphaerae* CECT 7877^T, *V. ruber* CECT 7878^T, *V. mangrovi* CECT 7927^T, *V. marisflavi* CECT 7928^T y *V. stylophorae* CECT 7929^T.

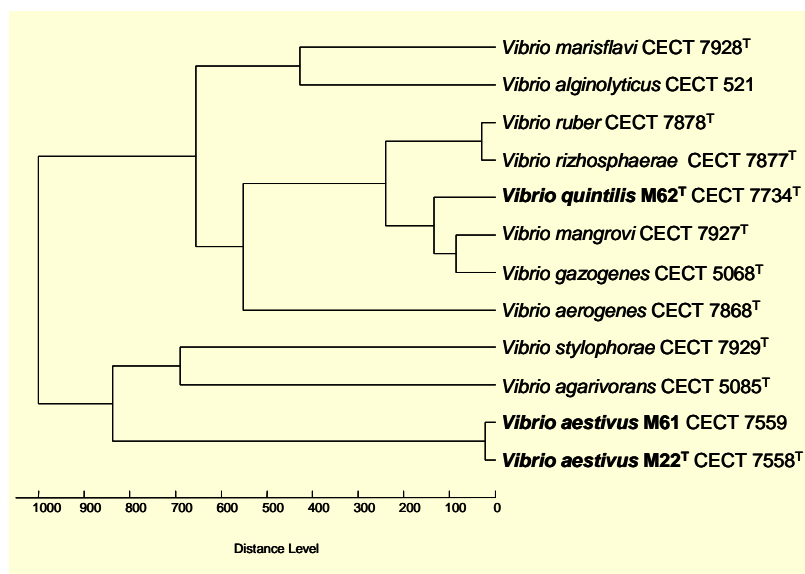


Figura 21: Dendrograma de distancias realizado mediante el análisis con MALDI-TOF MS de las cepas M22^T, M61 (*Vibrio aestivus* CECT 7558^T, CECT 7559), M62^T (*Vibrio quintilis* CECT 7734^T) y las especies relacionadas.

El examen del perfil fenotípico completo de las cepas M22^T y M61 revela que existen suficientes características diferenciales que permiten una clara identificación de éstas como una nueva especie dentro del género *Vibrio*. Sin embargo, su estrecha relación con *V. marisflavi* WH134^T y el porcentaje de similitud de secuencia del gen 16S rRNA que presentan (97,1-97,2% respectivamente) sugería un mayor estudio del genoma. Se llevó a cabo la secuenciación genómica de ambas cepas junto con *V. marisflavi* CECT 7928^T con el fin de calcular el parámetro ANI aplicado a un mínimo del 20% del genoma completo secuenciado al azar. Se obtuvieron unos valores del 95,4-97,6% entre M22^T y M61 en el caso de ANI_b y del 98,1-98,2% en el caso de ANI_m, tratándose por tanto de la misma especie. Sin embargo, *V. marisflavi* CECT 7928^T frente a las cepas M22^T y M61 presentó valores de ANI_b de 74,3% y de 77,7-79,8% respectivamente, y de ANI_m de 89,8 y 90,1%, respectivamente. Los resultados indican que M22^T y M61 pertenecen a la misma especie distinta de la cepa *V. marisflavi* CECT 7928^T. Además, el parámetro TETRA corrobora los resultados presentando valores superiores a

0,99 entre las cepas M22^T y M61, y valores inferiores a 0,99 entre M22^T-M61 frente a *V. marisflavi* CECT 7928^T (Tabla 39).

La secuenciación masiva de las cepas permitió además el cálculo de contenido en G+C del DNA, que en el caso de las cepas M22^T y M61 es de 44,5-41,1 mol%.

Tabla 39: Relación de valores ANI y TETRA obtenidos por comparación de genomas entre *V. aestivus* sp. nov. (M22^T y M61) y *V. aerogenes* CECT 7928^T.

ANiB

Cepa	M22 ^T	M61	CEC 7928 ^T
M22 ^I	---	95,9	74,3
M61	97,5	---	77,7
<i>V. marisflavi</i> CECT 7928 ^I	74,3	79,8	---

ANIm

Cepa	M22 ^T	M61	CEC 7928 ^T
M22 ^T	---	98,2	89,9
M61	98,1	---	90,2
<i>V. marisflavi</i> CECT 7928 ^I	89,8	90,1	---

TETRA

Cepa	M22 ^T	M61	CEC 7928 ^T
M22 ^I	---	0,996	0,932
M61	0,996	---	0,926
<i>V. marisflavi</i> CECT 7928 ^I	0,932	0,926	---

En el caso de la cepa M62^T, el perfil fenotípico también permite su identificación clara. Sin embargo, la relación de la cepa a nivel de especie respecto a *V. aerogenes* (97,6% de similitud de secuencia del gen 16S rRNA) se esclareció mediante la comparación de genomas. De acuerdo con la situación filogenética, la cepa M62^T muestra la mayoría de características fenotípicas que distinguen a los miembros del clado 'Gazogenes' del resto de especies de *Vibrio*, como son: la producción de gas durante la fermentación de carbohidratos, la reacción de VP positiva, la incapacidad de reducir nitratos a nitritos (excepto para *V. ruber* y *V. mangrovi*), no presentar crecimiento en

agar TCBS y dar una respuesta negativa a la prueba de la oxidasa. Sin embargo, a diferencia de la mayoría de miembros del clado, la cepa M62^T no produce el pigmento rojo prodigiosina, una característica compartida solo con *V. aerogenes*, su vecino más próximo.

Debido a estas semejanzas y al alto porcentaje de similitud de secuencia del gen 16S rRNA las cepas se sometieron a un análisis de secuenciación masiva para calcular el índice ANI y descartar que se tratase de la misma especie. El valor de ANI_b obtenido fue de 82,7–83,2% y el ANI_m de 87,5% (Tabla 40) muy lejos del 95% propuesto para diferenciar especies a nivel de genomas. El valor TETRA de 99,4% por encima del 99% establecido.

El contenido en G+C del DNA para la cepa M62^T es de 45,7 mol%.

Tabla 40: Relación de valores ANI y TETRA obtenidos por comparación de genomas entre *V. quintilis* sp. nov. (M62^T) y *V. aerogenes* CECT 7868^T.

ANI_b

Cepa	M62 ^T	CECT 7868 ^T
M62 ^T	---	82,7
<i>V. aerogenes</i> CECT 7868 ^T	83,2	---

ANI_m

Cepa	M62 ^T	CECT 7868 ^T
M62 ^T	---	87,5
<i>V. aerogenes</i> CECT 7868 ^T	87,5	---

TETRA

Cepa	M62 ^T	CECT 7868 ^T
M62 ^T	---	0,994
<i>V. aerogenes</i> CECT 7868 ^T	0,994	---

Las diferencias fenotípicas encontradas entre en los rasgos fisiológicos y bioquímicos, composición de ácidos grasos y perfiles de MALDI-TOF permiten identificar M22^T y M61y M62^T como miembros de dos nuevas especie de *Vibrio*, para las que se propone el nombre de *V. aestivus* con M22^T como cepa tipo y *V. quintilis* con M62^T como cepa tipo.

Descripción de *Vibrio aestivus*, sp. nov.

Vibrio aestivus sp. nov. (a.es.ti'vus. L. masc. adj., *aestivus*, of or pertaining to summer, intended to mean discovered in summer).

Bacilo Gram-negativo (0,5×1,0-2,0 μm), fermentativo mesófilo y halófilo moderado. Es positivo para las pruebas de la oxidasa y de la catalasa. Crece en MA formando colonias translúcidas, brillantes y de color beige (0,5 mm de diámetro tras 48 h). Es capaz de reducir nitratos a nitritos. Crece en TCBS produciendo colonias verdes (sacarosa negativo). Presenta crecimiento en un rango de temperatura que oscila entre 15 y 37 °C (no crece a 4 ni 40 °C) y en un rango de salinidad desde 0,85 hasta el 7% de sales totales en MA. No es capaz de crecer sin la adición de sales al medio, aunque el requerimiento salino no es específico de Na⁺, ya que se puede reemplazar por K⁺ como único catión presente en el medio de cultivo. Es negativo para la prueba de VP, la ADH, LDC y ODC de Thornley y para la producción de indol. No hidroliza caseína, gelatina, alginato, almidón, Tween-80 ni lecitina. Las actividades enzimáticas detectadas en API ZYM se limitan a la fosfatasa alcalina y a la leucina arilamidasa. En la tira API 50CH fermenta D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-trehalosa, D-celobiosa y D-maltosa, pero no D-manitol, sacarosa o D-xilosa ni el resto de carbohidratos del sistema API 50CH.

Las cepas M22^T y M61 son capaces de utilizar las siguientes fuentes de carbono y energía para crecer: D-glucosa, D-fructosa, D-galactosa, D-trehalosa, maltosa, D-celobiosa, D-gluconato, N-acetil-D-glucosamina, D-glicerato, piruvato, citrato, succinato, fumarato, malato, lactato, L-serina, L-treonina, L-alanina, D-glutamato. No es capaz de crecer con: D-ribosa, L-arabinosa, D-xilosa, D-manosa, L-rhamnosa, sacarosa, D-melibiosa, salicina, amigdalina, D-glucuronato, D-galacturonato, glicerol, D-manitol, D-sorbitol, m-inositol, D-sacarato, butirato, aconitato, 2-oxoglutarato, 3-hidroxi-butirato, L-leucina, L-tirosina, L-arginina, L-ornitina, 4-aminobutirato, L-citrulina, L-aspartato, L-lisina, L-sarcosina y putrescina.

Los ácidos grasos mayoritarios son C_{16:1} ω7c/C_{16:1} ω6c (summed in F3) con aproximadamente el 40% del total, y en menor cantidad C_{18:1} ω7c/ω6c (summed in F8, 12-16%), C_{16:0} (10-13%, C_{14:0} (6-7%), C_{12:0}

(4%), C_{12:0} 3OH (3%), C_{15:0} iso y C_{15:0} anteiso (1,5 y 3,5 cada uno) y C_{14:0} 3OH/C_{16:1} isol (summed in F2, 2,7%).

El contenido molar en G+C de la cepa M22^T es 45,2%.

La cepa tipo es M22^T (= CECT 7558^T = CAIM 1861^T), aislada de agua de mar de la costa en Valencia (costa mediterránea española).

Description of *Vibrio quintilis*, sp. nov.

Vibrio quintilis sp. nov. (quin.ti'lis. L. masc. adj. *quintilis*, de o perteneciente a julio, descubierta en el mes de julio).

Se trata de bacilos (0,6×0,7-2,0 μm) Gram-negativos, móviles que producen colonias no pigmentadas y transparentes (0,5 mm de diámetro tras 48 h). La cepa da negativo en la prueba de la oxidasa y no reduce nitratos a nitritos. La fermentación de carbohidratos es aerobia. Es positiva par ala reacción de Voges Proskauer. No se observa crecimiento en TCBS agar. Presenta actividad amylasa y DNAsa pero no es capaz de hidrolizar Tween 80, lecitina o alginato y es débilmente proteolítica en agar caseína gelatina. Las pruebas del indol, LDC y ODC son negativas. Sin embargo, la ADH de Thornley es positiva. Requiere iones Na⁺ para crecer y lo hace en un rango de salinidad que oscila entre el 1,7 y el 6%. No se observa crecimiento al 8% o más de salinidad. Crece a 28 y 37 °C pero no a 4 o 40 °C. Presenta las siguientes actividades enzimáticas: fosfatasa ácida y alcalina, leucina y valina arilamidasa y β-glucosidasa (API ZYM).

Fermenta los siguientes carbohidratos (API 50CHE): D-ribosa, D-xilosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, D-manitol, N-acetil-D-glucosamina, arbutina, esculina, salicina, D-celobiosa, D-maltosa, sacarosa, almidón y glicógeno. No fermenta los siguientes sustratos: glicerol, eritritol, D-arabinosa, L-arabinosa, L-xilosa, D-adonitol, metil-D-galactopiranosido, D-galactose, L-sorbose, L-rhamnose, dulcitol, m-inositol, D-sorbitol, metil-α-D-manopiranosido, metil-α-D-glucopiranosido, amigdalina, D-lactosa, D-melibiosa, D-trehalosa, inulina, D-melezitosa, D-rafinosa, xilitol, gentibiosa, D-turanosa, D-lixosa, D-tagatosa, D-fucosa, L-fucosa, D-arabitol, L-arabitol, D-gluconato, 2-oxogluconato y 5-oxogluconato.

Crece con las siguientes Fuentes únicas de carbono y energía: D-ribosa, D-xilosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, maltosa, D-celobiosa, sacarosa, NAG, D-glucuronato, D-galacturonato, D-manitol, m-inositol, acetato, piruvato, citrato, aconitato, succinato, fumarato,

malato, L-alanina, L-serina, L-treonina, L-glutamato, 4-aminobutirato, L-histidina y L-aspartato, pero no L-arabinosa, D-galactosa, D-trehalose, L-rhamnosa, lactose, D-melibiosa, amigdalina, D-gluconato, glicerol, D-sorbitol, D-glicerato, D-sacarato, propionate, butirato, 2-oxoglutarato, lactato, 3-hidroxiobutirato, glicina, L-leucina, L-arginina, L-tirosina, L-ornitina, L-citrulina, L-lisina, L-sarcosina y putrescina.

Los ácidos grasos principales son $C_{16:1} \omega 7c / C_{16:1} \omega 6c$ (*Summed in feature 3*) un 43%, $C_{18:1} \omega 7c / C_{18:1} \omega 6c$ (*summed in feature 8*) y $C_{16:0}$ representan un 17-18% cada una. Además se detectaron cantidades minoritarias (4-6%) de $C_{12:0} 3OH$, $C_{14:0} 3OH / C_{16:1} \text{ iso I}$ (*summed in feature 2*), $C_{12:0}$ y $C_{14:0}$.

El contenido en G+C es 45,0 mol%.

La cepa tipo es M62^T (= CECT 7734^T = CAIM 1863^T), aislada de agua de mar de la costa en Valencia (costa mediterránea española).

- **Estudio de las cepas M17, M49, M76, M15Ø-3, 2OM6 y R37: *Phaeomarinomonas mediterranea* gen. nov., sp. nov. y *Phaeomarinomonas costicola* sp. nov.**

El análisis comparativo de la secuencia casi completa del gen 16S rRNA de las cepas M17, M49, M76, M15Ø-3, 2OM6 y R37 y su alineamiento con respecto a otras secuencias publicadas permitió obtener una matriz de semejanza de la que se han extraído los porcentajes superiores al 95% de similitud y que se muestran en la Tabla 41.

Tabla 41: Porcentajes de semejanza obtenidos al comparar las secuencias del gen 16S rRNA de las cepas M17, M49, M76, M15Ø-3, 2OM6 y R37 con las secuencias del mismo gen de la especies relacionadas filogenéticamente.

Cepas	M17, M15Ø_3, M76, M49	2OM6	R37
Cepas M17, M15Ø_3, M76 y M49	99,9-100	99,8	99,2
Cepa 2OM6	99,7-99,9	100	99,3
Cepa R37	99,1-99,2	99,3	100
<i>Phaeobacter inhibens</i> T5 ^T	96,3	96,2	95,9
<i>Phaeobacter gallaeciensis</i> BS107 ^T	96,2	96,2	95,9
<i>Shimia marina</i> CL-TA03 ^T	95,8	95,9	95,8
<i>Nautella italica</i> LMG 24365 ^T	95,7	95,5	95,8
<i>Tropicibacter naphthalenivorans</i> C02 ^T	95,7	95,7	95,4
<i>Pseudoruegeria aquimaris</i> SW-255 ^T	95,4	95,4	95,5
<i>Phaeobacter daeponensis</i> TF-218 ^T	95,3	95,4	94,7
<i>Thalassobius mediterraneus</i> CECT 5383 ^T	95,3	95,3	95,2
<i>Thalassobius gelatinovorans</i> IAM12617 ^T	95,2	95,2	95,5

La figura 22 corresponde al árbol filogenético obtenido utilizando el algoritmo Neighbour-joining (NJ), en el que se observa cómo las seis cepas en estudio forman parte de un grupo que constituye una rama filogenética separada del resto de las especies del género *Roseobacter* incluidas en el árbol. La cepa R37 presenta valores de similitud de secuencia del gen 16S rRNA del 99,2 y 99,3% con el resto de cepas en estudio, sin embargo en el árbol obtenidos forma una rama a parte del resto de cepas.

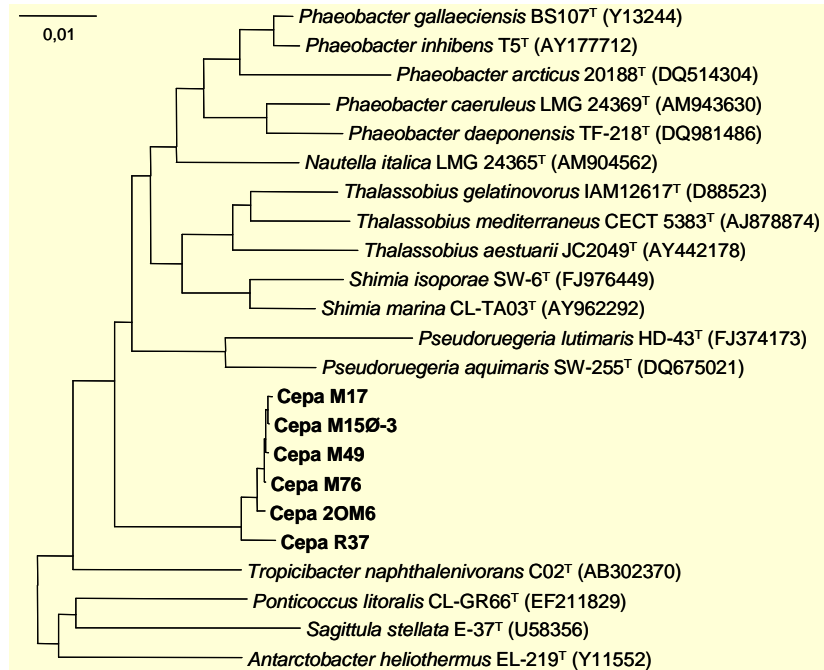


Figura 22: Árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16S rRNA mediante el algoritmo NJ en el que se muestra la posición de las cepas M17, M49, M76, M15Ø-3, 2OM6, R37 y las especies más cercanas. El número de acceso de las secuencias se muestra entre paréntesis. Barra, número de cambios nucleotídicos por sitio.

Los estudios realizados a las cepas M17, M49, M76, M15Ø-3, 2OM6 y R37 muestran valores muy similares en el contenido en G+C pues están comprendidos entre el 57,6 y el 59,0 moles%, lo que está en concordancia con los valores de G+C mol% del grupo Roseobacter (Shiba, 1991; Martens y col., 2006).

Realizamos estudios de secuenciación masiva con el fin de calcular el parámetro ANI entre las seis cepas y determinar si constituyen una misma especie bacteriana, ya que entre ellas mostraban valores de similitud de secuencia del gen 16S rRNA entre el 99,1 y el 100% y valores iguales o inferiores a 95,7% con respecto al resto de especies ya descritas (Tabla 42).

Tabla 42: Relación de valores ANI y TETRA obtenidos por comparación de genomas entre las cepas M17, M49, M15Ø-3, 2OM6 y R37.**ANlb**

Cepa	M17 ^T	M49	M15Ø-3	2OM6	R37 ^T
M17 ^T	---	98,1	97,8	99,2	86,3
M49	97,8	---	97,7	98,4	86,2
M15Ø-3	97,6	98,0	---	98,7	86,0
2OM6	98,7	98,0	98,2	---	86,1
R37 ^T	85,8	86,4	86,1	86,1	---

ANIm

Cepa	M17 ^T	M49	M15Ø-3	2OM6	R37 ^T
M17 ^T	---	98,8	99,2	99,8	90,1
M49	98,9	---	98,9	99,0	90,0
M15Ø-3	99,2	98,9	---	99,4	90,0
2OM6	99,4	99,0	99,4	---	90,0
R37 ^T	90,0	90,0	90,0	90,0	---

TETRA

Cepa	M17 ^T	M49	M15Ø-3	2OM6	R37 ^T
M17 ^T	---	0,995	0,991	0,993	0,986
M49	0,995	---	0,994	0,997	0,992
M15Ø-3	0,991	0,994	---	0,995	0,989
2OM6	0,993	0,997	0,995	---	0,994
R37 ^T	0,986	0,992	0,989	0,994	---

Los valores obtenidos con el parámetro ANI de la cepa M17, seleccionada como cepa tipo, y las cepas M49, 2OM6 y M15Ø-3 oscila entre 97,6 y 99,2% en el caso de ANlb, y entre 98,8 y 99,8% para ANIm. Estos datos están muy por encima del 95% establecido para delimitar especies, por lo que consideramos que las cuatro cepas pertenecen a la misma especie bacteriana. Todas ellas se diferencian de la cepa R37 pues presentan valores que oscilan entre el 85,0 y el 86,4% en el caso de ANlb y de 90,0% en el caso de ANIm. Estos resultados nos indican que podría tratarse de dos especies de un nuevo género.

Las cepas en estudio no crecen en ausencia de NaCl y algunas de ellas requieren combinaciones de sales más complejas para sustentar su crecimiento. Son mesófilas, pues la mayoría crece entre 15 y 30 °C, a excepción de la cepa R37^T que crece hasta 37 °C y las cepas M17^T y 2OM6 hasta 40 °C. Son bacilos (0,7-4,5 µm), Gram negativos, no móviles que forman cadenas cortas y curvadas, además de las rosetas típicas de las alphaproteobacterias (Fig. 23).

El resto de características las cepas M17^T, M49, M76, M15Ø-3, 2OM6 y R37^T se muestran en la Tabla 43 y Tabla 44.

Tabla 43: Características diferenciales entre las cepas M17^T, M49, M76, M15Ø-3, 2OM6 y R37^T y las especies filogenéticamente relacionadas. Todos los resultados proceden de este estudio. +, positivo; -, negativo o no detectado.

Cepas: 1, M17^T; 2, 2OM6; 3, M15Ø_3; 4, M49; 5, M76; 6, R37^T; 7, *P. inhibens* CECT 7251^T; 8, *P. gallaeciensis* CECT 7277^T; 9, *N. italica* CECT 7645^T; 10, *S. marina* CECT 7688^T; 11, *T. naphthalenivorans* CECT 7648^T.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Crecimiento :											
37 °C	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
40 °C	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
2% Na ⁺	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na ⁺ + Ca ²⁺	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
API ZYM											
α-galactosidasa	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
α-glucosidasa	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
β-glucosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
API 20NE											
NO ³⁻ a NO ²⁻	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
NO ²⁻ a N ₂	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Esculina	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PNPG	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
Fuentes únicas de Carbono											
D-xilosa	+	+	+	+	nc	-	-	-	+	-	-
D-glucosa	+	+	+	+	nc	-	-	+	+	-	+
D-fructosa	+	+	+	+	nc	-	+	+	+	-	+
D-galactosa	+	+	+	+	nc	-	+	+	+	-	+
Histidina	+	+	+	+	nc	-	-	-	+	-	+

El análisis de ácidos grasos se llevó a cabo en la CECT. En la Tabla 44 se muestra la composición de los ácidos grasos detectados para el conjunto de cepas en estudio y el de las cepas relacionadas filogenéticamente. La composición es muy similar entre las cepas M17^T, M49, M76, M15Ø-3, 2OM6 y R37^T, sobre todo si se tienen en cuenta los ácidos grasos mayoritarios. Sin embargo, no permite diferenciarlas claramente del resto de especies incluidas en el estudio con excepción de *Tropicibacter* que presenta un perfil completamente diferente.

Tabla 44. Comparación en la composición de los ácidos grasos celulares de las cepas M17^T, M49, M76, M15Ø-3, 2OM6, R37^T y las especies filogenéticamente relacionadas (crecidas en MA, 48h, 28 °C). Todos los datos obtenidos proceden de este estudio. -, no detectable; tr, cantidades traza (<1%). No se muestran los ácidos grasos con cantidades traza o no detectable en todos los casos.

Cepas: 1, M17^T; 2, 2OM6; 3, M15Ø_3; 4, M49; 5, M76; 6, R37^T; 7, *P. inhibens* CECT 7251^T; 8, *P. gallaeciensis* CECT 7277^T; 9, *N. italica* CECT 7645^T; 10, *S. marina* CECT 7688^T; 11, *T. naphthalenivorans* CECT 7648^T.

Ácidos Grasos (%)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Hidroxilados											
C _{10:0} 3OH	3,6	2,9	5,2	4,3	3,6	3,3	3,7	2,9	2,9	9,5	-
C _{12:0} 2OH	1,2	1,0	1,6	1,3	1,3	1,3	-	-	-	-	-
C _{12:0} 3OH	tr	tr	tr	tr	tr	tr	2,1	1,5	1,9	4,9	-
C _{18:0} 3OH	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	1,1	-
C _{16:0} 2OH	2,9	2,7	3,1	2,2	3,1	1,7	1,0	1,2	1,2	-	-
C _{12:1} 3OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,4
Saturados											
C _{9:0}	tr	-	-	tr	tr	-	2,5	1,0	-	-	1,5
C _{12:0}	tr	tr	1,1	1,0	tr	tr	tr	tr	tr	1,0	tr
C _{14:0}	1,1	tr	tr	tr	1,1	tr	2,8	1,8	tr	tr	2,1
C _{16:0}	5,0	4,0	3,7	4,1	5,1	1,9	10,8	9,4	4,0	6,2	7,4
C _{18:0}	2,0	1,9	1,3	2,4	2,0	1,5	2,3	2,3	1,2	1,9	6,9
C _{18:0} iso	2,8	2,3	3,5	2,6	2,3	4,6	1,9	3,9	4,7	-	-
Insaturados											
C _{18:1} ω7c 11-metil	4,2	4,2	2,0	tr	tr	7,3	1,3	tr	1,3	2,2	1,8
C _{18:1} ω9c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3
C _{18:1} ω7c /C _{18:1} ω6c	74,7	79,6	77,0	79,4	78,7	74,9	68,6	71,3	81,0	69,5	73,5

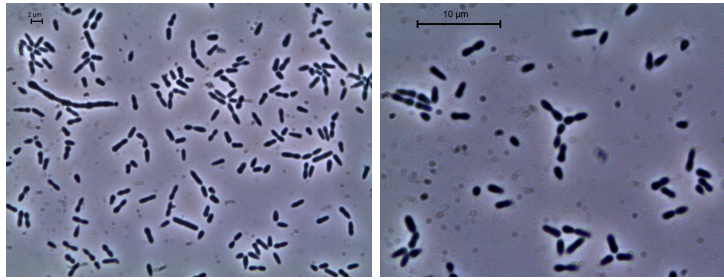


Figura 23: Microfotografías de contraste de fases de las cepas M17^T (izda) y R37^T (dcha).

Por último, el análisis de proteínas por espectrometría de masas MALDI-TOF MS se llevó a cabo en la CECT. El dendrograma obtenido (Fig. 24) mostró una separación clara de la cepa *Phaeoarinomonas costicola* R37^T del conjunto de cepas de *P. mediterranea* M17^T, M49, M76, M15Ø-3 y 2OM6 y del resto de cepas.

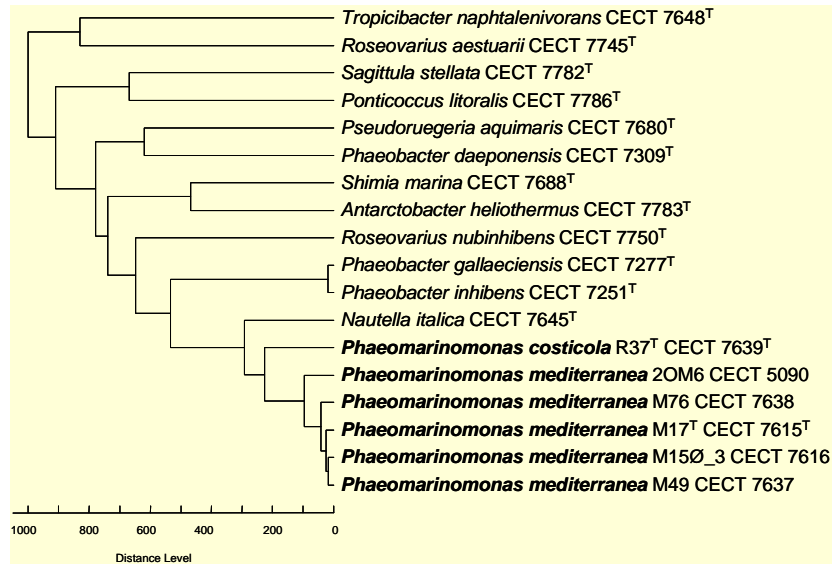


Figura 24: Dendrograma de distancias obtenido por análisis de MALDI-TOF MS en la que se muestra la posición de las cepas M17^T, M49, M76, M15Ø-3, 2OM6, R37^T y las especies más cercanas.

Dentro del estudio fenotípico se incluyó el análisis de la composición de lípidos polares y de quinonas llevados a cabo en Servicio de Identificación de la DSMZ.

El tipo de quinona respiratoria de la cepa M17^T fue la ubiquinona con diez unidades isoprenoides (Q10). Mientras que los lípidos polares detectados fueron fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, y un fosfolípido, un aminolípido y un lípido no identificados.

Descripción de *Phaeomarinomonas* gen. nov.

Phaeomarinomonas (Phaeo.ma.ri.no.mo'nas. Gr. adj. *phaeos*, oscuro, marrón. L. adj. *marinus*, perteneciente al mar, marino; Gr. fem. n. *monas*, unidad, mónada; N.L. fem. n. *Phaeomarinomonas*, mónada marina de color marrón).

Bacilo aeróbio quimioorganótrofo. Positivo para la prueba de la oxidasa y la catalasa. No acumula PHB. Los lípidos polares mayoritarios son fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol, mientras que los ácidos grasos mayoritarios son C_{18:1} ω7c/C_{18:1} ω6c. La quinona respiratoria es Q10. El contenido molar en G+C de la especie tipo es 57,6-59,0 moles%.

La especie tipo es *Phaeomarinomonas mediterranea*.

Descripción de *Phaeomarinomonas mediterranea* sp. nov.

Phaeomarinomonas mediterranea (me.di.te.rra'.ne.a, L. fem. adj., *mediterranea*, perteneciente al mar Mediterráneo).

Además de las características incluidas en la descripción del género, la especie muestra los siguientes rasgos: las células no son móviles y presentan una forma bacilar de 0,6-0,7 μm de ancho y 1-4,5 μm de largo. Crece en MA formando colonias regulares de aspecto cremoso y color que va del beige, en cultivos jóvenes, a marrón en cultivos de más de 15 días de incubación a 26 °C. El conjunto de cepas son mesófilas, pues no presentan crecimiento a 4 °C, y halófilas, pues requieren Na⁺, además de Mg²⁺, para crecer. El rango de salinidad en el que se observó crecimiento en MA es del 2% al 5%, no se produjo crecimiento al 6% o más ni por debajo del 1% de salinidad.

Utiliza los siguientes sustratos en API 20NE: D-glucosa, L-arabinosa, D-manosa, D-manitol, N-acetil-glucosamina, D-maltosa, adipato, malato, citrato trisódico, fenilacetato. Reduce nitratos a nitritos y/o a N₂. Es negativo para las siguientes actividades: arginina dihidrolasa

(ADH), producción de indol a partir de triptófano, ureasa, esterasa (C4), esterasa lipasa (C8), lipasa (C14), cistina arilamidasa, tripsina, α -quimiotripsina, fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa, α -galactosidasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa, α -glucosidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa, α -manosidasa y α -fucosidasa.

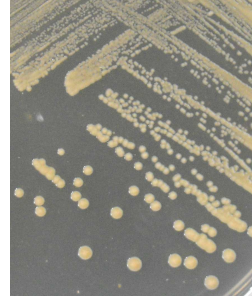


Figura 25: Aspecto que presentan las colonias jóvenes de la cepa M17^T cuando crecen en MA.

Las cepas estudiadas no son capaces de degradar polímeros extracelulares, como DNA, Tween-80, lecitina, gelatina, caseína, almidón, alginato o agar. Además presentan las siguientes actividades enzimáticas en API ZYM: fosfatasas ácida y alcalina y leucina arilamidasa.

Las cepas estudiadas crecen preferentemente con ácidos orgánicos y aminoácidos como fuentes de carbono y energía, aunque también usan algunos carbohidratos. A excepción de la cepa M76, que sólo creció en el control positivo (BMA adicionado con el 0,5% de extracto de levadura) manifestando requerimientos nutricionales específicos, el resto de las cepas en estudio, M17, M49, M76, M15Ø-3 y 2OM6 utilizan los siguientes compuestos como fuentes únicas de carbono y energía para mantener un crecimiento abundante en agar BMA: D-xilosa, D-glucosa, D-fructosa, D-galactosa, D-manitol, D-glicerol, acetato, piruvato, propionato, butirato, 3-hidroxi-butirato, citrato, 2-oxoglutarato, succinato, fumarato, malato, lactato, L-treonina, L-glutamato, L-alanina, L-tirosina, γ -aminobutirato y L-sarcosina y L-histidina.

Por otro lado, no utilizan los siguientes ácidos orgánicos, aminoácidos y carbohidratos como fuentes únicas de carbono y energía: L-arabinosa, D-trehalosa, D-manosa, L-rhamnosa, maltosa, D-celobiosa, sucrosa, lactosa, D-melibiosa, amigdalina, salicina, N-acetil glucosamina, D-gluconato, D-glucuronato, D-galacturonato, D-sorbitol,

m-inositol, D-glicerato, sacarato y putrescina. El resto de sustratos dieron resultados variables entre las repeticiones.

Los ácidos grasos mayoritarios son $C_{18:1} \omega 7c/\omega 6c$ (75-80%), $C_{16:0}$ (4-5%), $C_{10:0} 3OH$ (3-5%) y $C_{16:0} 2OH$ (2-3%). Además, $C_{12:0}$, $C_{18:0}$, $C_{18:0}$ iso y $C_{18:1} \omega 7c$ 11-metil se detectan en baja proporción (1-2%).

La cepa tipo aislada de agua de mar superficial en la playa de la Malvarrosa es M17^T (= CECT 7617^T = KCTC 23058^T).

Descripción de *Phaeomarinomonas costicola* sp. nov.

Phaeomarinomonas costicola (L. n. *costa*, costa, orilla del mar; L. suff. *-cola* (from L. n. *incola*), habitante, residente; N.L. n. *costicola*, que habita en la costa).

Además de las características incluidas en la descripción del género, la especie muestra los siguientes rasgos: las células son inmóviles y presentan una forma bacilar de 0,6-0,7 μm de ancho y 1-4,5 μm de largo. Crece en MA formando colonias regulares de aspecto cremoso y de color beige. En incubaciones prolongadas las colonias desarrollan un color marrón no difusible. Presenta crecimiento entre 15 y 30 °C. Presenta requerimientos salinos complejos, además de Na^+ para crecer. El rango de salinidad en el que se observó crecimiento en MA es del 1,7% al 6%, no se produjo crecimiento al 7% o más ni por debajo del 1% de salinidad. Son bacilos aerobios inmóviles, Gram-negativos, sin gránulos de PHB. Son catalasa y oxidasa positivas. Reducen nitratos a nitritos y a N_2 .



Figura 26: Aspecto que presentan las colonias jóvenes de la cepa R37^T cuando crecen en MA.

Asimila los siguientes sustratos en API 20NE: D-glucosa, L-arabinosa, D-manosa, D-manitol, N-acetil-glucosamina, D-maltosa. Reduce nitratos a N_2 . Es negativo para las siguientes actividades: arginina dihidrolasa (ADH), producción de indol a partir de triptófano, PNPG, ureasa, esterasa (C4), esterasa lipasa (C8), lipasa (C14), cistina

arilamidasa, tripsina, α -quimiotripsina, fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa, α -galactosidasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa, α -glucosidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa, α -manosidasa y α -fucosidasa. La cepa no es capaz de degradar polímeros extracelulares, como DNA, Tween-80, lecitina, gelatina, caseína, almidón, alginato o agar. Además presentan las siguientes actividades enzimáticas en API ZYM: fosfatasas ácida y alcalina y leucina arilamidasa.

Crece preferentemente con ácidos orgánicos y aminoácidos como fuentes de carbono y energía, aunque también usan algunos carbohidratos. Utiliza los siguientes compuestos como fuentes únicas de carbono y energía en BMA: D-glicerol, acetato, propionato, butirato, citrato, 2-oxoglutarato, succinato, fumarato, malato, lactato, L-treonina, L-glutamato, L-alanina, L-tirosina, γ -aminobutyrate y L-sarcosina. Por otro lado, no crece con D-xilosa, D-glucosa, D-fructosa, D-galactosa, D-manitol, piruvato, 3-hidroxibutirato y L-histidina. Tampoco utiliza los siguientes ácidos orgánicos, aminoácidos y carbohidratos como fuentes únicas de carbono y energía: L-arabinosa, D-trehalosa, D-manosa, L-rhamnosa, maltosa, D-celobiosa, sucrosa, lactosa, D-melibiosa, amigdalina, salicina, N-acetil glucosamina, D-gluconato, D-glucuronato, D-galacturonato, D-sorbitol, m-inositol, D-glicerato, sacarato y putrescina. El resto de sustratos dieron resultados variables entre las repeticiones.

Los ácidos grasos mayoritarios son $C_{18:1} \omega 7c/\omega 6c$ (75%), $C_{18:1} \omega 7c$ 11-metil (7%), $C_{18:0}$ iso (5%) y $C_{10:0}$ 3OH (3%). Además, $C_{12:0}$, $C_{16:0}$, $C_{16:0}$ 2OH y $C_{18:0}$ se detectan en baja proporción (1-2%).

La cepa tipo aislada de agua de mar superficial en la playa de la Malvarrosa es R37^T (= CECT 7639^T= KCTC 23353^T).

▪ **Estudio de la cepa 4SM10: *Roseovarius litoralis* sp. nov.**

La cepa 4SM10^T (CECT 7450^T) fue aislada de una muestra de agua de mar obtenida en la costa de Vinaroz, Castellón. Conservada originalmente en MB adicionado con glicerol al 20% y a -80 °C, la cepa ha sido sometida recientemente a un estudio polifásico para su descripción formal como un nuevo miembro del género *Roseovarius*.

El análisis comparativo de la secuencia del gen 16S rRNA de la cepa 4SM10^T (1442 pb) y su alineamiento con respecto a otras secuencias publicadas, permitió situar las cepas dentro del género *Roseovarius* (Labrenz y col., 1999). La secuencia corregida manualmente y alineada con el programa ARB EDIT fue comparada respecto a otras del mismo gen publicadas en la base de datos EMBL. Con la matriz de semejanza obtenida se estableció una relación de los porcentajes de similitud de secuencia (Tabla 45).

Tabla 45: Porcentajes de semejanza obtenidos al comparar la secuencia casi completa del gen 16S rRNA de la cepa 4SM10^T con las secuencias del mismo gen relacionadas filogenéticamente.

Cepa	Nº acceso de secuencia	4SM10 ^T (% similitud)
4SM10		100
<i>Roseovarius nubinhibens</i> ISM ^T	AF098495	97,7
<i>Roseovarius aestuarii</i> SMK-122 ^T	EU156066	97,6
<i>Roseovarius pacificus</i> 812 ^T	DQ120726	95,9
<i>Shimia marina</i> CL-TA03 ^T	AY962292	95,5
<i>Pseudoruegeria aquimaris</i> SW-255 ^T	DQ675021	95,3
<i>Roseovarius tolerans</i> Ekho Lake-172 ^T	Y11551	95,3
<i>Pelagicola litoralis</i> CL-ES2 ^T	EF192392	95,1
<i>Roseovarius halocynthiae</i> MA1-10 ^T	HQ852039	95,1
<i>Roseovarius halotolerans</i> HJ50 ^T	EU431217	94,9
<i>Roseovarius crassostreae</i> CV919-312 ^T	AF114484	94,8
<i>Roseovarius nanhaiticus</i> NH52J ^T	FJ403243	94,6
<i>Roseovarius indicus</i> B108 ^T	EU742628	94,2
<i>Roseovarius mucosus</i> DFL-24 ^T	AJ534215	94,0
<i>Roseovarius marinus</i> HDW-9 ^T	GQ243422	93,3

El género *Roseovarius* fue propuesto por Labrenz y col., en 1999 con la descripción de una única especie, *Roseovarius tolerans*. Posteriormente se han descrito 10 especies nuevas de *Roseovarius*: *Roseovarius nubinhibens* (González y col., 2003), *Roseovarius crassostreae* (Boettcher y col., 2005), *Roseovarius mucosus* (Biebl y

col., 2005), *Roseovarius aestuarii* (Yoon y col., 2008), *Roseovarius pacificus* (Wang y col., 2009), *Roseovarius halotolerans* (Oh y col., 2009), *Roseovarius nanhaiticus* (Wang y col., 2010), *Roseovarius marinus* (Jung y col., 2011b), *Roseovarius indicus* (Lai y col., 2011) y *Roseovarius halocynthiae* (Kim y col., 2012), la mayoría aisladas de agua de mar y sedimentos marinos.

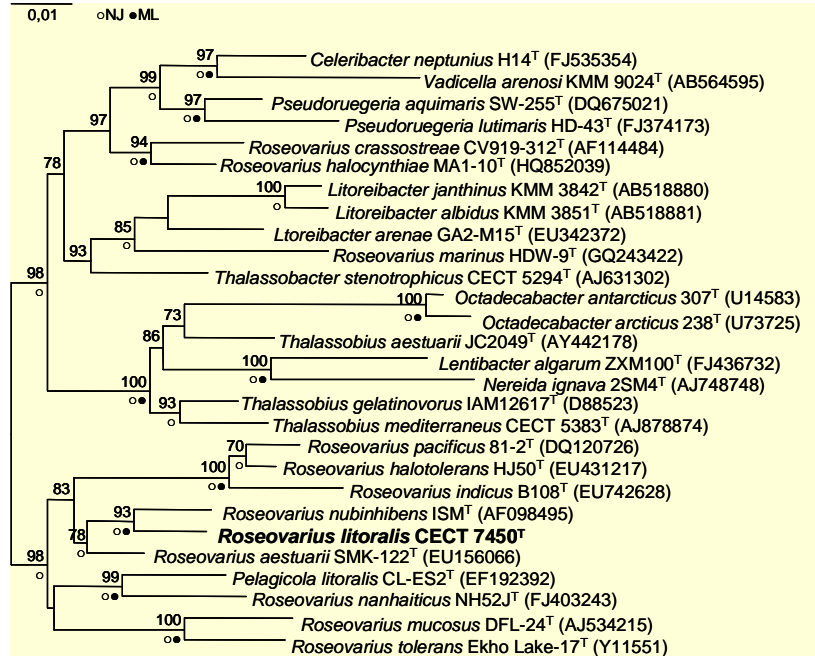


Figura 27: Árbol filogenético de *Máxima Parsimonia* basado en la secuencia casi completa del gen 16S rRNA de la cepa 4SM10^T (*Roseovarius litoralis* sp. nov. CECT 7450^T) y las especies relacionadas más cercanas. Los números de acceso de secuencia se muestran entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o superiores a 70% como porcentaje de 1000 réplicas. Los nodos coincidentes con los obtenidos por *Máxima Verosimilitud* (ML) y *Neighbour Joining* (NJ) se indican por un círculo negro y un círculo blanco, respectivamente. Barra, número de sustituciones por 100 posiciones nucleotídicas.

El análisis filogenético basado en la secuencia completa del gen 16S rRNA (1442 pb) relaciona la cepa 4SM10^T con el género *Roseovarius sensu stricto*, que engloba todas las especies descritas del género a excepción de *Roseovarius marinus*, *Roseovarius crassostreae* y la recientemente descrita, *Roseovarius halocynthiae* (en prensa) que no se asocian con otros géneros en todos los casos estudiados (Fig. 27

MP y Anexo II NJ y ML). Además, la especie *Pelagicola litoralis* siempre aparece asociada al clado *Roseovarius sensu stricto* (LTPs106_SSU).

Las especies *R. nubinhibens* y *R. aestuarii* aparecen como vecinas más próximas de la cepa 4SM10^T (97,7 y 97,6% respectivamente) y con las que forma un clado bien definido y robusto (Fig. 27 MP, NJ y ML Anexo II). Con el resto de especies de *Roseovarius* presentan menos del 96% de similitud de secuencia del gen 16S rRNA. Con el fin de saber si la cepa 4SM10^T se trataba de una nueva especie, distinta de *R. nubinhibens* y *R. aestuarii*, se realizó la secuenciación masiva de los genomas de las tres cepas para calcular el índice ANI.

Tabla 46: Relación de valores ANI y TETRA obtenidos por comparación de genomas entre *Roseovarius litoralis* 4M10^T, *R. nubinhibens* CECT 7750^T y *R. aestuarii* CECT 7745^T.

ANib

Cepa	4SM10 ^T	CEC 7750 ^T	CEC 7745 ^T
4SM10 ^T	---	73,0	74,7
<i>R. nubinhibens</i> CECT 7750 ^T	73,0	---	77,0
<i>R. aestuarii</i> CEC 7745 ^T	74,7	76,8	---

ANIm

Cepa	4SM10 ^T	CEC 7750 ^T	CEC 7745 ^T
4SM10 ^I	---	94,0	86,6
<i>R. nubinhibens</i> CECT 7750 ^I	94,0	---	86,6
<i>R. aestuarii</i> CEC 7745 ^I	86,7	86,6	---

TETRA

Cepa	4SM10 ^T	CEC 7750 ^T	CEC 7745 ^T
4SM10 ^I	---	0,745	0,839
<i>R. nubinhibens</i> CECT 7750 ^I	0,745	---	0,818
<i>R. aestuarii</i> CEC 7745 ^I	0,839	0,818	---

Los valores obtenidos entre la cepa 4SM10^T y las cepas *R. nubinhibens* CECT 7750^T y *R. aestuarii* CECT 7745^T oscila entre 73,0 y 77,0% en el caso de ANib, y entre 86,6 y 94,0% para ANIm. Estos datos están muy lejos del 95% establecido para delimitar especies. El valor de TETRA en todos los casos queda por debajo de 0,99, por lo que consideramos que la cepa 4SM10^T representa una nueva especie dentro del género *Roseovarius*.

El análisis de ácidos grasos fue llevado a cabo en la CECT utilizando el método TSBA6 (MIDI, 2008). Las cepas 4SM10^T, *R. nubinhibens* CECT 7750^T, *R. aestuarii* CECT 7745^T y *R. crassostreae* CECT 7676^T se incubaron en MA a 26 °C durante 24 h. Los ácidos grasos mayoritarios para las cuatro cepas fueron C_{16:1} ω7c (o ω6c), 37,2%; C_{18:1} ω7c (o ω6c), 13,4% y C_{16:0}, 10,1% (Tabla 47).

Tabla 47. Comparación de la composición de los ácidos grasos de *Roseovarius litoralis* 4SM10^T y otras especies del género *Roseovarius*.

Cepas: 1, *R. litoralis* 4SM10^T; 2, *R. nubinhibens* CECT 7750^T; 3, *R. aestuarii* CECT 7745^T; 4, *R. crassostreae* CECT 7676^T; 5, *R. tolerans* EL-172^T; 6, *R. mucosus* DFL-24^T; 7, *R. pacificus* 81-2^T; 8, *R. halotolerans* HJ50^T; 9, *R. nanhaiticus* NH52J^T; 10, *R. marinus* HDW-9^T; 11, *R. indicus* B108^T y 12, *R. halocynthiae* MA1-10^T. –, no detectado; tr, traza (<1%), ECL, *Equivalent chain length*.

Ác. grasos (%):	1*	2*	3*	4*	5 [†]	6 [†]	7 [†]	8 [†]	9 [†]	10 [‡]	11 [†]	12 [§]
Hidroxilados:												
C _{10:0} 3OH	tr	–	tr	2,8	–	1,2	1,1	tr	–	3,6	tr	2,0
C _{12:0} 2OH	–	–	–	–	tr	1,4	–	–	–	–	–	–
C _{12:1} 3OH	–	–	–	–	3,0	2,4	1,0	1,1	–	tr	tr	–
C _{12:0} 3OH	–	3,3	5,5	tr	–	–	2,7	2,5	2,1	–	2,1	–
C _{16:0} 2OH	4,7	–	–	–	tr	5,0	6,1	1,4	–	–	6,8	–
Saturados:												
C _{10:0}	tr	1,0	tr	–	–	–	–	–	–	–	3,2	–
C _{12:0}	5,5	6,4	4,7	tr	1,1	3,9	4,4	4,8	3,2	–	–	4,4
C _{14:0}	tr	tr	tr	tr	1,2	tr	tr	tr	tr	–	tr	–
C _{16:0}	9,4	13,0	15,8	6,4	11,3	9,1	8,4	9,1	17,6	3,2	5,7	9,7
C _{17:0}	tr	tr	tr	tr	2,8	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Insaturados:												
C _{18:1} ω9c	tr	–	–	–	1,5	tr	tr	tr	–	–	tr	–
C _{18:1} ω7c 11-	tr	–	tr	tr	5,0	1,5	8,3	6,0	14,5	7,9	3,9	9,7
C _{19:0} ω8c ciclo	tr	3,	tr	tr	–	5,2	13,6	2,7	–	–	8,6	–
C _{20:2} ω6,9c	2,	tr	tr	1,	–	tr	tr	–	–	–	–	–
Sum In Feature:												
SF2	7,4	tr	–	6,0	tr	tr	tr	tr	tr	5,3	tr	1,6
SF3	tr	2,2	tr	1,9	–	1,1	–	–	tr	–	–	–
SF8	67,1	67,4	67,6	77,5	63,0	60,3	48,0	63,9	53,5	68,8	63,2	65,5
ECL 11,779	–	tr	tr	–	–	tr	–	–	–	3,9	–	tr

Datos procedentes de *este estudio, [†]Lai y col. (2011), [‡]Jung y col. (2011b) y [§]Kim y col. (2012).

Tabla 48. Características fenotípicas diferenciales entre la cepa *Roseovarius litoralis* 4SM10^T y las especies de *Roseovarius* filogenéticamente relacionadas.

Cepas: 1, *R. litoralis* 4SM10^T; 2, *R. nubinihibens* CECT 7750^T; 3, *R. aestuarii* CECT 7745^T; 4, *R. crassostreae* CECT 7676^T; 5, *R. tolerans* CECT 7738^T. +, positivo; -, negativo; d, débil.

	1	2	3	4	5
Movilidad	-	+	+	+	-
Crecimiento:					
4 °C	-	-	-	-	+
37 °C	-	+	-	+	+
2% Na ⁺ + 0,2% Ca ²⁺	+	+	-	-	+
2% Na ⁺ + 0,06% K ⁺	+	+	-	+	+
0,85% sales totales	-	+	-	+	+
7% sales totales	-	+	-	-	-
Hidrólisis de Almidón	-	+	-	-	+
Fuentes únicas de Carbono					
Piruvato sódico	-	+	d	+	-
Propionato	+	-	-	+	-
Citrato	-	-	-	+	-
2-cetoglutarato	+	-	+	+	-
Succinato	-	-	+	+	-
Fumarato	-	d	d	+	-
Malato	-	d	d	+	-
Lactato	+	d	d	+	-
3-hidroxi-butirato	+	-	-	+	-
Glicina	-	-	-	+	-
L-leucina	+	-	-	+	-
L-serina	+	-	-	+	-
L-glutamato	+	d	-	+	-
L-alanina	d	+	-	+	-
L-arginina	+	-	-	+	-
L-tirosina	-	-	-	+	-
L-ornitina	+	-	-	+	-
L-citrulina	+	+	+	-	+
L-aspartato	+	-	-	+	-
L-lisina	+	-	-	+	-
L-histidina	+	+	-	-	-
L-sarcosina	+	-	d	+	-
Putrescina	+	-	+	+	-

El análisis de proteínas realizado en la CECT por espectrometría de masas MALDI-TOF MS dio como resultado el dendrograma que se muestra en la figura 26, donde se observa una separación clara de la cepa *Roseovarius litoralis* 4SM10^T de otras especies del género *Roseovarius*.

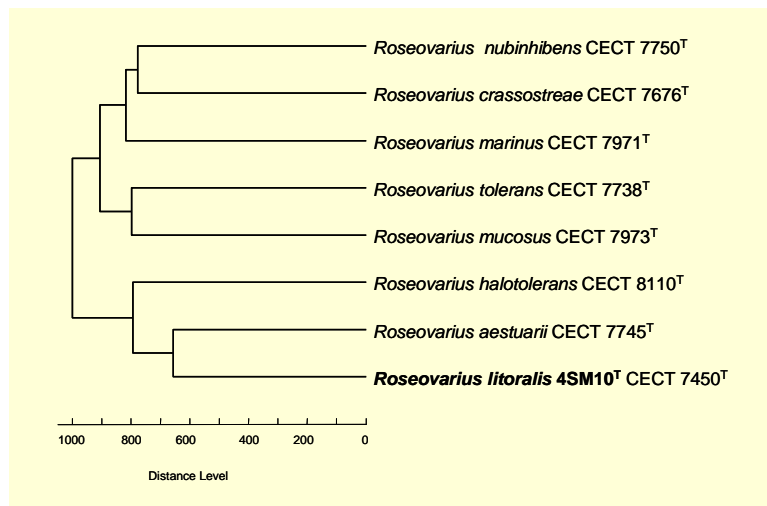


Figura 28: Dendrograma de distancias obtenido por análisis de MALDI-TOF MS en la que se muestra la posición de la cepa *Roseovarius litoralis* 4SM10^T (= CECT 7450^T) y las especies más cercanas del género *Roseovarius*.

El conjunto de datos permite sostener que se trata de una nueva especie para la que proponemos el nombre *Roseovarius litoralis*, siendo 4SM10^T (= CECT 7450^T = KCTC 22653^T) la cepa tipo.

Descripción de *Roseovarius litoralis*, sp. nov.

Roseovarius litoralis sp. nov. (li.to.ra'lis. L. masc. adj. *litoralis*, perteneciente a la costa o litoral, referente al hábitat donde fue aislado el microorganismo).

La cepa 4SM10^T es un bacilo Gram-negativo, inmóvil y no pigmentado, quimioorganotrofo y aerobio, oxidasa y catalasa positivo. Es mesófilo y halófilo débil que muestra requerimientos de iones divalentes Ca²⁺ o Mg²⁺, además de Na⁺, para crecer. La cepa 4SM10^T utiliza mayoritariamente aminoácidos y ácidos orgánicos como fuentes únicas de carbono y energía y no crece en ningún carbohidrato, excepto glicerato. Crece utilizando los siguientes sustratos: D-glicerato, acetato sódico, propionato, 2-cetoglutarato, lactato, 3-hidroxibutirato, L-leucina, L-glutamato, L-arginina, L-ornitina, L-citrulina, GABA, L-aspartato, L-lisina, L-histidina, L-sarcosina y putrescina. Además, presenta un crecimiento débil con los sustratos: D-glucosa, piruvato sódico y L-alanina. No utiliza los siguientes sustratos como fuente de carbo y energía: D-ribosa, L-arabinosa, D-xilosa, D-fructosa, D-galactosa, D-trehalosa, D-manosa, L-rhamnosa, maltosa, D-celobiosa, Sacarosa, Lactosa, D-melibiosa, amigdalina, salicina, NAG, D-gluconato, D-glucuronato, D-galacturonato, glicerol, D-manitol, D-sorbitol, m-inositol, D-sacarato, butirato, citrato, T-aconitato, succinato, fumarato, malato, glicina, L-serina, L-threonina ni L-tirosina. Carece de capacidad hidrolítica extracelular sobre agar, caseína, alginato, almidón, lecitina, DNA y Tween 80.

Presenta como ácidos grasos celulares predominantes C18:1 ω7c / C18:1 ω6c (67,1 %) y un 54,7 mol% de contenido en G+C.

La cepa tipo aislada de agua de mar en la costa de Vinaroz, Castellón es 4SM10^T (=CECT 7450^T = KCTC 22653^T)

CONCLUSIONES

1. La determinación de las secuencias parciales del gen que codifica el 16S rRNA y su análisis posterior, mostró que las bacterias aisladas (178 cepas) de agua de mar de la playa de la Malvarrosa en julio de 2008, están filogenéticamente relacionadas con los filos *Bacteroidetes* (0,6%), *Actinobacteria* (3,9%), *Firmicutes* (4,5%) y *Proteobacteria* (91,0%), concretamente con las clases *Gammaproteobacteria* (68,5%) y *Alphaproteobacteria* (22,5%). Estos datos coinciden con los obtenidos en estudios previos que identifican a las proteobacterias como las bacterias quimioheterótrofas cultivables más abundantes en el agua de mar del Mediterráneo, mientras que las bacterias pertenecientes a otros filos son de más difícil recuperación.
2. La mayoría de las cepas (88) fueron identificadas como pertenecientes al género *Vibrio*, confirmando su dominancia entre las bacterias heterótrofas cultivables presentes en el agua costera del mar Mediterráneo
3. La selección de las cepas de interés taxonómico se hizo basándose en la secuencia parcial (~1000 pb) del gen 16S rRNA. Tomando el valor de 98% como referencia para diferenciar especies, se seleccionaron 35 cepas, lo que representa el 19,7% del total de 178 cepas aisladas.
4. De las 48 cepas aisladas en estudios previos y analizadas en este trabajo de Tesis mediante secuenciación parcial (~1000 pb) del gen 16S rRNA, se seleccionaron cinco cepas por su interés taxonómico, un 10,4% del total de 48 cepas.
5. El análisis de la secuencia completa (>1400 pb) del gen 16S rRNA de las 40 cepas seleccionadas permitió priorizar aquellas cepas con mayor novedad taxonómica, 17, a las que se aplicó un estudio polifásico en profundidad.
6. Mediante la caracterización taxonómica de las cepas seleccionadas se han reconocido siete nuevos taxones dentro de la clase *Alphaproteobacteria*, y ello ha permitido la descripción formal de dos nuevos géneros (*Actibacterium* y *Phaeomarinomonas*) y cinco nuevas especies (*Actibacterium*

mucosum, *Phaeomarinomonas mediterranea*, *Phaeomarinomonas costicola*, *Roseovarius litoralis* y *Tropicibacter multivorans*).

7. Del mismo modo, se han reconocido y descrito cuatro nuevas especies dentro de la clase *Gammaproteobacteria*, *Haliea mediterranea*, *Photobacterium aphoticum*, *Vibrio aestivus* y *Vibrio quintilis*.
8. Además, se ha descrito un nuevo género y dos nuevas especies pertenecientes al filo *Bacteroidetes*, *Euzebyella saccharophila*, género nuevo con una sola especie, y *Marinifilum flexuosus*.
9. El análisis comparativo genómico, utilizando parámetros no dependientes de anotación (ANlB, ANIm y TETRA) sobre datos de secuenciación masiva al azar, ha permitido delimitar especies de acuerdo con los umbrales propuestos, de modo satisfactorio.
10. Este estudio ha puesto de manifiesto la existencia de taxones no descritos entre las poblaciones bacterianas fácilmente cultivables y procedentes de nuestro entorno inmediato.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Akagawa M & Yamasato K (1989).** Synonymy of *Alcaligenes aquamarinus*, *Alcaligenes faecalis* subsp. *homari*, and *Deleya aesta*: *Deleya aquamarina* comb. nov. as the type species of the genus *Deleya*. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 462-466.
- Albuquerque L, Rainey FA, Nobre MF & Da Costa MS (2011).** *Schleiferia thermophila* gen. nov., sp. nov., a slightly thermophilic bacterium of the phylum 'Bacteroidetes' and the proposal of *Schleiferiaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 2450-2455.
- Antón J, Oren A, Benlloch S, Rodríguez-Valera F, Amann R & Rosselló-Mora R (2002).** *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the *Bacteria* from saltern crystallizer ponds. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 485-491.
- Arahal DR, Vreeland RH, Litchfield CD, Mormile MR, Tindall BJ, Oren A, Bejar V, Quesada E & Ventosa A (2007).** Recommended minimal standards for describing new taxa of the family *Halomonadaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2436-2446.
- Arahal DR, Sánchez E, Macián MC & Garay E (2008).** Value of *recN* sequences for species identification and as a phylogenetic marker within the family "Leuconostocaceae". *Int Microbiol* **11**, 33-39.
- Ast JC & Dunlap PV (2005).** Phylogenetic resolution and habitat specificity of members of the *Photobacterium phosphoreum* species group. *Environ Microbiol* **7**, 1641-1654.
- Auch AF, von Jan M, Klenk HP & Göker M. (2010a).** Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Stand Genomic Sci* **2**, 117-34.
- Auch AF, Klenk HP & Göker M (2010b).** Standard operating procedure for calculating genome-to-genome distances based on high-scoring segment pairs. *Stand Genomic Sci* **2**, 142-8.

B

- Bachmann BJ (1955).** Studies on *Cytophaga fermentans* N. Sp., A facultatively anaerobic lower myxobacterium. *J Gen Microbiol* **13**, 541-551.
- Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W & Schleifer KH (1992).** The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. Volumes I-IV, pp. 4126.

- Baumann P & Baumann L (1981).** The marine gram-negative eubacteria: genera *Photobacterium*, *Beneckeia*, *Alteromonas*, *Pseudomonas* and *Alcaligenes*. In: *The Prokaryotes*, vol. 2, pp. 1302-1331. Edited by Starr MP, Stolp H, Trueper HG, Balows A & Schlegel H. Berlin & Heidelberg: Springer.
- Baumann L, Bowditch RD & Baumann P (1983).** Description of *Deleya* gen. nov. created to accommodate the marine species *Alcaligenes aestus*, *Alcaligenes pacificus*, *Alcaligenes cupidus*, *Alcaligenes venustus*, and *Pseudomonas marina*. *Int J Syst Bacteriol* **33**, 793-802.
- Baumann P, Furniss AL & Lee JV (1984).** Genus I *Vibrio* (Pacini, 1854). In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 518-538. Edited by Krieg NR and Holt JG. Baltimore: The Williams and Wilkins Co.
- Beaz-Hidalgo R, Doce A, Balboa S, Barja JL & Romalde JL (2010).** *Aliivibrio finisterrensis* sp. nov., isolated from Manila clam, *Ruditapes philippinarum* and emended description of the genus *Aliivibrio*. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 223-228.
- Beijerinck MW (1889).** Le *Photobacterium lamosum*, Bactérie lumineuse de la Mer du Nord. *Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles* **23**, 401-427.
- Bernardet JF, Segers P, Vancanneyt M, Berthe F, Kersters K & Vandamme P (1996).** Cutting a Gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (Basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978). *Int J Syst Bacteriol* **46**, 128-148.
- Bernardet JF, Nakagawa Y & Holmes B (2002).** Proposed minimal standards for describing new taxa of the family *Flavobacteriaceae* and emended description of the family. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1049-1070.
- Bernadet JF & Nakagawa Y (2006).** An Introduction to the family *Flavobacteriaceae*. In: *The Prokaryotes*, 3rd ed., pp. 455-480. Edited by Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH and Stackebrandt E. New York: Springer.
- Bernadet JF (2012).** VALIDATION LIST N° 143. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 1-4. [Order I. *Flavobacteriales* ord. nov. In: Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W and Whitman WB (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition, vol. 4 (The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes (Mollicutes)*, *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*), Springer, New York, 2010, p. 105.]

- Biebl H, Allgaier M, Lünsdorf H, Pukall R, Tindall BJ & Wagner-Döbler I (2005).** *Roseovarius mucosus* sp. nov., a member of the *Roseobacter* clade with trace amounts of bacteriochlorophyll *a*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 2377-2383.
- Boettcher KJ, Geaghan KK, Maloy AP & Barber BJ (2005).** *Roseovarius crassostreae* sp. nov., a member of the *Roseobacter* clade and the apparent cause of juvenile oyster disease (JOD) in cultured Eastern oysters. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1531-1537.
- Bohlin J, Skjerve E, Ussery DW (2008).** Reliability and applications of statistical methods based on oligonucleotide frequencies in bacterial and archaeal genomes. *BMC Genomics* **9**, 104.
- Bowman JP (2005).** Order VII. *Methylococcales* ord. nov. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT and Garrity GM (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 2 (The *Proteobacteria*), part B (The *Gammaproteobacteria*), Springer, New York, pp. 248-252.]
- Bowman JP (2006a).** VALIDATION LIST N° 107. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1-6. [Family V. *Methylocystaceae* fam. nov. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT and Garrity GM (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition, vol. 2 (The *Proteobacteria*), part C (The *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*-, and *Epsilonproteobacteria*), Springer, New York, 2005, pp. 411-413.]
- Bowman JP (2006b).** The marine clade of the family *Flavobacteriaceae*: The genera *Aequorivita*, *Arenibacter*, *Cellulophaga*, *Croceibacter*, *Formosa*, *Gelidibacter*, *Gillisia*, *Maribacter*, *Mesonina*, *Muricauda*, *Polaribacter*, *Psychroflexus*, *Psychroserpens*, *Robiginitalea*, *Salegentibacter*, *Tenacibaculum*, *Ulvibacter*, *Vitellibacter* and *Zobellia*. In: *The Prokaryotes*, 3rd ed., pp. 677-694. Edited by Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH and Stackebrandt E. New York: Springer.
- Bowman JP & McMeekin TA (2005).** Order X. *Alteromonadales* ord. nov. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT and Garrity GM (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 2 (The *Proteobacteria*), part B (The *Gammaproteobacteria*), Springer, New York, p. 443.
- Brenner DJ, Fanning GR, Rake AV & Johnson KE (1969).** Batch procedure for thermal elution of DNA from hydroxyapatite. *Analytical Biochemistry* **28**, 447-459.
- Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT & Garrity GM (2005a).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition, vol. 2 (The *Proteobacteria*), part A (Introductory Essays), Springer, New York, 304 pages.

Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT & Garrity GM (2005b). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol. 2 (The *Proteobacteria*), part B (The *Gammaproteobacteria*), Springer, New York, 1106 pages.

Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT & Garrity GM (2005c). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol. 2 (The *Proteobacteria*), part C (The *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*-, and *Epsilonproteobacteria*), Springer, New York, 1256 pages.

Bull AT & Stach JEM (2004). An overview of biodiversity? Estimating the scale. In: Microbial diversity and bioprospecting (ed. Bull AT), pp. 15-28. ASM, Washington, D.C.

Busse HJ, Denner EB & Lubitz W (1996). Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *J Biotechnol* **47**(1):3-38. Review.

C

Cavalier-Smith T (2002). The neomuran origin of *archaeobacteria*, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 7-76.

Chen C, Zheng Q, Wang YN, Yan XJ, Hao LK, Du X & Jiao N (2010). *Stakelama pacifica* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Sphingomonadaceae* isolated from the Pacific Ocean. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 2857-2861.

Chimetto LA, Cleenwerck I, Thompson CC, Brocchi M, Willems A, De Vos P & Thompson FL (2010). *Photobacterium jeanii* sp. nov., isolated from corals and zoanthids. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 2843-2848.

Cho JC & Giovannoni SJ (2003). *Parvularcula bermudensis* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium that forms a deep branch in the α -Proteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1031-1036.

Choi DH, Yi H, Chun J & Cho BC (2006). *Jannaschia seosinensis* sp. nov., isolated from hypersaline water of a solar saltern in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 45-49.

Choi DH, Yi H, Cho JC, Lanoil BD, Giovannoni SJ & Cho BC (2007). *Maribius salinus* gen. nov., sp. nov., isolated from a solar saltern and *Maribius pelagius* sp. nov., cultured from the Sargasso Sea, belonging to the *Roseobacter* clade. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 270-275.

Chun J, Lee JH, Jung Y, Kim M, Kim S, Kim BK & Lim YW (2007). EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2259-2261.

Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM & Tiedje JM (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nuc Acids Res* **37**, D141-D145.

Cramer MJ, Haghshenas N, Bagwell CE, Matsui GY & Lovell CR (2011). *Celerinatantimonas diazotrophica* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium representing a new family in the *Gammaproteobacteria*, *Celerinatantimonadaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 1053-1060.

Crespo-Medina M, Chatziefthimiou A, Cruz-Matos R, Pérez-Rodríguez I, Barkay T, Lutz RA, Starovoytov V & Vetriani C (2009). *Salinisphaera hydrothermalis* sp. nov., a mesophilic, halotolerant, facultatively autotrophic, thiosulfate-oxidizing gammaproteobacterium from deep-sea hydrothermal vents, and emended description of the genus *Salinisphaera*. *Int. J Syst Evol Microbiol* **59**, 1497-1503.

Curtis TP, Sloan WT & Scannell JW (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc Natl Acad Sci* **99**, 10494-10499.

D

de la Haba RR, Marquez MC, Papke TR & Ventosa A (2012). Multilocus sequence analysis (MLSA) of the family *Halomonadaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* doi:10.1099/ijls.0.032938-0

Denger K, Warthmann R, Ludwig W, Schink B (2002). *Anaerophaga thermohalophila* gen. nov., sp. nov., a moderately thermohalophilic, strictly anaerobic fermentative bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 173-178.

Devulder G, Pierre G, Baty F & Flandrois JP (2003). BIBI, a bioinformatics bacterial identification tool. *J Clin Microbiol* **41**, 1785-1787.

Dobson SJ & Franzmann PD (1996). Unification of the genera *Deleya* (Baumann et al. 1983), *Halomonas* (Vreeland et al. 1980), and *Halovibrio* (Fendrich 1988) and the species *Paracoccus halodenitrificans* (Robinson and Gibbons 1952) into a single genus, *Halomonas*, and placement of the genus *Zymobacter* in the family *Halomonadaceae*. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 550-558.

Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH & Stackebrandt E (2006). *The Prokaryotes*, vols. 1-7 3rd ed. Springer, New York.

E

Embley TM & Stackebrandt E (1997). Species in practice: exploring uncultured prokaryote diversity in natural samples. In: *Species: The Units of Biodiversity*, pp. 61-81. Edited by Claridge MF, Dawah HA and Wilson MR. London: Chapman and Hall.

Emerson D, Rentz JA, Lilburn TG, Davis, RE, Aldrich H, Chan C & Moyer CL (2010). VALIDATION LIST N° 135. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 1985-1986. [A novel lineage of *Proteobacteria* involved in formation of marine Fe-oxidizing microbial mat communities. *PLoS ONE*, 2007, **2**(8): e667].

F

Farmer III JJ & Janda JM (2005). Family I. *Vibrionaceae* Veron 1965, 5245^{AL}. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 491-494. Edited by Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT and Garrity GM. New York: Springer.

Farmer III JJ, Janda JM, Brenner FW, Cameron DN & Birkhead KM (2005). Genus I. *Vibrio* Pacini 1854, 411^{AL}. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed, vol 2, part B, pp. 494-546. Edited by Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT and Garrity GM. New York: Springer.

Farmer III, JJ & Hickman-Brenner FW (2006). The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. In: *The Prokaryotes*, 3rd ed., pp. 508-563. Edited by Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH and Stackebrandt E. New York: Springer.

Fleischmann R, Adams M, White O, Clayton R, Kirkness E, Kerlavage A, Bult C, Tomb J, Dougherty B & Merrick J (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269** (5223), 496-512.

Fox GE, Pechman KR & Woese CR (1977). Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: Molecular approach to procaryotic systematics. *Int J Syst Bacteriol* **27**, 44-57.

Fukunaga Y, Kurahashi M, Sakiyama Y, Ohuchi M, Yokota A & Harayama S (2010). VALIDATION LIST N° 131. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 1-2. [*Phycisphaera mikurensis* gen. nov., sp. nov., isolated from a marine alga, and proposal of *Phycisphaeraceae* fam. nov., *Phycisphaerales* ord. nov. and *Phycisphaerae* classis nov. in the phylum *Planctomycetes*. *J Gen Appl Microbiol* 2009, **55**, 267-275.]

Furniss AL, Lee JV & Donovan TJ (1978). The Vibrios. London: Public Health Laboratory Service. Monograph Series, no 11.

G

Garrity GM (2001-2009). "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" 5 Vols., 2nd ed. Springer, New York.

Garrity GM, Bell JA & Lilburn T (2005a). Filo XIV. *Proteobacteria* phyl. nov. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT and Garrity GM (Eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 2 (The *Proteobacteria*), part B (The *Gammaproteobacteria*), Springer, New York.

- Garrity GM, Bell JA & Lilburn T (2005b).** VALIDATION LIST N° 106. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 2235-2238. [Filo XIV. *Proteobacteria* phyl. nov. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT and Garrity GM (Eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 2 (The *Proteobacteria*), part B (The *Gammaproteobacteria*), Springer, New York, 2005, p. 1.]
- Garrity GM, Bell JA & Lilburn T (2006).** VALIDATION LIST N° 107. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1-6. [Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT and Garrity GM (Eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 2 (The *Proteobacteria*), part C (The *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*-, and *Epsilonproteobacteria*), Springer, New York, 2005.]
- Garrity GM, Lilburn TG, Cole JR, Harrison SH, Euzéby J & Tindall BJ (2007).** Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea, Release 7.7. Michigan State University Board of Trustees. DOI: 10.1601/TOBA7.7
- Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA & Krieg NR (1994).** *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- González JM, Covert JS, Whitman WB, Henriksen JR, Mayer F, Scharf B, Schmitt R, Buchan A, Fuhrman JA & other authors (2003).** *Silicibacter pomeroyi* sp. nov. and *Roseovarius nubinhibens* sp. nov., dimethylsulfoniopropionate-demethylating bacteria from marine environments. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1261-1269.
- Goodfellow M & O'Donnell AG (1993).** Roots of bacterial systematics. In: *Handbook of New Bacterial Systematics*, pp. 3-54. Goodfellow M y O'Donnell AG (eds.). London: Academic Press.
- Goodfellow M, Manfio GP & Chun J (1997).** Towards a practical species concept for cultivable bacteria. In: *Species: The units of biodiversity*, pp. 25-59. Claridge MF y Dawah HA (eds.). London: Chapman and Hall.
- Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM (2007).** DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 81-91.
- Grimont PAD, Popoff MY, Grimont F, Coynault C & Lemelin M (1980).** Reproducibility and correlation study of three deoxyribonucleic acid hybridization procedures. *Curr Microbiol* **4**, 325-330.

H

- Harwati TU, Kasai Y, Kodama Y, Susilaningsih D & Watanabe K (2009).** *Tropicibacter naphthalenivorans* gen. nov., sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from Semarang Port in Indonesia. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 392-396.

Hedlund BP (2010). Phylum XXIII. *Verrucomicrobia* phyl. nov. In: Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W and Whitman WB (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition, vol. 4 (The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes (Mollicutes)*, *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*), Springer, New York, p. 795.

Hedlund BP (2012). VALIDATION LIST N°143. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 1-4. [Phylum XXIII. *Verrucomicrobia* phyl. nov. In: Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W and Whitman WB (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition, vol. 4 (The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes (Mollicutes)*, *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*), Springer, New York, 2010, p. 795.].

Heimbrook ME, Wang WLL & Campbell G (1989). Staining bacterial flagella easily. *J Clin Microbiol* **27**, 2612-2615.

Henrici AT & Johnson D (1935). Stalked bacteria, a new order of *Schizomycetes*. *J Bacteriol* **29**, 3-4.

Holt, J.G. (ed.) "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" 4 Vols., 1st ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland. (1984-1989).

I

Imhoff JF (2005). VALIDATION LIST N° 106. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 2235-2238. [Order I. *Chromatiales* ord. nov. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT and Garrity GM (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 2 (The *Proteobacteria*), part B (The *Gammaproteobacteria*), Springer, New York, 2005, pp. 1-3.]

Ivanova EP, Flavier S & Christen R (2004). Phylogenetic relationships among marine *Alteromonas*-like proteobacteria: emended description of the family *Alteromonadaceae* and proposal of *Pseudoalteromonadaceae* fam. nov., *Colwelliaceae* fam. nov., *Shewanellaceae* fam. nov., *Moritellaceae* fam. nov., *Ferrimonadaceae* fam. nov., *Idiomarinaceae* fam. nov. and *Psychromonadaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1773-1788.

J

Jung SY, Jung YT, Oh TK & Yoon JH (2007). *Photobacterium lutimaris* sp. nov., isolated from a tidal flat sediment in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 332-336.

Jung JY, Kim JM, Jin HM, Kim SY, Park W & Jeon CO (2011a). *Litorimonas taeanensis* gen. nov., sp. nov., isolated from a sandy beach. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 1534-1538.

Jung YT, Lee JS, Oh KH, Oh TK & Yoon JH (2011b). *Roseovarius marinus* sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 427-432.

K

Kämpfer P & Kroppenstedt RM (1996). Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Can J Microbiol* **42**, 989-1005.

Kämpfer P (2012). VALIDATION LIST N° 143. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 1-4. [Class III. *Sphingobacteriia* class. nov. In: Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W and Whitman WB (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 4 (The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* (*Mollicutes*), *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*), Springer, New York, 2010, p. 330.]

Kersters KK, De Vos P, Gillis M, Swings J, Vandamme P & Stackebrandt E (2006). Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses. In: *The Prokaryotes* 3rd ed., Vol 5, pp. 3-37. Edited by M Dworkin (Editor-in-Chief), S Falkow, E Rosenberg, KH Schleifer, E Stackebrandt (Editors). New York: Springer.

Kim H, Choo YJ & Cho JC (2007). *Litoricolaceae* fam. nov., to include *Litoricola lipolytica* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium belonging to the order *Oceanospirillales*. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 1793-1798.

Kim BS, Lim YW & Chun J (2008). *Sphingopyxis marina* sp. nov. and *Sphingopyxis litoris* sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 2415-2419.

Kim YO, Kim KK, Park S, Kang SJ, Lee JH, Lee SJ, Oh TK & Yoon JH (2010). *Photobacterium gaetbulicola* sp. nov., a lipolytic bacterium isolated from a tidal flat sediment in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 2587-2591.

Kim YO, Kong HJ, Park S, Kang SJ, Lee JH, Kim JW, Kim KK, Oh TK & Yoon JH (2012). *Roseovarius halocynthiae* sp. nov., isolated from sea squirt *Halocynthia roretzi*. *Int J Syst Evol Microbiol* doi:10.1099/ijls.0.031674-0.

Konstantinidis KT & Tiedje JM (2005a). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci* **102**, 2567-2572.

Konstantinidis KT & Tiedje JM (2005b). Towards a genome-based taxonomy for Prokaryotes. *J Bacteriol* **187**, 6258-6264.

- Kovacs N (1956).** Identification of *Pseudomonas pyogenes* by the oxidase reactions. *Nature* 178, 703.
- Krieg NR (2005).** Identification of Procaryotes. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 2 (The *Proteobacteria*), part A (Introductory Essays), Springer, New York, 33-37 pages.
- Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W & Whitman WB (2010).** The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes (Mollicutes)*, *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 4. Springer.
- Krieg NR (2012).** VALIDATION LIST N° 143. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 1-4. [Class I. *Bacteroidia* class. nov. In: Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W and Whitman WB (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 4 (The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes (Mollicutes)*, *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*), Springer, New York, 2010, p. 25.].
- Kuever J, Rainey FA & Widdel F (2005).** Class IV. *Deltaproteobacteria* class. nov. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT and Garrity GM (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 2 (The *Proteobacteria*), part C (The *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*-, and *Epsilonproteobacteria*), Springer, New York, p. 922.
- Kuever J, Rainey FA & Widdel F (2006).** VALIDATION LIST N° 107. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56, 1-6. [Class IV. *Deltaproteobacteria* class. nov. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT and Garrity GM (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 2 (The *Proteobacteria*), part C (The *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*-, and *Epsilonproteobacteria*), Springer, New York, 2005, p. 922.]
- Kurahashi M, Fukunaga Y, Harayama S & Yokota A (2008).** *Sneathiella glossodoripedis* sp. nov., a marine alphaproteobacterium isolated from the nudibranch *Glossodoris cincta*, and proposal of *Sneathiellales* ord. nov. and *Sneathiellaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 548-552.
- Kuykendall LD (2006).** VALIDATION LIST N° 107. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 1-6. [Order VI. *Rhizobiales* ord. nov. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT and Garrity GM (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 2 (The *Proteobacteria*), part C (The *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*-, and *Epsilonproteobacteria*), Springer, New York, 2005, p. 324.]
- Kwon KK, Lee HS, Yang SH & Kim SJ (2005).** *Kordiimonas gwangyangensis* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from

marine sediments that forms a distinct phyletic lineage (*Kordiimonadales* ord. nov.) in the 'Alphaproteobacteria'. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 2033-2037.

L

Labeda DP (2005). Culture collections: an essential resource for microbiology. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 2 (The *Proteobacteria*), part A (Introductory Essays), Springer, New York, 304 pages.

Labrenz M, Collins MD, Lawson PA, Tindall BJ, Schumann P & Hirsch P (1999). *Roseovarius tolerans* gen. nov., sp. nov., a budding bacterium with variable bacteriochlorophyll *a* production from hypersaline Ekho Lake. *Int J Syst Bacteriol*, **49**, 137-147

Lai Q, Zhong H, Wang J, Yuan J, Sun F, Wang L, Zheng T & Shao Z (2011). *Roseovarius indicus* sp. nov., isolated from deep-sea water of the Indian Ocean. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 2040–2044.

Lagesen K, Ussery DW, Wassenaar TM (2010). Genome update: the 1000th genome - a cautionary tale. *Microbiol* **156**, 603-608.

Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML & Pace NR (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci* **82**, 6955-6959.

Lapage SP, Sneath PH, Skerman VBD, Lessel EF, Seeliger HPR & Clark WA (1992). International Code of Nomenclature of Bacteria (1990 Revision). *ASM*, Washington, D.C.

Le Roux F, Goubet A, Thompson FL, Faury N, Gay M, Swings J & Saulnier D (2005). *Vibrio gigantis* sp. nov., isolated from the haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*). *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 2251-2255.

Leadbetter ER (1974). Order II. *Cytophagales Nomen novum*. In: Buchanan RE and Gibbons NE (eds): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, eighth edition, The Williams & Wilkins Co, Baltimore, p.99.

Lee JV & Donovan TJ (1985). *Vibrio*, *Aeromonas* and *Pleisomonas*. In: Isolation and Identification of Microorganisms of Medical and Veterinary Importance, pp. 13-33. Edited by Collins CH and Grange JM. London: Academic Press.

Lee KB, Liu CT, Anzai Y, Kim H, Aono T & Oyaizu H (2005). The hierarchical system of the 'Alphaproteobacteria': description of *Hyphomonadaceae* fam. nov., *Xanthobacteraceae* fam. nov. and *Erythrobacteraceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1907-1919.

- Lucena T, Pascual J, Garay E, Arahal DR, Macián MC, Pujalte MJ (2010a).** *Haliaea mediterranea* sp. nov., a new marine gammaproteobacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 1844-1848.
- Lucena T, Pascual J, Giordano A, Gambacorta A, Garay E, Arahal DR, Macián MC, Pujalte MJ (2010b).** *Euzebyella saccharophila* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium of the family *Flavobacteriaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 2871-6.
- Lucena T, Ruvira MA, Pascual J, Garay E, Macián MC, Arahal DR, Pujalte MJ (2011).** *Photobacterium aphoticum* sp. nov., isolated from coastal water. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 1579-84.
- Lucena T, Pujalte MJ, Ruvira MA, Garay E, Macián MC, Arahal DR (2012a).** *Tropicibacter multivorans* sp. nov., an aerobic Alphaproteobacterium isolated from surface seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 844-848.
- Lucena T, Ruvira MA, Garay E, Macián MC, Arahal DR, Pujalte MJ (2012b).** *Actibacterium mucosum* gen. nov., sp. nov., a new marine Alphaproteobacterium from Mediterranean seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* doi:10.1099/ijs.0.038026-0.
- Ludwig W & Schleifer KH (1994).** Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Rev* **15**, 155-173.
- Ludwig W, Strunk O, Klugbauer S, Klugbauer N, Weizenegger M, Neumaler J, Bachleitner M & Schleifer KH (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 & other authors (2004).** ARB: a software environment for sequence data. *Nucl Acids Res* **32**, 1363-1371.
- Ludwig W, Euzeby J & Whitman WB (2011).** Family II. *Marinilabiliaceae* fam. nov. In: NR Krieg, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W, Whitman WB (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed., vol. 4, Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, p. 49.

M

- Macián MC, Ludwig W, Aznar R, Grimont PA, Schleifer KH, Garay E & Pujalte MJ (2001).** *Vibrio lentus* sp. nov., isolated from Mediterranean oysters. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1449-1456.
- Macián MC, Arahal DR, Garay E, Ludwig W, Schleifer KH & Pujalte MJ (2005a).** *Thalassobacter stenotrophicus* gen. nov., sp. nov., a novel marine

- α-proteobacterium* isolated from Mediterranean sea water. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 105-110.
- Macián MC, Arahál DR, Garay E, Ludwig W, Schleifer KH & Pujalte MJ (2005b)**. *Jannaschia rubra* sp. nov., a red-pigmented bacterium isolated from sea water. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 649-653.
- Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV & Clark DP (2009)**. Brock Biology of Microorganisms. 12^a ed. Prentice Hall.
- Maier T, Klepel S, Renner U & Kostrzewa M (2006)**. Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification. *Nature Methods*, Nature Publishing Group. Application note.
- Margalef R (1998)**. *Ecología*. Ediciones Omega, S. A. Barcelona
- Martens T, Heidorn T, Pukall R, Simon M, Tindall BJ & Brinkhoff T (2006)**. Reclassification of *Roseobacter gallaeciensis* Ruiz-Ponte *et al.* 1998 as *Phaeobacter gallaeciensis* gen. nov., comb. nov., description of *Phaeobacter inhibens* sp. nov., reclassification of *Ruegeria algicola* (Lafay *et al.* 1995) Uchino *et al.* 1999 as *Marinovum algicola* gen. nov., comb. nov., and emended descriptions of the genera *Roseobacter*, *Ruegeria* and *Leisingera*. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1293-1304.
- Martin-Carnahan A & Joseph SW (2005)**. VALIDATION LIST N° 106. *Int. J Syst Evol Microbiol* **55**, 2235-2238. [Order XII. *Aeromonadales* ord. nov. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT and Garrity GM (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 2 (The *Proteobacteria*), part B (The *Gammaproteobacteria*), Springer, New York, 2005, p. 556.]
- Martínez-Checa F, Quesada E, Martínez-Cánovas MJ, Llamas I & Béjar V (2005)**. *Palleronia marisminoris* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharideproducing bacterium belonging to 'Alphaproteobacteria', isolated from a saline soil. *Int J Syst Bacteriol* **55**, 2525-2530.
- Martínez-Murcia AJ, Monera A, Saavedra MJ, Oncina R, Lopez-Alvarez M, Lara E & Figueras MJ (2011)**. Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. *Syst Appl Microbiol* **34**, 189-199.
- Mellado E, Moore ERB, Nieto JJ & Ventosa A (1996)**. Analysis of 16S rRNA gene sequences of *Vibrio costicola* strains: description of *Salinivibrio costicola* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 817-821.
- Mesbah M, Premachandran U & Whitman WB (1989)**. Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 159-167.
- MIDI (2008)**. Sherlock Microbial Identification System Operating Manual, version 6.1. Newark, DE: MIDI Inc.

- Miroshnichenko ML, L'haridon S, Schumann P, Spring S, Bonch-Osmolovskaya EA, Jeanthon C & Stackebrandt E (2004).** *Caminibacter profundus* sp. nov., a novel thermophile of *Nautiliales* ord. nov. within the class '*Epsilonproteobacteria*', isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 41-45.
- Munoz R, Yarza P, Ludwig W, Euzéby J, Amann R, Schleifer KH, Glöckner FO & Rosselló-Móra R (2011).** Release LTPs104 of the All-Species Living Tree. *Syst Appl Microbiol* **34**, 169-170.
- Murray RG & Schleifer KH (1994).** Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* **44**, 174-176.
- Murray RG & Stackebrandt E (1995).** Taxonomic note: implementation of the provisional status Candidatus for incompletely described procaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* **45**, 186-187.

N

- Na H, Kim S, Moon EY & Chun J (2009).** *Marinifilum fragile* gen. nov., sp. nov., isolated from tidal flat sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 2241-2246.
- Nakagawa Y, Yamasato K (1996).** Emendation of the genus *Cytophaga* and transfer of *Cytophaga agarovorans* and *Cytophaga salmonicolor* to *Marinilabilia* gen. nov.: phylogenetic analysis of the *Flavobacterium-Cytophaga* complex. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 599-603.
- Nakagawa S, Takai K, Inagaki F, Horikoshi K & Sako Y (2005).** *Nitratiruptor tergarucus* gen. nov., sp. nov. and *Nitratifactor salsuginis* gen. nov., sp. nov., nitrate-reducing chemolithoautotrophs of the ϵ -*Proteobacteria* isolated from a deep-sea hydrothermal system in the Mid-Okinawa Trough. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 925-933.
- Nakagawa Y (2011).** Genus I. *Cytophaga* Winogradsky 1929, 577^{AL} emend. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 4, pp. 371-374. Edited by N. R. Krieg, J. T. Staley, D. R. Brown, B. P. Hedlund, B. J. Paster, N. L. Ward, W. Ludwig & W. B. Whitman. Springer.
- Nakagawa Y (2012).** VALIDATION LIST N° 143. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 1-4. [Class IV. *Cytophagia* Class. Nov. In: N.R. Krieg, J.T. Staley, D.R. Brown, B.P. Hedlund, B.J. Paster, N.L. Ward, W. Ludwig and W.B. Whitman (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition, vol. 4 (The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes (Mollicutes)*, *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*), Springer, New York, 2010, p. 370.]

Nedashkovskaya OI, Makoto S, Vancanneyt M, Cleenwerck I, Lysenko AM, Mikhailov VV & Swings J (2004). *Zobellia amurskyensis* sp. nov., *Zobellia laminariae* sp. nov. and *Zobellia russellii* sp. nov., novel marine bacteria of the family *Flavobacteriaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1643-1648.

Nedashkovskaya OI, Suzuki M, Lee JS, Kim SB & Mikhailov VV (2008). *Kriegella aquimaris* gen. nov., sp. nov., isolated from marine environments. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 2624-2628.

Nedashkovskaya OI, Suzuki M, Lee JS, Lee K, Shevchenko LS & Mikhailov VV (2009). *Pseudozobellia thermophila* gen. nov., sp. nov., a bacterium of the family *Flavobacteriaceae*, isolated from the green alga *Ulva fenestrata*. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 806-810.

O

Oh YS, Lim HJ, Cha IT, Im WT, Yoo JS, Kang UG, Rhee SK & Roh DH (2009). *Roseovarius halotolerans* sp. nov., isolated from deep seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 2718-2723.

Oren A, Ventosa A & Grant WD (1997). Proposed Minimal Standards for Description of New Taxa in the Order *Halobacteriales*. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 233-238.

Oren A (2006). The Genera *Rhodothermus*, *Thermonema*, *Hymenobacter* and *Salinibacter*. In: *The Prokaryotes*, 3rd ed., vol 7, pp. 712-738. Edited by Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH and Stackebrandt E. New York: Springer.

Ortigosa M, Garay E & Pujalte MJ (1994). Numerical taxonomy of aerobic, gram-negative bacteria associated with oysters and surrounding seawater of the Mediterranean coast. *Syst Appl Microbiol* **17**, 589-600.

Ortigosa M (1995). Bacterias heterotrofas aerobias y facultativas asociadas a agua y ostras del mar Mediterráneo: Abundancia, ciclo anual y taxonomía numérica. Tesis Doctoral. Universitat de València.

P

Park YD, Baik KS, Seong CN, Bae KS, Kim S & Chun J (2006). *Photobacterium ganghwense* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from sea water. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 745-749.

Pascual J, Macián MC, Arahal DR, Garay E & Pujalte MJ (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. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 154-165.

Pedrós-Alió C (2006). Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends in Microbiology* **14**, 257-262.

Poli A, Romano I, Cordella P, Orlando P, Nicolaus B & Ceschi-Berrini C (2009). *Anoxybacillus thermarum* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from thermal mud in Euganean hot springs, Abano Terme, Italy. *Extremophiles* **13**, 867-874.

Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs B, Ludwig W, Peplies J & Glöckner FO (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nuc Acids Res* **35** (21), 7188-7196.

R

Rameshkumar N & Nair S (2007). *Vibrio rhizosphaerae* sp. nov., a red-pigmented bacterium that antagonizes phytopathogenic bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2241-2246.

Rameshkumar N, Sproer C, Lang E & Nair S (2010). *Vibrio mangrovi* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from mangrove-associated wild rice (*Poteresia coarctata* Tateoka). *FEMS Microbiol Lett* **307**, 35-40.

Rappe MS & Giovannoni SJ (2003). The uncultured microbial majority. *Ann Rev Microbiol* **57**, 369-394.

Reichenbach H (1992). VALIDATION LIST N° 41. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 327-328. [Order 1. *Cytophagales* Leadbetter 1974, 99^{AL}. In: Staley JT, Bryant MP, Pfennig N and Holt JG (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st ed., vol. 3, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1989, pp. 2011-2013.]

Reichenbach H (2005). Order VIII. *Myxococcales* Tchan, Pochon and Prévot 1948, 398^{AL}. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT and Garrity GM (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 2 (The *Proteobacteria*), part C (The *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*-, and *Epsilonproteobacteria*), Springer, New York, p. 1059.

Reichenbach H (2006). The Order *Cytophagales*. In: *The Prokaryotes*, 3rd ed., vol 7, pp. 549-590. Edited by Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH and Stackebrandt E. New York: Springer.

Richter M & Rosselló-Móra R (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci* **106**, 19126-19131.

Rivas R, García-Fraile P, Mateos PF, Martínez-Molina E & Velázquez E (2006). *Photobacterium halotolerans* sp. nov., isolated from Lake Martel in Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1067-1071.

- Rosselló-Mora R & Amann R (2001).** The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 39-67.
- Rosselló-Móra R (2005).** Updating prokaryotic taxonomy. *Journal of Bacteriology* **187**, 6255-6257.
- Rosselló-Móra R (2006).** DNA-DNA reassociation methods applied to microbial taxonomy and their critical evaluation. In: *Molecular Identification, Systematics and Population Structure of Prokaryotes*, pp. 23-50. Edited by Stackebrandt E. Heidelberg: Springer.
- S**
- Sasser M (1990).** Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids, MIDI Technical Note 101. Newark: DE: MIDI Inc.
- Sanger F Brownlee GG & Barrell BG (1965).** A two dimensional fractionation procedure for radioactive nucleotides. *J Molec Biol* **13**, 373-398.
- Schildkraut CL, Marmur J & Doty P (1961).** The formation of hibrid DNA molecules and their use in studies of DNA homologies. *J Molec Biol* **3**, 595-617.
- Schink B (2006).** The genus *Pelobacter*. In: *The Prokaryotes*, 3rd ed., vol 7, pp. 5-11. Edited by Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH and Stackebrandt E. New York: Springer.
- Sheu SY, Jiang SR, Chen CA, Wang JT & Chen WM (2011).** *Vibrio stylophorae* sp. nov., isolated from the reef-building coral *Stylophora pistillata*. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 2180-2185.
- Shiba T (1991).** *Roseobacter litoralis* gen. nov., sp. nov., and *Roseobacter denitrificans* sp. nov., aerobic pink-pigmented bacteria which contain bacteriochlorophyll a. *Syst Appl Microbiol* **14**, 140-145.
- Shieh WY, Chen AL & Chiu HH (2000).** *Vibrio aerogenes* sp. nov., a facultatively anaerobic marine bacterium that ferments glucose with gas production. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 321-329.
- Shieh WY, Chen YW, Chaw SM & Chiu HH (2003).** *Vibrio ruber* sp. nov., a red, facultatively anaerobic, marine bacterium isolated from sea water. *Int. J Syst Evol Microbiol* **53**, 479-484.
- Shimkets LJ, Dworkin M & Reichenbach H (2006).** The Myxobacteria. In: *The Prokaryotes*, 3rd ed., vol 7, pp. 31-115. Edited by Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH and Stackebrandt E. New York: Springer.
- Skerman VBD, McGowan V & Sneath PHA (1980).** Approved Lists of Bacterial Names. *Int J Syst Bacteriol* **30**, 225-420.

- Smibert RM & Krieg NR (2007)**. Phenotypic characterization. In: *Manual of Methods for General Bacteriology*, pp. 607-654. Edited by Reddy CA, Beveridge TJ, Breznak JA, Marzluf G, Schmidt TM & Snyder LR. Washington DC: American Society for Microbiology.
- Sneath PHA & Brenner DJ (1992)**. "Official" nomenclature lists. *ASM News* **58**, 175.
- Sogin SJ, Sogin ML & Woese CR (1971)**. Phylogenetic measurement in procaryotes by primary structural characterization. *J Molec Evol* **1**, 173-184.
- Spring S, Lünsdorf H, Fuchs BH & Tindall BJ (2009)**. The photosynthetic apparatus and its regulation in the aerobic Gammaproteobacterium *Congregibacter litoralis* gen. nov., sp. nov. *PLOS One* **4**, e-4866.
- Stackebrandt E, Murray RGE & Trüper HG (1988)**. *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives". *Int J Syst Bacteriol* **38**, 321-325.
- Stackebrandt E & Goebel BM (1994)**. 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* **44**, 846-849.
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PA, Kämpfer P, Maiden MC, Nesme X, Rosselló-Mora R, Swings J, Trüper HG, Vauterin L, Ward AC & Whitman WB (2002)**. Report of the *ad hoc* committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* **52**, 1043-1047.
- Stackebrandt E & Ebers J (2006)**. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today* **33**, 152-155.
- Staley JT & Konopka A (1985)**. Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Ann Rev Microbiol* **39**, 321-346.
- Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A & Schlegel HG (1981)**. The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria. Springer-Verlag, New York, p. 2240.

T

- Takaichi S, Furihata K, Ishidu J & Shimada K (1991)**. Carotenoid sulphates from the aerobic photosynthetic bacterium, *Erythrobacter longus*. *Phytochemistry* **30**, 3411-3415.
- Tamaoka J & Komagata K (1984)**. Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett* **25**, 125-128.

- Tindall BJ, Sikorski J, Smibert RM & Krieg NR (2007).** Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. In: *Methods for General and Molecular Microbiology*, pp. 330–393. Edited by Reddy CA, Beveridge TJ, Breznak JA, Marzluf G, Schmidt TM & Snyder LR. Washington DC: American Society for Microbiology.
- Tindall BJ, Rosselló-Móra R, Busse JH, Ludwig W & Kämpfer P (2010).** Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 249-266.
- Thompson FL, Hoste B, Thompson CC, Huys G & Swings J (2001).** The coral bleaching *Vibrio shiloi* Kushmaro *et al.* 2001 is a later synonym of *Vibrio mediterranei* Pujalte and Garay 1986. *Syst Appl Microbiol* **24**, 516-519.
- Thompson FL, Hoste B, Thompson CC, Goris J, Gomez-Gil B, Huys L, De Vos P & Swings J (2002).** *Enterovibrio norvegicus* gen. nov., sp. nov., isolated from the gut of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae: a new member of the family *Vibrionaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 2015-2022.
- Thompson FL, Hoste B, Vandemeulebroecke K & Swings J (2003).** Reclassification of *Vibrio hollisae* as *Grimontia hollisae* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1615-1617.
- Thornley MJ (1994).** The differentiation of pseudomonas from other gram-negative bacteria on the basis of arginina metabolism. *J Appl Bacteriol* **23**, 37-52.
- Trüper HG & Schleifer KH (2006).** Prokaryote characterization and identification. In: *The Prokaryotes*, 3rd ed., pp. 58-79. Edited by M Dworkin, S Falkow, E Rosenberg, KH Schleifer and E Stackebrandt. New York: Springer.
- U**
- Uphoff HU, Felske A, Fehr W & Wagner-Dobler I (2001).** The microbial diversity in picoplankton enrichment cultures: a molecular screening of marine isolates. *FEMS Microbiol Ecol* **35**, 249-258.
- Urbanczyk H, Ast JC, Higgins MJ, Carson J & Dunlap PV (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. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2823-2829.
- Urdiain M, López-López A, Gonzalo C, Busse HJ, Langer S, Kämpfer P & Rosselló-Móra R (2009).** VALIDATION LIST N° 127. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 923-925. [Reclassification of *Rhodobium marinum* and *Rhodobium pfennigii* as *Afifella marina* gen. nov. comb. nov. and *Afifella*

pfennigii comb. nov., a new genus of photoheterotrophic *Alphaproteobacteria* and emended descriptions of *Rhodobium*, *Rhodobium orientis* and *Rhodobium gokarnense*. *Syst Appl Microbiol* 2008, **31**, 339-351].

Urios L, Intertaglia L, Lesongeur F & Lebaron P (2008). *Haliea salexigens* gen. nov., sp. nov., a member of the *Gammaproteobacteria* from the Mediterranean Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1233-1237.

Urios L, Intertaglia L, Lesongeur F & Lebaron P (2009). *Haliea rubra* sp. nov., a member of the *Gammaproteobacteria* from the Mediterranean Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 1188-1192.

V

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.

Vandecandelaere I, Segaert E, Mollica A, Faimali M & Vandamme P (2008). *Leisingera aquimarina* sp. nov., isolated from a marine electroactive biofilm, and emended descriptions of *Leisingera methylohalidivorans* Schaefer *et al.* 2002, *Phaeobacter daeponensis* Yoon *et al.* 2007 and *Phaeobacter inhibens* Martens *et al.* 2006. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 2788-2793.

Ventosa A (2005). Genus III. *Salinivibrio* Mellado, Moore, Nieto and Ventosa 1996, 820^{VP}. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed, vol 2, part B, pp. 552–555. Edited by Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT and Garrity GM. New York: Springer.

W

Wagner-Döbler I, Rheims H, Felske A, Pukall R & Tindall BJ (2003). *Jannaschia helgolandensis* gen. nov., sp. nov., a novel abundant member of the marine *Roseobacter* clade from the North Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 731–738.

Wang B, Tan T & Shao Z (2009). *Roseovarius pacificus* sp. nov., isolated from deep-sea sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 1116-1121.

Wang B, Sun F, Lai Q, Du Y, Liu X, Li G, Luo J & Shao Z (2010). *Roseovarius nanhaiticus* sp. nov., a member of the *Roseobacter* clade isolated from marine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 1289-1295.

Wang H, Liu J, Wang Y, Zhang XH (2011). *Vibrio marisflavi* sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 568-573.

Ward DM (1998). A natural species concept for prokaryotes. *Curr Opin Microbiol* **1**, 271-277.

- Ward NL (2010).** Phylum XXV. Planctomycetes Garrity and Holt 2001, 137 emend. Ward. In: Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W and Whitman WB (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 4 (The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes (Mollicutes)*, *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*), Springer, New York, p. 878.]
- Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC, Murray RGE, Stackebrandt E, Starr MP & Trüper HG (1987).** Report of the *ad hoc* Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Int J Syst Evol Microbiol* **37**, 463-464.
- Wheeler ML, Kandler O & Woese CR (1992).** On the nature of global classification. *Proc Natl Acad Sci* **89**, 2930-2934.
- Wiese J, Thiel V, Gärtner A, Schmaljohann R & Imhoff JF (2009).** *Kiloniella laminariae* gen. nov., sp. nov., an alphaproteobacterium from the marine macroalga *Laminaria saccharina*. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 350-356.
- Wimpee CF, Nadeau TL & Nealson KH (1991).** Development of species-specific hybridization probes for marine luminous bacteria by using *in vitro* DNA amplification. *Appl Environ Microbiol* **57**, 1319-1324.
- Woese CR, Sogin ML & Sutton LA (1974).** Procaryote phylogeny. I: Concerning the relatedness of *Aerobacter aerogenes* to *Escherichia coli*. *J Molec Evol* **3**, 293-299.
- Woese CR & Fox GE (1977).** The phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci* **74**, 5088-5090.
- Woese CR (1987).** Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**, 221-271.
- Woese CR (1992).** Prokaryote systematics: the evolution of a science. In: *The Prokaryotes* 2nd ed. Vol 1, pp. 3-18. Edited by Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W and Schleifer KH. Berlin: Springer-Verlag.

X

- Xu XW, Huo YY, Wang CS, Oren A, Cui HL, Vedler E & Wu M (2011).** *Pelagibacterium halotolerans* gen. nov., sp. nov. and *Pelagibacterium luteolum* sp. nov., novel members of the family *Hyphomicrobiaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 1817-1822.

Y

- Yan S, Fuchs BM, Lenk S, Harder J, Wulf J, Jiao NZ & Amann R (2009).** Biogeography and phylogeny of the NOR5/OM60 clade of *Gammaproteobacteria*. *Syst Appl Microbiol* **32**, 124-139.
- Yarza P, Ludwig W, Euzéby J, Amann R, Schleifer KH, Glöckner FO & Rosselló-Móra R (2010).** Update of the All-Species Living Tree Project based on 16S and 23S rRNA sequence analyses. *Syst Appl Microbiol* **33**, 291-299.
- Yoshizawa S, Wada M, Kita-Tsukamoto K, Yokota A & Kogure K (2009).** *Photobacterium aquimaris* sp. nov., a luminous marine bacterium isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 1438-1442.
- Yoon JH, Lee CH, Yeo SH & Oh TK (2005).** *Sphingopyxis baekryungensis* sp. nov., an orange-pigmented bacterium isolated from sea water of the Yellow Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1223-1227.
- Yoon JH, Lee SY, Kang SJ, Lee CH, & Oh TK (2007a).** *Pseudoruegeria aquimaris* gen. nov., sp. nov., isolated from seawater of the East Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 542-547.
- Yoon JH, Kang SJ, Park S & Oh TK (2007b).** *Jannaschia donghaensis* sp. nov., isolated from seawater of the East Sea, Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2132-2136.
- Yoon JH, Kang SJ & Oh TK (2008).** *Roseovarius aestuarii* sp. nov., isolated from a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1198-1202.
- Yuan J, Lai Q, Zheng T & Shao Z (2009).** *Novosphingobium indicum* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from a deep-sea environment. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 2084-2088.

Z

- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L & Miller W (2000).** A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* **7**(1-2), 203-214.
- Zhao C, Gao Z, Qin Q, Ruan L (2011).** *Mangroviflexus xiamenensis* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Marinilabiaceae* isolated from mangrove sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* doi:10.1099/ijs.0.036137-0.
- Zhilina TN, Appel R, Probian C, Llobet Brossa E, Harder J, Widdel F, Zavarzin GA (2004).** *Alkaliflexus imshenetskii* gen. nov. sp. nov., a new alkaliphilic gliding carbohydrate-fermenting bacterium with propionate formation from a soda lake. *Arch Microbiol* **182**, 244-253.
- Zeigler DR (2003).** Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1893-1900.

Zengler K, Toledo G, Rappe M, Elkins J, Mathur EJ, Short JM & Keller, M (2002). Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci* **99**, 15681-15686.

A. MEDIOS DE CULTIVO▪ **Caldo marino (MB)**

Marine broth (Difco 2216)	37,4 g
Agua destilada	1 L

Esterilizar a 121 °C, 20 min.

▪ **Agar marino (MA)**

Caldo marino	1 L
Agar bacteriológico	15 g

Esterilizar a 121 °C, 20 min.

▪ **R2A marino**

R2A	18,2 g
Agua de mar filtrada envejecida	1 L
Agar bacteriológico	15 g

Esterilizar a 121 °C, 20 min.

▪ **Agua de mar artificial (ASW)**

NaCl	23,4 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	24,7 g
KC	1,5 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,2 g
Agua destilada	1 L

Esterilizar a 121 °C, 20 min.

▪ **Medio Basal (BM)** (Baumann y Baumann, 1981)

NH ₄ Cl	1 g
K ₂ HPO ₄	75 mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	28 mg
Tris-HCl pH 7,5 (400 mM)	250 ml
ASW	500 ml
Agua ultrapura (Milli-Q)	hasta 1 L

Esterilizar a 121 °C, 20 min.

▪ **Medio Tiosulfato/Citrato/Sales-Biliares/Sacarosa (TCBS)**

Medio TCBS (Oxoid)	88 g
Agua destilada	1 L

Hervir hasta disolver el medio. No autoclavar.

▪ **Suplemento de Cationes Marinos (MCS)** (Farmer III & Hickman-Brenner, 2006)

NaCl	150 g
KCl	3,7 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	51 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	7,4 g
Agua ultrapura (Milli-Q)	1 L

Disolver por separado. Esterilizar a 121 °C, 20 min.

▪ **Medio para la halotolerancia (STA)**

Triptona	10 g
Extracto de levadura	3 g
NaCl	0,2 g
Agua destilada	1 L

Ajustar el pH a 7,2. Esterilizar a 121 °C, 20 min.

▪ **Luminous medium (LM)** (Baumann y Baumann, 1981)

Extracto de levadura	5 g
Triptona	5 g
CaCO ₃	1 g
Glicerol	3 g
Medio Basal	1 L
Agar	20 g

Esterilizar a 121 °C, 20 min.

▪ **Caldo para la reducción de nitratos**

Nitrato Potásico	2 g
Triptona	10 g
MCS	100 ml
Agua destilada	900 ml

Ajustar el pH a 7,2. Incorporar campana Durham si es necesario. Esterilizar a 121 °C, 20 min.

▪ **Caldo glucosado**

Peptona	10 g
Extracto de carne	30 g
NaCl	10 g
Glucosa	10 g
Agua destilada	1000 ml

Ajustar el pH a 7,2 y repartir 6 ml por tubo. Esterilizar a 121 °C, 20 min.

▪ **O/F medio basal (Difco) (Modificado)**

OF medium	9,4 g
MCS	100 ml
Agua destilada	900 ml

Ajustar el pH a 6,8. Esterilizar a 115 °C, 15 min.

▪ **Medio de Thornley para la descarboxilación de L-arginina**

Peptona	1 g
L-arginina	10 g
Rojo de fenol	10 mg
Agar	3 g
Medio Basal sin Tris-HCl	1 L

Ajustar el pH a 7,0. Esterilizar a 115°C, 15 min.

▪ **Medio de Moeller para la descarboxilación de aminoácidos**

<i>Decarboxylase medium base</i> (Difco)	9 g
Aminoácido (Arg, Lys u Orn)	5 g
MCS	100 ml
Agua destilada	900 ml

Esterilizar a 121 °C, 20 min.

▪ **Medio Gelatina-MB**

Gelatina (Oxoid)	12 g
MB	100 ml

Ajustar el pH a 7,2 y repartir 5 ml por tubo.

Esterilizar a 121 °C, 20 min.

▪ **Medio semisólido para Voges-Proskauer** (Furniss y col., 1978)

Extracto de levadura	1 g
Triptona	7 g
Soyotona	5 g
D-Glucosa	10 g
NaCl	10 g
Agar	3 g
Agua destilada	1 L

Esterilizar a 115 °C, 15 min.

▪ **Agar caseína**

MB	900 ml
Leche descremada	100 ml
Agar	15 g

Esterilizar por separado MA y leche descremada (121 °C, 20 min). Dejar enfriar (50 °C aprox.) y mezclar antes de verter en placas.

▪ **Agar DNAsa (Modificado)**

Medio agar DNAsa (Oxoid)	39 g
MCS	100 ml
Agua destilada	900 ml

Esterilizar a 121 °C, 20 min.

▪ **Agar alginato**

MB	1 L
Alginato sódico	20 g
Agar	15 g

Se mezclan el MB, el agar y el alginato, se les añade el agua de forma cuidadosa evitando que se formen grumos. No precisa ajustar el pH. Esterilizar a 121 °C, 20 min.

▪ **Agar almidón**

MB	1 L
Almidón	2 g
Agar	15 g

Esterilizar a 121 °C, 20 min.

▪ **Agar Tween 80**

Peptona	10 g
CaCl ₂	0,1 g
Tween 80	10 ml
MCS	100 ml
Agar bacteriológico	15 g
Agua destilada	900 ml

Esterilizar a 121 °C, 20 min.

▪ **Agar lecitina**

MB	1 L
Emulsión de yema de huevo	50 ml
Agar	15 g

Preparar la emulsión de yema de huevo batiéndola con agua destilada estéril 1:1 (v/v). Esterilizar por separado MA (121 °C, 20 min). Dejar enfriar (50 °C aprox.) y mezclar con la emulsión antes de verter en placas.

B. Reactivos y colorantes para pruebas fenotípicas**▪ Colorante de Ryu**

Preparar mezclando las soluciones I y II en una proporción 10:1

Solución I (mordiente)

Fenol (5% en H ₂ O)	10 ml
Ácido tánico	2 g
AlK(SO ₄) ₂ (sol. saturada)	20 ml

Solución II (Colorante)

Cristal violeta	12 g
Etanol	100 ml

▪ Colorante Nile Blue A (PHB)

Nile Blue	1 g
Agua destilada	100 ml

▪ Reactivo para la prueba de la oxidasa

Clorhidrato de tetrametil-p-fenilen-diamina	1 g
Agua destilada	100 ml

Preparar en el momento de utilizar, no almacenar

▪ Reactivos para la lectura de la reducción de los nitratos

Solución A

Sulfanilamida	5 g
Ácido clorhídrico 1,5 N	50 ml
Agua destilada	300 ml

Disolver la sulfanilamida en la disolución resultado de la mezcla del ácido clorhídrico y el agua destilada. Completar con agua destilada hasta 500 ml.

Solución B

N-1-Naftil-etilendiamina, dihidrocloruro	0,1 g
Agua destilada	100 ml

Guardar en frasco topacio, la solución no es estable más de un mes.

▪ **Reactivos para la lectura de la prueba VP**

Solución A

α -Naftol	5 g
Alcohol etílico	100 ml

Solución B

KOH	40 g
Creatina	0,3 g
Agua destilada	100 ml

▪ **Sustratos utilizados como fuente única de carbono y energía**

Sustratos utilizados en las pruebas nutricionales utilizando medio basal (BM), incluyendo carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos y aminas.

D-Ribosa	D-Glucuronato	Lactato
L-Arabinosa	D-Galacturonato	3-Hidroxiacetato
D-Xilosa	Glicerol	Glicina
D-Glucosa	D-Manitol	L-Leucina
D-Fructosa	D-Sorbitol	L-Serina
D-Galactosa	m-Inositol	L-Threonina
D-Trehalosa	D-Glicerato	L-Glutamato
D-Manosa	D-Sacarato	L-Alanina
L-Rhamnosa	Acetato sódico	L-Arginina
Maltosa	Piruvato sódico	L-Tirosina
D-Celobiosa	Propionato	L-Ornitina
Sacarosa	Butirato	L-Citrulina
Lactosa	Citrato	GABA [†]
D-Melibiosa	t-Aconitato	L-Aspartato
Amigdalina	2-Cetoglutarato	L-Lisina
Salicina	Succinato	L-Histidina
NAG*	Fumarato	L-Sarcosina
D-Gluconato	Malato	Putrescina

*N-acetilglucosamina

[†]Ácido γ -aminobutírico

C. Sustratos de los sistemas miniaturizados utilizados

▪ Biolog GN2

Sustratos utilizados en las pruebas nutricionales para la caracterización de microorganismos Gram negativos mediante sistema Biolog.

α -Cyclodextrin	Xilitol	L-Alanina
Dextrina	Metil piruvato	L-Alanil-glicina
Glucógeno	Mono-metil-succinato	L-Asparagina
Tween 40	Acetato	L-Aspartato
Tween 80	cis-Aconitato	L-Glutamato
N-acetil-D-galactosamina	Citrato	Glicil-L-aspartato
N-acetil-D-glucosamina	Formianato	Glicil-L-glutamato
Adonitol	Lactona-D-galactonato	L-Histidina
L-Arabinosa	D-Galacturonato	Hidroxi-L-prolina
D-Arabitol	D-Gluconato	L-Leucina
Celobiosa	D-Glucosamato	L-Ornitina
i-Eritritol	D-Glucuronato	L-Fenilalanina
D-Fructosa	α -Hidroxi butirato	L-Prolina
L-Fucosa	β -Hidroxi butirato	L-Piroglutamato
D-Galactosa	γ -Hidroxi butirato	D-Serina
Gentibiosa	p-Hidroxi fenilacetato	L-Serina
α -D-Glucosa	Itaconato	L-Treonina
m-Inositol	α -Ketobutirato	DL-Carnitina
α -D-Lactosa	α -Ketoglutarato	γ -Aminobutirato
Lactulosa	α -Ketovalerato	Urocanato
Maltosa	DL-Lactato	Inosina
D-Manitol	Malonato	Uridina
D-Manosa	Propionato	Timidina
D-Melibiosa	Quinato	Feniletilamina
β -metil D-glucosamina	D-sacarato	Putrescina
D-Psicosa	Sebazato	2-amino etanol
D-Rafinosa	Succinato	2,3-butanodiol
L-Rhamnosa	Bromosuccinato	Glicerol
D-Sorbitol	Succinamato	DL- α -glicerolfosfato
Sacarosa	Glucuronamida	Glucosa-1-fosfato
D-Trehalosa	Alaninamida	Glucosa-6-fosfato
Turanosa	D-Alanina	

▪ API 50CH

Glicerol	D-Manitol	D-Rafinosa
Eritritol	D-Sorbitol	Almidón
D-Arabinosa	Metil- α D-Manopiranosida	Gicógeno
L-Arabinosa	Metil- α D-Glucopiranosida	Xilitol
D-Ribosa	N-Acetilglucosamina	Gentiobiosa
D-Xilosa	Amigdalina	D-Turanosa
L-Xilosa	Arbutina	D-Lixosa
D-Adonitol	Esculina	D-Tagatosa
Metil- β D-xilopiranosida	Salicina	D-Fucosa
D-Galactosa	D-Celobiosa	L-Fucosa
D-Glucosa	D-Maltosa	D-Arabitol
D-Fructosa	D-Lactosa	L-Arabitol
D-Manosa	D-Melibiosa	Gluconato potásico
L-Sorbosa	D-Sacarosa	2-Cetogluconato potásico
L-Ramnosa	D-Trehalosa	
Dulcitol	Inulina	5-Cetogluconato potásico
Inositol	D-Melezitosa	

▪ API 20E

ONPG	Ortonitrofenilgalactosido	VP	Piruvato sódico
ADH	Arginina	GEL	Gelatinasa
LDC	Lisina	GLU	Glucosa
ODC	Ornitina	MAN	Manitol
CIT	Citrato sódico	INO	Inositol
H ₂ S	Tiosulfate sódico	SOR	Sorbitol
URE	Urea	RHA	Ramnosa
TDA	Triptófano (triptófano desaminasa)	SAC	Sacarosa
		MEL	Melibiosa
IND	Triptófano (producción de indol)	AMY	Amigdalina
		ARA	Arabinosa

▪ **API 20NE**

NO3	Nitrato potásico	MNE	D-Manosa
TRP	L-Triptófano	MAN	D-Manitol
GLU	D-Glucosa	NAG	N-Acetil-Glucosamina
ADH	L-Arginina	MAL	D-Maltosa
URE	Urea	GNT	Gluconato potásico
ESC	Esculina citrato férrico	CAP	Ácido cáprico
GEL	Gelatina	ADI	Ácido adipico
PNPG	4-Nitratofenil-βD-galactopiranosidasa	MLT	Ácido málico
GLU	D-Glucosa	CIT	Citrato trisódico
ARA	L-Arabinosa	PAC	Ácido fenilacético

▪ **API ZYM**

Fosfatasa alcalina	α-galactosidasa	D-turanosa
Esterasa (C4)	β-galactosidasa	D-lixosa
Esterasa lipasa (C8)	β-glucuronidasa	D-tagatosa
Lipasa (C14)	α-glucosidasa	D-fucosa
Leucina arilamidasa	β-glucosidasa	L-fucosa
Valina arilamidasa	N-acetil-β-glucosaminidasa	D-arabitol
Cistina arilamidasa		L-arabitol
Tripsina	α-manosidasa	Gluconato potásico
α-quimotripsina	α-fucosidasa	2-Cetogluconato
Fosfatasa ácida	Gentiobiosa	5-Cetogluconato
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa		

Figuras y tablas suplementarias

▪ Estudio de la cepa 7SM30: *Euzebyella saccharophila* gen. nov., sp. nov.

Figura S1: Árbol filogenético de NJ basado en la secuencia del gen 16S rRNA de la cepa tipo de *Euzebyella saccharophila* sp. nov. y las especies relacionadas. Los números de acceso de secuencia se muestran entre paréntesis. Barra, 0,01 sustituciones nucleotídicas por sitio.

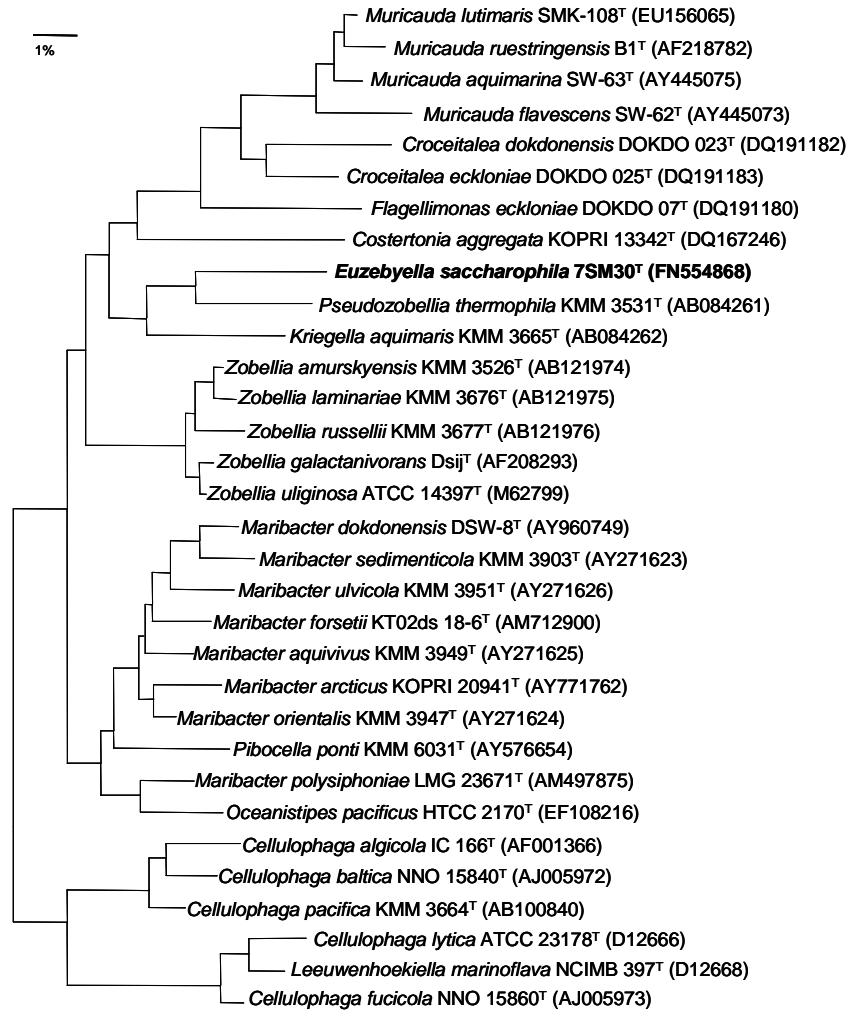


Figura S2: Árbol filogenético de ML basado en la secuencia del gen 16S rRNA de la cepa tipo de *Euzebyella saccharophila* sp. nov. y las especies relacionadas. Los números de acceso de secuencia se muestran entre paréntesis. Barra, 0,01 sustituciones nucleotídicas por sitio.

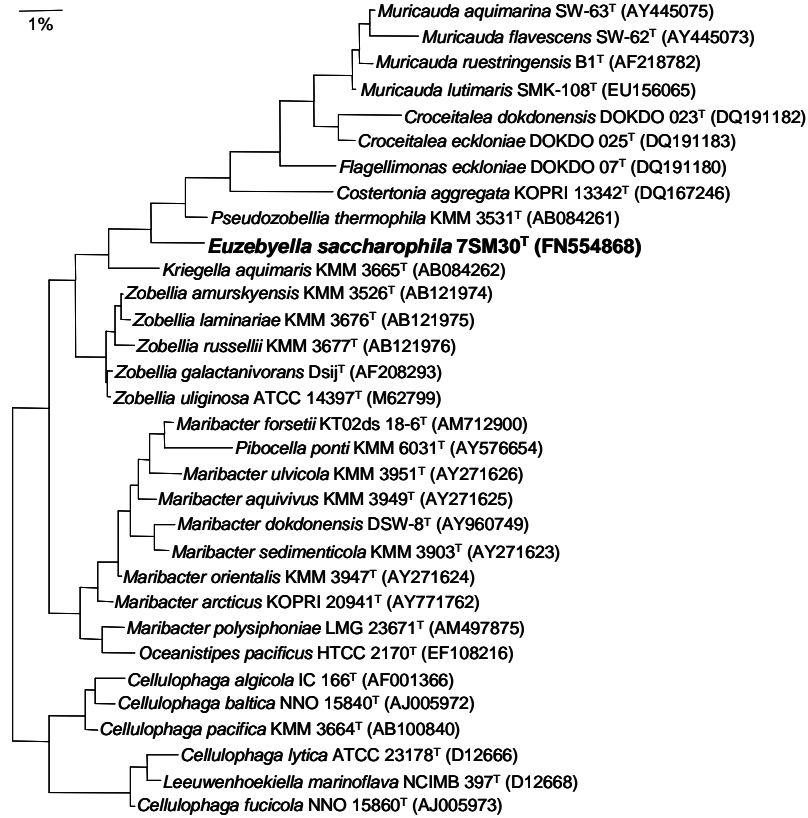


Tabla S1. Características fenotípicas de las cepas tipo incluidas en el estudio. **1**, *Euzebyella saccharophila* 7SM30^T; **2**, *Pseudozobellia thermophila* CECT 7618^T; **3**, *Kriegella aquimaris* CECT 7617^T; **4**, *Zobellia russellii* CECT 7505^T; **5**, *Z. uliginosa* CECT 4277^T.

Ninguna de las cepas es capaz de crecer utilizando los siguientes sustratos como fuente única de carbono y energía: D-ribosa, D-galacturonato, *m*-inositol, D-glicerato, D-sacarato, acetato, piruvato, propionato, butirato, citrato, t-aconitato, 2-oxoglutarato, succinato, fumarato, malato, lactato, 3-hidroxiobutirato, L-leucina, L-serina, L-tirosina, γ -aminobutirato, L-aspartato, L-lisina, L-sarcosina, putrescina. +, positivo; -, negativo; d, reacción débil; o, oxidativo; nd, no determinado; nc, sin crecimiento.

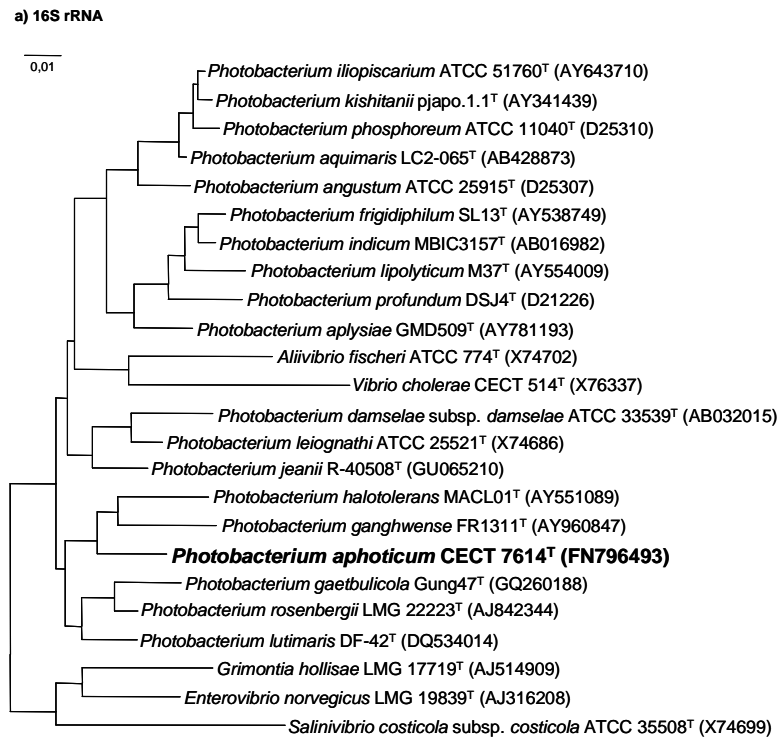
	1	2	3	4	5
Hidrólisis extracelular de:					
Caseína	d	-	-	d	+
Tween 80	-	+	+	+	-
DNasa	d	-	-	+	-
Agar	-	+	-	+	+
Almidón	-	-	-	d	-
Alginato	-	-	-	-	+
Reducción NO₃⁻	-	-	nd	nd	nd
Indol (en MB)	-	-	-	-	-
ADH, LDC y ODC	nc	nc	nc	nc	nc
Gelatina	nc	-	nc	-	nc
Oxidación/fermentación en medio O/F:					
D-glucosa	-	o	-	-	-
D-galactosa	-	o	-	-	-
Sacarosa	-	-	-	-	o
L-arabinosa	-	-	-	-	-
Amigdalina	-	o	-	-	-
D-melibiosa	-	-	-	-	-
Crecimiento (°C):					
4	-	-	-	+	-
15-37	+	+	-	+	+
40	-	+	-	-	+
Crecimiento en STA:					
0% NaCl	-	-	-	-	-
2% NaCl	-	-	-	-	-
2% NaCl+0,2% CaCl ₂ ·2H ₂ O	-	-	-	+	+
2% NaCl+0,9% MgCl ₂ ·6H ₂ O	+	+	-	+	+
2% NaCl+0,2%CaCl ₂ ·2H ₂ O+0,9%MgCl ₂ ·6H ₂ O	+	+	+	+	+

	1	2	3	4	5
Crecimiento en MA (% sales totales):					
0,34	+	+	-	+	+
0,85	+	+	-	+	+
1,70-6	+	+	+	+	+
7	+	+	-	+	+
8-9	+	-	-	+	-
10-11	+	-	-	-	-
Fuentes de carbono usadas para crecer:					
Control positivo	+	+	+	+	+
Control negativo	-	-	-	+	*
L-arabinosa	+	-	-	+	-
D-xilosa	+	-	-	+	-
D-glucosa	+	-	d	+	-
D-fructosa	+	-	+	+	-
D-galactosa	+	-	d	+	-
D-trehalosa	+	-	d	+	-
D-manosa	+	-	d	+	-
L-ramnosa	d	-	-	+	-
Maltosa	+	-	d	+	-
D-celobiosa	+	-	d	+	-
Sacarosa	+	-	d	+	-
Lactosa	+	-	d	+	-
D-melibiosa	+	-	d	+	-
Amigdalina	-	-	-	d	-
Salicina	+	-	-	+	-
N-acetilglucosamina	+	-	+	+	-
D-gluconato	+	-	d	+	-
D-glucuronato	-	-	-	+	-
Glicerol	-	-	-	+	-
D-manitol	-	-	+	+	-
D-sorbitol	-	-	-	d	-
Glicina	-	-	-	-	+
L-treonina	-	-	-	-	+
L-glutamato	-	-	-	d	d
L-alanina	-	-	-	d	-
L-arginina	-	-	-	-	d
L-ornitina	-	-	-	d	+
L-citrulina	-	-	-	d	-
L-histidina	-	-	-	-	+

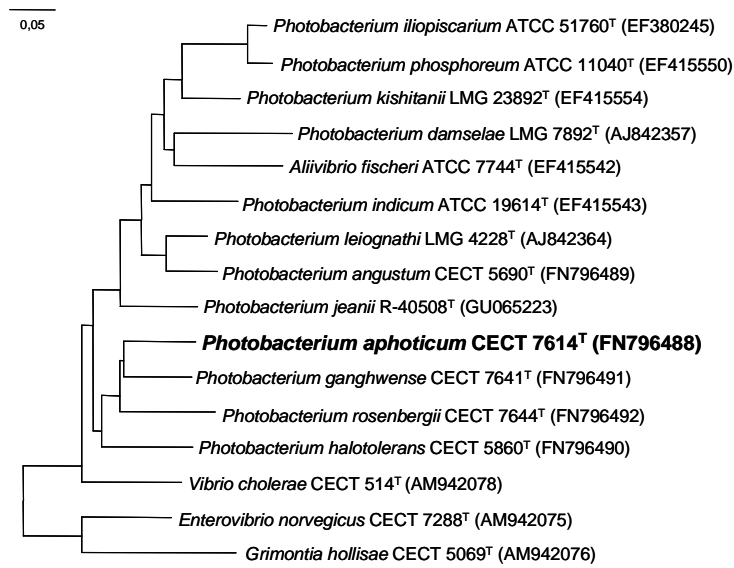
**Zobellia russellii* CECT 7505^T presentó crecimiento en el control negativo, por lo que los resultados para esta cepa solo se consideraron positivos cuando el crecimiento excedía el presentado en el control negativo.

▪ Estudio de la cepa M46: *Photobacterium aphoticum* sp. nov

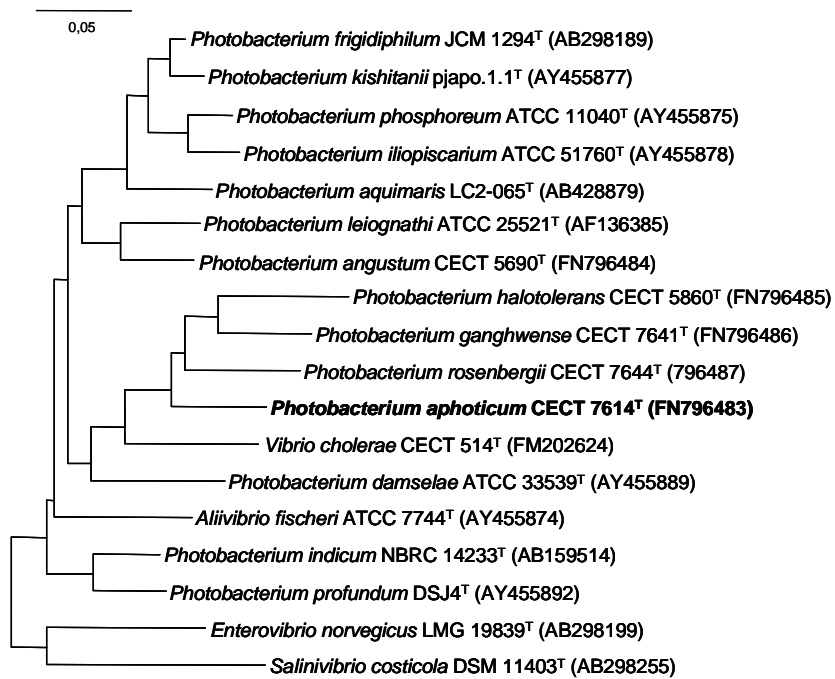
Figura S3: Árboles filogenéticos de MP basados en la secuencia del gen 16S rRNA (a), *recA* (b), *gyrB* (c) y las secuencias de los tres genes concatenados (d) de *Photobacterium aphoticum* sp. nov. CECT 7614^T y las especies relacionadas. Los números de acceso de secuencia se muestran entre paréntesis. Barra, número de cambios nucleotídicos por sitio.



b) *recA*



c) *gyrB*



d) Concatenado

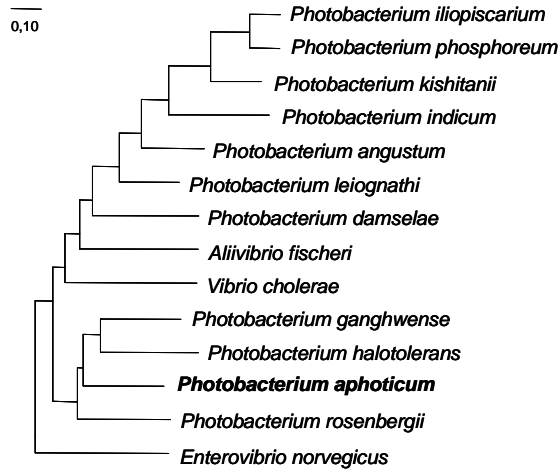
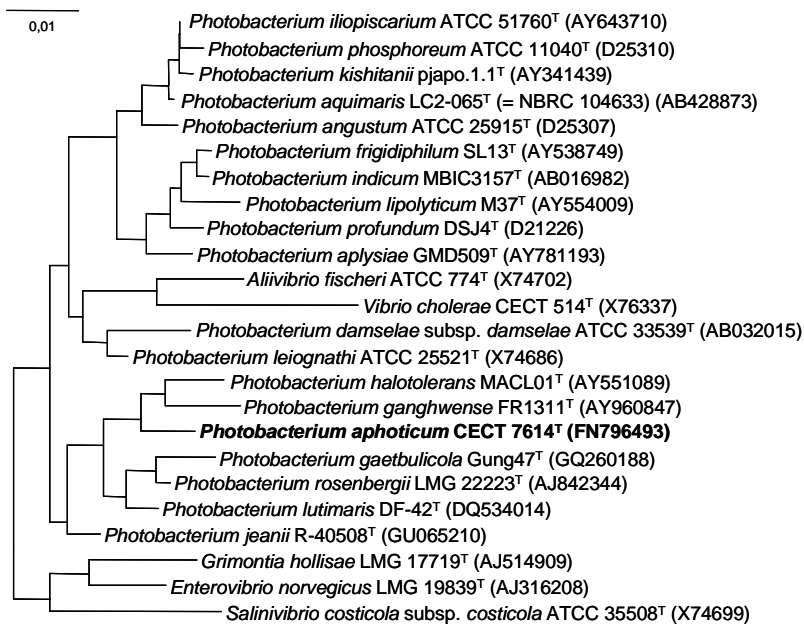
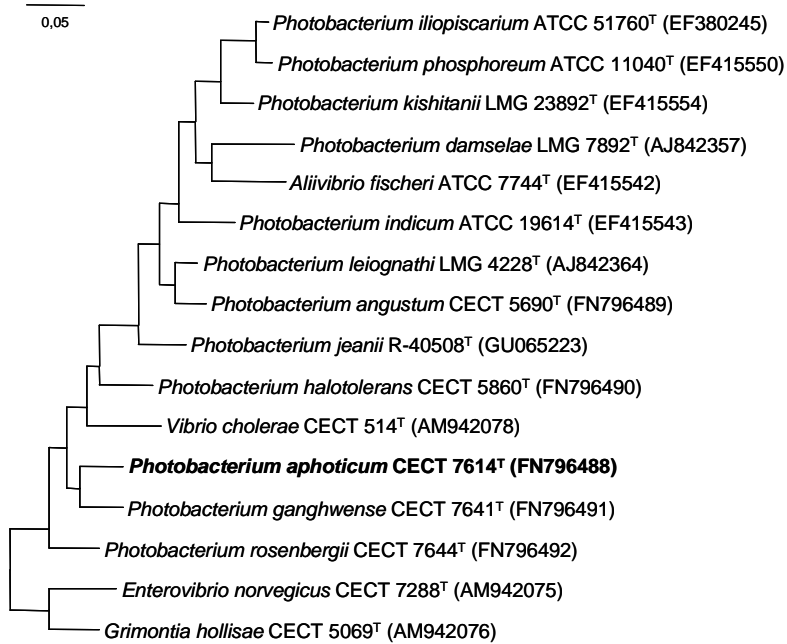
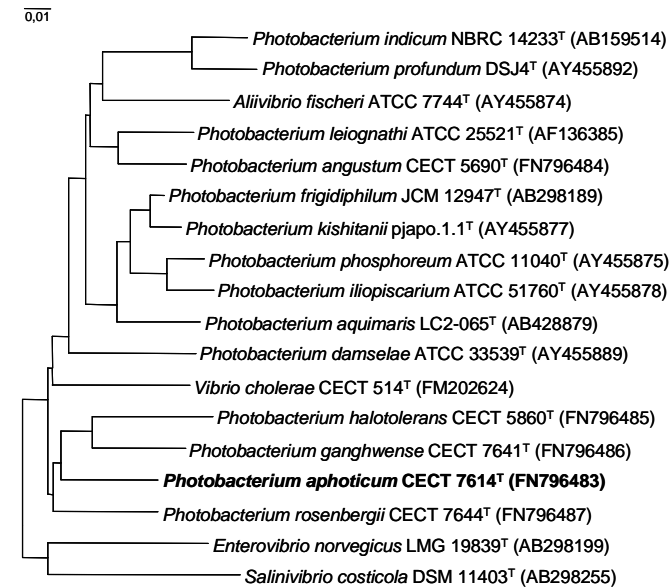


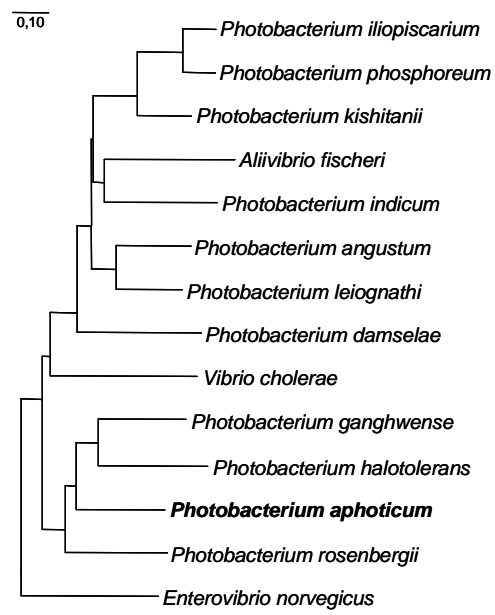
Figura S4: Árboles filogenéticos de ML basados en la secuencia del gen 16S rRNA (a), *recA* (b), *gyrB* (c) y las secuencias de los tres genes concatenados (d) de *Photobacterium aphoticum* sp. nov. CECT 7614^T y las especies relacionadas. Los números de acceso de secuencia se muestran entre paréntesis. Barra, número de cambios nucleotídicos por sitio.

a) 16S rRNA



b) *recA*c) *gyrB*

d) Concatenado



▪ Estudio de la cepa MD5: *Tropicibacter multivorans* sp. Nov.

Figura S5: Árbol filogenético de NJ basado en la secuencia del gen 16S rRNA de la cepa tipo de *Tropicibacter multivorans* sp. nov. y las especies relacionadas. Los números de acceso de secuencia se muestran entre paréntesis. Barra, 0,01 sustituciones nucleotídicas por sitio.

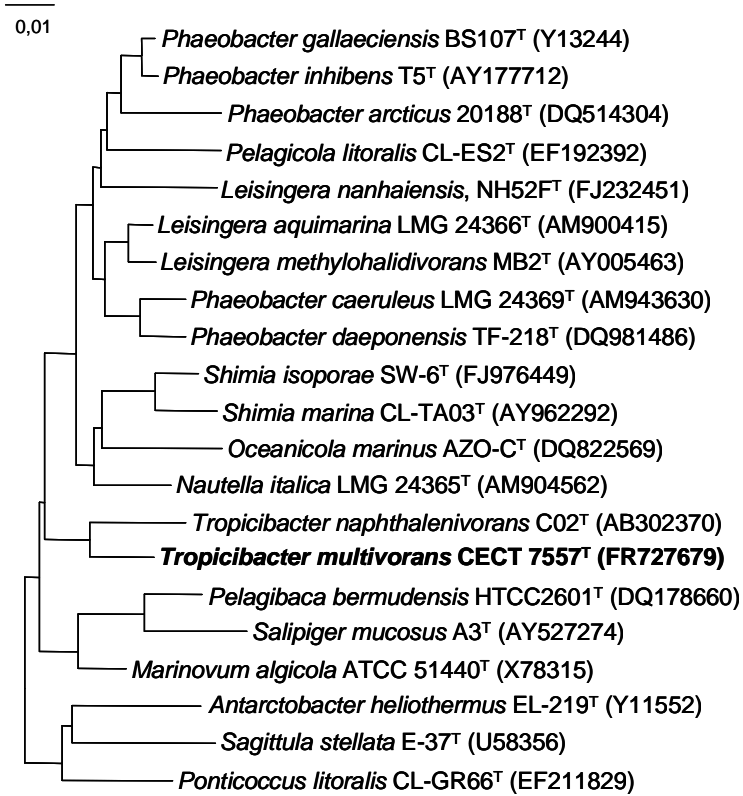
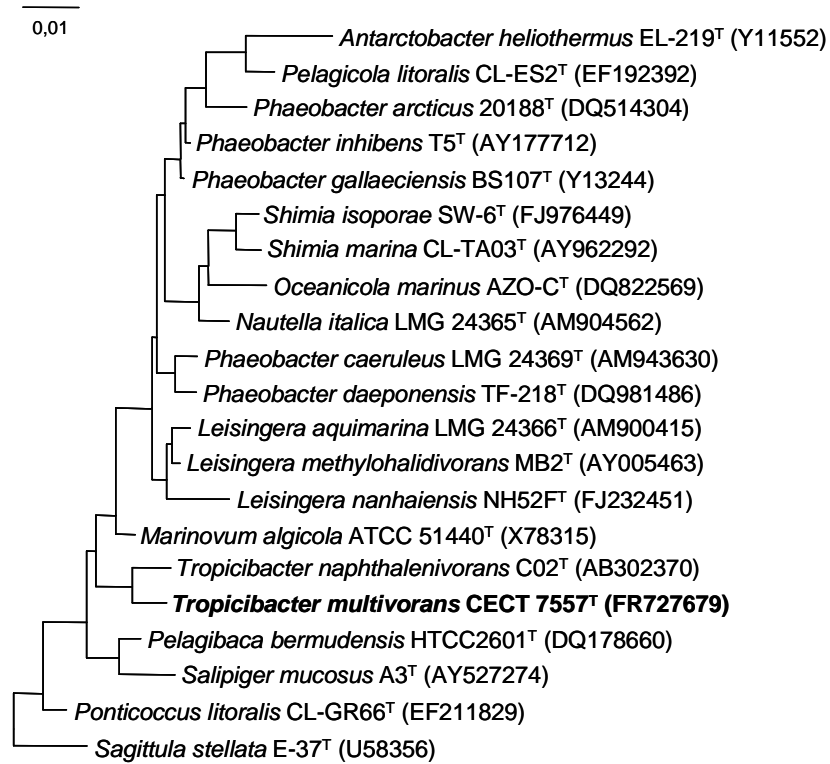
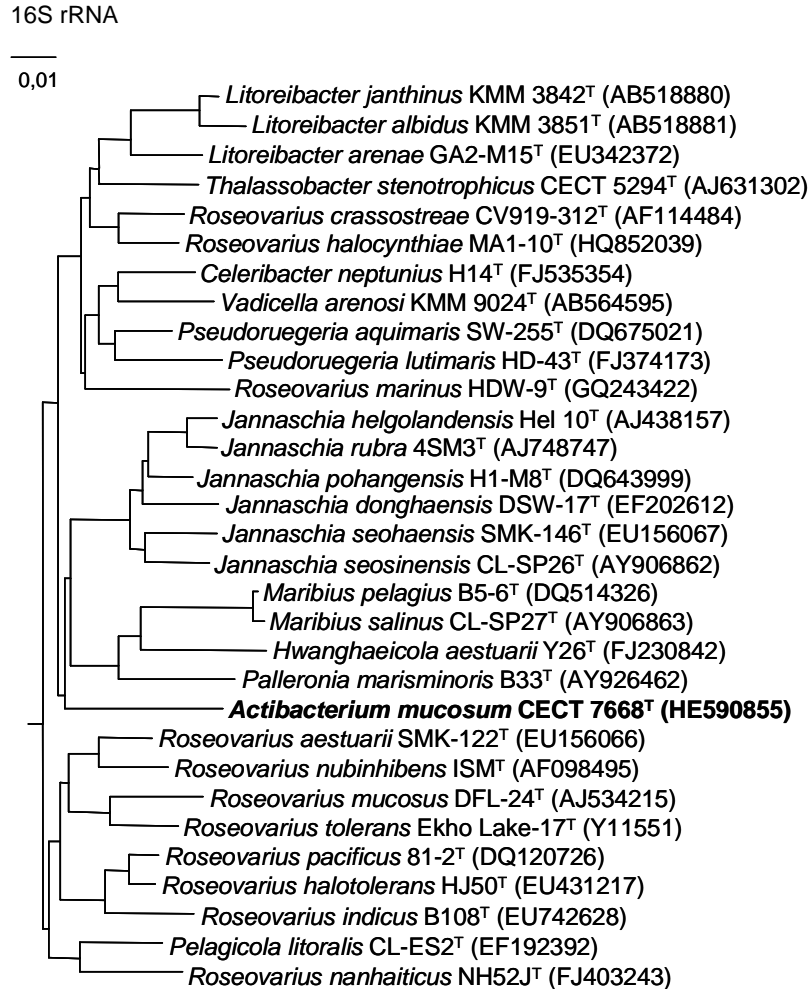


Figura S6: Árbol filogenético de ML basado en la secuencia del gen 16S rRNA de la cepa tipo de *Tropicibacter multivorans* sp. nov. y las especies relacionadas. Los números de acceso de secuencia se muestran entre paréntesis. Barra, 0,01 sustituciones nucleotídicas por sitio.



▪ **Estudio de la cepa R46: *Actibacterium mucosum* gen. nov., sp. nov.**

Figura S7: Árbol filogenético de NJ basado en las secuencias del gen 16S rRNA y *gyrB* de la cepa tipo de *Actibacterium mucosum* gen. nov. sp. nov. y las especies relacionadas. Los números de acceso de secuencia se muestran entre paréntesis. Barra, 0,01 sustituciones nucleotídicas por sitio.



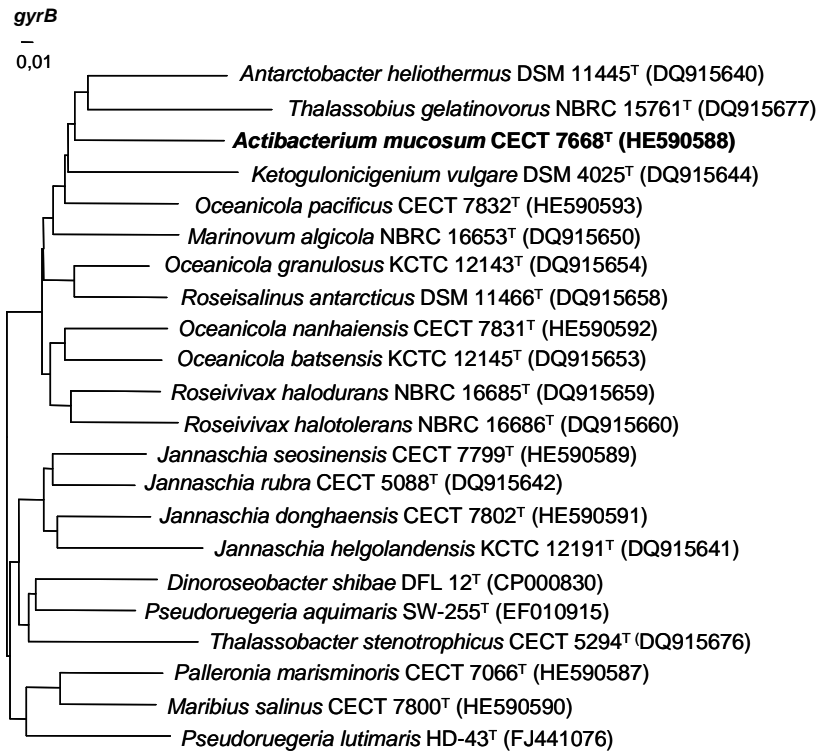
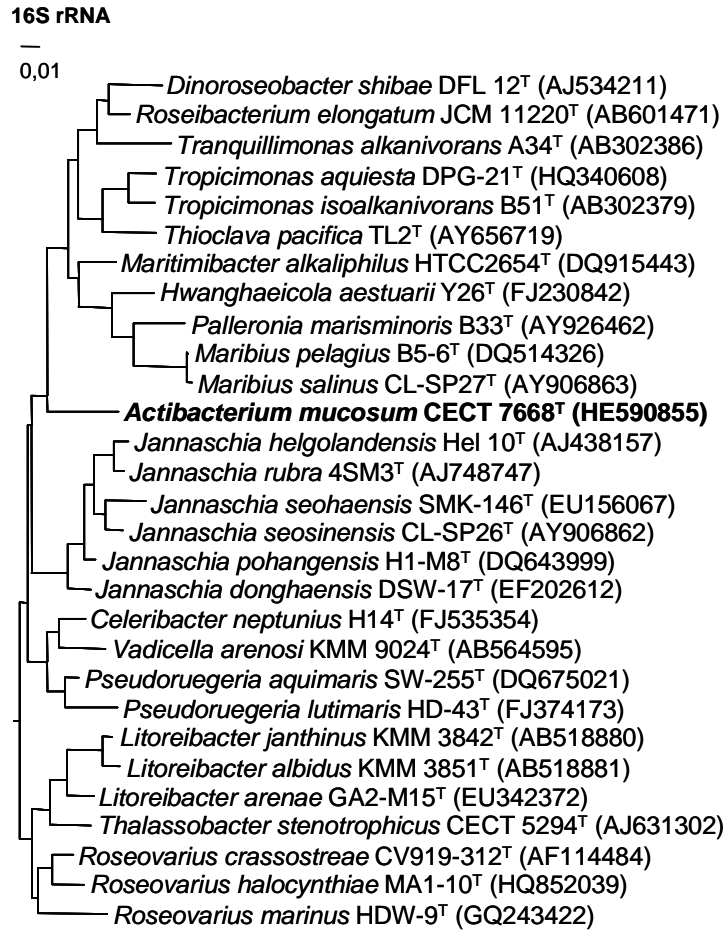
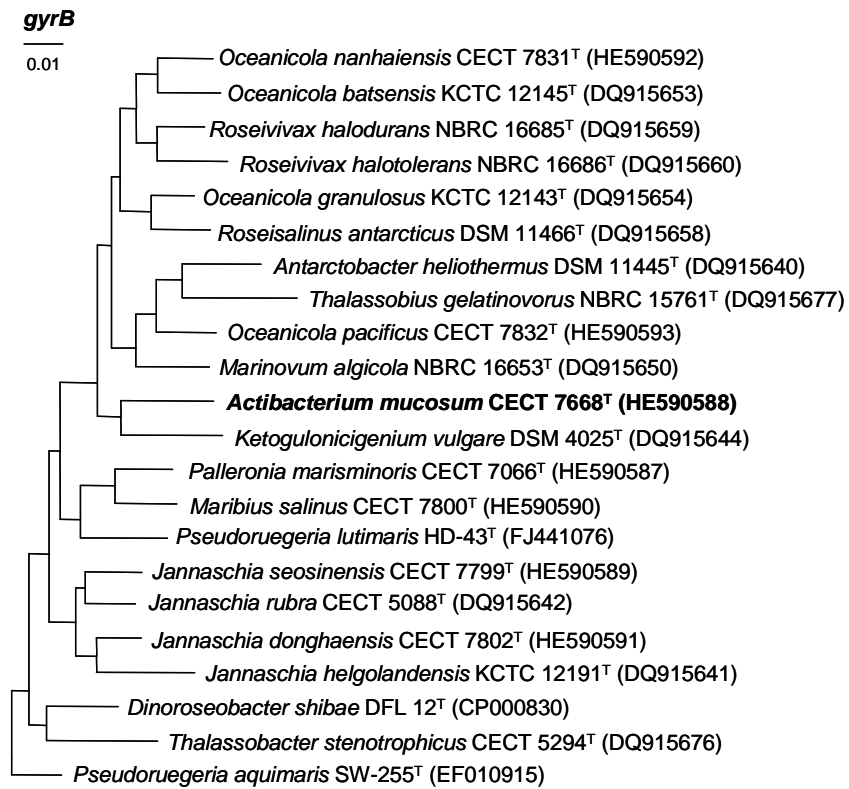


Figura S8: Árbol filogenético de ML basado en la secuencia del gen 16S rRNA de la cepa tipo de *Actibacterium mucosum* gen. nov. sp. nov. y las especies relacionadas. Los números de acceso de secuencia se muestran entre paréntesis. Barra, 0,01 sustituciones nucleotídicas por sitio.





▪ Estudio de la cepa M30: *Marinifilum flexuosus* sp. Nov.

Figura S9: Árbol filogenético de MP basado en la secuencia del gen 16S rRNA de *Marinifilum flexuosus* sp. nov. CECT 7448^T y las especies relacionadas. Los números de acceso de secuencia se muestran entre paréntesis. Barra, número de cambios nucleotídicos por sitio.

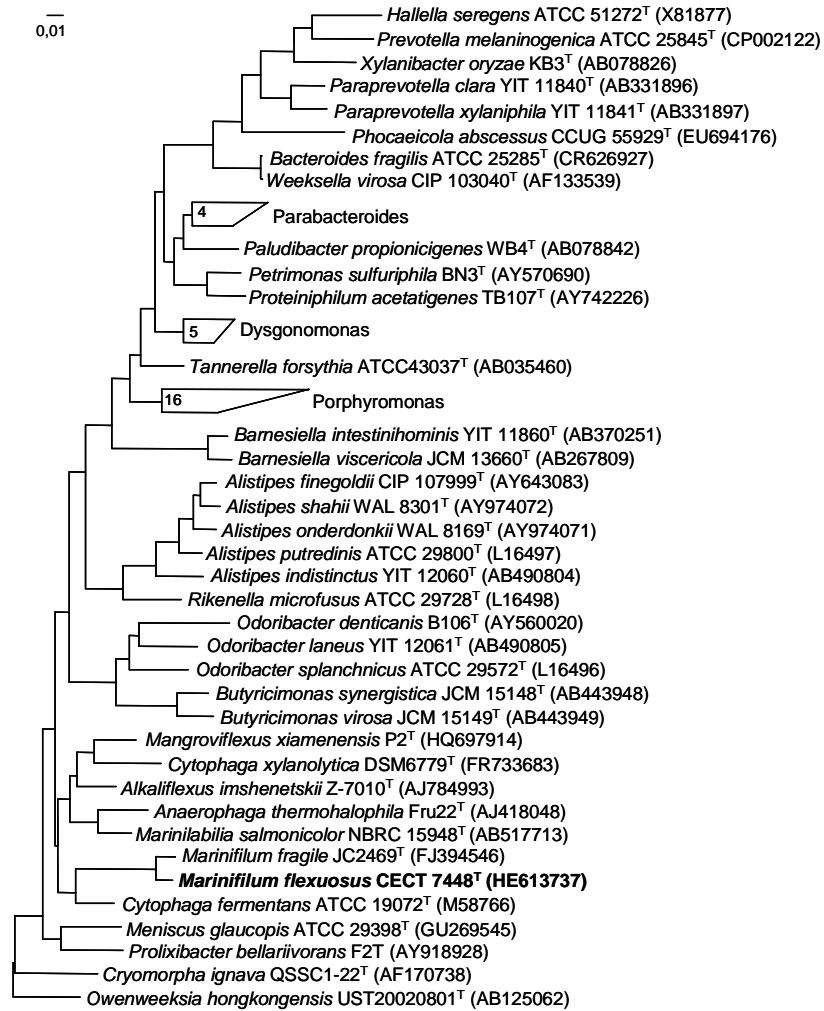
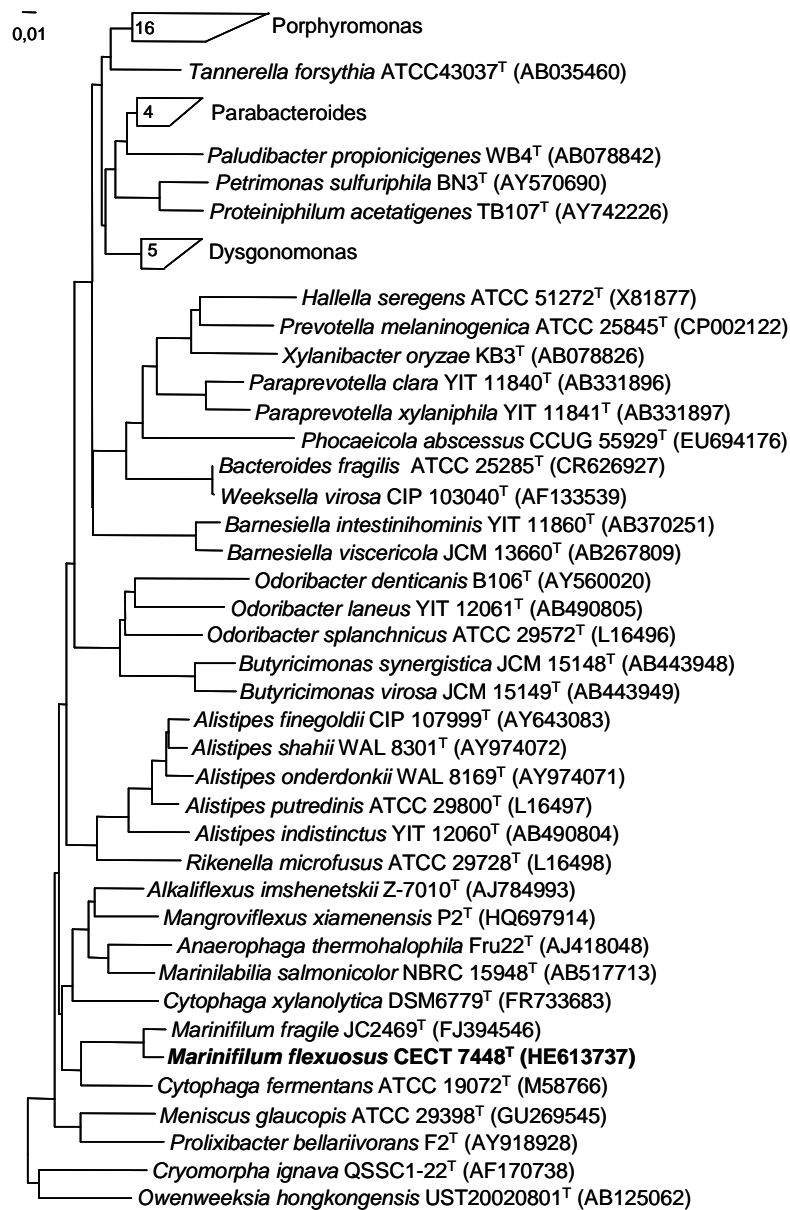


Figura S10: Árbol filogenético de NJ basado en la secuencia del gen 16S rRNA de *Marinifilum flexuosus* sp. nov. CECT 7448^T y las especies relacionadas. Los números de acceso de secuencia se muestran entre paréntesis. Barra, número de cambios nucleotídicos por sitio.



▪ Estudio de la cepa M22, M61 y M62: *Vibrio aestivus* sp. nov. y *Vibrio quintilis* sp. nov.

Figura S11: Árbol filogenético obtenido mediante MP basado en la secuencia parcial del gen 16S rRNA en el que se muestra la posición de las cepas *Vibrio aestivus* M22^T (= CECT 7558^T), *V. aestivus* M61 (= CECT 7559) y *Vibrio quintilis* M62^T (= CECT 7734^T) dentro del género *Vibrio*. Se muestra un subárbol del obtenido con las cepas tipo de las 90 especies del género *Vibrio* descritas. Barra, número de cambios nucleotídicos por sitio.

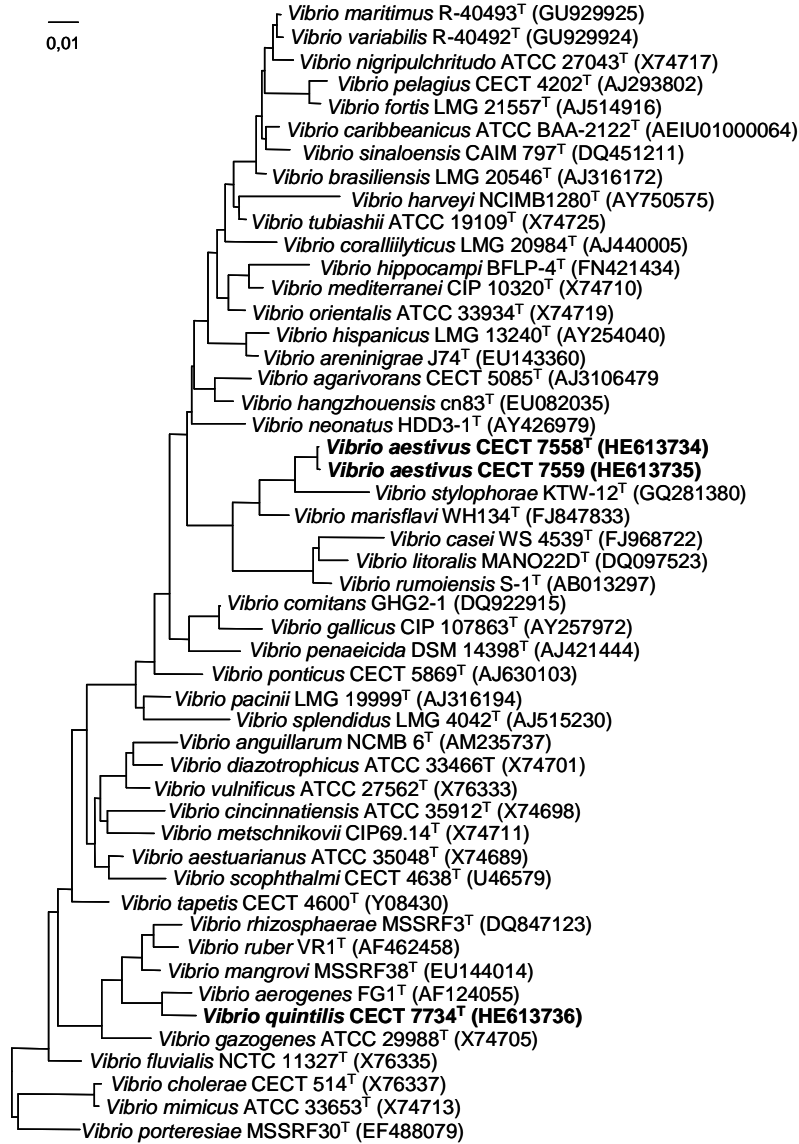
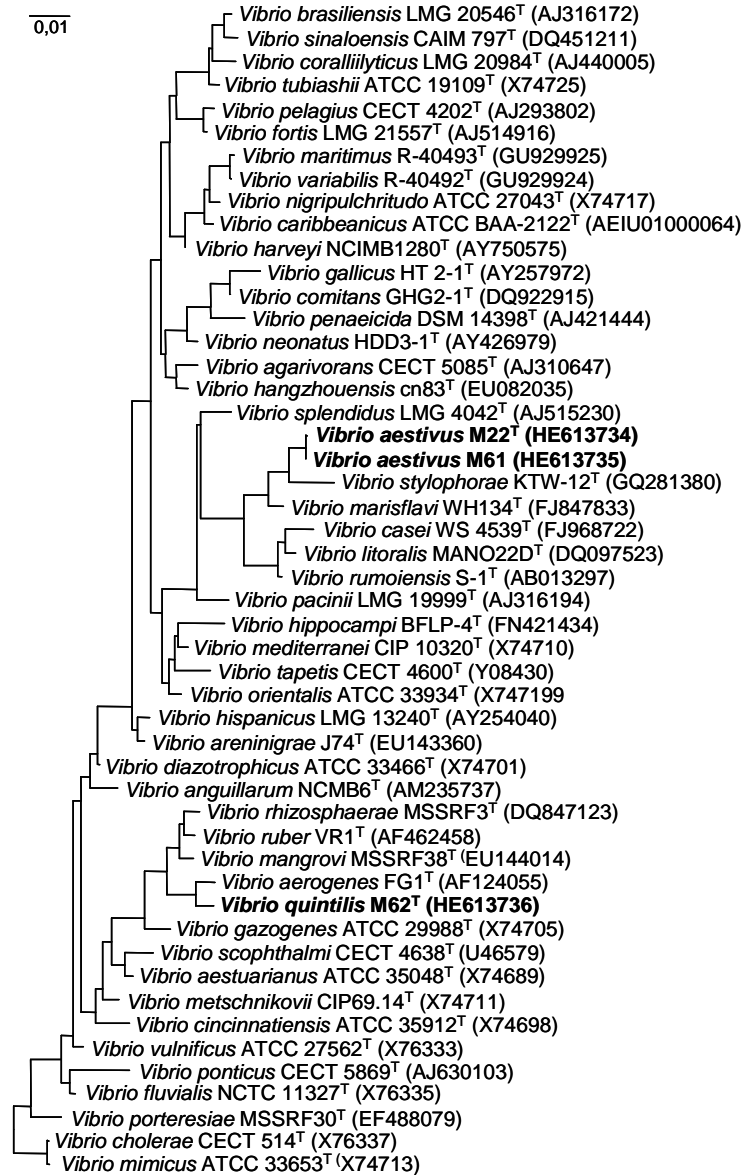


Figura S12: Árbol filogenético obtenido mediante ML basado en la secuencia parcial del gen 16S rRNA en el que se muestra la posición de las cepas *Vibrio aestivus* M22^T (= CECT 7558^T), *V. aestivus* M61 (= CECT 7559) y *Vibrio quintilis* M62^T (= CECT 7734^T) dentro del género *Vibrio*. Se muestra un subárbol del obtenido con las cepas tipo de las 90 especies del género *Vibrio* descritas. Barra, número de cambios nucleotídicos por sitio.



Estudio de la cepa 4SM10: *Roseovarius litoralis* sp. nov.

Figura S13: Árbol filogenético de NJ basado en la secuencia del gen 16S rRNA de *Roseovarius litoralis* sp. nov. CECT 7450^T y las especies relacionadas. Los números de acceso de secuencia se muestran entre paréntesis. Barra, número de cambios nucleotídicos por sitio.

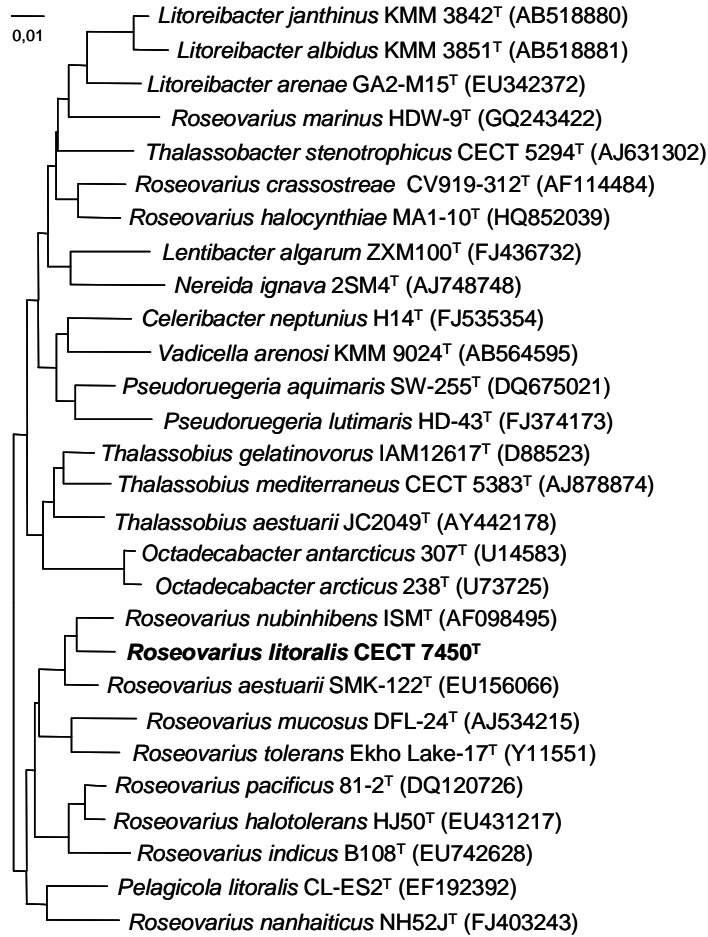


Figura S14: Árbol filogenético obtenido mediante ML basado en la secuencia parcial del gen 16S rRNA en el que se muestra la posición de las cepas *Vibrio aestivus* M22^T (= CECT 7558^T), *V. aestivus* M61 (= CECT 7559) y *Vibrio quintilis* M62^T (= CECT 7734^T) dentro del género *Vibrio*. Se muestra un subárbol del obtenido con las cepas tipo de las 90 especies del género *Vibrio* descritas. Barra, número de cambios nucleotídicos por sitio.

