

UNIVERSIDAD DE GRANADA

**FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**



**MICROORGANISMOS HALÓFILOS EN AMBIENTES
SALINOS DE ANDALUCÍA:
ESTUDIO TAXONÓMICO NUMÉRICO Y MOLECULAR.**

**M^a Azahara Pérez Davó
Tesis Doctoral
Granada, 2014**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: M^a Azahara Pérez Davó
D.L.: GR 1917-2014
ISBN: 978-84-9083-091-8

**MICROORGANISMOS HALÓFILOS EN AMBIENTES SALINOS DE ANDALUCÍA:
ESTUDIO TAXONÓMICO NUMÉRICO Y MOLECULAR.**

**Memoria que presenta la Licenciada en Farmacia Dña. Azahara Pérez Davó para
optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada.**

Fdo.: Dña. M^a Azahara Pérez Davó

VºBº LOS DIRECTORES DEL TRABAJO:

Dra. Mercedes Monteoliva Sánchez
Catedrática del Dpto. de Microbiología
Universidad de Granada

Dra. Margarita Aguilera Gómez
Profesor titular del Dpto. de Microbiología
Universidad de Granada

La doctoranda **M^a Azahara Pérez Davó** y las directoras de la tesis **Mercedes Monteoliva Sánchez** y **Margarita Aguilera Gómez** garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 28 de Marzo del 2014

Director/es de la Tesis

Fdo.: **Mercedes Monteoliva
Sánchez**

Fdo.: **Margarita Aguilera
Gómez**

Doctorando
Fdo.: **M^a Azahara Pérez Davó**

La presente tesis Doctoral se llevó a cabo gracias al disfrute de un contrato de investigación homologado en cofinanciación con el proyecto de investigación Ref. CGL2008-00447/BOS “Ambientes Salinos de Andalucía: Selección y estudio de arqueas y halófilas con potencial aplicación tecnológica”. Dicho proyecto ha sido seleccionado dentro del Programa 6.B del Plan Propio de la Universidad de Granada del 2009 desarrolló dentro del marco del proyecto de investigación “Obtención de compuestos.

Parte de los resultados presentes en esta memoria se han sido presentados en congresos nacionales e internacionales o están pendientes de publicación:

PUBLICACIONES

Pérez-Davó, A., Aguilera, M., Ramos-Cormenzana, A. y Monteoliva-Sánchez M (2014)

In Press. “Alkalibacillus almallahensis sp. nov., a halophilic bacterium isolated from an inland solar saltern”. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJS/2013/059121).

Pérez-Davó, A., Monteoliva-Sánchez, M., Jiménez-Valverde, A. y Aguilera M. (2014)

In review. “Predominance of culturable archaeal and bacterial populations from three Andalusian saline environments”. Microbes and environments.

CONGRESOS NACIONALES

Pérez-Davó, A., Aguilera M., Ramos-Cormenzana A. y Monteoliva-Sánchez M. (2012)

“Diversidad de procariotas halófilas cultivables de La Malahá (Granada)”. En XVI Reunión de Taxonomía, Filogenia y Biodiversidad, Granada, 10-12 Mayo.

Pérez-Davó A., Aguilera M., Ramos-Cormenzana A. y Monteoliva-Sánchez M. (2011)

“Estudio taxonómico numérico de bacterias y arqueas aisladas en dos salinas andaluzas de interior”. En Congreso Nacional de Microbiología (SEM), Salamanca, 11-14 Julio.

Aguilera M., Jiménez-Pranteda, M.L., Jiménez-Valverde, A., **Pérez-Davó, A.**, Ramos-Cormenzana, A. y Monteoliva-Sánchez, M. (2011) “Determinación de la diversidad de Arqueas y Bacterias halófilas en ambientes atalasoalinos y

talasohalinos de Andalucía mediante FISH y TTGE". En Congreso Nacional de Microbiología (SEM), Salamanca, 11-14 Julio.

Pérez-Davó A., Aguilera M., González-Paredes A., Ramos-Cormenzana A. y Monteoliva-Sánchez M. (2010) "Preliminary taxonomic study of halophilic archaea from the saline of Molentargius, Cagliari (Italy)". En XIII Meeting on Microbial Taxonomy, Phylogeny and Diversity, Sevilla, 13-15 de Mayo.

CONGRESOS INTERNACIONALES

Pérez-Davó, A., Vitale, R., Simona, L. ; Aguilera-Gómez, M. ; Monteoliva-Sánchez and M. and Corcelli A. (2013). " Membrane lipids of two novel extremely halophilic archeal microorganisms, belonging to the genus *Halobellus*.". In 5th Congress of European Microbiologists (FEMS), Leipzig (Germany), 21-25 July.

Pérez-Davó, A., Aguilera M., and Monteoliva-Sánchez M(2013). "Extremely Halophilic Microorganisms isolated from Andalusian Salines in Spain.". In 5th Congress of European Microbiologists (FEMS), Leipzig (Germany), 21-25 July.

Aguilera M., Jiménez-Valverde, A., Jiménez-Pranteda, M.L., Jiménez-Valverde, A., **Pérez-Davó, A.**, Ramos-Cormenzana, A. and Monteoliva-Sánchez, M. (2011) "Microbial variability inter-domains of Andalusian salty lakes ". In 4th Congress of European Microbiologists (FEMS), Geneva, Switzerland, Julio

RESUMEN:

En el desarrollo de la presente tesis doctoral se han utilizado una combinación de técnicas de cultivo microbiológico, métodos de biología molecular y tecnologías de alta resolución para el análisis de lípidos, con el objetivo de conocer la biodiversidad procarionta halófila de tres ambientes salinos de Andalucía poco caracterizados hasta el momento, sobre todo a nivel de arqueas, como han sido: las salinas de interior de Fuente de Piedra en Málaga y de La Malahá en Granada, las cuales son de tipo atalasalina; y las talasosalinas de Santa M^a de Jesús en Bahía de Cádiz. La alta salinidad de estos tres ambientes los hace propicios para hallar microorganismos extremófilos, los cuales son el eje del trabajo. La importancia creciente dada a este grupo de microorganismos, es debido a la capacidad de adaptarse a un medio extremo, los cuales van desde el desarrollo de mecanismos para excluir o desviar el factor que les dificulta la supervivencia hasta coexistir o incluso a depender de él. Estas condiciones le otorgan una serie de caracteres que pueden ser de alta aplicabilidad biotecnológica.

Mediante estudios polifásicos se han evaluado y caracterizado las cepas aisladas obtenidas de los tres ambientes salinos, generando una descripción y una batería de pruebas nutricionales, de cultivo, morfológicas, bioquímicas, fisiológicas y de susceptibilidad a agentes antimicrobianos, con las que se pudo realizar un análisis taxonómico numérico (Logan, et al., 2009, Oren, et al., 1997). Tras la selección mediante criterios de salinidad principalmente de las cepas de cada uno de los ambientes andaluces, se elaboraron dendogramas a partir de estudios de taxonomía numérica utilizando el coeficiente de agrupamiento simple "SM" y la técnica de agrupamiento "UPGMA" (Prado, et al., 1991). Este estudio generó dos dendogramas por ambiente correspondientes a arqueas y bacterias, donde de las agrupaciones se crearon en función de sus espectros de salinidad y caracteres fenotípicos. Realizada esta clasificación previa, se seleccionó un grupo de arqueas y bacterias con

características fenotípicas destacables de cada fenón para comenzar el análisis molecular y filogenético. Los resultados de las secuencias parciales del gen RNAr 16S nos permitió conocer la asignación a taxa de arqueas y bacterias halófilas extremas cultivables que se encuentran en los tres ambientes andaluces estudiados, y así, establecer datos comparativos. El grupo de arqueas se localiza dentro de la familia *Halobacteriaceae* siendo descritas especies en los siguientes géneros en Fuente de Piedra: *Halorubrum sp.*, *Halobellus sp.*, *Haloterrigena sp.*, *Haloferax sp.*, *Halogeometricum sp.*, *Haloarcula sp.*, *Halobacterium sp.*, *Halovivax sp.* y *Natrinema sp.* En La Malahá se describieron diferentes especies dentro de 5 géneros: *Halorubrum sp.*, *Haloterrigena sp.*, *Haloarcula sp.*, *Halobacterium sp.*, *Natrinema sp.* Y en el caso de Bahía de Cádiz fueron descritas especies diferentes de siete géneros: *Halorubrum sp.*, *Haloterrigena sp.*, *Natrinema sp.*, *Haloarcula sp.*, *Haloferax sp.*, *Halomicrobium sp.*, *Halorhabdus sp.* Por otro lado, la variabilidad bacteriana fue mayor en cuanto a phylum encontrados. En el humedal de Málaga, *Proteobacteria* (dentro de la clase α -*Proteobacteria*) y *Firmicutes* abarcan las especies cultivables recogidas. Por su parte nueve géneros de la atalasalina de Granada pertenecientes a los filos *Proteobacteria* (en concreto la clase α -*Proteobacteria*), *Bacteroidetes*, *Firmicutes*. Y seis géneros de la salina marina gaditana pertenecientes a los filos *Proteobacteria* (clase α -*Proteobacteria*) y *Firmicutes* (Pérez-Davó, et al., 2014, In review).

En cuanto a los análisis quimiotaxonómicos, realizados a algunos de las más representativas arqueas objeto de estudio, se buscó la descripción detallada del perfil lipídico para una mejor clasificación e identificación de microorganismos. Mediante técnicas de alta resolución como HPTLC y MALDI-Tof (Angelini, et al., 2010, Lopalco, et al., 2013), se detectó una nueva estructura de sulfolípidos (bis-sulfatodiglycosildiether) no descrita previamente. Esta estructura puede relacionarse con aquellos lípidos descritos previamente en el perfil de las especies pertenecientes al género *Halobellus* como lípidos no identificados.

Asimismo, en base a los datos de taxonomía molecular de la secuenciación completa del gen 16S DNAr junto con los datos fenotípicos, de contenido de puentes de guanina-citosina, quimiotaxonómicos, etc. se detalló un grupo de microorganismos con altas probabilidades de describir nuevas especies dentro de géneros ya descritos anteriormente. No obstante, para ser definidas como nuevas especies fue necesario completar los estudios de hibridación DNA-DNA (Ziemke, et al., 1998). Para lo cual se sometieron a una asociación DNA-DNA con el material genético de aquellas especies, válidamente descritas y depositadas en colecciones de cultivo, con las que presentaban mayor similitud a nivel de la secuencia del gen rRNA 16S.

Tras los diferentes análisis de taxonomía numérica, molecular y de quimiotaxonomía, se describieron nuevas especies de arqueas o de bacterias halófilas. Por un lado, una nueva especie bacteriana del género de *Alkalibacillus*. Esta cepa denominada como S1LM8^T fue aislada a partir de sedimentos de la explotación salinera de Granada y recibe el nombre de *Alkalibacillus almallahensis* (Pérez-Davó, et al., 2014, In Press.). Así como, se describió una nueva especie de arqueas representada por dos cepas procedentes de la laguna del parque natural de natural Fuente de Piedra, S2FP14^T y A1FP7. La especie pertenece al género de *Halobellus*, y recibe el nombre de *Halobellus ramosii* en honor a la contribución realizada en el campo de la microbiología por el profesor Alberto Ramos-Cormenzana.

SUMMARY:

This Doctoral Thesis has used a combination of microbiological culture techniques, methods of molecular biology and high resolution technologies for archaeal lipid analysis, which led towards an improvement in the knowledge of the halophilic biodiversity of the three Andalusian saline environments. The environments, which have been studied, are the natural lake of Fuente de Piedra in Málaga and the inside saline of La Malahá in Granada, which are both athalassohaline type, and the thalassohaline saline Santa María de Jesús, in Bahía de Cádiz. The highest salinity of these three environments increases the probability to find extremophile microorganisms, which constitute the core of this work. In a relative short time, this group of microorganisms is increasing their importance, due to the ability to adapt to a border live environments. They have developed some different mechanisms as exclude or divert the factor that makes them difficult to coexist. They are able to survive in presence of these factors or even depend on them. These conditions could give a series of characters that provide the microorganisms with highly applicable in biotechnology.

The isolated strains from the three saline environments were evaluated and characterized by polyphasic studies. Numerical taxonomic analysis generated a description through whole test (nutritional, culture, morphological, biochemical, physiological and susceptibility to antimicrobial agents) (Logan, et al., 2009, Oren, et al., 1997). The next step, after the selection of strains of each dendrograms' Andalusian environments by salinity criteria, was the numerical taxonomy analysis of the environments using the single clustering coefficient "SM" and the clustering algorithm "UPGMA" (Prado, et al., 1991). This study generated two clustering dendrograms for each environment, one for archaea and the other for bacteria, where their microorganisms were grouped into clusters according to their range of salinity and phenotypic characters. Once this preliminary classification was performed, we selected a group of archaea and bacteria with significant phenotypic

characteristics in order to begin a molecular and phylogenetic analysis. The results of the partial sequence of the 16S rRNA gene allowed us to know the type of cultivable extreme halophilic archaea and bacteria, which were found in the three studied Andalusian ecosystems, and we were able to establish some comparative data. The group of archaea is located within the family *Halobacteriaceae* being described species in the following genera for Fuente de Piedra: *Halorubrum sp.*, *Halobellus sp.*, *Haloterrigena sp.*, *Haloferax sp.*, *Halogeometricum sp.*, *Haloarcula sp.*, *Halobacterium sp.*, *Halovivax sp.* and *Natrinema sp.* In La Malahá were described species from five genera: *Halorubrum sp.*, *Haloterrigena sp.*, *Haloarcula sp.*, *Halobacterium sp.* and *Natrinema sp.* While in Bahía de Cádiz were species from archaeal seven genera: *Halorubrum sp.*, *Haloterrigena sp.*, *Natrinema sp.*, *Haloarcula sp.*, *Haloferax sp.*, *Halomicrobium sp.* and *Halorhabdus sp.* On the other hand, the bacterial variability was greater than archaea regarding global found phyla. In the wetland of Malaga, the collected species were belonging to Proteobacteria phylum (within the class α -Proteobacteria) and Firmicutes. Nine genera were found in La Malahá (Granada) which were belonging the Proteobacteria phyla (specifically the class α -Proteobacteria), Bacteroidetes and Firmicutes. In addition, there were six genera in marine saline of Cádiz edges belonging to Proteobacteria (α -Proteobacteria class) and Firmicutes (Pérez-Davó, et al., 2014, In review).

Following, the chemotaxonomic analyses were made to most representative archaea of this study. We performed a detailed description of the lipid profile for better classification and identification of microorganisms. For this reason, we used some high-resolution techniques like HPTLC and MALDI-ToF (Angelini, et al., 2010, Lopalco, et al., 2013), which allow to find a new structure of sulfolipid (bis- sulfatodiglycosildiether), which had not been described previously. This structure could be an unidentified lipid that was described in the profile of the species belonging to the genus *Halobellus*.

Furthermore, the results of complete sequencing of the gene of 16S rRNA, values of G+C content, chemotaxomic data and others allow us to describe a group of microorganisms with high probability of being new species within known genera.

However, the studies of DNA -DNA hybridization were necessary to define them as new species (Ziemke, et al., 1998). The genetic material of those species were subjected to DNA -DNA association with species, which present the greater similarity at the level of 16S rRNA gene sequence with described and deposited microorganisms in culture collections.

Taking in account the different numerical taxonomy analysis, classical and molecular, and chemotaxonomy data were described new species of halophilic archaea and/or bacteria. On one hand, a new bacterial species of the genus of *Alkalibacillus*. This strain, which was named S1LM8^T, was isolated from sediments of the human saline from Granada and called *Alkalibacillus almallahensis* (Pérez-Davó, et al., 2014, In Press.). And the other hand, a new species of archaea represented by two strains from natural reserve lake Fuente de Piedra, A1FP7 and S2FP14^T. The species belongs to the genus *Halobellus* and called *Halobellus ramosii* to honor the contribution made in the field of microbiology by Professor Alberto Ramos-Cormenzana. Several strains from the study will be tested to elucidate their final assignment to taxa.

INDICE

INTRODUCCIÓN

1. TAXONOMÍA Y FILOGENIA	29
1.1. RANGO TAXONÓMICO	31
1.2. TAXONOMÍA NUMÉRICA	34
1.3. TAXONOMÍA MOLECULAR	35
1.3.1. COMPOSICIÓN DE BASES DEL DNA	35
1.3.2. HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	36
1.3.3. CRONÓMETROS EVOLUTIVOS	37
1.3.4. CATÁLOGOS DE OLIGONUCLEÓTIDOS	39
1.3.5. MÉTODO DE SECUENCIACIÓN	40
1.3.6. ÁRBOLES FILOGENÉTICOS	41
1.3.7. SECUENCIA SEÑAL	41
1.4. DOMINIOS TAXONÓMICOS	43
1.4.1. BACTERIAS	44
1.4.2. ARQUEAS	46
2. AMBIENTES EXTREMOS	50
2.1. AMBIENTES HIPERSALINOS	54
2.2. HALOFILISMO	59
2.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE ZONAS HIPERSALINAS	63
3. SALINAS ANDALUZAS	64
3.1. FUENTE DE PIEDRA, MÁLAGA	64
3.2. LA MALAHÁ, GRANADA	66
3.3. SALINAS DE SANTA MARÍA DE JESÚS, CHICLANA, BAHÍA DE CÁDIZ	68
4. ARCHAEOAL LIPIDS	70
4.1. STUDY OF ARCHAEOAL CORE LIPIDS	70
4.2. POLAR LIPIDS	73

4.2.1.	PHOSPHOLIPIDS	73
4.2.2.	GLYCOLIPIDS	74
4.2.3.	PHOSPHOGLYCOLIPIDS	76
4.2.4.	NEUTRAL SQUALENES AND OTHER ISOPRENOIDS	77

5.	<u>APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS</u>	79
-----------	--	-----------

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1.	<u>MUESTREO Y AISLAMIENTO</u>	93
-----------	--------------------------------------	-----------

1.1.	ZONAS DE MUESTREO	93
1.2.	MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO	96
1.3.	TÉCNICA DE AISLAMIENTO A PARTIR DE LAS MUESTRAS	98
1.4.	SELECCIÓN DE CEPAS	99

2.	<u>TAXONOMÍA POLIFÁSICA</u>	109
-----------	------------------------------------	------------

2.1.	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS SELECCIONADAS	109
2.1.1.	PRUEBAS MORFOLÓGICAS Y DE CULTIVO	110
	Morfología colonial	110
	Estudio microscópico (óptico y de transmisión electrónica)	110
2.1.2.	PRUEBAS FISIOLÓGICAS	113
	Crecimiento en medio líquido	113
	Crecimiento a diferentes temperaturas	113
	Crecimiento a diferentes pH	113
	Crecimiento a diferentes concentraciones de sal	113
	Crecimiento en ausencia de magnesio	114
	Crecimiento en anaerobiosis en presencia de arginina	114
2.1.3.	PRUEBAS BIOQUÍMICAS	115
	Determinación de presencia o ausencia de enzimas	115
	Producción de indol	118
	Reducción de nitrato a nitrito y producción de N ₂	118
	Producción de ácidos a partir de diferentes sustratos: azúcares y alcoholes	119

2.1.4. SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS	120
Clasificación previa de microorganismos	120
Estudio de la susceptibilidad a antibióticos por difusión en agar	121
2.1.5. PRUEBAS NUTRICIONALES	124
Utilización de carbohidratos, alcoholes y ácidos como única fuente de carbono nitrógeno y energía	124
Utilización de aminoácidos como única fuente de carbono nitrógeno y energía	124
2.2. TAXONOMÍA NUMÉRICA	126
Procesamiento de los datos	127
2.3. ESTUDIO GENOTÍPICO. TAXONOMÍA MOLECULAR	128
2.3.1. EXTRACCIÓN DE DNA CROMOSÓMICO	128
KIT de extracción de DNA “DNeasy” de Quiagen®	128
Método de Marmur modificado (1961)	130
2.3.2. DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DEL DNA	132
Electroforesis en gel de agarosa	132
Determinación por biofotómetro	132
2.3.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE BASES GUANINA Y CITOSINA DE DNA.	
MÉTODO DE LA TEMPERATURA DE FUSIÓN (T _M)	133
Análisis de la curva de determinación del G+C y tratamiento de datos	135
2.3.4. ANÁLISIS FILOGENÉTICO	136
Obtención del fragmento del gen del rRNA 16S	136
Amplificación y purificación del fragmento de 16S rDNA	136
Secuenciación del fragmento de PCR purificado	138
2.3.5. CLONACIÓN	139
Cepas bacterianas y plásmido	139
Transformación bacteriana	139
2.4. ANÁLISIS FILOGENÉTICO BASADO EN LAS SECUENCIAS DEL GEN DEL 16S rDNA	141
2.5. HIBRIDACIÓN DNA-DNA	143
Marcaje del DNA	144
Precipitación del DNA	145
Comprobación del marcaje	145
Detección del marcaje	146
Revelado	146
Hibridación	147
Equilibrado de la hidroxipatita	148
Purificación de las cadenas	148
Preparación de la curva patrón de DNA	150

Lectura de ELISA	150
Determinación de la concentración de DNA marcado utilizado como patrón	151
Cálculo de la concentración de DNA hibridado	152

3. CHEMOTAXONOMIC ANALYSIS **154**

3.1. INITIAL TREATMENT	154
3.2. EXTRACTION OF LIPIDS BY METHOD OF Blich & Dyer	155
3.3. TLC (THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY)	158
3.4. ISOLATION AND PURIFICATION OF LIPIDS FROM THE TOTAL EXTRACT	159
2.4.1. EXTRACTION OF LIPIDS OF THE SILICAGEL	160
3.5. MALDI-ToF/MS	161
3.5.1. PREPARATION OF LIPIDS SAMPLES IN SOLUTION FOR MALDI-ToF/MS	162
3.5.2. COUPLING OF HPTLC WITH MALDI-ToF/MS	163

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. MUESTREO Y AISLAMIENTO **167**

1.1. PROCEDENCIA Y RECUENTO DE MICROORGANISMOS TOTALES	167
1.2. SELECCIÓN DE CEPAS	187

2. TAXONOMÍA POLIFÁSICA **203**

2.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS SELECCIONADAS	203
2.1.1. PRUEBAS MORFOLÓGICAS Y DE CULTIVO	203
Pruebas morfológicas, tinción de Gram, test KOH y movilidad	203
2.1.2. PRUEBAS FISIOLÓGICAS	208
Crecimiento a diferentes concentraciones de sales	208
Crecimiento a diferentes temperaturas y a diferentes pH	208
Crecimiento en medio líquido, en ausencia de magnesio y en anaerobiosis en presencia de arginina	217
2.1.3. PRUEBAS BIOQUÍMICAS	221
Determinación de presencia o ausencia de enzimas	221
Producción de ácidos a partir de diferentes sustratos	229

2.1.4. SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS	238
2.1.5. PRUEBAS NUTRICIONALES	246
Utilización de carbohidratos, alcoholes y ácidos como única fuente de carbono y energía	246
Utilización de aminoácidos como única fuente de carbono, nitrógeno y energía	254
2.2. TAXONOMÍA NUMÉRICA	259
2.2.1. SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS REPRESENTANTES DE CADA FENÓN	274
2.3. TAXONOMÍA MOLECULAR	276
2.3.1. EXTRACCIÓN DE DNA CROMOSÓMICO, CUANTIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DNA	276
Determinación del contenido de bases Guanina y Citosina de DNA. Método de la temperatura de fusión (T _m)	277
2.3.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO	280
Obtención del gen del 16S rRNA. Secuenciación del fragmento obtenido por PCR una vez purificado	280
Análisis filogenético basado en las secuencias del gen del 16S rRNA	295
2.3.3. HIBRIDACIÓN DNA-DNA	309
Resultados de la hibridación de la cepas S2FP14, A1FP20, A1FP7 y S2FP8	309
Resultados de la hibridación de la Cepa A1FP12	314
Resultados de la hibridación de la Cepa A3FP22	315
Resultados de la hibridación de la Cepa S2FP25	316
Resultados de la hibridación de la Cepa S1LM8	317
Resultados de la hibridación de la Cepa S3LM7	318
<u>3. CHEMOTAXONOMIC ANALYSIS</u>	320
<u>4. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA, FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE LAS NUEVAS ESPECIES</u>	328
4.1. S1LM8 ^T : <i>ALKALIBACILLUS ALMALLAHENSIS</i> SPP. NOV.	328
4.2. S2FP14 ^T Y A1FP7: <i>HALOBELLUS RAMOSII</i> SPP. NOV.	333
4.3. A4BC2 ^T : <i>HALORHABDUS GADIBUSENSE</i> SPP. NOV.	337

CONCLUSIONES

ANEXOS

INDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Rasgos seleccionados de los tres dominios de la vida.
- Tabla 2.** Composición del medio HM.
- Tabla 3.** Stock de sales 30 % (Subov.).
- Tabla 4.** Composición del medio OS.
- Tabla 5.** Cepas seleccionadas procedentes de la Laguna de Fuente de Piedra (Málaga).
- Tabla 6.** Cepas seleccionadas procedentes de la salina de la Malahá (Granada).
- Tabla 7.** Cepas seleccionadas procedentes de las salinas de Santa María de Jesús, (Chiclana, Cádiz).
- Tabla 8.** Medio HM suplementado.
- Tabla 9.** Reactivo de Frasier.
- Tabla 10.** Composición del reactivo de Kovacs.
- Tabla 11.** Composición de los reactivos A y B.
- Tabla 12.** Sustratos utilizados en la producción de ácidos por fermentación.
- Tabla 13.** Valores en mm de los diámetros de los antibióticos (CMI).
- Tabla 14.** Composición del medio basal de sales.
- Tabla 15.** Buffer de lisis enzimática.
- Tabla 16.** Secuencias de oligonucleótidos usados en el presente trabajo.
- Tabla 17.** Mezcla de sustratos necesaria para la PCR.
- Tabla 18.** Medio SOC.
- Tabla 19.** Recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) en Fuente de Piedra (Málaga).
- Tabla 20.** Descripción de las cepas aisladas y seleccionadas de Fuente de Piedra (Málaga).
- Tabla 21.** Recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) en La Malahá (Granada).
- Tabla 22.** Descripción de las sepas aisladas y seleccionadas de La Malahá (Granada).
- Tabla 23.** Recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) en Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).
- Tabla 24.** Descripción de las sepas aisladas y seleccionadas de Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).

- Tabla 25.** Espectro de salinidad de cepas aisladas procedentes de Fuente de Piedra.
- Tabla 26.** Espectro de salinidad de cepas aisladas procedentes de La Malahá.
- Tabla 27.** Espectro de salinidad de cepas aisladas procedentes de La Malahá.
- Tabla 28.** Morfología, tinción de Gram, test KOH y movilidad. Fuente de Piedra (Málaga).
- Tabla 29.** Morfología, tinción de Gram, test KOH y movilidad. La Malahá (Granada).
- Tabla 30.** Morfología, tinción Gram, test KOH y movilidad. Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).
- Tabla 31.** Crecimiento a diferentes temperaturas y a diferentes pH.
- Tabla 32.** Fuente de Piedra (Málaga): Crecimiento en medio líquido, ausencia de Magnesio y anaerobiosis en presencia de arginina.
- Tabla 33.** La Malahá (Granada): Crecimiento en medio líquido, ausencia de Magnesio y anaerobiosis en presencia de arginina.
- Tabla 34.** Santa M^a de Jesús, Chiclana (Cádiz): Crecimiento en medio líquido, ausencia de Magnesio y anaerobiosis en presencia de arginina.
- Tabla 35.** Fuente de Piedra (Málaga): Determinación de presencia o ausencia de enzimas.
- Tabla 36.** La Malahá (Granada): Determinación de presencia o ausencia de enzimas.
- Tabla 37.** Santa M^a de Jesús, Chiclana (Cádiz): Determinación de presencia o ausencia de enzimas.
- Tabla 38.** Fuente de Piedra (Málaga): Producción de ácidos a partir de diferentes sustratos.
- Tabla 39.** La Malahá (Granada): Producción de ácidos a partir de diferentes sustratos.
- Tabla 40.** Santa M^a de Jesús, Chiclana (Cádiz): Producción de ácidos a partir de diferentes sustratos.
- Tabla 41.** Susceptibilidad a Antibióticos. Fuente de Piedra (Málaga).
- Tabla 42.** Susceptibilidad a Antibióticos. La Malahá (Granada).
- Tabla 43.** Susceptibilidad a Antibióticos. Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).
- Tabla 44.** Utilización de diversos sustratos como fuente única de Carbono y energía. Fuente de Piedra (Málaga).

- Tabla 45.** Utilización de diversos sustratos como fuente única de Carbono y energía. La Malahá (Granada).
- Tabla 46.** Utilización de diversos sustratos como fuente única de Carbono y energía. Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).
- Tabla 47.** Utilización de aminoácidos como fuente única de Carbono y energía. Fuente de Piedra (Málaga).
- Tabla 48.** Utilización de aminoácidos como fuente única de Carbono y energía. La Malahá (Granada).
- Tabla 49.** Utilización de aminoácidos como fuente única de Carbono y energía. Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).
- Tabla 50.** Concentración, pureza, valor medio de temperatura de fusión y valor teórico de G+C (%mol) de las cepas seleccionadas.
- Tabla 51.** Resultados del alineamiento global mediante BLAST de las secuencias parciales y totales del gen del RNAr 16S de las arqueas seleccionadas de Fuente de Piedra (Málaga).
- Tabla 52.** Resultados de alineamiento global mediante BLAST de las secuencias parciales y totales del gen del RNAr 16S de las arqueas seleccionadas de La Malahá (Granada).
- Tabla 53.** Resultados de alineamiento global mediante BLAST de las secuencias parciales y totales del gen del RNAr 16S de las arqueas seleccionadas de La Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).
- Tabla 54.** Resultados de alineamiento global mediante BLAST de las secuencias parciales y totales del gen del RNAr 16S de las bacterias seleccionadas de Fuente de Piedra (Málaga).
- Tabla 55.** Resultados de alineamiento global mediante BLAST de las secuencias parciales y totales del gen del RNAr 16S de las bacterias seleccionadas de La Malahá (Granada).
- Tabla 56.** Resultados de alineamiento global mediante BLAST de las secuencias parciales y totales del gen del RNAr 16S de las bacterias seleccionadas de Santa M^a de Jesús (Chiclana, Bahía de Cádiz).
- Tabla 57.A.** Hibridación de la cepa S2FP14.
- Tabla 57.B.** Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada S2FP14*, las cepas seleccionadas y la cepa de referencia.
- Tabla 57.C.** Hibridación de la cepa S2FP14.
- Tabla 57.D.** Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada S2FP14*, las cepas seleccionadas y la cepa de referencia.
- Tabla 57.E.** Hibridación de la cepa A1FP7*.
- Tabla 57.F.** Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada A1FP7*, las cepas seleccionadas y la cepa de referencia.

- Tabla 58.A.** Hibridación DNA-DNA de la cepa A1FP12*.
- Tabla 58.B.** Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada A1FP12*, las cepas seleccionadas y la cepa de referencia.
- Tabla 59.A.** Hibridación DNA-DNA de la cepa A3FP22*.
- Tabla 59.B.** Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada A3FP22*, las cepas seleccionadas y la cepa de referencia.
- Tabla 60.A.** Hibridación DNA-DNA de la cepa S2FP25*.
- Tabla 60.B.** Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada A3FP22*, las cepas seleccionadas y la cepa de referencia.
- Tabla 61.A.** Hibridación de la cepa S1LM8*.
- Tabla 61.B.** Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada S1LM8*, las cepas seleccionadas y la cepa de referencia.
- Tabla 62.A.** Hibridación de la cepa S3LM7*.
- Tabla 62.B.** Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada S3LM7*, las cepas seleccionadas y la cepa de referencia.
- Tabla 63.** Composición de ácidos grasos (%) de la cepa S1LM8^T y las especies cercanas pertenecientes al género *Alkalibacillus*.

INDICE DE FIGURAS

- Fig. 1.** Esquema de categorías taxonómicas o taxa.
- Fig. 2.** Árbol de la vida basado en la secuenciación del gen 16s rRNA y distribución de alguno de los microorganismos.
- Fig. 3.** Posible nuevo árbol de la vida.
- Fig. 4.** Lago Retba (Senegal), lago Rosa se encuentra al norte de la península senegalesa de Cabo Verde, al noreste del país africano.
- Fig. 5.** Explotaciones humanas. Salineras de Maras, situadas en la cordillera Andina, en el Valle Sagrada de los Incas.
- Fig. 6.** Parque Nacional Etosha, Namibia (África).
- Fig. 7.** Cuenca endorreica de Fuente de Piedra.
- Fig. 8.** Salina de La Malahá.
- Fig. 9.** Salinas de Santa M^a de Jesús
- Fig. 10.** Chemical formulas of lipids
- Fig. 11.** Tetraether-based lipids.
- Fig. 12.** The structure of archaeal cardiolipin or bisphosphatidylglycerol.
- Fig. 13.** Mapa geográfico de Andalucía con las localizaciones de las zonas de muestreo.
- Fig. 14.** Ilustración de la laguna de Fuente de Piedra.
- Fig.15.** Cristalizadores de la atalasalina de La Malahá (Granada).
- Fig.16.** Esquema de la salinas de Santa M^a de Jesús, Chiclana, Bahía de Cádiz.
- Fig.17.** Test KOH positivo.
- Fig.18.** Curva de desnaturalización del DNA de *Escherichia coli*.
- Fig.19.** Marcaje del DNA.
- Fig. 20.** Placa de Estreptadivina tras dos horas de incubación.
- Fig. 21.** Extraction of lipids by method of Bligh & Dyer.
- Fig. 22.** The marks of silica-gel plate.
- Fig. 23.** The marks of silica-gel plate to extraction of lipids of the Silica-gel.
- Fig. 24.** Photograph of MALDI-Tof target (Top). Dimensions of target are approximately 53 x 41 mm. and MALDI-Tof machine (right).
- Fig. 25.** HPTLC in aluminum plate.
- Fig. 26.** Zonas de muestreo de Fuente de Piedra.
- Fig. 27.** Zonas de muestreo de La Malahá.
- Fig. 28.** Zonas de muestreo de Bahía de Cádiz.
- Fig. 29.** Muestra de colores y morfologías coloniales procedentes de los tres ambientes salinos.

- Fig. 30.** Porcentajes de la coloración de unidades formadoras de colonias aisladas en los ambientes de FP (Fuente de Piedra), LM (La Malahá) y BC (Bahía de Cádiz). (Colonias rojas, rosadas, anaranjadas, amarillentas, ocres y blanquecinas).
- Fig. 31.** Diagrama de selección de las cepas aisladas de los tres ambientes salinos, desde la recogida inicial hasta la selección final por taxonomía molecular. (Paso 1: Selección de cepas en base su coloración y producción de exopolisacárido; Paso 2: selección por rango de salinidad; Paso3: test fenotípicos y taxonomía numérica; Paso 4: Secuencias parciales del 16S rRNA; Paso 5: Secuencias totales del 16S rRNA).
- Fig. 32.** Dendograma de arqueas aisladas de la salina de Fuente de Piedra (Málaga).
- Fig. 33.** Dendograma de bacterias aisladas de la salina de Fuente de Piedra (Málaga).
- Fig. 34.** Medio de crecimiento de las cepas que componen el dendograma de arqueas (A) y bacterias (B) de Fuente de Piedra (Málaga).
- Fig. 35.** Dendograma de arqueas aisladas de la salina de La Malahá (Granada).
- Fig. 36.** Dendograma de bacterias aisladas de la salina de La Malahá (Granada).
- Fig. 37.** Medio de crecimiento de las cepas que componen el dendograma de arqueas (A) y bacterias (B) de La Malahá (Granada).
- Fig. 38.** Dendograma de arqueas aisladas de la salina de Santa M^a de Jesús (Chiclana, Bahía de Cádiz).
- Fig. 39.** Dendograma de bacterias aisladas de la salina de Santa M^a de Jesús (Chiclana, Bahía de Cádiz).
- Fig. 40.** Medio de crecimiento de las cepas que componen el dendograma de arqueas (A) y bacterias (B) de Santa M^a de Jesús (Chiclana, Bahía de Cádiz).
- Fig. 41.** Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen del RNAr 16S de las arqueas en estudio y las diferentes especies de colección válidamente descritas. Fuente de Piedra (Málaga).
- Fig. 42.** Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen del RNAr 16S de las arqueas en estudio y las diferentes especies de colección válidamente descritas. La Malahá (Granada).

- Fig. 43.** Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen del RNAr 16S de las arqueas en estudio y las diferentes especies de colección válidamente descritas. Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz)
- Fig. 44.** Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen del RNAr 16S de las cepas bacterianas en estudio y las diferentes especies de colección válidamente descritas. Fuente de Piedra (Málaga).
- Fig. 45.** Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen del RNAr 16S de las cepas bacterianas en estudio y las diferentes especies de colección válidamente descritas. Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).
- Fig. 46.** Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen del RNAr 16S de las cepas bacterianas en estudio y las diferentes especies de colección válidamente descritas. La Malahá (Granada).
- Fig. 47.** Árbol filogenético de las secuencias totales del gen del RNAr 16S de las arqueas en estudio y las diferentes especies de colección válidamente descritas. Fuente de Piedra (Málaga).
- Fig. 48.** Árbol filogenético de las secuencias totales del gen del RNAr 16S de las arqueas en estudio y las diferentes especies de colección válidamente descritas. La Malahá (Granada).
- Fig. 49.** Árbol filogenético de las secuencias totales del gen del RNAr 16S de las arqueas en estudio y las diferentes especies de colección válidamente descritas. Santa M^a de Jesús (Bahía de Cádiz).
- Fig. 50.** Árbol filogenético de las secuencias totales del gen del RNAr 16S de las bacterias en estudio y las diferentes especies de colección válidamente descritas. Fuente de Piedra (Málaga).
- Fig. 51.** Árbol filogenético de las secuencias totales del gen del RNAr 16S de las bacterias en estudio y las diferentes especies de colección válidamente descritas. La Malahá (Granada).
- Fig. 52.** Árbol filogenético de las secuencias totales del gen del RNAr 16S de las bacterias en estudio y las diferentes especies de colección válidamente descritas. Santa M^a de Jesús (Bahía de Cádiz).
- Fig. 53.** HPTLC lipids profiles of the total lipid extract of SQ (*Haloquadratum Walsbyi*), A (A1FP7) and S (S2FP14).
- Fig. 54.** MALDI-Tof MS analysis (negative mode) of the total lipid extracts of S2FP14 and A1FP7.
- Fig. 55.** Comparative of values of MALDI-Tof MS analysis of the total lipid extracts of S2FP14 and the different type of stains for HPTLC.
- Fig. 56.** MALDI-Tof mass spectra of band 1 of Halobellus S2FP14 strain by direct coupling of HPTLC and MALDI-Tof.

- Fig. 57.** PDS fragment ion spectra of band 1 of Halobellus S2FP14 strain.
- Fig. 58.** PDS Proposed structures for the bis -sulfated glycolipid and its hydroxylated form.
- Fig. 59.** Fotografías al microscopio óptico mostrando la endoespora terminal, teñida mediante métodos tradicionales (Técnica de Shaeffer-Fulton). Bar 3 μm .
- Fig. 60.** Fotografía del microscopio electrónico de la cepa S1LM8T con espora terminal, crecida en el medio HM. Bar 5 μm .
- Fig. 61.** Árbol basado en el método “Neighbour-joining” que muestra la relación filogenética basada en las secuencias del gen 16S rRNA de la cepa S1LM8T y otras cepas validadas relacionadas. Los valores de “Bootstrap” son expresados en porcentajes de 1000 replicaciones. Bar, 0.01 cambios por la posición del nucleótido.
- Fig. 62.** Imagen de S2FP14 crecida en medio HM de requerimientos mínimos por microscopio de transmisión electrónica. Bar. 500 nm.
- Fig. 63.** Perfil lipídico de S2FP14 crecida en medio HM al 20% (v/w) a 37 $^{\circ}\text{C}$.
- Fig. 64.** Árbol basado en el método “Neighbour-joining” que muestra la relación filogenética basada en las secuencias del gen 16S rRNA de las cepas S2FP14T y A1FP7 y otras cepas validadas relacionadas. Los valores de “Bootstrap” son expresados en porcentajes de 1000 replicaciones. Bar, 0.02 cambios por la posición del nucleótido.
- Fig. 65.** Imagen de A4BC2 crecida en medio HM de requerimientos mínimos por microscopio de transmisión electrónica. Bar. 2 μm .
- Fig. 66.** Perfil lipídico de A4BC2 crecida en medio HM al 25% (v/w) a 45 $^{\circ}\text{C}$.
- Fig. 67.** Árbol basado en el método “Neighbour-joining” que muestra la relación filogenética basada en las secuencias del gen 16S rRNA de la cepa A4BC2T y otras cepas validadas relacionadas. Los valores de “Bootstrap” son expresados en porcentajes de 1000 replicaciones. Bar, 0.02 cambios por la posición del nucleótido.

INTRODUCCIÓN

1. TAXONOMÍA Y FILOGENIA

La taxonomía microbiana puede definirse como el estudio científico de la diversidad de microorganismos con el objetivo de caracterizarlos y colocarlos de modo ordenado. Comprende la clasificación, identificación y nomenclatura de los organismos, incluyendo actividades implicadas en la construcción de sistemas clasificatorios que agrupan los seres vivos de acuerdo con criterios preestablecidos (Ramos-Cormenzana, 1979). La **clasificación** trata de ordenar las unidades taxonómicas (taxa) en grupo sobre la base de sus similitudes fenotípicas o relaciones filogenéticas. Esta clasificación se define como sistemática, cuando se genera una agrupación de organismos vivos para facilitar su conocimiento y sus relaciones. La base de la taxonomía es el taxón o taxa, el cual debe contener la mayor información posible. El establecimiento de un taxón determinado, debe implicar la existencia de unos caracteres afines en las especies agrupadas en aquel taxón en el que puede existir un rasgo fundamental. Y deben establecerse unas afinidades, porque de otro modo podría darse el caso que quedara excluida un microorganismo que careciese del rasgo fundamental, aunque todos los demás rasgos si fueran afines con el taxón. La **identificación** es el proceso por el cual los organismos con determinadas y desconocidas afinidades taxonómicas se sitúan dentro de un grupo preexistente. Y finalmente, **nomenclatura**, es dar nombre a las unidades taxonómicas de acuerdo con las reglas del código internacional (Lapage, et al., 1992, Zhi, et al., 2012).

Frecuentemente se confunde clasificación con identificación, sin embargo es necesario describir y caracterizar primero la unidad taxonómica básica (clasificación) antes que un aislamiento pueda ser identificado como perteneciente a ese taxón. Un aislamiento que no pueda ser identificado como un miembro de un taxón conocido, tiene que ser descrito y clasificado como una nueva especie o género (Ludwig & Klenk, 2001). Por consiguiente la clasificación precede a la identificación. Hay dos tipos principales de clasificación: una basada en las relaciones

fenotípicas (no evolutiva) y otra filogenética (evolutiva). La formación de grupos de organismos sobre la base de sus propiedades filogenéticas, suele ser una guía genealógica segura.

En la actualidad, la clasificación microbiana está basada en el manual sistemático de Bergey (Garrity & Holt, 2001, Tindall, et al., 2010), aceptado mundialmente. Continuamente se publican cambios, que la comunidad científica acepta como correctos y en consecuencia, se convierten en cambios aplicables. Las clasificaciones microbianas se basan en una serie de caracteres morfológicos, fisiológicos, antigénicos, ecológicos y genéticos. Por supuesto debe basarse en caracteres no adaptacionales y a ser posible filogenéticos, es decir, los miembros deben ir relacionados de acuerdo con la procedencia de un ancestro común, pudiendo considerarse como mayor inconveniente el que se desconozcan las vías de descendencia genética en la mayor parte de los casos, cuestión que se resuelve actualmente con las relaciones filogenéticas establecidas con la secuenciación del RNA ribosómico 16S. Exactamente, la filogenia se ocupa del estudio de las relaciones evolutivas entre diferentes grupos de organismos, utilizando matrices de información de moléculas de DNA obtenida de la pequeña subunidad ribosomal y de pruebas morfológicas. Actualmente, la clasificación procariota se desarrolla mediante la utilización de métodos genómicos rápidos, siendo la información recabada la que desarrolla los sistemas filogenéticos, estableciendo relaciones entre los microorganismos y mejorando el conocimiento de la bioquímica, genética, fisiología y evolución de los microorganismos (Zhi, et al., 2012).

1.1. RANGO TAXONÓMICO

En la clasificación de los microorganismos se utilizan varios niveles o rangos. Todos los organismos están situados en un dominio y las sucesivas categorías del reino, división, clase, orden, familia, género y especie, que son sucesivamente inferiores.

La especie es la base de la organización del grupo en la sistemática microbiana. El concepto de especie es más controvertido que en organismos superiores. Una especie bacteriana puede ser considerada como un grupo de cepas que comparten muchas características y difieren considerablemente de otras cepas. En realidad, el concepto no puede ser más universal, a pesar de las muchas críticas. Actualmente se discuten las fronteras que delimitan esta unidad taxonómica, estudiando la validez de las fronteras demarcadas por el comité de taxonomía bacteriana de 1987, debido a que en la mayoría de los casos, se trataba de un concepto demasiado conservador y subestima la diversidad real. Por ello existen una serie de conceptos universales, los cuales son:

- Concepto evolutivo de la especie: es el concepto con menos carga teórica, y se basa en la definición de especie como una línea de desarrollo, donde se puede reconocer una trayectoria evolutiva.
- Concepto fenotípico de especie: es el concepto más pragmático, el cual concibe la especie como una unidad basada en el grado de semejanza entre los organismos que lo conforman.
- Concepto filogenético de especie: se basa en el reconocimiento de grupos monofiléticos que se pueden definir por un número determinado de caracteres en principio unidos y exclusivos del taxón.

Una cepa está formada por los descendientes de un aislamiento en cultivo puro y usualmente proviene de una sucesión de cultivos derivados desde una simple colonia inicial. Una especie consta de la cepa tipo y de todas las demás cepas, que

son suficientemente similares a ésta para incluirlas dentro de la especie. Esta cepa tipo, la cual será la cepa de referencia que portará el nombre de la especie, posee un papel muy importante en la clasificación. El nivel de homología del DNA es una de las bases más importantes en la definición de especie (Garrity & Holt, 2001). Cuando una cepa tipo no se encuentre disponible o existe una incapacidad para ubicarla en un taxón, la especie debería ser considerada como “*incertae sedis*” (expresión procedente del latín para definir una posición taxonómica incierta) y esta denominación debe considerarse provisional (Kiss, et al., 2010).

Por la gran importancia que tiene que la cepa tipo sea seleccionada adecuadamente, no es extraño que se produzcan cambios en la cepa tipo inicial. Un ejemplo es el caso de *Halorubrum trapanicum*, que inicialmente venía representada por una cepa tipo denominada NRC34021, pero que con el tiempo se vio que la cepa denominada NCIMB13488, era más afín con la descripción original de la especie (Grant, et al., 1998).

Una especie puede dividirse en dos o más subespecies basándose en una menor pero consistente variación filogenética dentro de la especie, o en agrupamiento de cepas determinado genéticamente dentro de la especie. Los niveles más bajos a la subespecie se utilizan en algunos grupos de bacterias, tales como: biotipos, serotipos y fagotipos. Indican grupos de cepas que pueden distinguirse por algún carácter especial, como marcaje antigénico, reacciones a bacteriófagos, etc., aunque esta categoría no se establece de forma oficial en la nomenclatura, es muy útil para designar a algunos grupos. Todas las especies son asignadas a un género siguiendo el sistema binomial de nomenclatura de Linneo; todos los microorganismos se adscriben a un género y una especie. Los géneros en bacterias son grupos bien definidos que están claramente separados de otro género (Grant & Larsen, 1989, Rossello-Mora & Amann, 2001).

La taxonomía da lugar al establecimiento de una jerarquía (Figura 1) dentro de la diversidad de los organismos cuyos conceptos básicos son:

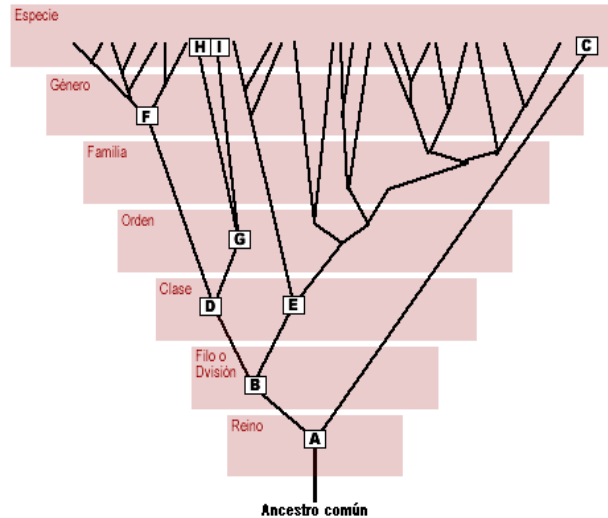


Fig. 1. Esquema de categorías taxonómica o taxa.

- **Especie:** Se trata del pilar fundamental del esquema taxonómico, así como la unidad básica para entender la biodiversidad microbiana, que encierra un grupo de aislados individuales (o cepas) procedente de un mismo filo, genómicamente coherente, que comparten también un alto grado de similitud en muchas funciones independientes (Rossello-Mora, 2012).
- **Género:** Escalón taxonómico superior que engloba a especies relacionadas. El nombre del género debe estar acompañado al de la especie cuando se refiera el nombre de un microorganismo (Tindall, et al., 2010).
- **Familia:** En la clasificación biológica, nivel intermedio de la jerarquía taxonómica. Éste contiene varios géneros, cada uno con una o más especies. Es el taxón superior que se emplea de manera rutinaria en estudios taxonómicos de procariotas.
- **Filo o división:** Términos equivalentes para un mismo rango taxonómico. Dentro de este rango, destacar que, en ocasiones, varios filios pueden

agruparse en superfilos, y los individuos de un filo puede organizarse en subfilos (y éstos a su vez en infrafilos).

- **Reino:** es cada una de las grandes subdivisiones en que se distribuyen los seres vivos, atendiendo a sus caracteres comunes. Se trata del segundo nivel de clasificación por debajo del dominio. Dónde el sistema de los tres dominios (Arquea, Bacteria y Eukarya) es ampliamente aceptado.
- **Dominio:** Es el nivel más elevado de clasificación biológica. Según la propuesta de Carl Woese, los tres dominios de los seres vivos son Bacteria, Arquea y Eukarya (Woese, et al., 1990).

La taxonomía bacteriana moderna está basada en las relaciones filogenéticas, establecidas a través de similitudes entre la secuencia de RNA ribosomal 16S (Woese, 1987), aunque por sí sola no permite una identificación certera de los taxones. Algunos autores utilizan el término de taxonomía polifásica para englobar la combinación de métodos fenotípicos y genotípicos (Colwell, 1970, Vandamme, 1996).

1.2. TAXONOMÍA NUMÉRICA

La taxonomía numérica (también llamada taxometría), es la evaluación numérica de la afinidad o semejanza entre las unidades taxonómicas operacionales (OTU); así como la ordenación de estas unidades en taxa, bajo la base de sus similitudes. Comenzó a desarrollarse a finales de los años 50 como parte de un análisis multivariable y en paralelo con el desarrollo de las ciencias de computación. Una amplia descripción de los métodos de taxonomía numérica fue realizada por Sneath y Sokal (Sneath & Sokal, 1973). La taxonomía numérica se relaciona principalmente con las relaciones fenóticas. Para revelar la estructura taxonómica se

realiza un análisis de agrupación, el resultado es un dendograma (o más precisamente un fenograma, porque expresa relaciones fenotípicas). La idea de taxonomía numérica surge por la necesidad de darle igual valor a los caracteres, aunque realmente, no todos los caracteres son homólogos. El método de agrupamiento más común es UPGMA (“Unweighted Pair Group Mean Average” o acoplamiento promedio binario contrapesado), el cual se realiza con algoritmos informáticos específicos.

La taxonomía numérica es útil cuando se trabaja con un número de microorganismos elevado, y se quiere conocer la relación existente con respecto a otros microorganismos perfectamente conocidos y pertenecientes a cultivos tipo de diferentes asignaciones taxonómicas.

1.3. TAXONOMÍA MOLECULAR

Las técnicas genéticas han evolucionado exponencialmente, ya que trabajan sobre un material resistente, invariable, de fácil manipulación y en el que reside toda la información codificada para el desarrollo de un ser vivo. Cada día es mayor el número de secuencias completas y su consecuente análisis funcional. Esto ha hecho que el entendimiento de la clasificación y la evolución de los microorganismos vayan incrementándose, y en consecuencia, dándose la oportunidad de evaluar las relaciones taxonómicas hasta ahora establecidas (Zhi, et al., 2012).

1.3.1. Composición de bases del DNA

El análisis de los ácidos nucleicos se ha integrado en determinaciones de taxonomía clásica. La composición de Guanina más Citosina (porcentaje de G+C) es un parámetro muy útil para comparar la proporción de bases del DNA entre los

distintos grupos de microorganismos. En los procariotas pueden encontrarse proporciones de G+C entre el 20% y 80%, siendo una de sus propiedades más importantes. Este margen es mucho mayor que en los eucariotas, lo cual pone de manifiesto la enorme diversidad evolutiva de este grupo particular de seres vivos, sugiriendo asimismo, su antigüedad en la escala evolutiva.

No obstante, es importante mantener presente que dos microorganismos con porcentajes de G+C similares no necesariamente deben de estar relacionados, ya que es posible tener secuencias genómicas diferentes pero una misma composición global de bases de DNA. Así, las diferencias sustanciales en la composición de las bases del DNA de dos organismos tampoco son el reflejo de un número elevado de diferencias individuales en las respectivas secuencias de bases de sus DNA. Teniendo presente los dos anteriores aspectos, podemos afirmar que si dos microorganismos tienen una gran semejanza en la composición de bases de DNA solo podrá tomarse como indicador firme de afinidad genética y evolutiva, cuando además de compartir un gran número de propiedades fenotípicas, se acompañe de una casi idéntica composición de bases del DNA. Lo cual aportaría una base firme para apoyar la semejanza genética y evolutiva.

Se han descrito varios métodos para la determinación del porcentaje de G+C:

- Desnaturalización térmica (Gerhardt & et al., 1981, Marmur & Doty, 1962).
- Centrifugación en gradiente de densidad (Mandel, et al., 1968).
- Cromatografía de alta precisión (HPLC) (Mesbah, et al., 1989)

1.3.2. Hibridación de ácidos nucleicos

La hibridación genómica permite esclarecer las relaciones a nivel de especie o incluso por debajo de esta categoría. La secuencia genómica de DNA es crítica, ya que si dos microorganismos tienen muchos genes idénticos o parecidos, muchas de

sus secuencias de DNA serán similares. El comité de taxonomía bacteriana (“Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics”) ha establecido los criterios para definir la relación de DNA a nivel de especies, en valores iguales o superiores al 70% en técnicas de hibridación DNA-DNA o en la diferencia menor a 5°C en los resultados de temperatura de desnaturalización en homo y heteroduplex (Tindall, et al., 2010, Wayne, et al., 1987). La hibridación genómica es útil para el estudio taxonómico de microorganismos estrechamente relacionados, pero no es útil para determinar relaciones en rangos taxonómicos superiores. Además la hibridación DNA-DNA no revela la historia filogenética de un organismo. Para ello es necesario conocer la secuencia molecular específica general.

Así pues, mediante la aplicación de esta técnica se determina el nivel de similitud a nivel de especie entre dos cepas bacterianas, de ahí su gran importancia dentro de las técnicas de identificación bacteriana (Stackebrandt & Goebel, 1994).

1.3.3. Cronómetros evolutivos

Las distancias evolutivas entre dos organismos pueden determinarse por las diferencias en las secuencias de aminoácidos o nucleótidos de macromoléculas homólogas a ellos. Esto se debe a que el número de diferencias en la secuencia de una macromolécula es proporcional al número de mutaciones estables fijados en el DNA que codifica esa molécula en ambos organismos. La evolución se produce a medida que esas mutaciones queden fijadas en las diferentes poblaciones, siendo la biodiversidad el resultado final, de forma que la secuencia de macromoléculas puede ser cambiada en numerosas vías sin alterar su función. Esto ha conducido al concepto de “hora evolutiva” y al uso de las secuencias moleculares como cronómetros (Zuckerka & Pauling, 1965). La evolución ocurre al nivel de genotipo y fenotipo. Los cambios en la secuencia de DNA ocurren más o menos de forma continua sobre una escala de tiempo evolutiva y se mantienen constantes a lo largo del tiempo. Sin embargo, destacar que los cronómetros evolutivos no siempre son muy precisos. La

mayoría de estos cambios son pérdidas o selecciones neutras y por lo tanto no alteran el fenotipo (Kimura, 1979, Nei, et al., 2010), donde los cambios a nivel fenotípico son relativamente raros y esporádicos.

El RNA ribosómico (RNAr) se ha convertido en una excelente molécula para discernir las relaciones filogenéticas entre los seres vivos. Se trata de moléculas antiguas, funcionalmente constantes, distribuidas universalmente y relativamente bien conservadas a través de un largo trayecto filogenético. Considerando el elevado número de secuencias genéticas diferentes, en moléculas de gran tamaño como el RNAr, la semejanza entre dos especies indica siempre algún tipo de relación filogenética. El análisis comparativo de secuencias permite determinar la genealogía y, en última instancia, construir el árbol filogenético que muestra la verdadera posición evolutiva de los organismos.

Los genes de RNAr bacteriano de gran tamaño son el 16S y el 23S (aproximadamente 1500 y 2900 nucleótidos, respectivamente), las cuales contienen varias regiones con secuencias muy bien conservadas (Figura 2). Estas regiones son útiles para conseguir el alineamiento de secuencias adecuado, pero al mismo tiempo presenta la suficiente variabilidad en otras regiones, mostrando la posición evolutiva más probable existente entre los organismos, por lo que sirve como excelentes cronómetros filogenéticos. Dado que la molécula 16S rRNA es más manejable experimentalmente, es la molécula de elección en procariotas para desarrollar la filogenia.

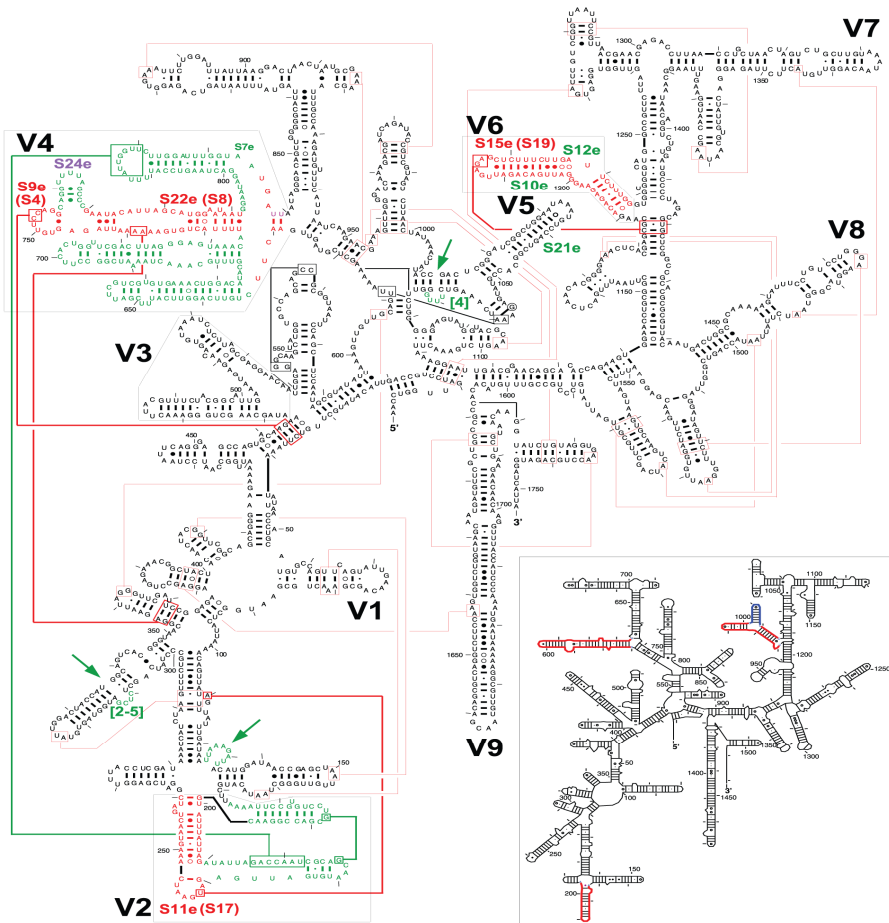


Fig.2. Estructura primaria y secundaria del RNA ribosómico 16S. Se encuentran señalizadas las regiones variables de la secuencia (V1-V9).

1.3.4. Catálogos de oligonucleótidos

Hasta hace unos años atrás no fue posible determinar la secuencia completa de RNAr. Los primeros catálogos de secuenciación correspondían a cortas secuencias de oligonucleótidos de 20 o más pares de bases, producidos por digestión de RNAr 16S con ribonucleasa T1 (que actúa en los residuos de G) (Fox, et al., 1977).

Una colección de estos fragmentos constituía los catálogos de oligonucleótidos de RNA ribosómico (RNAr). Permitiendo la agrupación filogenética y la identificación a distintos niveles taxonómicos, incluyendo a los superiores, por comparación entre estos catálogos (Fox, et al., 1977, Fox, et al., 1980, Wu, et al., 2011).

Los datos de los catálogos de oligonucleótidos se analizaban en términos de coeficiente de asociación binaria, también llamados valores de SAB (Fox, et al., 1977), siendo útiles para definir la mayoría de los filo o filos bacterianos, pero no resuelven el orden de las ramificaciones entre ellos o sus divisiones. El análisis de secuencias completas de RNAr 16S ha remplazado a los catálogos de oligonucleótidos, incrementando el valor del RNAr como cronómetro molecular (Dighe, et al., 2004).

1.3.5. Método de secuenciación

El RNAr puede analizarse secuenciando directamente sobre extractos crudos de células utilizando la transcriptasa inversa y el método de la secuenciación de los didesoxinucleótidos (Sanger, et al., 1977). Actualmente es más utilizada la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que amplifica los genes del RNAr como moldes de la PCR, con cebadores obtenidos sintéticamente, complementarios de la secuencia conservada en el RNAr. La PCR es un método altamente sensible y requiere de la utilización de dos oligonucleótidos (cebadores) complementarios para el flanqueo de las regiones de DNA que se quieren amplificar.

La secuencia de 16S RNAr es polinucleotídica de aproximadamente 1500 bases y funciona como parte de la subunidad pequeña del ribosoma de procariontes. La secuencia que se extrae proporciona información evolutiva (el equivalente en eucariotas es el RNAr 18S). La secuencia de firma son oligonucleótidos cortos de secuencia definida en los RNAr 16S ó 18S, característicos de organismos concretos o

de grupos de organismos relacionados filogenéticamente (Anand, et al., 1994, Shivanand & Mugeraya, 2011).

1.3.6. Árboles filogenéticos

Un método para la construcción de árboles filogenéticos desde las secuencias de RNAr es el método basado en una matriz de distancias (Tajima & Takezaki, 1994). Para ello, se alinean dos secuencias de RNAr y se calcula una distancia evolutiva (ED) registrando en un ordenador el número de posiciones en la secuencia en la que ambas difieren. Se introduce un factor de corrección estadístico, para compensar la posibilidad de que a través de los diferentes cambios que pueden haberse producido, se obtenga de nuevo la secuencia original. La matriz de distancias evolutivas generada a partir de la comparación de secuencias se analiza posteriormente mediante un programa informático diseñado para producir árboles filogenéticos a partir de la medida de ED. Este programa examina todas las posibilidades de ramificación para el conjunto de distancias comparadas. La ED que separa dos organismos es directamente proporcional a la longitud total de las ramas que los separan. Se pueden obtener distintos tipos de formatos de árboles filogenéticos dependiendo del algoritmo y del número de organismos a analizar. Los árboles en forma de abanico son los más útiles para examinar un bajo número de grupos taxonómicos. Cuando se trabaja con grandes grupos de organismos se utilizan los dendogramas, que producen árboles muy ramificados con más dicotomías (Takahashi & Nei, 2000, Woese, 1987).

1.3.7. Secuencia señal

Las secuencias señal son oligonucleótidos cortos característicos de un determinado grupo o grupos de organismos. Se han identificado secuencias señal de oligonucleótidos que definen cada uno de los tres Dominios primarios (Woese,

1987). También se han detectado otras secuencias señal que definen los taxones principales dentro de cada dominio (Benlloch, et al., 1996, Vardhan, et al., 2011). Las secuencias señal se encuentra generalmente en regiones definidas de la molécula de rRNA 16S, y se detecta por el alineamiento de dos secuencias. Son muy útiles para situar microorganismos desconocidos en el grupo filogenético que les corresponde.

1.4. DOMINIOS TAXONÓMICOS

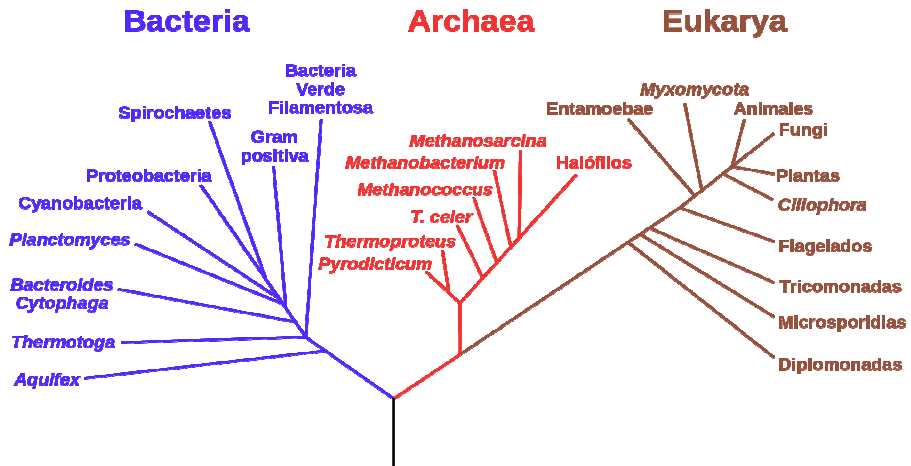


Fig. 3. Árbol de la vida basado en la secuenciación del gen 16s rRNA y distribución de alguno de los microorganismos. (Madigan, et al., 2003)

Basándonos en la pequeña subunidad de 16S RNAr, en base a la cual se crean los arboles filogenéticos de la vida, se observa un árbol con los 3 dominios diferenciados (Figura 3) con un ancestro común en el centro (Barton, et al., 2007, Madigan, et al., 2003).

Tabla 1. Rasgos seleccionados de los tres dominios de la vida.

CARACTERÍSTICAS	BACTERIAS	ARQUEAS	EUKARYA
Tipos de enlaces lipídicos	Ester	Éter	Ester
Estructura fosfatídico de los lípidos	Glicerol-3-fosfato	Glicerol-1-fosfato	Glicerol-3-fosfato
Metabolismo	Bacteriano	Semejante a Bacterias	Eucariótico
Núcleo de Transcripción	Bacteriano	Semejante a Eucariotas	Eucariótico
Factores de elongación	Bacteriano	Semejante a Eucariotas	Eucariótico
Núcleo	No	No	Sí

Orgánulos	No	No	Sí
Metanogénesis	No	Sí	No
Patógenos	Sí	No	Sí

La tabla representa las características generales que se dan en la mayoría de los organismos de cada dominio.

Pero la relación existente entre los tres dominios de la vida no solo se manifiesta a nivel filogenético, sino que los rasgos generales a nivel fenotípico respaldan la relación de los dominios y la posible existencia de un ancestro común (Tabla 1).

1.4.1. Bacterias

Hasta el momento se han descrito 30 filos, algunos de las cuales se muestran en la Figura 3. Como pincelada general de este dominio, cabe destacar que los orgánulos del dominio Eukarya se originaron a partir de las bacterias y su capacidad endosimbionte (Guy & Ettema, 2011). Las mitocondrias surgieron de un grupo importante denominado *Proteobacteria*, y concretamente de *Agrobacterium*, *Rhizobium* y *Rickettsias*. Mientras que los cloroplastos procedían del filo *Cyanobacteria*, ya que este lleva acabo la fotosíntesis oxigénica (Brock, 1969).

Centrándonos en las bacterias halófilas cultivables, cuyas capacidad de crecimiento y desarrollo en concentraciones salinas varía entre 15-180 g/l y se desarrollan por lo general metabolismos de desnitrificación o de fermentación (Oren, 2011b), debemos de destacar su presencia en distintos filos: *Firmicutes*, *Proteobacteria* (*Gammproteobacteria*), *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* y *Bacteroidetes* (Oren, 2008b). Destacando como representantes mayoritarios los dos primeros. La mayoría son organismos de vida libre, pero también existen posibles patógenos del hombre y de otros animales, endosimbiontes de distintos organismos y formas que viven íntimamente asociadas a las plantas que habitan los

suelos salinos (*Salicornia*) (Gontia, et al., 2011). En los medios acuáticos se han aislado, de forma fundamental, especies pertenecientes a los filos: *Cyanobacteria*, *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*, así como miembros de la clase *Clostridia* en sus sedimentos. Así, *Salinobacter ruber*, especie perteneciente a *Bacteroidetes*, define la composición de prácticamente todos los lagos salados. Dentro de estos filos existen grupos taxonómicos que incluyen un elevado número especies halófilas, como es el caso de la familia *Halomonadaceae*, la cual está constituida unas 70 especies, o del orden *Halanaerobiales*. Por el contrario también existen especies que constituyen casos aislados dentro de un orden u otro taxón de menor rango. Merece la pena señalar que algunos de estos taxones fueron creados exclusivamente para alojar bacterias halófilas y que otros, sin embargo, encierran tanto especies halófilas como no halófilas (Oren, 2011a).

Las bacterias fotosintéticas, aunque aparentemente son menos abundantes que las quimiotrofas, están presentes en los medios acuáticos hasta una salinidad del 20 - 25 % (p/v). Entre ellas se han aislado representantes del filo *Cyanobacteria* y anoxifotobacterias de las clases *Gammaproteobacteria* y *Alfaproteobacteria*. Las bacterias quimiotrofas halófilas abarcan *Proteobacterias* (clases *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* y *Epsilonproteobacteria*) con una gran diversidad de tipos morfológicos, fisiológicos y metabólicos.

En resumen, los filos *Proteobacteria* y *Firmicutes* son los que abarcan mayor número de bacterias halófilas. Por su parte *Proteobacteria* presenta 33 géneros halófilos, localizados en la clase de α -*proteobacteria*. Mientras, *Firmicutes* abarca 25 géneros halófilos en la clase *Bacillis*, y 10 géneros en *Clostridia* (www.bacterio.cict.fr) (Parte, 2013).

1.4.2. Arqueas

Las arqueas componen uno de los tres dominios de la vida existentes desde hace varios billones de años, que desde 1970 fueron formalmente propuestas como un dominio propio (Woese, et al., 1990). En base a los análisis filogenéticos se proponen varias divisiones: *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Nanoarchaeota*, *Korarchaeota*, *Aigarchaeota* y *Thaumarchaeota* (Figura 4).

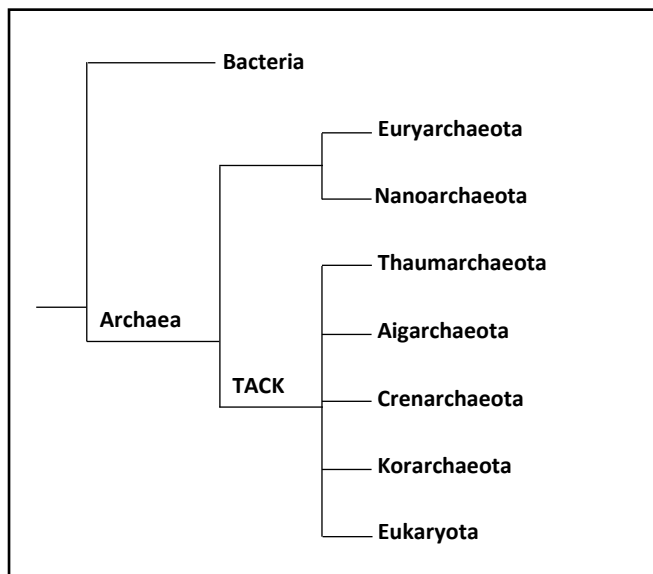


Fig.4. Posible nuevo árbol de la vida.

Cuando nos referimos a arqueas, inmediatamente se las relaciona con estudios evolutivos que las proponen como probable origen de la vida. Woese (Woese, et al., 1990) propuso la existencia de una rama ancestral común que compartía el dominio Arquea y Eukarya. Sin embargo, esto ha sido muy discutido en estudios que definían estas relaciones a nivel de genes o bien de orgánulos citoplasmáticos compartidos. Diferentes corrientes de pensamiento de la época (donde una corriente defendía que tanto Arquea como Eukarya, proceden de un

ancestro común; mientras que en otra corriente, se partía de la idea de que las arqueas fusionaron uno o varios componentes bacterianos, generando a las eukaryas (Guy & Ettema, 2011)), compartían la idea de la existencia de un ancestro común con el que poseen semejanzas y divergencias, tanto el dominio de Arquea como el de Eukarya. En resumen y de acuerdo con los últimos filios de arqueas descubiertos, la filogenia de arquea está relacionada con la eucariota de diversos modos dependiendo de los diferentes árboles filogenéticos genómicos. Cruzando estos datos se obtiene un resultado que descarta el árbol de los tres dominios, dando respaldo tanto a la hipótesis del eocito como a la simbiogénesis pre-eucariota, y se deduce la presencia de dos superfilos de arqueas, uno que agrupa a Euryarchaeota con Nanoarchaeota, y otro que agrupa a los demás filios con Eukaryota bajo el acrónimo TACK (Figura 4) (Guy & Ettema, 2011).

Morfológicamente podemos caracterizar a las arqueas por un diámetro comprendido entre 0.1 y 15 μm , mientras que algunos agregados o filamentos celulares llegan a tener una longitud de hasta 200 μm . Presentan diversas formas: esférica, cilíndrica, espiral, lobular, triangular, rectangular, irregular, pleomórfica, etc. Algunas de ellas poseen flagelos y en consecuencia presentan movilidad. Siguiendo el "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (Garrity & Holt, 2001), las arqueas se agrupan principalmente en: metanogénicas (procariontas que producen metano), halófilas extremas (con requerimientos de al menos 10% de cloruro de sodio necesario para su crecimiento), termófilos y psicrófilos (viven a temperaturas muy altas o muy bajas).

Si nos centramos en las arqueas halófilas extremas, grupo con el que se realiza parte de la presente memoria, podemos decir que la palabra halófila es derivada de dos palabras griegas, "halos" y "phylus" que significan respectivamente; "sal" y "relacionado con". En base a esto podemos caracterizarlas principalmente por ser microorganismos extremófilos y que requieren para sobrevivir elevadas concentraciones de sal. Crecen en hábitats salinos, a lo largo del borde de los

océanos y en ciertas aguas continentales, aguas y suelos salinos con marcado carácter alcalino, así como en los estanques de evaporación donde se obtiene la sal. Los miembros de la familia *Halobacteriaceae* se caracterizan por ser quimiotrofos, es decir necesitan de aminoácidos y carbohidratos para crecer, así como una concentración de sales entre 3.5 - 4.5 M de NaCl, siendo este su intervalo óptimo. Además destacar su pigmentación roja característica debida principalmente a los pigmentos carotenoides que presentan (Grant, et al., 2001). Al igual que los microorganismos termoacidófilos, mantienen fuertes gradientes de ciertos iones a través de la membrana celular, y utilizan esos gradientes para transportar ciertas sustancias hacia dentro y fuera de la célula. Según Larsen (Larsen, 1962), los requerimientos de NaCl son altamente específicos y no sustituibles por otras sales. Las arqueas halófilas extremas, permiten la entrada a su citoplasma de elevadísimas concentraciones de iones inorgánicos, aunque no en las mismas proporciones que en el medio extracelular. Intracelularmente predomina el potasio, mientras que en el medio extracelular suele hacerlo el sodio, lo que implica que todas y cada una de sus funciones celulares están adaptadas a funcionar en presencia de una elevada fuerza iónica (Rodríguez-Valera, 1989). Finalmente, destacar la presencia de características propias tales como: presencia de lípidos polares con uniones éter y cadenas isopropanílicas (Corcelli & Lobasso, 2006) y la carencia de una típica pared celular de mureína (Kandler, 1994, Poxton, 1993).

Dentro del dominio Arquea, donde el número de filo es sorprendentemente pequeño en comparación con 12 filo del dominio de las bacterias tal y como recoge en "Bergey's Manual of Systematic bacteriology" (Garrity & Holt, 2001). El filo *Euryarchaeota* contiene las comúnmente denominadas haloarqueas y siendo por excelencia considerada la familia *Halobacteriaceae* como la representante de las halófilas extremas. Esta es la única familia dentro de la *Halobacteriales*, y el único orden en *Halobacteria*. Las especies que actualmente componen los 42 géneros (*Haladaptatus*, *Halalkalicoccus*, *Halarchaeum*, *Haloarchaeobius*, *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halobaculum*, *Halobellus*, *Halobiforma*, *Halococcus*, *Haloferax*,

Halogeometricum, *Halogramum*, *Halolamina*, *Halomarina*, *Halomicrobium*, *Halonotius*, *Halopelagius*, *Halopenitus*, *Halopiger*, *Haloplanus*, *Haloquadratum*, *Halorhabdus*, *Halorientalis*, *Halorubru*, *Halosarcina*, *Halosimplex*, *Halostagnicola*, *Haloterrigena*, *Halovenus*, *Halovivax*, *Natrialba*, *Natrinema*, *Natronoarchaeum*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronolimnobi*, *Natronomonas*, *Natronorubrum* y *Salarchaeum*), crecen óptimamente a 150g/l de sal, y no es posible su existencia sin esta. La mayor parte de ellas se lisan por debajo de 100g/l (www.bacterio.cict.fr) (Parte, 2013). Dentro del filo *Euryarchaeota* hay un número de especies halófilas capaces de crecer en concentraciones próximas a la saturación, las cuales son definidas como metanógenas. Dentro de la clase *Methanomicrobia* se encuentran aquellas arqueas que también son definidas como halófilas y que incluyen especies extremas y moderadas pertenecientes a los géneros *Methanohalobium*, *Methanosalsum* y *Methnaohalophilus*, incluidas en la familia *Methanosarcinaceae*, dentro del orden *Methanosarcinales*. Estas arqueas son anaerobias estrictas y productoras de metano. Además, la especie *Methanocalculus halotolerans*, perteneciente al orden *Methanomicrobiales*, ha sido descrita como una arquea metanógena halotolerante y no ha sido asignada a ninguna familia por lo que hasta el momento, se considera “incertae sedis” dentro de este orden (Andrei, et al., 2012). *Thermaerobacter marianensis*, es otro ejemplo de bacteria marina que también recibe el término “incertae sedis”(Han, et al., 2010).

También existe presencia de halófilos en el filo *Nanoarchaeota*. Mediante estudios metagenómicos en ambientes hipersalinos, se ha puesto de manifiesto la posible existencia de una clase *Nanohaloarchaea*, con la propuesta de dos nuevos candidatos a géneros *Nanosalinarium* y *Nanosalina*, los cuales aparecen ampliamente distribuidos por diferentes ecosistemas del mundo (Andrei, et al., 2012, Narasingarao, et al., 2012).

2. AMBIENTES EXTREMOS

Para que un microorganismo se considere viable en un determinado ambiente, éste debe ser capaz de crecer y mantener su metabolismo. No obstante, existen una serie de factores de tipo físico, geoquímico y biológico que pueden provocar limitaciones en la vida microbiana. Dentro de estos factores limitantes para la vida, tanto por exceso como por defecto, nos encontramos con: el valor de actividad del agua (a_w), la energía, los nutrientes y trazas de elementos, y los factores ambientales (pH, salinidad, temperatura, presión atmosférica, radiaciones...) (Harrison, et al., 2013).

Durante los últimos cuarenta años, las investigaciones han puesto de manifiesto la existencia de vida en ambientes alejados de las condiciones que consideramos “óptimas”. Estos límites físico-químicos que definen a un ambiente como habitable, vienen referido a las condiciones necesarias para la vida humana. Un ejemplo claro de este tipo de microorganismos capaces de sobrevivir a condiciones “límite” son los halófilos, ya que son capaces de soportar e incluso necesitar concentraciones de sal 10 veces mayores a las del agua del mar. En general la definición de ambiente extremo se ha planteado desde dos perspectivas (Brock, 1969, Rothschild & Mancinelli, 2001). No es apropiado definir ambiente extremos desde un punto de vista antropocéntrico, considerando ambiente extremo a todo aquel ambiente que sea hostil al hombre. Más apropiado es definirlo taxonómicamente como aquellos ambientes en los cuales la diversidad de especies es baja y algunos grupos taxonómicos están ausentes. La baja diversidad taxonómica es un factor en común en todos los ambientes extremos. Usualmente se pueden encontrar gradientes donde la diversidad disminuye cuando las condiciones llegan a ser más extremas (Ma, et al., 2010, Rodríguez-Valera, 1988). De manera que el término, ambiente extremo, es complicado de definir, ya que para un determinado grupo de organismos este tipo de hábitat puede ser el ideal, siendo para otros letal. Probablemente no se encuentre una definición totalmente consensuada.

En líneas generales, los microorganismos extremófilos son procariotas, y en función a las condiciones “extremas” en las que son capaces de crecer y desarrollarse, pueden definirse microorganismos del tipo:

- Anhidrobiótico o xerófilo: Viven en ausencia de agua o son capaces de resistir la desecación viviendo con muy poca cantidad. Ejemplo: *Geodermatophilus siccatus* (Montero-Calasanz, et al., 2013)
- Acidófilo: Se desarrollan en ambientes de alta acidez, (pH óptimo de crecimiento próximo a 3), como es el caso de *Acidithiobacillus ferrooxidans* los organismos de la cuenca del Río Tinto, en Huelva (González-Toril, et al., 2009).
- Alcalófilo: Se desarrollan en ambientes muy alcalinos, cuyo pH óptimo de crecimiento está próximo a 9 o incluso superior a este. Un ejemplo es *Anditalea andensis*, bacteria cuyo intervalo de pH para desarrollarse se encuentra entre el 7.5 al 9.2 (Shi, et al., 2012).
- Barófilo o Piezófilo: Se desarrollan en ambientes con presión muy alta, como son lechos oceánicos profundos de hasta once mil metros de profundidad, como *Thermosipho japonicus* (Takai & Horikoshi, 2000).
- Halófilo: Se desarrollan en ambientes hipersalinos, como es el caso de *Halorubrum tebenquichense* (Lizama, et al., 2002).
- Criptoendolitos: Organismo de suelos profundos. Viven a muchos metros bajo el suelo, incluso en el interior de rocas; *Bacillus infernus* fue aislado a 2700 metros bajo la superficie del suelo (Boone, et al., 1995).
- Metalotolerantes: Organismos que habitan con altas concentraciones de metal en su entorno (cobre, cadmio, arsénico, zinc). Por ejemplo *Ralstonia metallidurans* (Goris, et al., 2001).
- Psicrófilos o Psicrotolerantes: Se desarrollan en ambientes de temperatura muy fría, (fosas abisales, glaciares) como *Polaromonas vacuolata* (Irgens, et al., 1996).

- Radiófilo: Soportan gran cantidad de radiación, como la bacteria *Deinococcus sahariense* (Bouraoui, et al., 2012).
- Termófilo: Se desarrollan en ambientes a temperaturas superiores a 45 °C, algunos de ellos, los hipertermófilos, poseen su temperatura óptima de crecimiento por encima de los 80 °C., como *Pyrococcus furiosus*, aislado de chimeneas hidrotermales submarinas de Porto di Levante (Vulcano, Italia) y que crece en un intervalo de temperatura de 70 °C a 103 °C (Fiala & Stetter, 1986).
- Poliextremófilos: Combinan la capacidad de crecer bajo varias condiciones extremas, como es el caso de *Halorhodospira halochloris*, quien necesita de un pH de 8.5 y una temperatura de 45 °C para desarrollarse (Bowers, et al., 2009). En la actualidad están siendo muy atractivos por las posibilidades de aplicación biotecnológica.

Los ambientes extremos, son de especial interés para microbiólogos, debido a las condiciones que presentan con un bajo grado de biodiversidad, pero dónde densidad de la comunidad microbiana es bastante elevada en torno a 10^7 - 10^8 células/mL. Esto es el resultado de la falta de depredadores y el alto nivel de nutrientes. Sin mencionar la alta especialización de los microorganismos adaptados. En estas condiciones los microorganismos con estructuras más simples pueden crecer en condiciones extremas antes que organismos más complejos, lo cual explica el predominio de los microorganismos en estos ambientes.

Existen cuatro vías por las cuales un microorganismo puede adaptarse a un medio extremo: desarrollar un mecanismo para excluir un factor, desarrollarlo para desviar el factor, vivir con él o depender de él. Esta última vía supone una adaptación, ya que el organismo llega a depender de un factor que para otros organismos es letal. Los organismos llamados extremófilos, no solo toleran sino que prefieren y requieren condiciones extremas para su desarrollo. Cada organismo

tiene sus condiciones ambientales óptimas, máximas y mínimas para la vida. Cuando el rango de crecimiento natural de un organismo se da en un ambiente que difiere de las condiciones preferidas por la mayoría, el organismo llega a ser extremófilo. La mayoría de ellos están confinados en ambientes extremos, porque su proceso de adaptación va usualmente acompañado por la pérdida de la capacidad para crecer en condiciones normales.

A través de la historia de la evolución de la tierra, las condiciones predominantes han cambiado, de modo que lo que ahora consideramos como extremo podría haber sido lo normal en épocas pasadas, y los organismos que evolucionaron podrían prosperar utilizando hábitats de condiciones primitivas que permanecen en el planeta. Se ha postulado que un grupo de extremófilos, las arqueas (Woese, 1987), corresponderían a este tipo. Todas las arqueas habitan en ambientes que pueden ser considerados como extremos, en unos u otros aspectos. Pero no solo los extremófilos están siendo usados para definir el inicio de la vida en la tierra, sino también la vida extraterrestre (Squyres & Knoll, 2005). El concepto de vida en planetas diferentes a la tierra, como pudiera ser Marte, está siendo cada vez más perfilado, ya que en el planeta tierra disponemos de prototipos extrapolables. El estrés oxidativo, altas dosis de radiación, la temperatura baja y la presión son condiciones que se encuentran en la superficie de Marte. Así pues, los microorganismos extremófilos abrieron la ventana a posibilidades para considerar el desarrollo de la vida en el universo, y como consecuencia en Marte (Fendrihan, et al., 2012). Resultados notificados recientemente en ambientes extremos indican la posibilidad de presencia de microorganismos en micronichos mediante la propiedad de atraer la humedad del aire y disolver lentamente las sales presentes en depósitos. La recopilación de los datos producidos por las misiones en curso: Mars Global Surveyor, Mars Odyssey, Mars Express y Mars Exploration Rover Opportunity; muestran una visión completamente diferente a la ofrecida por la misión Viking (Gómez, et al., 2012). El descubrimiento de acumulaciones importantes de sulfatos,

y la existencia de minerales de hierro en las rocas de origen sedimentario han permitido tomar modelos terrestres específicos para poder extrapolar conclusiones.

Rio Tinto (suroeste España, Faja Pirítica Ibérica) es un ambiente ácido extremo, producto de la actividad quimiolitotrófica de microorganismos que prosperan en los enormes depósitos de pirita. La alta concentración de hierro férrico y sulfatos, productos del metabolismo de la pirita, genera una colección de minerales, los cuales han sido detectados en diferentes regiones de Marte. Actualmente en España se están haciendo numerosos estudios en Rio Tinto, ya que este podría asemejar su ambiente al que en un pasado se hubiera podido desarrollar en Marte (Gómez, et al., 2012).

2.1. AMBIENTES HIPERSALINOS

Los ambientes hipersalinos son zonas inhóspitas para una gran variedad de microorganismos, lo cual provoca que aquellos que son capaces de desarrollarse en tales condiciones generen grandes comunidades. Estos factores hacen que la mayor parte de las agrupaciones de microorganismos halófilos desarrollen diversos colores por producción de carotenoides u otro tipo de pigmentos, provocando que las salinas, cristalizadores, lagos salado o cualquier zona con concentraciones salinas cercanas a la saturación posean unos colores característicos: rojos, rosas, anaranjados, etc. (Figura 5).

Los ambientes hipersalinos están distribuidos ampliamente por todo el globo terráqueo, bien en forma de sistemas acuáticos, como pueden ser los lagos salados, o bien en suelos salinos (De la Haba, et al., 2011, Oren, 2011a).

Hablando en términos de concentraciones salinas, generalmente referida al NaCl, se definen como ambientes salinos extremos aquellos cuya concentración de



Fig.5. Lago Retba (Senegal), lago Rosa se encuentra al norte de la península senegalesa de Cabo Verde, al noreste del país africano.

sales es superior al 3'5% (p/v). No obstante, el límite requerido para la aplicación del término hipersalino varía según los autores y normalmente se aplica desde el 3 al 12% de salinidad (Por, 1980, Post, et al., 1983). No obstante, cabe destacar que el término salino también se refiere a concentraciones de sales menores que las descritas anteriormente.



Fig.6. Explotaciones humanas. Salineras de Maras, situadas en la cordillera Andina, en el Valle Sagrada de los Incas.

Los **ambientes salinos acuáticos** presentan más del 0'3% de salinidad (Dedecker, 1983), y muchos de ellos se originan por la precipitación y disolución de sales ocurridas tras la evaporación del agua, de forma natural. Los ambientes acuáticos hipersalinos pueden dividirse en dos grandes grupos en función de quien los surta:

- ✓ Los ambientes talasohalinos son aquellos que se alimentan por agua procedente del mar, donde la composición iónica de sus salinas refleja la similitud con el mar. Un ejemplo de ambiente salino acuático es el Gran Lago Salado (Zafrilla, et al., 2010). Cuando el agua del mar se evapora en las salinas solares naturales o en las creadas por el hombre (Figura 6), existe una progresiva precipitación de CaCO_3 y Ca_2SO_4 hasta obtener saturación de NaCl , que se traduce concentraciones salinas de 300g/L y costras de sal (Halitas). Físicoquímicamente se describe una predominancia de aniones del tipo de Cl^- y el SO_4^{2-} , mientras que los cationes mayoritarios son el Na^+ y el Mg^{2+} (Pipkin, et al., 1977). El pH de las salinas de este grupo rondan los valores de 7 a 8 (Oren, 2011b). Las salinas solares costeras hechas por el hombre son construidas para la producción de sal por medio de la evaporación de agua marina. Éstas constan de una serie de pozas en las cuales la salinidad, que se encuentra íntimamente relacionado con la influencia de la temperatura, se va incrementando gradualmente hasta obtener halitas en los últimos cristalizadores. La salinidad de cada cristalizador se mantiene constante, de manera que presentan micro-ecosistemas en base al gradiente salino, desde concentraciones salinas del agua del mar (35g/l) hasta la saturación (>300g/l) (Javor, 1989, Oren, 2002).

✓ Otras aguas hipersalinas atalasoalinas o atalasoalinas derivan de la dilución de sales de origen continental, y se caracterizan por tener una gran variación iónica diferente al agua de mar, como es el caso del Salar de Atacama (Demergasso, et al., 2004). La concentración iónica (concentración salina del

orden de 347g/l) está mayoritariamente representada por iones divalentes de Magnesio (próximos a 2 M) y de Calcio (0.47M), en lugar de Sodio (1.54M)(Oren, 2011b). Los aniones principales son el Cl⁻ y el Br⁻, habiendo una mínima cantidad de sulfatos. El incremento de la concentración salina, se encuentra relacionado con las temperaturas y la pluviosidad, y es la diferencia principal entre ambientes talasohalinos y atalasohalinos. En cuanto a la densidad de las comunidades microbianas tienen grandes fluctuaciones estacionales, ya que las intensas lluvias del invierno causan una dilución de dichas lagunas o salinas de interior, haciendo que las comunidades halófilas extremas se vean mermadas en densidad durante estos periodos de tiempo (Oren, 2011b). El pH de este tipo de salinas es muy variable ya que nos encontramos con valores de 6, como en el caso del Mar Muerto, o de 9.7-10 en el Lago Mono de California (Oren, 2011b). En este tipo de salina de interior, también se ha visto la obra del hombre, aprovechando los manantiales y aguas subterráneas salinas para crear explotaciones salineras, como es el caso de La Malahá, en Granada (Pérez-Davó, et al., 2014, In review).

La escasa diversidad en cuanto a especies que integran estos hábitats es significativa, probablemente por la práctica ausencia de eucariotas. En este sentido la microbiota de estos ambientes suele estar en mayor densidad, localizándose entre 10⁷ y 10⁸ UFC/mL. (Oren, 2011b). Según estudios realizados en salinas de estanques múltiples (Oren, 2011a), por encima del 15% (p/v) de sales totales los microorganismos hallados son halófilos o están especialmente adaptados a ambientes hipersalinos; a partir del 25% (p/v) de concentración salina crecen especialmente los cocos Gram-positivos y eubacterias fototrofas; asimismo, y hasta un 30% de sales, la presencia de *Dunaliella*, un alga halófila, en estas salinas es notable, disminuyendo drásticamente a partir de ese valor junto a la microbiota citada. A partir de dicha salinidad, los microorganismos aislados son halófilos extremos, resultando de forma paralela, un descenso en cuanto a diversidad de géneros y especies. Este descenso puede venir acentuado, por la particularidad de

algunas arqueas halófilas de la familia de las *Halobacteriaceae* capaces de excretar halocinas, que actúan inhibiendo el crecimiento de otros miembros de la misma familia (Oren, 2011b).

Los **suelos salinos** (Figura 7) son otro tipo de ambientes hipersalinos poco estudiados a pesar de su amplia distribución. Éstos se definen como aquellos que contienen principalmente sales neutras de cloruros y sulfatos de sodio en cantidades excesivas que interfieren en el desarrollo de organismos vivos. De esta manera se pueden considerar como suelo salino aquellos que presentan más del 0'2% de sales solubles (Kaurichev, 1980), este tipo de ambientes está ampliamente distribuido a nivel mundial, aunque es más frecuente en regiones áridas, como por ejemplo el desierto de Atacama, Chile (Lizama, et al., 2001). Las altas temperaturas, frecuentes en estos ambientes, aumentan la velocidad de evaporación del agua, formando costras de sal encima de la superficie del suelo o cristales de sal los cuales pueden encontrarse en las capas superiores mezclados con los constituyentes minerales del suelo. En estas superficies hay una alta concentración de sales solubles neutras, que interfieren con la actividad microbiana y con la fertilidad del suelo (Sarig, et al., 1993) y también con el crecimiento de la mayoría de las plantas.



Fig.7. Parque Nacional Etosha, Namibia (África).

Los suelos salinos se describen en base a factores tales como pH, conductividad eléctrica, clase y calidad de cationes presentes, entre otros (Cervantes & Olivares, 1976, Oren, 2011b). Se localizan principalmente en zonas de clima árido o semiárido. En condiciones húmedas, las sales solubles originalmente presentes en los materiales del suelo, son llevadas a las capas inferiores, hacia el agua subterránea y finalmente transportada a los océanos. En consecuencia los suelos salinos no existen en zonas húmedas, exceptuando aquellos casos en los que el suelo ha estado expuesto al agua del mar en los deltas de los ríos u otras tierras bajas cercanas al mar. En las regiones áridas, las sales solubles no pueden ser transportadas muy lejos. Esto ocurre no solamente porque hay menos precipitación adecuada para lavar y transportar las sales, sino también a consecuencia de la elevada evaporación característica del clima árido, que tiende a concentrar las sales en los suelos y aguas superficiales.

El drenaje restringido es un factor que generalmente contribuye a la salinización de los suelos y que frecuentemente puede llevar consigo la presencia de una capa freática poco profunda o con una permeabilidad del suelo. La capa freática poco profunda puede guardar casi siempre estrecha relación con la topografía del terreno. Bajo condiciones de pocas precipitaciones y elevada evaporación, así como el ascenso del agua subterránea, se da origen a la formación de suelos hipersalinos (Allison, 1994, Yadav, et al., 2012).

2.2. HALOFILISMO

A lo largo de los últimos años muchos autores han intentado clasificar a los microorganismos que se encuentran en ambientes hipersalinos. Globalmente, y en función de la salinidad, podemos diferenciar entre microorganismos tolerantes a la sal o dependientes de ella. Con el término halófilo, definimos aquellos microorganismos que no sólo toleran las concentraciones salinas sino que además

son necesarias para su desarrollo óptimo (Oren, 2008b). En función de los requerimientos del microorganismo (Delgado-García, et al., 2012, Kushner & Kamekura, 1988) estos se agrupan en:

- Halófilos extremos: muestran crecimiento en medios con 3'5 - 5 M de NaCl. En este grupo se incluyen a la mayoría de las arqueas halófilas extremas y haloarqueas.
- Halófilas moderadas: crecen óptimamente en medios con 0.5 - 3.5 M. En esta categoría se incluyen a la mayoría de las bacterias halófilas.
- Halófilas débiles: se desarrollan en medios con 0.3 - 0.5M de ClNa, también llamadas bacterias marinas.
- Halotolerantes: crecen en medios hasta con un valor de 0.3M de ClNa. No obstante, algunos de ellos pueden tolerar altas concentraciones de sal.

Los microorganismos halófilos han sido encontrados en distintos ecosistemas hipersalinos repartidos por distintas áreas geográficas del mundo. Como hemos citado anteriormente, la composición de estos ambientes puede variar significativamente. A pesar de esto, lo único que no difiere es la concentración de ClNa, ya que es la sal predominante. Estos microorganismos pueden encontrarse también en ambientes de bajas o altas temperaturas, alcalófilos o acidófilos, etc. Generando un grupo particular, denominado poliextremófilos (Harrison, et al., 2013). También hay que destacar que el margen de salinidad y el óptimo en el cual es capaz de crecer un microorganismo depende de las condiciones y la composición del cultivo, y está depende a su vez de variables tales como la temperatura y/o la fuente de energía utilizada (Oren, 2008b, Vreeland & Martin, 1980). Determinadas bacterias halófilas moderadas, tales como *Salinivibrio costicola* y *Halomonas halophila* por ejemplo varían sus requerimientos salinos según la composición del medio de cultivo y/o la temperatura de crecimiento (Forsyth & Kushner, 1970).

Desde el punto de vista ecológico, los microorganismos halófilos no solo se encuentran ampliamente distribuidos en hábitats naturales anteriormente comentado, tales como salinas solares, lagos hipersalinos, suelos salinos, agua de mar, fuentes termales altamente mineralizadas; sino también en monumentos arqueológicos, obras de arte, en pinturas de cuevas prehistóricas, provocando el deterioro en templos griegos, monumentos romanos, castillos medievales, etc. Estos microorganismos no solo los localizamos en el medio ambiente, sino también en los alimentos que ingerimos, como salsas de pescado (Namwong, et al., 2011), en órganos de plantas y animales (Oren, 2011b).

En estos medios hipersalinos los dos grupos predominantes son: los halófilos extremos y los moderados, debido a una mayor competencia por parte de estos microorganismos entre sí. Existen dos estrategias diferentes por parte de los microorganismos halófilos extremos y moderados: los primeros se encuentran mejor adaptados para crecer a concentraciones saturadas de sal, en medios en los que, puesto que no tienen competencia por parte de otros grupos microbianos, pueden crecer lentamente, mientras que las bacterias halófilas moderadas predominan en medios con salinidad comprendida entre el 10 y el 20%. No obstante, existe un espectro salino en el que ambos grupos fisiológicos son capaces de crecer (Rodríguez-Valera, 1988).

Taxonómicamente constituyen un grupo bastante heterogéneo, ya que hallamos representantes de los tres dominios de la vida: Arquea, Bacteria y Eukarya, y donde encontramos miembros capaces de crecer a concentraciones superiores a la saturación. Estos microorganismos pueden definirse tanto como aeróbicos como anaeróbicos, heterótrofos, fototróficos, quimioautótrofos o capaces de transformar una gran variedad de sustratos. Incluso se debería de subrayar la importancia creciente de los virus de microorganismos halófilos como parte significativa de los ecosistemas salinos (Roine & Oksanen, 2011).

Estos microorganismos deben de desarrollar una serie de mecanismos para protegerse a la exposición a altas salinidades. Uno de estos mecanismos es la acumulación de solutos compatibles en citoplasma, los cuales actúan a modo de estabilizadores de varias de sus estructuras haciendo posible que resistan no solo a la elevada salinidad, sino también a altas temperaturas y pH extremos. Estos solutos compatibles suponen una gran variedad de ventajas en un medio donde la concentración de nutrientes es escasa. La lista de solutos identificados es bastante larga, en donde algunos de ellos son producidos por prácticamente todos los componentes de los tres dominios de la vida, mientras otros son de exclusiva producción por determinados grupos de halófilos. Sin embargo, la obtención de estos productos es altamente costosa, por lo que el microorganismo ha optimizado su metabolismo de modo que el gasto por la supervivencia en ambientes hipersalinos sea el mínimo posible. Aquí radica principalmente las diferencias de metabolismo entre los distintos procariotas, es decir, deben de realizar un balance entre la energía capaz de producir la célula y la necesaria para producir solutos compatibles (Eichler, 2001, Oren, 2008a). Otras adaptaciones están basadas en la acumulación de iones inorgánicos en su citoplasma, tales como el Na^+ , Cl^- y K^+ , lo cual permite mantener el equilibrio cuando el medio posee una saturación de ClNa , previniendo el choque osmótico (Kunte, et al., 2002). Por otro lado se han observado adaptaciones a nivel de aminoácidos, que se encuentren mayoritarios en sus proteínas y enzimas. Esta adaptación a nivel molecular, estando elevados sus aminoácidos ácidos y en bajas cantidades los hidrofóbicos, permiten mantener su actividad en concentraciones salinas elevadas, a pH alcalinos y a altas temperaturas (Delgado-García, et al., 2012).

2.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE ZONAS HIPERSALINAS

Los ecosistemas hipersalinos muestran una gran variabilidad en las concentraciones de sales totales, composición iónica y pH. En el Gran Lago Salado, la concentración de Cl^- y Na^+ es del 10'5% y 18'2% respectivamente. En el Mar Muerto el ión Cl^- es el dominante con un 22'5%, con concentraciones equivalentes de Na^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} cercanos al 4%, 4'4% y 1'3% respectivamente. La ausencia de bajas concentraciones de Mg^{2+} y Ca^{2+} se atribuye principalmente a pH elevados en estos ecosistemas hipersalinos. Los sulfatos, los cuales son importantes aceptores de electrones y están involucrados en la mineralización de la materia orgánica, están presentes en bajas concentraciones en aguas hipersalinas (aproximadamente 0'05% en el Mar Muerto y 0'37% en el Gran Lago Salado), probablemente debido a su precipitación (Ollivier, et al., 1994).

Los suelos hipersalinos se caracterizan por presentar un bajo contenido de materia orgánica (Del Moral, et al., 1988). Se ha sugerido que la concentración de sales no es el único factor que determina las características del suelo salino, sino también el contenido de materia orgánica. El tipo y densidad de vegetación afecta al contenido de materia orgánica en suelos salinos. En la rizosfera de plantas halofíticas, comunes en estos ambientes, se encuentra una gran cantidad de materia orgánica (Quesada, et al., 1982). Por lo tanto la presencia de microorganismos en suelos salinos puede estar afectada por el contenido de materia orgánica. De esta forma cada ambiente está definido por unas características propias que lo hacen diferente, y en consecuencia, la biodiversidad de la zona es también diversa, permitiendo la pluralidad de vida al resto de ambientes salinos.

3. SALINAS ANDALUZAS

3.1. FUENTE DE PIEDRA, MÁLAGA

La Reserva Natural de la Laguna de Fuente de Piedra se localiza al noroeste de la provincia de Málaga (cuyas coordenadas son 37º 06' 49" N; 4º 46' 27" O) en el término municipal de Fuente de Piedra (Figura 8). Se encuentra situada en la denominada Hoya del Navazo, a 410 m de altitud. La cubeta, de morfología elipsoidal algo arriñonada y con su eje mayor en dirección noreste-suroeste, presenta en su interior tierras emergidas, diques y espigones, en su mayoría artificiales.

Se describe como una extensa y somera depresión, de orillas tendidas y fondo plano, y en la que se ha llegado a registrar una profundidad máxima



Fig.8. Cuenca endorreica de Fuente de Piedra.

aproximada de metro y medio, en condiciones de excepcional nivel de inundación. Esta laguna constituye el desagüe natural de una cuenca endorreica de 15.350 hectáreas, siendo este endorreísmo una de las principales características del humedal. A esto se suma su extrema salinidad procedente de la disolución de las sales procedentes del sustrato, ya que su origen se relaciona con fenómenos kársticos en materiales yesíferos y salinos del Trías, nombre que recibe una de las distintas capas del suelos procedentes del periodo Triásico. Así mismo, es primordial su carácter estacional, lo que hace que el nivel de agua, y con ello las comunidades vegetales y animales que presenta la laguna, dependa de las precipitaciones y del resto de condiciones climáticas que se registren en cada año.

Su dinámica hidrológica está asociada a la pluviometría y al funcionamiento superficial, por los arroyos principales de Santillán y Charcón, y por los flujos ascendentes de acuíferos subterráneos de esta cuenca endorreica. El alto contenido en sales y el diferente grado de mineralización de sus aguas a lo largo de su ciclo de inundación están íntimamente relacionados con dicha dinámica, de modo que la salinidad evoluciona siguiendo un patrón de concentración por evaporación típico de las lagunas endorreicas.

La salinidad de las aguas presenta un amplio rango de variación, en función de los mencionados niveles de inundación que se hayan registrado. En su fase de recarga otoñal las aguas de Fuente de Piedra se pueden considerar una salmuera que termina en la formación de una característica costra blanquecina formada por las sales precipitadas por evaporación. La laguna presenta aguas cloruradas sódicas, predominando las composiciones Cl-(SO₄)/Na-(Mg)-(Ca) que, en determinados periodos, pueden llegar a ser Cl/Na-(Mg)-(Ca). Las aguas superficiales de esta laguna, en las que el pH no suele ser inferior a 8, presentan una moderada alcalinidad. En los estudios más recientes, y en condiciones de bajos niveles de inundación del humedal, se han registrado contenidos elevados de amonio, fósforo total y nitrógeno total, si bien las mayores concentraciones de nitrógeno y fósforo son

proporcionados por arroyos afluentes, como es el caso del arroyo Charcón (Consejería de Medio Ambiente, 2013, Piedra, 2013).

En la laguna de Fuente de Piedra podemos encontrar distintas estructuras procedentes de su antigua utilización como salinas industriales. Por ello, el vaso palustre se encuentra circundado por un canal perimetral y su interior existen restos de diques que se utilizaban para canalizar el agua y favorecer la cristalización de la sal. Estas zonas en la actualidad son utilizadas por las distintas comunidades bióticas para su asentamiento. Destacar al Flamenco Rosa (*Phoenicopterus ruber*), que encuentra un anidamiento estacional en Fuente de Piedra.

3.2. LA MALAHÁ, GRANADA

La Malahá es una localidad de Granada con el nombre de ortografía más cambiante en su dilatada historia. Escrito indistintamente como Malá, La Malá, La Malaha o La Malahá, según el mapa que se mire o la carretera por la que se entre al municipio. El nombre de la localidad granadina procede del término árabe al-Mallaha, que significa "alquería de la sal", aunque las salinas son explotadas desde la época del imperio romano y posteriormente por los godos, quienes comenzaron a usarlas por los beneficios de sus aguas termales, extendiendo su fama como balneario durante s. XIX en toda Europa (Figura 9).

Esta localidad posee un lago salino, el cual se encuentra localizado en la comarca del Temple, antes denominada Quempe 37º 6' 15" N; 3º 43' 14" O), circundado por la vega del Genil, la meseta de las Albuñuelas y las Sierras Hacho de Loja, Tejeda y Almiar, cuyas cotas máximas superan los 1.000 m. El Quempe está en el extremo suroeste de la gran depresión de Granada, una cuenca intramontañosa, que mide 60 km de longitud (este-oeste) y 40 km de anchura (norte-sur).



Fig.9. Salina de La Malahá.

A 780 m sobre el nivel del mar y formando una depresión rodeada por una serie de elevaciones constituidas por depósitos de yesos (margas yesíferas), que constituyen el cerro minero de Montevives, se sitúa la explotación humana de la salina de La Malahá. La salinera aprovecha los recursos naturales que proporcionan tres manantiales salobres, dos de ellos subterráneos y un tercero que aflora en la superficie cerca del río, pertenecientes a la cuenca del Guadalquivir. Estos forman una balsa en la que el agua está prácticamente estancada, donde el valor medio de conductividad es de 183 mS/cm y desprende cierto olor a gas sulfhídrico. A través del uso de norias en el pasado, y de un motor en la actualidad, las aguas salobres que alimentan los arroyos y acuíferos de la zona son elevadas hasta los calentadores. Allí se acumula el agua durante los meses de invierno y por decantación los sedimentos se depositan en el fondo, quedando el agua limpia para extraer a partir de ella las sales. Una vez limpia el agua, es trasvasada desde los calentadores hasta los evaporadores o esteros, y allí se calienta por la intensa radiación solar, precipitando en el fondo de los estanques cristales cúbicos de sal que se amontonan y recogen con la ayuda de un dumper o auto-volquete. Las condiciones geográficas de la zona, permiten la explotación de estas aguas, ya que utilizan la energía solar, como ocurre en las salinas marítimas. Y ello es posible porque Granada está situada

en una latitud relativamente baja, haciendo que la estación estival sea sensiblemente cálida, pudiendo establecer temperaturas medias de Julio entre los 26°C y los 28.5°C, alcanzando temperaturas extremas que pueden rebasar los 45°C (Malahá, 2013, Ruiz Jiménez, 2010, S.L., 2013).

3.3. SALINAS DE SANTA MARÍA DE JESÚS, CHICLANA, BAHÍA DE CÁDIZ

Las salinas de Santa M^a de Jesús (Figura 10), con coordenadas 36° 26' 21"N; 6° 9' 60 " O, se definen como talasosalinas, debido a que el agua que alimenta a estas salinas de la Bahía de Cádiz proceden del Océano Atlántico. Enclavado en el Parque Natural Bahía de Cádiz, el Centro de Recursos Ambientales Salinas de Chiclana cuenta con una superficie de aproximadamente 30 hectáreas que encierran numerosos recursos naturales y culturales con un enorme potencial interpretativo y educativo. El centro cuenta con una “salina tradicional” litoral rehabilitada, que



Fig.10. Salinas de Santa M^a de Jesús.

vuelve a recuperar parte de su fisonomía original junto a sus distintos componentes para la regulación del régimen hídrico y la extracción de la sal de manera artesanal. La actividad de extraer sal del agua del mar es sencillo, y comienza cuando en las salinas el agua salada de mar se conduce por una red de canales o acueductos hasta unas plataformas horizontales construidas en el propio terreno. Tales áreas de evaporización del agua marina se denominan granjas, y en ellas el agua se reparte en parcelas rectangulares, llamadas cristalizadores. La profundidad de los cristalizadores suelen oscilar entre los 15 y los 20 centímetros. La evaporación del agua va concentrando la salmuera, por regla general, desde un gradiente de salinidad bajo, que corresponde a la salinidad del agua marina, hasta que la sal precipita en forma de cristales dejándola lista para su posterior recolección y secado, la cual se seca por efecto del sol y del aire.

La Salina de Santa María de Jesús cuenta, además, con dos esteros que reúnen unas condiciones óptimas para el cultivo de peces, un tradicional aprovechamiento acuícola de los esteros de las salinas. La obtención de los alevines se realiza mediante la apertura de las compuertas que permiten a los caños captar agua del océano gracias a la subida de la marea (Chiclana, 2013, Junta de Andalucía, 2013).

4. ARCHAEOAL LIPIDS

In all domains of life, isoprenoids are key molecules exhibiting a variety of functions in the cell membrane. Isoprenoids are included in: steroids (e.g. cholesterol), protecting pigments (e.g. carotenoids), light-responsive co-factors (e.g. retinal), respiratory electron carriers (e.g. quinones), and membrane lipids (Matsumi, et al., 2011).

The biochemistry of Archaea is different from other domains. These peculiar biochemical features do that they can be used as useful markers for taxonomy, mainly the presence of ether lipids seems to be confined to the most ancient microorganisms such as Archaea. Thus, It's easiest and quickest to analysis of core lipids fraction for discriminating between Archaea and Bacteria, also they are giving information about genus or order level of this Archaea. Archaeal lipids are generally composed of a core lipid (archaeol or caldarchaeol) and phosphodiester bonded polar head groups or glycosides that are linked to one of the core lipids.

4.1. STUDY OF ARCHAEOAL CORE LIPIDS

Archaeal membrane lipids are unique, because they contain a saturated isoprenoids chains of different lengths of 15, 20, 25 or 40 carbons atoms with bond of ether (-CH₂OR) to the carbons at the positions 2 and 3 of a molecule of glycerol (Gambacorta, et al., 1995).

In the beginning, archaeal ether lipids were designated with systematic names, to be refer in the laboratory. Thus, Nishihara proposed a nomenclature for these structures. The core lipids obtained after hydrolysis (diether) are called archaeol, whereas structures created since two diether (tetraether) are called caldarchaeol and nonitolcaldarchaeol (Nishihara, et al., 1987). Nonitolcaldarchaeol is

a derivated of caldarchaeol, where a nonitol is replaced by one of the glycerols (Figures 11 and 12).

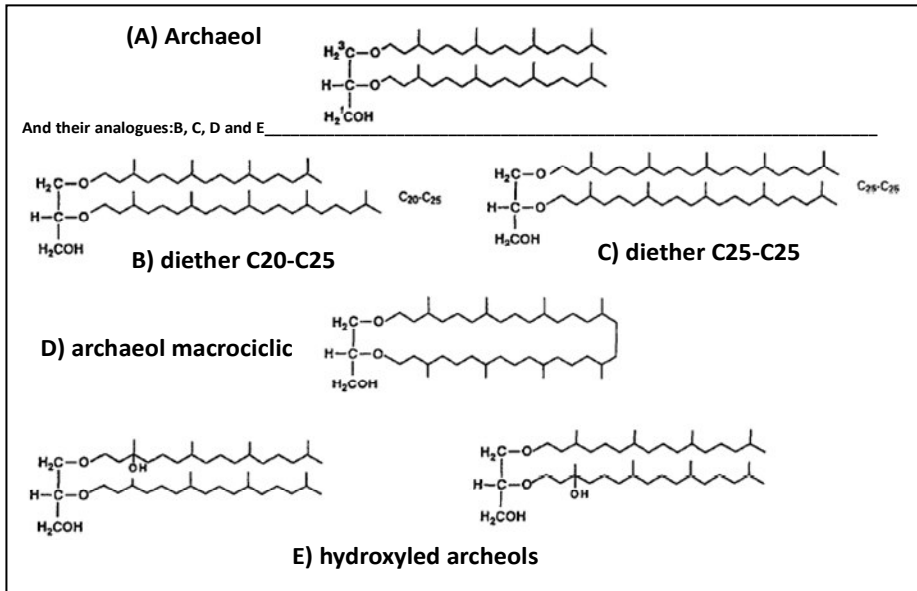


Fig. 11. Chemical formulas of lipids.

The diether core lipid of archaeas is the most abundant polar lipids. This structure is called **archaeol** (Figure 11). This is building, via an ether linkage, a two phytanyl chain (two isoprenoid chain of 20 atom of carbon, C₂₀-C₂₀) and glycerol molecule. This diethers structure is present in all types of archaea and they are characterized by the S configuration of the molecule, which is the mirror image of the sn-glycerol-3-phosphate isomer with R configuration owned bacteria (Corcelli, 2009). Archaea's phospholipids are Eukarya and Bacteria's counterparts, which consist of ester bond, which is in the position 1 and 2 of the molecule of glycerol and they aren't aliphatic components.

Archaeol gives the hydrophobic pattern of the complex lipids. Its structure is formed by two C-20 isoprenoid alcohols and glycerol molecule likened via ether bond. Thus, the 2, 3-di-O-phytanyl-sn-glycerol (DE C₂₀-C₂₀) can be considered the

universal core lipids in this kingdom. The archaeol is dextrorotatory opposite to that of naturally occurring diacylglycerol in position 2 and 3 (Kates, 1972). The archaeol can suffer some variations, to create some different kinds of archaeol (Figure 11), between which can find unsaturated archaeol, structure C₂₀-C₂₅ diether or C₂₅-C₂₅, an archaeal macrocyclic ring 36 with atoms, caused by the condensation of one molecule of glycerol, or in hydroxylation C₂₀ alkyl chain originating archaeols hydroxylated (Gambacorta, et al., 1995).

Two series of tetraether-based lipids (Figure 12), which are called caldarchaeol and nonitolcaldarchaeol, don't have counterpart at level of ester lipids. They are exclusive of archaea and are bipolar amphipatic molecules characterized by the presence of two polar head, or analogues, linked by two diether.

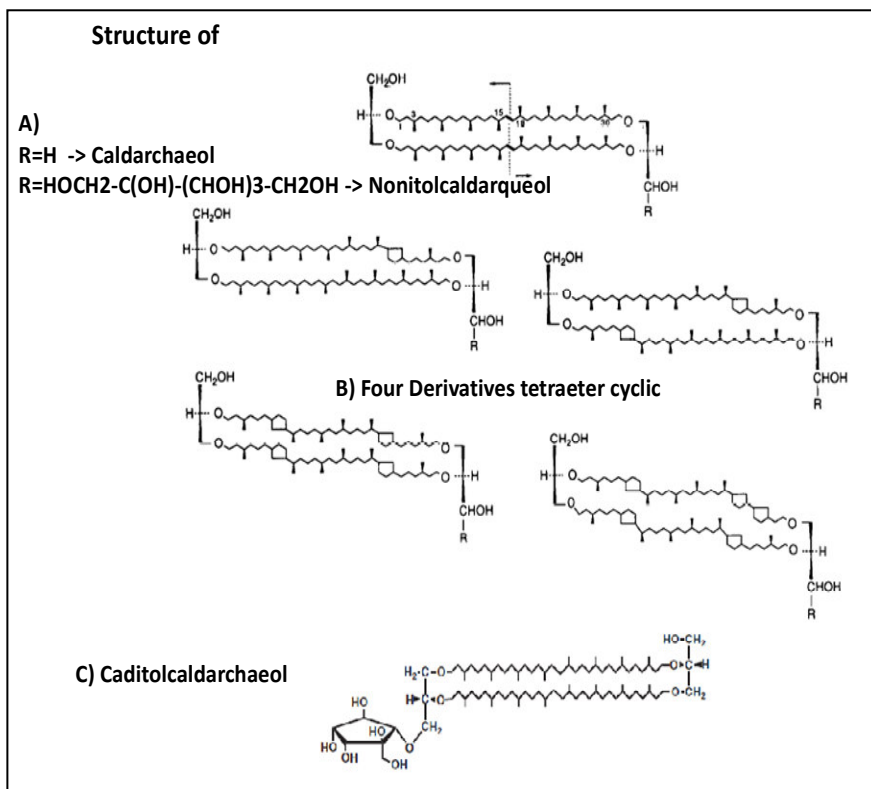


Fig.12. Tetraether-based lipids.

The basic structure of caldarchaeol, glyceril-dialkyl-glycerol tetraether (GDGT), are dextrorotatory, with the bonds in position 2 and 3 of the glycerol and with localization of –OH groups of the two opposed glycerols are in the *trans* configuration. These first were originated by dimerization of two diether molecules, at the level of the isoprenoid C₂₀ tails, giving rise to a macrocyclic lipid. And the other family of the tetraether is nonitolcaldarchaeol, glycerol-diakyl-nonitol tetraethers (GDNT), which shows a same structural and stereochemical to caldarchaeol but with a nonitol in C-2, which has a chiral center of the glycerol moiety of archaeal lipids. These other were created with a more complex polyol with nine carbon atoms replaces one of the glycerols. In which family, these structures can generate to some cyclopentane rings at the isoprenoidic level (Gambacorta, et al., 1995, Gambacorta, et al., 1994).

Archaeobacterial lipids are divided in: polar lipids (ether lipids) and neutral lipids (neutral squalenes and the other isoprenoids), which are represented for 80-95% and 5-20%, respectively.

4.2. POLAR LIPIDS

The polar lipids are constitutive of a non-polar part, this can be archaeol and its derivatives; and polar head groups, such as an organic phosphate and a/some sugar residue/s. Polar structure offers some advantages because of the polar heads which can determinate the genus-specific. However, this determination is complex.

4.2.1. Phospholipids

The derivative of archaeol, and the main phospholipids in extreme halophiles, thus the only found phenotype, is analogue isoprenoid of

monomethylate phosphoglycerophosphate (PGP-Me) (Kates, 1993). The minority phospholipids have been found as diether analogues of phosphatidylglycerol (PG) in this group, where the proportion between both depend on the conditions of growing (Oren, 2006), phosphatidylglycerosulfate (PGS) and phosphatidic acid (PA). Moreover, whereas PGS is typical of most halophilic species, PG and PA appear to be the only polar lipids which occur in both methanogens and halophiles. (Gambacorta, et al., 1994, Kates, 1993).

There are other type of phospholipids and phosphoglycolipids in the purple membrane from *Halobacterium salinarum*, which have bacteriorodhopsin. This is an analogue of cardiolipin. All phospholipids describe latterly, they are analogue phospholipids to Bacteria and Eukarya. In addition, analogues phospholipid ether of ethanolamine, choline, serine, glycerol and inositol have been found, but not the ester analogues phospholipid of the monomethyl and dimethyl ethanolamine. These phospholipids may originate both from the archaeol as the caldarqueol (Corcelli, 2000, Koga & Morii, 2005). The presence of aminophospholipids and aminophosphoglycolipids is common among methanogens, however this type of lipid is absent in the halophilic and in the genus *Thermoplasma* (Gambacorta, et al., 1995).

4.2.2. Glycolipids

They have been found in archaeals membranes a great variety, overall in halophilic archaea. The glycolipids from methanogens differed in the nature of the sugar residue, interglycosidic linkage and the lack of a sulfate group. Usually, they are as glucose derivatived of diethers, while mannose and galactose have been found in a few species (Koga, et al., 1993).

A variety of glycolipids has been also determined on membranes archaeal, especially halophilic archaea. The mono, di, tri or tetraglycosyl derivatives are mainly

in methanogens and neutrophilic halophiles, whereas the diether-based glycolipids are generally identified in alkaliphilic halophiles and thermophiles (Gambacorta, et al., 1995, Gambacorta, et al., 1994, Sprott, 1992). Saccharidic residues are composed of glucose, mannose or galactose, all with pyranose configuration (Kates, 1993).

Some glycolipids described are:

- **S-DGD-1:** (mannosyl-6-sulfate-(1-2)-glucosyldiphintanylglycerol) is majority in the genus *Haloferax* (Kushwaha, et al., 1982). This type of lipids appears minority in the genus *Halobaculum*, and in the species *Halococcus saccharovorum* (Lanzotti, et al., 1988, Oren, et al., 1996). The desulfated product (DGD-1) is presented as minority glycolipid in *Haloferax* (Oren, 2006).

- **S-DGD-3:** (mannosyl-2-sulfate-(1-4)-diphintanylglycerolglycosyl) is in different species of *Halorubrum*, such as *H. sodomense* and *H. Lacusprofundi* (Trincone, et al., 1990).

- **TGD-2** (mannosyl-glucosyl-glucosyl-difitanilglicerol) is the most major archaeol triglicosil in *Haloarcula* species (Evans, et al., 1980). It is a diglycosyl archaeol of unknown structure (GD-2) but with mannose and glucose. This is a minor component in the species of this genus (Oren, 2006).

- **S-TGD-1** (galactosyl-(3)-sulfate-(1-6)-mannosyl (1-2)-glucosyl-diphintanylglycerol) is present in the *Halobacterium* genus (Kates, 1978), and is in the purple membrane (Corcelli, 2000). The desulfated form of triglycosyl appears as the minority glycolipid *Halobacterium salinarum* and a tetraglycosyl diphitanylglycerol (GDMA) (Smallbone & Kates, 1981).

Glycolipids, which are identified in methanogenic, are derivated mono or diglycosilated of archaeol. Glycosidic residues are glucose and/or galactose with conformation pyranose or furanose (Gambacorta, et al., 1994).

4.2.3. Phosphoglycerolipids

This type of lipids is often in the polar lipids created with caldarchaeol or nonitolcaldarchaeol, because these components can be in both parts. And the lack of symmetry in the molecule is one of the lipid features, whose structures are based in tetraether (Gambacorta, et al., 1994, Sprott, 1992). In fact, when the tetraether is functional, one of the polar residues is glycosylated and the other of them is phosphorylated (Gambacorta, et al., 1995). These lipids are the majority component of membranes from *Crenarchaeota* kingdom, except in the *Sulfolobales* order which is the only order where there is nonitolcaldarchaeol. The myo-inositol is the only phospho- component detected in all cases. The sugars, which are in their structures, are glucose and /or galactose in lipid caldarchaeol; and glucose or glucose-sulphate in the case of derivatives nonitolcaldarchaeol (Gambacorta, et al., 1994). Moreover, the membrane of halophilic archaeal also contains analogs of cardiolipins. In

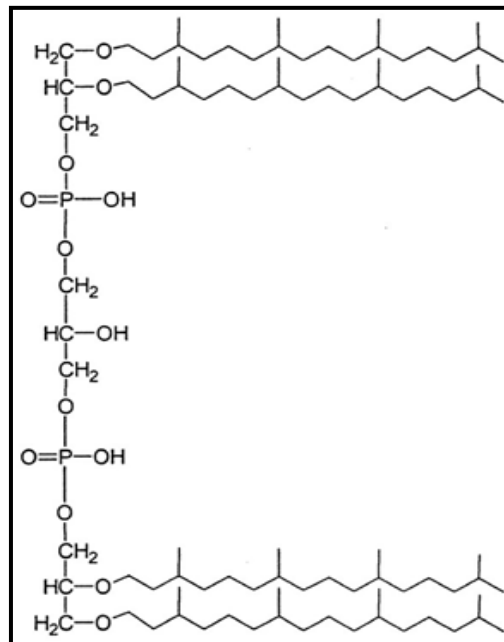


Fig. 13. The structure of archaeal cardiolipin or bisphosphatidylglycerol.

particular, both cardiolipins and glycosates cardiolipins have been found in halophilic archaeal (Corcelli, 2009, Corcelli, et al., 2000, Corcelli, et al., 2004, Sprott, et al., 2003). The archaeal (i.e. ether lipid) cardiolipin or bisphosphatidylglycerol (BPG) of halophilic archaea (Figure 13) is a dimeric phospholipid containing four identical branched C₂₀ lipid chains as it is synthesized at expense of phosphatidylglycerol based on the 2,3-di-*O*-phytanyl-*sn*-glycerol diether lipid core (PG C₂₀, C₂₀) (Lobasso, et al., 2003, Lopalco, et al., 2004).

4.2.4. Neutral squalenes and other isoprenoids

Neutral lipids account for 5-20% of the membrane lipids. Quinones, components of the neutral lipids fraction, play an important role in electro transport, oxidative phosphorylation and active transport. Two major structural groups of isoprenoid quinones appear in Archaea, the naphthoquinones and benzothiophenquinones:

- Naphthoquinones are menaquinones (MK) o thermoplasmaquinones (TPQ) and their variations in the length chain or the degree of saturation of the isoprenoid chain.
- Benzothiophenquinones are identified by sulfur-containing quinones and were isolated for the first time in the members of the *Sulfolobales*. They are of three types: the CQ type (6-polyprenyl-5-methyl-thiobenzo-[b]-thiophene-4,7-quinone, caldarielaquinone), the SQ type (6-polyprenyl-5-methylbenzo-[b]-thiophene-4,7-quinone, sulfolobusquinone) and the SSQ type (2-polyprenyl-benzo-[1,2-b; 4,5-b']-dithiophene-4,8-quinone, tricyclic quinone)(Gambacorta, et al., 1994).

Menaquinones of the order *Halobacteriales* are mainly two, with 8 isoprenoid units, MK-8 with their hydrogenated form, MK-8(H₂). The proportion of these depends on the conditions of growth. And the minority menaquinones are MK-7 y MK-7 (H₂) (Tindall, 1990, Tindall, et al., 1991). Lack of homogeneity in the

archaea is observed in their respiratory isoprenoid quinone composition, although some general features can be outlined. Thus, halophiles have all of the described menaquinones, while methanogens contain neither menaquinones nor ubiquinones, in general lines. Thermophilic archaea possess mainly quinones with fully saturated side chains and can be divided in two groups on the basis of the quinone composition. The genera *Thermoproteus* and *Archaeoglobus* possess menaquinones with *Thermoplasma* have menaquinones and thermoplamaquinones. Members of the GNMT-type are considered taxonomic markers for this order (Gambacorta, et al., 1994).

All archaea present archaeol in their membrane lipids, albeit in the trace form, which suggests that it is the major lipid universal. Thus, this represents 100% of the lipid composition in halophilic, and the main lipids in coccoid forms of methanogenic and thermophilic *Euryarchaeota* kingdom, with the exception of *Thermoplasma*. However, complex lipids, which are derived in archaeol structure, are minority in thermophilic of the kingdom of *Crenarchaeota*, and are at different proportions in methanogens. Within archaeol variants include macrocyclic forms as essential lipid majority of the genus *Methanococcus*, and *Methanosarcina* and *Methanosaeta* species contain hydroxiarchaeoles as nuclear lipid. The caldarchaeol is present in methanogens, with some exceptions, constitutes the major lipid in the total lipids present in the thermophilic of the kingdom of *Crenarchaeota*. The nonitolcaldarqueol and its cyclic form has only been detected in the Order *Sulfolobales*(Gambacorta, et al., 1995, Spratt, 1992).

5. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS

Las aplicaciones de los microorganismos extremófilos en procesos industriales abren una nueva puerta en la biotecnología, pudiendo ser útiles en: industria bioenergética, industria alimentaria, en recuperación medioambiental, industria farmacéutica. En comparación a la gran cantidad de estudios de grupos de extremófilos, como pueden ser los termófilos o los alcalófilos, los halófilos han sido escasamente estudiados a nivel del amplio potencial biotecnológico que pueden desarrollar. Aunque sí que se ha centrado su estudio en puntos fisiológicos, bioquímicos y genéticos que son los que en la actualidad más se están explotando en el estudio multidisciplinar.

En la **industria bioenergética** el interés por estos microorganismos radica en la capacidad de producir biogás de forma limpia y económica. Las arqueas halófilas metanógenas son una parte vital del tratamiento de aguas residuales, realizando la digestión anaeróbica de los residuos y produciendo biogás. Estos microorganismos han sido muy bien descritos en ambientes alcalinos e hipersalinos (Boone, et al., 1989).

También las arqueas halófilas productoras de **bacteriorrodopsina** tienen importancia basándose en el ciclo catalítico de la proteína y las funciones moleculares de foto-eléctrica, fotocromáticos y transporte de protones, lo que hace de esta proteína una molécula estratégica con potenciales aplicaciones en biotecnología. Tales aplicaciones incluyen películas de proteínas, utilizadas en los implantes de retina artificial, moduladores de luz, memorias ópticas tridimensionales, sensores fotocromáticos de color, fotocromáticas y papeles electrocromáticos y de tinta, camuflaje biológico y detectores de fotos (Saeedi, et al., 2012).

Las arqueas acidófilas son también prometedoras en minería para la extracción de metales tales como oro, cobalto y cobre (**biomining**). Sin embargo, tienen el inconveniente de generar residuos ácidos que provocan la contaminación generalizada del medio ambiente, por lo que hoy día siguen siendo estudiados para salvar este inconveniente frente a la gran cantidad de beneficios que presentan (Johnson, 1998).

Las arqueas extremófilas, en particular las resistentes a las altas temperaturas o a los extremos de acidez y alcalinidad, son una importante **f fuente de enzimas** que puede funcionar bajo estas duras condiciones. La principal razón de seleccionar las enzimas a partir de microorganismos extremófilos es la elevada estabilidad que poseen y la disminución del riesgo de contaminación. En la obtención de enzimas podríamos extendernos mucho, pero únicamente destacaremos la obtención de las DNA polimerasas termoestables, como la DNA polimerasa Pfu obtenida de *Pyrococcus furiosus* y la DNA Polimerasa Th de *Thermus aquaticus*, las cuales han revolucionado la biología molecular, al permitir el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como método simple, rápido y eficiente para la amplificación específica de secuencias de DNA. Sin embargo, se ha demostrado que modificaciones producidas por las enzimas psicrófilas que permiten una flexibilidad conformacional a bajas temperaturas, es opuesta a aquellas que confieren termoestabilidad a proteínas de termófilos (Canganella & Wiegel, 2011, Russell, 2000). Por otro lado destacar que Madern (Madern, et al., 2000), describe la capacidad que tienen ciertas enzimas halófilas de crear una cubierta protectora en ambientes de baja actividad de agua para así desarrollar una actividad catalítica, propiedad que podría ser interesante en diversas aplicaciones.

En la **industria alimentaria**, los microorganismos halófilos han tenido un interés muy elevado desde el inicio, ya que eran los causantes de la biodegradación de distintos alimentos, como los alimentos en salazón, en donde las pérdidas económicas han sido impresionantes. Afortunadamente su estudio ha ampliado las

posibilidades de condimentación de los alimentos, ya que a partir de estos surgió la salsa de Tai, muy utilizada en el continente asiático (Thongthai & Suntainalert, 1991); así como la salsa fermentada de hígado de calamar obtenida de la bacteria halófila moderada *Tetragenococcus muruaticus* (Juste, et al., 2012).

A otro nivel, dentro de la industria alimentaria, distintos microorganismos son productores de amilasas, galactosidasas y pululanastas, como son diferentes especies de *Pyrococcus*, que realizan su función a más de 100 °C, lo que permite la elaboración de alimentos a altas temperaturas, tales como leche baja en lactosa y suero de leche. Pero estas enzimas no solo podrían ser aplicadas en la industria alimentaria, sino que desarrollan papeles importantes en la fabricación de detergentes o en la creación de papel y pasta. Los exopolisacáridos de estas arqueas poseen un alto poder viscosizantes o espesante, con la importante ventaja de ser estable a elevadas concentraciones de sal, a diferencia de otros polisacáridos que poseen elevado valor comercial como el Xantano (Oren, 2010, Pfiffner, et al., 1986, Vijayendra & Shamala, 2013).

Dentro de las aplicaciones a nivel **medioambiental** podemos destacar que su alto interés radica en la capacidad de los halófilos en biodegradar substratos tóxicos, así como en el tratamiento de residuos (Ramos-Cormenzana, 1991). En ciertas arqueas halófilas se ha comprobado su capacidad degradadora de alcanos e hidrocarburos aromáticos (Bertrand, et al., 1990), compuestos tóxicos organofosforados (Defrank & Cheng, 1991), compuestos aromáticos nitro derivados (Oren, et al., 1991), seguido de un largo etcétera .

Dentro de la **industria farmacéutica** la búsqueda de nuevas sustancias antimicrobianas ha dado como resultado una nueva clase de antibióticos potencialmente útiles que se derivan de este grupo de organismos. No obstante no se centra únicamente en la búsqueda de sustancias antibióticas sino que se amplía el campo, ya que los metabolitos microbianos secundarios pueden ser aplicados como

tratamiento de enfermedades no causadas por microorganismos (Pettit, 2011). En concreto existe un interés especial por los organismos halófilos y halotolerantes, debido a la alta diversidad y a los mecanismos que han desarrollado para adaptarse al medios hipersalinos, lo que genera una posible producción de metabolitos primarios y secundarios de alto interés (Blunt, et al., 2013, Faulkner, 2002). De modo que el descubrimiento de nuevas sustancias de valor terapéutico depende de la recuperación de estos organismos del medio ambiente y de su cultivo, de ahí que en la actualidad bastantes líneas de investigación se centren en el conocimiento de la población de extremófilos.

Los **solutos compatibles** son compuestos altamente solubles, de bajo peso molecular que hacen que las halófilas puedan sobrevivir en medios de altas salinidades. Estos microorganismos son capaces de, o tomar los solutos del medio en el que habitan, o bien sintetizarlos. Los solutos compatibles incluyen aminoácidos, hidratos de carbono o sus derivados, azúcares y polioles. Además de sus efectos estabilizadores, que ofrecen una multitud de aplicaciones biotecnológicas fisiológicos que van desde estabilizadores de biomoléculas, agentes de estrés de protección a los agentes terapéuticos y principios activos de cosméticos, pero sobre todo las de preparados enzimáticos y medicamentos de relativa dificultad para la conservación (Galinski & Lippert, 1991, Shivanand & Mugeraya, 2011).

Destacar que la producción típica de **pigmento** de las halófilas, como β -carotenos, poseen poder preventivo de cáncer y son fuentes de vitamina A, la cual es muy útil para evitar la ceguera nocturna. Los carotenoides rojos-anaranjados, destacan por su capacidad protectora frente a los procesos de fotooxidación, de ahí que puedan ser usados como agentes cosméticos en las cremas solares tanto protectoras como las que favorecen la pigmentación(Oren, 2010). Para el diagnóstico de cáncer se ha comprobado su utilidad, ya que el cáncer de colon o de recto, generan unos anticuerpos frente a una proteína de 84Kda, aislada de *Halobacterium halobium*. Pero gracias a la capacidad de modificar la respuesta

biológica inmune, las sustancias antimicrobianas que producen estos microorganismos tienen una acción directa sobre el mecanismo carcinogénico (Benmahrez, et al., 1991). O como es el caso del “berkelic acid”, obtenido de un extremófilo que habita en una mina de cobre a cielo abierto abandonada, la cual presenta aguas ácidas junto con metales. Esta biomolécula ha demostrado actividad selectiva contra el cáncer de ovario (Wilson & Brimble, 2010).

Además, uno de los problemas, que desgraciadamente en la actualidad en el mundo occidental está creciendo de forma exponencial, es la **obesidad**, es decir, el desequilibrio entre la energía que se ingiere y la que se consume. El tratamiento de la obesidad es muy importante, ya que de este derivan muchas enfermedades crónicas, considerando también la obesidad como una enfermedad crónica. La *Spirulina* es un ejemplo de alga microscópica halófila, que ha sido utilizado contra la obesidad, ya que tiene la capacidad de ser un adelgazante a la par que aditivo nutricional (Becker, et al., 1986, Sironval, 1993). Sin embargo no es el único microorganismo con aplicación en este campo, en general, la presencia de arqueas como parte de la microbiota natural del colon puede influir en fermentación de los alimentos ingeridos, y de forma indirecta en la obesidad. Sin embargo, actualmente no está claro si la presencia de arqueas influencia el balance energético. Por lo tanto, se necesitan más estudios para investigar si Archaea jugar un papel en obesidad (Fernandes, et al., 2013).

Los **liposomas** son vesículas constituidas por bicapas fosfolipídicas concéntricas, alternadas con compartimentos acuosos que poseen una arquitectura molecular que les permiten captar una variedad de agentes activos. Cuando para la elaboración de estos liposomas utilizamos los lípidos de las membranas de las arqueas, se obtiene un nuevo tipo de liposoma denominado arqueosoma. Éstos se forman de manera espontánea, cuando los lípidos de las arqueas se ponen en contacto con una solución acuosa, generando, en consecuencia, un medio de transporte del principio activo al lugar de actuación. La preparación de arqueosomas

a partir de lípidos de arqueas halófilas extremas constituye una de las líneas de investigación desarrolladas por nuestro grupo de investigación (BIO-190). Debido a las óptimas características de estabilidad que presentan ante diferentes situaciones de estrés. Nuestros últimos resultados han mostrado que mediante esta forma farmacéutica, un hidro-gluocorticoide de potencia moderada (dipropionato betametasona), con acción antiinflamatoria e inmunosupresora, mejora su eficacia en la aplicación tópica sobre la piel enferma (González-Paredes, et al., 2011). Por otro lado, también se vehiculizaron antioxidantes de origen natural con extraordinarios resultados (González-Paredes, et al., 2010). La amplia variedad de lípidos que encontramos en los microorganismos halófilos conduce a que se continúen buscando nuevas especies y en consecuencia nuevas posibles lípidos, ya que los lípidos de membrana de las arqueas halófilas extremas poseen una clara diferencia en su composición en relación a las bacterias, y derivan de diéteres y tetraéteres difitanilglicerol, arqueoles (Corcelli & Lobasso, 2006).

En la actualidad se investiga sobre nueva líneas de aplicación de microorganismos halófilos, como pudiera ser para uso como probióticos, nutracéticos, tratamiento del acné, etc... (Baquero & Nombela, 2012, Murillo & Raoult, 2013, Oren, 2010).

Solo el tiempo y numerosos estudios que se realizan podrán determinar si son activos en estas líneas y en otras muchas que están por determinar. La biotecnología de extremófilos está en sus comienzos, pero se desarrolla rápidamente, por lo que en breve las aplicaciones se verán exponencialmente aumentadas.

OBJETIVOS

Los ambientes hipersalinos suponen una fuente de amplia biodiversidad microbiana e interés por sus consecuentes rutas metabólicas, características fisiológicas, comportamientos moleculares y mecanismos de adaptación a condiciones consideradas como extremas, que pueden conducir a procesos y productos biotecnológicos de creciente interés (Taylor, et al., 2012). Esto se confirma con la gran cantidad de especies que cada año son descritas y que, en su mayoría, pasan de ser especies no cultivables a poder ser cultivadas. Este hecho refleja la necesidad de obtener nuevos aislamientos y estudiar ecosistemas que anteriormente fueron considerados hostiles para la vida y donde actualmente encontramos vida gracias a nuevas metodologías.

El presente trabajo se ha centrado en el aislamiento y estudio taxonómico de cepas con posible interés biotecnológico en los siguientes ambientes hipersalinos localizados en Andalucía:

- La laguna salada de **Fuente de Piedra**, humedal salino localizado en el interior de la provincia de Málaga, reutilizado en la actualidad como parque natural (ZEPA, zona de especial protección para aves) donde numerosas especies de aves, destacando el flamenco rosa, lo usan como parada en sus periodos migratorios.
- Las salinas de interior de **La Malahá**, situado en la comarca del Quempe (interior de la provincia granadina), utilizadas desde el tiempo de los romanos como salineras y a las que actualmente sigue dándose el mismo uso por una sociedad limitada, aprovechando la orografía de la zona.
- Y por último, las salinas solares de **Santa María de Jesús**, salinas marinas de la Bahía de Cádiz en Chiclana, actualmente reutilizadas como centro educativo. En ellas se desarrolla la misma actividad que siglos atrás, la obtención de sal a partir de una serie de cristalizadores surtidos con agua del mar.

Estos tres ecosistemas reúnen características para ser definidos como ambientes extremos: alta salinidad, variaciones de temperatura y sequedad y presencia de fuentes de agua (mar, surgencias subterráneas y/o superficiales); y permiten el desarrollo y crecimiento de una biota extremófila. Además, siguen siendo ambientes con recursos a explorar a nivel de descripción microbiana.

El grupo de investigación BIO-190 “Microorganismos halófilos y biorremediación ambiental” de la Universidad de Granada ha desarrollado a lo largo de su historia múltiples proyectos asociados al estudio y aplicación de microorganismos halófilos extremos y moderados. Entre sus últimos estudios se encuentra el proyecto CGL2008-00447 “Selección y estudio de arqueas halófilas con potencial aplicación tecnológica”, financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, proyecto centrado en contribuir a la descripción de ambientes salinos andaluces y a la descripción de posibles nuevas especies con un importante potencial, y en el que se encuadra la presente tesis doctoral,

De forma específica, los objetivos concretos planteados para el desarrollo del presente trabajo son:

- I. Describir microbiológicamente los ambientes seleccionados bajo las condiciones estacionales en las que se desarrolló el muestreo.
- II. Aislar y seleccionar microorganismos halófilos de los ecosistemas salinos localizados en Andalucía basándose en técnicas clásicas de cultivo.
- III. Realizar un estudio fenotípico de las cepas microbianas seleccionadas.

- IV. Crear agrupaciones de cepas microbianas por la utilización de la taxonomía numérica y seleccionar representantes de éstas, para su posterior estudio por medio de técnicas moleculares.
- V. Identificar y clasificar mediante métodos moleculares los aislamientos de halófilos en grupos taxonómicos conocidos para definir la microbiota de las salinas andaluzas en el momento del muestreo.
- VI. Analizar el perfil lipídico de nuevas arqueas mediante tecnologías de alta resolución (HTPLC, MALDI-Tof y la combinación de ambas).

Describir nuevos taxa de arqueas y/o bacteria halófilas en base a sus características polifásicas: taxonómicas y filogenéticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MUESTREO Y AISLAMIENTO

1.1. ZONAS DE MUESTREO

Las áreas de muestreo seleccionadas en Andalucía (Figura 14) para la búsqueda de arqueas y bacterias halófilas extremas y moderadas, estaban en la zona oriental de la comunidad: La salina de Fuente de Piedra (Málaga) y La Malahá (Granada), ambas salinas de interior o atalasohalinas; y en la zona occidental, la talasohalina de Santa María de Jesús, Chiclana, en la Bahía de Cádiz.



Fig. 14. Mapa geográfico de Andalucía con las localizaciones de las zonas de muestreo.

Dentro de cada una de estas zonas, se recogieron muestras en diferentes puntos y estas fueron tanto de agua, como de sedimento.

- Las muestras de la salina de Fuente de piedra (Málaga) fueron recogidas el 14 octubre de 2009, en concreto se coleccionaron cinco muestras diferentes, de las de cuales dos de ellas fueron de agua (A1FP y A2FP) con sus correspondientes muestras de sedimentos (S1FP y S2FP). Mientras que del

tercer punto de recogida, únicamente se pudo recoger agua (A3FP) (Figura 15).



Fig. 15. Ilustración de la laguna de Fuente de Piedra.

- La salina localizada en La Malahá (Granada), fue muestreada el 6 de noviembre de 2009, de la cual se recogieron muestras en tres puntos diferentes dentro de la zona indicada (Figura 16). El primer punto escogido, fue un cristalizador coloreado de rojo debido a la presencia de halófilos extremos, de donde se recogió una muestra de agua (A1LM) procedente del primer cristalizador con una temperatura de 15 °C y una muestra de sedimento de este mismo cristalizador (S1LM). El segundo punto, fue un cristalizador donde la evaporación de agua permite que los márgenes del cristalizador estuvieran constituidos por halitas (cristales de sal): A2LM fue la muestra de agua de este segundo cristalizador con una temperatura de 14 °C y su respectivo sedimento S2LM. Por último S3LM, que representa la última muestra recogida, procedente de tierra contigua a la salina, la cual presentaba costras de sal.



Fig.16. Cristalizadores de la atalasalina de La Malahá (Granada).

- El 16 de noviembre del 2009, se recogieron muestras en las salinas de Santa María de Jesús (Chiclana, Bahía de Cádiz). Éstas fueron tomadas de diferentes puntos (Figura 17), el primero (A1BC y S1BC) de un cristalizador que presentaba una coloración rosácea, donde el agua poseía una

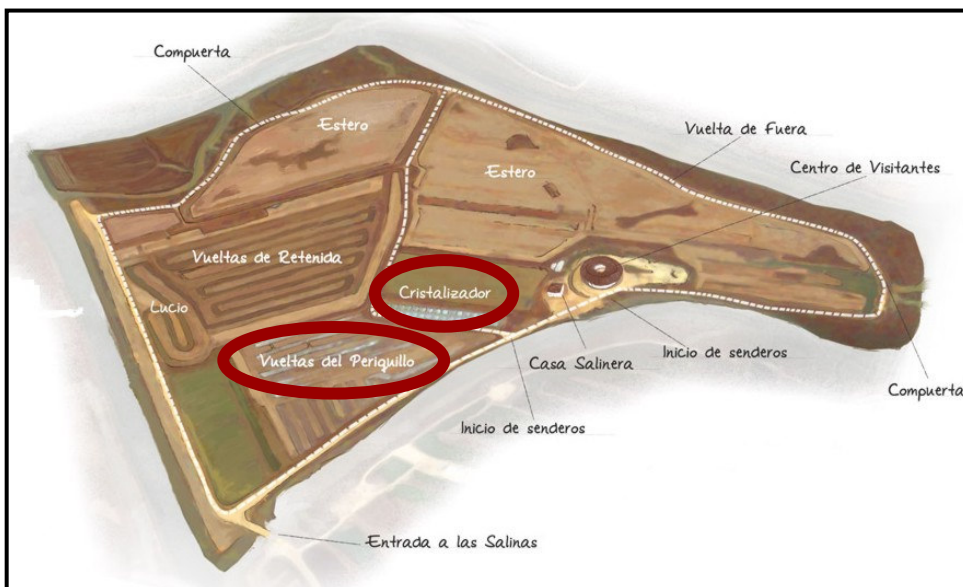


Fig.16. Esquema de la salinas de Santa M^a de Jesús, Chiclana, Bahía de Cádiz.

temperatura de 17°C y más del 15% de salinidad. El segundo punto (A2BC y S2BC) fue de la entrada de agua a los cristalizadores, zona denominada “Vueltas del Periquillo”, aquí la temperatura era de 20 °C y un 13 % de salinidad. El canal exterior del cristalizador representa el tercer punto (A3BC y S3BC) con una coloración violácea, 18 °C y un 11 % de salinidad presente en el agua. Finalmente, el cuarto punto (A4BC y S4BC) se recogió de otro cristalizador con coloración blanquecina con una temperatura de 19 °C y el 14 % de salinidad.

Para la recolección de las muestras se usaron “Falcon” estériles de 10 mL, con tapón de rosca. Las diferentes muestras, fueron procesadas en el mismo día, sin superar un máximo de 8 horas entre la toma de muestras y su procesamiento a temperatura ambiente. Todas ellas se trabajaron por triplicado, asignándoles un código, para que exista un trazabilidad al final del trabajo.

1.2. MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO

Para el aislamiento de cepas halófilas se utilizó el medio de cultivo HM (Tabla 2) (Ventosa, et al., 1982b) con un rango de concentraciones de ClNa del 0, 5, 10, 15, 20 y 25% (p/v).

Tabla 2. Composición del medio HM.

<i>Sales</i>	<i>Cantidades</i>
Glucosa	0.9 g
Extracto de levadura	4.5 g
Proteasa de peptona	4.5 g
Agar tipo Europeo	18 g (al 20%)
H ₂ O destilada	c.p.s. 900mL

Tabla 3. Stock de sales 30 % (Subov.).

<i>Sales</i>	<i>Cantidades</i>
NaHCO ₃	0.36 g
NaBr	1.26 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.98 g
KCl	10.81 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	75.60 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	108 g
NaCl	421.20 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O [0.5% (p/v)]	XVII (gotas)
H ₂ O destilada	c.p.s. 1800 mL

Cada uno de los medios se ajusta a un pH de 7.3 a 25 °C, para lo cual añadimos solución de NaOH 5 M. Para la preparación de los medios a distintas salinidades, parte del volumen que compone el medio de cultivo lo constituye un stock de sales de Subov al 30 % (Tabla 3) (Rodríguez-Valera, et al., 1981, Subov, 1931), con cuya suplementación al medio, conseguimos la salinidad deseada.

Junto con el medio HM a distintas concentraciones de sal, también se utilizó el medio OS (Tabla 4) (Oesterhelt & Stoeckenius, 1974). Este medio se utiliza para el aislamiento de arqueas halófilas, como *Halobacterium salinarium*.

Todos estos medios se esterilizan por medio de autoclave a 112 °C/ 30 min con una sobrepresión atmosférica de 0.5 ATM. Posteriormente se reparten en placas Petri estériles y se conservan a 4 °C hasta su uso.

Tabla 4. Composición del medio OS.

<i>Componentes</i>	<i>Cantidades</i>
NaCl	250 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	20 g
Citrato trisódico·2H ₂ O	3 g
KCl	2 g
Proteasa de peptona	10 g
Agar tipo Europeo (20%)	20 g
Solución de metales traza*	100 µL
H ₂ O destilada	c.s.p. 1000 mL

*** Solución de metales traza.**

<i>Sales</i>	<i>Cantidades</i>
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	6.6 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	1.7 g
Fe(NH ₄)SO ₄ ·6H ₂ O	3.9 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.7 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	6.6 g
H ₂ O destilada	c.s.p 1000 ml

*El pH del medio ajustado a 7.3 a 25 °C.

1.3. TÉCNICA DE AISLAMIENTO A PARTIR DE LAS MUESTRAS

Para realizar el aislamiento de los microorganismos halófilos a partir de las distintas muestras, se inocularon 100 µL de la muestra recogida, así como de sus respectivas diluciones (de 10⁻¹ a 10⁻⁴), sobre los distintos medios de cultivo seleccionados, realizando una extensión homogénea de la alícuota sembrada

mediante el uso de asas de Digralsky. Las placas inoculadas, se introdujeron en bolsas de plástico, y se cerraron, para evitar la desecación del medio. Se incubaron en una estufa a 37 °C durante aproximadamente 4 semanas, siendo examinadas a término de cada semana.

1.4. SELECCIÓN DE CEPAS

Finalizadas las cuatro semanas de incubación, cada cepa microbiana considerada como distinta se le asignó un código, en el que se tiene presente el medio del que procede, así como de la concentración de sales del mismo; a la par que se caracterizaba en color y proporción de cepa en la placa y se procedió a resiembras en el mismo tipo de medio de origen.

De manera que partimos de un total de **426 cepas**, las cuales fueron reducidas a solo aquellas que fuesen principalmente halófilas extremas, siendo las halotolerantes de amplio intervalo salino de crecimiento excluidas. Así pues, para el presente estudio quedaron **268 cepas** de los tres ambientes salinos andaluces (Tablas 5, 6 y 7):

- Fuente de Piedra cuenta con 92 cepas aisladas.
- La Malahá con 76.
- Bahía de Cádiz con 100.

Tabla 5. Cepas seleccionadas procedentes de la Laguna de Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	LUGAR DE PROCEDENCIA	MEDIO DE CULTIVO	COLORACION
A1FP-1	AFP1	OS	Roja
A1FP-2	AFP1	OS	Roja-teja
A1FP-3	AFP1	OS	Rosa
A1FP-4	AFP1	25% HM	Roja

Tabla 5. Cepas seleccionadas procedentes de la Laguna de Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	LUGAR DE PROCEDENCIA	MEDIO DE CULTIVO	COLORACION
A1FP-5	AFP1	25% HM	Roja
A1FP-6	AFP1	25% HM	Rosa
A1FP-7	AFP1	15% HM	Blanca-rosa
A1FP-8	AFP1	15% HM	Roja
A1FP-9	AFP1	15% HM	Roja
A1FP-11	AFP1	10% HM	Blanca
A1FP-12	AFP1	10% HM	Amarilla
A1FP-14	AFP1	OS	Roja
A1FP-15	AFP1	OS	Roja
A1FP-16	AFP1	25% HM	Roja
A1FP-17	AFP1	25% HM	Roja
A1FP-18	AFP1	20% HM	Roja
A1FP-19	AFP1	20% HM	Roja
A1FP-20	AFP1	15% HM	Blanca-rosa
A1FP-21	AFP1	15% HM	Roja
A1FP-22	AFP1	15% HM	Roja
A2FP-1	AFP2	OS	Rojo
A2FP-2	AFP2	OS	Rojo
A2FP-3	AFP2	OS	Amarilla
A2FP-4	AFP2	OS	Rojo
A2FP-5	AFP2	25% HM	Rojo
A2FP-6	AFP2	25% HM	Rojo
A2FP-7	AFP2	25% HM	Rojo
A2FP-10	AFP2	20% HM	Rojo
A2FP-11	AFP2	20% HM	Rojo
A2FP-15	AFP2	10% HM	Marrón
A2FP-16	AFP2	10% HM	Marrón
A2FP-17	AFP2	10% HM	Amarilla
A2FP-19	AFP2	OS	Crudo
A2FP-20	AFP2	OS	Rojo
A2FP-21	AFP2	25% HM	Rosa
A2FP-22	AFP2	25% HM	Rojo
A2FP2122T	AFP2	25% HM	Incolora
A2FP-23	AFP2	20% HM	Incolora-rojo

Tabla 5. Cepas seleccionadas procedentes de la Laguna de Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	LUGAR DE PROCEDENCIA	MEDIO DE CULTIVO	COLORACION
A2FP-24	AFP2	20% HM	Rosa
A2FP-26	AFP2	15% HM	Rojo
A3FP-1	AFP3	OS	Rosa
A3FP-2	AFP3	OS	Rojo
A3FP-3	AFP3	25% HM	Rojo
A3FP-4	AFP3	25% HM	Rojo
A3FP-5	AFP3	25% HM	Rojo
A3FP-6	AFP3	25% HM	Rosa
A3FP-8	AFP3	20% HM	Rosa
A3FP-10	AFP3	15% HM	Rojo
A3FP-13	AFP3	10% HM	Incolora-rojo
A3FP-16	AFP3	OS	Rojo
A3FP-17	AFP3	OS	Rojo
A3FP-18	AFP3	25% HM	Rojo
A3FP-19	AFP3	25% HM	Rojo
A3FP-20	AFP3	20% HM	Rojo
A3FP-21	AFP3	20% HM	Rojo
A3FP-22	AFP3	15% HM	Rojo
A3FP-23	AFP3	15% HM	Naranja pastel
S1FP-2	SFP1	OS	Rojo
S1FP-3	SFP1	OS	Rojo
S1FP-4	SFP1	OS	Rojo
S1FP-5	SFP1	25% HM	Burdeos
S1FP-6	SFP1	25% HM	Rojo
S1FP-7	SFP1	25% HM	Rojo
S1FP-8	SFP1	20% HM	Rojo
S1FP-9	SFP1	20% HM	Rojo
S1FP-10	SFP1	20% HM	Rojo
S1FP-11	SFP1	25% HM	Incolora-rojo
S1FP-12	SFP1	15% HM	Rojo
S1FP-13	SFP1	15% HM	Rosa
S1FP-17	SFP1	10% HM	Amarilla
S2FP-1	SFP2	OS	Rosa
S2FP-2	SFP2	OS	Rojo

Tabla 5. Cepas seleccionadas procedentes de la Laguna de Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	LUGAR DE PROCEDENCIA	MEDIO DE CULTIVO	COLORACION
S2FP-3	SFP2	OS	Rojo
S2FP-4	SFP2	OS	Rojo
S2FP-5	SFP2	25% HM	Berenjena
S2FP-6	SFP2	25% HM	Rojo
S2FP-7	SFP2	25% HM	Berenjena
S2FP-8	SFP2	25% HM	Rosa
S2FP-9	SFP2	25% HM	Teja
S2FP-10	SFP2	25% HM	Rosa
S2FP-12	SFP2	25% HM	Rojo marrón
S2FP-13	SFP2	20% HM	Blanca-rosa
S2FP-14	SFP2	20% HM	Rosa
S2FP-15	SFP2	20% HM	Blanca
S2FP-16	SFP2	20% HM	Rojo
S2FP-20	SFP2	15% HM	Burdeos
S2FP-21	SFP2	15% HM	Chocolate
S2FP-22	SFP2	15% HM	Rojo
S2FP-23	SFP2	15% HM	Rojo
S2FP-24	SFP2	15% HM	Rojo
S2FP-25	SFP2	15% HM	Rojo
S2FP-27	SFP2	15% HM	Rojo-rosa

*AFP, Agua Fuente de Piedra; SFP, Sedimento Fuente de Piedra

Tabla 6. Cepas seleccionadas procedentes de la salina dela Malahá (Granada).

CEPAS	LUGAR DE AISLAMIENTO	MEDIO DE CULTIVO	COLORACIÓN
A1LM-1	1AC	OS	Morada
A1LM-2	1AC	OS	Rojo
A1LM-4	1AC	OS	Amarilla
A1LM-7	1AC	OS	Rosa-morada
A1LM-8	1AC	25% HM	Rojo
A1LM-9	1AC	25% HM	Rojo
A1LM-10	1AC	25% HM	Blanca

Tabla 6. Cepas seleccionadas procedentes de la salina dela Malahá (Granada).

CEPAS	LUGAR DE AISLAMIENTO	MEDIO DE CULTIVO	COLORACIÓN
A1LM-11	1AC	25% HM	Rosa
A1LM-12	1AC	25% HM	Berenjena
A1LM-14	1AC	20% HM	Naranja
A1LM-15	1AC	20% HM	Blanca
A1LM-18	1AC	20% HM	Yema
A1LM-21	1AC	20% HM	Rojo
A1LM-22	1AC	15% HM	Crema
A1LM-23	1AC	15% HM	Naranja pastel
A1LM-24	1AC	15% HM	Marrón
A1LM-25	1AC	15% HM	Naranja
A1LM-26	1AC	15% HM	Rojo
A1LM-28	1AC	15% HM	Rosa
A1LM-30	1AC	10% HM	Naranja
A2LM-1	2AC	OS	Rosa
A2LM-2	2AC	OS	Rosa-naranja
A2LM-3	2AC	OS	Crema
A2LM-4	2AC	25% HM	Rosa
A2LM-5	2AC	25% HM	Rojo
A2LM-6	2AC	25% HM	Rojo
A2LM-8	2AC	20% HM	Rojo
A2LM-9	2AC	20% HM	Rojo
A2LM-10	2AC	20% HM	Marrón
A2LM-12	2AC	20% HM	Blanco-marrón
A2LM-16	2AC	15% HM	Rosa
A2LM-19	2AC	15% HM	Amarillo
A2LM-23	2AC	15% HM	Naranja
S1LM-2	1SC	OS	Transparente-crudo
S1LM-3	1SC	OS	Crema
S1LM-4	1SC	OS	Naranja
S1LM-5	1SC	OS	Amarillo
S1LM-6	1SC	OS	Rojo
S1LM-8	1SC	25% HM	Ocre-verde
S1LM-11	1SC	25% HM	Rosa
S1LM-12	1SC	25% HM	Rojo
S1LM-13	1SC	25% HM	Rojo

Tabla 6. Cepas seleccionadas procedentes de la salina de la Malahá (Granada).

CEPAS	LUGAR DE AISLAMIENTO	MEDIO DE CULTIVO	COLORACIÓN
S1LM-14	1SC	25% HM	Rosa
S1LM-15	1SC	20% HM	Naranja
S1LM-16	1SC	20% HM	Crema
S1LM-17	1SC	20% HM	Rojo
S1LM-18	1SC	20% HM	Rosa
S1LM-19	1SC	20% HM	Naranja
S1LM-20	1SC	20% HM	Rojo
S1LM-21	1SC	20% HM	Crema
S1LM-22	1SC	20% HM	Marrón-claro
S1LM-30	1SC	10% HM	Rosa
S1LM-32	1SC	10% HM	Naranja
S2LM-1	2SC	OS	Rojo
S2LM-2	2SC	OS	Rojo
S2LM-3	2SC	OS	Crema
S2LM-4	2SC	OS	Rosa brillante
S2LM-5	2SC	OS	Rojo
S2LM-6	2SC	25% HM	Crema
S2LM-7	2SC	25% HM	Rosa
S2LM-8	2SC	25% HM	Crema
S2LM-9	2SC	25% HM	Naranja
S2LM-12	2SC	20% HM	Blanca
S2LM-15	2SC	15% HM	Rosa
S2LM-18	2SC	15% HM	Marrón-claro
S2LM-19	2SC	15% HM	Rojo
S2LM-21	2SC	10% HM	Blanca
S3LM-2	SPH	OS	Rosa
S3LM-5	SPH	25% HM	Crudo
S3LM-6	SPH	25% HM	Rojo
S3LM-7	SPH	20% HM	Marrón
S3LM-8	SPH	20% HM	Crema
S3LM-10	SPH	20% HM	Marrón
S3LM-12	SPH	20% HM	Rojo
S3LM-13	SPH	15% HM	Marrón
S3LM-15	SPH	15% HM	Salmon

*AC, Agua de cristalizador; SC, suelo cristalizador;
SPH, suelo próximo con halita.

Tabla 7. Cepas seleccionadas procedentes de las salinas de Santa María de Jesús, (Chiclana, Cádiz).

CEPAS	LUGAR DE AISLAMIENTO	MEDIO DE CULTIVO	COLORACION
A1BC-2	AC- A	OS	Rojo
A1BC-3	AC- A	OS	Blanca-crema
A1BC-4	AC- A	25% HM	Crema
A1BC-5	AC- A	25% HM	Ocre
A1BC-6	AC- A	25% HM	Roja
A1BC-8	AC- A	20% HM	Ocre
A1BC-11	AC- A	15% HM	Marrón
A1BC-16	AC- A	10% HM	Ocre
A2BC-1	AVP	OS	Rosa
A2BC-2	AVP	OS	Ocre
A2BC-3	AVP	OS	Crema
A2BC-4	AVP	25% HM	Marrón-amarilla
A2BC-5	AVP	25% HM	Rojo
A2BC-6	AVP	25% HM	Rosa palo
A2BC-7	AVP	25% HM	Rojo-naranja
A2BC-8	AVP	25% HM	Rosa
A2BC-9	AVP	25% HM	Rojo
A2BC-10	AVP	20% HM	Ocre
A2BC-11	AVP	20% HM	Rojo
A2BC-14	AVP	20% HM	Marrón
A2BC-15	AVP	15% HM	Amarilla
A2BC-17	AVP	15% HM	Marrón
A2BC-18	AVP	15% HM	Crema
A2BC-19	AVP	15% HM	Crema
A2BC-21	AVP	10% HM	Amarilla
A3BC-1	AC- B	OS	Rojo
A3BC-2	AC- B	OS	Rojo-rosa
A3BC-3	AC- B	OS	Blanca
A3BC-4	AC- B	OS	Incolora
A3BC-5	AC- B	25% HM	Rosa-rojo
A3BC-6	AC- B	25% HM	Crema

Tabla 7. Cepas seleccionadas procedentes de las salinas de Santa María de Jesús, (Chiclana, Cádiz).

CEPAS	LUGAR DE AISLAMIENTO	MEDIO DE CULTIVO	COLORACION
A3BC-7	AC- B	25% HM	Rojo
A3BC-8	AC- B	25% HM	Rojo
A3BC-9	AC- B	20% HM	Rosa-rojo
A3BC-10	AC- B	20% HM	Rosa-rojo
A3BC-11	AC- B	20% HM	Rojo
A3BC-12	AC- B	20% HM	Blanca
A3BC-16	AC- B	15% HM	Rosa
A3BC-19	AC- B	10% HM	Marrón
A4BC-1	AC- C	OS	Roja
A4BC-2	AC- C	25% HM	Rosa
A4BC-3	AC- C	25% HM	Rosa
A4BC-4	AC- C	25% HM	Roja
A4BC-5	AC- C	25% HM	Roja
A4BC-6	AC- C	25% HM	Roja
A4BC-7	AC- C	20% HM	Roja
A4BC-8	AC- C	20% HM	Roja
A4BC-9	AC- C	20% HM	Roja
A4BC-10	AC- C	15% HM	Roja
A4BC-11	AC- C	15% HM	Ocre
A4BC-14	AC- C	15% HM	Blanca
A4BC-16	AC- C	10% HM	Naranja
S1BC-1	SC- A	OS	Roja
S1BC-2	SC- A	OS	Roja
S1BC-4	SC- A	25% HM	Roja
S1BC-5	SC- A	25% HM	Roja
S1BC-6	SC- A	25% HM	Naranja-roja
S1BC-7	SC- A	20% HM	Roja
S1BC-8	SC- A	20% HM	Crema
S1BC-10	SC- A	15% HM	Roja
S1BC-11	SC- A	15% HM	Roja
S1BC-12	SC- A	15% HM	Roja
S2BC-2	SVP	OS	Rosa

Tabla 7. Cepas seleccionadas procedentes de las salinas de Santa María de Jesús, (Chiclana, Cádiz).

CEPAS	LUGAR DE AISLAMIENTO	MEDIO DE CULTIVO	COLORACION
S2BC-4	SVP	OS	Rojo
S2BC-5	SVP	25% HM	Rosa
S2BC-6	SVP	25% HM	Roja
S2BC-7	SVP	25% HM	Roja
S2BC-8	SVP	25% HM	Crema
S2BC-9	SVP	20% HM	Crudo
S2BC-10	SVP	20% HM	Naranja
S2BC-12	SVP	20% HM	Marrón
S2BC-13	SVP	20% HM	Marrón
S2BC-15	SVP	20% HM	Roja
S2BC-19	SVP	15% HM	Roja
S2BC-20	SVP	15% HM	Marrón
S2BC-22	SVP	15% HM	Naranja
S2BC-23	SVP	15% HM	Roja
S2BC-24	SVP	10% HM	Marrón
S2BC-27	SVP	10% HM	Naranja
S2BC-28	SVP	10% HM	Rosa
S3BC-2	SC- B	OS	Rojo
S3BC-3	SC- B	OS	Rojo
S3BC-4	SC- B	OS	Rosa
S3BC-5	SC- B	25% HM	Rosa
S3BC-6	SC- B	25% HM	Rojo
S3BC-7	SC- B	25% HM	Rojo
S3BC-8	SC- B	20% HM	Crema
S3BC-9	SC- B	20% HM	Marrón
S3BC-10	SC- B	20% HM	Rojo
S3BC-11	SC- B	20% HM	Rosa
S3BC-18	SC- B	10% HM	Marrón
S4BC-1	SC- C	OS	Rojo
S4BC-2	SC- C	OS	Rojo
S4BC-3	SC- C	OS	Rosa
S4BC-4	SC- C	25% HM	Rojo

Tabla 7. Cepas seleccionadas procedentes de las salinas de Santa María de Jesús, (Chiclana, Cádiz).

CEPAS	LUGAR DE AISLAMIENTO	MEDIO DE CULTIVO	COLORACION
S4BC-5	SC- C	25% HM	Rojo
S4BC-6	SC- C	25% HM	Rosa
S4BC-8	SC- C	20% HM	Incolora-rojo
S4BC-9	SC- C	15% HM	Crudo
S4BC-12	SC- C	15% HM	Rosa

*AC, agua cristalizador; AVP, agua Vuelta del Periquillo; SC, sedimento cristalizador; SVP, sedimento Vuelta del Periquillo. (réplicas: A, B, C)

2. TAXONOMÍA POLIFÁSICA

En la taxonomía polifásica se aúnan criterios fenotípicos y moleculares de los organismos. Su uso permite que la identificación sea más completa y precisa, ya que se dispone de mayor información acerca del microorganismo objeto de estudio y de las relaciones que se establecen con otros microorganismos, permitiendo la clasificación según un conjunto de criterios más amplio y, por tanto, con menor posibilidad de error.

2.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

Para la caracterización de las cepas se realizaron pruebas de identificación: morfológicas y de cultivo, fisiológicas, bioquímicas, nutricionales y de susceptibilidad a agentes antimicrobianos, tal y como se determina para la descripción de microorganismos (Oren, 2012, Oren, et al., 2009, Oren, et al., 1997).

Como medio base se utilizó el medio HM a 20 % ó 10 % p/v de sales totales (Rodríguez-Valera, et al., 1981), según fuese determinado inicialmente como el óptimo para las cepas seleccionadas. El pH se ajustó a 7.3 con NaOH 5 N y la temperatura de incubación fue 37 °C. Todas las pruebas para la caracterización fenotípica fueron realizadas por duplicado.

2.1.1. Pruebas morfológicas y de cultivo

Morfología colonial

Se observó el aspecto de cada una de las colonias de los microorganismos aislados: borde, forma, tamaño y coloración de la colonia. La observación se realizó a partir de las cepas que se sembraron en placas de los medio HM o OS sólido, tras 10 días de incubación a 37 °C.

Estudio microscópico (óptico y de transmisión electrónica)

Estudio al microscopio óptico

a) Tinción de Gram

Se realizó la tinción de Gram para poder observar la morfología del microorganismo y clasificar a los mismos en base a su comportamiento tintorial, distinguiendo Gram positivos y Gram negativos.

La tinción se realizó según la modificación de Hucker (Hucker, 1927) usando cristal violeta y safranina y de Dussault (Dussault, 1955), en la cual se utiliza una solución de ácido acético al 2% para la fijación y posterior eliminación de la sal. Se utilizaron cultivos jóvenes en medio HM.

Para realizar la tinción de Gram es necesaria la utilización de los siguientes colorantes:

CRISTAL DE VIOLETA

- Cristal de violeta 1 g
- Alcohol etílico 5 mL
- Agua destilada 95 mL

LUGOL

- Yodo metálico 1 g
- Yoduro potásico 2 g
- Agua destilada 300 mL

SAFRANINA

- Safranina 1 g
- Agua destilada 100 mL

b) Test KOH

Aunque en sí no es una técnica basada en la observación al microscopio, se introdujo para confirmar la tinción de Gram (Figura 17).

Para realizar dicho test (Cerny, 1976), se procede de la forma siguiente:

- Preparar una solución acuosa de hidróxido potásico al 3 % (p/v).
- Colocar una o dos gotas de la solución sobre una placa de vidrio o sobre un portaobjeto limpio.
- Tomar una o varias colonias, dependiendo del tamaño, de un cultivo relativamente joven.
- Suspender dicha masa bacteriana sobre la gota de la solución alcalina y observar en pocos segundos la presencia o no de viscosidad haciendo movimientos circulares con el asa de Platino, con la que se tomó la colonia, y levantándola un par de centímetros lentamente.

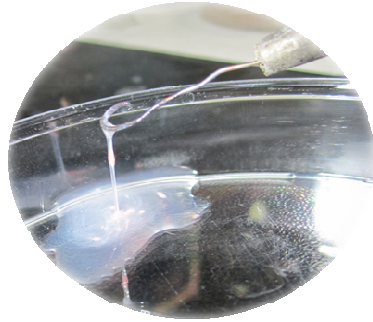


Fig.17. Test KOH positivo.

Los microorganismos Gram-negativos tornan la suspensión viscosa, de forma que se generará un filamento de aspecto mucoso al retirar el asa, lo cual es debido a que el KOH es capaz de romper la pared celular de los Gram negativos, liberando en consecuencia el DNA, quien genera la viscosidad. Por el contrario, si la gota permanece líquida, y no se forma ese hilo viscoso, será una bacteria Gram-positiva.

c) Movilidad

Se observó la movilidad de cada cepa por el método de gota pendiente, utilizando para ello cultivos con un mínimo de 72 horas en su medio de origen: HM o OS líquido.

Microscopía transmisión electrónica

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) se utilizó para examinar la morfología de las cepas de nueva descripción. Las muestras se prepararon a partir de un cultivo joven crecido en el medio establecido como óptimo. Se inoculó 1 mL en matraces de 500 mL con 200 mL de medio, incubándose durante 5 días a 37 °C.

Tinción negativa

Esta técnica fue realizada en el Laboratorio de Preparación de Muestras Biológicas del Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Instrumentación Científica (del Centro de Investigaciones Biomédicas, CIBM) de la Universidad de Granada. Se utilizó el acetato de uranilo al 1% p/v, colorante que actúa a pH ácido, con la muestra de medio de cultivo filtrada y resuspendida en solución salina al 2 M.

Debido a la complejidad para teñir las arqueas seleccionadas, se decidió realizar pequeñas modificaciones en el protocolo estándar. Por ello, en el caso de las muestras procedentes de arqueas, la gota de cultivo joven fue depositada sobre la rejilla, de modo inverso a las muestras de bacterias. Ambas fueron preparadas como soporte con una película de Formvar 1595-E (Serva), donde la manipulación fue delicada por la facilidad de desprender el flagelo del cuerpo celular. Pasados 5 minutos para la adhesión de las partículas, se retira el exceso y se procedió a realizar dos lavados en agua bidestilada de un minuto cada uno. Para generar el contraste en la imagen se añade el colorante Acetato de uranilo al 1% p/v durante 1 minuto. Las observaciones de se realizaron en un microscopio electrónico de transmisión (CARL ZEISS LEO 906E) a 80 Kw.

2.1.2. Pruebas fisiológicas

Crecimiento en medio líquido

Se determinó en tubos de ensayo con 10 mL de medio HM. El tiempo de incubación fue de 72-96 h., sin agitación. Los tipos de crecimiento observados se clasificaron como: homogéneo, velo superficial o precipitado en el fondo.

Crecimiento a diferentes temperaturas

Se estudió el crecimiento a diferentes temperaturas: 4 °C, 22 °C, 35 °C y 50 °C. Las cepas se sembraron en placas con medio HM, por siembra en gota. Los resultados se determinaron después de 2 semanas de incubación, considerando positivo el desarrollo de las placas.

Crecimiento a diferentes pH

El rango de pH, en el cual el microorganismo es capaz de crecer, se determinó en placas por siembra en gota utilizando el medio HM con el porcentaje de sales óptimo para el crecimiento de cada cepa. Los distintos pH utilizados fueron: 4, 5.5, 7, 8.5 y 10. Para mantener el pH constante durante el tiempo de incubación se añade tampón $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{KH}_2\text{PO}_4$, debido a que pH extremos y concentraciones salinas elevadas no se podría garantizar un valor de pH constante sin ayuda de tampones (Sorokin, 2005). La lectura se realiza a las 2 semanas, considerando la prueba positiva cuando existía desarrollo colonial.

Crecimiento a diferentes concentraciones de sal

Se estudió el crecimiento del microorganismo a: 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5, 25 y 30 % p/v de concentración salina de Subov. Para ello se preparó el medio HM sólido a las diferentes concentraciones de sal, se inocularon cepas seleccionadas en los medios preparados y se incubaron en estufa a 37 °C. El desarrollo de colonias se consideró el test como positivo. La lectura se realizó a los 15 días y aunque en elevadas concentraciones se comenzaron a generar pequeños

cristales de sal. Sin embargo, fue posible la observación del crecimiento por turbidez (Rodríguez-Valera, et al., 1983).

Crecimiento en ausencia de magnesio

Se investigó la capacidad de las cepas para crecer en ausencia de Magnesio en el medio de cultivo. Para lo cual como sustituto de la fuente de sulfatos se le añadió Na_2SO_4 (Rodríguez-Valera, et al., 1983) al medio HM, en el porcentaje de salinidad óptimo para cada cepa. La siembra se realiza por el método en gota, el cual se realiza a partir de un inóculo en solución salina al 2 M y a 0.5 de la escala de Mc Farland. Se depositó una gota de 100 μL en el medio de cultivo sólido, dejándose evaporar antes de incubar las placas.

Crecimiento en anaerobiosis en presencia de arginina

Se determinó la facultad de crecer en un ambiente anaeróbico producido por la arginina. Para ello la prueba se desarrolló en tubos de medio líquido rellenos casi completamente con el medio apropiado y suplementado con arginina (Tabla 8). Una vez inoculado se añadió parafina líquida estéril.

Tabla 8. Medio HM suplementado.

Arginina	5 g
Tampón:	
NH_4Cl	0.5 g
KH_2PO_4	0.05 g
* C.S.P.	1000 ml

Es recomendado añadir un buffer para prevenir los cambios drásticos de pH que pueden producirse. Los tubos son incubados en oscuridad y tras 7 a 10 días se observará la turbidez del medio comparándolo con un tubo crecido sin la arginina.

2.1.3. Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas se realizarán a partir de un cultivo joven, del cual se realiza un inóculo al 0.5 en la escala Mac Farland, exceptuando las pruebas de catalasa y oxidasa, para las cuales se parten directamente de una colonia aislada.

Determinación de presencia o ausencia de enzimas

Catalasa

Casi todos los microorganismos aerobios, microaerófilos y anaerobios facultativos poseen la enzima responsable de la hidrólisis del H₂O₂ de 10 volúmenes desdoblándola en H₂O y O₂. Para la detección de la catalasa, se partió de masa colonial procedente de un cultivo sólido joven, la cual se depositó en un portaobjetos. La generación de burbujas dio como positiva esta prueba.

Oxidasa

Se determinó la presencia o ausencia de la enzima del Citocromo C en la cadena transportadora de electrones. La prueba se realizó de acuerdo a lo descrito por Kovacs (Kovacs, 1956). Se depositó una gota de reactivo de oxidasa (solución acuosa de tetrametil-p-fenilendiamina al 1 %) sobre un papel filtro, en el que se había realizado una extensión de un cultivo joven. La reacción se consideró positiva cuando apareció un color púrpura intenso antes de los 10 segundos.

Pruebas de hidrólisis

Mediante esta prueba se pone de manifiesto la presencia de determinadas enzimas que actúan hidrolizando los diferentes sustratos que se adicionan al medio:

- a) **Hidrólisis del almidón**: De acuerdo a Cowan y Steel al medio HM se le agregó almidón soluble al 1 % (Cowan & Steel, 1982). Se sembraron 4 microorganismos por placa, incubándose durante 15 días. La lectura se

realizó agregando lugol sobre el medio, de modo que la formación de un halo incoloro alrededor del crecimiento indicó la hidrólisis del almidón.

b) Hidrólisis de la gelatina: Se utilizó el método de Frazier modificado (Frazier, 1926). Para ello se agregó gelatina al 1% al medio sólido de elección (Sneath & Collins,

c) 1974). Durante 2 semanas se incubaron las placas inoculadas con 4 cepas por placa a 37 °C. La lectura se realizó agregando sobre el cultivo reactivo de Frazier (Tabla 9), la formación de un halo transparente dio la prueba como positiva.

Tabla 9. Reactivo de Frazier.

Cloruro mercuríco	12 g
HCl concentrado	16 mL
Agua destilada	80 mL

d) Hidrólisis del tween: Esta prueba se determinó agregando al medio basal sólido Tween80 esterilizado por separado a una concentración del 1 % (Sierra, 1957). La incubación a 37 °C se realizó durante 15 días. La acción de la esterasa se muestra por la presencia de halos opacos alrededor del crecimiento debido a la precipitación de la sal cálcica del ácido oleico liberado.

e) Hidrólisis de la caseína: Se utilizó el método modificado de Hasting (Ventosa, 1980). Para ello se esteriliza el medio skin milk doblemente concentrado (Difco™ Ref. 232100) y medio HM a la concentración salina demandada para cada cepa. Previa disminución de la temperatura a 55 °C aproximadamente, se mezclaron asépticamente ambos medios y se

distribuyeron en placas de Petri estériles. Se inocularon ocho cepas de microorganismos por placa mediante el método de la gota, para lo cual se depositó en el medio sólido 50 μ L de cultivo joven. Tras 15 días de incubación a 37 °C, se realizó la lectura. La producción o no de halos de aclaramiento alrededor del microorganismo ensayado, determinó la presencia o ausencia de proteasas que actúan sobre la caseína presente en el medio, generando polipéptidos y/o aminoácidos.

β -galactosidasa, ONPG

Para determinar la presencia de la β -galactosidasa, enzima presente en microorganismos fermentadores de lactosa, se utilizaron los discos de ONPG (O-nitrofenil- β -D-galactopiranosida, Fluka 49940). La lactosa puede ser fermentada de manera rápida (18 - 24 horas), lenta, o puede no ser fermentada. Los microorganismos que la fermentan rápidamente poseen 2 enzimas: β -galactosidasa permeasa, la cual está localizada en la membrana celular y está involucrada en el transporte de la lactosa, y la β -D-galactosidasa, que es intracelular y está involucrada en la hidrólisis de la lactosa en dos azúcares: galactosa y glucosa. Los microorganismos fermentadores lentos de lactosa, son deficientes en β -galactosidasa permeasa pero no en β -D-galactosidasa, y los microorganismos no fermentadores no poseen ninguna de las 2 enzimas. Los discos contienen O.N.P.G. (orto-nitrofenilgalactopiranosido), el cual posee la propiedad de penetrar rápidamente al interior de la célula bacteriana, sin la necesidad de utilizar la β -galactosidasa permeasa, y allí es metabolizado por la β -D-galactosidasa, liberándose o-nitro-fenol, compuesto de color amarillo. Esta prueba no diferencia entre una u otra β -galactosidasa (Becker & Evans, 1969, Sanbrook, et al., 1989).

Para la realización de la prueba, se prepararon pequeños botes con tapón de rosca con solución salina 2 M, donde se deposita una colonia aislada procedente de los medios sólidos hasta obtener una turbidez de 1 en la escala Mac Farland. En condiciones de esterilidad, se introduce un disco de ONPG y se incuba a 37 °C

durante 24-48 horas, de manera que la aparición de una coloración amarilla da como positiva esta prueba.

Producción de indol

Mediante esta prueba se detecta la liberación de indol en un cultivo bacteriano. Dicha liberación se debe a la degradación del aminoácido triptófano por el enzima triptofanasa en un medio con el porcentaje salino adecuado, 1 % de extracto de levadura y 1 % de Triptona (OXOID L42) (Rodríguez-Valera, et al., 1981). Para el desarrollo de esta prueba el microorganismo se cultivó durante 7 días en medio HM y para realizar la lectura fue necesario añadir 0.5 mL de reactivo de Kovacs (Tabla 10) por tubo (Cowan, 1974). La aparición de un anillo rojo en la superficie del medio indicó la presencia de indol.

Tabla 10. Composición del reactivo de Kovacs.

Alcohol amílico o isoamílico	25 mL
P-dimetilamino-benzaldehído*	10 g
HCl (concentrado)	75 mL

* C.S.P. 1000 mL

**El aldehído se disuelve en el alcohol calentado suavemente al baño María, posteriormente se enfría y tras enfriar se le añade el ácido

Reducción de nitrato a nitrito y producción de N₂

Se estudió la reducción de nitratos a nitritos y/o a gas, es decir, la presencia o ausencia de las enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa. Para ello se utilizó el medio HM con la concentración salina establecida, más 0.1 % de KNO₃. El medio se

distribuye en tubos de hemólisis y se esteriliza en autoclave a 112 °C durante 30 minutos. Tras ser inoculados, se incuban a 37 °C durante 2 semanas.

Para la lectura se añade 0.5 mL de los reactivos A y B (Tabla 11) respectivamente a cada tubo. Tras dejar un par de minutos los tubos a temperatura ambiente se puede observar la aparición de color rojo escarlata que indica la presencia de nitritos en el medio, por tanto, la presencia en el medio de nitritos, debido a la reducción de los nitratos por acción de la *nitrato reductasa*. En los casos donde no apareció color, se adiciona al medio, trazas de granalla de Zinc para detectar la existencia o no de nitratos. De forma que una nueva ausencia de color indica que todo el nitrato ha sido reducido inicialmente a N₂ que se libera a la atmósfera (este microorganismo posee tanto *nitrato* como *nitrito reductasa*). Por el contrario, la aparición de color rojo indica la existencia de nitratos en el medio y en consecuencia la ausencia de ambas enzimas.

Tabla 11. Composición de los reactivos A y B (Bachmann & Weaver, 1951).

Reactivo A	0.5 % p/v de α-naftilamina
	Ácido acético 5 N
Reactivo B	0.8 % p/v de ácido sulfanílico
	Ácido acético 5 N

*Se facilita la disolución de ambos reactivos por calentamiento leve.

Producción de ácidos a partir de diferentes sustratos: azúcares y alcoholes

Se utilizó caldo HM suplementado con 1 % del sustrato de prueba. Los tubos deben contener 10 mL de medio y se inocularon e incubaron durante una semana. Para la lectura debe agregarse una gota de una solución de rojo fenol (0.04 % fenol en H₂O destilada) y la presencia de ácidos derivados de la fermentación de los diferentes sustratos (Tabla 12) se indica por la coloración amarilla del medio, ya que

el pH disminuye al fermentar los diferentes sustratos ensayados (Rodríguez-Valera, et al., 1983).

Tabla 12. Sustratos utilizados en la producción de ácidos por fermentación.

Azúcares	D(+) Glucosa	Lactosa	D(+)Xilosa
	D (-) Fructosa	D (+) Galactosa	Maltosa
	L (+)Arabinosa	D (+) Celobiosa	Almidón
	D (+) Manosa	D (+) Rafinosa	L (+) Ramnosa
Alcohol	Manitol	Glicerol	Sorbitol

2.1.4. Susceptibilidad a antibióticos

Clasificación previa de microorganismos

Ciertos agentes antimicrobianos nos pueden ser de ayuda para realizar una primera clasificación de los microorganismos, en arqueas o bacterias, por la sensibilidad a los mismos. Estos agentes antibióticos deben ser adicionados a medio líquido para obtener una concentración de 10 g/mL. Los antimicrobianos utilizados son:

- **Penicilina G:** la mayoría de arqueas son resistentes, ya que inhibe la formación de la pared celular impidiendo a distintos niveles la síntesis del péptidoglicano (Purdy, et al., 2004)
- **Bacitracina:** inhibe el crecimiento de arqueas y bacterias Gram positivas, debido a su acción sobre la pseudomureina y otros polímeros de la pared celular, afectando así mismo, a los lípidos isoprenoides diester (Bardavid, et al., 2007, Kandler, 1994, Mescher, et al., 1976).

- Anisomicina: inhibe el crecimiento de las arqueas, ya que actúa a nivel de la transducción de proteínas arqueales (Bardavid, et al., 2007, Irihimovitch & Eichler, 2003).

En el desarrollo de esta prueba, para cada cepa microbiana se utilizó el medio de cultivo dónde se había aislado y a dicho medio se le adicionó el antibiótico (Al ser un péptido no puede ser autoclavado, por lo que se debe añadir antes de repartir el medio, cuando éste no supere una temperatura de 55 °C). Las concentraciones a las que se realiza este estudio fue de 10 g/L (Bardavid, et al., 2007). La disolución del antibiótico se realiza en agua destilada, excepto la anisomicina, que posee una mayor solubilidad en etanol.

En el caso de la penicilina G y la bacitracina se trabaja con medios sólidos, considerando resistente el microorganismo cuando es capaz de desarrollar colonias en el medio. Mientras que con la Anisomicina se trabaja en medio líquido, por lo que la resistencia viene medida por la absorbancia recogida en un espectrofotómetro (Cintra 10e, UV-Visible Spectrometer) a una longitud de onda de 600 nm.

Estudio de la susceptibilidad a antibióticos por difusión en agar

Se siguió la metodología de Kirby-Bauer (Bauer, et al., 1966), la cual emplea el medio base HM y la técnica de difusión de los discos impregnados con antibiótico. Este método se basa en la medida de la inhibición del crecimiento de un microorganismo en la superficie de una placa de agar. El método estandarizó al máximo cada uno de los factores que influyen en el diámetro del halo de inhibición, tales como densidad del inóculo, pH del medio, difusión del antimicrobiano y concentración del disco. Se trabaja con discos de 6mm de diámetro OXOID®, siendo ensayados los siguientes antibióticos (Oren, et al., 1997):

- Penicilinas A: Ampicilina (10 µg/mL)
- Penicilinas G: Penicilina G (10 U)

- Macrólidos (MLS): Eritromicina (15 µg/mL)
- Rifamicinas: Rifampicina (30 µg/mL)
- Fenicoles: Cloranfenicol (30 µg/mL)
- Aminoglucósidos: Neomicina (10 µg/mL)
- Quinolonas: Norfloxacin (10 µg/mL),
Ciprofloxacina (5 µg/mL)
- Aminocumarina: Novobiocina (30 µg/mL)
- Polipéptidos: Bacitracina (10 U)

La metodología seguida fue la siguiente:

- Preparación del inóculo: Se incubó el microorganismo problema en medio líquido en la salinidad en la que se había aislado, durante 72 horas aproximadamente. A partir de estos medios líquidos se crearon inóculos, en soluciones salinas al 2 M con una carga microbiana equivalente a una turbidez del 0.5 en la escala Mc Farland.

- Siembra del inóculo: Se siembra el inóculo sobre la superficie de una placa de agar del medio MH en una concentración de sal idónea. Se deposita 300 µL del inóculo en la placa y extendemos con un escobillón estéril (Colwell, et al., 1979).

- Aplicación de los discos: Los discos fueron colocados con pinzas flameadas con alcohol sobre la superficie de la placa, previamente inoculada con el caldo de cultivo, procurando no tocar con las pinzas la placa y efectuando una ligera presión sobre el disco. Se dejaron las placas aproximadamente 15 minutos a 4 °C para la pre-difusión del antibiótico. Se utilizó la "regla del 15-15-15", en la cual se establece que el inóculo debe de ser usado antes de 15 minutos después de su preparación; debe de ponerse el disco de antibiótico antes de que trascurren 15 minutos de la siembra del inóculo y debe de meterse en la estufa después de los 15 minutos de la pre-difusión del antibiótico a 4 °C.

- Incubación de las placas: Las placas se protegen cerradas, para evitar la excesiva desecación del medio y la posible precipitación de sales, y se incuban a 37 °C durante 7 días.

- Interpretación: Se mide el halo de inhibición con una regla incluyendo el diámetro del disco. El microorganismo es resistente, intermedio o sensible al antibiótico, según la comparativa de las tablas de referencia facilitadas por el servicio técnico de BioMeriux y el valor del halo de inhibición (CMI) de la cepa en estudio. En la tabla 13 se muestran los valores de los diámetros y su relación con respecto al comportamiento del microorganismo.

Tabla 13. Valores en mm de los diámetros de los antibióticos (CMI).

ANTIBIOTICO	RESISTENTE	SENSIBLE
Ampicilina 10 µg	</=11	>/=14
Bacitracina 10 U	-	>13
Cloranfenicol 30 µg	</=17	>/=17
Ciprofloxacina 5 µg	</=19	>/=22
Eritromina 15 µg	</=18	>/=21
Neomicina 10 µg	</=15	>/=17
Norfloxacinina 10 µg	</=19	>/=22
Noboviocina 30 µg	</=12	>/=16
Penicilina 10 U	</=27	>/=30
Rifampicina 30 µg	</=18	>/=22

2.1.5. Pruebas nutricionales

Con este conjunto de pruebas, se pone de manifiesto la versatilidad metabólica de los microorganismos para utilizar diferentes tipos de sustratos como única fuente de carbono y energía.

Utilización de carbohidratos, alcoholes y ácidos como única fuente de carbono nitrógeno y energía

Para los estudios nutricionales se utilizó una modificación del medio mínimo (Oren, et al., 2009, Rodríguez-Valera, et al., 1981), cuya composición es: 20 % o 10 % p/v de sales totales más 0.5 g/L de NH₄Cl, 0.05 g/L de KH₂PO₄, los cuales actuarán a modo de tampón. El pH debe ser ajustado a 7.3 con NaOH 5N. Antes de ser esterilizado el medio debe filtrarse y luego se agregan los sustratos a la concentración adecuada. Los sustratos deben agregarse a la concentración de 0.2 g/L los carbohidratos y 0.1 g/L los alcoholes y ácidos orgánicos. La esterilización del medio con los sustratos se realizó en autoclave a 112 °C durante 30 minutos.

- Carbohidratos ensayados: D (+) glucosa, lactosa, D (+) xilosa, D (+) galactosa, maltosa y L (+) arabinosa.
- Alcoholes ensayados: glicerol, manitol y sorbitol.
- Ácidos orgánicos ensayados: succinato, malato, piruvato y citrato.

Utilización de aminoácidos como única fuente de carbono nitrógeno y energía

Se sigue la misma metodología indicada para las pruebas nutricionales anteriores, pero se utiliza un medio base (Tabla 14) desprovisto de fuentes inorgánicas nitrogenadas (Ventosa, et al., 1982a) con la siguiente composición:

Tabla 14. Composición del medio basal de sales.

<i>Sales</i>	<i>Cantidades</i>
NaCl	200 g
KCl	2 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
Agua destilada	c.s.p. 1000 mL

Se debe ajustar el pH del medio a 7.3 con NaOH 5 N o HCl 1 N, antes de esterilizar el medio en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Los aminoácidos se agregan por filtración con un filtro cuyo diámetro de poro sea 0.22 µL al medio basal de sales estéril a una concentración de 0.1 %.

Aminoácidos ensayados: L-lisina, L-alanina, L-aspartato y L-glicina.

En ambas pruebas de utilización de sustratos como única fuente de carbono y energía los tubos se sembraron a partir de un inóculo de un cultivo en el medio HM de 96 horas de crecimiento depositado en la solución de sales sin sustrato. Para la lectura se debe contar con un medio control cuya base sea sin sustrato inoculado al mismo tiempo que los tubos de la prueba. Los tubos positivos se determinaron por turbidez transcurridos de 7 a 10 días de incubación a 37 °C.

2.2. TAXONOMÍA NUMÉRICA

Los resultados obtenidos en las pruebas taxonómicas se codificaron como positivos o negativos asignándoles respectivamente el valor de 1 ó 0, mientras que para resultados variables se les dio el valor 9. Para el análisis numérico se seleccionaron una media de 69 pruebas siendo eliminadas las que presentaban resultados idénticos para las cepas estudiadas, lo que indica caracteres no discriminatorios (Sneath & Sokal, 1973). La batería de pruebas seleccionadas para realizar el análisis numérico fueron: determinación de morfología, comportamiento a la tinción de Gram, movilidad, detección de presencia de enzimas, rangos de crecimiento a diferentes valores de temperatura, pHs y porcentajes de salinidad, presencia de magnesio, tipo de crecimiento desarrollado en el medio óptimo, capacidad de producción de ácido y utilización como única fuente de carbono diferentes tipos de sustratos y comportamiento ante la presencia de diferentes antibióticos. El coeficiente de correlación utilizado fue el “simple matching” que elaboraron Sokal y Michener (S_{SM}), el cual incluye tanto las concordancias positivas como las negativas (Sokal y Michener, 1958), debiendo compararse microorganismo con microorganismo.

Una comparación entre los OTUs (“Operational Taxonomic Unit”) A y B podríamos expresarla como sigue:

		Resultados OTU A	
		+	-
Resultados OTU B	+	a	b
	-	c	d

En este caso a y b indican concordancia (a concordancias positivas y d concordancias negativas), mientras que b y c señalarían la discrepancia.

$$S_{SM} = \frac{a+d}{a+b+c+d}$$

Procesamiento de los datos

Los datos se analizaron empleando, el coeficiente de agrupamiento simple S_{SM} (Sokal & Michener, 1958) como hemos indicado anteriormente.

El análisis numérico se realiza por medio del programa TAXAN (The Numerical Taxonomy Program-Release) 2.0, desarrollado por el instituto de Biotecnología de Maryland, EEUU. Se define como un programa de clasificación taxonómica basado en características similares. El programa nos permite obtener una matriz de distancia o semejanza. La agrupación se realiza utilizando la técnica de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Mean Average) (Sneath & Sokal, 1973). Las cepas, con similitudes en sus características, son agrupadas en entidades conocidas como fenones.

2.3. ESTUDIO GENOTÍPICO. TAXONOMÍA MOLECULAR

Las técnicas de biología molecular resultan hoy día de gran ayuda en la clasificación de los microorganismos, ya que los resultados son objetivos, se pueden medir y, además, es posible comparar microorganismos muy diferentes o casi idénticos. La aplicación de éstas técnicas, basadas en la información de los genomas bacterianos y la obtención de sus resultados, es una herramienta muy útil para la identificación de microorganismos.

2.3.1. Extracción de DNA cromosómico

KIT de extracción de DNA “DNeasy” de Quiagen®

Este método de extracción de DNA fue aplicado a una selección de cepas, que tras su elección en los dendogramas desarrollados con el TAXAN 2.0 (Sneath & Sokal, 1973) por la posición que ocupaban y las características morfológicas y de cultivo, fisiológicas, bioquímicas y nutricionales, son considerados los más interesantes para la obtención de su secuencia parcial. Para la extracción y purificación del DNA microbiano se siguió el protocolo modificado del Kit DNeasy® adaptado y modificado para bacterias de Quiagen®. Para cada cepa:

1. Se realiza un cultivo en medio líquido idóneo.
2. Se obtiene un precipitado de células del medio líquido donde ha crecido, para lo cual se centrifuga a 4.800 rpm (Centrifuga BECKMAN GS-15R, rotor S4180) durante 40 minutos.
3. Al pellet se resuspende en 200 µL de Buffer de lisis enzimática (Tabla 15).
4. Se incuba durante 1 hora a 37 °C con agitación.
5. Se añaden 25 µL de proteinasa K y 200 µL del Buffer AL (sin etanol) y se mezcla con el vortex. (No añadir la proteinasa K directamente al Buffer AL).
6. Se añaden 200 µL de etanol (96 - 100 %) a la muestra, y se mezcla bien por medio del vortex. Es importante que se mezcle bien, quedando una mezcla

homogénea. Puede formarse un precipitado blanco después de la adición del etanol, este precipitado no interfiere en el buen funcionamiento del kit.

7. Se pipetea la mezcla anterior en una columna y se centrifuga a $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) durante 1 min. Descartar el filtrado y el tubo colector.
8. Se coloca la columna de filtración en un nuevo tubo colector. Se añade 500 μL de Buffer AW1. Centrifugar durante 1 min a $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm). Descartar el filtrado y el tubo colector nuevamente.
9. Colocar la columna de filtración en un nuevo tubo colector.
 - ✓ Añadir 500 μL Buffer AW2, y centrifugar durante 2 min a $\geq 20000 \times g$ (14000 rpm).
 - ✓ Quitar el sobrenadante y centrifugar nuevamente a 14000 rpm durante 1 min. Descartar el filtrado y el tubo colector.
10. El Buffer AE se incuba a 37 °C durante 5min.
 - ✓ Una vez que esté caliente, se añade 200 μL y se centrifuga durante 1 min a $\geq 6000 \times g$ 8000 rpm.
 - ✓ Añadir nuevamente 100 μL de Buffer AE a la columna de filtración. Y centrifugar durante 1 min a $\geq 6000 \times g$ (8000rpm).
11. Y por último se carga en un gel de agarosa al 0.8 % para comprobar la cantidad y calidad del DNA extraído. Conservar a 4 °C

Tabla 15. Buffer de lisis enzimática.

<i>Composición</i>	<i>Concentración</i>
Tris.Cl, pH 8.0	200 µL/mL
Sodium EDTA	400 µL/mL
Triton® X-100	200 µL/mL
Lisoenzima*	10 mg/mL
Agua milliQ	c.s.p. 50 mL

*Añadir inmediatamente.

**Conservar a 4 °C.

Método de Marmur modificado (1961)

Con este método se trata de obtener la máxima cantidad de DNA de la mayor pureza, para ello se realiza lo siguiente:

1. Se parte de un cultivo de 250 mL de medio líquido (HM al porcentaje de sales del que necesite la cepa, crecida a 37 °C y con agitación). Se centrifuga en frascos de 250 mL (Sorvall) previamente autoclavados, para obtener un sedimento de células a 9000 rpm/ 20 min en una centrifuga refrigerada Sorvall (5-10 °C) con un rotor JA-14.
2. En un Falcon se introduce la masa recogida del cultivo en su fase exponencial.
 - a) ARQUEAS: Añadimos 20 mL de agua milliQ estéril, a continuación se agita, de manera que las paredes celulares se lisen y se libere el DNA.
 - b) BACTERIAS: Para conseguir la lisis de la pared celular se añade 20 µL de lisoenzima e incubamos a 37 °C durante 2 horas.
3. Se añade SDS al 25 %, para facilitar que se lisen las membranas y para conseguir una concentración final de 2.5%. Se incubar a 60 °C durante 10-15 min.

4. Se enfría en hielo durante un par de minutos.
5. Se añade ClNa 5M hasta conseguir una concentración del 1 M.
6. Se añade cloroformo/isoamílico 24:1, 1 volumen. De esta forma se consigue eliminar las impurezas.
7. Se agita enérgicamente y se centrifuga a 7000 rpm, en una centrifuga Beckman GS-6R, durante 15 min. Una vez finalizada la centrifugación se distingue en el Falcon 2 fases, de las cuales se recoge la superior. El sobrenadante se transvasa a otro Falcon.
8. Para poder obtener el precipitado de DNA, es necesario:
 - Adicionar 0.1 volumen de Acetato sódico 3 M.
 - Agitar por volteo.
 - Agregar 0.56 volúmenes de isopropanol, lentamente y voltear con suavidad.
 - Se obtiene una hebra de DNA, que se recoge con una pipeta Pasteur de vidrio y se vierte en un microtubo de 2 mL.
9. Se resuspende el DNA en 1 mL de SSC 1 (citrato sódico).
10. Añadir 50 µL RNAsa y 50 µL de concentración 10mg/mL de Proteinasa K.
11. Se incuba a 60 °C durante 30 min.
12. Se añade 1 volumen de Cloroformo/Alcohol isoamílico/Fenol en la proporción 24:1:1.
13. Se centrifuga a 7000 rpm durante 15 min.
14. Recoger la fase superior y precipitar el DNA con 0.1 volumen de Acetato sódico 3 M a pH 5.2 y 0.56 volúmenes de isopropanol (si buscamos calidad de DNA frente a concentración) o 1 volumen de etanol 96 °C overnight (si por el contrario se prefiere concentración a calidad).
15. Recoger el DNA con una pipeta Pasteur de vidrio, eliminando el exceso de líquido.
16. Se deseca hasta que los disolventes se evaporan.
17. Y por último, se añade 0.5 mL de agua milliQ estéril. Para favorecer la disolución. Se conserva a 4 °C.

2.3.2. Determinación cualitativa y cuantitativa del DNA

Electroforesis en gel de agarosa

Una vez extraído y purificado el DNA de cada cepa seleccionada, a las cuales se les quiere hacer una secuenciación del fragmento 16S DNAr, se debe verificar la pureza y cantidad de DNA extraído. Para lo cual hay que realizar una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, para poder verificar que no hay presencia de RNA y de proteínas, mientras que el de 1.5 % se utiliza para el fragmento de 16S RNA (gen filogenético) procedente de la PCR.

Los pasos para realizar la electroforesis comienzan con la preparación del gel de agarosa al 0.8 %. Una vez introducido el gel de agarosa en la cubeta de electroforesis con 1 xTAE, se carga el pocillo del gel con 2 μ l DNA junto con 2.5 μ l del tampón de carga. Esta cubeta de electroforesis la conectaremos a la fuente de alimentación a 100 V. durante 30 min. De modo que el gel correrá del polo negativo al positivo debido a las cargas del DNA. Una vez que el gel ha corrido, se somete al ultravioleta donde observaremos si la purificación de DNA ha sido correcta.

Determinación por biofotómetro

La cuantificación y determinación de la pureza del DNA genómico microbiano se calculó por medio de un Eppendorf Biophotometro plus, el cual realiza una Espectroscopia de absorción. Por medio de la espectroscopia de absorción, se compara con un blanco (agua milliQ estéril), una dilución de DNA en una cubeta de plástico. Se determinó la concentración de DNA en nuestra muestra expresándola en μ g/mL. La dilución con la que se trabaja está constituida con 45 μ L de agua milliQ estéril y 5 μ L de la muestra de DNA. Dado que una unidad de densidad óptica a 260 nm equivale a 50 μ g/mL de DNA, la concentración final de DNA vendrá definida de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{ABS}_{260} \times 50 \times \frac{\text{Volumen mezcla mL}}{\text{Volumen muestra mL}} = \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

El biofotómetro realiza medidas a D.O. de 230, 260 y 280 nm, de dichas medidas se destaca la fracción 260/280, la cual es un índice cualitativo de la pureza de ácido nucleico, es decir, la ausencia de proteínas, compuestos químicos, etc. El DNA puede considerarse como altamente puro a partir de valores de 1.8.

2.3.3. Determinación del contenido de bases guanina y citosina de DNA. Método de la temperatura de fusión (T_m)

Se determinó la cantidad de guanina y citosinas que hay en el DNA genómico por el método Marmur y Doty (Marmur & Doty, 1962). Esta técnica es muy importante para datos taxonómicos, ya que permite conocer la temperatura de desnaturalización del DNA (T_m) de un microorganismo para poder, posteriormente, realizar una hibridación DNA-DNA.

La desnaturalización térmica, se basa en la temperatura de fusión del DNA, es decir, la temperatura a la cual los triples puentes de hidrógeno que mantienen unida las dos cadenas se fragmentan. Se considera los enlaces de GC y no los de AT, ya que los primeros al ser un triple enlace requiere de mayor energía, en este caso temperatura, que los dobles enlaces de AT, para ser rotos. La separación de las cadenas va acompañada de un marcado incremento en la absorbancia a 260 nm, el máximo de absorción del DNA, y esto puede medirse con facilidad en espectrofotómetro. Cuando una muestra de DNA se va calentando gradualmente, la absorbancia se incrementa a medida que se va rompiendo los puentes de hidrógeno, alcanzando un tope a aquella temperatura en la cual todo el DNA ha pasado a ser

monocatenario. El punto medio de subida, la temperatura de fusión (T_m), es una medida del contenido en G+C. Con lo cual, a mayor contenido en G+C, mayor cantidad de calor que hay que aplicar a un DNA de doble hélice para desnaturalizarlo. La separación de las cadenas viene acompañada de un incremento marcado de la D.O. a una longitud de onda de 260 nm. La pendiente de la curva en la transición térmica está directamente relacionada con la homogeneidad de contenido G+C de la población de moléculas de DNA. A mayor contenido de G+C, mayor T_m . Se debe de destacar, que ninguna preparación de DNA presenta una homogeneidad molecular absoluta, es decir, el contenido de G+C es siempre un valor medio y representa el valor máximo de una curva de distribución normal.

Para el análisis espectrofotométrico se utilizó el equipo Spectrophotometer Lambda 3B, Recorder R 100 A-Perkin-Elmer, USA; así como las cubetas de cuarzo (Hellma 115F-QS) de 0.5 mL de volumen y con tapón hermético para evitar la evaporación de la muestra.

Del DNA, que debía de estar cuantificado, se tomó un volumen en μL , que disuelto en un volumen de 500 μL de SSC 1 de un valor de absorbancia de 1.000 a 1.200 aproximadamente. Para ajustar el cero de espectrofotómetro se utiliza un blanco que será SSC 1. La variación de temperatura se establece en 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, tomando valores de absorbancia a 25 $^{\circ}\text{C}$, 50 $^{\circ}\text{C}$ y a partir de 80 $^{\circ}\text{C}$ hasta los 100 $^{\circ}\text{C}$, minuto a minuto. La temperatura de partida de 80 $^{\circ}\text{C}$ se determina por pruebas iniciales en las cuales no se demostraba cambio significativo anterior a este valor. La velocidad con la que se registran los cambios de absorbancia se establece 5 mm/minuto (SPD).

Se incluyó una cepa de referencia (*Escherichia coli*), para asegurar que los parámetros externos y el funcionamiento del espectrofotómetro era el óptimo.

Análisis de la curva de determinación del G+C y tratamiento de datos

La curva debe cumplir una serie de requisitos de forma que se asegure que el proceso de desnaturalización se llevó a cabo correctamente. A modo de ejemplo mostramos la curva de desnaturalización de *Escherichia coli* (Figura 18), cepa de la cual se tienen valores establecidos.

Para calcular el porcentaje de G+C en cada cepa seleccionada de nuestro estudio, se determinó la temperatura de fusión (T_m) en cada curva obtenida. El T_m es la temperatura donde el 50% de las moléculas de DNA se encuentran desnaturalizadas y se corresponde con el punto medio de la curva. Una vez calculadas las temperaturas de fusión, se calculó el porcentaje G+C con la siguiente expresión: $T_m = 69.3 + 0.4 [G+C (\text{mol } \%)]$

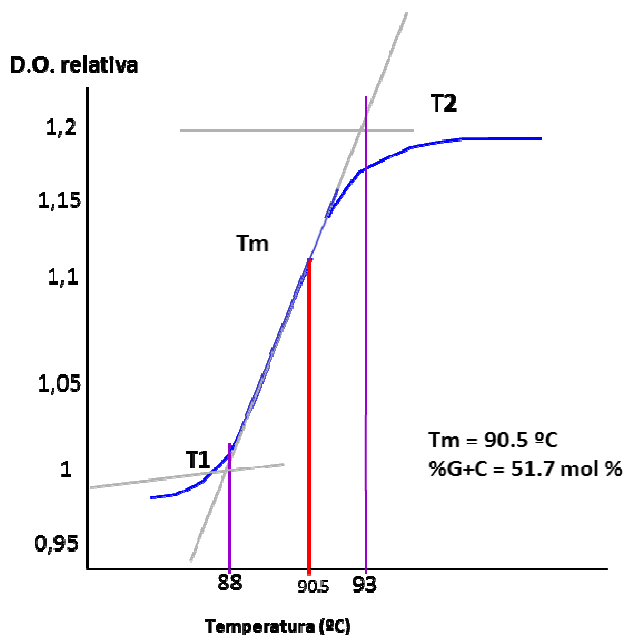


Fig.18. Curva de desnaturalización del DNA de *Escherichia coli*.

2.3.4. Análisis filogenético

Obtención del fragmento del gen del rRNA 16S

La secuenciación del DNA nos permite conocer la secuencia de los nucleótidos de un gen (Sanger, et al., 1977). Mediante la técnica para determinar la secuencia del gen del 16S rRNA, se comparan diferentes secuencias con el objetivo de establecer relaciones entre las secuencias del gen del 16S rRNA comparadas. El gen del 16S rRNA es una molécula evolutiva muy conservada, es una diana universal para la identificación de microorganismos. Su estructura y función han permanecido constantes, pero tiene suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados sino también los más próximos.

Amplificación y purificación del fragmento de 16S rDNA

El DNA que se utiliza para la secuenciación del gen del 16S rRNA, debe tener un alto grado de pureza, para evitar cualquier tipo de error durante el proceso. Una vez obtenido y purificado el DNA de las cepas en estudio se realizó la amplificación del fragmento del gen del 16S rRNA por PCR (Polimerization Chain Reaction), utilizando los oligonucleótidos específicos o cebadores específicos del gen del 16S rRNA de eubacterias (Saiki, et al., 1988) y en arqueas (Kharroub, et al., 2011) sintetizados por Sigma. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Secuencias de oligonucleótidos usados en el presente trabajo.

Nombre	Secuencia (5' -3')	Tipo	Dom.	Orientación
16F27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Amplif.	Bact.	Forward
1525R	AAGGAGGTGATCCAGCC	Amplif.	Bact.	Reverse
F357	CTCCTACGGGAGGCAGCA	Seq.	Bact.	Forward
R519	GWATTACCGCGGCKGCTG	Seq.	Bact.	Reverse
F915	GGGCCCGACAAGCGGTGG	Seq.	Bact.	Forward
D30	ATTCCGGTTGATCCTGC	Amplif.	Arquea	Forward
D56	GYTACCTTGTACGACTT	/ Seq.	Arquea	Reverse

* Dom.: Dominio; Amplif.: Amplificación; Seq.: secuenciación; Bact.: Bacteria

La técnica de amplificación consiste en la incubación del DNA con un exceso de los dos oligonucleótidos y con los cuatro nucleósidos trifosfato, en presencia de la DNA polimerasa. El volumen final de la mezcla de sustratos (Tabla 17) será 25 μL .

Tabla 17. Mezcla de sustratos necesaria para la PCR.

Mastermix (HotStarTaq [®] , QIAGEN [®] , cat.203443)	12.5 μL
Cl ₂ Mg	
Tampón	
dNTPs	
AmpliTaq	
Oligonucleótido F diluido al 1:20	2 μL
Oligonucleótido R diluido al 1:20	2 μL
DNA	* μL
Agua milliQ estéril	c.s.p. 25 μL

* Añadiremos los μl necesarios en función de la concentración y pureza obtenidas para que la concentración final de DNA sea de 50-500 ng.

Las muestras se introdujeron en el termociclador (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems) y se programaron los tiempos en los que se aplican las temperaturas, que varían en función de la procedencia del material genético, arqueas y bacterias. Así pues, cuando trabajamos con arqueas las condiciones de la reacción para la amplificación del gen del 16S rRNA fueron las siguientes: una desnaturalización previa (95 $^{\circ}\text{C}$ - 15 min) seguida de 30 ciclos constituidos por otra desnaturalización (95 $^{\circ}\text{C}$ - 45 s), alineamiento (55 $^{\circ}\text{C}$ - 60 s), y una extensión (72 $^{\circ}\text{C}$ - 2 min), para finalizar los ciclos con una extensión final (72 $^{\circ}\text{C}$ - 7 min). En el caso de las bacterias, las condiciones de esta reacción cambia: comienzan también con una desnaturalización previa (95 $^{\circ}\text{C}$ - 15 min) seguida de 25 ciclos constituidos por otra desnaturalización (95 $^{\circ}\text{C}$ - 60 s), alineamiento (55 $^{\circ}\text{C}$ - 60 s), y una extensión (72 $^{\circ}\text{C}$ - 90 s), para finalizar los ciclos con una extensión final (72 $^{\circ}\text{C}$ - 2 min) (Kumar, et al., 2004). Este proceso se realiza en un dispositivo de regulación automática de temperatura, de modo que en cada ciclo aumenta la abundancia de dobles cadenas de DNA unidas por los cebadores oligonucleótidos. Se produce un crecimiento

exponencial de la concentración de fragmentos que se amplifican, existiendo un número de copias del gen de $2 \times n^{\text{n ciclos}}$.

Los productos de PCR se cargaron en un gel de 1.5 % p/v de agarosa con 5 μ l de muestra, junto con una cantidad de marcador fija. De esta manera se determinó la presencia del producto de PCR, su pureza y la cantidad aproximada del producto según la intensidad de las bandas que se comparan con el marcador. El producto de PCR que nos interesa es del orden de 1500 pares de bases.

El producto resultante de la PCR debe ser purificado mediante la utilización de Amicon® Ultra 0.5 mL de Millipore, para lo cual se seguirán las instrucciones que recomienda el fabricante:

- Añadir 100 μ l de agua miliQ al producto de la PCR y añadirlo a la columna.
- Centrifugar 10 minutos a 10700 rpm (el producto PCR se ha quedado retenido en el filtro).
- Cambiar el filtro a otro eppendorf invirtiendo su posición.
- Centrifugar durante 2 minutos a 2860 rpm, tras lo cual el DNA quedará purificado.

Secuenciación del fragmento de PCR purificado

La preparación de las muestras para secuenciar requiere la máxima pureza del DNA, no estando con otros oligonucleótidos ni con EDTA u otras sales que puedan interferir en el desarrollo de la PCR previa a la secuenciación. Se debe elaborar un volumen final de cada muestra de 12 μ L. La cantidad de oligonucleótidos cebadores (Forward o reverse dependiendo de la parte de secuencia buscada) (Tabla 16) es de 6 a 12 picomoles y la concentración de DNA puro de 30-90 ng. Y mediante agua milliQ estéril se alcanzara el volumen final de 12 μ L.

Los 16S DNA purificados fueron secuenciados en el Servicio de Secuenciación del Instituto López-Neyra (CSIC, Granada) utilizando un secuenciador de DNA modelo Strech Applied Biosystems, siguiendo el protocolo recomendado para la secuenciación cíclica por Polimerasa AmpliTaq^r FS y terminadores (didexionucleotidos) marcados con colorante fluorescentes (kit ABI PRIMSTM BigDye terminator Cycle Sequency Ready Reaction de Perkin Elmer), de acuerdo al método de Sanger (Sanger, et al., 1977). Las secuencias fueron analizadas por el programa Chromas Lite 2.1.

2.3.5. Clonación

Cepas bacterianas y plásmido

La cepa bacteriana y el plásmido usados en el estudio genético del gen del 16S rDNA, fueron las siguientes:

- *E. coli* XL1 blue ampicilina (Bullock, et al., 1987).
- pGEMT (Promega), usado para la clonación de productos de PCR.

Las cepas *Escherichia coli* fueron crecidas a 37 °C en medio LB líquido. Con adicción de antibiótico, o bien ampicilina (5 µg/ml) o tetraciclina (10 µg/ml), para asegurar el crecimiento exclusivo de *E. coli*. Para la obtención de medio sólido se añade 1.5 % de Bacto-agar (Difco).

Transformación bacteriana

Sometiendo a electroporación a las cepas de *E. coli* según el método de Dower (Dower, et al., 1988) conseguimos introducir el gen deseado en el plásmido de esta bacteria. Para ello, las células crecieron en medio líquido (Tabla 18) hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 - 0.8 a una longitud de onda de 600 nm. Se recogieron estas células por centrifugación a 4000 Xg durante 15 min a 4 °C, para a continuación realizar varios lavados con agua bidestilada esterilizada a 4 °C: 1 volumen, 0.5 volúmenes dos veces y 0.02 volúmenes y finalmente, el sedimento se

resuspendió en 0.002 volúmenes de glicerol al 10 % esterilizado por filtración y a 4 °C. Mantener la temperatura es determinante para que el proceso de competencia bacteriano sea satisfactorio.

La electroporación se realizó con 1 µg de DNA diluido en agua bidestilado ausente de sales, para lo cual es necesario filtro de 0.42 µm (Millipore). En la cubeta de electroporación preenfriadas se mezclan 40 µL de células competentes con 1 µg de DNA. Se someten a un pulso de 2500 mV/cm durante 5 mseg, se le añade medio SOC (Tabla 18). Se incuba a 37 °C durante una hora y posteriormente se siembran en LB-agar con el antibiótico de elección (en este caso ampicilina). Se incuban durante 12 - 16 h a 37 °C. La selección de clones recombinantes se realiza de acuerdo al gen que porta el vector y también mediante selección de colonias blancas o azules con vectores como pGEMT, que contiene el gen de la β-galactosidasa capaz de metabolizar el X-Gal (2 %, que está en el medio de cultivo junto al inductor IPTG, 10 mM). Se verificó la presencia del plásmido recombinante extrayéndolo mediante el sistema miniprep de Gibco- BRL.

Tabla 18. Medio SOC.

2 %	Bacto triptona
0.5 %	Extracto de levadura
10 mM	NaCl
10 mM	KCl
Añadir extemporáneamente para 1 L:	
- 2 mM MG ⁺⁺ (1M MgCl ₂ , 1M MgSO ₄)	
- 2 mM glucosa	

Tras la extracción de DNA y amplificación genética por PCR, explica en el apartado anterior, se desarrolla la clonación y secuenciación. En el vector pGEMT (promega) se clonan los fragmentos de PCR que una vez purificados 16S rDNA. La secuenciación se realizó por el método de Sanger (Sanger, et al., 1977), utilizando el “DNA sequencing kit” de Perkin Elmer y la enzima AmpliTaq DNA polimerasa en los

servicios de secuenciación del Instituto López-Neyra (CSIC-Granada), y los cebadores utilizados fueron SP6 y T7.

2.4. ANÁLISIS FILOGENÉTICO BASADO EN LAS SECUENCIAS DEL GEN DEL 16S rDNA

Las secuencias parciales y en un paso posterior, las secuencias totales del gen del rRNA16S, se analizaron en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information), donde el alineamiento global mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) relaciona las secuencias del gen del 16S rRNA de un microorganismo problema con las secuencias del gen RNAr16S ya depositadas e identificadas (Altschul, et al., 1990, Altschul, et al., 1997).

Los árboles filogenéticos se obtuvieron a partir de las matrices de distancia de la secuencia de DNA. Para ello se alinean dos o más secuencias de DNAr y se calcula una distancia evolutiva (E_D) registrando en el ordenador el número de posiciones en la secuencia que ambos difieren, se introduce un factor de corrección estadístico para compensar la posibilidad de que, a través de los diferentes cambios que puedan haberse producido, se obtenga de nuevo la secuencia inicial. La matriz de las distancias evolutivas, generada a partir de la comparación de secuencia, se analiza posteriormente por medio de un programa informático, el Mega 6, diseñado para generar árboles filogenéticos a partir de las medidas de E_D . Lo cual equivale a examinar todas las posibilidades de ramificaciones para el conjunto de distancias comparadas y así disponer de las longitudes de las ramificaciones para ajustar los datos de la mejor manera. La E_D que separa dos organismos es directamente proporcional a la longitud total de las ramas que lo separan (Khatun, et al., 2012, Kumar, et al., 2004, Tamura, et al., 2013).

La reconstrucción filogenética se realizó con el método de Maximum Parsimony (Jukes & Cantor, 1969), cuando partimos de secuencias parciales, ya que este método tiene en cuenta el gasto evolutivo menor que tiene que darse para generar un árbol, así como las mutaciones que puedan haberse producido. Mientras que los arboles creados por Neighbour-Joining son aquellos realizados con secuencias totales. El árbol creado es el más simple, ya que la comparación de las secuencias (2 a 2) fenética genera una matriz de similitud por medio de un algoritmo que genera la similitud en base a la distancia. Las distancias entre las distintas cepas vienen en base al modelo Jukes-Cantor con un Bootstrap de 1000, lo cual significa que el programa da un porcentaje en las ramas en base al resultado de los 1000 árboles diferentes generados.

2.5. HIBRIDACIÓN DNA-DNA

La afiliación filogenética de un organismo nos aclara datos como el parentesco de éste con otros organismos ya secuenciados, así como la naturaleza monofilética de los taxones que se analizan. Sin embargo, la información que contiene este gen es limitada y se encuentra en el umbral de resolución en la circunscripción de una especie procariota. Podemos encontrar variaciones sorprendentes en la secuencia de microorganismos pertenecientes a la misma especie, así como especies claramente distintas con secuencias de 16S rRNA similares y que se encuentran como frontera de una especie bacteriana.

En los últimos estudios centrados en el desarrollo de nuevos métodos basados en todo el genoma (Gevers, et al., 2005, Tindall, et al., 2010), se refleja que actualmente el método definitivo de identificación de una especie es la hibridación DNA-DNA. Las demás técnicas moleculares que, también utilizan todo el genoma, aportan información que confirman los datos obtenidos con la reasociación DNA-DNA entre dos cepas, pero son demasiado nuevas para que hayan sido aceptadas universalmente e incluidas en el proceso de clasificación y delimitación de una especie. Las numerosas especies que actualmente están siendo descritas utilizan la hibridación DNA-DNA como parámetro llave a la hora de definir a una nueva especie, aunque la técnica de secuenciación masiva parcial está comenzando a abrirse paso (Lucena, et al., 2012).

La hibridación DNA-DNA es una medida indirecta de la semejanza de secuencias entre genomas (Ziemke, et al., 1998). En este método se trabaja con secuencias que al ser comparadas en datos de bases, como el BLAST, se observa que la secuencia objeto de estudio comparte una similitud igual o superior al 97 % con secuencias de cepas validadas. Para que dos DNA muestren un mínimo grado de hibridación es necesario que ambas secuencias compartan al menos un 80 % de identidad. Por tanto, entre 0 % y 100 % de similitud se distribuyen genomas que

comparten entre el 80 % y el 100 % de identidad en las secuencias. De forma empírica se ha observado, que una especie procariota agrupa organismos con una similitud interna superior al 70 % de RBR o inferior a 5 °C de ΔT_m . Sin embargo, es muy importante tener en cuenta que estos límites numéricos no son absolutos, y que pueden oscilar entre el 50 % y el 80 % (± 9 °C ΔT_m y ± 3 °C ΔT_m) (Rossello-Mora, 1999, Tindall, et al., 2010).

Marcaje del DNA

Se utiliza el método enzimático de Nick Translation Kit (Roche cat. 10976776001). El objetivo es realizar un doble marcaje con digoxigenina (Roche cat. 11093088910) y con biotina-16-dUTP (Roche cat. 11093070910).

La mezcla de nucleótidos se estructuró de acuerdo a la siguiente proporción:

- 3 vol. de dATP.
- 3 vol. de dGTP.
- 3 vol. de dCTP.
- 2 vol. de dTTP.
- 1 vol. de digUTP:
 - 0.75 vol. de digoxigenina.
 - 0.25 vol. de biotina.

El marcaje se realiza en tubos de 1.5 mL para microcentrífuga, siendo el volumen final de la reacción de 10 μ L. De manera que se agrega a cada muestra:

- *0.7 μ g de DNA para marcar (cuantificado a 0.3 μ g/mL).
- *5 μ L de la mezcla de nucleótidos.
- *1 μ L de tampón.
- *1 μ L de enzima (mezcla enzimática contenida en el Nick Translation Kit).
- *Agua bidestilada c.s.p. 10 μ L.

La reacción se incubó a 15 °C durante 90 minutos para que se produzca el marcaje del DNA.

Precipitación del DNA

Para precipitar el DNA marcado se agregó a la reacción anterior:

- 390 µL de agua bidestilada.
- 45 µL de acetato de sodio 3 M pH 5.2.
- 890 µL de etanol absoluto y puro a -20°C.

Se conserva durante 1 hora a -80 °C, o toda la noche a -20 °C. Para concentrar el DNA se centrifuga a 13000 rpm durante 30 minutos. A continuación, se elimina cualquier resto de etanol de la muestra por evaporación a temperatura ambiente y se resuspende en 100 µL de agua desionizada.

Comprobación del marcaje

La comprobación del marcaje se realiza en microplacas de estreptavidina (Streptavidin-Coated Microtiter plates, (Roche cat. 11645692001). A cada pocillo se agregaron:

- 200 µL de tampón fosfato 0.14 M y 0.2 % SDS pH 6.8.
- 5 µL de albúmina al 4 % p/v.
- 1 µL de DNA marcado y previamente desnaturalizado (15 minutos a 100 °C, y trasladado a agua-hielo inmediatamente para evitar la renaturalización).

Se incubó a temperatura ambiente y con agitación constante durante 1 hora.

Detección del marcaje

Transcurrida la hora de incubación, se elimina el volumen de los pocillos de la microplaca y se lava tres veces con tampón 1. En la última repetición, los pocillos han de secarse muy bien, dejándolos volteados durante unos segundos sobre un papel de filtro. Se adiciona 200 μ L por pocillo de solución de detección. Se vuelve a incubar durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante.

Solución de detección*. Viabilidad de 1 semana

5 μ L de Tampón 1

0.5 % p/v de albúmina

1 μ L de Anti-Digoxigenin-AP, fragments (Roche, cat 11093274910)

Tampón 1 (0.15M NaCl y 0.1M de Ac. maleico) pH 7.5

Autoclavar y guardar a 4 °C

NaCl	4.3 g
Ac. Maleico	5.8 g
NaOH	4.015 g
Agua desionizada	c.s.p. 500 mL

*Es una solución extemporánea, por lo que debe prepararse la cantidad necesaria en cada ensayo.

Revelado

Después de eliminar la solución de los pocillos, se lavaron tres veces con tampón 1, y se secaron del modo anteriormente descrito. Se agregan 250 μ L de solución de revelado y se procede a la lectura de la absorbancia a 405 nm en un lector de ELISA. Inmediatamente se incuba la microplaca a 37 °C durante 30 minutos, transcurrido este tiempo se vuelve a leer la densidad óptica, así como pasadas 1, 2 y 3 horas. Aproximadamente a las 3 horas de incubación, se obtienen los valores óptimos de lectura.

Para el revelado se utiliza una solución extemporánea, que se prepara en el momento de ser utilizada. Se debe calcular la cantidad que se necesita, de acuerdo al número de pocillos, preparando 250 μ L por pocillo.

Solución de revelado.

- 5 mL de Tampón 2
- 5 mL de agua desionizada
- 3.5 μ L de $MgCl_2$ 3M (0.1mg/mL)
- 10 mg de p-nitrofenil fosfato (Sigma, cat. 9389)

Tampón 2: pH 9.6. Guardar un máximo de 15 días a 4°C.

Na_2CO_3	0.795 g
$NaHCO_3$	1.465 g
Agua desionizada	c.p.s. 500mL

Hibridación

Se realiza en tubos para PCR de 0.3 mL donde se adiciona:

- 15 μ g de DNA (purificado y cuantificado a una concentración aproximada de 0.3 μ g/mL).
- 5 μ L de DNA marcado (se pueden utilizar entre 4 y 12 μ L de DNA).
- Agua bidestilada suficiente para completar 72 mL de muestra.

Las muestras se desnaturalizan durante 15 minutos a 100 °C, transcurridos los cuales se depositan en un baño de agua-hielo para impedir la renaturalización durante 15 minutos. Se agregan 28 μ L de tampón fosfato 1 M. Para evitar la evaporación, las muestras se sellan con unas gotas de aceite mineral (Sigma cat. M-3516). Se dejan hibridar durante 16 horas, a una temperatura de 30 °C menor que la T_m de la cepa a hibridar.

Las muestras hibridadas se transfieren a tubos de 1.5 mL para microcentrífuga, eliminando previamente el aceite mineral. Para ello se extrae cuidadosamente la muestra con micropipeta y se desliza sobre un trozo de parafilm,

para eliminar los posibles restos de aceite. Se recoge y se mide con micropipeta el volumen de la muestra, y depositándose en un microtubo limpio.

Equilibrado de la hidroxiapatita

Se prepara la cantidad necesaria de hidroxiapatita (Hidroxyapatite, Bio-Rad Cat 130-0520) para una concentración de 1 g/10 mL de tampón fosfato 0.14 M. Para ello, se homogeniza y se reparte en alícuotas de 1 mL en tubos de 1.5 mL para microcentrífuga. Se centrifugan durante 2 minutos a 13000 rpm, se descarta el sobrenadante y se agrega 1 mL de tampón fosfato 0.14 M. Se agita mediante el vortex y se centrifuga de nuevo manteniendo las condiciones anteriores, nuevamente se descarta el sobrenadante y este proceso se repitió dos veces más.

Finalmente la hidroxiapatita se resuspendió en 1 mL de tampón fosfato 0.14 M y se repartió en alícuotas de 500 μ L (en tubos de 1.5 mL). Cada alícuota se centrifugó en condiciones similares descartando el sobrenadante. Es recomendable equilibrar la cantidad de hidroxiapatita necesaria en el momento en que vaya a ser utilizado.

Purificación de las cadenas

La separación de las cadenas simples y cadenas dobles de DNA se realiza utilizando como soporte la hidroxiapatita. Ya que los ácidos nucleicos se unen a la hidroxiapatita por interacción de los grupos fosfato, de las bases del polinucleótido y los residuos de calcio en la resina. Los ácidos nucleicos pueden ser eluidos en tampón fosfato a temperaturas elevadas (60 °C). Las cadenas dobles de ácidos nucleicos se unen más fuerte a la hidroxiapatita que las cadenas simples y por tanto, son eluidas a concentraciones de fosfato más altas. Normalmente, las cadenas simples de DNA eluyen a concentraciones de fosfato sódico (pH 6.8) entre 0.14 M y 0.16 M y el DNA de doble cadena es liberado a concentraciones de fosfato superiores a 0.4 M.

Cadenas simples

Al volumen de la muestra hibridada incluida en tampón fosfato 0.28 M se agrega una cantidad igual de agua bidestilada, para obtener una concentración de tampón fosfato de 0.14 M. De cada muestra se toman dos alícuotas de 50 μL y se depositan en dos tubos de 1.5 mL con hidroxapatita equilibrada. Los 50 μL de muestra se mezclan cuidadosamente con la hidroxapatita y se incuban durante 15 minutos a una temperatura 35 $^{\circ}\text{C}$ menor que la T_m (a esta temperatura se producen las reasociaciones específicas de las cadenas dobles), de esta manera el DNA se une a la hidroxapatita. Transcurrido este tiempo se centrifugan durante 1 minuto a 13000 rpm los tubos con la muestra y la hidroxapatita.

Los 50 μL de sobrenadante que contiene las cadenas simples se recuperan y reservan en microtubos limpios, La hidroxapatita se vuelven a lavar dos veces con tampón fosfato 0.14 M y 0.2 % p/v SDS, primero con 450 μL y luego con 500 μL . En ambos casos se repitió el mismo procedimiento:

- Agitar suavemente para mezclar el tampón con la hidroxapatita.
- Incubar 5 minutos a una temperatura 35 $^{\circ}\text{C}$ menor que la T_m (Temperatura de fusión).
- Centrifugar 1 minuto a 13000 rpm.
- Recoger el sobrenadante con cuidado de no coger hidroxapatita.
- Lavar con 500 μL de tampón fosfato 0.14 M y 0.2 % p/v SDS
- Incubar durante 5 minutos a una temperatura 35 $^{\circ}\text{C}$ menor que T_m .
- Recuperar el sobrenadante, que contiene las cadenas simples.

De este modo se obtienen dos microtubos con un volumen final de 1000 μL (50 μL + 450 μL + 500 μL) de tampón fosfato 0.14 M y 0.2 % p/v SDS, con las cadenas libres no hibridadas. Mientras que en los microtubos con la hidroxapatita quedan adheridas las cadenas dobles hibridadas.

Cadenas dobles

Para liberar las dobles cadenas fijadas en la hidroxiapatita, se lava con 200 μL de tampón fosfato 0.4 M. La muestra se agita mediante el vortex y se centrifuga 1 minuto a 13000 rpm. El sobrenadante se recupera en un nuevo microtubo. Este procedimiento se repite dos veces, de manera que al final se obtienen dos tubos con 400 μL de tampón 0.4 M respectivamente, que contiene las cadenas dobles hibridadas.

Las cadenas dobles y la muestra patrón se desnaturalizan 10 minutos a 100 $^{\circ}\text{C}$ y se traspasan inmediatamente a agua-hielo durante 15 minutos para evitar la re-naturalización de las cadenas dobles.

Preparación de la curva patrón de DNA

La curva patrón se prepara con 4 μL de DNA marcado en 800 μL de tampón fosfato 0.14 M y 0.2 % p/v SDS. A partir de ahí, se realizan 7 diluciones seriadas tomando cada vez 400 μL de muestra y se deposita en otro tubo con 400 μL de tampón fosfato 0.14 M y 0.2 % p/v SDS.

Lectura de ELISA

Se utiliza un lector de ELISA (Microplate Reader de Behring El 311). La lectura se realiza a una longitud de onda de 405 nm. Las muestras se colocan por duplicado en los pocillos, 200 μL de cadena simple y 200 μL de cadena doble. Se distribuyen varios blancos en distintas posiciones de la placa, que contienen 200 μL de tampón fosfato 0.14 M y 0.2 % p/v SDS. Además, a cada pocillo de la microplaca se agrega 5 μL de una solución de albúmina al 4 % p/v (quedando, ésta al 1 % p/v). La solución de albúmina se utiliza como bloqueante.

Se mantiene dos horas en agitación fuerte y constante a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo y siguiendo el mismo procedimiento empleado para el marcaje, se procede al revelado y detección de la microplaca.

El DNA marcado se une durante las dos horas de incubación a la estreptavidina de la placa de ELISA, por el receptor específico de biotina que lleva en un extremo después de haberlo marcado. En el otro extremo, el DNA tiene digoxigenina, que se une específicamente a la antidigoxigenina que se añade en el proceso de revelado y detección (Figura 19).

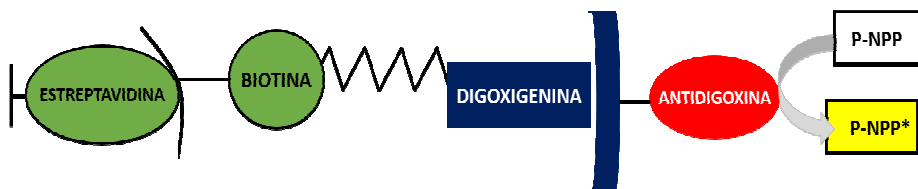


Fig.19. Marcaje del DNA.

Determinación de la concentración de DNA marcado utilizado como patrón

Para obtener la recta patrón del DNA marcado, que nos permitirá saber la concentración en pg de las cadenas simples y dobles de cada muestra, es necesario determinar los pg de DNA de la muestra patrón. El DNA marcado, que está a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se resuspende en 100 μL de agua bidestilada, por lo tanto, por cada mL habrá 5×10^{-3} $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA marcado. De esta dilución, se toman 4 μL y se vuelven a diluir en 800 μL de tampón fosfato 0.14 M + 0.2 % p/v SDS para la preparación de la muestra patrón. De esta manera tenemos 0.02 μg (20 ng) de DNA marcado en 800 μL de tampón. La primera dilución de la muestra patrón que contiene el DNA marcado, tiene una concentración de 0.025 ng/mL. Finalmente, de ésta dilución, se toman 200 μL para depositarlos en los pocillos de la microplaca, por lo que la concentración real será de 5 ng/mL, que expresado en pg correspondería a 5000 pg. A partir de esta muestra se van diluyendo a la mitad, obteniéndose los demás valores (5000 pg, 2500 pg, 1250 pg, 625 pg, 313 pg, 156 pg).

Cálculo de la concentración de DNA

hibridado

Los valores de densidad óptica obtenidos en la microplaca (Figura 20) se convierten en concentración de DNA expresada en pg. Para esto, se realiza una recta patrón de regresión con los valores del patrón que contiene sólo el DNA marcado. Con los valores de la recta se determina la concentración de DNA para cada muestra.

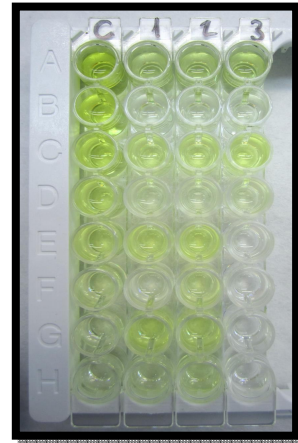


Fig. 20. Placa de estreptavidina tras dos horas de incubación.

Tratamiento de los datos de hibridación

Los datos de las reasociaciones homólogas y heterólogas obtenidas a 405 nm en el lector de ELISA se procesan simultáneamente. El cálculo del porcentaje de las cadenas apareadas o grado de reasociación "BR" (Binding Ratio), se expresa como el porcentaje del DNA marcado liberado con 0.4 M de tampón fosfato (cadenas dobles), comparado con el total de DNA marcado liberado (suma de cadenas simples y cadenas dobles).

$$BR = 100 \times \frac{\text{DNA total de cadenas dobles}}{\text{DNA total cadenas dobles} + \text{DNA total cadenas simples}}$$

La tasa de unión relativa de DNA heterólogo (RBR) se expresó como el porcentaje de los heterólogos, relativo al 100 % BR que se debe al homólogo.

$$RBR = 100 \times \frac{\text{BR heterólogo}}{\text{BR homólogo}}$$

Los resultados de la proporción de DNA marcado-DNA no marcado que hibrida, se expresaron teniendo en cuenta las siguientes referencias y nombres:

- Los valores de cada muestra se obtuvieron por duplicado, calculando la desviación estándar (σ) de la unión relativa, valor que nos indica si la técnica se ha realizado correctamente.
- Los valores de D.O. a 405 nm, son los valores de la X que por aplicación en la ecuación correspondiente en cada caso, nos dará un valor de Y que corresponde con los valores de DNA en picogramos.
- Los pg totales se calculan en el caso de las cadenas simples multiplicando el valor de Y por 5, lo consideramos el valor A, y en el caso de las cadenas dobles Y por 2, éste será el valor B. A partir de los cuales, calcularemos la unión relativa o **B.R. = 100 x (B / A + B)**
- Posteriormente, calculamos el Porcentaje de Unión Relativa o R.B.R. tomando como valor de referencia el valor de B.R. más alto será B. Ref.: **R.B.R.= 100 x (B.R. / B. Ref).**
- Finalmente, se aplicó la desviación estándar a todos los datos obtenidos, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\sigma\% = \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{X})^2}{n}}$$

3. CHEMOTAXONOMIC ANALYSIS

As a general recommendation, the chemical characteristics have been studying for the description of novel taxa by different authors. The lipid pattern vary qualitatively and quantitatively, according to the conditions in which the microorganism has shown growth (Lobasso, et al., 2003). However, the lipid profile can be used taxonomically to distinguish between the different phenotypic sub-groups of archaea and to delineate them from all other microorganisms, i.e, they are useful markers for their taxonomy (Gambacorta, et al., 1995).

3.1. INITIAL TREATMENT

Before beginning with extraction of archaeal lipids, It is necessary a pre-treatment of microorganism, which has been grown in its optimal medium and optimal conditions until being saturated.

- 1)** Centrifuge in Beckman AVANTI™ JM-25 with rotor JA-14, during 15 minutes to 8000 rpm.
- 2)** The pellet has to be re-suspend in ClNa 4 M in a volume of 100 mL approx. Thus, the microorganisms were cleaned of the medium.
- 3)** Centrifuge 30 minutes to 10000 rpm.
- 4)** The precipitated is re-suspended in 2 mL of ClNa 4 M. This will be conserved to 4 °C.

3.2. EXTRACTION OF LIPIDS

Total lipids were extracted by the Bligh and Dyer methods, as modified for extreme halophiles, as it is observed in the figure 21 (Bligh & Dyer, 1959, Kates, 1986):

- 1) All material, which is used to extraction, should be cleaned with sulfocromic mixture. This product damages all organic components. After overnight, the tubes should clean with water very well and they should be dry before using in extraction.
- 2) The archaeal pellet was mixed with distillate water. It's distributed 1.6 mL in glass tube from Pyrex^{®*}.
- 3) Add 4 mL of CH₃OH (This serves to dissolve the membrane and precipitate proteins) in each tube and softly shake for 15 minutes.
- 4) Add 2 mL of CHCl₃ (This serves to dissolve the lipids in the liquid phase) in each tube and shake for 15 minutes.
- 5) Centrifuge with a Thermo Electron Corporation PK 121, at 3500 rpm for 15 minutes.
- 6) There are a supernatant and a pellet in each tube.
 - a. The supernatant (SN) is preserved to work after.
 - b. The pellet is adding 1.6 mL distillate water. It is begging to point 3.
- 7) Join SN1 and SN2. Add 2 mL CHCl₃ and 2 mL KCl 0.2 M, this facilitates separation of the phases, by each supernatant. And manually shake.

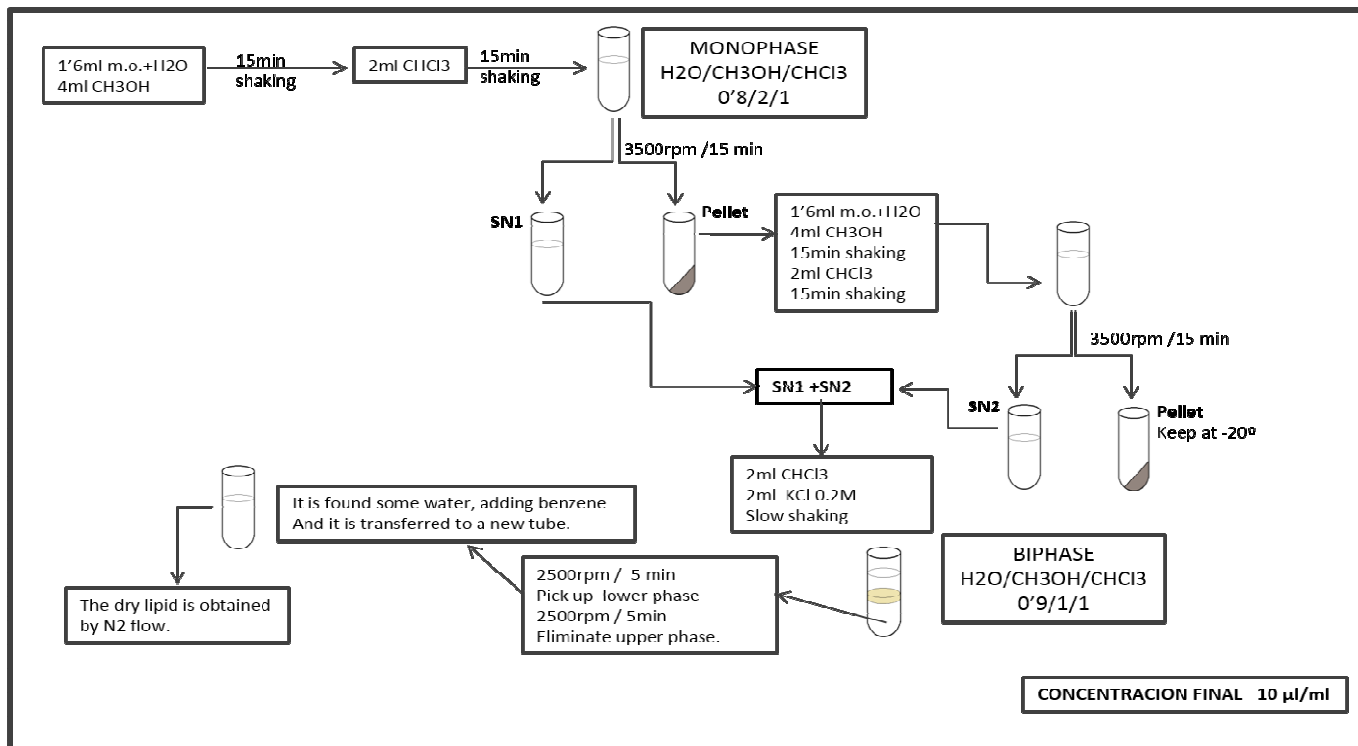


Fig. 21. Extraction of lipids by method of Bligh & Dyer.

- 8) Centrifuge at 2500 rpm for 5 minutes to obtain a biphasic ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3 = 0.9/1/1$), where the upper part of the biphasic is water and methanol (colorless) and the lower is chloroform phase (yellow).
- 9) Lipids were dissolved in chloroform phase while proteins were arranged in the interphase. For this reason:
 - a. To collect the chloroform phase and kept.
 - b. While the upper phase is added 2 mL of CHCl_3 , shaking and centrifuged at 2500 rpm for 15 minutes.
 - c. To collect the lower phase again and join it to the one we kept.
- 10) Centrifuge at 3900 rpm for 15 minutes and eliminate the upper phase with glass Pasteur's pipette.
- 11) The chloroform phase was transferred to another test tube and adds benzene to confirm the absence of water. Since the combination of water and benzene makes the solution becomes cloudy, in which case the previous step was repeated.
- 12) In this step, there is only lipids dissolved in chloroform. These tubes, with part of the lipid solution and chloroform, were placed in a block heater at 37 °C and submitted a flow of N_2 . Add more solution to obtain a dry lipid.
- 13) Dry lipid extract** is diluted in CHCl_3 to give a final concentration of 10 $\mu\text{l}/\text{mL}$. It was retained at 20 °C until tested by TLC, MALDI and NMR.

* All material must be cleaned with CHCl_3 before using in this technique.

**Previously weighted on a precision balance microtubules that have been used in obtaining the lipid extract. Again, as with the lipid extract obtained, weigh these microtubes. If the weight value remains constant after repeated weighing, this indicates that it is free of chloroform. So it is having longer otherwise exposed to N_2 gas until it is completely dry.

3.3. TLC (THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY)

Total lipid extracts were analyzed by TLC (Merck 10 x 20 cm x 0.5 mm thick layer). The first step is to clean with $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CHCl}_3$ at 1:1 the chromatography camera. While the reactivities are evaporated, plate is marked with the lines to depositing the lipids extract to 1cm of the bottom of the plate, the end line of the way to 1.5 cm top of the thin-layer and well, which wide is 0.5 cm (Figure 22).

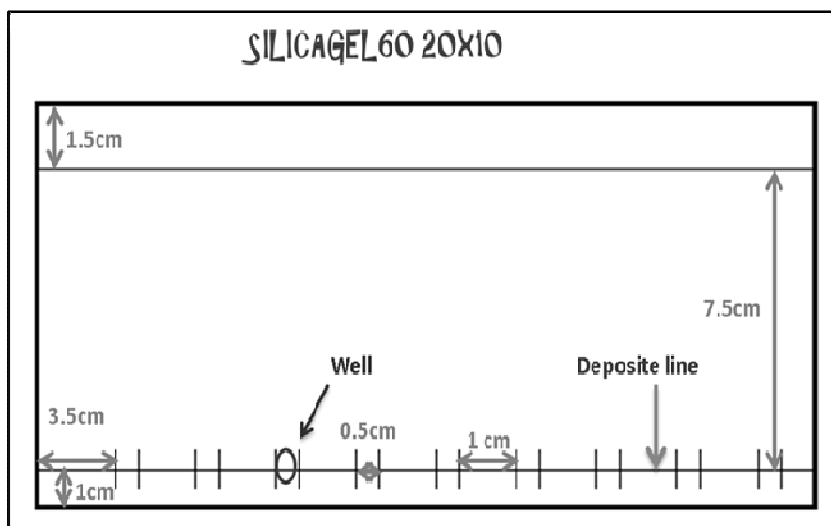


Fig. 22. The marks of silica-gel plate.

The steps that we must follow to use the plate for HPTLC are:

- 1) Plates for thin-layer chromatography were washed twice with $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CHCl}_3$ (20 mL) in the chromatography camera with hermetic seal.
- 2) They will be active at 180 °C during 2 hours minimum.
- 3) While the plate is activating, the chromatography camera takes saturation $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{COOH}$ 90 %, 65:4:35 by volume.
- 4) Load some samples into each gap and introduce in the chromatography camera with hermetic seal during 15-20 minutes approximately.

- 5) The next step was drying well the thin-layer. The lipids, are detecting by 3 different methods. The detection of lipids depends on the type of used stain:

For all lipids: There are two option to show all lipids:

- Spraying 5 % sulphuric acid in water, followed by charring at 180 °C for 5 minutes. For this way, it's possible observing permanently the lipids bands.

- Silicagel plate was introduced in the camera with Iodine dust. This iodine produces vapor, which makes that all lipids are visible for a moment. This method is ideal for isolation and purification of individual lipids.

Phospholipids: Silicagel plate is spraying with molybdenum blue (Sigma) with sulphuric acid (4.2 N) and allowed to dry until blue marks appear phospholipids.

Sulfoglycolipids: Silicagel plate is spraying with 2 % azure A in sulfuric acid 1 mM and It is bathed in 40 mM H₂SO₄ bath: MeOH (3:1) and in constant motion overnight. This bath is bleach, so we need to change the bath until the bands were observed.

3.4. ISOLATION AND PURIFICATION OF LIPIDS FROM THE TOTAL EXTRACT

The lipids components are separated by preparative TLC in silicagel 60 (20 x 20 cm x 0.5 mm thick layer) (Figure 23) in the chromatography camera which takes saturation CH₃OH:CHCl₃:CH₃COOH 90%, 65:4:35 by volume. They were visualized by staining with iodine vapor. Thus, these lipids were eluted and recovered from the scraped silica as previously described.

2.4.1. Extraction of lipids of the Silicagel

For an equivalent amount of silica about 1mL:

1. Add 2 mL H₂O:CH₃OH:CHCl₃ (0.8:2:1) and apply 2 min in vortex.
2. Spin at 3500 rpm during 5 min.
3. Recover of supernatant and repeating this operation with the pellet in 5 times.
4. Add at 2.6 mL CHCl₃ and 2.6 mL KCL 0.2M to SN 1,2,3,4, and 5
5. Spin at 3900 rpm during 15 min. This operation will be repeat to obtain inferior phase very cleaning.
6. For last, spin at 3500 rpm during 5 min and flipping the liquid in a new tube to avoid the superior phase droop too.

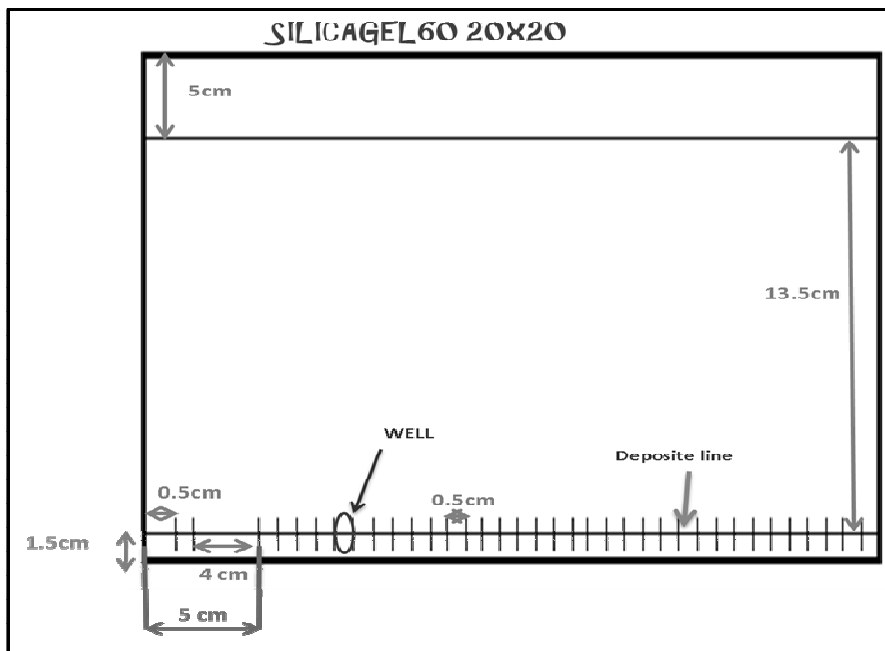


Fig. 23. The marks of silica-gel plate to extraction of lipids of the Silica-gel.

3.5. MALDI-ToF/MS

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry is used to applicate to identification, typification and diversity studies (Figure 24). In the present work is used to analyze the lipids profile, and consequently, as biomarkers for characterization of microorganism. The isolation and purify individual lipids present in archaeal membranes, are using in a mass spectrometer Bruker Microflex (Angelini, et al., 2010).

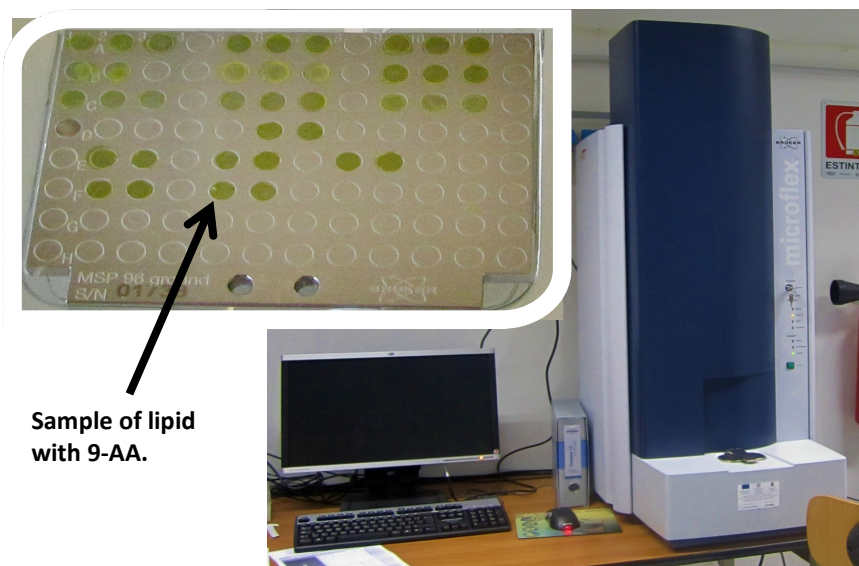


Fig.24. Photograph of MALDI-ToF target (Top). Dimensions of target are approximately 53 x 41 mm. And MALDI-ToF machine (right).

Thus, the MALDI-TOF analyzes archaea phospholipids in the membranes of extreme halophilic microorganisms, through a series of absorption peaks corresponding to molecular ions of different types of polar lipids.

In particular, this method utilizes a pulsed nitrogen laser, emitting at 337 nm, the extraction voltage was 20 KV and gated matrix suppression was applied to

prevent detector saturation. Six hundred single laser shots were aged for each mass spectrum. In the analysis of lipids in solution, the spectrum was obtained by moving the laser within the spot. The laser fluence was kept at about 80 % of maximum value to have a good signal-to-noise ratio. At variance in the analysis of lipids in intact membranes, it was not necessary to move the laser during the acquisition of the spectrum, thanks to the thickness of the pellet (see below). It was necessary to keep the laser fluence at 100 % for good desorption and ionization of the sample in the pellet; at lower laser intensity, it was not possible to have good signals. All spectra were acquired in negative ion mode using the delayed pulsed extraction. Spectral mass resolutions and signal to noise ratios were determined by the software for the instrument, "Flex Analysis 3.0" (Bruker Daltonics). When indicated, spectra were acquired with a Bruker Autoflex mass spectrometer (Bruker Daltonics) in reflector mode; the laser fluence was kept about 10 % above threshold to optimize the signal to noise ratio (Angelini, et al., 2010). It's necessary, an external calibration to performing before each measurement.

3.5.1. Preparation of lipids samples in solution for MALDI-Tof/MS

Samples were prepared as in section 2.4.2 (for a total lipids) and 2.4.5 (for selected band) have been described. Briefly, the total lipids (10 mg/mL) and individual lipids component (1-2 mg/mL) were diluted in 45 μ l of isopropanol/acetonitrile (60:40) in a proportion 1:9. Following, 0.3 μ l of this dilution was mixed with 0.3 μ l of 9-aminoacridine (9-AA). Then 0.3 μ l of the last mixture was spotted on the MALDI-Tof target (Micro Scout Plate, MSP 96 ground steel target) (Figure 24). Next step was begging the analysis in the MALDI-Tof machine (Angelini, et al., 2010).

3.5.2. Coupling of HPTLC with MALDI-Tof/MS

The procedure was carried out, according to Fuchs et al. (Fuchs, et al., 2007), with minor modifications, cutting the HPTLC plates in smaller pieces (about 4x8 cm in size) containing the lipids which want be study specifically. Thus, these pieces, which corresponded to a single lane of HPTLC (figure 25), were then fixed onto the MALDI target with double-sided adhesive tape. Three small droplets of saturated matrix (9-AA) solution (in total 1.5 μ l) were then deposited onto each point, obtaining a continuous deposition along the HPTLC lane. Then the matrix deposition points were numbered and each of them was assigned to HPTLC band areas of interest by comparing the retention factors resulting from staining by lipid charring and/or primuline. Then all the matrix deposition points were directly analyzed with MALDI-TOF/MS. Although for each TLC band a certain number of mass spectra were acquired, only the most representative spectra are shown (Angelini, et al., 2012).

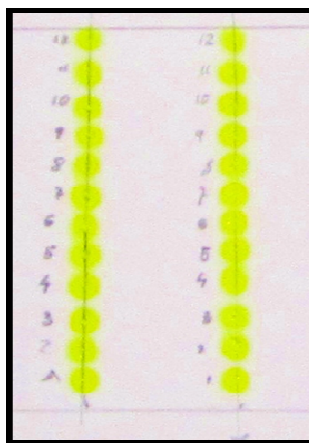


Fig.25. HPTLC in aluminum plate.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. MUESTREO Y AISLAMIENTO

1.1. PROCEDENCIA Y RECUENTO DE MICROORGANISMOS TOTALES

Los tres ambientes salinos elegidos en Andalucía, son salinas poco estudiadas en la bibliografía de halófilos extremos y moderados. Dos de los tres ambientes sujetos a este estudio, son ambientes atalasalinos: Fuente de Piedra (Málaga) y La Malahá (Granada); mientras que Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz) se define como un ambiente talasohalino. Las muestras fueron recogidas en otoño, aprovechando el bajo nivel del agua que había en sus estanques, fruto de un verano muy caluroso y un inicio de otoño poco lluvioso. Estas condiciones meteorológicas favorecieron que la concentración de sal en la laguna de Fuente de Piedra y en los cristalizadores de La Malahá y de Santa M^a de Jesús, fueran bastantes elevadas y en consecuencia la presencia de microorganismos halófilos extremos más probable.

- Las muestras de la salina de **Fuente de piedra** (Málaga) fueron recogidas el 14 octubre de 2009. En concreto se coleccionaron muestras de cinco zonas diferentes, de las de cuales, dos muestras eran de agua (A1FP y A2FP) con sus correspondientes muestras de sedimentos (S1FP y S2FP). Mientras que del tercer punto de recogida únicamente se almacenó agua (A3FP). Esta salina de interior se encontró bastante marcada por la estación seca que le precedía, ya que la laguna presentaba un volumen de agua muy reducido, lo cual permitía la observación de un desierto de suelo salino (Figura 26). Esta situación, hacia muy propicia la búsqueda de microorganismos halófilos extremos, el cual era el punto de partida de este proyecto. Según los datos proporcionados por el Parque Natural de la Laguna de Fuente de Piedra, el muestreo se realizó con unos valores medios de Oxígeno del 7.65 mg/L, la conductividad era 67 S/m, el valor del pH era del 8.9, la temperatura de 19.2 °C y la salinidad superaba el 44.7 %.



Fig. 26. Zonas de muestreo de Fuente de Piedra.

- La salina localizada en La Malahá (Granada), fue muestreada el 6 de noviembre de 2009, de la cual se recogieron muestras en tres puntos diferentes: A1LM procedente del agua del primer cristizador con una temperatura de 15 °C; S1LM, sedimento con agua del mismo cristalizados que el



Fig. 27. Zonas de muestreo de La Malahá.

anterior; A2LM procede del agua de un segundo cristalizador con una temperatura de 14 °C y su respectivo sedimento con agua S2LM (Figura 27); estos dos primeros cristalizadores ya presentaban coloración rosácea en sus aguas, lo que hizo plantearse la elevada posibilidad de identificar arqueas halófilas. Y por último S3LM, representa la muestra recogida de tierra contigua a la salina, la cual presentaba costras de sal en su superficie, probablemente debido a las filtraciones de agua salina procedentes del río que abastece a ésta. La Malahá, al igual que la anterior, es una salina de interior cuya fuente de agua procede de manantiales internos que por filtración acceden a ellas. Esta situación provoca que en estaciones secas el porcentaje de salinidad se vea bastante incrementado en comparación con salinas de exterior, cercanas al mar. En el momento del muestreo la salinidad se encontraba en un valor próximo al 30 % y el pH de 8.1.

- El 16 de noviembre del 2009, se recogieron muestras en las salinas de **Santa María de Jesús** (Chiclana, Bahía de Cádiz) (Figura 28). En este caso se recogieron de 4 puntos diferentes, el primero punto de muestreo (A1BC y S1BC) procede de un cristalizador que presentaba inicialmente coloración rosácea, donde el agua poseía una temperatura de 17 °C, con más del 15 % de salinidad. El segundo punto (A2BC y S2BC) fue la entrada de agua a los cristalizadores, conocida como la Vuelta del Periquillo, aquí la temperatura era de 20 °C y con un 13 % de salinidad. El canal exterior del cristalizador representa el tercer punto (A3BC y S3BC) con una coloración violácea, con 18 °C y un 11 % de salinidad presente en el agua. Y finalmente, el punto cuarto (A4BC y S4BC) se recogió de otro cristalizador con coloración blanquecina con una temperatura de 19 °C y el 14 % de salinidad. La salina de Santa M^a de Jesús, se encuentra a escasos metros de la costa, esta situación provoca que sus cristalizadores sean continuamente surtidos por agua del mar, de manera, que el contraste entre años con mayor o menor recogida pluvial no sea tan marcado como en las salinas de interior. Los valores generales que describen este ambiente salino el otoño del 2009, se

resumen en una temperatura media de 18.3 °C, un pH de 7.5 y un porcentaje de salinidad entorno al 15 %.



Fig. 28. Zonas de muestreo de Santa María de Jesús (Bahía de Cádiz).

Los recuentos se realizaron a cada muestra tras las tres primeras semanas de incubación, y sus resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL), y se recogen en las tablas 17, 19 y 21. Siendo los medios utilizados para el recuento, los ya descritos en el apartado 1.2. de Materiales y

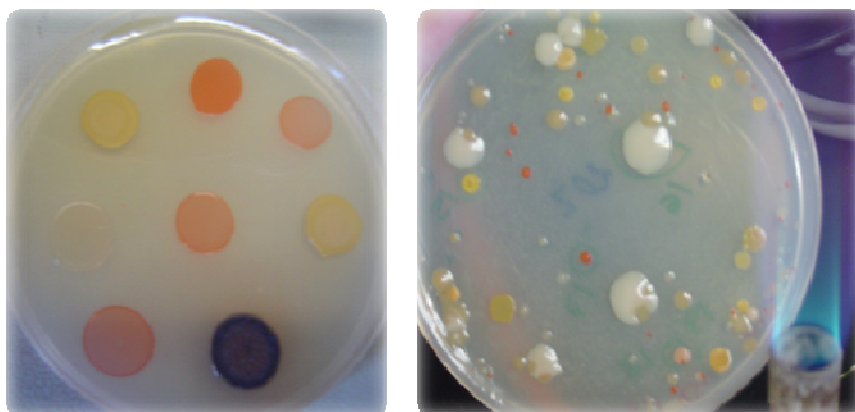


Fig. 29. Muestra de colores y morfologías coloniales procedentes de los tres ambientes salinos.

Métodos. Se trabaja con muestras preparadas en diluciones seriadas (0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) de una muestra recogida desde un mismo punto y ambiente salino. Tanto las muestras acopiadas como sus respectivas diluciones (de la 10^{-1} a la 10^{-4}) se sembraron en medios HM en el intervalo de salinidad del 10 al 25 % y en medio OS, e incubándose a una temperaturas de 37°C . El uso de un mismo medio de cultivo, HM con diferentes concentraciones de sales (Subov); unido al uso del medio OS, más específico para *Halobacterium sp.*, permite el crecimiento y aislamiento de diferentes bacterias y arqueas de todos aquellos microorganismos que interaccionan y coexisten en estos medios ambientes. Transcurrida la primera semana de incubación, se comenzó a realizar recuentos del número de colonias que crecían en los distintos medios durante las tres primeras semanas. El valor de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) mostradas en las tabas 19, 21 y 23, proceden de aquellas diluciones donde el número de colonias que se cuentan, se localizan en las placas de cultivo cuyas diluciones presentaron un intervalo de 30 a 300 colonias. Transcurridas las semanas de incubación se comenzó la selección de microorganismos, a la par que se caracterizaba el color (Figura 29) y proporción de las cepas con la misma morfología colonial en la placa (Tablas 20, 22 y 24).

Tabla 19. Recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) en Fuente de Piedra (Málaga).

A1FP				A2FP		
[C]	1ª SEM	2ª SEM	3ª SEM	1ª SEM	2ª SEM	3ª SEM
10*	27	$2.7 \cdot 10^1$	$2.7 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^3$	$1.1 \cdot 10^3$
15*	**NC	$8.6 \cdot 10^3$	$1.3 \cdot 10^4$	**NC	$5.4 \cdot 10^4$	$7.5 \cdot 10^4$
20*	**NC	$1.7 \cdot 10^4$	$2.3 \cdot 10^4$	**NC	$5.5 \cdot 10^4$	$9 \cdot 10^4$
25*	**NC	$2.4 \cdot 10^4$	$2.6 \cdot 10^4$	**NC	$7.5 \cdot 10^3$	$1.3 \cdot 10^4$
OS*	**NC	$4.9 \cdot 10^2$	$1.8 \cdot 10^4$	**NC	80	$1.6 \cdot 10^4$
A3FP				S1FP		
[C]	1ª SEM	2ª SEM	3ª SEM	1ª SEM	2ª SEM	3ª SEM
10*	1.3	$1.2 \cdot 10^4$	$1.3 \cdot 10^4$	$6 \cdot 10^2$	$6 \cdot 10^2$	$6.3 \cdot 10^2$
15*	$10 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^4$	$2.1 \cdot 10^4$	**NC	$2.6 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^6$

Tabla 19. Recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) en Fuente de Piedra (Málaga).

20*	**NC	8.1 10 ⁴	1.3 10 ⁵	**NC	2.8 10 ⁶	3 10 ⁶
25*	**NC	5.8 10 ⁴	9.2 10 ⁴	**NC	8 10 ⁵	1.7 10 ⁶
OS	**NC	**NC	2 10 ⁴	**NC	3 10 ⁴	3 10 ⁴
S2FP						
[C]	1ª SEM	2ª SEM	3ª SEM			
10*	26	2.7 10 ⁴	2.8 10 ⁴			
15*	30	1.2 10 ⁶	2.6 10 ⁶			
20*	2	2 10 ⁵	2 10 ⁵			
25*	**NC	4.4 10 ⁵	7.9 10 ⁵			
OS	**NC	1.1 10 ⁴	1.8 10 ⁴			

*(%p/v en medio HM) **NC. No crecimiento

Tabla 20. Descripción de las cepas aisladas y seleccionadas de Fuente de Piedra (Málaga).

Microorg. aislado	Microorganismo (Medio-Punto Muestreo-Placa-Dilución-Numeración)	Color de la colonia	Presencia de la colonia seleccionada (% UFC)
A1FP1	OS-A1FPO9-A -0 -1	Roja	50 %
A1FP2	OS-A1FPO9-A-(-1)2	Roja teja	50 %
A1FP3	OS-A1FPO9-B-(-3)-3	Rosa	100 %
A1FP4	25-A1FPO9-A-(-1)-4	Roja vino	20 %
A1FP5	25-A1FPO9-A-(-1)-5	Roja intenso transparente	39 %
A1FP6	25-A1FPO9-A-(-4)-6	Rosa brillante	100 %
A1FP7	15-A1FPO9-C-0-7	Rosa clara	20 %
A1FP8	15-A1FPO9-C-0-8	Roja transparente	1 %
A1FP9	15-A1FPO9-C-(-1)-9	Roja transparente	40 %
A1FP10	10-A1FPO9-B-0-10	Amarilla	50 %
A1FP11	10-A1FPO9-B-0-11	Blanco	50 %
A1FP12	10-A1FPO9-A-0-12	Amarillo transparente	25 %
A1FP13	10-A1FPO9-C-(-1)-13	Marrón transparente	100 %
A1FP14	OS-A1FPO9-A-(-1)-14	Rojo anaranjada	26 %
A1FP15	OS-A1FPO9-B-(-1)-15	Rojo transparente	37 %
A1FP16	25-A1FPO9-A-(-1)-16	Roja oscura	16.5 %
A1FP17	25-A1FPO9-A-(-1)-17	Rojo brillante	44 %
A1FP18	20-A1FPO9-A-0-18	Rosa pastel	1.5 %
A1FP19	20-A1FPO9-A-0-19	Rojo brillante	30 %

Tabla 20. Descripción de las cepas aisladas y seleccionadas de Fuente de Piedra (Málaga).

Microorg. aislado	Microorganismo (Medio-Punto Muestreo-Placa-Dilución-Numeración)	Color de la colonia	Presencia de la colonia seleccionada (% UFC)
A1FP20	15-A1FPO9-C-(-1)-20	Rojo claro transparente	81 %
A1FP21	15-A1FPO9-B-(-2)-21	Rojo claro transparente	19 %
A1FP22	15-A1FPO9-C-(-3)-22	Rojo intenso claro	20 %
A1FP23	10-A1FPO9-B-(-1)-23	Amarilla clara	50 %
A1FP24	10-A1FPO9-B-(-4)-24	Naranja	33 %
A2FP1	OS-A2FPO9-A-0-1	Roja anaranjada	60 %
A2FP2	OS-A2FPO9-A-0-2	Roja transparente	12.5 %
A2FP3	OS-A2FPO9-A-(-1)-3	Amarilla clara	90 %
A2FP4	OS-A2FPO9-A-0-4	Roja	3 %
A2FP5	25-A2FPO9-C-(-1)-5	Roja	0.33 %
A2FP6	25-A2FPO9-C-(-1)-6	Roja anaranjada	50 %
A2FP7	25-A2FPO9-B-(-2)-7	Roja vino	57 %
A2FP8	25-A2FPO9-B-(-2)-8	Rojo	35 %
A2FP9	20-A2FPO9-B-(-2)-9	Rojo transparente	2.2 %
A2FP10	20-A2FPO9-B-(-2)-10	Rojo transparente	13.3 %
A2FP11	20-A2FPO9-B-(-2)-11	Rojo vino	50 %
A2FP12	15-A2FPO9-A-(-2)-12	Marrón con degradación	1 %
A2FP13	15-A2FPO9-A-(-2)-13	Amarilla oscura	2 %
A2FP14	15-A2FPB-(-2)-14	Marrón clara	2.3 %
A2FP15	10-A2FPO9-A-0-15	Marrón chocolate	1 %
A2FP16	10-A2FPO9-B-0-16	Marrón en anillas	1 %
A2FP17	10-A2FPO9-B-0-17	Amarilla transparente	6.4 %
A2FP18	10-A2FPO9-B-(-1)-18	Salmón	5 %
A2FP19	OS-A2FPO9-A-0-19	Crema transparente	3 %
A2FP20	OS-A2FPO9-C-0-20	Rosa intenso	70 %
A2FP21	25-A2FPO9-A-(-1)-21	Rosa clara	0.33 %
A2FP22	25-A2FPO9-A-(-1)-22	Roja sangre	80 %
A2FP23	20-A2FPO9-A-(-1)-23	Rosa intenso transparente	2.7 %
A2FP24	20-A2FPO9-B-(-1)-24	Rosa intenso	70 %
A2FP25	15-A2FPO9-A-0-25	Marrón con degradación	7.4 %
A2FP26	15-A2FPO9-A-(-2)-26	Roja transparente	71.4 %
A2FP27	10-A2FPO9-C-(-1)-27	Amarillo brillante	5 %
A2FP28	10-A2FPO9-C-(-1)-28	Blanca	5.12 %
A3FP1	OS-A3FPO9-B-(-1)-1	Rosa	100 %
A3FP2	OS-A3FPO9-C-(-1)-2	Roja transparente	100 %
A3FP3	25-A3FPO9-A-(-1)-3	Roja claro transparente	1 %
A3FP4	25-A3FPO9-B-(-2)-4	Roja vino	43 %
A3FP5	25-A3FPO9-B-(-2)-5	Roja	33 %
A3FP6	25-A3FPO9-B-(-2)-6	Rosa transparente	6.25 %

Tabla 20. Descripción de las cepas aisladas y seleccionadas de Fuente de Piedra (Málaga).

Microorg. aislado	Microorganismo (Medio-Punto Muestreo-Placa-Dilución-Numeración)	Color de la colonia	Presencia de la colonia seleccionada (% UFC)
A3FP7	20-A3FPO9-A-0-7	Blanca	2 %
A3FP8	20-A3FPO9-A-(-1)-8	Rosa	1 %
A3FP9	15-A3FPO9-B-0-9	Blanca	1 %
A3FP10	15-A3FPO9-B-0-10	Rojo claro	1 %
A3FP11	15-A3FPO9-C-0-11	Marrón ocre	1 %
A3FP12	15-A3FPO9-C-(-1)-12	Blanca	2.2 %
A3FP13	10-A3FPO9-A-(-1)-13	Roja transparente	75 %
A3FP14	10-A3FPO9-A-0-14	Blanca transparente	1 %
A3FP15	10-A3FPO9-C-(-1)-15	Naranja	1 %
A3FP16	OS-A3FPO9-A-(-1)-16	Roja	100 %
A3FP17	OS-A3FPO9-B-(-1)-17	Roja anaranjada	100 %
A3FP18	25-A3FPO9-A-(-1)-18	Roja claro	1.3 %
A3FP19	25-A3FPO9-B-(-2)-19	Roja tinta	24.1 %
A3FP20	20-A3FPO9-A-(-1)-20	Roja burdeos	16.3 %
A3FP21	20-A3FPO9-B-(-1)-21	Rojo fresa	15.3 %
A3FP22	15-A3FPO9-A-(-1)-22	Rojo pastel	1.4 %
A3FP23	15-A3FPO9-C-(-1)-23	Naranja claro	2.2 %
A3FP24	10-A3FPO9-B-(-1)-24	Salmón transparente	1.3 %
A3FP25	10-A3FPO9-C-(-3)-25	Salmón opaco	40 %
S1FP1	OS-S1FPO9-A-(-1)-1	Blanca	100 %
S1FP2	OS-S1FPO9-C-(-1)-2	Roja transparente	50 %
S1FP3	OS-S1FPO9-C-(-3)-3	Roja vino	50 %
S1FP4	OS-S1FPO9-C-(-3)-4	Roja sangre	50 %
S1FP5	25-S1FPO9-A-(-3)-5	Burdeos	15 %
S1FP6	25-S1FPO9-A-(-3)-6	Roja transparente	65 %
S1FP7	25-S1FPO9-A-(-3)-7	Roja transparente	20 %
S1FP8	20-S1FPO9-B-(-3)-8	Roja vino	33 %
S1FP9	20-S1FPO9-B-(-3)-9	Roja oscura	33 %
S1FP10	20-S1FPO9-B-(-3)-10	Rosa	33 %
S1FP11	15-S1FPO9-A-(-2)-11	Roja anaranjada	40 %
S1FP12	15-S1FPO9-C-(-2)-12	Roja	50 %
S1FP13	15-S1FPO9-C-(-3)-13	Roja transparente	20.3 %
S1FP14	15-S1FPO9-A-(-4)-14	Teja	17 %
S1FP15	10-S1FPO9-A-(-1)-15	Transparente	98 %
S1FP16	10-S1FPO9-A-(-1)-16	Marrón clara	1.33 %
S1FP17	10-S1FPO9-B-(-1)-17	Amarilla transparente	20 %
S1FP18	10-S1FPO9-C-(-1)-18	Marrón oscuro	33.3 %
S1FP19	10-S1FPO9-B-(-4)-19	Salmón	100 %
S2FP1	OS-S2FPO9-A-(-1)-1	Rosa	100 %

Tabla 20. Descripción de las cepas aisladas y seleccionadas de Fuente de Piedra (Málaga).

Microorg. aislado	Microorganismo (Medio-Punto Muestreo-Placa-Dilución-Numeración)	Color de la colonia	Presencia de la colonia seleccionada (% UFC)
S2FP2	OS-S2FPO9-A-(-2)-2	Roja intenso	100 %
S2FP3	OS-S2FPO9-B-(-2)-3	Roja	27.27 %
S2FP4	OS-S2FPO9-C-(-2)-4	Roja pálido	3.3 %
S2FP5	25-S2FPO9-B-(-2)-5	Berenjena	10 %
S2FP6	25-S2FPO9-B-(-2)-6	Roja vino	10 %
S2FP7	25-S2FPO9-B-(-2)-7	Berenjena intenso	5 %
S2FP8	25-S2FPO9-B-(-2)-8	Roja transparente	35 %
S2FP9	25-S2FPO9-B-(-2)-9	Teja	10 %
S2FP10	25-S2FPO9-B-(-2)-10	Rosa claro	30 %
S2FP11	25-S2FPO9-C-(-2)-11	Rosa transparente	1 %
S2FP12	25-S2FPO9-A-(-3)-12	Roja	8.2 %
S2FP13	20-S2FPO9-B-(-1)-13	Rosa claro	1.7 %
S2FP14	20-S2FPO9-B-(-1)-14	Rosa anaranjada	50 %
S2FP15	20-S2FPO9-B-(-1)-15	Blanca	5 %
S2FP16	20-S2FPO9-B-(-1)-16	Roja intenso	30 %
S2FP17	20-S2FPO9-C-(-1)-17	Ocre verde	0.7 %
S2FP18	20-S2FPO9-C-(-1)-18	Naranja	0.3 %
S2FP19	20-S2FPO9-C-(-2)-19	Naranja	100 %
S2FP20	15-S2FPO9-C-(-1)-20	Roja burdeos	10 %
S2FP21	15-S2FPO9-C-(-1)-21	Marrón oscura	4 %
S2FP22	15-S2FPO9-A-(-2)-22	Roja sangre	10 %
S2FP23	15-S2FPO9-B-(-2)-23	Roja intenso	16 %
S2FP24	15-S2FPO9-B-(-2)-24	Roja clara	18 %
S2FP25	15-S2FPO9-C-(-2)-25	Roja claro	25 %
S2FP26	15-S2FPO9-A-(-3)-26	Marrón clara	4 %
S2FP27	15-S2FPO9-B-(-3)-27	Roja brillante	20 %
S2FP28	15-S2FPO9-B-(-4)-28	Amarilla clara	0.3 %
S2FP29	10-S2FPO9-B-(-2)-29	Salmón	9 %
S2FP30	10-S2FPO9-B-(-2)-30	Rosa clara	18 %
S2FP31	10-S2FPO9-B-(-2)-31	Berenjena	5.4 %
S2FP32	10-S2FPO9-B-(-3)-32	Marrón clara	28.6 %
S2FP33	10-S2FPO9-C-(-3)-33	Marrón clara	20 %

Tabla 21. Recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) en La Malahá (Granada).

A1LM				A2LM		
[C]	1ª SEM	2ª SEM	3ª SEM	1ª SEM	2ª SEM	3ª SEM
10*	1.7 10 ²	2 10 ²	2 10 ²	7 10 ²	7.4 10 ²	7.5 10 ²
15*	5.1 10 ²	7 10 ²	7.3 10 ²	8 10 ²	9.9 10 ²	1 10 ³
20*	9.6 10 ¹	3.5 10 ²	4.2 10 ²	2.2 10 ²	1.2 10 ³	3 10 ³
25*	**NC	8.7 10 ¹	3.6 10 ²	4.5 10 ¹	2.4 10 ³	3 10 ³
OS	1.9 10 ²	3.1 10 ²	1.1 10 ³	3.1 10 ²	3 10 ³	3 10 ³
S1LM				S2LM		
[C]	1ª SEM	2ª SEM	3ª SEM	1ª SEM	2ª SEM	3ª SEM
10*	1.2 10 ⁶	1.2 10 ⁶	1.3 10 ⁶	6.7 10 ²	2.1 10 ³	2.2 10 ³
15*	7.7 10 ⁵	8.2 10 ⁵	8.3 10 ⁵	8.7 10 ³	9.1 10 ³	1.1 10 ⁴
20*	1.7 10 ⁵	2.1 10 ⁵	2.2 10 ⁵	1.1 10 ⁴	1.8 10 ⁴	2.8 10 ⁴
25*	1.8 10 ⁵	2.9 10 ⁵	2.8 10 ⁵	1.5 10 ⁴	2.6 10 ⁴	3 10 ⁴
OS	7.4 10 ⁵	8.9 10 ⁵	1.7 10 ⁶	2 10 ⁴	2.7 10 ⁴	1.2 10 ⁵
S3LM						
[C]	1ª SEM	2ª SEM	3ª SEM			
10*	1.3 10 ³	1.6 10 ³	1.6 10 ³			
15*	6.5 10 ³	8.5 10 ³	1.7 10 ⁴			
20*	2 10 ⁴	3 10 ⁴	3 10 ⁴			
25*	**NC	8.5 10 ⁴	9.4 10 ⁴			
OS	**NC	3 10 ⁴	3 10 ⁴			

*(%p/v en medio HM) **NC. No crecimiento

Tabla 22. Descripción de las cepas aisladas y seleccionadas de La Malahá (Granada).

Microorg. aislado	Microorganismo (Medio-Punto Muestreo-Placa-Dilución-Numeración)	Color de la colonia	Presencia de la colonia seleccionada (% UFC)
A1LM1	OS-A1LMO9-A-0-1	Rosa -morada	33.3 %
A1LM2	OS-A1LMO9-A-0-2	Rojo anaranjada	44.4 %
A1LM3	OS-A1LMO9-B-0-3	Crema	10 %
A1LM4	OS-A1LMO9-B-0-4	Amarillo claro	10 %
A1LM5	OS-A1LMO9-B-0-5	Crema oscura	10 %
A1LM6	OS-A1LMO9-C-0-6	Rojo anaranjado	70 %
A1LM7	OS-A1LMO9-B-(-1)-7	Rosa morado	50 %

Tabla 22. Descripción de las cepas aisladas y seleccionadas de La Malahá (Granada).

Microorg. aislado	Microorganismo (Medio-Punto Muestreo-Placa-Dilución-Numeración)	Color de la colonia	Presencia de la colonia seleccionada (% UFC)
A1LM8	25-A1LMO9-A-0-8	Rojo transparente	38.5 %
A1LM9	25-A1LMO9-B-0-9	Rojo anaranjado	47.7 %
A1LM10	25-A1LMO9-B-0-10	Blanca	9.5 %
A1LM11	25-A1LMO9-C-0-11	Rosa claro	14.3 %
A1LM12	25-A1LMO9-B-(-1)-12	Rosa fuerte	0.3 %
A1LM13	25-A1LMO9-C-(-1)-13	Rojo sangre	1.3 %
A1LM14	20-A1LMO9-A-0-14	Naranja	3.1 %
A1LM15	20-A1LMO9-A-0-15	Blanca	1.5 %
A1LM16	20-A1LMO9-A-0-16	Salmón	12.3 %
A1LM17	20-A1LMO9-B-0-17	Roja anaranjada	4.4 %
A1LM18	20-A1LMO9-C-0-18	Naranja	5.9 %
A1LM19	20-A1LMO9-C-0-19	Rojo burdeos	5.9 %
A1LM20	20-A1LMO9-A-(-1)-20	Rojo intensa transparente	17.6 %
A1LM21	20-A1LMO9-B-(-1)-21	Rojo claro	35 %
A1LM22	15-A1LMO9-A-0-22	Marrón	28.2 %
A1LM23	15-A1LMO9-A-0-23	Naranja	2.6 %
A1LM24	15-A1LMO9-B-0-24	Marrón oscura	2.5 %
A1LM25	15-A1LMO9-C-0-25	Naranja brillante	1 %
A1LM26	15-A1LMO9-B-(-1)-26	Rojo brillante	43.4 %
A1LM27	15-A1LMO9-B-(-4)-27	Blanca transparente	72.7 %
A1LM28	15-A1LMO9-A-0-28	Rosa claro	1.3 %
A1LM29	10-A1LMO9-A-0-29	Naranja	5.8 %
A1LM30	10-A1LMO9-A-0-30	Naranja	5.8 %
A1LM31	10-A1LMO9-B-0-31	Naranja claro	20 %
A1LM32	10-A1LMO9-C-0-32	Rosa oscura	2.9 %
A1LM33	10-A1LMO9-C-0-33	Amarillo claro	2.9 %
A1LM34	10-A1LMO9-B-(-1)-34	Blanco	99 %
A2LM1	0S-A2LMO9-A-0-1	Rosa claro	25 %
A2LM2	0S-A2LMO9-B-0-2	Naranja	50 %
A2LM3	0S-A2LMO9-A-(-2)-3	Crema	100 %
A2LM4	25-A2LMO9-A-0-4	Rosa	50 %
A2LM5	25-A2LMO9-C-(-1)-5	Rojo claro	72.7 %
A2LM6	25-A2LMO9-C-(-1)-6	Rojo intenso	18.2 %
A2LM7	25-A2LMO9-C-(-2)-7	Crema	25 %
A2LM8	20-A2LMO9-A-0-8	Rojo claro	50 %
A2LM9	20-A2LMO9-A-(-)-9	Rojo anaranjado	25 %
A2LM10	20-A2LMO9-A-0-10	Marrón anaranjado	1 %
A2LM11	20-A2LMO9-B-0-11	Salmón	4 %
A2LM12	20-A2LMO9-B-0-12	Marrón claro	6 %

Tabla 22. Descripción de las cepas aisladas y seleccionadas de La Malahá (Granada).

Microorg. aislado	Microorganismo (Medio-Punto Muestreo-Placa-Dilución-Numeración)	Color de la colonia	Presencia de la colonia seleccionada (% UFC)
A2LM13	20-A2LMO9-A-(-1)-13	Rojo intenso	76.7 %
A2LM14	20-A2LMO9-B-(-1)-14	Rojo opaco	4.1 %
A2LM15	15-A2LMO9-B-0-15	Marrón anaranjado	6.1 %
A2LM16	15-A2LMO9-C-(-1)-16	Rosa claro	11.1 %
A2LM17	15-A2LMO9-C-(-1)-17	Marrón	22.2 %
A2LM18	15-A2LMO9-C-(-2)-18	Amarillo claro intenso	100 %
A2LM19	15-A2LMO9-C-(-3)-19	Amarillo claro	100 %
A2LM20	10-A2LMO9-C-0-20	Marrón	26.8 %
A2LM21	10-A2LMO9-A-(-2)-21	Marrón	100 %
A2LM22	10-A2LMO9-B-(-2)-22	Marrón	50 %
A2LM23	10-A2LMO9-B-(-2)-23	Marrón anaranjado	50 %
S1LM1	OS-S1LMO9-A-0-1	Marrón transparente	7 %
S1LM2	OS-S1LMO9-A-0-2	Marrón transparente	50 %
S1LM3	OS-S1LMO9-B-0-3	Crema	16 %
S1LM4	OS-S1LMO9-A-(-2)-4	Naranja	0.3 %
S1LM5	OS-S1LMO9-A-(-2)-5	Amarillo anaranjado	0.6 %
S1LM6	OS-S1LMO9-A-(-2)-6	Rojo intenso	9 %
S1LM7	OS-S1LMO9-A-(-3)-7	Rojo anaranjado brillante	1.8 %
S1LM8	25-S1LMO9-C-0-8	Ocre verde	10 %
S1LM9	25-S1LMO9-A-(-1)-9	Amarillo claro	1 %
S1LM10	25-S1LMO9-A-(-2)-10	Amarillo anaranjado	0.3 %
S1LM11	25-S1LMO9-A-(-2)-11	Rosa	30 %
S1LM12	25-S1LMO9-B-(-2)-12	Rojo sangre	15.9 %
S1LM13	25-S1LMO9-C-(-2)-13	Rojo anaranjado	1.6 %
S1LM14	25-S1LMO9-C-(-3)-14	Rosa	7.14 %
S1LM15	20-S1LMO9-A-(-2)-15	Naranja	4.8 %
S1LM16	20-S1LMO9-A-(-2)-16	Crema	8.7 %
S1LM17	20-S1LMO9-A-(-2)-17	Rojo	46.6 %
S1LM18	20-S1LMO9-A-(-2)-18	Rosa claro	0.93 %
S1LM19	20-S1LMO9-A-(-2)-19	Naranja	2.9 %
S1LM20	20-S1LMO9-B-(-2)-20	Rojo sangre	8.76 %
S1LM21	20-S1LMO9-B-(-2)-21	Crema transparente	84.1 %
S1LM22	20-S1LMO9-A-(-3)-22	Marrón	8.76 %
S1LM23	15-S1LMO9-B-(-1)-23	Marrón	20 %
S1LM24	15-S1LMO9-C-(-2)-24	Naranja opaca	30 %
S1LM25	15-S1LMO9-C-(-2)-25	Crema	5 %
S1LM26	15-S1LMO9-A-(-2)-26	Naranja brillante	1 %
S1LM27	15-S1LMO9-A-(-2)-27	Rosa claro	3 %
S1LM28	15-S1LMO9-B-(-2)-28	Marrón oscuro	1 %

Tabla 22. Descripción de las cepas aisladas y seleccionadas de La Malahá (Granada).

Microorg. aislado	Microorganismo (Medio-Punto Muestreo-Placa-Dilución-Numeración)	Color de la colonia	Presencia de la colonia seleccionada (% UFC)
S1LM29	10-S1LMO9-B(-2)-29	Naranja	45 %
S1LM30	10-S1LMO9-B(-2)-30	Rosa claro	5 %
S1LM31	10-S1LMO9-B(-2)-31	Marrón	30 %
S1LM32	10-S1LMO9-A(-3)-32	Naranja oscura	1.2 %
S1LM33	10-S1LMO9-B(-3)-33	Marrón	3.1 %
S1LM34	10-S1LMO9-C(-3)-34	Rosa intenso	1.7 %
S1LM35	10-S1LMO9-B(-4)-35	Naranja brillante	0.8 %
S2LM1	OS-S2LMO9-A(-1)-1	Rojo naranja	2.1 %
S2LM2	OS-S2LMO9-B(-1)-2	Rojo brillante	25 %
S2LM3	OS-S2LMO9-B(-1)-3	Crema	50 %
S2LM4	OS-S2LMO9-A(-2)-4	Rosa brillante	1 %
S2LM5	OS-S2LMO9-A(-2)-5	Rojo brillante intenso	1 %
S2LM6	25-S2LMO9-B(-1)-6	Crema	50 %
S2LM7	25-S2LMO9-A(-2)-7	Rosa claro transparente	75 %
S2LM8	25-S2LMO9-B(-2)-8	Crema	30 %
S2LM9	25-S2LMO9-B(-2)-9	Naranja brillante	20 %
S2LM10	25-S2LMO9-C(-2)-10	Rojo oscuro intenso	40 %
S2LM11	20-S2LMO9-C(-1)-11	Blanca	0.3 %
S2LM12	20-S2LMO9-A(-2)-12	Blanco	4.3 %
S2LM13	20-S2LMO9-B(-2)-13	Rojo anaranjada	30 %
S2LM14	20-S2LMO9-A(-4)-14	Rojo anaranjada	50 %
S2LM15	15-S2LMO9-A(-1)-15	Rosa anaranjada	8.9 %
S2LM16	15-S2LMO9-C(-1)-16	Rosa oscura	1.6 %
S2LM17	15-S2LMO9-B(-2)-17	Rojo brillante	60.7 %
S2LM18	15-S2LMO9-C(-3)-18	Marrón	45.4 %
S2LM19	15-S2LMO9-C(-3)-19	Rojo	54.5 %
S2LM20	15-S2LMO9-A(-4)-20	Blanca	99 %
S2LM21	10-S2LMO9-C-0-21	Amarilla oscura	17.6 %
S2LM22	10-S2LMO9-A(-1)-22	Marrón clara	16.7 %
S2LM23	10-S2LMO9-B(-1)-23	Blanca	6.2 %
S2LM24	10-S2LMO9-C(-1)-24	Amarillo oscuro	2.6 %
S2LM25	10-S2LMO9-C(-2)-25	Amarillo oscuro	11.1 %
S3LM1	OS-S3LMO9-A(-1)-1	Blanca	100 %
S3LM2	OS-S3LMO9-C(-1)-2	Rosa brillante	100 %
S3LM3	25-S3LMO9-A(-1)-3	Crema transparente	100 %
S3LM4	25-S3LMO9-C(-1)-4	Marrón	33.3 %
S3LM5	25-S3LMO9-C(-1)-5	Marrón claro	66.6 %

Tabla 22. Descripción de las cepas aisladas y seleccionadas de La Malahá (Granada).

Microorg. aislado	Microorganismo (Medio-Punto Muestreo-Placa-Dilución-Numeración)	Color de la colonia	Presencia de la colonia seleccionada (% UFC)
S3LM6	25-S3LMO9-A-(-2)-6	Rojo	100 %
S3LM7	20-S3LMO9-A-(-1)-7	Marrón transparente	0.3 %
S3LM8	20-S3LMO9-B-(-1)-8	Crema	0.3 %
S3LM9	20-S3LMO9-B-(-1)-9	Crema	0.7 %
S3LM10	20-S3LMO9-B-(-1)-10	Marrón anaranjada	0.3 %
S3LM11	20-S3LMO9-B-(-2)-11	Blanca	99 %
S3LM12	20-S3LMO9-B-(-2)-12	Roja	0.96 %
S3LM13	15-S3LMO9-A-(-1)-13	Marrón claro	1.3 %
S3LM14	15-S3LMO9-A-(-1)-14	Crema	1 %
S3LM15	15-S3LMO9-A-(-1)-15	Salmón	0.3 %
S3LM16	10-S3LMO9-A-(-1)-16	Crema	8.3 %
S3LM17	10-S3LMO9-A-(-1)-17	Marrón	25 %
S3LM18	10-S3LMO9-B-(-1)-18	Salmón anaranjada	9.1 %
S3LM19	10-S3LMO9-B-(-1)-19	Naranja	36.4 %
S3LM20	10-S3LMO9-C-(-1)-20	Blanca	12.2 %
S3LM21	10-S3LMO9-C-(-1)-21	Amarilla	20.8 %

Tabla 23. Recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) en Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).

	A1BC			A2BC		
[C]	1 ^a SEM	2 ^a SEM	3 ^a SEM	1 ^a SEM	2 ^a SEM	3 ^a SEM
10*	1.7 10 ⁶	1.7 10 ⁶	1.6 10 ⁶	1.7 10 ³	2.1 10 ³	2.2 10 ³
15*	1.2 10 ⁵	1.2 10 ⁵	1.3 10 ⁵	1.5 10 ³	1.6 10 ³	1.6 10 ³
20*	9.3 10 ²	9.8 10 ²	1 10 ⁴	7.5 10 ²	1.9 10 ³	1.9 10 ³
25*	1.9 10 ³	1.9 10 ³	2.4 10 ⁵	50 10 ¹	1.7 10 ²	3.1 10 ³
OS	**NC	1.3 10 ³	1.9 10 ³	**NC	20	1.5 10 ³
	A3BC			A4BC		
[C]	1 ^a SEM	2 ^a SEM	3 ^a SEM	1 ^a SEM	2 ^a SEM	3 ^a SEM
10*	1 10 ⁴	1 10 ⁴	1 10 ⁴	5.5 10 ²	6 10 ²	6 10 ²
15*	1.4 10 ³	2.3 10 ³	3 10 ³	20	20	1.7 10 ³
20*	1.5 10 ³	1.7 10 ³	1.9 10 ³	**NC	**NC	1.5 10 ⁴
25*	5.8 10 ²	1.6 10 ³	2.5 10 ³	**NC	1.7 10 ³	3 10 ³
OS	**NC	6.1 10 ²	1.9 10 ³	**NC	**NC	1.5 10 ²

Tabla 23. Recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) en Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).

S1BC		S2BC				
[C]	1ª SEM	2ª SEM	3ª SEM	1ª SEM	2ª SEM	3ª SEM
10*	3.5 10 ²	3.5 10 ²	3.5 10 ²	3.2 10 ⁴	3.9 10 ⁴	3.9 10 ⁴
15*	1 10 ²	1 10 ²	3.6 10 ³	1.2 10 ⁴	1.3 10 ⁴	2.1 10 ⁴
20*	1 10 ²	3.5 10 ³	2.7 10 ⁴	5 10 ³	3 10 ⁵	3 10 ⁵
25*	**NC	**NC	6.2 10 ⁴	**NC	5 10 ³	1.1 10 ⁵
OS	**NC	**NC	3 10 ⁷	**NC	2.2 10 ³	3.4 10 ³
S3BC		S4BC				
[C]	1ª SEM	2ª SEM	3ª SEM	1ª SEM	2ª SEM	3ª SEM
10*	6.2 10 ⁶	6.2 10 ⁶	6.5 10 ⁶	2 10 ²	2.5 10 ²	3.5 10 ²
15*	5.5 10 ⁶	5.5 10 ⁶	5.9 10 ⁶	2.5 10 ²	3.5 10 ²	2.5 10 ⁴
20*	4 10 ⁵	1 10 ⁶	1.1 10 ⁶	**NC	**NC	1.7 10 ⁵
25*	**NC	**NC	3.2 10 ⁵	**NC	7.1 10 ⁴	1.6 10 ⁵
OS	**NC	1.4 10 ⁵	1.4 10 ⁵	**NC	**NC	3.5 10 ³

*(%p/v en medio HM) **NC. No crecimiento

Tabla 24. Descripción de las cepas aisladas y seleccionadas de Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).

Microorg. aislado	Microorganismo (Medio-Punto Muestreo-Placa-Dilución-Numeración)	Color de la colonia	Presencia de la colonia seleccionada (% UFC)
A1BC1	OS-A1BCO9-B-0-1	Crema oscura	98.3 %
A1BC2	OS-A1BCO9-A-(-1)-2	Rojo naranja	2 %
A1BC3	OS-A1BCO9-A-(-1)-3	Blanco crema	8 %
A1BC4	25-A1BCO9-A-0-4	Marrón claro	7.9 %
A1BC5	25-A1BCO9-A-0-5	Ocre	85.8 %
A1BC6	25-A1BCO9-A-0-6	Rojo	4.2 %
A1BC7	20-A1BCO9-B-(-1)-7	Amarillo claro	3.3 %
A1BC8	20-A1BCO9-A-(-2)-8	Ocre	50 %
A1BC9	20-A1BCO9-A-(-2)-9	Marrón claro	33.3 %
A1BC10	15-A1BCO9-B-(-1)-10	Ocre transparente	60 %
A1BC11	15-A1BCO9-A-(-2)-11	Marrón	3.6 %
A1BC12	15-A1BCO9-A-(-2)-12	Blanca	90.1 %
A1BC13	15-A1BCO9-B-(-2)-13	Marrón verde	1.5 %
A1BC14	10-A1BCO9-B-(-1)-14	Ocre marrón	70 %
A1BC15	10-A1BCO9-B-(-1)-15	Beige	1.3 %

Tabla 24. Descripción de las cepas aisladas y seleccionadas de Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).

Microorg. aislado	Microorganismo (Medio-Punto Muestreo-Placa-Dilución-Numeración)	Color de la colonia	Presencia de la colonia seleccionada (% UFC)
A1BC16	10-A1BC09-A-(-2)-16	Beige oscuro	0.8 %
A1BC17	10-A1BC09-A-(-2)-17	Ocre transparente	95.2 %
A1BC18	10-A1BC09-A-(-2)-18	Marrón claro	0.8 %
A2BC1	OS-A2BC09-A-0-1	Rosa	95 %
A2BC2	OS-A2BC09-A-(-1)-2	Ocre	0.8 %
A2BC3	OS-A2BC09-A-(-1)-3	Crema	9.4 %
A2BC4	25-A2BC09-A-0-4	Marrón claro	3 %
A2BC5	25-A2BC09-A-0-5	Rojo brillante intenso	6 %
A2BC6	25-A2BC09-A-0-6	Rosa claro	6 %
A2BC7	25-A2BC09-A-0-7	Naranja oscuro	30.3 %
A2BC8	25-A2BC09-A-0-8	Rosa intenso	9.1 %
A2BC9	25-A2BC09-B-0-9	Rojo	10.3 %
A2BC10	20-A2BC09-B-0-10	Rosa claro	1.8 %
A2BC11	20-A2BC09-B-0-11	Crema oscura	20 %
A2BC12	20-A2BC09-B-0-12	Rojo intenso brillante	4.7 %
A2BC13	20-A2BC09-B-0-13	Blanca	36.5 %
A2BC14	20-A2BC09-B-(-2)-14	Marrón	18.2 %
A2BC15	15-A2BC09-A-0-15	Amarillo ocre	0.5 %
A2BC16	15-A2BC09-A-0-16	Salmón	0.6 %
A2BC17	15-A2BC09-B-0-17	Marrón	0.8 %
A2BC18	15-A2BC09-B-0-18	Amarilla clara	21.9 %
A2BC19	15-A2BC09-B-0-19	Marrón clara	4 %
A2BC20	10-A2BC09-A-0-20	Ocre verde	3.6 %
A2BC21	10-A2BC09-B-0-21	Amarillo clara	5.4 %
A2BC22	10-A2BC09-B-0-22	Beige	53.6 %
A2BC23	10-A2BC09-B-0-23	Crema	2.2 %
A3BC1	OS-A3BC09-A-0-1	Rojo pastel brillante	70 %
A3BC2	OS-A3BC09-B-0-2	Rojo pastel	12.2 %
A3BC3	OS-A3BC09-B-0-3	Blanco	43.3 %
A3BC4	OS-A3BC09-B-(-1)-4	Transparente	49.1 %
A3BC5	25-A3BC09-A-0-5	Rosa transparente	0.7 %
A3BC6	25-A3BC09-A-0-6	Crema	20 %
A3BC7	25-A3BC09-B-0-7	Rojo anaranjada	49.2 %
A3BC8	25-A3BC09-B-(-2)-8	Rojo vino	3 %
A3BC9	20-A3BC09-B-0-9	Rosa anaranjada	17.6 %
A3BC10	20-A3BC09-B-0-10	Rosa claro	27.1 %
A3BC11	20-A3BC09-B-0-11	Rojo intenso brillante	17.6 %
A3BC12	20-A3BC09-B-0-12	Blanco	20 %

Tabla 24. Descripción de las cepas aisladas y seleccionadas de Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).

Microorg. aislado	Microorganismo (Medio-Punto Muestreo-Placa-Dilución-Numeración)	Color de la colonia	Presencia de la colonia seleccionada (% UFC)
A3BC13	15-A3BCO9-B-0-13	Rojo brillante	15 %
A3BC14	15-A3BCO9-B-0-14	Crema	1.6 %
A3BC15	15-A3BCO9-A-(-1)-15	Blanco	2.4 %
A3BC16	15-A3BCO9-B-(-1)-16	Rosa anaranjada	6 %
A3BC17	15-A3BCO9-A-(-2)-17	Roja	1.7 %
A3BC18	15-A3BCO9-B-(-2)-18	Crema	0.8 %
A3BC19	10-A3BCO9-B—19	Marrón oscuro	2 %
A3BC20	10-A3BCO9-B-0-20	Salmón claro	0.3 %
A3BC21	10-A3BCO9-B-0-21	Naranja	0.3 %
A3BC22	10-A3BCO9-B-0-22	Transparente	21.7 %
A3BC23	10-A3BCO9-A-(-2)-23	Blanca	21.6 %
A4BC1	OS-A4BCO9-1	Roja	100 %
A4BC2	25-A4BCO9-B-0-2	Rosa	10 %
A4BC3	25-A4BCO9-B-0-3	Rosa intenso	15 %
A4BC4	25-A4BCO9-B-0-4	Rojo sangre	15 %
A4BC5	25-A4BCO9-B-0-5	Rojo burdeos	20 %
A4BC6	25-A4BCO9-B-0-6	Rojo transparente	40 %
A4BC7	20-A4BCO9-B-(-1)-7	Rojo sangre intenso	30 %
A4BC8	20-A4BCO9-B-(-1)-8	Rojo brillante	70 %
A4BC9	20-A4BCO9-B-(-2)-9	Rosa oscura	21.1 %
A4BC10	15-A4BCO9-A-0-10	Rojo brillante	20 %
A4BC11	15-A4BCO9-A-0-11	Ocre	0.3 %
A4BC12	15-A4BCO9-A-0-12	Rojo	60 %
A4BC13	15-A4BCO9-B-0-13	Salmón oscuro	2.17 %
A4BC14	15-A4BCO9-B-0-14	Blanco oscuro	4.35 %
A4BC15	10-A4BCO9-A-0-15	Marrón claro	100 %
A4BC16	10-A4BCO9-B-0-16	Naranja	25 %
A4BC17	10-A4BCO9-B-(-1)-17	Beige	90.9 %
S1BC1	OS-S1BCO9-A-(-2)-1	Rosa oscuro	33.9 %
S1BC2	OS-S1BCO9-A-(-4)-2	Rosa brillante	100 %
S1BC3	25-S1BCO9-A-(-1)-3	Rojo transparente	30 %
S1BC4	25-S1BCO9-B-(-1)-4	Rojo sangre	40 %
S1BC5	25-S1BCO9-B-(-1)-5	Rojo transparente	30 %
S1BC6	25-S1BCO9-B-(-2)-6	Rojo anaranjada	33.9 %
S1BC7	20-S1BCO9-A-(-1)-7	Rosa oscuro	30 %
S1BC8	20-S1BCO9-B-(1)-8	Crema	0.95 %
S1BC9	20-S1BCO9-B-(1)-9	Rojo brillante	59.8 %
S1BC10	15-S1BCO9-A-(-1)-10	Marrón oscura	5 %

Tabla 24. Descripción de las cepas aisladas y seleccionadas de Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).

Microorg. aislado	Microorganismo (Medio-Punto Muestreo-Placa-Dilución-Numeración)	Color de la colonia	Presencia de la colonia seleccionada (% UFC)
S1BC11	15-S1BCO9-A-(-1)-11	Rojo intenso	80 %
S1BC12	15-S1BCO9-B-(-1)-12	Rojo transparente	30.8 %
S1BC13	10-S1BCO9-A-(-1)-13	Naranja	25 %
S1BC14	10-S1BCO9-B-(-1)-14	Marrón	100 %
S1BC15	10-S1BCO9-A-(-4)-15	Marrón claro	33.3 %
S1BC16	10-S1BCO9-A-(-4)-16	Amarillo oscuro	33.3 %
S1BC17	10-S1BCO9-B-(-4)-17	Amarillo claro	100 %
S2BC1	0S-S2BCO9-A-(-1)-1	Rojo	54.5 %
S2BC2	0S-S2BCO9-A-(-1)-2	Rosa claro	20 %
S2BC3	0S-S2BCO9-A-(-1)-3	Blanco	16.4 %
S2BC4	0S-S2BCO9-A-(-1)-4	Rojo oscuro	9.1 %
S2BC5	25-S2BCO9-A-(-1)-5	Rosa transparente	20 %
S2BC6	25-S2BCO9-A-(-1)-6	Rojo claro	15 %
S2BC7	25-S2BCO9-A-(-1)-7	Rojo intenso	60 %
S2BC8	25-S2BCO9-A-(-3)-8	Crema	3.3 %
S2BC9	20-S2BCO9-A-(-1)-9	Marrón verde	3 %
S2BC10	20-S2BCO9-A-(-1)-10	Naranja	1.5 %
S2BC11	20-S2BCO9-A-(-1)-11	Amarillo	0.6 %
S2BC12	20-S2BCO9-A-(-1)-12	Marrón	0.3 %
S2BC13	20-S2BCO9-B-(-1)-13	Marrón	5 %
S2BC14	20-S2BCO9-B-(-1)-14	Amarillo	0.6 %
S2BC15	20-S2BCO9-B-(-2)-15	Rojo transparente	25 %
S2BC16	20-S2BCO9-B-(-2)-16	Rojo intenso	40 %
S2BC17	15-S2BCO9-A-(-1)-17	Marrón claro	0.3 %
S2BC18	15-S2BCO9-A-(-1)-18	Amarillo anaranjada	0.6 %
S2BC19	15-S2BCO9-A-(-1)-19	Rojo brillante	0.3 %
S2BC20	15-S2BCO9-A-(-1)-20	Marrón anaranjada	0.3 %
S2BC21	15-S2BCO9-A-(-1)-21	Crudo	30 %
S2BC22	10-S2BCO9-B-(-1)-22	Marrón anaranjada	2.4 %
S2BC23	10-S2BCO9-A-(-2)-23	Rojo	4.8 %
S2BC24	10-S2BCO9-A-(-1)-24	Marrón	2 %
S2BC25	10-S2BCO9-B-(-1)-25	Blanco transparente	2.3 %
S2BC26	10-S2BCO9-A-(-2)-26	Amarillo	2.9 %
S2BC27	10-S2BCO9-A-(-2)-27	Naranja	20 %
S2BC28	10-S2BCO9-A-(-3)-28	Rosa claro	50 %
S3BC1	0S-S3BCO9-A-(-1)-1	Beige	45 %
S3BC2	0S-S3BCO9-A-(-1)-2	Rosa oscuro	10 %
S3BC3	0S-S3BCO9-A-(-1)-3	Rojo intenso	15 %

Tabla 24. Descripción de las cepas aisladas y seleccionadas de Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).

Microorg. aislado	Microorganismo (Medio-Punto Muestreo-Placa-Dilución-Numeración)	Color de la colonia	Presencia de la colonia seleccionada (% UFC)
S3BC4	OS-S3BCO9-A-(-1)-4	Rosa palo	30 %
S3BC5	25-S3BCO9-B-0-5	Rosa claro	2.6 %
S3BC6	25-S3BCO9-B-(-1)-6	Rojo anaranjado	40 %
S3BC7	25-S3BCO9-B-(-1)-7	Rojo brillante	20 %
S3BC8	20-S3BCO9-B-(-3)-8	Crema	19.6 %
S3BC9	20-S3BCO9-B-(-3)-9	Marrón claro	16.1 %
S3BC10	20-S3BCO9-B-(-3)-10	Rojo salmón	2.8 %
S3BC11	20-S3BCO9-B-(-3)-11	Rosa claro	2.8 %
S3BC12	20-S3BCO9-B-(-3)-12	Beige	53.8 %
S3BC13	15-S3BCO9-B-(-4)-13	Marrón	13.8 %
S3BC14	15-S3BCO9-B-(-4)-14	Marrón claro	24.1 %
S3BC15	15-S3BCO9-B-(-4)-15	Ocre	10.3 %
S3BC16	10-S3BCO9-B-(-4)-16	Marrón	42.9 %
S3BC17	10-S3BCO9-B-(-4)-17	Marrón	4.3 %
S3BC18	10-S3BCO9-B-(-4)-18	Marrón	1.4 %
S4BC1	OS-S4BCO9-B-(-1)-1	Rojo vino	3 %
S4BC2	OS-S4BCO9-B-(-1)-2	Rojo claro	3 %
S4BC3	OS-S4BCO9-B-(-3)-3	Rosa brillante	100 %
S4BC4	25-S4BCO9-A-(-2)-4	Rojo intenso	50 %
S4BC5	25-S4BCO9-A-(-2)-5	Rojo transparente	20 %
S4BC6	25-S4BCO9-A-(-2)-6	Rosa transparente	30 %
S4BC7	20-S4BCO9-B-(-2)-7	Rojo intenso	70 %
S4BC8	20-S4BCO9-B-(-2)-8	Rojo transparente	30 %
S4BC9	15-S4BCO9-A-(-1)-9	Marrón claro	0.3 %
S4BC10	15-S4BCO9-A-(-1)-10	Amarillo	0.3 %
S4BC14	15-S4BCO9-A-(-2)-11	Rojo brillante	0.3 %
S4BC12	15-S4BCO9-A-(-2)-12	Rosa transparente	99.9 %
S4BC13	10-S4BCO9-A-(-1)-13	Rosa	33.3 %
S4BC14	10-S4BCO9-A-(-1)-14	Marrón	33.3 %
S4BC15	10-S4BCO9-A-(-1)-15	Naranja oscuro	33.3 %
S4BC16	10-S4BCO9-B-(-1)-16	Blanca transparente	25 %

Los resultados preliminares, relativos al crecimiento de microorganismos, obtenidos de los tres ambientes salinos tienen un elevado valor de UFC a medida que la concentración salina de los medios de cultivo iba incrementándose. Esta

situación destaca la presencia marcada de microorganismos halófilos extremos. Sin embargo, se ha de destacar que existen bacterias capaces de crecer en intervalos de concentración salina bastante amplios, localizando su óptimo a bajas salinidades (Sabet, et al., 2009). Este hecho, explica la elevada carga microbiana en porcentajes altos de salinidad, así el porcentaje de microorganismo con coloraciones atípicas a estas concentraciones. El uso del medio OS, deriva de la capacidad que tiene para permitir un buen desarrollo de determinadas arqueas, en concreto del género *Halobacterium*, con lo cual aseguramos abarcar este dominio de microorganismos. El crecimiento en estos medios no alcanza su pico máximo, de forma generalizada, hasta la tercera semana. Siendo llamativo en el caso de La Malahá, o de Bahía de Cádiz, donde el crecimiento fue inexistente hasta la segunda semana, en donde las UFC se manifiestan. Esta situación viene explicada por las dificultades de adaptación a la nueva situación, ya que proceden de un medio en el cual coexisten con muchas especies en las que pueden darse relaciones simbióticas que facilitan la vida en estos ambientes extremos, y dónde los nutrientes, difieren en cantidad y forma de los medios de cultivo de los aislamientos.

En cuanto a la diversidad de coloración, en la totalidad de cepas aisladas y seleccionadas en los tres ambientes andaluces (Figura 30), existe una mayor presencia de aquellas cepas que desarrollan pigmentos de tonalidades rojizas y rosadas, las cuales suelen asociarse a arqueas y bacterias halófilas extremas, pigmentadas, que juegan un papel importante en la adaptación a ambientes salinos

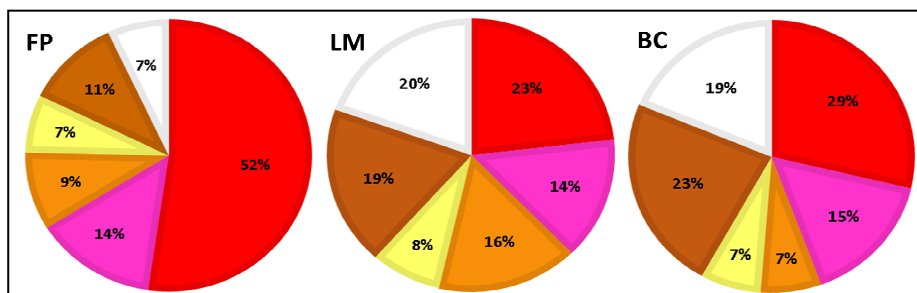


Fig. 30. Porcentajes de la coloración de unidades formadoras de colonias aisladas en los ambientes de FP (Fuente de Piedra), LM (La Malahá) y BC (Bahía de Cádiz). (Colonias rojas, rosadas, anaranjadas, amarillentas, ocre y blanquecinas).

(Müller & Köscher, 2011), debido a que estos suponen una protección ante las radiaciones UV a las que se encuentran sometidas. Mientras que la presencia de microorganismos con ausencia de β -carotenos, se presentan en porcentajes algo más elevados en La Malahá y Bahía de Cádiz. Esta ausencia de pigmentación viene debida a que estos ambientes presentaban una salinidad inferior en el momento de la recogida de muestras, haciendo, consecuentemente, que el número de bacterias probablemente sea más elevado que el de arqueas. Es destacable la condición de que los colores rojos y rosas, en sus numerosas tonalidades, son predominantes en el medio OS y en el HM a altas concentraciones salinas (Oren & Rodríguez-Valera, 2001), mientras que a medida que baja la concentración de sal, aumente la gama de colores pálidos hasta abarcar el blanco, el cual deja de ser característico para las arqueas. Esta condición, la presencia de pigmentos carotenoides, predetermina uno de los primeros filtros que se aplican para la selección de cepas que entrarán en el grueso del estudio, ya que principalmente la tesis va orientado a la búsqueda de arqueas.

1.2. SELECCIÓN DE CEPAS

El interés científico por los microorganismos extremófilos se ha incrementado en las últimas décadas, debido al todavía incompleto tercer dominio de la vida, el dominio de las Arqueas. Los organismos que han evolucionado en ambientes salinos y son capaces de superar el efecto negativo de la sal a concentraciones saturadas, se han considerado útiles para el estudio ecológico y evolutivo. Además, sus mecanismos de adaptación son un aspecto bastante interesante desde el punto de vista microbiológico, así como a nivel industrial, por las rutas bioquímicas involucrados bajo condiciones extremas, lo que genera un potencial uso en diferentes áreas industriales (Elevi, et al., 2004).

Los principales candidatos a encontrar en las salinas son los microorganismos halófilos. Sin embargo, dentro de esta clasificación tan amplia, el concepto previo en este estudio para la criba de microorganismos, fue el inmediato interés en las arqueas, y en segundo plano, la búsqueda de bacterias halófilas extremas. Como criterios de selección, se tuvo presente el espectro salino que presentaban, así como el color que desarrollaban en la placa. De manera que el primer paso, fue el descarte de todas aquellas cepas de colores blancos, marrones, ocre y con coloración similar, ya que responderían, con elevada probabilidad, a microorganismos del dominio de las bacterias. Se pretendía encontrar cepas que fueran capaces de sobrevivir en dichos ambientes hostiles, sin requerimientos específicos y sin exigencias ambientales, más allá de la elevada salinidad. De manera, que los microorganismos anaerobios, por ejemplo, no fueron objeto de estudio, porque la recogida de muestras se realizó en zonas expuestas al oxígeno.

El siguiente paso, fue el análisis del perfil de crecimiento en salinidad, buscando aquellas cepas que presentaran un espectro típico de halófilas extremas y moderadas, aunando características físicas atractivas, tales como morfología colonial, tamaño, producción de colonias con exopolisacárido y el color del pigmento que presentaran.

Para conocer los requerimientos salinos de las 426 cepas aisladas (Figura 31), se prepararon medio HM en un amplio rango de concentraciones de sales: 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5, 25 y 30 % (p/v).

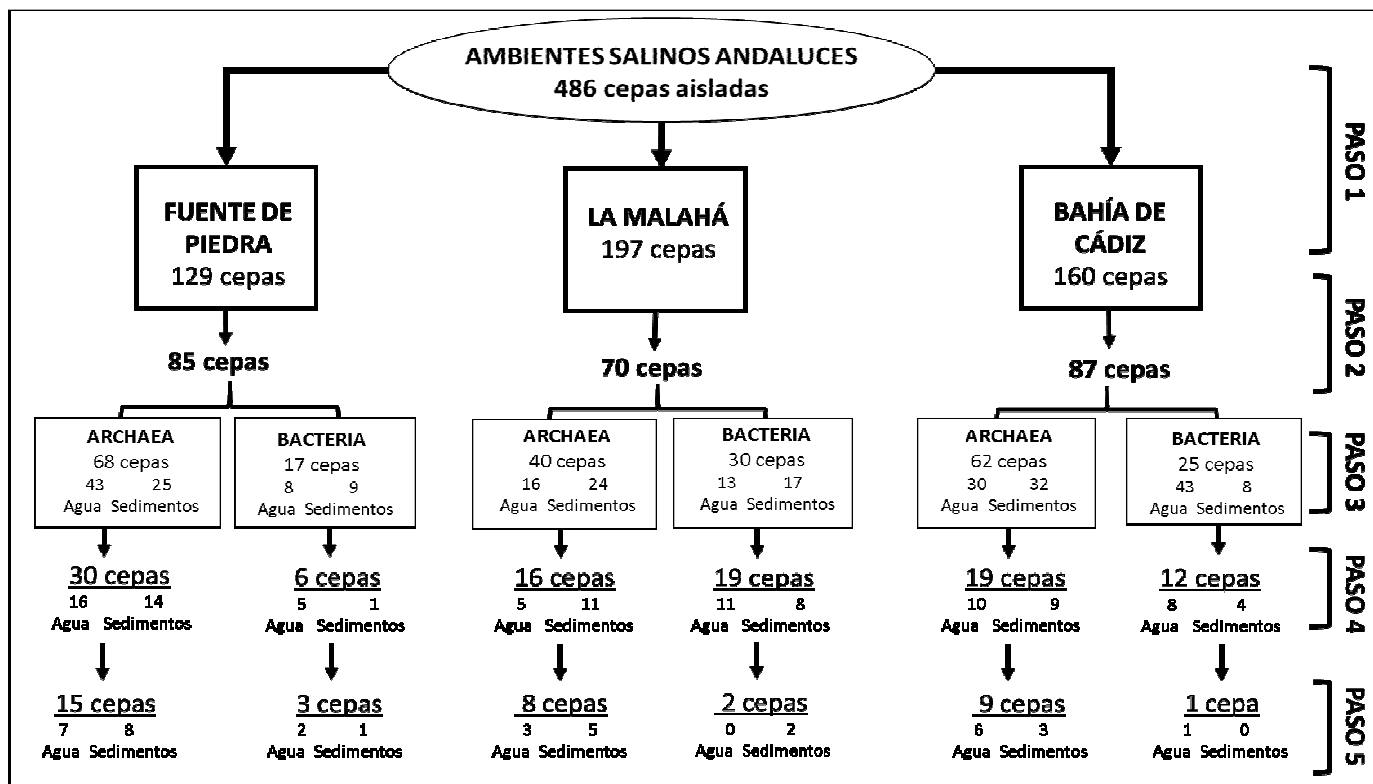


Fig. 31. Diagrama de selección de las cepas aisladas de los tres ambientes salinos, desde la recogida inicial hasta la selección final por taxonomía molecular. (Paso 1: Selección de cepas en base su coloración y producción de exopolisacárido; Paso 2: selección por rango de salinidad; Paso 3: test fenotípicos y taxonomía numérica; Paso 4: Secuencias parciales del 16S rRNA; Paso 5: Secuencias totales del 16S rRNA).

Las lecturas de los resultados se realizaron transcurridos 14 días de incubación. Mediante los espectros (expresados en porcentaje de Subov) se pudo determinar el grado de halofilismo de las cepas procedentes de los tres ambientes andaluces (Tablas 25, 26 y 27).

Tabla 25. Espectro de salinidad de cepas aisladas procedentes de Fuente de Piedra.

CEPA	0	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20	22.5	25	30
A1FP1						+	+	+	+	+	+	
A1FP2						+	+	+	+	+	+	+
A1FP3								+	+	+	+	+
A1FP4						+	+	+	+	+	+	+
A1FP5						+	+	+	+	+	+	+
A1FP6							+	+	+	+	+	+
A1FP7						+	+	+	+	+	+	
A1FP8			+	+	+	+	+	+	+			
A1FP9						+	+	+	+	+		
A1FP10				+	+	+	+					
A1FP11				+	+	+	+					
A1FP12			+	+	+	+	+	+	+			
A1FP13				+	+	+	+	+				
A1FP14						+	+	+	+	+	+	+
A1FP15						+	+	+	+	+	+	+
A1FP16						+	+	+	+	+	+	+
A1FP17						+	+	+	+	+	+	+
A1FP18					+	+	+	+	+	+	+	
A1FP19						+	+	+	+	+	+	+
A1FP20						+	+	+	+	+	+	
A1FP21							+	+	+	+	+	
A1FP22						+	+	+	+	+	+	
A1FP23	+	+	+	+	+	+	+					
A1FP24	+	+	+	+	+							
A2FP1						+	+	+	+	+	+	+
A2FP2						+	+	+	+	+	+	+
A2FP3			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A2FP4							+	+	+	+	+	+
A2FP5						+	+	+	+	+	+	
A2FP6								+	+	+	+	+

Tabla 25. Espectro de salinidad de cepas aisladas procedentes de Fuente de Piedra.

CEPA	0	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20	22.5	25	30
A2FP7						+	+	+	+	+	+	
A2FP10						+	+	+	+	+	+	+
A2FP11							+	+	+	+	+	+
A2FP12			+	+	+	+	+	+	+			
A2FP14			+	+	+	+	+	+	+			
A2FP15		+	+	+	+	+	+	+	+			
A2FP16		+	+	+	+	+	+	+	+	+		
A2FP17		+	+	+	+	+	+	+	+	+		
A2FP18	+	+	+	+	+	+	+					
A2FP19				+	+	+	+	+	+	+	+	+
A2FP20						+	+	+	+	+	+	+
A2FP21				+	+	+	+	+	+	+	+	+
A2FP22				+	+	+	+	+	+	+	+	+
A2FP23						+	+	+	+	+	+	+
A2FP24						+	+	+	+	+	+	
A2FP25			+	+	+	+	+	+				
A2FP26						+	+	+	+	+	+	
A2FP27			+	+	+	+	+	+				
A3FP1						+	+	+	+	+	+	+
A3FP2						+	+	+	+	+	+	+
A3FP3						+	+	+	+	+	+	
A3FP4							+	+	+	+	+	+
A3FP5						+	+	+	+	+	+	+
A3FP6							+	+	+	+	+	
A3FP7		+	+	+	+	+	+	+	+	+		
A3FP8					+	+	+	+	+	+	+	
A3FP10				+	+	+	+	+	+	+	+	+
A3FP11			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
A3FP13		+	+	+	+	+	+	+	+			
A3FP14		+	+	+	+	+	+	+	+			
A3FP15		+	+	+	+	+	+					
A3FP16						+	+	+	+	+	+	+
A3FP17						+	+	+	+	+	+	+
A3FP18						+	+	+	+	+	+	+
A3FP19						+	+	+	+	+	+	+
A3FP20						+	+	+	+	+	+	

Tabla 25. Espectro de salinidad de cepas aisladas procedentes de Fuente de Piedra.

CEPA	0	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20	22.5	25	30
A3FP21						+	+	+	+	+	+	+
A3FP22						+	+	+	+	+	+	+
A3FP23							+	+	+			
A3FP24				+	+	+	+	+				
A3FP25	+	+	+	+	+							
S1FP1				+	+	+	+	+	+	+	+	+
S1FP2							+	+	+	+	+	+
S1FP3						+	+	+	+	+	+	+
S1FP4					+	+	+	+	+	+	+	+
S1FP5						+	+	+	+	+	+	+
S1FP6						+	+	+	+	+	+	+
S1FP7							+	+	+	+	+	+
S1FP8					+	+	+	+	+	+	+	+
S1FP9						+	+	+	+	+		
S1FP10						+	+	+	+	+		
S1FP11							+	+	+	+		
S1FP12							+	+	+	+	+	+
S1FP13						+	+	+	+	+	+	
S1FP16			+	+	+							
S1FP17			+	+	+	+	+	+	+	+		
S1FP18				+	+	+	+					
S1FP19		+	+	+	+							
S2FP1						+	+	+	+	+	+	+
S2FP2						+	+	+	+	+	+	+
S2FP3						+	+	+	+	+	+	+
S2FP4							+	+	+	+	+	+
S2FP5							+	+	+	+	+	+
S2FP6							+	+	+	+	+	+
S2FP7							+	+	+	+	+	+
S2FP8						+	+	+	+	+	+	+
S2FP9							+	+	+	+	+	+
S2FP10							+	+	+	+	+	+
S2FP12						+	+	+	+	+	+	+
S2FP13							+	+	+	+	+	+
S2FP14						+	+	+	+	+	+	+
S2FP15				+	+	+	+	+	+	+		

Tabla 25. Espectro de salinidad de cepas aisladas procedentes de Fuente de Piedra.

CEPA	0	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20	22.5	25	30
S2FP16						+	+	+	+	+	+	+
S2FP17			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S2FP18			+	+	+	+	+	+	+	+		
S2FP19			+	+	+	+	+	+	+	+		
S2FP20				+	+	+	+	+	+	+	+	+
S2FP21				+	+	+	+	+	+	+		
S2FP22					+	+	+	+	+	+		
S2FP23						+	+	+	+	+	+	+
S2FP24						+	+	+	+	+	+	+
S2FP25						+	+	+	+			
S2FP26		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
S2FP27						+	+	+	+	+	+	+
S2FP28			+	+	+	+	+	+				
S2FP29	+	+	+	+	+							
S2FP30			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
S2FP31			+	+	+	+	+	+				
S2FP32		+	+	+	+	+	+	+	+			
S2FP33		+	+	+	+							

Tabla 26. Espectro de salinidad de cepas aisladas procedentes de La Malahá.

CEPA	0	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20	22.5	25	30
A1LM1								+	+	+	+	+
A1LM2						+	+	+	+	+	+	+
A1LM3				+	+	+	+	+	+	+	+	+
A1LM4				+	+	+	+	+	+	+	+	+
A1LM5				+	+	+	+	+	+	+	+	+
A1LM6				+	+	+	+	+	+	+	+	+
A1LM7								+	+	+	+	+
A1LM8								+	+	+	+	+
A1LM9									+	+	+	+
A1LM10					+	+	+	+	+	+		
A1LM11						+	+	+	+	+	+	+
A1LM12								+	+	+	+	+
A1LM13								+	+	+	+	
A1LM14			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 26. Espectro de salinidad de cepas aisladas procedentes de La Malahá.

CEPA	0	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20	22.5	25	30
A1LM15				+	+	+	+	+	+	+	+	+
A1LM16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
A1LM17						+	+	+	+	+	+	
A1LM18			+	+	+	+	+	+	+	+		
A1LM21								+	+	+	+	+
A1LM22			+	+	+	+	+	+	+	+		
A1LM23			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
A1LM24			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
A1LM25			+	+	+	+	+	+	+	+		
A1LM26						+	+	+	+	+		
A1LM28						+	+	+				
A1LM29		+	+	+	+	+	+					
A1LM30			+	+	+	+	+	+	+	+		
A1LM31		+	+	+	+	+	+	+				
A1LM32		+	+	+	+	+	+	+				
A1LM33	+	+	+	+	+							
A2LM1								+	+	+	+	+
A2LM2					+	+	+	+	+	+	+	+
A2LM3							+	+	+	+	+	
A2LM4							+	+	+	+	+	+
A2LM5							+	+	+	+	+	
A2LM6						+	+	+	+	+	+	+
A2LM7			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
A2LM8							+	+	+	+	+	+
A2LM9								+	+	+	+	+
A2LM10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
A2LM11	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
A2LM12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
A2LM15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
A2LM16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
A2LM17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
A2LM18			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
A2LM19						+	+	+	+	+	+	
A2LM20	+	+	+	+	+	+	+	+				
A2LM21			+	+	+	+	+	+	+	+		
A2LM22			+	+	+	+	+					

Tabla 26. Espectro de salinidad de cepas aisladas procedentes de La Malahá.

CEPA	0	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20	22.5	25	30
A2LM23		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
S1LM1		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S1LM2					+	+	+	+	+	+	+	+
S1LM3		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S1LM4			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S1LM5				+	+	+	+	+	+	+	+	
S1LM6							+	+	+	+	+	+
S1LM7				+	+	+	+	+	+	+	+	+
S1LM8				+	+	+	+	+	+	+	+	+
S1LM11						+	+	+	+	+	+	+
S1LM12						+	+	+	+	+	+	+
S1LM13						+	+	+	+	+	+	+
S1LM14						+	+	+	+	+	+	+
S1LM15			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
S1LM16				+	+	+	+	+	+	+	+	
S1LM17					+	+	+	+	+	+	+	+
S1LM18		+	+	+	+	+	+	+	+	+		
S1LM19			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
S1LM20					+	+	+	+	+	+	+	+
S1LM21						+	+	+	+	+	+	
S1LM22		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S1LM23		+	+	+	+	+	+	+	+	+		
S1LM24		+	+	+	+	+						
S1LM25	+	+	+	+	+	+	+					
S1LM26		+	+	+	+	+	+					
S1LM27		+	+	+	+	+	+	+	+			
S1LM28			+	+	+	+	+	+	+			
S1LM29		+	+	+	+	+	+					
S1LM30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
S1LM32					+	+	+	+	+	+	+	+
S1LM33		+	+	+	+	+	+					
S1LM34	+	+	+	+	+							
S1LM35		+	+	+	+	+	+					
S2LM1							+	+	+	+	+	+
S2LM2						+	+	+	+	+	+	+
S2LM3					+	+	+	+	+	+	+	

Tabla 26. Espectro de salinidad de cepas aisladas procedentes de La Malahá.

CEPA	0	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20	22.5	25	30
S2LM4								+	+	+	+	+
S2LM5								+	+	+	+	+
S2LM6					+	+	+	+	+	+	+	+
S2LM7								+	+	+	+	+
S2LM8							+	+	+	+	+	+
S2LM9								+	+	+	+	+
S2LM10								+	+	+	+	+
S2LM11		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
S2LM12								+	+	+	+	
S2LM13		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S2LM15								+	+	+	+	+
S2LM16		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S2LM18					+	+	+	+	+	+	+	+
S2LM19					+	+	+	+	+	+	+	
S2LM20		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
S2LM21					+	+	+	+	+	+	+	
S2LM22		+	+	+	+	+	+	+				
S2LM23		+	+	+	+	+	+	+				
S2LM24	+	+	+	+	+	+	+	+				
S2LM25		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
S3LM2								+	+	+	+	+
S3LM3			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
S3LM5					+	+	+	+	+	+	+	+
S3LM6						+	+	+	+	+	+	+
S3LM7						+	+	+	+	+	+	+
S3LM8			+	+	+	+	+	+	+	+		
S3LM9		+	+	+	+	+	+	+	+	+		
S3LM10					+	+	+	+	+	+	+	+
S3LM12						+	+	+	+	+	+	+
S3LM13			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
S3LM14			+	+	+	+	+	+	+	+		
S3LM15						+	+	+	+	+		
S3LM16		+	+	+	+	+	+	+	+	+		
S3LM17			+	+	+	+						
S3LM18		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S3LM19		+	+	+	+	+						

Tabla 26. Espectro de salinidad de cepas aisladas procedentes de La Malahá.

CEPA	0	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20	22.5	25	30
S3LM20		+	+	+	+	+	+	+	+	+		
S3LM21	+	+	+	+	+	+						

Tabla 27. Espectro de salinidad de cepas aisladas procedentes de La Malahá.

CEPA	0	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20	22.5	25	30
A1BC1		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A1BC2							+	+	+	+	+	+
A1BC3		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A1BC4		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A1BC5		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A1BC6								+	+	+	+	+
A1BC8		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
A1BC9		+	+	+	+	+	+	+	+			
A1BC11		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
A1BC13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
A1BC14	+	+	+	+	+	+	+					
A1BC15	+	+	+	+	+	+	+					
A1BC16		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
A1BC17	+	+	+	+	+	+	+					
A1BC18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
A2BC1							+	+	+	+	+	+
A2BC2		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A2BC3		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A2BC4		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
A2BC5						+	+	+	+	+	+	
A2BC6						+	+	+	+	+	+	
A2BC7								+	+	+	+	+
A2BC8								+	+	+	+	+
A2BC9								+	+	+	+	+
A2BC10							+	+	+	+	+	+
A2BC11				+	+	+	+	+	+	+	+	
A2BC14				+	+	+	+	+	+	+	+	
A2BC15			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
A2BC16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
A2BC17				+	+	+	+	+	+			
A2BC18		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
A2BC19		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
A2BC20		+	+	+	+	+	+	+				

Tabla 27. Espectro de salinidad de cepas aisladas procedentes de La Malahá.

CEPA	0	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20	22.5	25	30
A2BC21			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
A2BC22	+	+	+	+	+	+	+					
A2BC23	+	+	+	+	+	+	+					
A3BC1				+	+	+	+	+	+	+	+	+
A3BC2						+	+	+	+	+	+	+
A3BC3					+	+	+	+	+	+	+	+
A3BC4			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A3BC5						+	+	+	+	+	+	+
A3BC6					+	+	+	+	+	+	+	+
A3BC7							+	+	+	+	+	+
A3BC8							+	+	+	+	+	+
A3BC9							+	+	+	+	+	+
A3BC10					+	+	+	+	+	+	+	+
A3BC11							+	+	+	+	+	
A3BC12							+	+	+	+	+	
A3BC14			+	+	+	+	+	+				
A3BC15		+	+	+	+	+	+					
A3BC16			+	+	+	+	+	+	+			
A3BC17				+	+	+	+	+				
A3BC18		+	+	+	+	+	+					
A3BC19			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
A3BC20				+	+	+						
A3BC21	+	+	+	+	+	+	+					
A3BC22				+	+	+						
A3BC23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
A4BC1						+	+	+	+	+	+	+
A4BC2								+	+	+	+	+
A4BC3							+	+	+	+	+	+
A4BC4									+	+	+	+
A4BC5							+	+	+	+	+	+
A4BC6								+	+	+	+	+
A4BC7							+	+	+	+	+	+
A4BC8								+	+	+	+	+
A4BC9								+	+	+	+	+
A4BC10						+	+	+	+	+	+	+
A4BC11					+	+	+	+	+			
A4BC12						+	+	+	+	+		
A4BC13	+	+	+	+	+	+	+	+				
A4BC14					+	+	+	+	+	+	+	+
A4BC15		+	+	+	+	+	+					

Tabla 27. Espectro de salinidad de cepas aisladas procedentes de La Malahá.

CEPA	0	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20	22.5	25	30
A4BC16					+	+	+	+	+	+		
S1BC1					+	+	+	+	+	+	+	+
S1BC2								+	+	+	+	+
S1BC3								+	+	+	+	+
S1BC4							+	+	+	+	+	+
S1BC5							+	+	+	+	+	+
S1BC6							+	+	+	+	+	+
S1BC7							+	+	+	+	+	+
S1BC8				+	+	+	+	+	+	+		
S1BC10				+	+	+	+	+	+	+	+	
S1BC11							+	+	+	+	+	+
S1BC12						+	+	+	+	+	+	+
S1BC13	+	+	+	+	+	+						
S1BC14			+	+	+	+	+	+	+			
S1BC15	+	+	+	+	+	+	+					
S1BC16	+	+	+	+	+	+	+					
S1BC17							+	+	+	+	+	+
S2BC1							+	+	+	+	+	+
S2BC2						+	+	+	+	+	+	+
S2BC3				+	+	+	+	+	+	+	+	+
S2BC4						+	+	+	+	+	+	+
S2BC5						+	+	+	+	+	+	+
S2BC6							+	+	+	+	+	+
S2BC7						+	+	+	+	+	+	+
S2BC8				+	+	+	+	+	+	+	+	+
S2BC9				+	+	+	+	+	+	+		
S2BC10					+	+	+	+	+	+	+	+
S2BC11			+	+	+	+	+	+	+			
S2BC12					+	+	+	+	+	+	+	+
S2BC13					+	+	+	+	+	+	+	+
S2BC15				+	+	+	+	+	+	+	+	+
S2BC17		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
S2BC18	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
S2BC19					+	+	+	+	+	+	+	
S2BC20			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
S2BC21		+	+	+	+	+	+	+	+	+		
S2BC22			+	+	+	+	+	+	+			
S2BC23					+	+	+	+	+	+	+	
S2BC24			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
S2BC26			+	+	+	+	+	+	+	+		

Tabla 27. Espectro de salinidad de cepas aisladas procedentes de La Malahá.

CEPA	0	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20	22.5	25	30
S2BC27			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
S2BC28			+	+	+	+	+	+	+			
S3BC1				+	+	+	+	+	+	+	+	+
S3BC2				+	+	+	+	+	+	+	+	+
S3BC3				+	+	+	+	+	+	+	+	+
S3BC4						+	+	+	+	+	+	+
S3BC5					+	+	+	+	+	+	+	+
S3BC6						+	+	+	+	+	+	+
S3BC7							+	+	+	+	+	+
S3BC8		+	+	+	+	+	+	+	+	+		
S3BC9						+	+	+	+	+	+	+
S3BC10							+	+	+	+	+	+
S3BC11					+	+	+	+	+	+	+	+
S3BC12		+	+	+	+	+	+	+	+			
S3BC13		+	+	+	+	+	+	+				
S3BC14		+	+	+	+	+	+	+				
S3BC15		+	+	+	+	+	+	+	+			
S3BC16		+	+	+	+	+	+	+				
S3BC17			+	+	+	+	+	+				
S3BC18			+	+	+	+	+	+	+			
S4BC1						+	+	+	+	+	+	+
S4BC2							+	+	+	+	+	+
S4BC3								+	+	+	+	+
S4BC4							+	+	+	+	+	
S4BC5									+	+	+	+
S4BC6							+	+	+	+	+	+
S4BC8							+	+	+	+	+	
S4BC9		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
S4BC10		+	+	+	+	+	+	+	+			
S4BC12						+	+	+	+	+	+	+
S4BC13					+	+	+	+	+	+	+	
S4BC14		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
S4BC15			+	+	+	+	+					
S4BC16	+	+	+	+	+	+	+					

Observando las tres tablas anteriores, donde se muestra el perfil de concentración salino de microorganismos de cada ambiente estudiado, podemos predefinir el tipo de población microbiana. En el caso de la salina malagueña, los microorganismos aislados de sus aguas y sedimentos son mayoritariamente halófilos extremos debido a que el crecimiento se comienza a producir a partir del 3.5 M de ClNa. Esta situación viene fundamentalmente explicada debido a la alta salinidad encontrada en el momento del muestreo, ya que la estación previa a la recogida se había caracterizado por unas escasas precipitaciones acompañadas de elevadas temperaturas, que provocaron que el volumen de agua de la laguna fuera inexistente en algunas zonas de muestreo. Sin embargo, La Malahá muestra un perfil halófilo moderado tendiendo a extremo, debido a que en general los microorganismos aislados de este ambiente poseen de forma individualizada un perfil amplio capaz de adaptarse a diferentes condiciones de salinidad. Una explicación plausible de este perfil, a pesar de las condiciones climatológicas de la estación que precedió al muestreo, puede venir dada por su construcción como explotación humana salinera, con lo que la entrada de agua a sus cristalizadores se realiza de manera regular sin que las condiciones meteorológicas supongan un limitante. Bahía de Cádiz es considerada también una explotación salinera donde el suministro de agua a los cristalizadores procede del océano Atlántico. Ésta posee una población microbiana halófila moderada y extrema, al igual que La Malahá. Por ello en las dos salinas (La Malahá, atalasalina, y Santa M^a de Jesús, talasohalina) utilizadas a día de hoy por el ser humano nos permiten hacer una descripción previa de su población como microorganismos adaptados a oscilaciones frecuentes de salinidad en base al estado de llenado o evaporización de sus cristalizadores.

Tras el análisis del espectro salino en el que son capaces de crecer, unido a características como: la capacidad de generar EPS (exopolisacárido), desarrollar pigmentos (rojos, rosas, naranjas, etc.) y morfología de la colonia. De un total de 129 cepas aisladas en Fuente de piedra se seleccionaron 91; de 197 procedentes de La Malahá se redujeron a 76; y de 160 originarias de Bahía de Cádiz se disminuyó a 99.

De manera que este grupo de cepas seleccionadas son aquellas a las que se le hicieron las pruebas necesarias para desarrollar la taxonomía polifásica (Figura 31).

Solo destacar, que algunos de los microorganismos incubados a 37 °C y crecidos en medios con un elevado porcentaje de salinidad tuvieron dificultades para crecer y tras sucesivas resiembras no consiguieron mantenerse y se perdieron. Se podría decir que son microorganismos que resisten condiciones extremas de sal, pero éste, no es su hábitat natural y probablemente ante estas condiciones extremas pasan a una forma de latencia esperando a que estas condiciones desaparezcan y proliferar nuevamente (Fendrihan, et al., 2012).

2. TAXONOMÍA POLIFÁSICA

La taxonomía polifásica trata de integrar las diferentes fuentes de información, como son el fenotipo, genotipo, quimiotipo y la filogenia de los microorganismos, en un mismo análisis. Esto es lo que constituye la taxonomía bacteriana moderna. Dónde se nos revela la biología de las especies, datos de estructura celular, rasgos bioquímicos y características fisiológicas (de desarrollo y/o diferenciación) en base al entendimiento de la evolución y las relaciones que se establecen entre ellos dentro del mismo género o en un mismo nicho ecológico.

2.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

Los resultados de las pruebas realizadas a cada una de las cepas elegidas de los 3 ambientes salinos de Andalucía, vienen representadas en las siguientes tablas separadas en base a la procedencia de las muestras. En ellas, se agrupan las cepas que tienen el mismo resultado en las distintas pruebas realizadas. Los códigos de los resultados son: (+) resultado positivo; (-) resultado negativo y (9) resultado variable.

2.1.1. Pruebas morfológicas y de cultivo

Pruebas morfológicas, tinción de Gram, test KOH y movilidad

Los resultados de las tablas 28, 29 y 30, corresponden a las pruebas de morfología, movilidad, oxidasa, catalasa, Gram y test KOH que presentan cada uno de los microorganismos analizados. Las abreviaturas de las pruebas, que aparecen en la siguiente tabla, corresponden a: bacilo: **B**; coco: **C**; y pleomórfica: **P**; tinción Gram: **GR**; test KOH: **KOH**; movilidad: **MV**.

Tabla 28. Morfología, tinción de Gram, test KOH y movilidad de los aislados de Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	B	C	PL	GR	KOH	MV	CEPAS	B	C	PL	GR	KOH	MV
A1FP1	-	-	+	-	+	-	A3FP8	-	+	-	-	+	9
A1FP2	-	+	-	-	+	+	A3FP10	-	+	-	+	-	-
A1FP3	-	+	-	-	+	-	A3FP13	+	-	-	+	-	-
A1FP4	-	+	-	-	+	+	A3FP16	-	+	-	-	+	-
A1FP5	-	-	+	-	+	-	A3FP17	-	+	-	-	+	+
A1FP6	+	-	-	-	+	-	A3FP18	-	+	-	-	+	+
A1FP7	+	-	-	-	+	+	A3FP19	+	-	-	-	+	+
A1FP8	+	-	-	+	-	+	A3FP20	-	-	+	-	+	+
A1FP11	-	+	-	-	+	-	A3FP21	-	-	+	-	+	+
A1FP12	+	-	-	-	+	-	A3FP22	-	-	+	-	+	-
A1FP14	-	+	-	-	+	+	S1FP2	-	-	+	-	+	-
A1FP15	-	+	-	-	+	+	S1FP3	-	-	+	-	+	-
A1FP16	-	+	-	-	+	+	S1FP4	-	-	+	-	+	-
A1FP17	-	-	+	-	+	+	S1FP5	-	-	+	-	+	-
A1FP18	-	+	-	+	-	-	S1FP6	-	+	-	-	+	-
A1FP19	+	-	-	-	+	+	S1FP7	-	+	-	-	+	-
A1FP20	+	-	-	-	+	+	S1FP8	-	-	+	-	+	-
A1FP21	-	-	+	+	-	9	S1FP9	-	+	-	+	-	-
A1FP22	-	+	-	-	+	-	S1FP10	-	-	+	-	+	+
A2FP1	-	+	-	-	+	-	S1FP11	-	-	+	+	-	-
A2FP2	-	+	-	-	+	-	S1FP12	-	+	-	-	-	9
A2FP3	-	-	+	-	+	-	S1FP13	-	+	-	-	+	+
A2FP4	-	-	+	-	+	-	S1FP17	+	+	-	+	-	-
A2FP5	-	+	-	-	+	+	S2FP1	-	+	-	-	+	-
A2FP6	-	-	+	+	-	+	S2FP2	-	+	-	-	+	-
A2FP7	-	+	-	-	+	-	S2FP3	-	-	+	-	+	-
A2FP10	-	+	-	-	+	+	S2FP4	-	+	-	+	-	-
A2FP11	-	-	+	-	+	+	S2FP5	-	+	-	-	+	-
A2FP15	-	-	+	-	+	-	S2FP6	-	-	+	-	+	+
A2FP16	-	-	+	+	-	-	S2FP7	-	-	+	-	+	-
A2FP17	-	+	-	+	-	9	S2FP8	-	-	+	-	+	-
A2FP19	-	-	+	+	-	+	S2FP9	-	+	-	-	+	-

Tabla 28. Morfología, tinción de Gram, test KOH y movilidad de los aislados de Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	B	C	PL	GR	KOH	MV	CEPAS	B	C	PL	GR	KOH	MV
A2FP20	-	+	-	-	+	-	S2FP10	-	+	-	-	+	+
A2FP21	+	-	-	-	+	-	S2FP12	-	-	+	-	+	-
A2FP22	+	-	-	-	+	-	S2FP13	-	+	-	-	+	-
A2FP2122T	-	-	+	-	+	+	S2FP14	-	-	+	-	+	-
A2FP23	-	+	-	+	-	+	S2FP15	+	-	-	+	-	+
A2FP24	-	+	-	+	-	-	S2FP16	-	-	+	-	+	-
A2FP26	-	+	-	-	+	9	S2FP20	+	-	-	-	+	-
A3FP1	-	-	+	-	+	-	S2FP21	-	+	-	+	-	-
A3FP2	-	-	+	-	+	+	S2FP22	-	+	-	-	+	-
A3FP3	-	-	+	+	-	-	S2FP23	-	+	-	-	+	-
A3FP4	-	+	-	-	+	9	S2FP24	-	+	-	-	+	-
A3FP5	-	-	+	-	+	+	S2FP25	-	+	-	-	+	-
A3FP6	-	+	-	-	+	-	S2FP27	-	+	-	+	-	-

Tabla 29. Morfología, tinción de Gram, test KOH y movilidad de los aislados de La Malahá (Granada).

CEPAS	B	C	PL	GR	KOH	MV	CEPAS	B	C	PL	GR	KOH	MV
A1LM1	-	+	-	-	+	9	S1LM8	+	-	-	+	-	-
A1LM2	-	-	+	-	+	+	S1LM11	-	+	-	-	+	-
A1LM4	+	-	-	+	-	-	S1LM12	-	+	-	-	+	-
A1LM7	-	-	+	-	+	9	S1LM13	-	-	+	-	+	+
A1LM8	-	+	-	-	+	+	S1LM14	-	+	-	+	-	-
A1LM9	-	-	+	-	-	-	S1LM15	-	+	-	+	-	-
A1LM10	+	-	-	-	+	-	S1LM16	-	+	-	-	+	-
A1LM11	-	+	-	+	-	-	S1LM17	-	+	-	+	-	-
A1LM12	+	-	-	-	+	+	S1LM18	+	+	-	+	-	-
A1LM14	-	+	-	+	-	-	S1LM19	-	+	-	-	+	-
A1LM15	-	+	-	+	-	-	S1LM20	-	+	-	-	+	+
A1LM18	-	+	-	+	-	9	S1LM21	-	-	+	-	+	-
A1LM21	-	-	+	-	+	+	S1LM22	-	+	-	+	-	-
A1LM22	-	+	-	+	-	-	S1LM30	-	+	-	+	-	-
A1LM23	-	+	-	+	-	-	S1LM32	-	+	-	+	-	+
A1LM24	+	-	-	-	+	-	S2LM1	-	+	-	-	+	-

Tabla 29. Morfología, tinción de Gram, test KOH y movilidad de los aislados de La Malahá (Granada).

CEPAS	B	C	PL	GR	KOH	MV	CEPAS	B	C	PL	GR	KOH	MV
A1LM25	-	+	-	+	-	-	S2LM2	-	-	+	-	+	-
A1LM26	+	-	-	-	+	+	S2LM3	-	+	-	+	-	+
A1LM28	-	-	+	-	+	-	S2LM5	-	+	-	-	+	-
A1LM30	-	+	-	+	-	+	S2LM6	+	-	-	-	+	+
A2LM1	-	+	-	-	+	+	S2LM7	-	+	-	+	-	-
A2LM2	-	-	+	-	+	+	S2LM8	-	+	-	+	-	-
A2LM3	-	-	+	-	+	-	S2LM9	-	-	+	-	+	-
A2LM4	-	+	-	-	+	-	S2LM12	-	+	-	+	-	-
A2LM5	-	-	+	-	+	-	S2LM15	-	+	-	+	-	-
A2LM6	-	+	-	-	+	-	S2LM18	-	+	-	-	+	+
A2LM9	-	-	+	+	-	-	S2LM21	-	-	+	-	+	-
A2LM10	+	-	-	-	+	-	S3LM2	-	-	+	-	+	-
A2LM12	+	-	-	+	-	-	S3LM5	-	+	-	+	-	-
A2LM16	+	-	-	+	-	-	S3LM6	-	-	+	-	+	-
A2LM19	+	-	-	-	+	-	S3LM7	-	+	-	-	+	-
A2LM23	-	-	+	-	+	+	S3LM8	-	+	-	+	-	-
S1LM2	+	-	-	+	-	+	S3LM10	-	+	-	+	-	-
S1LM3	-	+	-	+	-	-	S3LM12	-	+	-	-	+	+
S1LM4	-	-	+	-	+	-	S3LM13	-	+	-	+	-	-
S1LM5	-	+	-	+	-	-	S3LM15	-	-	+	-	+	-
S1LM6	-	-	+	-	+	+							

Tabla 30. Morfología, tinción Gram, test KOH y movilidad de los aislados de Santa Mª de Jesús (Chiclana, Cádiz).

CEPAS	B	C	PL	GR	KOH	MV	CEPAS	B	C	PL	GR	KOH	MV
A1BC2	-	+	-	-	+	+	A4BC14	-	+	-	+	-	+
A1BC3	-	+	-	+	-	-	A4BC16	-	+	-	-	+	-
A1BC4	-	+	-	+	-	-	S1BC1	-	+	-	-	+	-
A1BC5	+	-	-	-	+	+	S1BC2	-	-	+	-	+	-
A1BC6	-	+	-	+	-	-	S1BC4	-	+	-	-	+	-
A1BC8	-	+	-	+	-	-	S1BC5	-	-	+	-	+	-
A1BC11	-	+	-	+	-	-	S1BC6	-	-	+	-	+	-
A1BC16	-	+	-	+	-	-	S1BC7	-	-	+	-	+	9

Tabla 30. Morfología, tinción Gram, test KOH y movilidad de los aislados de Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).

CEPAS	B	C	PL	GR	KOH	MV	CEPAS	B	C	PL	GR	KOH	MV
A2BC1	-	+	-	+	-	-	S1BC8	+	-	-	+	-	-
A2BC2	+	-	-	+	-	+	S1BC10	+	-	-	-	+	-
A2BC3	-	+	-	+	-	-	S1BC11	+	-	-	-	+	-
A2BC4	-	+	-	+	-	-	S1BC12	-	+	-	-	+	+
A2BC5	-	-	+	-	+	-	S2BC2	-	-	+	-	+	-
A2BC6	-	+	-	+	-	-	S2BC5	-	-	+	+	-	-
A2BC7	-	-	+	+	-	+	S2BC6	-	-	+	+	-	-
A2BC8	-	-	+	+	-	-	S2BC7	+	-	-	-	+	-
A2BC9	-	-	+	-	+	+	S2BC8	+	-	-	-	+	+
A2BC10	-	+	-	+	-	-	S2BC9	+	-	-	+	-	-
A2BC11	+	-	-	+	-	-	S2BC10	+	-	-	-	+	-
A2BC14	+	-	-	+	-	9	S2BC12	-	+	-	-	+	-
A2BC15	-	+	-	+	-	9	S2BC13	+	-	-	+	-	+
A2BC17	-	+	-	+	-	+	S2BC15	-	-	+	+	-	-
A2BC18	-	-	+	-	+	-	S2BC19	+	-	-	+	-	-
A2BC19	+	-	-	+	-	-	S2BC20	-	-	+	-	+	-
A2BC21	-	-	+	+	-	9	S2BC22	+	-	-	+	-	-
A3BC1	+	-	-	-	+	-	S2BC23	+	-	-	+	-	+
A3BC2	-	-	+	-	+	-	S2BC27	-	+	-	+	-	-
A3BC3	+	-	-	-	+	+	S2BC28	+	-	-	-	+	-
A3BC4	+	-	-	-	+	-	S3BC2	-	-	+	-	+	+
A3BC5	-	-	+	+	-	-	S3BC3	+	-	-	-	+	-
A3BC6	+	-	-	-	+	+	S3BC4	-	-	+	-	+	-
A3BC7	-	+	-	-	+	-	S3BC5	-	-	+	+	-	-
A3BC8	-	+	-	-	+	-	S3BC6	-	+	-	+	-	-
A3BC9	-	-	+	+	-	9	S3BC7	-	-	+	+	-	-
A3BC10	-	-	+	+	-	-	S3BC8	+	-	-	-	+	+
A3BC11	-	-	+	-	+	+	S3BC9	+	-	-	+	-	-
A3BC12	+	-	-	+	-	-	S3BC10	-	-	+	-	+	-
A3BC16	+	-	-	-	+	+	S3BC11	-	-	+	-	+	-
A3BC19	+	-	-	+	-	-	S3BC18	+	-	-	+	-	-
A4BC1	-	+	-	-	+	-	S4BC1	-	+	-	-	+	-
A4BC2	-	-	+	-	+	-	S4BC2	-	+	-	-	+	-

Tabla 30. Morfología, tinción Gram, test KOH y movilidad de los aislados de Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).

CEPAS	B	C	PL	GR	KOH	MV	CEPAS	B	C	PL	GR	KOH	MV
A4BC3	-	+	-	+	-	-	S4BC3	-	+	-	-	+	-
A4BC6	+	-	-	-	+	-	S4BC4	-	+	-	-	+	9
A4BC7	+	-	-	-	+	-	S4BC5	-	-	+	+	-	-
A4BC8	-	+	-	-	+	+	S4BC6	-	+	-	-	+	-
A4BC9	-	+	-	-	+	-	S4BC8	-	-	+	-	+	-
A4BC10	-	+	-	-	+	-	S4BC9	+	-	-	+	-	-
A4BC11	-	+	-	+	-	-	S4BC12	-	+	-	-	+	-

2.1.2. Pruebas fisiológicas

Crecimiento a diferentes concentraciones de sales

Se preparó medio de cultivo HM con porcentajes de sal que oscilaban entre la ausencia de salinidad hasta el 30 % p/v, con objeto de probar la tolerancia de cada microorganismo a las distintas concentraciones de sales. Los resultados se han recogido en las tablas anteriores de la tabla 26 a la 28. Esta designación ayudó a determinar la concentración óptima de salinidad de cada una de las cepas seleccionadas para el estudio.

Crecimiento a diferentes temperaturas y a diferentes pH

Una vez clasificados los microorganismos en el medio HM con su óptima concentración salina de Subov, se desarrollaron las pruebas, las cuales despliegan sus resultados en el medio cuya concentración óptima para el crecimiento sea más cercana al 10 o el 20 % p/v de sales, siendo éstos los porcentajes consensuados para la realización de todas las pruebas de caracterización fenotípica, de modo que no existan factores que puedan variar las condiciones que nos permitan comparar los resultados.

Estos microorganismos seleccionados fueron sometidos al crecimiento a temperaturas que oscilaron entre los 4 °C y los 50 °C. Los medios, también, fueron preparados a diferentes pH para comprobar el crecimiento de cada microorganismo en pH 4; 5.5; 7; 8.5 y 10. Los resultados se muestran en la tabla 31.

Tabla 31. Crecimiento a diferentes temperaturas y pHs de las cepas procedentes de Fuente de Piedra (Málaga), La Malahá (Granada) y Santa M^a de Jesús (Cadiz).

CEPAS	50°C	35°C	22 °C	4 °C	pH 4	pH 5.5	pH 7	pH 8.5	pH 10
A1FP1	+	+	+	-	-	+	+	+	-
A1FP2	+	+	+	-	-	+	+	+	-
A1FP3	-	+	+	-	+	+	+	+	-
A1FP4	-	+	+	-	+	+	+	+	-
A1FP5	+	+	+	-	-	+	+	+	-
A1FP6	-	+	+	-	+	+	+	+	-
A1FP7	+	+	+	-	-	+	+	+	-
A1FP8	+	+	+	+	-	+	+	+	-
A1FP11	-	+	+	+	-	+	+	+	+
A1FP12	-	+	+	+	-	-	+	+	+
A1FP14	+	+	+	-	-	+	+	+	-
A1FP15	-	+	+	-	-	+	+	+	-
A1FP16	+	+	+	-	-	+	+	+	-
A1FP17	+	+	+	-	-	+	+	+	-
A1FP18	+	+	+	-	-	+	+	+	-
A1FP19	+	+	+	-	-	+	+	+	-
A1FP20	+	+	+	+	-	+	+	+	-
A1FP22	+	+	+	-	-	-	+	+	-
A2FP1	-	+	+	-	-	+	+	+	-
A2FP2	-	+	+	-	-	+	+	+	-
A2FP3	-	+	+	-	+	+	+	+	-
A2FP4	+	+	+	+	-	+	+	+	-
A2FP5	+	+	+	+	-	-	+	+	-
A2FP6	+	+	+	+	+	+	+	+	-
A2FP7	+	+	+	-	-	-	+	+	-
A2FP10	+	+	+	-	-	+	+	+	-

Tabla 31. Crecimiento a diferentes temperaturas y pHs de las cepas procedentes de Fuente de Piedra (Málaga), La Malahá (Granada) y Santa M^a de Jesús (Cadiz).

CEPAS	50°C	35°C	22 °C	4 °C	pH 4	pH 5.5	pH 7	pH 8.5	pH 10
A2FP11	-	+	+	+	-	+	+	+	-
A2FP15	-	+	+	+	-	-	+	+	+
A2FP16	-	+	+	+	-	+	+	+	+
A2FP17	-	+	+	+	-	-	+	+	+
A2FP19	-	+	+	-	-	-	+	+	-
A2FP20	+	+	+	-	-	+	+	+	-
A2FP21	-	+	+	+	+	+	+	+	-
A2FP22	-	+	+	-	-	+	+	+	-
A2FP2122T	-	+	+	+	-	-	+	+	-
A2FP23	+	+	+	-	-	+	+	+	-
A2FP24	+	+	+	-	-	+	+	+	-
A3FP1	-	+	+	-	-	+	+	+	-
A3FP2	-	+	+	+	-	+	+	+	-
A3FP3	+	+	+	-	-	-	+	-	-
A3FP4	-	+	+	-	-	-	+	+	-
A3FP5	+	+	+	-	-	+	+	+	-
A3FP6	-	+	-	-	-	+	+	+	-
A3FP10	+	+	-	-	-	+	+	+	-
A3FP13	-	+	+	+	-	+	+	+	+
A3FP16	+	+	+	-	-	+	+	+	-
A3FP17	+	+	+	-	-	+	+	+	-
A3FP18	+	+	+	-	-	+	+	+	-
A3FP19	-	+	+	-	-	+	+	+	-
A3FP20	-	+	+	-	-	+	+	+	-
A3FP21	+	+	+	-	-	+	+	+	-
A3FP22	+	+	-	-	-	+	+	+	-
S1FP2	+	+	+	+	-	+	+	+	-
S1FP3	+	+	+	-	-	+	+	+	-
S1FP4	+	+	+	+	-	+	+	+	-
S1FP5	+	+	+	-	-	-	+	+	-
S1FP6	+	+	+	-	-	+	+	+	-
S1FP7	-	+	+	-	-	+	+	+	-
S1FP8	+	+	+	+	-	+	+	+	-

Tabla 31. Crecimiento a diferentes temperaturas y pHs de las cepas procedentes de Fuente de Piedra (Málaga), La Malahá (Granada) y Santa M^a de Jesús (Cadiz).

CEPAS	50°C	35°C	22 °C	4 °C	pH 4	pH 5.5	pH 7	pH 8.5	pH 10
S1FP9	-	+	-	-	-	-	+	-	-
S1FP10	-	+	+	+	-	+	+	+	-
S1FP11	-	+	-	-	-	-	+	-	-
S1FP13	+	+	+	+	-	+	+	+	-
S1FP17	-	+	+	+	-	+	+	+	+
S2FP1	+	+	+	-	-	-	+	+	-
S2FP2	+	+	+	-	-	+	+	+	-
S2FP3	+	+	+	+	-	+	+	+	-
S2FP4	+	+	-	-	-	+	+	+	-
S2FP5	+	+	+	-	-	+	+	+	-
S2FP6	-	+	+	-	-	+	+	+	-
S2FP7	+	+	+	-	-	+	+	+	-
S2FP8	-	+	+	-	-	+	+	+	-
S2FP9	+	+	+	-	-	+	+	+	-
S2FP10	-	+	-	-	-	-	+	+	-
S2FP12	+	+	-	-	-	+	+	+	-
S2FP13	+	+	-	-	-	-	+	+	-
S2FP14	+	+	+	-	-	+	+	+	-
S2FP15	-	+	-	-	-	-	+	-	-
S2FP16	-	+	+	+	-	+	+	+	-
S2FP20	+	+	+	-	+	+	+	+	-
S2FP21	-	+	+	-	-	-	+	-	-
S2FP22	+	+	+	-	-	+	+	+	-
S2FP23	-	+	-	-	-	-	+	-	-
S2FP24	+	+	+	-	-	+	+	+	-
S2FP25	+	+	-	-	-	+	+	+	-
S2FP27	+	+	+	-	+	+	+	+	-
A1LM2	-	+	+	-	-	-	+	+	-
A1LM4	+	+	-	-	-	-	+	+	-
A1LM8	-	+	+	-	-	-	+	+	-
A1LM9	+	+	+	-	-	-	+	+	-
A1LM10	-	+	+	+	-	+	+	+	-
A1LM11	+	+	-	-	-	-	+	+	-

Tabla 31. Crecimiento a diferentes temperaturas y pHs de las cepas procedentes de Fuente de Piedra (Málaga), La Malahá (Granada) y Santa M^a de Jesús (Cadiz).

CEPAS	50°C	35°C	22 °C	4 °C	pH 4	pH 5.5	pH 7	pH 8.5	pH 10
A1LM12	-	+	-	-	-	-	+	+	-
A1LM14	+	+	+	+	-	+	+	+	-
A1LM15	-	+	+	+	-	-	+	+	+
A1LM21	-	+	+	-	-	-	+	+	-
A1LM22	-	+	+	+	-	-	+	+	+
A1LM23	+	+	+	-	-	-	+	+	-
A1LM24	-	+	+	+	-	+	+	+	+
A1LM25	+	+	+	+	-	-	+	+	-
A1LM26	-	+	+	-	-	-	+	+	-
A1LM28	-	+	+	+	-	-	+	+	-
A1LM30	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A2LM1	-	+	+	-	-	-	+	+	-
A2LM2	-	+	+	+	-	-	+	+	-
A2LM3	-	+	-	-	-	-	+	+	-
A2LM4	-	+	+	-	-	+	+	+	-
A2LM5	+	+	+	+	-	-	+	+	-
A2LM6	-	+	+	+	-	-	+	+	-
A2LM9	+	+	+	-	-	+	+	+	-
A2LM10	+	+	+	+	-	+	+	+	+
A2LM12	+	+	+	+	-	+	+	+	+
A2LM16	+	+	+	+	-	+	+	+	+
A2LM19	-	+	+	-	-	-	+	+	-
A2LM23	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S1LM2	-	+	+	-	-	+	+	+	-
S1LM3	-	+	+	+	-	+	+	+	+
S1LM4	-	+	+	+	-	+	+	+	+
S1LM5	-	+	+	+	-	+	+	+	+
S1LM6	-	+	+	+	-	+	+	+	-
S1LM8	+	+	+	+	-	-	+	+	-
S1LM11	+	+	+	-	-	-	+	+	-
S1LM12	+	+	+	+	-	+	+	+	-
S1LM13	+	+	+	+	-	+	+	+	-
S1LM14	+	+	+	-	-	+	+	+	-

Tabla 31. Crecimiento a diferentes temperaturas y pHs de las cepas procedentes de Fuente de Piedra (Málaga), La Malahá (Granada) y Santa M^a de Jesús (Cádiz).

CEPAS	50°C	35°C	22 °C	4 °C	pH 4	pH 5.5	pH 7	pH 8.5	pH 10
S1LM15	-	+	+	+	-	+	+	+	+
S1LM16	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S1LM17	+	+	+	-	-	-	+	+	-
S1LM18	-	+	+	+	-	-	+	+	+
S1LM19	-	+	+	+	-	+	+	+	-
S1LM20	+	+	+	-	-	+	+	+	-
S1LM21	-	+	+	+	-	+	+	+	+
S1LM22	-	+	+	+	-	+	+	+	+
S1LM30	-	+	+	+	+	+	+	+	+
S1LM32	-	+	+	-	-	-	+	+	+
S2LM1	+	+	+	-	-	+	+	+	-
S2LM2	-	+	+	-	-	+	+	+	+
S2LM3	-	+	+	+	-	+	+	+	-
S2LM5	-	+	+	-	-	+	+	+	-
S2LM6	+	+	+	+	-	+	+	+	-
S2LM7	+	+	+	-	-	+	+	+	-
S2LM8	-	+	+	-	-	+	+	+	-
S2LM9	+	+	+	-	-	+	+	+	-
S2LM12	-	+	+	-	-	-	+	+	-
S2LM15	+	+	+	-	-	+	+	+	-
S2LM18	+	+	+	+	-	+	+	+	-
S2LM21	-	+	+	+	-	+	+	+	+
S3LM2	-	+	+	-	-	+	+	+	-
S3LM5	+	+	-	-	-	-	+	+	-
S3LM6	-	+	-	-	-	-	+	+	-
S3LM7	+	+	-	-	-	-	+	+	-
S3LM8	-	+	+	-	-	-	+	+	-
S3LM10	+	+	-	-	-	-	+	+	-
S3LM12	+	+	+	+	-	-	+	+	-
S3LM13	-	+	+	+	-	+	+	+	+
S3LM15	+	+	-	+	-	-	+	+	-
A1BC2	+	+	+	+	-	-	+	+	+
A1BC3	+	+	+	+	-	+	+	+	+

Tabla 31. Crecimiento a diferentes temperaturas y pHs de las cepas procedentes de Fuente de Piedra (Málaga), La Malahá (Granada) y Santa M^a de Jesús (Cadiz).

CEPAS	50°C	35°C	22 °C	4 °C	pH 4	pH 5.5	pH 7	pH 8.5	pH 10
A1BC4	+	+	+	+	-	+	+	+	+
A1BC5	+	+	+	+	-	+	+	+	+
A1BC6	-	+	-	-	-	+	+	+	+
A1BC8	+	+	+	+	-	+	+	+	+
A1BC11	+	+	+	+	-	+	+	+	+
A1BC16	+	+	+	+	-	+	+	+	+
A2BC1	+	+	+	-	-	+	+	+	+
A2BC2	+	+	+	+	-	+	+	+	+
A2BC3	+	+	+	+	-	+	+	+	+
A2BC4	+	+	+	+	-	-	+	+	+
A2BC5	+	+	+	+	-	-	+	+	+
A2BC6	+	+	-	-	-	-	+	+	+
A2BC7	+	+	-	-	-	-	+	+	+
A2BC8	+	+	-	-	-	-	+	+	+
A2BC9	+	+	+	+	-	+	+	+	+
A2BC10	+	+	-	-	-	+	+	+	+
A2BC11	-	+	+	+	-	+	+	+	+
A2BC15	-	+	+	+	-	+	+	+	+
A2BC17	-	+	+	+	-	+	+	+	+
A2BC18	+	+	+	+	-	+	+	+	+
A2BC19	+	+	+	+	-	+	+	+	+
A2BC21	-	+	+	+	-	+	+	+	+
A3BC1	-	+	+	+	-	+	+	+	+
A3BC2	+	+	-	-	-	-	+	+	+
A3BC3	-	+	+	+	-	+	+	+	+
A3BC4	+	+	+	+	-	+	+	+	+
A3BC5	+	+	-	-	-	-	+	+	+
A3BC6	+	+	+	+	-	+	+	+	+
A3BC7	+	+	-	-	-	+	+	+	+
A3BC8	+	+	-	-	-	-	+	+	+
A3BC10	+	+	-	-	-	-	+	+	-
A3BC11	+	+	+	-	-	-	+	+	-
A3BC12	-	+	+	+	-	-	+	+	-

Tabla 31. Crecimiento a diferentes temperaturas y pHs de las cepas procedentes de Fuente de Piedra (Málaga), La Malahá (Granada) y Santa M^a de Jesús (Cádiz).

CEPAS	50°C	35°C	22 °C	4 °C	pH 4	pH 5.5	pH 7	pH 8.5	pH 10
A3BC16	-	+	+	+	-	-	+	+	-
A3BC19	-	+	+	+	-	-	+	+	+
A4BC1	+	+	+	+	-	-	+	+	-
A4BC2	-	+	-	-	-	-	+	-	-
A4BC3	+	+	+	+	-	-	+	+	-
A4BC6	-	+	+	-	-	-	+	+	-
A4BC7	+	+	-	-	-	-	+	-	-
A4BC8	-	+	-	-	-	-	+	+	-
A4BC9	-	+	-	-	-	-	+	+	-
A4BC10	-	+	-	-	-	-	+	-	-
A4BC11	-	+	+	+	-	-	+	+	-
A4BC14	+	+	+	+	-	+	+	+	-
A4BC16	-	+	+	+	-	-	+	-	-
S1BC1	+	+	+	+	-	-	+	+	-
S1BC2	-	+	+	-	-	+	+	+	-
S1BC4	-	+	-	-	-	-	+	-	-
S1BC5	-	+	-	-	-	-	+	-	-
S1BC6	+	+	+	-	-	+	+	+	-
S1BC7	-	+	-	-	-	-	+	-	-
S1BC8	-	+	+	+	-	-	+	+	-
S1BC10	-	+	+	-	-	-	+	+	+
S1BC11	+	+	+	-	-	-	+	+	-
S1BC12	-	+	-	-	-	-	+	-	-
S2BC2	+	+	+	-	-	-	+	+	-
S2BC5	+	+	+	-	-	-	+	+	-
S2BC6	-	+	-	-	-	+	+	-	-
S2BC7	+	+	+	-	-	-	+	+	-
S2BC8	+	+	+	+	-	+	+	+	-
S2BC9	-	+	+	+	-	+	+	+	-
S2BC10	+	+	+	-	-	-	+	+	-
S2BC12	-	+	+	-	-	-	+	+	-
S2BC13	-	+	+	-	-	+	+	+	-
S2BC15	+	+	+	-	-	+	+	+	-

Tabla 31. Crecimiento a diferentes temperaturas y pHs de las cepas procedentes de Fuente de Piedra (Málaga), La Malahá (Granada) y Santa M^a de Jesús (Cadiz).

CEPAS	50°C	35°C	22 °C	4 °C	pH 4	pH 5.5	pH 7	pH 8.5	pH 10
S2BC19	-	+	+	+	-	+	+	+	-
S2BC20	+	+	+	+	-	+	+	+	-
S2BC22	-	+	+	-	-	-	+	+	-
S2BC23	-	+	+	+	-	+	+	+	-
S2BC27	-	+	+	+	-	-	+	+	-
S2BC28	-	+	+	+	-	-	+	+	+
S3BC2	+	+	+	-	-	+	+	+	-
S3BC3	-	+	+	-	-	+	+	+	-
S3BC4	+	+	+	-	-	+	+	+	-
S3BC5	+	+	+	-	-	+	+	+	-
S3BC6	+	+	+	-	-	+	+	+	-
S3BC7	+	+	+	-	-	+	+	+	+
S3BC8	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S3BC9	+	+	+	-	-	+	+	+	-
S3BC10	+	+	+	-	-	+	+	+	-
S3BC11	+	+	+	-	-	-	+	+	+
S3BC18	-	+	+	+	-	-	+	+	+
S4BC1	+	+	+	-	-	-	+	+	+
S4BC2	+	+	+	-	-	-	+	+	-
S4BC3	+	+	+	-	-	-	+	+	-
S4BC6	+	+	+	-	-	-	+	+	-
S4BC8	+	+	+	-	-	-	+	+	+
S4BC9	-	+	+	+	-	+	+	+	-
S4BC12	+	+	+	-	-	+	+	+	-

Crecimiento en medio líquido, en ausencia de magnesio y en anaerobiosis en presencia de arginina

Los resultados de las restantes pruebas de fisiológicas se presentan en las tablas 32, 33 y 34, donde las siguientes claves permiten conocer la correspondencia de cada prueba. Para el tipo de crecimiento que desarrolla en medio líquido: **V**, genera un velo en la superficie del medio líquido; **H**, el crecimiento es homogéneo; y **F**, el crecimiento genera un botón en el fondo del tubo; **Mg**: crecimiento en ausencia de Magnesio y **A**: crecimiento en anaerobiosis en presencia de arginina.

Tabla 32. Crecimiento en medio líquido, ausencia de Magnesio y anaerobiosis en presencia de arginina: Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	Mg	A	V	H	F	CEPAS	Mg	A	V	H	F
A1FP1	+	-	-	+	-	A3FP10	-	-	-	+	-
A1FP2	+	-	-	+	-	A3FP13	-	+	-	+	-
A1FP3	+	-	-	+	-	A3FP16	+	+	-	+	-
A1FP4	+	+	-	+	-	A3FP17	+	-	-	+	-
A1FP5	+	+	-	+	-	A3FP18	+	+	-	+	-
A1FP6	+	-	-	+	-	A3FP19	+	-	-	+	-
A1FP7	-	-	-	+	-	A3FP20	+	-	-	+	-
A1FP8	+	-	-	+	-	A3FP21	+	-	-	+	-
A1FP11	+	-	-	+	-	A3FP22	+	-	-	+	-
A1FP12	+	+	-	+	-	S1FP2	+	-	-	+	-
A1FP14	+	+	-	+	-	S1FP3	+	-	-	-	+
A1FP15	+	+	-	+	-	S1FP4	+	-	-	-	+
A1FP16	-	-	-	+	-	S1FP5	+	+	-	+	-
A1FP17	+	+	-	+	-	S1FP6	+	-	-	-	+
A1FP18	-	-	-	+	-	S1FP7	+	-	-	-	+
A1FP19	+	-	-	+	-	S1FP8	+	-	-	-	+
A1FP20	+	+	-	-	+	S1FP9	-	+	-	+	-
A1FP21	+	-	-	+	-	S1FP10	+	-	-	+	-
A1FP22	+	-	-	+	-	S1FP11	-	-	-	+	-
A2FP1	+	+	-	+	-	S1FP13	+	-	-	+	-

Tabla 32. Crecimiento en medio líquido, ausencia de Magnesio y anaerobiosis en presencia de arginina: Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	Mg	A	V	H	F	CEPAS	Mg	A	V	H	F
A2FP2	+	-	-	+	-	S1FP17	+	-	-	+	-
A2FP3	+	-	-	+	-	S2FP1	+	-	-	+	-
A2FP4	+	+	-	+	-	S2FP2	-	-	-	+	-
A2FP5	+	+	-	-	+	S2FP3	+	+	-	+	-
A2FP6	+	-	-	+	-	S2FP4	-	-	-	+	-
A2FP7	+	-	-	+	-	S2FP5	+	-	-	+	-
A2FP10	+	-	-	+	-	S2FP6	+	-	-	-	+
A2FP11	+	+	-	+	-	S2FP7	+	-	-	+	-
A2FP15	+	+	-	-	+	S2FP8	+	+	-	+	-
A2FP16	+	+	-	+	-	S2FP9	+	-	-	-	+
A2FP17	+	+	-	-	+	S2FP10	+	+	-	+	-
A2FP19	+	+	-	+	-	S2FP12	+	-	-	+	-
A2FP20	+	+	-	+	-	S2FP13	-	-	-	+	-
A2FP21	+	-	+	-	-	S2FP14	+	+	-	+	-
A2FP22	+	+	-	-	+	S2FP15	+	-	-	+	-
A2FP2122T	+	+	+	-	-	S2FP16	+	-	-	+	-
A2FP23	+	-	-	+	-	S2FP20	+	-	-	+	-
A2FP24	-	-	-	+	-	S2FP21	-	-	-	+	-
A3FP1	+	-	-	-	+	S2FP22	-	-	-	+	-
A3FP2	+	-	-	-	+	S2FP23	-	+	-	+	-
A3FP3	+	-	-	+	-	S2FP24	+	-	-	+	-
A3FP4	+	-	-	-	+	S2FP25	-	+	-	-	+
A3FP5	+	+	-	+	-	S2FP27	+	-	-	+	-
A3FP6	+	-	-	+	-						

Tabla 33. Crecimiento en medio líquido, ausencia de Magnesio y anaerobiosis en presencia de arginina: La Malahá (Granada).

CEPAS	Mg	A	V	H	F	CEPAS	Mg	ANA	V	H	F
A1LM2	+	-	-	+	-	S1LM11	+	+	+	-	-
A1LM4	+	+	-	+	-	S1LM12	+	+	+	-	-
A1LM8	+	-	-	+	-	S1LM13	+	-	-	-	+
A1LM9	+	-	-	+	-	S1LM14	+	-	-	+	-
A1LM10	+	+	+	-	-	S1LM15	+	-	-	+	-

Tabla 33. Crecimiento en medio líquido, ausencia de Magnesio y anaerobiosis en presencia de arginina: La Malahá (Granada).

CEPAS	Mg	A	V	H	F	CEPAS	Mg	ANA	V	H	F
A1LM11	+	-	-	+	-	S1LM16	+	-	-	+	-
A1LM12	+	-	-	+	-	S1LM17	+	-	-	-	+
A1LM14	+	-	+	-	-	S1LM18	+	-	-	+	-
A1LM15	+	-	-	+	-	S1LM19	+	-	-	+	-
A1LM21	+	-	+	-	-	S1LM20	+	-	-	-	+
A1LM22	+	+	+	-	-	S1LM21	+	+	+	-	-
A1LM23	+	+	-	+	-	S1LM22	+	+	-	+	-
A1LM24	+	+	-	+	-	S1LM30	+	-	-	-	+
A1LM25	+	-	-	+	-	S1LM32	+	+	+	-	-
A1LM26	+	+	-	+	-	S2LM1	+	+	-	+	-
A1LM28	+	+	-	+	-	S2LM2	+	+	-	+	-
A1LM30	+	+	-	-	+	S2LM3	+	+	-	+	-
A2LM1	+	+	+	-	-	S2LM5	+	+	-	+	-
A2LM2	+	+	+	-	-	S2LM6	+	+	+	-	-
A2LM3	+	+	+	-	-	S2LM7	+	+	-	+	-
A2LM4	+	+	-	-	+	S2LM8	+	+	+	-	-
A2LM5	+	-	-	+	-	S2LM9	+	+	-	+	-
A2LM6	+	-	-	+	-	S2LM12	+	+	-	+	-
A2LM9	+	-	-	+	-	S2LM15	+	-	-	+	-
A2LM10	+	+	+	-	-	S2LM18	+	+	-	+	-
A2LM12	+	+	-	+	-	S2LM21	+	+	-	+	-
A2LM16	+	+	+	-	-	S3LM2	+	+	-	+	-
A2LM19	+	-	-	+	-	S3LM5	+	-	-	-	+
A2LM23	+	+	+	-	-	S3LM6	+	+	-	+	-
S1LM2	+	-	-	+	-	S3LM7	+	-	-	+	-
S1LM3	+	-	+	-	-	S3LM8	+	+	-	+	-
S1LM4	+	+	-	+	-	S3LM10	+	+	-	+	-
S1LM5	+	-	-	+	-	S3LM12	+	-	-	+	-
S1LM6	+	-	-	+	-	S3LM13	-	+	-	+	-
S1LM8	+	+	-	+	-	S3LM15	+	-	-	+	-

Tabla 34. Crecimiento en medio líquido, ausencia de Magnesio y anaerobiosis en presencia de arginina: Santa M^a de Jesús, Chiclana (Cádiz).

CEPAS	Mg	A	V	H	F	CEPAS	Mg	A	V	H	F
A1BC2	+	-	-	+	-	A4BC14	+	+	+	-	-
A1BC3	+	+	-	+	-	A4BC16	-	-	-	-	+
A1BC4	+	+	-	+	-	S1BC1	+	-	-	+	-
A1BC5	+	+	+	-	-	S1BC2	+	-	-	+	-
A1BC8	+	+	+	-	-	S1BC4	-	-	-	+	-
A1BC11	+	+	+	-	-	S1BC5	-	-	-	-	+
A1BC16	+	+	-	+	-	S1BC6	+	-	-	+	-
A2BC1	+	-	-	+	-	S1BC8	+	-	-	+	-
A2BC2	+	+	+	-	-	S1BC10	+	+	-	+	-
A2BC3	+	+	+	-	-	S1BC11	+	+	-	+	-
A2BC4	+	-	-	+	-	S1BC12	-	+	-	+	-
A2BC5	+	+	-	+	-	S2BC2	+	+	-	+	-
A2BC6	+	-	-	+	-	S2BC5	-	-	-	+	-
A2BC7	+	+	-	+	-	S2BC6	+	-	-	+	-
A2BC8	+	+	-	+	-	S2BC7	+	+	-	+	-
A2BC9	+	+	-	+	-	S2BC8	+	+	+	-	-
A2BC10	+	+	-	+	-	S2BC9	+	+	-	+	-
A2BC11	+	+	-	+	-	S2BC10	+	-	-	-	+
A2BC15	+	+	-	+	-	S2BC12	-	9	-	+	-
A2BC17	+	+	-	+	-	S2BC13	+	+	-	+	-
A2BC18	+	+	-	+	-	S2BC15	+	+	-	+	-
A2BC19	+	+	-	+	-	S2BC19	+	+	-	-	+
A2BC21	+	+	-	+	-	S2BC20	+	+	-	+	-
A3BC1	+	+	-	+	-	S2BC22	+	+	-	-	+
A3BC2	-	+	-	+	-	S2BC23	+	-	-	+	-
A3BC3	+	+	+	-	-	S2BC27	+	+	-	+	-
A3BC4	+	+	+	-	-	S2BC28	+	+	-	+	-
A3BC5	+	+	+	-	-	S3BC2	+	+	-	+	-
A3BC6	+	+	+	-	-	S3BC3	+	+	-	+	-
A3BC7	+	+	+	-	-	S3BC4	+	+	+	-	-
A3BC8	+	+	+	-	-	S3BC5	+	+	-	+	-
A3BC10	-	+	-	+	-	S3BC6	+	+	-	+	-

Tabla 34. Crecimiento en medio líquido, ausencia de Magnesio y anaerobiosis en presencia de arginina: Santa M^a de Jesús, Chiclana (Cádiz).

CEPAS	Mg	A	V	H	F	CEPAS	Mg	A	V	H	F
A3BC11	+	+	-	+	-	S3BC7	+	+	-	-	+
A3BC12	+	-	-	+	-	S3BC8	+	+	+	-	-
A3BC16	+	+	+	-	-	S3BC9	-	+	-	+	-
A3BC19	+	+	-	+	-	S3BC10	+	-	-	+	-
A4BC1	+	-	+	-	-	S3BC11	+	+	-	+	-
A4BC2	+	-	-	+	-	S3BC18	+	+	-	+	-
A4BC3	+	-	-	-	+	S4BC1	+	-	-	+	-
A4BC6	-	+	-	+	-	S4BC2	+	-	-	+	-
A4BC7	-	+	-	-	+	S4BC3	+	-	-	-	+
A4BC8	+	-	-	+	-	S4BC6	+	-	-	+	-
A4BC9	-	-	-	+	-	S4BC8	+	-	-	+	-
A4BC10	+	-	-	+	-	S4BC9	+	+	-	+	-
A4BC11	+	+	-	+	-	S4BC12	+	-	-	+	-

2.1.3. Pruebas bioquímicas

Determinación de presencia o ausencia de enzimas

La capacidad de hidrolizar determinadas compuestos orgánicos para poner de manifiesto la existencia de enzimas, siendo las sustancias a hidrolizar: la caseína (CS), Tween 80 (80), almidón (AL) y gelatina (GEL). Y la presencia de enzimas tales como la catalasa (CAT), la citocromooxidasa (OXI), la β-galactosidasa (ONPG), la nitrato y nitrito reductasa (NO₃ y NO₂) y la triptofanasa (IN) (Tablas 35, 36 y 37).

Tabla 35. Determinación de presencia o ausencia de enzimas: Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	CAT	OXI	ONPG	80	AL	GEL	CS	NO ₃	NO ₂	IN
A1FP1	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
A1FP2	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
A1FP3	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
A1FP4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 35. Determinación de presencia o ausencia de enzimas: Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	CAT	OXI	ONPG	80	AL	GEL	CS	NO ₃	NO ₂	IN
A1FP5	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
A1FP6	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
A1FP7	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A1FP8	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
A1FP11	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
A1FP12	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
A1FP14	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
A1FP15	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
A1FP16	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
A1FP17	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
A1FP18	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
A1FP19	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
A1FP20	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
A1FP22	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
A2FP1	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
A2FP2	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A2FP3	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-
A2FP4	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-
A2FP5	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
A2FP6	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
A2FP7	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
A2FP10	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
A2FP11	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A2FP15	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
A2FP16	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A2FP17	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
A2FP19	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A2FP20	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A2FP21	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+
A2FP22	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A2FP2122T	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A2FP23	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
A2FP24	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
A3FP1	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-

Tabla 35. Determinación de presencia o ausencia de enzimas: Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	CAT	OXI	ONPG	80	AL	GEL	CS	NO ₃	NO ₂	IN
A3FP2	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-
A3FP3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3FP4	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
A3FP5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
A3FP6	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
A3FP8	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
A3FP10	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
A3FP13	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A3FP16	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3FP17	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
A3FP18	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
A3FP19	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A3FP20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3FP21	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
A3FP22	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
S1FP2	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
S1FP3	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-
S1FP4	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
S1FP5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1FP6	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
S1FP7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1FP8	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
S1FP9	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
S1FP10	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
S1FP11	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
S1FP13	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1FP17	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
S2FP1	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
S2FP2	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
S2FP3	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
S2FP4	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
S2FP5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2FP6	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
S2FP7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 35. Determinación de presencia o ausencia de enzimas: Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	CAT	OXI	ONPG	80	AL	GEL	CS	NO ₃	NO ₂	IN
S2FP8	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
S2FP9	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
S2FP10	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
S2FP12	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
S2FP13	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
S2FP14	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
S2FP15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2FP16	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
S2FP20	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
S2FP21	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
S2FP22	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
S2FP23	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
S2FP24	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
S2FP25	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
S2FP27	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+

Tabla 36. Determinación de presencia o ausencia de enzimas: La Malahá (Granada).

CEPAS	CAT	OXI	ONPG	80	AL	GEL	CS	NO ₃	NO ₂	IN
A1LM2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
A1LM4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1LM8	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A1LM9	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A1LM10	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
A1LM11	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
A1LM12	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
A1LM14	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
A1LM15	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
A1LM21	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
A1LM22	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
A1LM23	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
A1LM24	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
A1LM25	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
A1LM26	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-

Tabla 36. Determinación de presencia o ausencia de enzimas: La Malahá (Granada).

CEPAS	CAT	OXI	ONPG	80	AL	GEL	CS	NO ₃	NO ₂	IN
A1LM28	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
A1LM30	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
A2LM1	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
A2LM2	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
A2LM3	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
A2LM4	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
A2LM5	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A2LM6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2LM9	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
A2LM10	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A2LM12	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-
A2LM16	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
A2LM19	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
A2LM23	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
S1LM2	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
S1LM3	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
S1LM4	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
S1LM5	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
S1LM6	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
S1LM8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S1LM11	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
S1LM12	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
S1LM13	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
S1LM14	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-
S1LM15	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
S1LM16	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
S1LM17	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
S1LM18	+	-	-	9	-	-	-	+	-	-
S1LM19	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
S1LM20	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1LM21	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
S1LM22	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1LM30	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
S1LM32	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Tabla 36. Determinación de presencia o ausencia de enzimas: La Malahá (Granada).

CEPAS	CAT	OXI	ONPG	80	AL	GEL	CS	NO ₃	NO ₂	IN
S2LM1	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
S2LM2	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
S2LM3	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
S2LM5	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
S2LM6	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
S2LM7	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
S2LM8	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
S2LM9	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+
S2LM12	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
S2LM15	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
S2LM18	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-
S2LM21	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
S3LM2	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
S3LM5	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
S3LM6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S3LM7	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
S3LM8	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
S3LM10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3LM12	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
S3LM13	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
S3LM15	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-

Tabla 37. Determinación de presencia o ausencia de enzimas: Santa M^a de Jesús, Chiclana (Cádiz).

CEPAS	CAT	OXI	ONPG	80	ALM	GEL	CAS	NO ₃	NO ₂	IN
A1BC2	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A1BC3	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
A1BC4	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
A1BC5	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A1BC6	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
A1BC8	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A1BC11	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A1BC16	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Tabla 37. Determinación de presencia o ausencia de enzimas: Santa M^a de Jesús, Chiclana (Cádiz).

CEPAS	CAT	OXI	ONPG	80	ALM	GEL	CAS	NO ₃	NO ₂	IN
A2BC1	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
A2BC2	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A2BC3	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-
A2BC4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2BC5	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A2BC6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2BC7	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
A2BC8	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A2BC9	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
A2BC10	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
A2BC11	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
A2BC15	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
A2BC17	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
A2BC18	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-
A2BC19	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A2BC21	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
A3BC1	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
A3BC2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3BC3	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
A3BC4	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
A3BC5	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
A3BC6	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
A3BC7	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
A3BC8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3BC9	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
A3BC10	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+
A3BC11	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
A3BC12	+	+	-	-	-	9	-	+	-	-
A3BC16	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
A3BC19	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
A4BC1	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
A4BC2	+	-	-	+	-	-	-	9	9	-
A4BC3	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Tabla 37. Determinación de presencia o ausencia de enzimas: Santa M^a de Jesús, Chiclana (Cádiz).

CEPAS	CAT	OXI	ONPG	80	ALM	GEL	CAS	NO ₃	NO ₂	IN
A4BC6	+	-	-	+	-	-	-	9	9	-
A4BC7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A4BC8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A4BC9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A4BC10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A4BC11	+	-	-	9	-	-	-	+	+	-
A4BC14	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
A4BC16	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
S1BC1	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-
S1BC2	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-
S1BC4	-	-	-	9	-	-	-	+	+	-
S1BC5	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
S1BC6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1BC7	+	-	-	-	-	-	-	9	9	-
S1BC8	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
S1BC10	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
S1BC11	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
S1BC12	+	-	+	-	-	-	-	9	9	-
S2BC2	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
S2BC5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2BC6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2BC7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2BC8	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-
S2BC9	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
S2BC10	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
S2BC12	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
S2BC13	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
S2BC15	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
S2BC19	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
S2BC20	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
S2BC22	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
S2BC23	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
S2BC27	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-

Tabla 37. Determinación de presencia o ausencia de enzimas: Santa M^a de Jesús, Chiclana (Cádiz).

CEPAS	CAT	OXI	ONPG	80	ALM	GEL	CAS	NO ₃	NO ₂	IN
S2BC28	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
S3BC2	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
S3BC3	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
S3BC4	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-
S3BC5	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
S3BC6	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
S3BC7	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
S3BC8	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
S3BC9	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-
S3BC10	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
S3BC11	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
S3BC18	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
S4BC1	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
S4BC2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S4BC3	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-
S4BC6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S4BC8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S4BC9	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
S4BC12	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Producción de ácidos a partir de diferentes sustratos

Los resultados de producción de ácidos, por los microorganismos problema, a partir de diferentes sustratos, se muestran en la tabla 38, 39 y 40 y se leen de acuerdo a la siguiente clave: glucosa (G), lactosa (L), xilosa (X), fructosa (F), galactosa (GA), maltosa (ML), arabinosa (AR), celobiosa (C), almidón (AL), manosa (MN), sorbitol (S), rafinosa (RF), ramnosa (RM), manitol (MT) y glicerol (GL).

Tabla 38. Producción de ácidos a partir de diferentes sustratos: Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	G	L	X	F	GA	ML	AR	C	AL	MN	S	RF	RM	MT	GL
A1FP1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 38. Producción de ácidos a partir de diferentes sustratos: Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	G	L	X	F	GA	ML	AR	C	AL	MN	S	RF	RM	MT	GL
A1FP2	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A1FP3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1FP4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1FP5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1FP6	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1FP7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1FP8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A1FP11	-	+	+	9	-	-	-	+	9	+	+	-	-	-	-
A1FP12	-	+	9	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	9	-
A1FP14	-	-	+	-	+	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-
A1FP15	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
A1FP16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1FP17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1FP18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1FP19	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1FP20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1FP22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
A2FP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2FP2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2FP3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2FP4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2FP5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2FP6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2FP7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2FP10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2FP11	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A2FP15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2FP16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2FP17	+	-	+	+	9	9	+	9	+	+	+	+	-	+	+
A2FP19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2FP20	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
A2FP21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2FP22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 38. Producción de ácidos a partir de diferentes sustratos: Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	G	L	X	F	GA	ML	AR	C	AL	MN	S	RF	RM	MT	GL
A2FP21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2FP23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2FP24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3FP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3FP2	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
A3FP3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
A3FP4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3FP5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3FP6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3FP10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3FP13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3FP16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3FP17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
A3FP18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
A3FP19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
A3FP20	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
A3FP21	+	-	+	-	+	-	9	-	-	-	-	-	-	-	+
A3FP22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
S1FP2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
S1FP3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
S1FP4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
S1FP5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
S1FP6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1FP7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
S1FP8	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
S1FP9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
S1FP10	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1FP11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1FP13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1FP17	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-	-	-	+
S2FP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2FP2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
S2FP3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Tabla 38. Producción de ácidos a partir de diferentes sustratos: Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	G	L	X	F	GA	ML	AR	C	AL	MN	S	RF	RM	MT	GL
S2FP4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2FP5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2FP6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2FP7	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2FP8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2FP9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2FP10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2FP12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2FP13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2FP14	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2FP15	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S2FP16	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S2FP20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
S2FP21	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2FP22	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
S2FP23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2FP24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2FP25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2FP27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 39. Producción de ácidos a partir de diferentes sustratos: La Malahá (Granada).

CEPAS	G	L	X	F	GA	ML	AR	C	AL	MN	S	RF	RM	MT	GL
A1LM2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1LM4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1LM8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1LM9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1LM10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1LM11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1LM12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1LM14	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
A1LM15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1LM21	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 39. Producción de ácidos a partir de diferentes sustratos: La Malahá (Granada).

CEPAS	G	L	X	F	GA	ML	AR	C	AL	MN	S	RF	RM	MT	GL
A1LM22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1LM23	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
A1LM24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1LM25	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A1LM26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
A1LM28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1LM30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2LM1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2LM2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2LM3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2LM4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2LM5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
A2LM6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
A2LM9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2LM10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2LM12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2LM16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2LM19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2LM23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1LM2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1LM3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1LM4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1LM5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
S1LM6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1LM8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
S1LM11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1LM12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1LM13	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S1LM14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1LM15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
S1LM16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1LM17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1LM18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1LM19	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-

Tabla 39. Producción de ácidos a partir de diferentes sustratos: La Malahá (Granada).

CEPAS	G	L	X	F	GA	ML	AR	C	AL	MN	S	RF	RM	MT	GL
S1LM20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
S1LM21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1LM22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1LM30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1LM32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2LM1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2LM2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2LM3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2LM5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2LM6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2LM7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2LM8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2LM9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
S2LM12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2LM15	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2LM18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2LM21	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
S3LM2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3LM5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3LM6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3LM7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3LM8	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
S3LM10	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3LM12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3LM13	+	+	+	+	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
S3LM15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 40. Producción de ácidos a partir de diferentes sustratos: Santa M^a de Jesús, Chiclana (Cádiz).

CEPAS	G	L	X	F	GA	ML	AR	C	AL	MN	S	RF	RM	MT	GL
A1BC2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
A1BC3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1BC4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 40. Producción de ácidos a partir de diferentes sustratos: Santa M^a de Jesús, Chiclana (Cádiz).

CEPAS	G	L	X	F	GA	ML	AR	C	AL	MN	S	RF	RM	MT	GL
A1BC5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1BC6	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
A1BC8	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
A1BC11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1BC16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2BC1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2BC2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2BC3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2BC4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
A2BC5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2BC6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
A2BC7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2BC8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2BC9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2BC10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2BC11	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
A2BC15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2BC17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2BC18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2BC19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2BC21	9	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
A3BC1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
A3BC2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3BC3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3BC4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3BC5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3BC6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3BC7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3BC8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
A3BC10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3BC11	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
A3BC12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3BC16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 40. Producción de ácidos a partir de diferentes sustratos: Santa M^a de Jesús, Chiclana (Cádiz).

CEPAS	G	L	X	F	GA	ML	AR	C	AL	MN	S	RF	RM	MT	GL
A3BC19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A4BC1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
A4BC2	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A4BC3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A4BC6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A4BC7	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
A4BC8	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A4BC9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A4BC10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A4BC11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A4BC14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A4BC16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1BC1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1BC2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1BC4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1BC5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1BC6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1BC7	+	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-	+	-	-	-
S1BC8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1BC10	+	9	+	+	+	9	9	+	+	-	-	-	+	+	-
S1BC11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
S1BC12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2BC2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
S2BC5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
S2BC6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2BC7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2BC8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2BC9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2BC10	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S2BC12	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S2BC13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2BC15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2BC19	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 40. Producción de ácidos a partir de diferentes sustratos: Santa M^a de Jesús, Chiclana (Cádiz).

CEPAS	G	L	X	F	GA	ML	AR	C	AL	MN	S	RF	RM	MT	GL
S2BC20	-	-	+	+	-	-	-	-	9	-	-	-	-	-	-
S2BC22	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2BC23	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2BC27	9	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-
S2BC28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3BC2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3BC3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3BC4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3BC5	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
S3BC6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3BC7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3BC8	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
S3BC9	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
S3BC10	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3BC11	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
S3BC18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S4BC1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S4BC2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S4BC3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S4BC6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
S4BC8	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
S4BC9	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
S4BC12	-	-	-	-	-	+	9	-	-	-	-	-	-	-	-

Es reseñable, la presencia de determinadas cepas las cuales son capaces de producir ácidos a partir de 4 ó más sustratos diferentes, ya que marcan un perfil que difiere del conjunto general. Dentro de este grupo de microorganismos capaces de acidificar el medio en el que crecen por el uso de los sustratos testados en el presente trabajo, señalamos en Fuente de piedra a: A1FP11, A1FP12, A2FP17, A3FP20 y A3FP21; en La Malahá a: A1LM14, A1LM23, S1LM19, S2LM21 y S3LM13; y en Bahía de Cádiz a: A1BC8, A2BC11, A2BC21, A3BC11, A4BC7, A4BC8, S1BC10,

S2BC12 y S3BC8. Este conjunto de cepas poseen unas características que les hacen destacables ante la posterior selección de microorganismos para el análisis molecular.

2.1.4. Susceptibilidad a antibióticos

Los resultados de susceptibilidad a los antibióticos probados se presentan en las tablas 41, 42 y 43. Cada antibiótico se denominó con las clave que a continuación se especifica: ampicilina 10 µg (**AMP**); bacitracina 10 U (**BAC**); cloranfenicol 30 µg (**CLO**); ciprofloxacina 5 µg (**CIP**); eritromina 15 µg (**ERI**); neomicina 10 µg (**NEO**); norfloxacina 10 µg (**NOR**); novobiocina 30 µg (**NOV**); penicilina 10 U (**PEN**) y rifampicina 30 µg (**RIF**). Donde la clave para la lectura de las siguientes tablas sera resistente (R), susceptible (S) e intermedio (I). Para cada antibiótico existe una extensión de diámetro en el halo de inhibición disitnto los cuales se describen en Materiales y Métodos.

Tabla 41. Susceptibilidad a Antibióticos. Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	AMP	BAC	CLO	CIP	ERI	NEO	NOR	NOV	PEN	RIF
A1FP1	R	S	R	R	R	R	R	I	R	R
A1FP2	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A1FP3	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A1FP4	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A1FP5	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A1FP6	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
A1FP7	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
A1FP8	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A1FP11	S	S	S	R	S	R	R	S	R	I
A1FP12	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S
A1FP14	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
A1FP15	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A1FP16	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R

Tabla 41. Susceptibilidad a Antibióticos. Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	AMP	BAC	CLO	CIP	ERI	NEO	NOR	NOV	PEN	RIF
A1FP17	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A1FP18	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A1FP19	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A1FP20	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
A1FP22	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
A2FP1	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A2FP2	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A2FP3	R	S	I	R	R	R	R	S	R	S
A2FP4	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
A2FP5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A2FP6	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A2FP7	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
A2FP10	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A2FP11	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
A2FP15	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S
A2FP16	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A2FP17	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S
A2FP19	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A2FP20	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A2FP21	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A2FP22	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A2FP2122T	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
A2FP23	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
A2FP24	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
A3FP1	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A3FP2	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A3FP3	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I
A3FP5	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A3FP6	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
A3FP10	R	S	R	R	R	R	R	S	R	I
A3FP13	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A3FP16	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A3FP17	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A3FP18	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R

Tabla 41. Susceptibilidad a Antibióticos. Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	AMP	BAC	CLO	CIP	ERI	NEO	NOR	NOV	PEN	RIF
A3FP19	R	S	R	R	R	R	R	S	R	I
A3FP20	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A3FP21	R	S	R	R	R	R	R	S	R	-
A3FP22	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
S1FP2	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S1FP3	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S1FP4	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S1FP5	R	S	R	R	R	R	R	S	R	I
S1FP6	R	S	R	R	R	R	R	S	R	I
S1FP7	R	S	R	R	R	R	R	S	R	I
S1FP8	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S1FP9	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
S1FP10	R	S	R	R	R	R	R	R	R	I
S1FP11	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S1FP13	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S1FP17	S	S	S	R	S	R	R	S	I	S
S2FP1	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I
S2FP2	R	S	R	R	R	R	R	S	R	I
S2FP3	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S
S2FP4	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
S2FP5	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S2FP6	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S2FP7	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S2FP8	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
S2FP9	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S
S2FP10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S2FP12	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S
S2FP13	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
S2FP14	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S2FP15	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S2FP16	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S2FP20	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S2FP21	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
S2FP22	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R

Tabla 41. Susceptibilidad a Antibióticos. Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	AMP	BAC	CLO	CIP	ERI	NEO	NOR	NOV	PEN	RIF
S2FP23	R	S	R	R	R	R	R	S	R	I
S2FP24	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
S2FP25	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
S2FP27	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R

Tabla 42. Susceptibilidad a Antibióticos. La Malahá (Granada).

CEPAS	AMP	BAC	CLO	CIP	ERI	NEO	NOR	NOV	PEN	RIF
A1LM2	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A1LM4	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S
A1LM8	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A1LM9	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A1LM10	R	R	S	R	R	R	R	R	R	I
A1LM11	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I
A1LM12	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A1LM14	S	S	S	R	S	R	R	I	I	R
A1LM15	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
A1LM21	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A1LM22	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
A1LM23	S	S	S	R	S	R	R	I	S	S
A1LM24	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A1LM25	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S
A1LM26	S	R	R	R	R	R	R	I	R	S
A1LM28	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A1LM30	I	R	R	R	S	R	R	R	R	R
A2LM1	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
A2LM2	S	R	S	R	R	R	R	R	R	I
A2LM3	S	R	S	R	R	R	R	I	I	I
A2LM4	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A2LM5	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A2LM6	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A2LM9	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R

Tabla 42. Susceptibilidad a Antibióticos. La Malahá (Granada).

CEPAS	AMP	BAC	CLO	CIP	ERI	NEO	NOR	NOV	PEN	RIF
A2LM10	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A2LM12	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A2LM16	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A2LM19	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
A2LM23	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S1LM2	R	R	S	R	R	R	R	R	R	I
S1LM3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S1LM4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S1LM5	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S
S1LM6	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S1LM8	S	S	S	R	S	R	R	S	S	I
S1LM11	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S
S1LM12	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
S1LM13	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
S1LM14	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
S1LM15	S	S	R	R	R	R	R	S	S	I
S1LM16	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
S1LM17	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I
S1LM18	S	R	S	R	S	R	R	S	I	R
S1LM19	S	S	R	R	R	R	R	I	R	R
S1LM20	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S1LM21	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S1LM22	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S1LM30	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R
S1LM32	S	R	R	R	S	R	R	R	R	S
S2LM1	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S2LM2	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S2LM3	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R
S2LM5	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S2LM6	S	R	S	R	S	R	R	R	R	I
S2LM7	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S2LM8	S	R	S	R	R	R	R	R	S	I

Tabla 42. Susceptibilidad a Antibióticos. La Malahá (Granada).

CEPAS	AMP	BAC	CLO	CIP	ERI	NEO	NOR	NOV	PEN	RIF
S2LM9	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R
S2LM12	S	R	R	R	R	R	R	R	S	I
S2LM15	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I
S2LM18	S	R	S	R	S	R	R	R	R	I
S2LM21	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S
S3LM2	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S3LM5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
S3LM6	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S3LM7	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R
S3LM8	I	S	R	R	S	R	R	S	R	S
S3LM10	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S
S3LM12	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
S3LM13	S	S	S	S	S	R	R	I	R	S
S3LM15	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S

Tabla 43. Susceptibilidad a Antibióticos. Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).

CEPAS	AMP	BAC	CLO	CIP	ERI	NEO	NOR	NOV	PEN	RIF
A1BC2	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A1BC3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A1BC4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A1BC5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A1BC8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A1BC11	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
A1BC16	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A2BC1	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A2BC2	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A2BC3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A2BC4	R	S	R	R	R	R	R	S	R	I
A2BC5	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S
A2BC6	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S
A2BC7	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A2BC8	R	S	R	R	R	S	R	S	R	I

Tabla 43. Susceptibilidad a Antibióticos. Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).

CEPAS	AMP	BAC	CLO	CIP	ERI	NEO	NOR	NOV	PEN	RIF
A2BC9	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A2BC10	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A2BC11	S	S	S	R	S	R	R	R	S	9
A2BC15	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
A2BC17	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
A2BC18	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A2BC19	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A2BC21	S	S	S	R	I	S	R	R	S	S
A3BC1	S	S	S	R	S	R	R	S	I	R
A3BC2	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
A3BC3	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I
A3BC4	S	R	R	R	R	R	R	R	S	I
A3BC5	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A3BC6	S	R	S	R	I	R	R	R	R	I
A3BC7	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R
A3BC8	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A3BC10	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
A3BC11	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A3BC12	S	R	S	R	R	R	R	I	R	R
A3BC16	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
A3BC19	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S
A4BC1	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A4BC2	R	R	R	R	R	9	R	R	R	R
A4BC3	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A4BC6	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S
A4BC7	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A4BC8	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
A4BC9	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
A4BC10	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
A4BC11	S	S	S	S	S	R	R	S	S	9
A4BC14	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
A4BC16	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S
S1BC1	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R

Tabla 43. Susceptibilidad a Antibióticos. Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).

CEPAS	AMP	BAC	CLO	CIP	ERI	NEO	NOR	NOV	PEN	RIF
S1BC2	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S1BC6	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S1BC8	S	R	S	S	S	R	R	S	R	S
S1BC10	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
S1BC11	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S
S2BC2	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S2BC5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S2BC6	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S2BC7	R	S	R	R	R	9	R	S	R	I
S2BC8	S	S	S	R	R	R	R	R	I	S
S2BC9	S	S	R	S	S	R	R	R	S	S
S2BC10	R	S	R	R	R	R	R	S	R	I
S2BC12	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S
S2BC13	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S2BC15	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S2BC19	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S
S2BC20	S	S	S	R	S	R	R	I	R	S
S2BC22	S	S	S	R	S	R	R	S	R	S
S2BC23	R	S	R	R	R	R	R	S	R	I
S2BC27	S	R	S	S	R	R	R	S	S	S
S2BC28	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S
S3BC2	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S3BC3	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
S3BC4	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
S3BC5	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
S3BC6	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S3BC7	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S3BC8	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S3BC9	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
S3BC10	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
S3BC11	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
S3BC18	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
S4BC1	R	S	R	R	R	R	R	S	R	I

Tabla 43. Susceptibilidad a Antibióticos. Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).

CEPAS	AMP	BAC	CLO	CIP	ERI	NEO	NOR	NOV	PEN	RIF
S4BC2	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S4BC3	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
S4BC6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S4BC8	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
S4BC9	S	S	R	R	R	R	R	I	R	S
S4BC12	R	S	R	R	R	R	R	S	R	I

2.1.5. Pruebas nutricionales

Utilización de carbohidratos, alcoholes y ácidos como única fuente de carbono y energía

Los resultados de la capacidad de los microorganismos aislados, para crecer teniendo como única fuente de carbono a un carbohidrato: glucosa (**G**), lactosa (**L**), D+ xilosa (**X**), D+ galactosa (**GA**), maltosa (**M**) y L- arabinosa (**AR**); a un azúcar alcohólico: sorbitol (**SO**), glicerol (**GLY**) y D+ manitol (**MN**); y a un ácido orgánico: succinato (**SU**), malato (**MT**), Citrato (**C**) y piruvato (**P**); se muestran en las tablas 44, 45 Y 46.

Tabla 44. Utilización de diversos sustratos como fuente única de Carbono y energía. Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	G	L	X	GA	MT	AR	SO	GLY	MN	SU	MT	C	P
A1FP1	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
A1FP2	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
A1FP3	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
A1FP4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
A1FP5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
A1FP6	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
A1FP7	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
A1FP8	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
A1FP11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	9	+

Tabla 44. Utilización de diversos sustratos como fuente única de Carbono y energía. Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	G	L	X	GA	MT	AR	SO	GLY	MN	SU	MT	C	P
A1FP12	-	+	+	+	+	-	+	9	+	+	-	9	9
A1FP14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1FP15	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
A1FP16	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
A1FP17	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
A1FP18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1FP19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1FP20	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
A1FP22	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
A2FP1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
A2FP2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A2FP3	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A2FP4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2FP5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2FP6	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
A2FP7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2FP10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
A2FP11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2FP15	+	+	+	+	+	+	+	+	9	9	-	+	-
A2FP16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
A2FP17	+	-	-	9	-	-	-	-	-	-	-	9	-
A2FP19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2FP20	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
A2FP21	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
A2FP22	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
A2FP2122T	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
A2FP23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
A2FP24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3FP1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	+	+
A3FP2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
A3FP3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3FP5	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
A3FP6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 44. Utilización de diversos sustratos como fuente única de Carbono y energía. Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	G	L	X	GA	MT	AR	SO	GLY	MN	SU	MT	C	P
A3FP10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3FP13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	+	+
A3FP16	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
A3FP17	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
A3FP18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
A3FP19	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3FP20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
A3FP21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
A3FP22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1FP2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
S1FP3	9	-	-	+	+	9	9	9	+	9	-	+	+
S1FP4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S1FP5	+	9	-	-	9	+	+	+	+	-	-	+	+
S1FP6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
S1FP7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1FP8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
S1FP9	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
S1FP10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
S1FP11	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
S1FP13	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
S1FP17	+	+	+	9	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S2FP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
S2FP2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
S2FP3	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
S2FP4	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
S2FP5	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
S2FP6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2FP7	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
S2FP8	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
S2FP9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
S2FP10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
S2FP12	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
S2FP13	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+

Tabla 44. Utilización de diversos sustratos como fuente única de Carbono y energía. Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	G	L	X	GA	MT	AR	SO	GLY	MN	SU	MT	C	P
S2FP14	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
S2FP15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
S2FP16	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
S2FP20	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
S2FP21	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	9	-
S2FP22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2FP23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2FP24	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
S2FP25	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
S2FP27	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+

Tabla 45. Utilización de diversos sustratos como fuente única de Carbono y energía. La Malahá (Granada).

CEPAS	G	L	X	GA	MT	AR	SO	GLY	MN	SU	MT	C	P
A1LM2	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
A1LM4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1LM8	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
A1LM9	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
A1LM10	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
A1LM11	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
A1LM12	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
A1LM14	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
A1LM15	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+
A1LM21	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
A1LM22	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+
A1LM23	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
A1LM24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	+	+
A1LM25	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1LM26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1LM28	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
A1LM30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
A2LM1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
A2LM2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Tabla 45. Utilización de diversos sustratos como fuente única de Carbono y energía. La Malahá (Granada).

CEPAS	G	L	X	GA	MT	AR	SO	GLY	MN	SU	MT	C	P
A2LM3	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
A2LM4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
A2LM5	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
A2LM6	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
A2LM9	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+
A2LM10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	+	+
A2LM12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
A2LM16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
A2LM19	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
A2LM23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	+	+
S1LM2	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
S1LM3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
S1LM4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S1LM5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S1LM6	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
S1LM8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1LM11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
S1LM12	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
S1LM13	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
S1LM14	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
S1LM15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	9	+
S1LM16	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+
S1LM17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1LM18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S1LM19	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
S1LM20	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
S1LM21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S1LM22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S1LM30	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
S1LM32	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S2LM1	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
S2LM2	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S2LM3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+

Tabla 45. Utilización de diversos sustratos como fuente única de Carbono y energía. La Malahá (Granada).

CEPAS	G	L	X	GA	MT	AR	SO	GLY	MN	SU	MT	C	P
S2LM5	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
S2LM6	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
S2LM7	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
S2LM8	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
S2LM9	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
S2LM12	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
S2LM15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
S2LM18	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+
S2LM21	+	+	9	+	9	+	+	+	9	+	9	+	+
S3LM2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
S3LM5	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
S3LM6	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
S3LM7	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+
S3LM8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3LM10	+	+	+	+	+	-	+	9	+	+	+	+	-
S3LM12	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+
S3LM13	9	+	+	+	9	+	-	+	+	+	-	-	+
S3LM15	+	-	+	+	+	9	+	9	-	+	-	+	-

Tabla 46. Utilización de diversos sustratos como fuente única de Carbono y energía. Santa Mª de Jesús (Chiclana, Cádiz).

CEPAS	G	L	X	GA	MT	AR	SO	GLY	MN	SU	MT	C	P
A1BC2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
A1BC3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A1BC4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A1BC5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A1BC8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A1BC11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	+	+
A1BC16	+	+	+	+	+	+	+	9	+	+	9	+	+
A2BC1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A2BC2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A2BC3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A2BC4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	9	+	+

Tabla 46. Utilización de diversos sustratos como fuente única de Carbono y energía. Santa Mª de Jesús (Chiclana, Cádiz).

CEPAS	G	L	X	GA	MT	AR	SO	GLY	MN	SU	MT	C	P
A2BC5	-	-	-	+	-	+	9	-	9	-	-	-	-
A2BC6	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
A2BC7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
A2BC8	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
A2BC9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
A2BC10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A2BC11	+	-	9	9	+	+	9	+	+	9	+	+	+
A2BC15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2BC17	+	+	+	+	9	+	-	-	9	+	-	-	+
A2BC18	+	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A2BC19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	+	+
A2BC21	+	+	9	+	9	9	-	+	+	+	-	+	9
A3BC1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A3BC2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A3BC3	+	+	+	+	+	9	+	-	+	+	+	+	+
A3BC4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
A3BC5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	+	9	+
A3BC6	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
A3BC7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
A3BC8	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
A3BC10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A3BC11	+	+	+	+	+	9	-	+	-	-	-	+	+
A3BC12	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
A3BC16	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+
A3BC19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
A4BC1	+	+	+	+	+	-	9	+	+	+	-	9	9
A4BC2	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
A4BC3	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
A4BC6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A4BC7	+	-	-	-	-	-	+	+	9	+	-	-	-
A4BC8	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	9
A4BC9	-	-	-	9	-	-	+	-	-	-	-	+	-
A4BC10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 46. Utilización de diversos sustratos como fuente única de Carbono y energía. Santa Mª de Jesús (Chiclana, Cádiz).

CEPAS	G	L	X	GA	MT	AR	SO	GLY	MN	SU	MT	C	P
A4BC11	9	-	9	-	9	9	-	-	-	9	-	+	+
A4BC14	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
A4BC16	9	9	9	+	+	+	+	-	9	9	-	+	+
S1BC1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	+	+
S1BC2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
S1BC4	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-	-
S1BC5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
S1BC6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	+	+
S1BC8	9	9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S1BC10	9	9	9	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
S1BC11	+	+	+	-	9	9	+	+	+	+	+	-	-
S1BC12	+	-	-	+	9	+	-	+	-	-	-	-	+
S2BC2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S2BC5	+	-	-	-	+	-	9	+	+	-	-	9	-
S2BC6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S2BC7	+	+	+	9	9	+	+	9	9	+	-	+	+
S2BC8	+	+	9	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
S2BC9	9	+	+	-	+	-	-	+	-	9	-	+	+
S2BC10	9	-	-	+	-	-	-	-	-	9	-	-	9
S2BC12	-	-	-	-	9	-	-	+	-	-	-	-	-
S2BC13	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
S2BC15	+	+	9	+	+	+	+	+	+	+	9	+	+
S2BC19	-	9	-	9	-	-	-	9	9	+	9	-	-
S2BC20	9	+	9	-	+	9	-	-	-	-	9	9	9
S2BC22	-	9	+	-	9	-	-	+	-	9	+	9	+
S2BC23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S2BC27	+	+	+	9	9	+	+	+	+	+	-	+	9
S2BC28	+	+	-	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-
S3BC2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
S3BC3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S3BC4	+	+	+	+	+	+	+	+	9	+	+	+	+
S3BC5	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	9	+
S3BC6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 46. Utilización de diversos sustratos como fuente única de Carbono y energía. Santa Mª de Jesús (Chiclana, Cádiz).

CEPAS	G	L	X	GA	MT	AR	SO	GLY	MN	SU	MT	C	P
S3BC7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S3BC8	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
S3BC9	9	+	+	+	+	+	+	+	9	+	+	+	+
S3BC10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S3BC11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
S3BC18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S4BC1	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
S4BC2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	+	+
S4BC3	-	-	9	9	-	9	-	-	-	-	9	-	+
S4BC5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
S4BC6	-	-	9	+	+	9	-	-	9	-	-	-	9
S4BC8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S4BC9	-	+	+	+	+	-	+	+	-	9	-	9	-
S4BC12	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Utilización de aminoácidos como única fuente de carbono, nitrógeno y energía

Los resultados de esta prueba nutricional, en la que se determina la capacidad del microorganismo problema tiene la capacidad de utilizar como única fuente de carbono y energía a un aminoácido, donde las claves de las tablas 47, 48 Y 49 corresponden: L alanina (AL), L aspartato (AS), Lisina (L) y Glicina (GL).

Tabla 47. Utilización de aminoácidos como fuente única de Carbono y energía. Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	AL	AS	L	GL	CEPAS	AL	AS	L	GL
A1FP1	-	-	-	-	A3FP13	-	+	-	-
A1FP2	-	-	-	-	A3FP16	-	-	-	-
A1FP3	-	-	-	-	A3FP17	-	-	-	9
A1FP4	-	-	-	-	A3FP18	-	-	-	-
A1FP5	-	-	-	-	A3FP19	-	-	-	-

Tabla 47. Utilización de aminoácidos como fuente única de Carbono y energía. Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	AL	AS	L	GL	CEPAS	AL	AS	L	GL
A1FP6	-	-	-	-	A3FP20	-	-	-	-
A1FP7	-	-	-	-	A3FP21	-	-	-	-
A1FP8	-	-	-	-	A3FP22	-	-	-	-
A1FP11	-	+	-	-	S1FP2	-	-	-	-
A1FP12	-	+	-	-	S1FP3	-	-	-	-
A1FP14	-	-	-	-	S1FP4	-	-	-	-
A1FP15	-	-	-	-	S1FP5	-	-	-	-
A1FP16	-	-	-	-	S1FP6	-	-	-	-
A1FP17	-	-	-	-	S1FP7	-	-	-	-
A1FP18	-	-	-	-	S1FP8	-	-	-	-
A1FP19	-	9	-	-	S1FP9	-	-	-	-
A1FP20	-	-	-	-	S1FP10	-	-	-	-
A1FP22	-	-	-	-	S1FP11	-	-	-	-
A2FP1	-	-	-	-	S1FP13	-	-	-	-
A2FP2	-	-	-	-	S1FP17	-	-	-	-
A2FP3	-	-	-	-	S2FP1	-	-	-	-
A2FP4	-	-	-	-	S2FP2	-	-	-	+
A2FP5	-	-	-	-	S2FP3	-	-	-	-
A2FP6	-	-	-	+	S2FP4	-	-	-	-
A2FP7	-	-	-	-	S2FP5	-	-	-	-
A2FP10	-	-	-	-	S2FP6	-	-	-	-
A2FP11	-	-	-	-	S2FP7	-	-	-	-
A2FP15	-	+	-	-	S2FP8	-	-	-	-
A2FP16	-	+	-	-	S2FP9	-	-	-	-
A2FP17	9	9	-	-	S2FP10	-	-	-	-
A2FP19	-	-	-	-	S2FP12	-	-	-	-
A2FP20	-	-	-	-	S2FP13	-	-	-	-
A2FP21	-	-	-	-	S2FP14	-	-	-	-
A2FP22	-	-	-	-	S2FP15	-	-	-	-
A2FP2122T	-	-	-	-	S2FP16	-	-	-	+
A2FP23	-	-	-	-	S2FP20	-	-	-	+
A2FP24	-	-	+	-	S2FP21	-	-	-	-
A3FP1	-	-	-	-	S2FP22	-	-	-	-
A3FP2	-	-	-	-	S2FP23	-	-	-	-
A3FP3	-	-	-	-	S2FP24	-	-	-	-
A3FP5	-	-	-	+	S2FP25	-	-	-	-
A3FP6	-	-	+	-	S2FP27	-	-	-	+
A3FP10	-	-	-	-					

Tabla 48. Utilización de aminoácidos como fuente única de Carbono y energía. La Malahá (Granada).

CEPAS	AL	AS	L	GL	CEPAS	AL	AS	L	GL
A1LM2	-	-	-	-	S1LM11	-	-	-	-
A1LM4	-	-	-	-	S1LM12	-	-	-	-
A1LM8	-	-	-	-	S1LM13	-	-	-	-
A1LM9	-	-	-	-	S1LM14	-	-	-	-
A1LM10	-	-	-	-	S1LM15	-	-	-	-
A1LM11	-	-	-	-	S1LM16	-	-	-	-
A1LM12	-	-	-	-	S1LM17	-	-	-	-
A1LM14	-	-	-	-	S1LM18	-	-	-	9
A1LM15	-	-	-	-	S1LM19	-	-	-	-
A1LM21	-	-	-	-	S1LM20	-	+	-	-
A1LM22	-	-	-	-	S1LM21	-	-	+	+
A1LM23	-	-	-	-	S1LM22	-	+	-	-
A1LM24	-	-	-	-	S1LM30	-	-	-	-
A1LM25	-	-	-	-	S1LM32	-	-	-	-
A1LM26	-	-	-	-	S2LM1	-	-	-	-
A1LM28	-	-	-	-	S2LM2	-	-	-	+
A1LM30	-	+	-	-	S2LM3	-	-	-	-
A2LM1	-	-	-	-	S2LM5	-	-	-	-
A2LM2	-	-	-	-	S2LM6	-	-	-	-
A2LM3	-	-	-	-	S2LM7	-	-	-	-
A2LM4	-	-	-	-	S2LM8	-	-	-	-
A2LM5	-	-	-	-	S2LM9	-	-	-	-
A2LM6	-	+	-	-	S2LM12	-	-	-	-
A2LM9	-	-	-	-	S2LM15	-	-	-	+
A2LM10	-	9	-	-	S2LM18	-	-	-	-
A2LM12	+	+	+	+	S2LM21	9	+	+	+
A2LM16	-	+	-	-	S3LM2	-	-	-	-
A2LM19	-	-	-	-	S3LM5	-	-	-	-
A2LM23	+	+	9	+	S3LM6	-	-	-	-
S1LM2	-	-	-	-	S3LM7	-	-	-	-
S1LM3	+	-	+	-	S3LM8	-	-	-	-
S1LM4	+	+	+	-	S3LM10	-	-	-	-
S1LM5	-	-	-	-	S3LM12	-	-	-	-
S1LM6	-	-	-	-	S3LM13	+	-	-	-
S1LM8	-	-	-	-	S3LM15	-	-	-	-

Tabla 49. Utilización de aminoácidos como fuente única de Carbono y energía. Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).

CEPAS	AL	AS	L	GL	CEPAS	AL	AS	L	GL
A1BC2	-	-	-	-	A4BC16	-	9	-	-
A1BC3	+	+	+	+	S1BC1	-	-	-	-
A1BC4	+	+	+	+	S1BC2	-	-	-	-
A1BC5	+	+	+	+	S1BC4	-	-	-	-
A1BC8	+	+	+	+	S1BC5	-	-	-	-
A1BC11	+	+	+	-	S1BC6	-	-	-	-
A1BC16	+	+	+	+	S1BC8	-	+	-	-
A2BC1	-	-	-	-	S1BC10	-	-	-	-
A2BC2	+	+	-	+	S1BC11	-	-	-	-
A2BC3	+	+	+	+	S1BC12	-	-	-	-
A2BC4	-	-	-	-	S2BC2	-	-	-	-
A2BC5	-	-	-	-	S2BC5	-	-	-	-
A2BC6	-	-	-	-	S2BC6	-	-	-	-
A2BC7	+	+	+	-	S2BC7	-	-	-	-
A2BC8	+	+	+	-	S2BC8	-	-	-	-
A2BC9	-	-	-	-	S2BC9	-	-	-	-
A2BC10	-	-	-	-	S2BC10	-	-	-	-
A2BC11	+	+	+	+	S2BC12	-	-	9	9
A2BC15	-	9	-	-	S2BC13	-	-	-	-
A2BC17	+	+	-	-	S2BC15	-	-	-	-
A2BC18	+	+	+	+	S2BC19	-	-	-	-
A2BC19	+	+	+	+	S2BC20	-	-	-	-
A2BC21	-	-	-	-	S2BC22	-	-	-	-
A3BC1	-	-	-	-	S2BC23	-	-	-	-
A3BC2	-	-	-	-	S2BC27	-	+	-	-
A3BC3	-	-	-	-	S2BC28	-	-	-	-
A3BC4	-	-	-	-	S3BC2	-	-	-	-
A3BC5	-	-	-	-	S3BC3	-	-	-	-
A3BC6	-	-	-	-	S3BC4	-	-	-	-
A3BC7	-	-	-	-	S3BC5	-	-	-	-
A3BC8	-	-	-	-	S3BC6	-	-	-	+
A3BC10	-	-	-	-	S3BC7	+	+	-	-
A3BC11	-	-	-	-	S3BC8	-	-	-	-
A3BC12	-	-	-	-	S3BC9	-	-	-	-
A3BC16	-	-	-	-	S3BC10	-	-	-	-
A3BC19	-	+	-	-	S3BC11	-	-	-	-
A4BC1	-	-	-	-	S3BC18	9	9	-	-
A4BC2	9	9	9	9	S4BC1	-	-	-	-
A4BC3	-	-	-	-	S4BC2	-	-	-	-
A4BC6	-	-	-	-	S4BC3	-	-	-	-
A4BC7	-	-	-	-	S4BC5	-	-	-	-

Tabla 49. Utilización de aminoácidos como fuente única de Carbono y energía. Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).

CEPAS	AL	AS	L	GL	CEPAS	AL	AS	L	GL
A4BC8	-	-	-	-	S4BC6	-	-	-	-
A4BC9	-	-	-	-	S4BC8	-	-	-	-
A4BC10	-	-	-	-	S4BC9	+	+	-	-
A4BC11	-	+	-	-	S4BC12	-	-	-	-
A4BC14	-	-	-	-					

Los microorganismos procedentes de Bahía de Cádiz poseen una mayor capacidad para desarrollar ante la presencia de aminoácidos como fuente única de carbono, nitrógeno y energía. En concreto, aquellos microorganismos procedentes de muestras de agua, y más específicamente de los dos primeros puntos de muestreo de la atalasalina de Santa María de Jesús, manifiestan dicha habilidad.

2.2. TAXONOMÍA NUMÉRICA

La taxonomía numérica, es una técnica clásica cuya finalidad es la clasificación de los organismos basándose en la semejanza del mayor número posible de caracteres, a los que se le atribuye un mismo peso o valor. El resultado es un dendograma producto de la similitud entre los caracteres estudiados. La unidad de medida es el porcentaje de semejanza o desemejanza analizada con un algoritmo que genera matrices, produciendo una agrupación de los microorganismos en función de sus analogías, tras el análisis de los datos. Los resultados se expresan en fenogramas, de los cuales no se puede deducir ningún tipo de relaciones evolutivas ni filogenéticas, las relaciones son de similitud de caracteres.

Estos caracteres son pruebas morfológicas, de cultivo, fisiológicas, bioquímicas, nutricionales y de susceptibilidad ante diferentes antibióticos descritos a continuación. Donde los resultados obtenidos para éste estudio taxonómico, basado en el "Manual de Sistemática de Bergey" (Garrity & Holt, 2001), que está aceptado mundialmente y que se ha compendiado en diferentes publicaciones (Ludwig & Klenk, 2001). A término se procesaran mediante el TAXAN 2.0.

Los datos obtenidos en las distintas pruebas fueron analizados empleando uno de los coeficientes más comunes en taxonomía numérica de bacterias por utilizar las concordancias negativas como es el coeficiente de agrupamiento "Simple Matching" (Sokal & Michener, 1958). Para el análisis de agrupación se utilizó la técnica de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages) (Sneath & Sokal, 1973).

Una vez realizados las pruebas para definir fenotípicamente cada cepa y previamente determinado su dominio filogenético (arquea o bacteria) mediante los resultados de susceptibilidad frente a diferentes tipos y concentraciones de antibióticos, confirmándose mediante la realización de una reacción en cadena de la polimerasa con oligonucleótidos de arqueas o bacterias a partir del DNA de cada

microorganismo. En función de los resultados de la respuesta a la anisomicina, penicilina y bacitracina, y la posterior visualización del producto de PCR en geles de agarosa al 0.8 %, se verificó el dominio al que pertenecía cada colonia estudiada. Tras la criba previa, Fuente de Piedra se redujo a 85 cepas procariotas, La Malahá a 70 y Bahía de Cádiz a 87 (Figura 31); y los resultados obtenidos por la clasificación en bacterias y arqueas de los ambientes, dio una proporción de composición relativa de cada ambiente de 1:4 (Bacteria: Arquea) en Fuente de Piedra, 1:1.35 en La Malahá y 1:2.5 en Bahía de Cádiz. Estas proporciones pueden ser debidas a los parámetros de salinidad y pH. Ya que en líneas generales los ambientes con altos valores de salinidad suelen componer su microbiota mayoritariamente por arqueas y los valores de pH básico refuerzan la presencia de bacterias (Pérez-Davó, et al., 2014, In review).

Una vez determinado el dominio al que pertenecían, se procesaron los datos de arqueas y bacterias de forma independiente por medio del programa informático TAXAN 2.0. Este programa generó la matriz de semejanza. Aplicando un 70 % de semejanza a las 68 arqueas procedentes de Fuente de Piedra generaron un dendograma con 6 fenones (Figura 32); y a las 17 bacterias con un 70 % de semejanza, se obtuvieron 2 fenones (Figura 33). Las 40 arqueas aisladas de La Malahá, se le aplicó un 74 % de semejanza creando 5 fenones (Figura 35), y a las 30 bacterias con un 73 % de semejanza generó 5 fenones (Figura 36). Y tanto a las 62 arqueas como a las 25 bacterias de Bahía de Cádiz se les aplicó un 73 % de semejanza, lo cual generó 7 fenones en el grupo de arqueas (Figura 38) y 5 fenones en las bacterias (Figura 39). En la descripción de los fenones de cada dendograma que se desarrollan en los siguientes párrafos, siempre se va a referir a características que cumplen la mayoría de las cepas que constituyen el fenón, no teniendo por que ser una característica fenotípica general del fenón analizado.

En la figura 32, se muestra el dendograma de arqueas procedentes de **Fuente de Piedra**, el cual está compuesto por 6 fenones donde cada uno de ellos abarca un total de 22 cepas el A, 19 cepas el B, 10 el C, 4 el D y 3 cepas los fenones E

y F. El estudio detallado de estos fenones y su comparación por taxonomía numérica, donde el porcentaje de semejanza se estableció en un 70 %, esto nos permitió observar que entre los distintos fenones del dendograma de las arqueas de Fuente de Piedra encontrábamos características comunes. Estas cepas son extremófilas, ya que poseen un espectro común que se extiende desde el 2.57 M hasta 5.14 M. No obstante existen cepas dentro de este grupo capaces de crecer a concentraciones más bajas de salinidad al intervalo anterior de 2.57 M a 5.14 M (Eichler, 2001). El pH en el que se desarrollan estas cepas, encuentra unos márgenes más amplios cuando se tratan de arqueas, ya que en su mayoría oscila entre 5.5 y 8.5 de pH. No obstante dentro de la totalidad de las cepas pertenecientes al fenón A, B y C, nos encontramos con algunas capaces de crecer a pH ácidos por debajo de 5 de pH, ácidotolerantes y hasta pH elevados de 10, alcalinotolerantes, en los fenones B y C. Prácticamente todos los microorganismos eran Gram-negativos, catalasa positiva y oxidasa negativa. La prueba de la movilidad no fue tan homogénea y encontramos microorganismos que son negativos para esta prueba. Los fenones A, B, D y F presentan ausencia de hidrolisis al almidón, siendo igualmente negativa para el tween 80 el Fenón B y D. Los fenones D, E y F presentan una crecimiento homogéneo y producción de ácido a partir de la glucosa. Los microorganismos que se agruparon en seis fenones cuyos resultados para las pruebas de la producción de ácido a partir de distintos sustratos fue negativa para fructosa, galactosa, maltosa, almidón, manosa y sorbitol. La resistencia y sensibilidad a los antibióticos es específica no sólo para cada fenón sino para cada microorganismo, en general la resistencia a cloranfenicol, eritromicina y neomicina la presentan todas las arqueas de Fuente de Piedra.

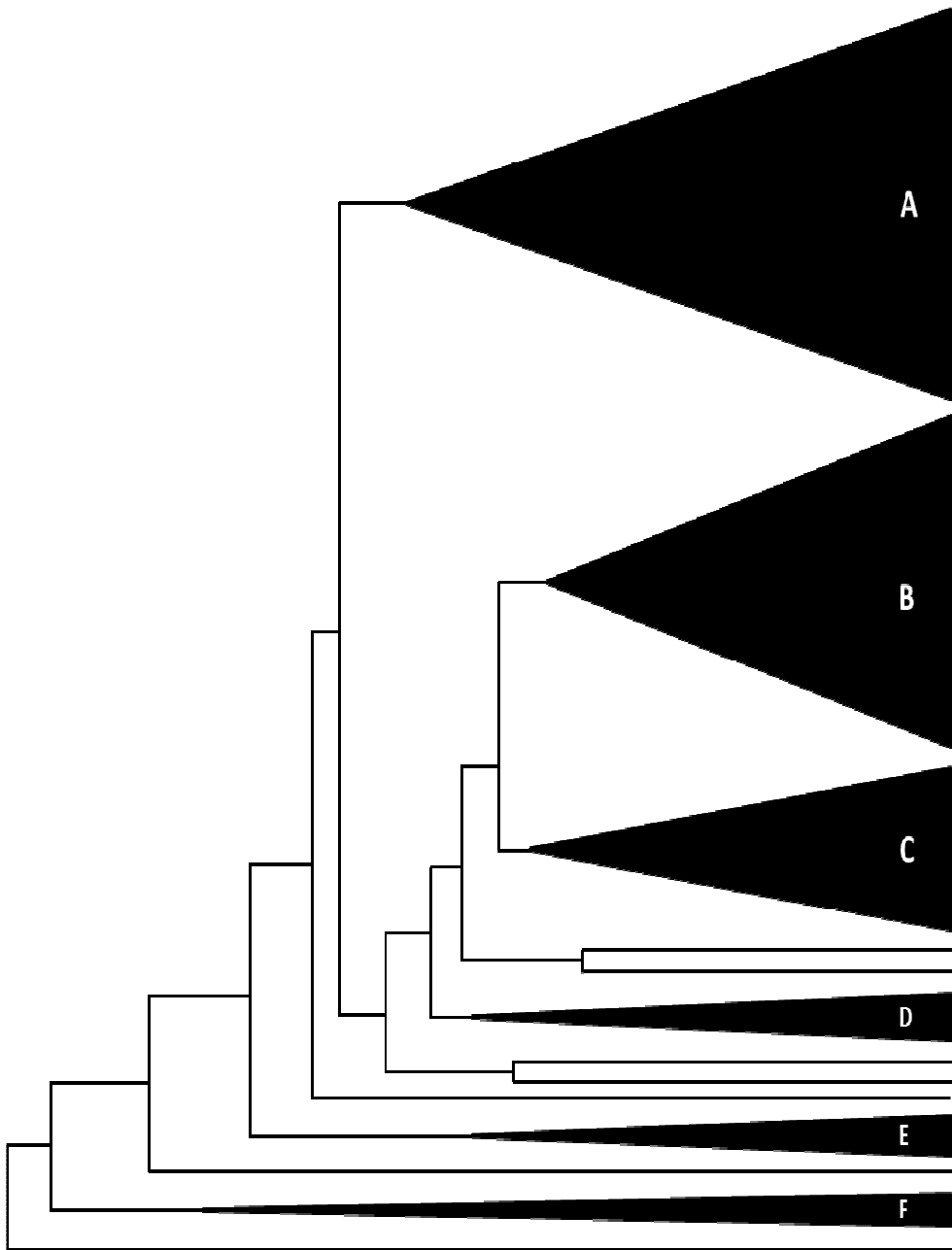


Fig. 32. Dendrograma de arqueas aisladas de la salina de Fuente de Piedra (Málaga).

La agrupación de las cepas de bacterias de Fuente de Piedra ha generado el dendograma de la figura 33, el cual se generó a un 70 % de similitud.

Poseen un intervalo más amplio de salinidad requerida para su crecimiento, desde el 1.3 M al 5.14 M. En éste, solo se generan dos fenones donde el A engloba a 3 cepas y el B a 12. Las bacterias localizadas en estas salinas se caracterizan por ser en su gran mayoría cocos, catalasa positiva, oxidasa negativa, indol negativo e incapaces de crecer a pH 4. La ausencia de enzimas capaces de hidrolizar el almidón y la producción de ácido a partir de glucosa y manitol define a los dos fenones que generan este dendograma. La resistencia a antibióticos comunes que presenta es a la neomicina y norfloxacina.

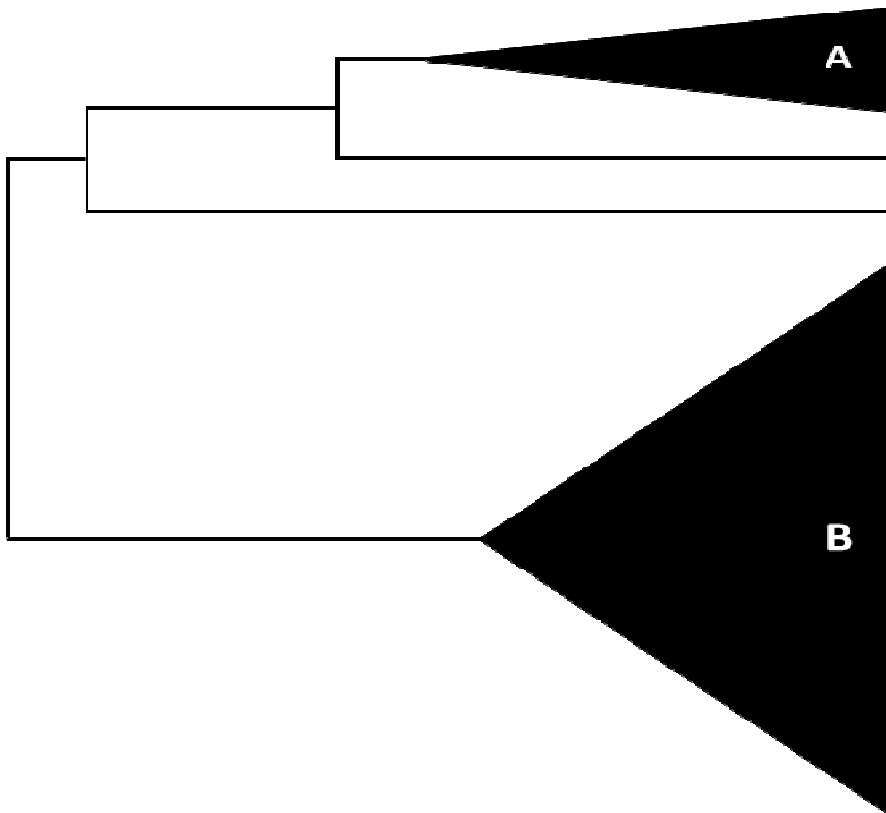


Fig. 33. Dendograma de bacterias aisladas de la salina de Fuente de Piedra (Málaga).

Realizando un estudio detallado a partir de los fenones que generan cada dendograma de Fuente de Piedra, el medio y la salinidad de donde se aislaron las cepas que componen la microbiota recogida para este ambiente, se especificaron la figura 34. En las gráficas observamos como el dendograma de las arqueas, parte de microorganismos recogidos en general de medios con una salinidad elevada, ya que el criterio primario de esta tesis está dirigido principalmente a la selección, aislamiento y descripción de microorganismos halófilos extremos. Los fenones A, E y F se caracterizan por estar representados mayoritariamente por cepas procedentes del medio OS o HM a altas salinidades, mayores del 15 %. Sin embargo, B y C, describen a cepas halófilas moderadas; quedando en consecuencia el fenón D, definido por un grupo homogéneo de cepas que han sido recogidas de un amplio abanico de salinidades. En el caso de la gráfica B de la figura 34, que describe el dendograma de bacterias, hay una agrupación total de microorganismos que provienen del medio HM al 10 % en el fenón A; dejando el fenón B, descrito por un reparto homogéneo en base a las diferentes salinidades donde fueron aislados.

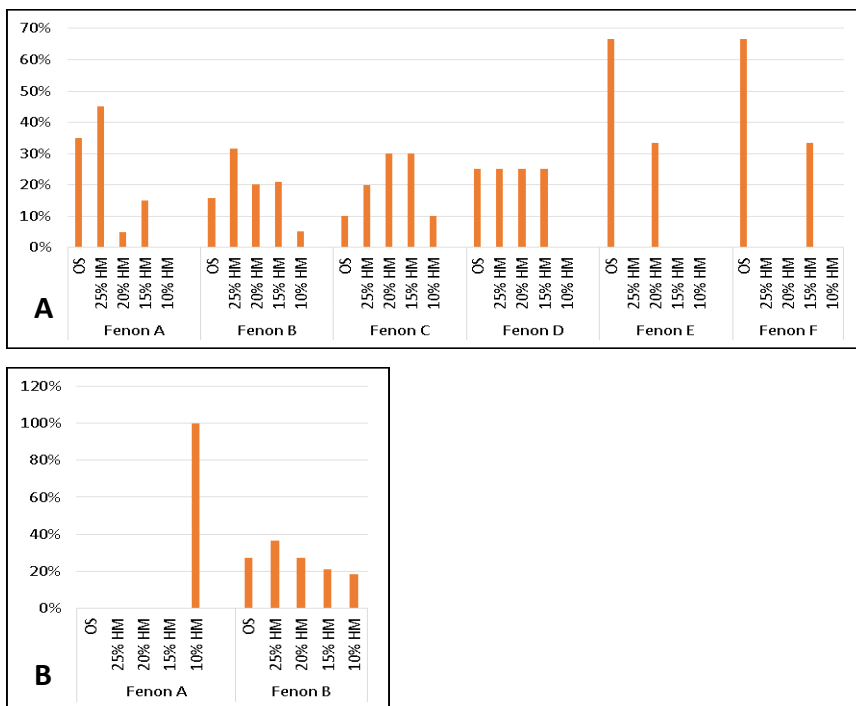


Fig. 34. Medio de crecimiento de las cepas que componen el dendograma de arqueas (A) y bacterias (B) de Fuente de Piedra (Málaga).

Por otro lado, en el ambiente salino de **La Malahá**, el estudio detallado de los dendogramas creados por taxonomía numérica a un porcentaje de similitud del 74 %, en el caso de las arqueas, y del 72 % en las bacterias nos permitió encontrar características comunes dentro de los fenones que se generaron. En el dendograma de arqueas presentado en la figura 35, el número de cepas se limitaron a 5 fenones, donde el fenón A abarcaba 19 cepas, el B a 7, el C y el D a 3 cepas cada uno y 5 cepas el fenón E. Mientras la figura 36, dendograma de bacterias procedentes de la salina granadina, presenta una composición de 5 fenones. Donde A posee 5 cepas; el fenón B, 7; el fenón C, 4; el fenón D, 3 y el fenón E, 9 microorganismos. En el caso de las arqueas, son capaces de crecer en un intervalo de salinidad del 2.57 M a 5.14 M, y en las bacterias, el intervalo mínimo común va de 2.57 M a 3.4 M (Eichler, 2001).

Las arqueas (Figura 35) poseen en común la capacidad de crecer en presencia de norfloxacina y ausencia de magnesio, así como, la incapacidad de producir ácido en presencia de celobiosa y almidón. En el dendograma creado por el TAXAN 2.0, se generan 5 fenones, de los cuales se puede destacar que el Fenón C están compuesto mayoritariamente por microorganismos cocoides, capaces de resistir temperaturas de hasta 50 °C incapaces de hidrolizar el almidón, el tween 80 o la caseína. Por otro lado, en el Fenón D difiere en el rango de temperaturas en el cual puede crecer, ya que es capaz de tolerar temperaturas de 4 °C e incapaz de desarrollarse a 50 °C. Sin embargo, comparten la capacidad de crecer cuando poseen como única fuente de carbono y energía al citrato, succinato o sorbitol. A su vez el Fenón C posee características semejantes con el fenón E, como es la presencia de la nitrato y nitrito reductasa, o como la producción de ácido a partir de la galactosa maltosa y sorbitol. Estos tres fenones, caracterizados por carecer de movilidad, junto con el fenón B se definen como triptófano desaminasa negativa y catalasa positivas.

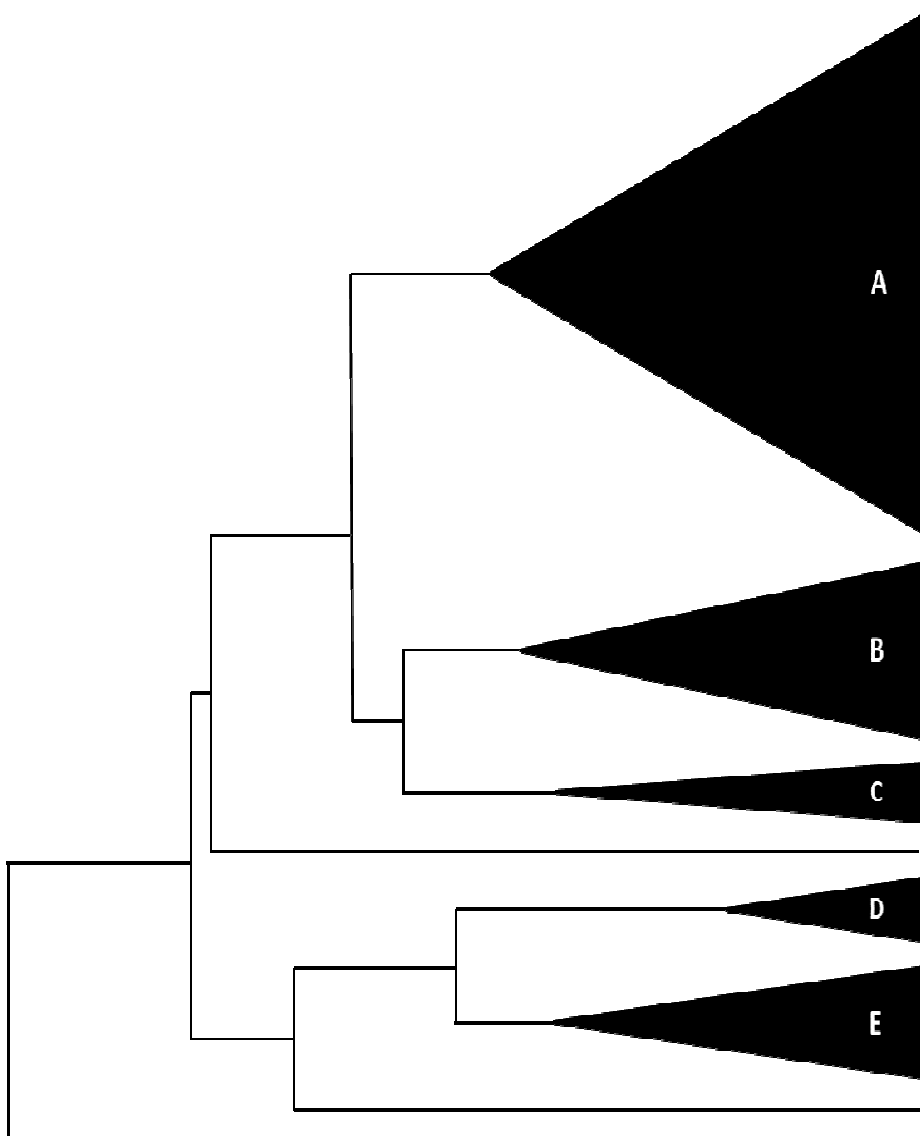


Fig. 35. Dendrograma de arqueas aisladas de la salina de La Malahá (Granada).

En el caso de las bacterias (Figura 36) el dendograma se ha generado a una similitud del 72 % en el que se han generado 5 fenones, todos comparten la resistencia a la ciprofloxacina y la capacidad de crecer en ausencia de magnesio. Las bacterias del fenón A son capaces de crecer en condiciones de pH 5 hasta 8.5, así como en ausencia de magnesio. Pueden utilizar como única fuente de carbono y energía el glicerol y el piruvato. De forma específica este fenón posee la nitrito reductasa, mientras que la nitrato reductasa la tienen los componentes tanto del Fenón A, B, C y E. Por su parte el fenón B está compuesto por cocos, catalasa positiva y capaz de crecer a 50 °C. El fenón C está compuesto por Gram negativos, catalasa positiva, y con ausencia de enzimas ONPG y proteolíticas. Por su parte el fenón D lo componen bacterias Gram positivas, catalasas positivas, capaces de crecer a 4 °C y con ausencia de enzimas para la hidrólisis de la caseína. Y por último destacar, la capacidad del fenón D para crecer a 4 °C y a pH 10, donde con la única presencia, como fuente de carbono y energía, de la glucosa, lactosa, xilosa, maltosa o sorbitol son capaces de desarrollarse.

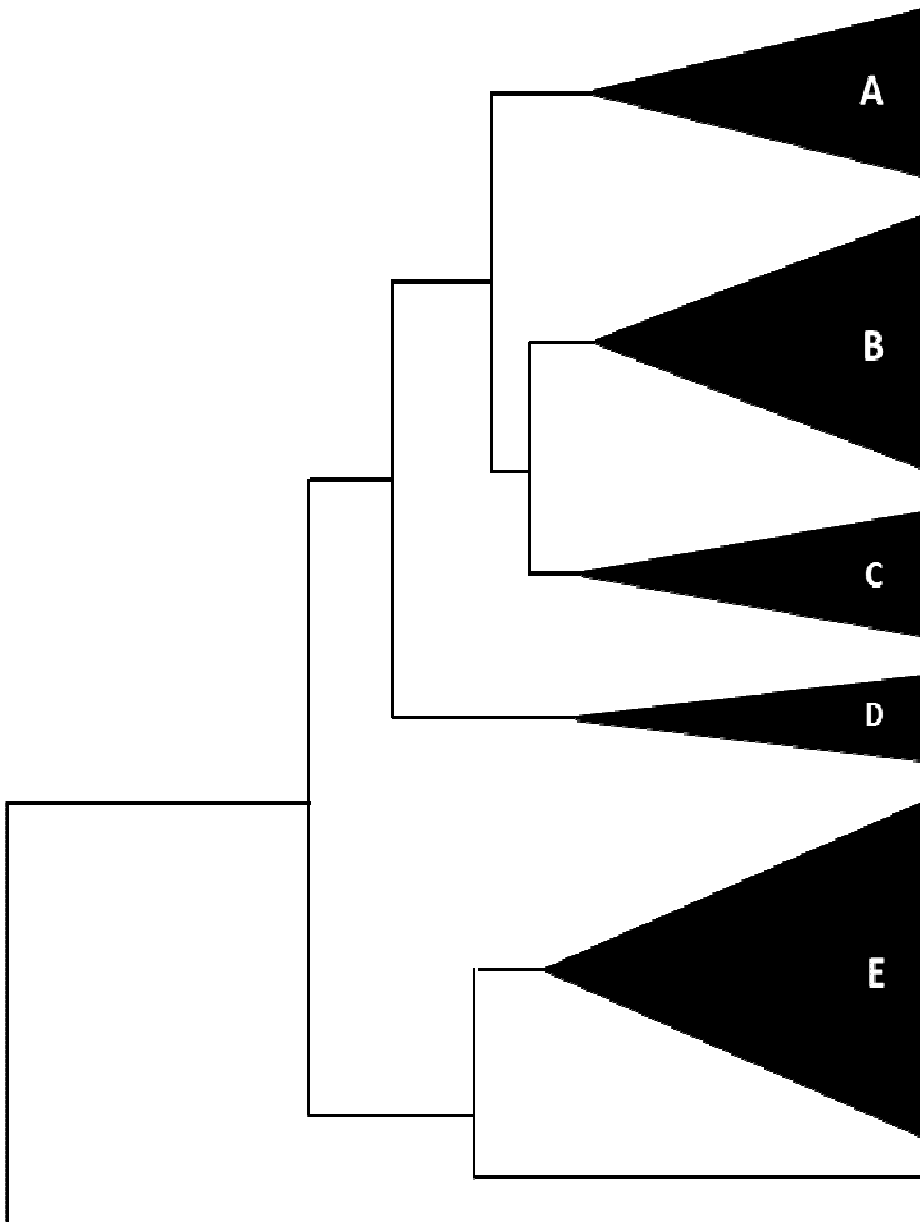


Fig. 36. Dendrograma de bacterias aisladas de la salina de La Malahá (Granada).

En líneas generales la gráfica de arqueas (Figura 37-A) muestra una clara tendencia de los microorganismos seleccionados a altas concentraciones salinas. Siendo destacable el porcentaje global de arqueas que proceden del medio OS, típicamente usado para el género *Halobacterium*. En la figura 37-B, la gráfica de barras muestra que la población bacteriana posee una clara procedencia de altas salinidades en cuatro de los 5 fenones que componen el dendograma, concretamente en torno al 20 % de salinidad, apareciendo una disminución del porcentaje de microorganismos presentes en salinidades inferiores. El fenón D difiere más del resto, ya que está caracterizado por una homogeneidad de porcentajes salinos de procedencia.

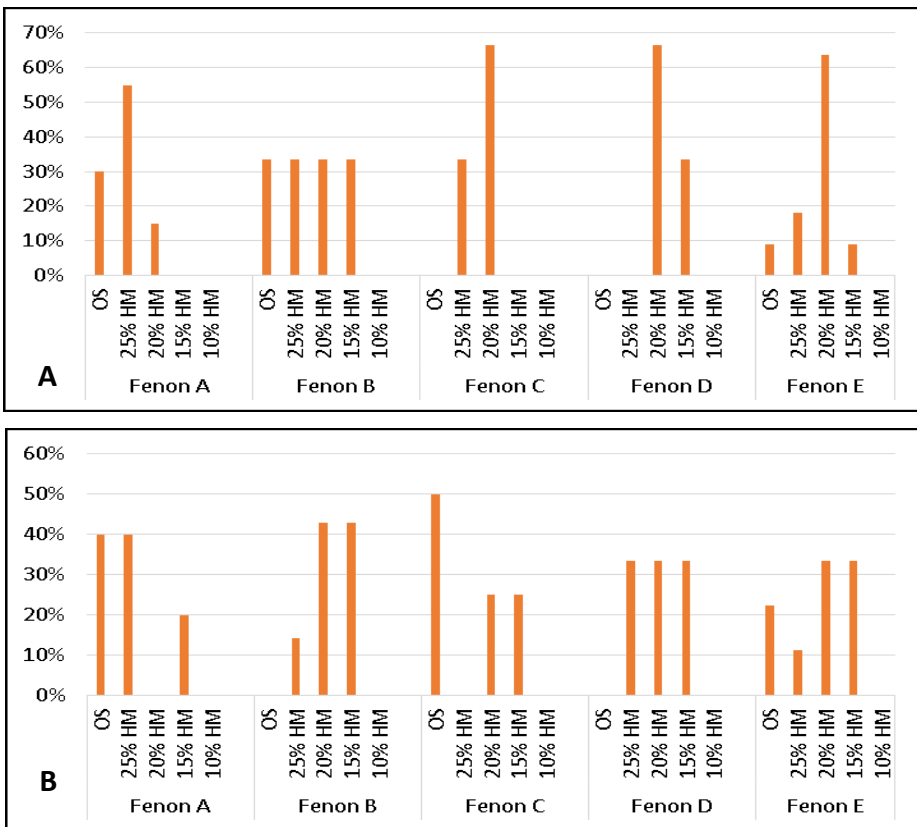


Fig. 37. Medio de crecimiento de las cepas que componen el dendograma de arqueas (A) y bacterias (B) de La Malahá (Granada).

El dendograma, al 73 % de similitud, generado a partir de las arqueas analizadas de **Bahía de Cádiz** (Figura 39), contiene siete fenones (con 22 cepas en el A; 3 cepas en los fenones B, C y G respectivamente; 8 cepas en el D; 14 en el G; y 4 cepas en el F) que comparten características tales como un intervalo mínimo de salinidad del 3 M al 4.3 M, catalasa positiva, ausencia de la enzima ONPG y la capacidad de crecer en presencia de norfloxacin. El fenón A, B, D, E y G se caracterizan por crecer en ausencia de magnesio. Comparten además la capacidad de crecer con una única fuente de energía y carbono, siendo para el fenón A la glucosa; el B: glucosa, lactosa, xilosa, galactosa, maltosa, sorbitol, glicerol, manitol, succinato, citrato y aminoácidos como la L-alanina y L-aspártico; en el fenón C: arabinosa, sorbitol, glicerol, succinato, malto y piruvato; y en el D: xilosa, galactosa, maltosa, arabinosa, sorbitol, glicerol, manitol, succinato, citrato y piruvato. Destacar que las arqueas que componen el fenón A y B son capaces de crecer a 50 °C, donde el fenón B destaca a su vez por la capacidad de desarrollarse a pH del orden de 10 y en anaerobiosis, la ausencia de la triptófano desaminasa y la nitrito reductasa, y la presencia de nitrato reductasa. El fenón C por su parte es capaz de fermentar la xilosa y la fructosa generando ácidos. Las arqueas que componen el fenón D crecen a 4 °C, al contrario que las del fenón F las cuales poseen la enzima capaz de hidrolizar la gelatina.

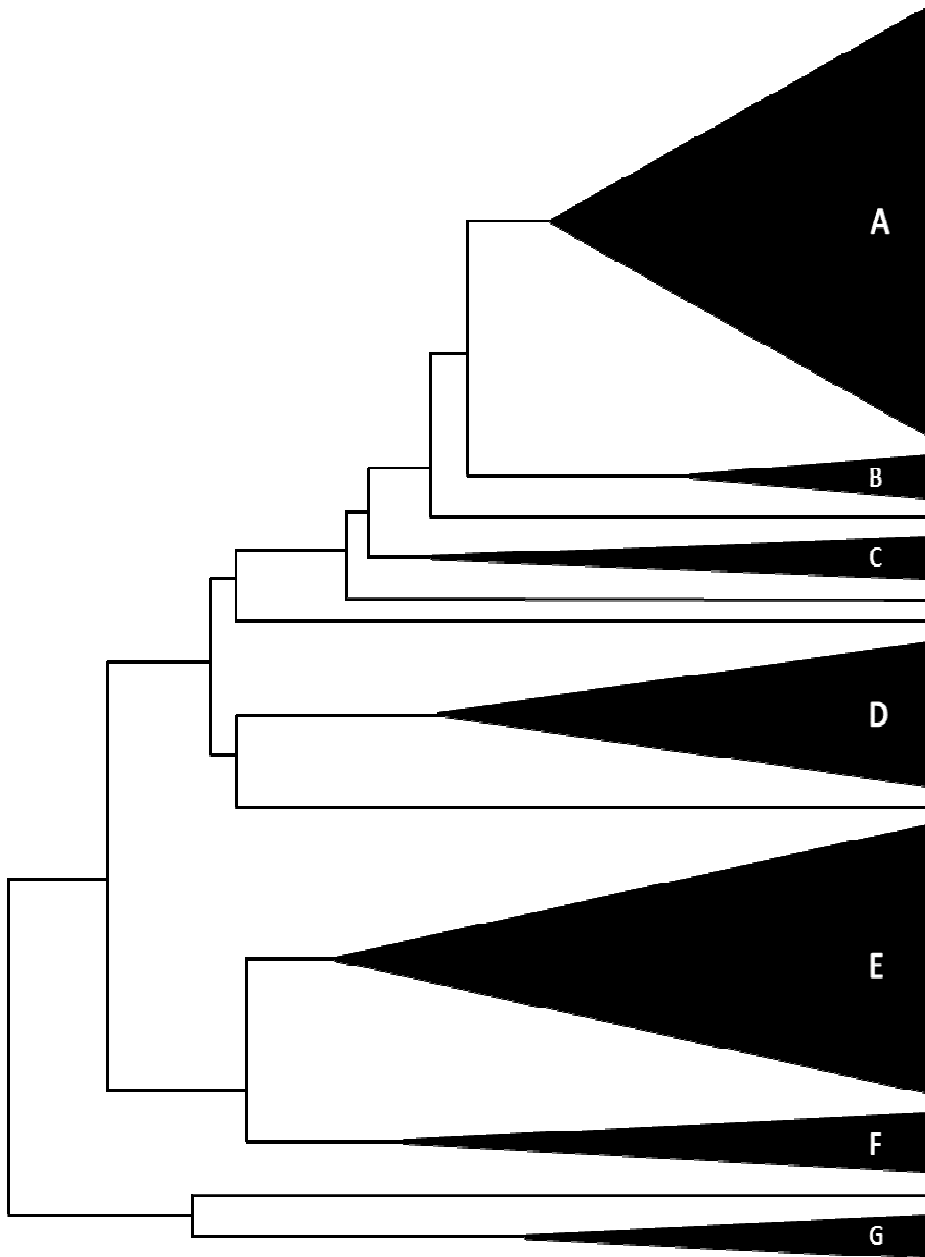


Fig. 38. Dendrograma de arqueas aisladas de la salina de Santa Mª de Jesús (Chiclana, Bahía de Cádiz).

Por otro lado, al 74 % de similitud (Figura 39), se crea un dendograma de bacterias con 4 fenones: 7 cepas en el A; 3 cepas en el B; 6 cepas en el C; y 4 cepas en el D. Todas las bacterias crecen dentro de un rango del 3M al 3.8M, existiendo dentro de este grupo mayores o menores exigencias salinas. El fenón A, es el más homogéneo en cuanto características bioquímicas y nutricionales. Se definen como bacterias capaces de crecer en anaerobiosis creada a partir de L-arginina, del mismo modo que las que componen el fenón C y D, al igual que el fenón B, resisten temperaturas de 50 °C, y de 4 °C. A nivel de pH pueden desarrollarse en presencia

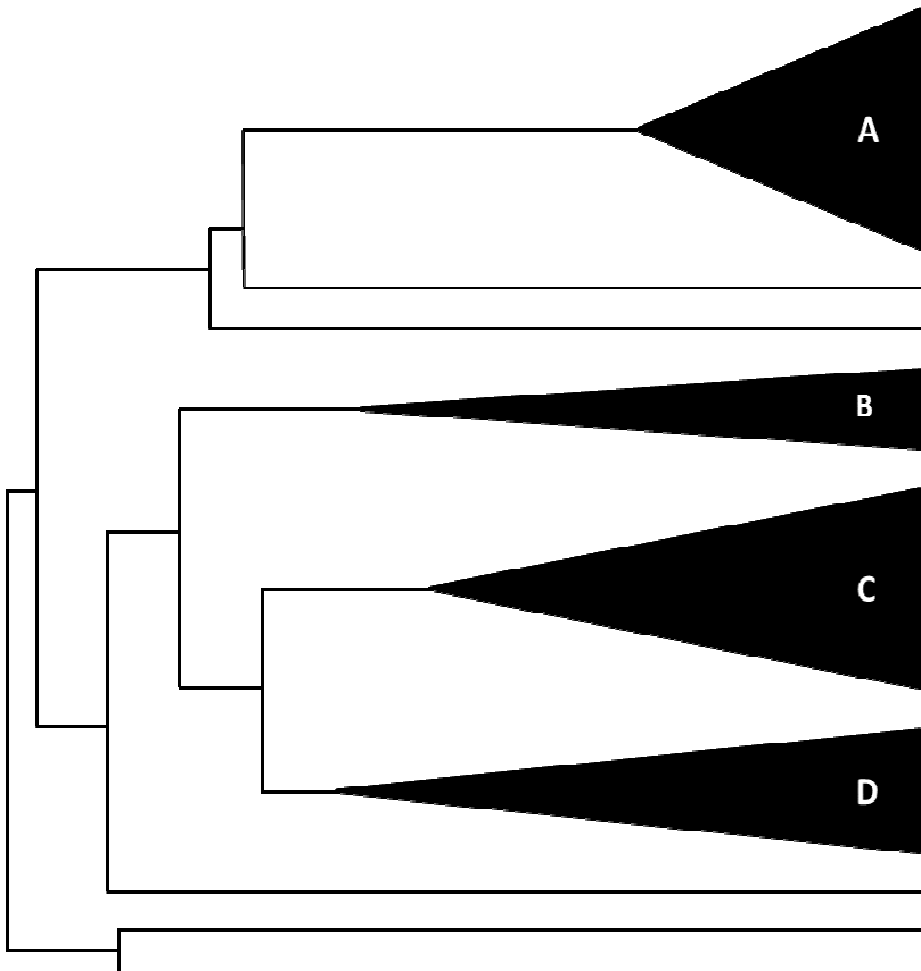


Fig. 39. Dendograma de bacterias aisladas de la salina de Santa Mª de Jesús (Chiclana, Bahía de Cádiz).

de un valor igual a 10 y poseen la nitrato reductasa. Pueden utilizar como única fuente de carbono y energía la glucosa, xilosa, galactosa, maltosa, arabinosa, sorbitol, manitol, succinato, citrato, piruvato y los cuatro aminoácidos estudiados: L-lisina, L-arginina, L-aspartico y glicina. El fenón B se especifica como bacilos, Gram negativo capaces de crecer a en ausencia de magnesio en su medio.

Estas últimas gráficas (Figura 40), de las salinas de Bahía de Cádiz, muestran una población de arqueas halófilas moderadas, a excepción del fenón B que está compuesto exclusivamente por arqueas procedentes del medio HM al 25 % Subov, por lo que pueden ser englobadas en un principio como halófilas extremas. Curiosamente en el fenograma de bacterias, el fenón B también se halla compuesto exclusivamente por bacterias que se seleccionaron del medio 25 % (Subov).

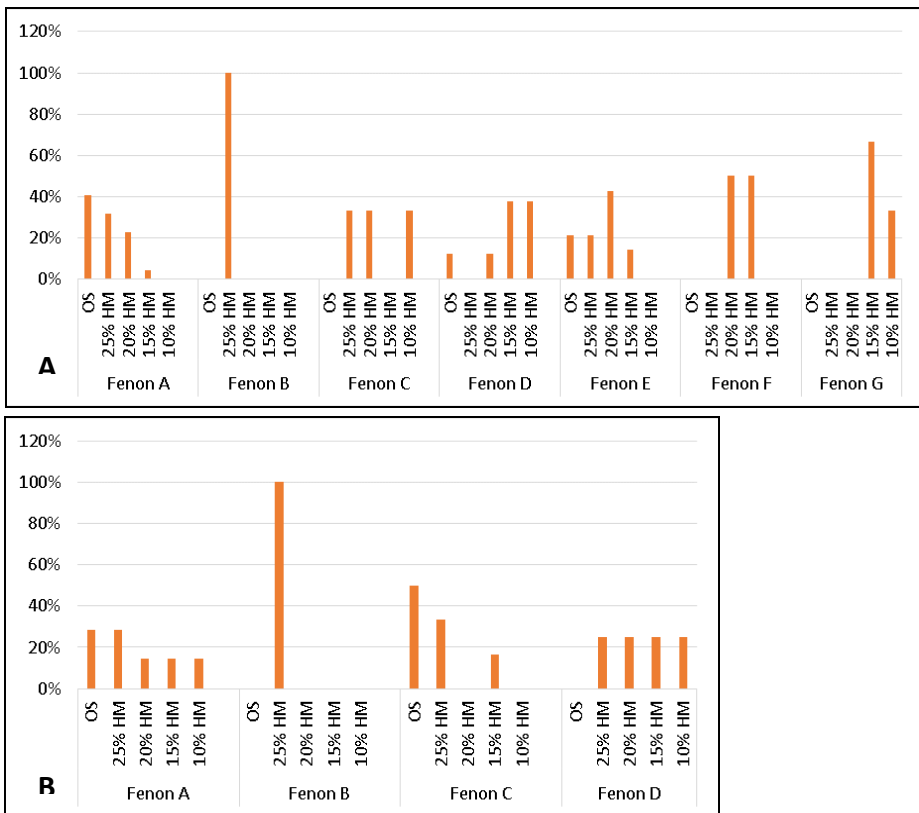


Fig. 40. Medio de crecimiento de las cepas que componen el dendograma de arqueas (A) y bacterias (B) de Santa M^a de Jesús (Chiclana, Bahía de Cádiz).

Continuando con la gráfica de arqueas, observamos como a excepción del fenón G, donde sus cepas proceden de salinidades bajas (10 % - 15 %), los 5 fenones restantes poseen un procedencia homogénea. La bacterias poseen cepas procedentes de una uniforme salinidad, a excepción del fenón B de procedencia exclusiva del 25 % seguido de un destacable alto porcentaje de bacterias del fenón C obtenidas de medios de cultivo OS.

Las gráficas de medios de crecimiento de las cepas de los distintos ambientes salinos de las figuras 35, 38 y 41, ponen de manifiesto como el programa TAXAN 2.0 realiza una buena agrupación, a pesar de poseer ciertos sesgos cuando se quiere agrupar a los microorganismos por diferencias y semejanzas fenotípicas. Esto queda reflejado en la buena agrupación de los microorganismos en base a la capacidad de desarrollo en diferentes porcentajes de salinidad, aun siendo ésta una mínima representación fenotípica de los 69 caracteres totales estudiados (Mesbah & Wiegel, 2012).

2.2.1. Selección de microorganismos representantes de cada fenón

Para seleccionar las cepas, a las que se les realizará un estudio taxonómico molecular, se valoran características morfológicas, fisiológicas y de cultivo atractivas e interesantes, tales como la capacidad de crecer a elevadas salinidades. Así como, se seleccionan cepas de cada uno de los fenones, de manera que siempre haya algún representante con la secuencia de nucleótidos de la secuencia del gen del 16S rRNA analizada:

❖ Laguna de Fuente de Piedra:

- **Arqueas.** Fenón A: A1FP1, A1FP5, A2FP3, A2FP2122T, A3FP2, S1FP4, S2FP 6, S2FP8 y S2FP20; fenón B: A1FP7, A1FP17, A1FP19, A2FP11,

A2FP21, A3FP1, A3FP10, S1FP8, S2FP3, S2FP16 y S2FP25; fenón C: A1FP20, A2FP6, A3FP21, A3FP22 y S1FP10; fenón D: S1FP2, A3FP5 y S2FP14; y algunas cepas no incluidas en fenones: S2FP2, S2FP22 y S2FP27.

- **Bacterias.** Fenón A: A1FP11 y A1FP12; fenón B: A1FP22, A2FP19 y S2FP15; y una cepa no incluida en fenones: A2FP15.

❖ Salinas de La Malahá:

- **Arqueas.** Fenón A: A1LM2, A1LM9, A1LM12, A1LM21, A2LM5, S1LM11, S1LM20, S2LM2, S2LM9, S3LM2 y S3LM6; fenón B: S1LM13; fenón D: S1LM16; y algunas cepas no incluidas en fenones: S1LM19 y S2LM21.

- **Bacterias.** Fenón A: A1LM10, S2LM6 y S2LM18; fenón B: S3LM15; fenón C: A1LM26, A2LM1 y A2LM10; fenón D: A1LM14, A1LM25 y S1LM8; fenón E: A1LM24, A1LM28, A1LM30, A2LM19, A2LM23, S1LM4, S1LM21 y S1LM30; y una cepa no incluida en ningún fenón: S3LM13.

❖ Salina de Santa M^a de Jesús, Bahía de Cádiz:

- **Arqueas.** Fenón A: A1BC2, A2BC9, A2BC10, A3BC2, A3BC7, S1BC11, S3BC10 y S3BC11; fenón D: S2BC27; fenón E: A2BC5, A4BC2, A4BC7, S4BC3, S4BC8 y S4BC12; fenón G: S2BC20; y cepas no incluidas en ningún fenón: A3BC11, A4BC16 y S1BC10.
- **Bacterias.** Fenón A: A1BC3, A1BC5 y A2BC18; fenón C: A3BC4, A3BC6, A3BC16 y S2BC8; fenón D: A4BC6 y S2BC28 y cepas no incluidas en ningún fenón: A2BC21, S3BC8 y S4BC9.

2.3. TAXONOMÍA MOLECULAR

El análisis previo de taxonomía numérica, clasificó a los microorganismos en función de la homología de sus caracteres y atributos fenotípicos, dándole el mismo valor a cada uno de ellos, de acuerdo con el coeficiente utilizado y descrito.

Actualmente, con el fin de identificar, clasificar, y nombrar a los microorganismos seleccionados, aplicamos técnicas de biología molecular. Estas técnicas están basadas en el análisis de DNA, un material resistente e invariable, permitiendo un análisis más fiable y preciso. Además, aportan un conocimiento de las relaciones filogenéticas que existen entre los microorganismos objeto de estudio pertenecientes a un ecosistema determinado.

2.3.1. Extracción de DNA cromosómico, cuantificación y purificación del DNA

Las cepas seleccionadas como representantes de cada fenón se sometieron al proceso de extracción, purificación y cuantificación de su DNA mediante las técnicas explicadas en material y métodos.

La determinación de la pureza y calidad del DNA se realizó por dos métodos dependiendo del tipo de extracción que se realice. De manera, que si el DNA de la cepa es extraído con el kit de extracción de DNA "DNeasy" de QuiaGen®, por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (p/v), descrito en el apartado 2.2 de materiales y métodos, es suficiente para estimar la calidad necesaria para las siguientes pruebas. Ya que, este DNA será usado para la obtención de la secuencia del 16S rRNA mediante amplificación por PCR. Sin embargo, cuando el DNA es extraído por el método de Marmur, el producto final será usado para la determinación del contenido de G+C y la hibridación DNA-DNA, procedimientos para los cuales es muy importante conocer la pureza y la concentración de DNA. La

medida de la concentración de DNA se realiza mediante un espectrofotómetro, Eppendorf Biophotometro plus, recogiendo los valores de absorción en longitudes de onda de 260 y 280 nm. Los resultados obtenidos son los expresados en la tabla 50.

Determinación del contenido de bases Guanina y Citosina de DNA. Método de la temperatura de fusión (T_m)

Considerando que el grado de pureza obtenida era adecuada, se calculó el contenido en guanina-citosina (G+C mol %) y la temperatura media de fusión (T_m °C) como se explica en el apartado correspondiente de material y métodos. Los resultados de las cepas seleccionadas, por ser candidatos a nuevas especies, se muestran en la tabla 50.

La temperatura de fusión del DNA, temperatura a la que se desnaturaliza la molécula, está directamente relacionada con el contenido en G+C. Variaciones importantes de este valor, aparecen cuando los microorganismos son de distintos géneros. Cada especie bacteriana tiene un contenido de G+C medio característico. Las diferencias sustanciales en la composición de bases del DNA de dos microorganismos son reflejo de un número elevado de diferencias individuales en las respectivas secuencias de las bases de su DNA. Dos organismos con gran semejanza en la composición de bases de su DNA, puede tomarse como base inicial, que indica su semejanza genética y evolutiva, confirmándose únicamente mediante la hibridación DNA-DNA. Destacar que aquellos microorganismos que presentan valores elevados de G+C % mol, es debido a un mayor número de triples enlaces (guanina-citosina) que proporcionan una mayor estabilidad al DNA, lo cual es un mecanismo de adaptación que presentan para sobrevivir en condiciones adversas, como pueden ser las elevadas temperaturas (Rothschild & Mancinelli, 2001).

Tabla 50. Concentración, pureza, valor medio de temperatura de fusión y valor teórico de G+C (% mol) de las cepas seleccionadas.

CEPA	Dominio	Concentración de DNA (µg/mL)	Pureza $\lambda_{260/280}$	Valor medio Tm (°C)	Valor medio G+C (mol %)
A1FP7	A	1167	1.71	94.85	62.37
A1FP12	B	380	1.60	83.84	35.46
A1FP20	A	960	1.75	94.50	61.42
A3FP22	A	1010.5	1.72	93.47	58.94
S1FP10	A	1483.8	1.87	95.93	64.96
S2FP2	A	743	1.79	96.58	66.54
S2FP3	A	843	1.65	95.23	63.24
S2FP8	A	1710	1.78	94.37	61.14
S2FP14	A	2280.4	1.80	94.50	61.46
S2FP25	A	1386	1.52	94.18	60.70
S1LM8	B	2457.5	1.7	84.96	38.20
S1LM16	A	2319	1.79	94.95	62.56
S3LM7	A	600	1.77	93.45	58.90
A3BC6	B	970	1.70	94.58	61.60
A3BC11	A	1400	1.70	96.97	67.48
A4BC2	A	408	1.71	93.23	58.35
S4BC8	A	2007.3	1.92	94.00	60.24

*A, arquea; B, bacteria.

En los microorganismos estudiados los valores del contenido G+C (Tabla 50), analizándolos por ambientes, presentan diferencias destacables. Fuente de Piedra presenta cepas con valores mínimos de 35.46 % correspondiente a la bacteria A1FP12, y 58.94 % correspondiente a la arquea A3FP22. En cuanto al valor máximo del resto de arqueas el porcentaje es de 66.54 %, correspondiente a la arquea S2FP2. Por su parte, La Malahá tiene cepas con un valor mínimo de 38.20 % para la bacteria S1LM8, valor inferior a los reportados por las arqueas. En las arqueas de La Malahá se muestran un valor máximo de 62.56 % y un mínimo de 58.90 %, para S1LM16 y S3LM7 respectivamente. Este intervalo descrito es el más estrecho, si lo

comparamos con los observados en Fuente de Piedra o en Bahía de Cádiz. Por último, Santa M^a de Jesús, presenta valores de G+C para la bacteria A3BC6 de 61.60 %, siendo el valor más elevado para bacterias de los tres ambientes andaluces. Por otro lado, las arqueas marcan el margen de valores entre 58.35 % (A4BC2) y 67.48 % (A3BC11). Valores muy similares a los hallados en Fuente de Piedra. En resumen, los datos expuestos en la tabla 50, ponen de manifiesto las diferencias máximas en el contenido G+C son inferiores al 10 % y su Tm no varía más de 5 °C, para especies que pertenecen al mismo género, como es el caso de A1FP7, A1FP10, S2FP8 y S2FP14, quienes pertenecientes al género *Halobellus*.

Dentro de los bloques que pertenecen al mismo género, el margen que existe entre los valores de G+C máximo y mínimo no presentan un valor superior al 4 %, que traducido a variaciones en la Tm es del orden de 1.64 °C, siendo un dato de importancia taxonómica, ya que diferentes especies pertenecientes a un mismo género normalmente poseen un porcentaje de G+C que no varía en más del 10% (Ziemke, et al., 1998). Dicha similitud se ve confirmada por las pruebas moleculares posteriores.

En general, los valores altos de G+C se encuentran en torno al 60 mol %, presumiblemente es debido al mecanismo de adaptación que desarrollan los microorganismos halófilos para evitar la incidencia de los rayos UV, ya que estas lagunas saladas suelen ser zonas de alta irradiación. No obstante, la arquea halófila extrema *Haloquadratum walsbyi* es una excepción. Ya que presenta un bajo valor de G+C mol% (47.9 %) debido a que compensa la desventaja de un bajo valor de guanina y citosina en la composición de su DNA con el aumento de la presencia de enzimas fotoliasas (Chitra & Sandip, 2012). Sin embargo, A1FP12 (35.46 mol %) y S1LM8 (38.20 mol %) poseen unos valores de G+C más bajos en relación al resto. En este caso puede ser debido a que su salinidad óptima para el crecimiento y desarrollo es del 10% por lo que no son halófilos extremos.

Por otro lado, destacar que la degeneración del código genético permite múltiples codones para codificar el mismo aminoácido. Sin embargo, el uso de los codones alternativos y los aminoácidos se utilizan de manera desigual entre los genes, un fenómeno denominado *sesgo del uso codón*. El análisis de los datos de uso de codón global indicó que los codones que terminan en guanina o citosina eran predominantes entre los genes de microorganismos halófilos. Lo cual, presentaba una fuerte correlación positiva con el elevado contenido de G + C. Así mismo, el análisis de correlación indicó que los genes con mayor nivel de expresión y que muestran un mayor grado de sesgo de uso de codones fueron ricos en guanina y citosina, así como la preferencia de localizar dichos nucleótidos en la tercera posición (Sanjukta, et al., 2013).

2.3.2. Análisis filogenético

Obtención del gen del 16S rRNA. Secuenciación del fragmento obtenido por PCR una vez purificado

Se realizó una primera secuenciación parcial del gen del 16S rRNA de las cepas seleccionadas tras su amplificación por PCR con el oligonucleótido inicial D30, para arqueas (Arahal, et al., 1996), y el 16SF27 para bacterias (Kharroub, et al., 2011), para tipificar los microorganismos y tener una estimación de la diversidad de las especies que constituían estos ambientes, así como conocer, si se trataban de especies ya conocidas y descritas en la bibliografía o si por el contrario, eran microorganismos no descritos hasta el momento. Las secuencias parciales obtenidas bien con el oligonucleótido D30 o el interno 16SR519 para bacterias de todas las cepas seleccionadas, que se pueden ver en el Anexo, fueron comparadas en las bases de datos del NCBI y se realizó el alineamiento global mediante BLAST (Altschul, et al., 1990). Una vez realizado el alineamiento y comparación con secuencias de especies validadas, se seleccionaron todas aquellas que tenían la posibilidad de ser una especie nueva para secuenciarlas completamente usando el

oligonucleótido “reverse” D56 para arqueas y para bacterias, los oligonucleótidos 357F y 945F.

La comparación de secuencias, tanto parciales como completas, el porcentaje de cobertura de nuestra secuencia con respecto a las ya validadas, el porcentaje de similitud con las secuencias contenidas en las bases de datos y la viabilidad para realizar la hibridación con la cepa incógnita, se presentan en las tablas, 51, 52, 53, 54, 55 y 56. Siendo las claves para dichas tablas: Secuencia (**SEQ**); porcentaje de cobertura de la secuencia problema con respecto a las validadas (**%COB**); y porcentaje que posee la secuencia de nuestra cepa con respecto a las de la base de datos (**%SIM**).

Tabla 51. Resultados del alineamiento global mediante BLAST de las secuencias parciales y totales del gen del RNAr 16S de las arqueas seleccionadas de Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	SEQ. 700 NT	% SIM	SEQ. 1400NT	% COB	% SIM	CEPAS	SEQ. 700 NT	% SIM	SEQ. 1400NT	% COB	% SIM		
A1FP1	<i>Halorubrum sp.</i>	99 %				S1FP2	<i>Halorubrum sp.</i>	100 %	<i>H.chaoviator</i>	98 %	99 %		
A1FP5	<i>Halorubrum sp.</i>	99 %			<i>H.ezzemoulense</i>				98 %	99 %			
A1FP7	<i>Halobellus sp.</i>	93 %	<i>Hb. Inordinatus</i>	97 %	98 %				<i>H.xinjiangense</i>	98 %	99 %		
A1FP17	<i>Halorubrum sp.</i>	99 %			<i>H.trapanicum</i>				98 %	99 %			
A1FP19	<i>Halorubrum sp.</i>	99 %			<i>H.coriense</i>				98 %	99 %			
A1FP20	<i>Halobellus sp.</i>	94 %	<i>Hb. Inordinatus</i>	97 %	98 %				<i>H.californiense</i>	98 %	99 %		
A2FP3	<i>Haloferax sp.</i>	99 %	<i>Hf. alexandrinus</i>	98 %	99 %				<i>H.sodomense</i>	98 %	99 %		
			<i>Hf.volcanii</i>	98 %	99 %				<i>H.litorem</i>	98 %	98 %		
			<i>Hf.lucentense</i>	98 %	99 %				<i>H.tebenquichense</i>	98 %	98 %		
			<i>Hf.prahovense</i>	98 %	99 %				<i>H.distributum</i>	95 %	99 %		
			<i>Hf.denitrificans</i>	98 %	99 %	<i>H.ejinoreense</i>	98 %	98 %					
			<i>Hf.rutilus</i>	98 %	99 %	<i>H.terrestre</i>	98 %	97 %					
			<i>Hf.antrum</i>	98 %	99 %	<i>H.arcis</i>	98 %	97 %					
A2FP6	<i>Haloarcula sp.</i>	99 %	<i>H. hispanica</i>	98 %	98 %	S1FP4	<i>Natrinema sp.</i>	99 %	<i>Nt. pallidum</i>	98 %	99 %		
			<i>H.amylolytica</i>	98 %	98 %				<i>H. trapanicum</i>	99 %	98 %	99 %	
			<i>H.salari</i>	98 %	98 %				<i>Haloterrigena sp.</i>	97 %	<i>Nt. altunense</i>	98 %	99 %
			<i>H.japonica</i>	98 %	98 %						<i>Nt. versiforme</i>	98 %	99 %
			<i>H.argentinensis</i>	98 %	98 %						<i>Nt. pellirubrum</i>	98 %	97 %
			<i>H.amylolytica</i>	98 %	98 %						S1FP8	<i>Halorubrum sp.</i>	99 %

Tabla 51. Resultados del alineamiento global mediante BLAST de las secuencias parciales y totales del gen del RNAr 16S de las arqueas seleccionadas de Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	SEQ. 700 NT	% SIM	SEQ. 1400NT	% COB	% SIM	CEPAS	SEQ. 700 NT	% SIM	SEQ. 1400NT	% COB	% SIM
A2FP6			<i>H.marismortui</i>	98 %	98 %	S1FP8			<i>H.chaoviator</i>	99 %	99 %
			<i>H.tradensis</i>	98 %	98 %					<i>H.xinjiangense</i>	98 %
A2FP11	<i>Halorubrum sp.</i>	99 %	<i>H.ezzemoulense</i>	99 %	99 %				<i>H.californiense</i>	99 %	99 %
			<i>H.californiense</i>	99 %	99 %				<i>H.trapanicum</i>	99 %	99 %
			<i>H.chaoviator</i>	99 %	99 %				<i>H.litoreum</i>	99 %	99 %
			<i>H.xinjiangense</i>	98 %	99 %				<i>H.sodomense</i>	99 %	99 %
A2FP11			<i>H.coriense</i>	99 %	99 %				<i>H.distributum</i>	95 %	99 %
			<i>H.trapanicum</i>	99 %	99 %				<i>H.tebenquichense</i>	99 %	98 %
			<i>H.sodomense</i>	99 %	99 %				<i>H.ejinoreense</i>	99 %	98 %
			<i>H.litoreum</i>	99 %	98 %				<i>H.terrestre</i>	99 %	97 %
			<i>H.tebenquichense</i>	99 %	98 %				<i>H.arcis</i>	99 %	97 %
			<i>H.distributum</i>	95 %	99 %	S1FP10	<i>Halorubrum sp.</i>	98 %	<i>H.cibi</i>	98 %	98 %
			<i>H.ejinoreense</i>	99 %	98 %				<i>H.alkaliphilum</i>	98 %	97 %
			<i>H.terrestre</i>	99 %	97 %	S2FP2	<i>Haloterrigena sp.</i>	99 %	<i>Ht. thermotolerans</i>	99 %	99 %
			<i>H.arcis</i>	99 %	97 %		<i>Natrinema sp.</i>	99 %	<i>Ht. saccharevitans</i>	99 %	99 %
A2FP21	<i>Halobacterium sp.</i>	100 %							<i>Ht. jeotgali</i>	96 %	99 %
A3FP1	<i>Halorubrum sp.</i>	99 %							<i>Ht. limicola</i>	98 %	97 %
A3FP2	<i>Halorubrum sp.</i>	99 %	<i>H.chaoviator</i>	99 %	99 %				<i>Ht. turkmenica</i>	99 %	97 %
			<i>H.ezzemoulense</i>	99 %	99 %	S2FP3	<i>Haloterrigena sp.</i>	97 %	<i>Ht. limicola</i>	98 %	98 %

Tabla 51. Resultados del alineamiento global mediante BLAST de las secuencias parciales y totales del gen del RNAr 16S de las arqueas seleccionadas de Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	SEQ. 700 NT	% SIM	SEQ. 1400NT	% COB	% SIM	CEPAS	SEQ. 700 NT	% SIM	SEQ. 1400NT	% COB	% SIM	
A3FP2			<i>H.xinjiangense</i>	98 %	99 %	S2FP3			<i>Ht. hispanica</i>	98 %	98 %	
			<i>H.californiense</i>	99 %	98 %					<i>Ht. thermotolerans</i>	97 %	97 %
			<i>H.trapanicum</i>	99 %	98 %					<i>Ht. jeitgali</i>	96 %	97 %
			<i>H.litoreaum</i>	99 %	98 %	S2FP6	<i>Halorubrum sp.</i>	99 %				
			<i>H.corriense</i>	99 %	98 %	S2FP 8	<i>Halobellus sp.</i>	94 %	<i>Hb. Inordinatus</i>	97 %	98 %	
			<i>H.sodomense</i>	99 %	98 %	S2FP 14	<i>Halobellus sp.</i>	95 %	<i>Hb. Inordinatus</i>	99 %	99 %	
			<i>H.tebenquichense</i>	99 %	98 %	S2FP16	<i>Halorubrum sp.</i>	99 %				
			<i>H.ejinoreense</i>	99 %	98 %	S2FP20	<i>Haloferax sp.</i>	99 %				
		<i>H.distributum</i>	99 %	98 %	S2FP22	<i>Halogeometricum sp.</i>	99 %					
		<i>H.arcis</i>	99 %	97 %		<i>Halosarcina sp.</i>	99 %					
A3FP5	<i>Halorubrum sp.</i>	100 %				S2FP25	<i>Haloterrigena sp</i>	98 %	<i>Ht. limicola</i>	99 %	98 %	
A3FP10	<i>Halogeometricum sp.</i>	99 %							<i>Ht. hispanica</i>	99 %	98 %	
A3FP10	<i>Halosarcina sp.</i>	99 %			S2FP27	<i>Natrinema sp.</i>	99 %					
A3FP21	<i>Halorubrum sp.</i>	99 %				<i>H. trapanicum</i>	99 %					
A3FP22	<i>Halovivax sp.</i>	99 %	<i>Hv. ruber</i>	99 %	99 %	<i>Haloterrigena sp.</i>	97 %					
			<i>Hv. asiaticus</i>	99 %	99 %							

Tabla 52. Resultados de alineamiento global mediante BLAST de las secuencias parciales y totales del gen del RNAr 16S de las arqueas seleccionadas de La Malahá (Granada).

CEPAS	SEQ 700 NT	% SIM	SEQ 1400NT	% COB	% SIM	CEPAS	SEQ 700 NT	% SIM	SEQ 1400NT	% COB	% SIM
A1LM2	<i>Halorubrum sp.</i>	98 %	<i>H. kocurii</i>	99 %	98 %	S1LM20	<i>Haloterrigena sp.</i>	99 %			
			<i>H. lipolyticum</i>	99 %	98 %		<i>Natrinema sp.</i>	99 %			
			<i>H. saccharovororum</i>	99 %	97 %	S2LM2	<i>Halorubrum sp.</i>	99 %			
			<i>H. aidingense</i>	99 %	97 %	S2LM9	<i>Haloarcula sp.</i>	99 %	<i>H. hispanica</i>	98 %	99 %
			<i>H. terrestre</i>	99 %	97 %				<i>H. argentinensis</i>	98 %	99 %
			<i>H. litoreum</i>	99 %	97 %				<i>H. marismortui</i>	98 %	99 %
			<i>H. Arcis</i>	99 %	97 %				<i>H. salaria</i>	98 %	99 %
			<i>H. japonica</i>	98 %	99 %						
				<i>H. amylolytica</i>	98 %	99 %					
				<i>H. quadrata</i>	98 %	98 %					
A1LM9	<i>Haloarcula sp.</i>	99 %	<i>H. hispanica</i>	98 %	99 %		<i>H. vallismortis</i>	98 %	98 %		
			<i>H. salaria</i>	98 %	99 %	S2LM21	<i>Halorubrum sp.</i>	98 %	<i>H. saccharovororum</i>	98 %	99 %
			<i>H. marismortui</i>	98 %	99 %				<i>H. lipolyticum</i>	98 %	99 %
			<i>H. amylolytica</i>	98 %	98 %				<i>H. kocurii</i>	98 %	99 %
			<i>H. japonica</i>	98 %	98 %				<i>H. lacusprofundi</i>	98 %	98 %
			<i>H. argentinensis</i>	98 %	98 %				<i>H. jeotgali</i>	97 %	98 %
			<i>H. quadrata</i>	98 %	98 %				<i>H. arcis</i>	98 %	97 %
<i>H. vallismortis</i>	98 %	98 %	<i>H. aidingense</i>	98 %	97 %						
A1LM12	<i>Halobacterium sp.</i>	100 %									
A1LM21	<i>Haloarcula sp.</i>	99 %	<i>H. hispanica</i>	99 %	99 %	S3LM2	<i>Halobacterium sp.</i>	100 %			
			<i>H. japonica</i>	99 %	99 %				S3LM6	<i>Halorubrum sp.</i>	99 %
			<i>H. marismortui</i>	99 %	98 %						
			<i>H. salaria</i>	99 %	98 %						
			<i>H. amylolytica</i>	98 %	99 %						

Tabla 52. Resultados de alineamiento global mediante BLAST de las secuencias parciales y totales del gen del RNAr 16S de las arqueas seleccionadas de La Malahá (Granada).

CEPAS	SEQ 700 NT	% SIM	SEQ 1400NT	% COB	% SIM	CEPAS	SEQ 700 NT	% SIM	SEQ 1400NT	% COB	% SIM	
A1LM21			<i>H. vallismortis</i>	99 %	98 %	S3LM6			<i>H. ejinorensis</i>	99 %	98 %	
			<i>H. californiae</i>	99 %	98 %				<i>H. ezzemoulense</i>	99 %	98 %	
			<i>H. quadrata</i>	99 %	98 %				<i>H. chaoviator</i>	99 %	98 %	
			<i>H. argentinensis</i>	99 %	98 %				<i>H. xinjiangense</i>	98 %	98 %	
A2LM5	<i>Halorubrum sp.</i>	99 %							<i>H. trapanicum</i>	99 %	98 %	
S1LM11	<i>Haloterrigena sp.</i>	99 %							<i>H. coriense</i>	99 %	98 %	
S1LM11	<i>Natrinema sp.</i>	99 %							<i>H. sodomense</i>	99 %	98 %	
S1LM13	<i>Haloarcula sp.</i>	99 %							<i>H. litoreum</i>	99 %	97 %	
S1LM16	<i>Haloterrigena sp.</i>	98 %	<i>Ht. limicola</i>	98 %	98 %					<i>H. terrestre</i>	99 %	97 %
			<i>Ht. hispanica</i>	98 %	98 %					<i>H. californiense</i>	98 %	97 %
S1LM19	<i>Haloterrigena sp.</i>	99 %				S3LM7	<i>Haloterrigena sp.</i>	99 %	<i>Ht. turkmenica</i>	99 %	99 %	
			<i>Natrinema sp.</i>	99 %						<i>Natrinema sp.</i>	97 %	<i>Ht. salina</i>
									<i>Ht. thermotolerans</i>	99 %	97 %	

Tabla 53. Resultados de alineamiento global mediante BLAST de las secuencias parciales y totales del gen del RNAr 16S de las arqueas seleccionadas de La Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).

CEPAS	SEQ 700 NT	% SIM	SEQ 1400NT	% COB	% SIM	CEPAS	SEQ 700 NT	% SIM	SEQ 1400NT	% COB	% SIM
A1BC2	<i>Halorubrum sp.</i>	99 %	<i>H. litoreum</i>	99 %	99 %	A3BC11	<i>Halomicrobium sp.</i>	95 %	<i>H. mukohatei</i>	99 %	99 %
			<i>H. californiense</i>	99 %	98 %					<i>Haloarcula sp.</i>	89 %
			<i>H. ezzemoulense</i>	98 %	99 %	A4BC2	<i>Halorhabdus sp.</i>	92 %	<i>H. utahensis</i>	99 %	92 %
			<i>H. chaoviator</i>	99 %	99 %					<i>Halosimple sp.</i>	92 %
			<i>H. coriense</i>	99 %	99 %		<i>Halomicrobium sp.</i>	91 %			

Tabla 53. Resultados de alineamiento global mediante BLAST de las secuencias parciales y totales del gen del RNAr 16S de las arqueas seleccionadas de La Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).

CEPAS	SEQ 700 NT	% SIM	SEQ 1400NT	% COB	% SIM	CEPAS	SEQ 700 NT	% SIM	SEQ 1400NT	% COB	% SIM
A1BC2			<i>H. xinjiangense</i>	98 %	99 %	A4BC2	<i>Haloarcula sp.</i>	91 %			
			<i>H. trapanicum</i>	99 %	99 %		A4BC7	<i>Halorubrum sp.</i>	99 %		
			<i>H. distributum</i>	99 %	99 %	A4BC16		<i>Haloterrigena sp.</i>	100 %		
			<i>H. ejinoreense</i>	99 %	98 %			<i>Natrinema sp.</i>	100 %		
			<i>H. sodomense</i>	99 %	98 %	S1BC10	<i>Haloterrigena sp.</i>	95 %			
			<i>H. distributum</i>	95 %	99 %			<i>Natrinema sp.</i>	95 %		
			<i>H. tebenquichense</i>	99 %	98 %	S1BC11	<i>Halorubrum sp.</i>	99 %	<i>H. chaoviator</i>	98 %	99 %
			<i>H. terrestre</i>	99 %	98 %				<i>H. ezzemoulense</i>	98 %	99 %
			<i>H. arcis</i>	99 %	97 %				<i>H. xinjiangense</i>	98 %	99 %
			<i>H. ejinoreense</i>	99 %	99 %				<i>H. californiense</i>	99 %	98 %
		<i>H. tebenquichense</i>	99 %	98 %	<i>H. trapanicum</i>				98 %	99 %	
		<i>H. ezzemoulense</i>	99 %	98 %	<i>H. coriense</i>				98 %	99 %	
A2BC5	<i>Halorubrum sp.</i>	99 %	<i>H. chaoviator</i>	99 %	98 %				<i>H. sodomense</i>	98 %	99 %
			<i>H. californiense</i>	99 %	98 %				<i>H. litoreum</i>	98 %	99 %
			<i>H. xinjiangense</i>	98 %	98 %	<i>H. tebenquichense</i>	98 %	98 %			
			<i>H. trapanicum</i>	99 %	98 %	<i>H. distributum</i>	95 %	99 %			
			<i>H. litoreum</i>	99 %	98 %	<i>H. ejinoreense</i>	98 %	98 %			
			<i>H. coriense</i>	99 %	98 %	<i>H. terrestre</i>	98 %	97 %			
			<i>H. sodomense</i>	99 %	97 %	<i>H. arcis</i>	98 %	97 %			
			<i>H. arcis</i>	99 %	97 %						
					<i>Natrinema sp.</i>	99 %					

Tabla 53. Resultados de alineamiento global mediante BLAST de las secuencias parciales y totales del gen del RNAr 16S de las arqueas seleccionadas de La Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).

CEPAS	SEQ 700 NT	% SIM	SEQ 1400NT	% COB	% SIM	CEPAS	SEQ 700 NT	% SIM	SEQ 1400NT	% COB	% SIM
A2BC5			<i>H. terrestre</i>	99 %	97 %	S2BC20	<i>H. trapanicum</i>	99 %			
			<i>H. distributum</i>	99 %	97 %			<i>Haloterrigena sp.</i>	97 %		
			<i>H. marismortui</i>	99 %	99 %	S2BC27	<i>Halorubrum sp.</i>	98 %			
			<i>H. hispanica</i>	99 %	99 %			<i>Natrinema sp.</i>	99 %		
			<i>H. amylolytica</i>	99 %	99 %	S3BC10	<i>H. trapanicum</i>	99 %			
							<i>Haloterrigena sp.</i>	97 %			
A2BC9	<i>Haloarcula sp.</i>	99 %	<i>H. argentinensis</i>	99 %	99 %	S3BC11	<i>Haloferax sp.</i>	99 %	<i>Hf.mediterranei</i>	99 %	99 %
			<i>H. quadrata</i>	99 %	99 %			<i>Hf.mucosum</i>	99 %	99 %	
			<i>H. japonica</i>	99 %	99 %			<i>Hf.alexandrinus</i>	99 %	98 %	
			<i>H. argentinensis</i>	99 %	99 %			<i>Hf.lucentense</i>	99 %	98 %	
			<i>H. vallismortis</i>	99 %	99 %			<i>Hf.prahovense</i>	99 %	98 %	
			<i>H. salaria</i>	99 %	98 %			<i>Hf.volcanii</i>	99 %	98 %	
			<i>H. amylolytica</i>	99 %	98 %			<i>Hf.denitrificans</i>	99 %	98 %	
		<i>H. tradensis</i>	99 %	98 %							
A2BC10	<i>Natrinema sp.</i>	99 %				S4BC3	<i>Halorubrum sp.</i>	99 %			
A3BC2	<i>Natrinema sp.</i>	99 %	<i>Nt. pallidum</i>	99 %	99 %	S4BC8	<i>Halorubrum sp.</i>	98 %	<i>H. cibi</i>	99 %	99 %
	<i>H.trapanicum</i>	99 %	<i>Nt. gari</i>	99 %	99 %			<i>H. alkaliphilum</i>	99 %	97 %	
	<i>Haloterrigena sp.</i>	97 %	<i>Nt. altunense</i>	99 %	99 %			<i>H. tibetense</i>	99 %	97 %	
			<i>Nt. versiforme</i>	99 %	98 %			<i>H. lipolyticum</i>	99 %	97 %	
			<i>Nt. pellirubrum</i>	99 %	97 %			<i>H. kocurii</i>	99 %	97 %	
A3BC7	<i>Haloarcula sp.</i>	99 %				S4BC12	<i>Haloterrigena sp.</i>	100 %			

Tabla 54. Resultados de alineamiento global mediante BLAST de las secuencias parciales y totales del gen del RNAr 16S de las bacterias seleccionadas de Fuente de Piedra (Málaga).

CEPAS	SEQ. 700 NT	% SIM	SEQ. 1400NT	% COB	% SIM	CEPAS	SEQ. 700 NT	% SIM	SEQ. 1400NT	% COB	% SIM
A1FP11	<i>Idiomarina sp.</i>	99 %				A2FP19	<i>Pseudomonas sp.</i>	99 %			
A1FP12	<i>Paraliobacillus sp.</i>	99 %	<i>P. quinghaiensis</i>	100 %	99 %		<i>Halovibrio sp.</i>	99 %			
A1FP22	<i>Halobacillus sp.</i>	99 %					<i>Halospina sp.</i>	97 %			
A2FP15	<i>Halomonas sp.</i>	98 %	<i>H. aquamarina</i>	99 %	98 %		<i>Salicola sp</i>	97 %			
	<i>Pseudomonas sp.</i>	98 %	<i>H. variabilis</i>	99 %	98 %	S2FP15	<i>Virgibacillus sp.</i>	99 %	<i>V. litoralis</i>	100 %	99 %
			<i>H. gomseomensis</i>	99 %	98 %				<i>V. salinus</i>	97 %	99 %
			<i>H. venusta</i>	99 %	97 %				<i>V. byunsanensis</i>	100 %	98 %
			<i>H. alkaliphila</i>	98 %	97 %				<i>V. subterraneus</i>	100 %	98 %
			<i>H. janggokensis</i>	99 %	97 %				<i>V. carmonensis</i>	100 %	98 %
			<i>H. meridiana</i>	99 %	97 %				<i>V. necropolis</i>	100 %	97 %
			<i>H. aquamarina</i>	99 %	97 %				<i>V. zhanjiangensis</i>	100 %	98 %
			<i>H. frigididi</i>	98 %	97 %				<i>V. halodenitrificans</i>	100 %	97 %
									<i>V. salarius</i>	100 %	97 %
									<i>V. marismortur</i>	100 %	97 %
									<i>V. olivae</i>	100 %	97 %

Tabla 55. Resultados de alineamiento global mediante BLAST de las secuencias parciales y totales del gen del RNAr 16S de las bacterias seleccionadas de La Malahá (Granada).

CEPAS	SEQ. 700 NT	% SIM	SEQ 1400NT	% COB	% SIM	CEPAS	SEQ 700 NT	% SIM	SEQ 1400NT	% COB	% SIM
A1LM10	<i>Salicola sp.</i>	99 %				A2LM23	<i>Chromohalobacter sp.</i>	99 %			
	<i>Halovibrio sp.</i>	99 %					<i>Halomonas sp.</i>	99 %			
A1LM14	<i>Halobacillus sp.</i>	99 %				S1LM4	<i>Salinibacter sp.</i>	99 %			
	<i>Staphylococcus sp.</i>	99 %				S1LM8	<i>Alkalobacillus sp.</i>	99 %	<i>A. halophilus</i>	99 %	99 %
A1LM24	<i>Chromohalobacter sp.</i>	99 %			<i>A. salilacus</i>		95 %	99 %			
A1LM25	<i>Halobacillus sp.</i>	99 %			<i>A. flavidus</i>		98 %	98 %			
	<i>Staphylococcus sp.</i>	99 %			S1LM21	<i>Halomonas sp.</i>	99 %	<i>H. elongata</i>	100 %	100 %	
A1LM26	<i>Halospina sp.</i>	99 %				<i>H.eurihalina</i>	100 %	99 %			
	<i>Halovibrio sp.</i>	98 %				<i>H. sinaiensis</i>	100 %	99 %			
	<i>Salicola sp.</i>	97 %			S1LM30	<i>Salinicoccus sp.</i>	99 %				
A1LM28	<i>Chromohalobacter sp.</i>	99 %			S2LM6	<i>Salicola sp.</i>	99 %				
	<i>Halomonas sp.</i>	98 %			<i>Halovibrio sp.</i>	98 %					
A1LM30	<i>Salinicoccus sp.</i>	99 %			S2LM18	<i>Salicola sp.</i>	99 %				
A2LM1	<i>Salicola sp.</i>	99 %			<i>Halovibrio sp.</i>	98 %					
	<i>Halovibrio sp.</i>	97 %			S3LM13	<i>Halobacillus sp.</i>	99 %				
A2LM10	<i>Chromohalobacter sp.</i>	99 %			S3LM15	<i>Halovibrio sp.</i>	98 %				
	<i>Halomonas sp.</i>	99 %				<i>Halospina sp.</i>	98 %				
A2LM19	<i>Halovibrio sp.</i>	99 %				<i>Salicola sp.</i>	97 %				
	<i>Salicola sp.</i>	97 %									

Tabla 56. Resultados de alineamiento global mediante BLAST de las secuencias parciales y totales del gen del RNAr 16S de las bacterias seleccionadas de Santa M^a de Jesús (Chiclana, Bahía de Cádiz).

CEPAS	SEQ. 700 NT	% SIM	SEQ. 1400NT	% COB	% SIM	CEPAS	SEQ. 700 NT	%SIM	SEQ. 1400NT	%COB	%SIM
A1BC3	<i>Halomonas sp.</i>	99 %				A3BC16	<i>Pseudomonas sp.</i>	99 %			
A1BC5	<i>Chromohalobacter sp.</i>	99 %					<i>Halovibrio sp.</i>	99 %			
	<i>Halomonas sp.</i>	99 %				A4BC6	<i>Halomonas sp.</i>	99 %			
A2BC18	<i>Halomonas sp.</i>	99 %				S2BC8	<i>Salicola sp.</i>	99 %			
A2BC21	<i>Halobacillus sp.</i>	99 %				S2BC28	<i>Halomonas sp.</i>	99 %			
A3BC4	<i>Pseudomonas sp.</i>	99 %				S3BC8	<i>Salicola sp.</i>	99 %			
	<i>Halovibrio sp.</i>	99 %				S4BC9	<i>Thalassobacillus sp.</i>	99 %			
A3BC6	<i>Salicola sp.</i>	99 %	<i>S. maresensis</i>	100 %	99 %						
			<i>S. salis</i>	99 %	99 %						

Para la determinación de la afiliación taxonómica de las cepas seleccionadas para el presente estudio, se secuenció parcialmente el gen del RNAr 16S, ya que basándonos en estudios que indican, que la ubicación filogenética de un microorganismo a nivel de especie no requiere necesariamente la secuenciación completa de dicho gen. De hecho, aunque existen posiciones filogenéticamente informativas a lo largo de todo el gen, la mayor variabilidad se concentra en las primeras 500 pares bases, correspondientes al extremo 5'. Generalmente, esta secuencia de 500 pares bases será suficiente para la ubicación filogenético de un aislado (Patel, 2001, Patel, et al., 2000, Rogall, et al., 1990).

El RNA ribosómico 16S se ha considerado uno de los principales métodos para discernir las relaciones filogenéticas de los procariontes, a nivel de especie y/o a nivel de cepa. Es una molécula primitiva, funcionalmente constante, distribuida universalmente y bien conservada a través de un amplio rango filogenético. Presenta regiones que están totalmente conservadas, aproximadamente el 10 % de las bases del RNAr 16S, las cuales sirvieron para establecer las relaciones parentales entre los microorganismos; mientras que existen otras regiones variables que proporcionan las diferencias entre microorganismos diferentes (Baker, et al., 2003). El uso de los fragmentos del RNAr 16S sirven para clasificar las afinidades taxonómicas entre un extenso rango de taxa y como una herramienta poderosa para determinar la diversidad genética de muestras ambientales (Sahm, et al., 2013).

La secuencia parcial del gen RNAr 16S jerarquiza a las **arqueas** aisladas y parcialmente secuenciadas dentro de especies de diferentes géneros de la familia *Halobacteriaceae* siendo descritos en Fuente de Piedra: un 46 % *Halorubrum* sp.; 13.3 %, *Halobellus* sp.; 10 %, *Haloterrigena* sp.; 6.7 %, *Haloferax* sp.; 6.7 %, *Halogeometricum* sp.; 3.3 %, *Haloarcula* sp.; 3.3 %, *Halobacterium* sp.; 3.3 %, *Halovivax* sp.; 6.7 %, *Natrinema* sp.. Por otro lado, La Malahá estaba compuesta por 5 géneros: *Halorubrum* sp. (31.5 %), *Haloterrigena* sp. (25 %), *Haloarcula* sp. (25 %), *Halobacterium* sp. (12.5 %), *Natrinema* sp. (6.25 %). Y en el caso de Bahía de Cádiz se

encontraron siete géneros los que describieron la microbiota cultivable de arqueas de la zona: *Halorubrum* sp. (36.8 %), *Haloterrigena* sp. (21 %), *Natrinema* sp. (15.8 %), *Haloarcula* sp. (10.5 %), *Haloferax* sp. (5.3 %), *Halomicrobium* sp. (5.3 %), *Halorhabdus* sp. (5.3 %).

En lo que respecta a la variabilidad **bacteriana** fue mayor en cuanto a filos encontrados. En el humedal de Málaga, las *Proteobacteria* (dentro de la clase γ -*Proteobacteria*) y *Firmicutes* abarcan las especies cultivables recogidas, componiéndose de forma bastante homogénea por especies de los generos: *Pseudomonas* sp. (16.6 %), *Halomonas* sp. (16.6 %), *Idiomarina* sp. (16.6 %), *Halobacillus* sp. (16.6 %), *Paraliobacillus* sp. (16.6 %) y *Virgibacillus* sp. (16.6 %). Por otra parte nueve géneros diferentes en la atalasalina de Granada (*Salicola* sp. (26.3 %), *Pseudomonas* sp. (5.2 %), *Halomonas* sp. (52 %), *Chromohalobacter* sp. (21 %), *Halospina* sp. (5.2 %); *Salinibacter* sp. (5.2 %), *Salinicoccus* sp. (10.5 %), *Alkalibacillus* sp. (5.2 %) y *Halobacillus* sp. (15.8 %) pertenecientes a los filos *Proteobacteria* (en concreto la clase γ -*Proteobacteria*), *Bacteroidetes*, *Firmicutes*. Y seis géneros de la salina marina gaditana pertenecientes a los filos *Proteobacteria* (clase γ -*Proteobacteria*) y *Firmicutes* (*Halomonas* sp. (27.3 %), *Salicola* sp. (27.3 %), *Pseudomonas* sp. (18.2 %), *Chromohalobacter* sp. (9.1 %), *Halobacillus* sp. (9.1 %), *Thalassobacillus* sp. (9.1 %)).

Ante los resultados anteriores, resaltamos que ambos ambientes andaluces vienen descritos por una proporción mayor de arqueas que de bacterias. En concreto, se observa que la cantidad de microorganismos recogida en Fuente de piedra destaca por ser más rica en el dominio de las arqueas, debido principalmente a que los valores de los parámetros fisicoquímicos presentes en el periodo de muestreo eran más favorables a la presencia de arqueas, es decir, presentaban altas salinidades y su pH no llegaba a ser tan alcalino como por ejemplo en La Malahá. Los valores físico-químicos de salinidad y alcalinidad son caracteres definitorios para la presencia de arqueas o bacterias (Anton, et al., 2000, Mutlu, et al., 2008).

Es destacable, que en la composición de las salinas andaluzas, todas las secuencias procedentes de arqueas se agrupan dentro del orden Halobacteriales (filo Euryarchaeota). Encontramos géneros como: *Halorubrum* sp., *Haloterrigena* sp., *Natrinema* sp. y *Haloarcula* sp., representados en distintos porcentajes en las tres salinas. Siendo *Halorubrum* el género que en mayor proporción se halla, representa un 46 % en Fuente de Piedra, 31 % en La Malahá y 37 % en Bahía de Cádiz. Y *Natronomomas* también se encuentra ampliamente distribuido en los suelos alcalinos y salinos (Valenzuela-Encinas, et al., 2008). Es importante reseñar el haber conseguido aislar una especie de *Halorhabdus* sp. en las salinas de Bahía de Cádiz, a pesar del al lento y difícil crecimiento que presenta este género.

Es destacable la presencia de un mayor número de géneros bacterias dentro de 3 filos diferentes representados en La Malahá (9 géneros), frente a los 6 géneros (de 2 filos) presentes en las salinas de Málaga y de Cádiz, también explicado por las condiciones más alcalinas a las presentes en Fuente de Piedra. Dentro de la variabilidad microbiana de los tres ambientes, comparte una microbiota común: el género *Halobacillus* sp., perteneciente al filo *Firmicutes* y *Halomonas* sp., dentro del filo γ -*Proteobacteria*.

Alcanzado este punto, las secuencias totales (1400 - 1500 nt) nos darán una información más acertada sobre la existencia de especies nuevas. Para que una secuencia completa del 16S rRNA que se compara con secuencias pertenecientes a especies validadas e introducidas en la base de datos BLAST, se considere una nueva especie, ésta debe de presentar una semejanza inferior al 97 %. De manera que podría ser descrita y nombrada novel, acogiendo el nombre del género en donde se englobe. Si bien si el porcentaje es superior al 97 %, esta especie posee posibilidades de ser nueva, pero para ello debe de someterse a la hibridación DNA-DNA. Método por el cual se realiza una comparación de la secuencia bajo estudio con todas aquellas especies con las que posean una similitud igual o superior a 97 %. Conforme a lo expuesto en las tablas de la 43 a la 48, afirmamos que **Fuente de Piedra**

presenta 16 cepas de arqueas (A1FP7, A1FP20, A2FP3, A2FP6, A2FP11, A3FP2, A3FP22, S1FP2, S1FP4, S1FP8, S1FP10, S2FP2, S2FP3 S2FP8, S2FP14 y S2FP25) y 3 de bacterias (A1FP12, A2FP15 y S2FP15) que deberán de ser sometidas al método de hibridación DNA-DNA para determinar qué especie son, o si por el contrario nos encontramos ante una nueva especie a describir. En **La Malahá** son 10 las cepas que deben ser hibridadas: 8 arqueas (A1LM2, A1LM9, A1LM21, S1LM16, S2LM9, S2LM21, S3LM6 y S3LM7) y 2 bacterias (S1LM8 y S1LM21). Y en Santa M^a de Jesús, **Bahía de Cádiz**, se deben de hibridar 9 cepas: 8 arqueas (A1BC2, A2BC5, A2BC9, A3BC2, A3BC11, S1BC11, S3BC11 y S4BC12) y 1 bacteria (A3BC6). No obstante, la secuencia completa de A4BC2 desvela la presencia de una nueva especie de *Halorhabdus* sp. Las dificultades que presenta esta cepa para cultivarla y así poder proseguir en la descripción de una nueva especie perteneciente al este género, han hecho que a día de hoy no podamos hablar de la descripción de una nueva especie. No obstante, se puede confirmar el aislamiento de *Halorhabdus* sp. basándose en los resultados de la secuencia del gen 16S rRNA, las fotografías de microscópio electrónico de transmisión y el perfil lipídico obtenido por TLC bidimensional.

Análisis filogenético basado en las secuencias del gen del 16S

rRNA

La utilización de programas informáticos nos permitió la construcción de árboles filogenéticos que reflejan gráficamente la genealogía molecular de las distintas cepas, mostrando su posición evolutiva en el contexto de los organismos tipo comparados.

En nuestro estudio realizamos el agrupamiento de las secuencias parciales del gen del RNAr 16S de los organismos objeto de estudio y de las cepas con quienes presentaban similitud según el alineamiento global mediante BLAST utilizando el programa MEGA 6 (Kumar, et al., 2004), mediante ClustalW2 (Chenna, et al., 2003, Larkin, et al., 2007, Patel, et al., 2012). La reconstrucción filogenética de las

secuencias parciales se realizó utilizando el método “Maximum Parsimony” usando el valor bootstrap basado en 1000 replicaciones, de manera que se tiene en cuenta el gasto evolutivo menor que tiene que darse para generar un árbol. Se tienen también en cuenta las mutaciones (Takahashi & Nei, 2000). Los árboles filogenéticos se observan en las figuras 41, 22, 43, 44, 45 y 46.

En el caso de los árboles filogenéticos de bacterias fueron realizados con 900 nucleótidos debido a que las regiones más conservadas se encuentran entre las posiciones 778 y 798 (Baker, et al., 2003) lo cual permita que en la creación de árboles mediante el MEGA 6, no se produzca una distorsión importante con respecto a las relaciones parentales entre las cepas seleccionadas y las validadas.

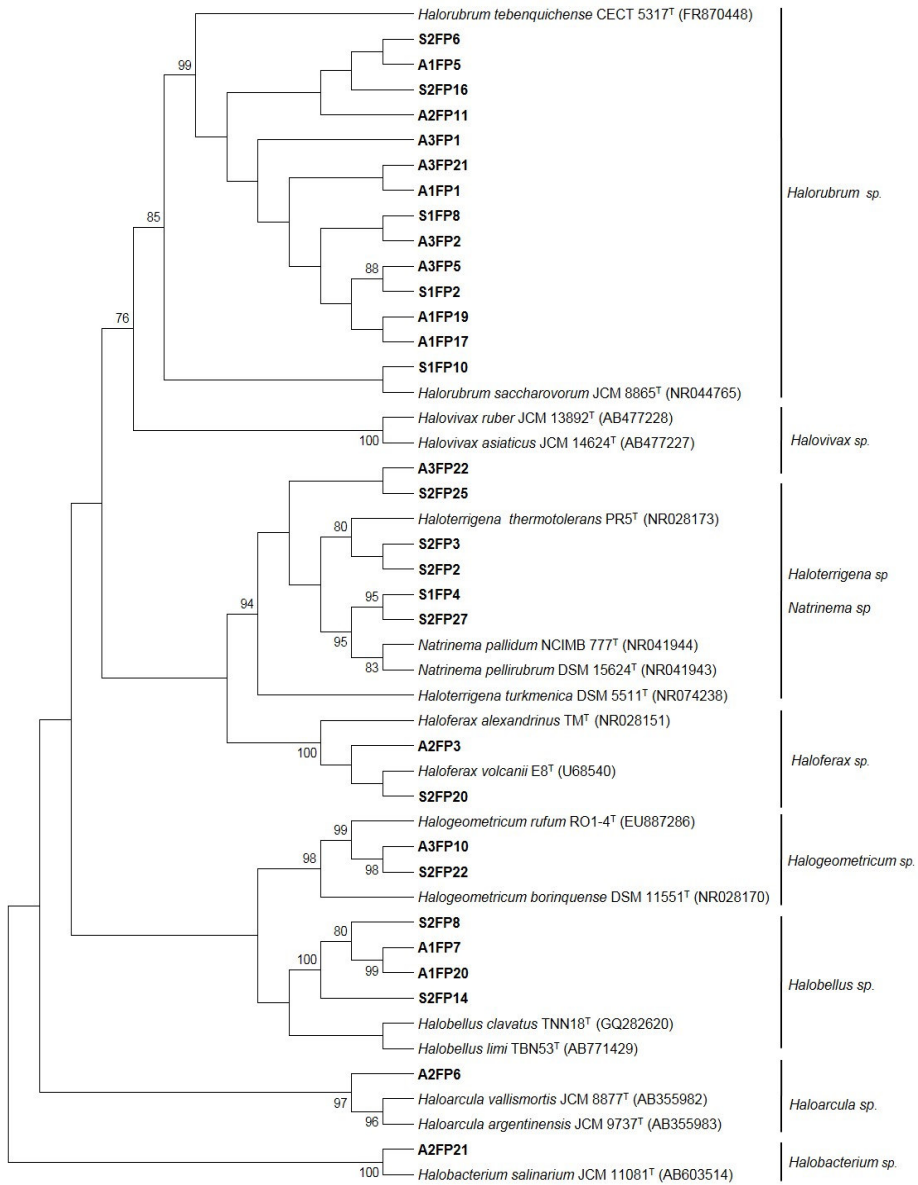


Fig. 41. Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen del RNAr 16S de las arqueas en estudio y las diferentes especies de colección válidamente descritas. Fuente de Piedra (Málaga).

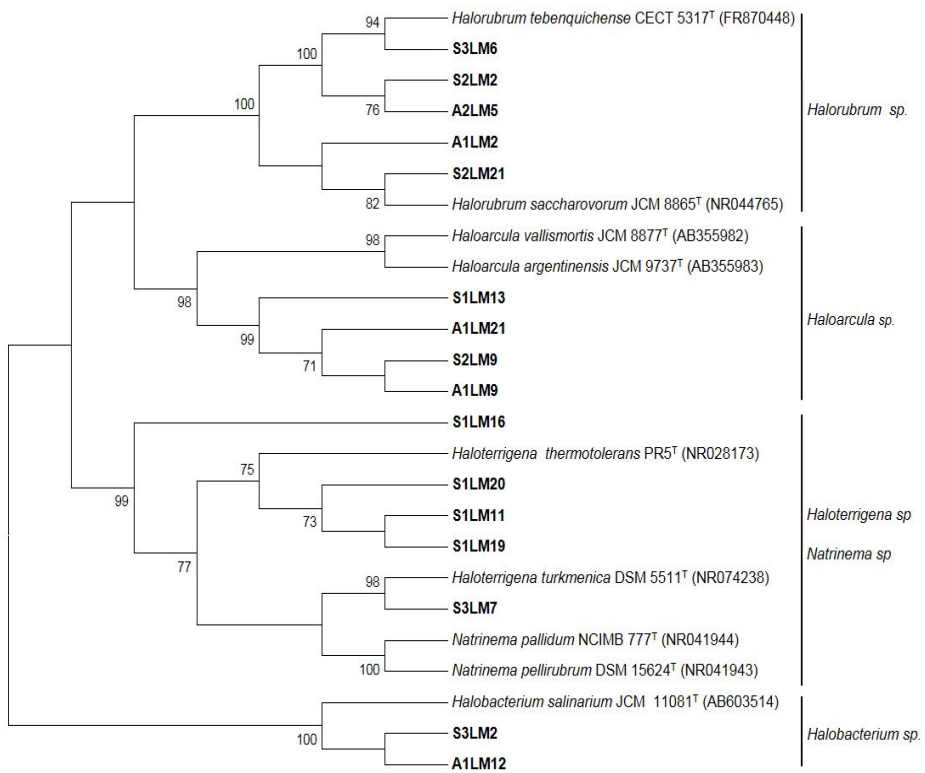


Fig. 42. Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen del RNAr 16S de las arqueas en estudio y las diferentes especies de colección válidamente descritas en La Malahá (Granada).

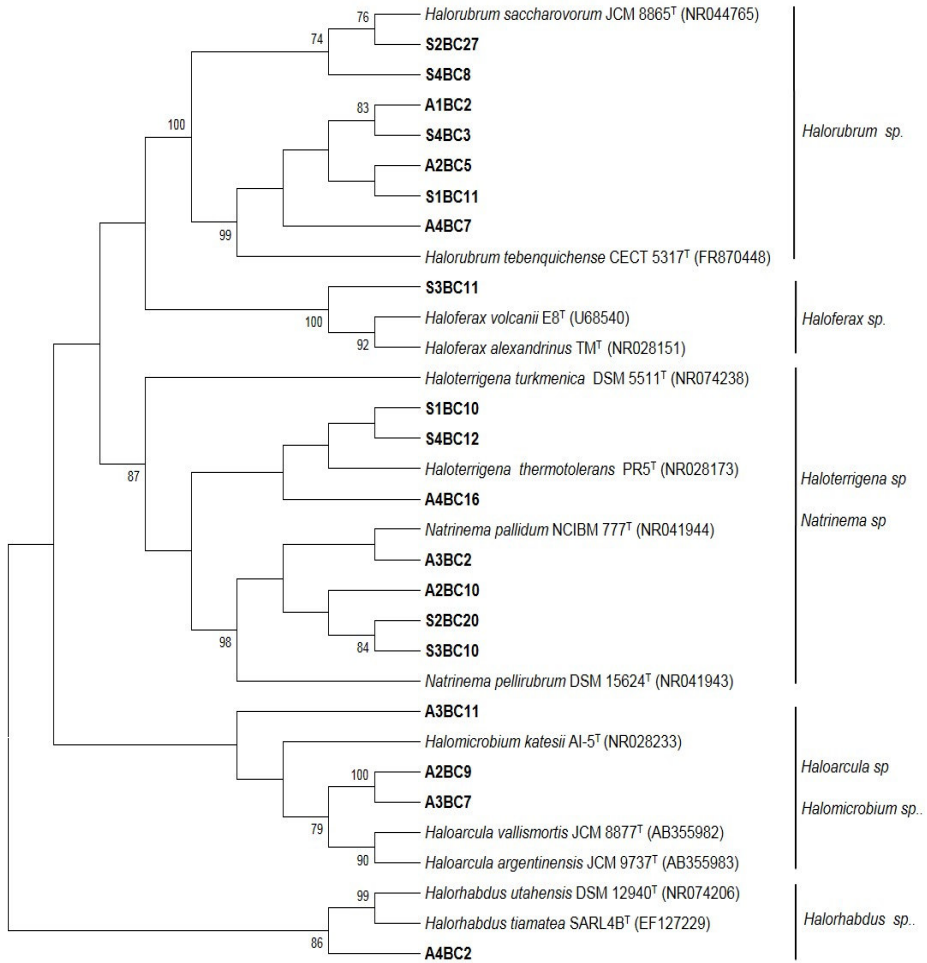


Fig. 43. Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen del rRNA 16S de las arqueas en estudio y las diferentes especies de colección válidamente descritas. Santa M^a de Jesús (Chiclana, Cádiz).

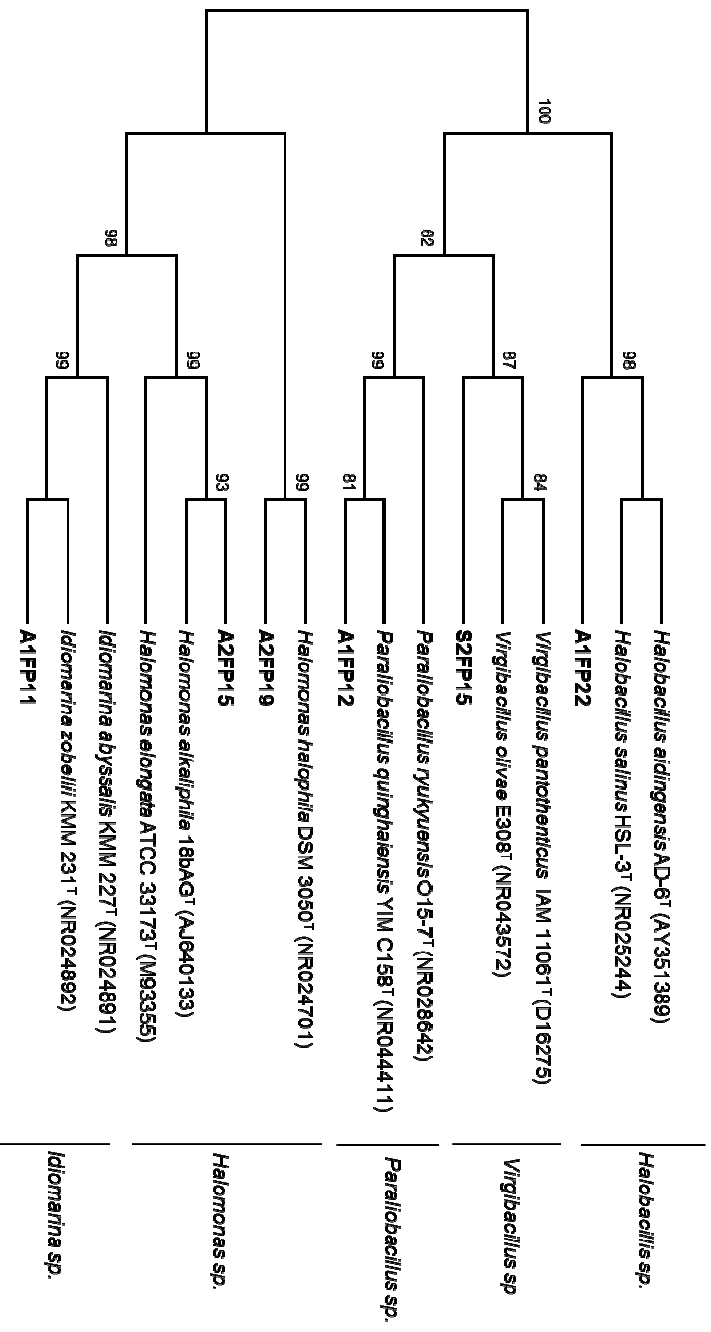


Fig. 44. Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen del rRNA 16S de las cepas bacterianas en estudio y las diferentes especies de colección válidamente descritas. Fuente de Piedra (Malaga).

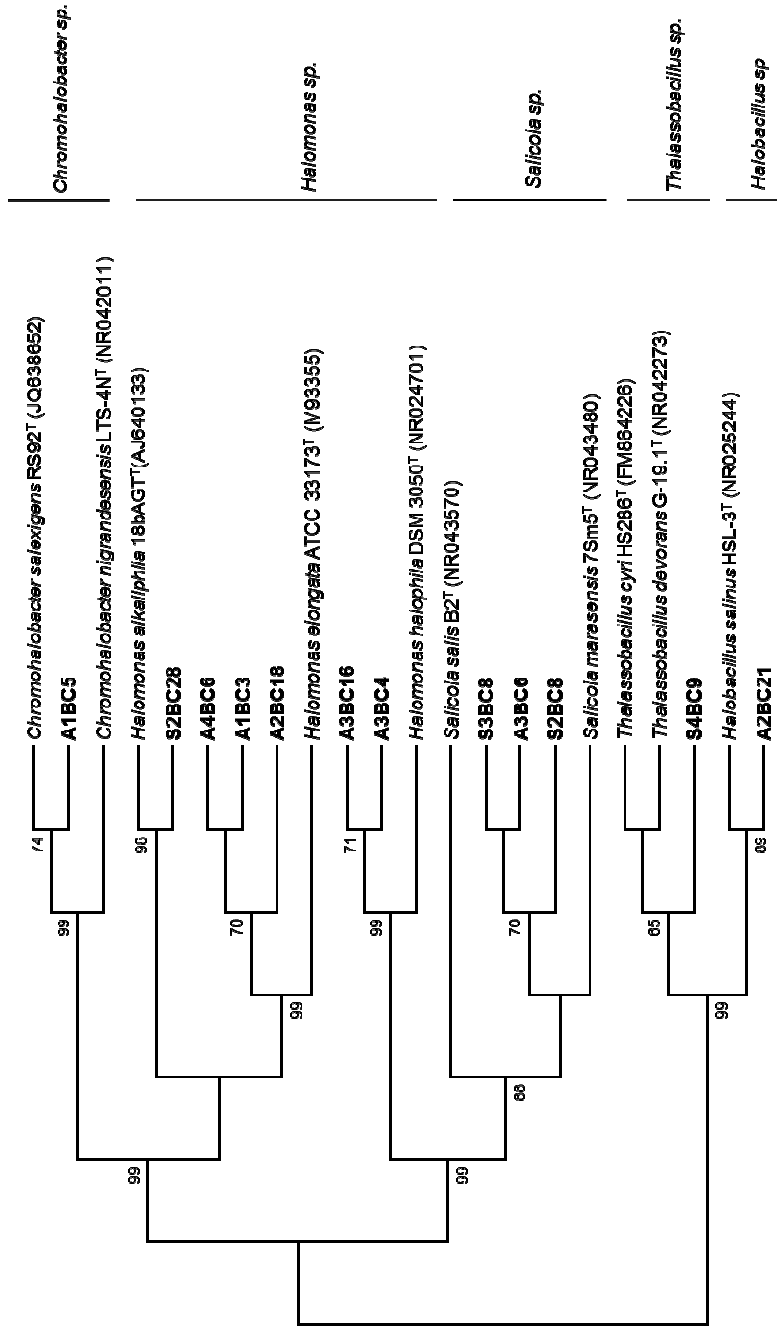


Fig. 45. Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen del rRNA 16S de las cepas bacterianas en estudio y las diferentes especies de colección válidamente descritas. Santa Mía de Jesús (Chiclana, Cádiz).

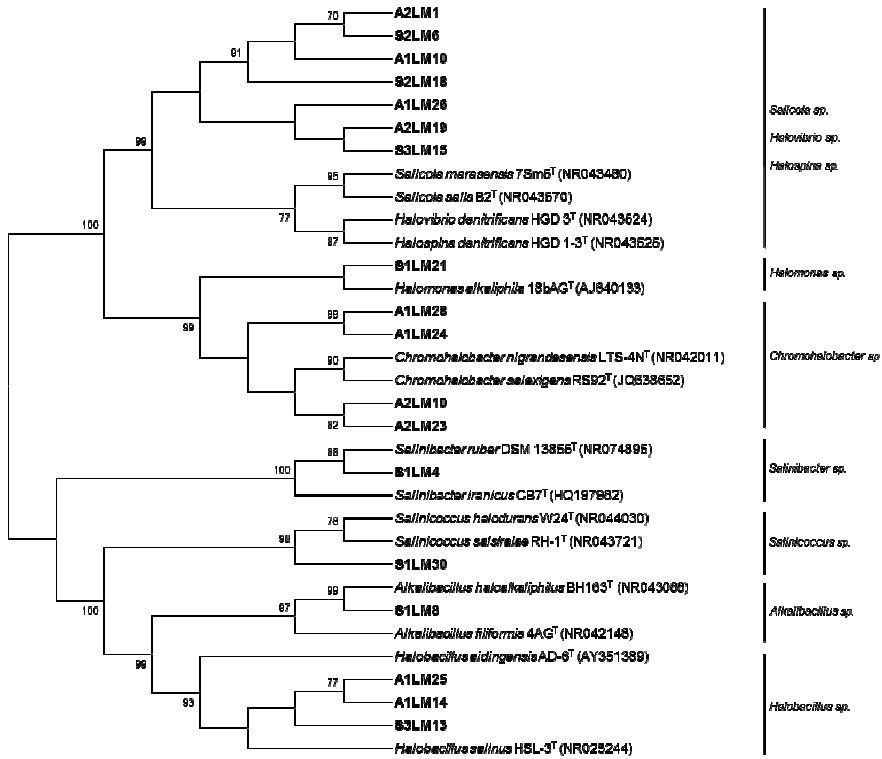


Fig. 46. Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen del rRNA 16S de las cepas bacterianas en estudio y las diferentes especies de colección válidamente descritas en La Malincha (Guatemala).

Tras el análisis de las secuencias parciales, se seleccionaron aquellas que poseen una similitud baja con secuencias insertadas en la base de datos BLAST, y que les permitía poseer una alta probabilidad de ser una nueva especie. A partir de estas secuencias de aproximadamente 1400-1500 pares de bases, se crean arboles filogenéticos utilizando el método “Neighbour-Joining”, en donde la comparación es más simple ya que se realiza de 2 a 2 (Saitou & Nei, 1987, Takahashi & Nei, 2000), lo que permite realizar la comparación fenética creando un algoritmo que genera la similitud en base a la distancia, siendo el modelo Jukes-Cantor de Soete quien

genera las distancias (Jukes & Cantor, 1969). Las distancias y el agrupamiento se determinaron con el método de "Maximum Parximony" usando el valor bootstrap basado en 1000 replicaciones. Los arboles filogenéticos obtenidos con las secuencias totales nos dan un visión más real de las relaciones que poseen nuestras cepas bajo estudio, así como, se explica el porcentaje de semejanza en base a la distancia que poseen con las cepas que posteriormente deberán ser hibridadas. Los árboles de las figuras del 47 a la 52 han sido creados por el método "Neighbour-Joining". Las ramas de los árboles creados por este método fueron comparadas con los árboles creados a partir de los métodos de "Maximun-Parximony" y de "Maximun-Likelihood" (Figuras mostradas en Anexos). Esta comparación corrobora la estabilidad de las ramas que generan el árbol, confirmando la veracidad de los mismos.

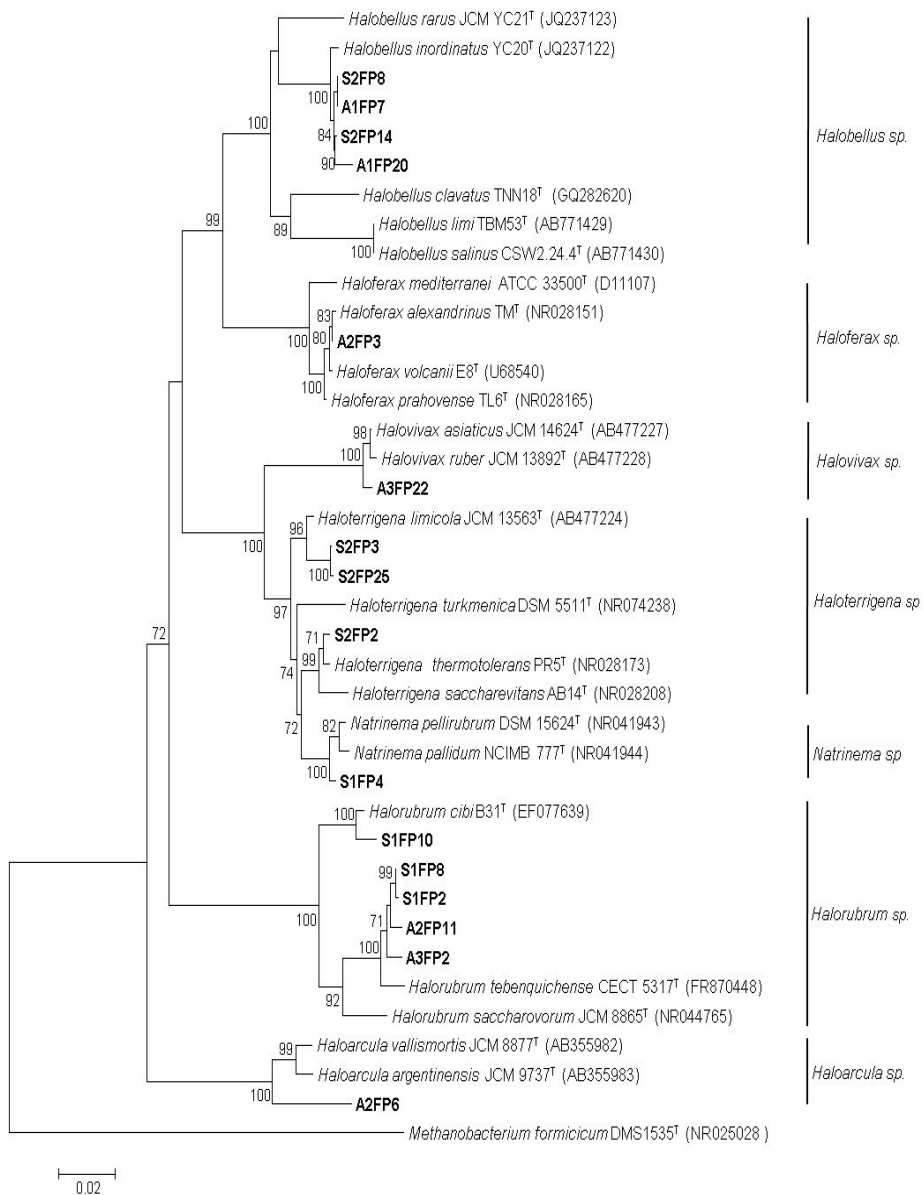


Fig. 47. Árbol filogenético de las secuencias totales del gen del RNAr 16S de las arqueas en estudio y las diferentes especies de colección válidamente descritas. Fuente de Piedra (Málaga).

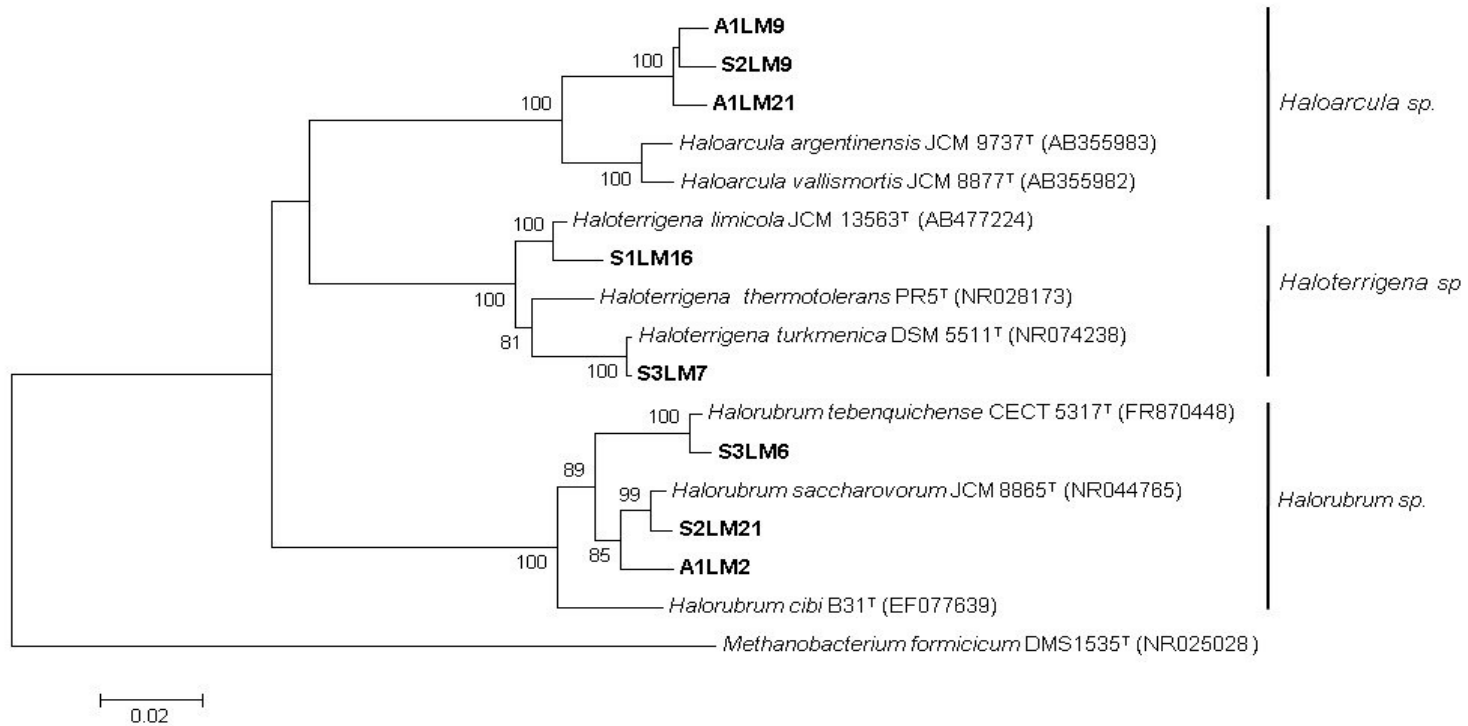


Fig. 48. Árbol filogenético de las secuencias totales del gen del rRNA 16S de las arqueas en estudio y las diferentes especies de colección válidamente descritas. La Malahá (Granada).

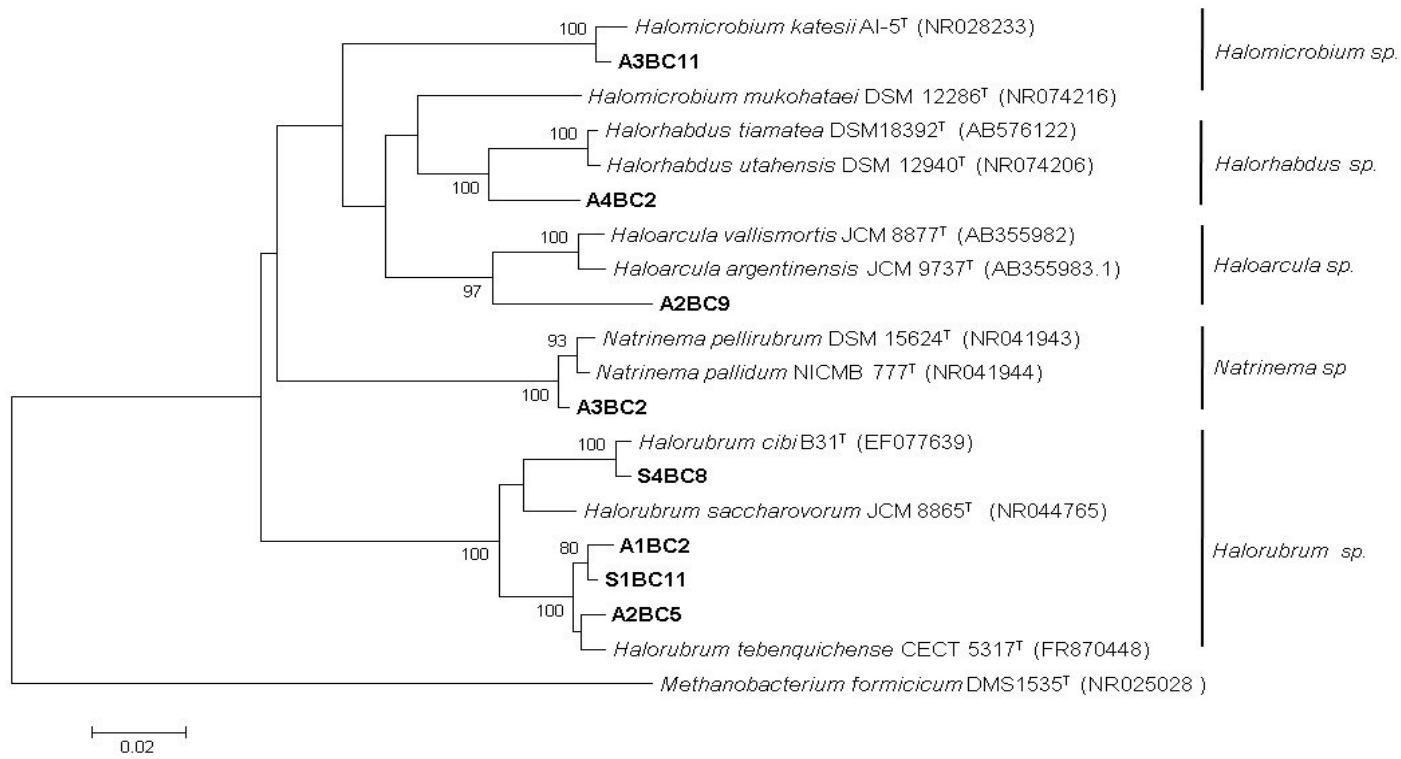


Fig. 49. Árbol filogenético de las secuencias totales del gen del RNAr 16S de las arqueas en estudio y las diferentes especies de colección válidamente descritas. Santa M^a de Jesús (Bahía de Cádiz).

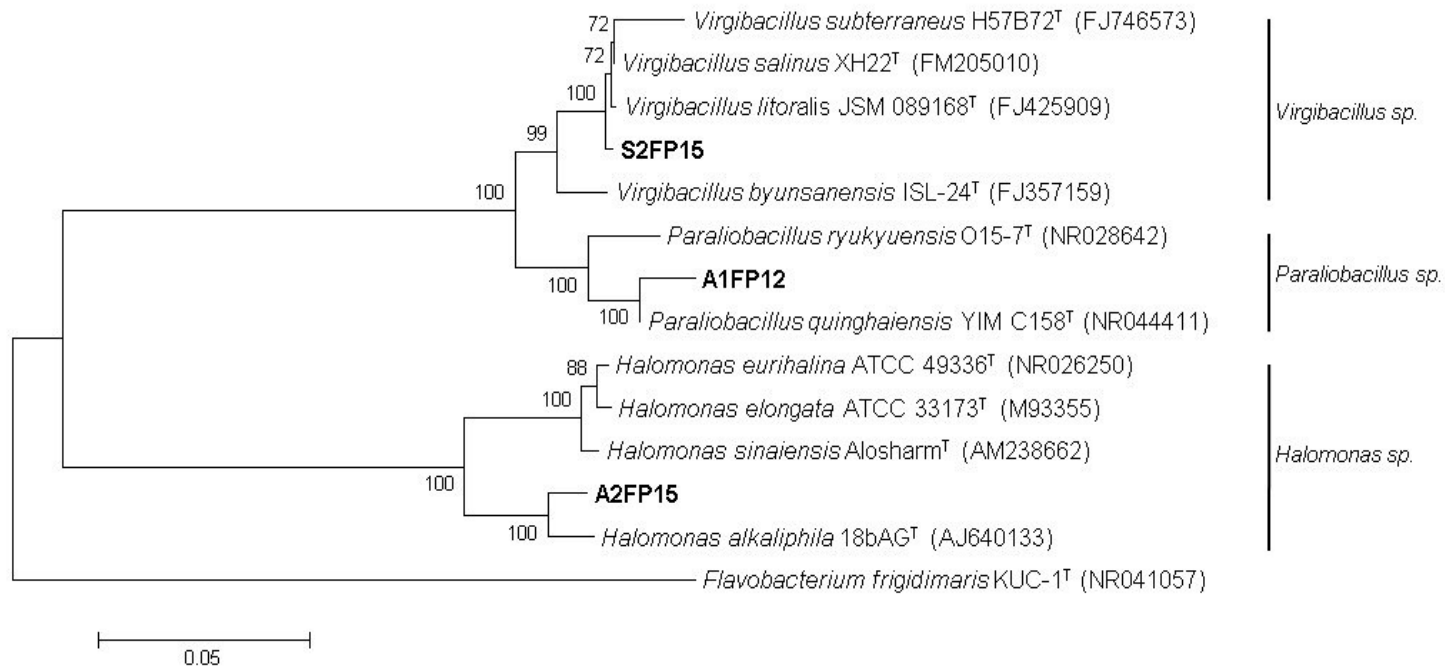


Fig. 50. Árbol filogenético de las secuencias totales del gen del RNAr 16S de las bacterias en estudio y las diferentes especies de colección válidamente descritas. Fuente de Piedra (Málaga).

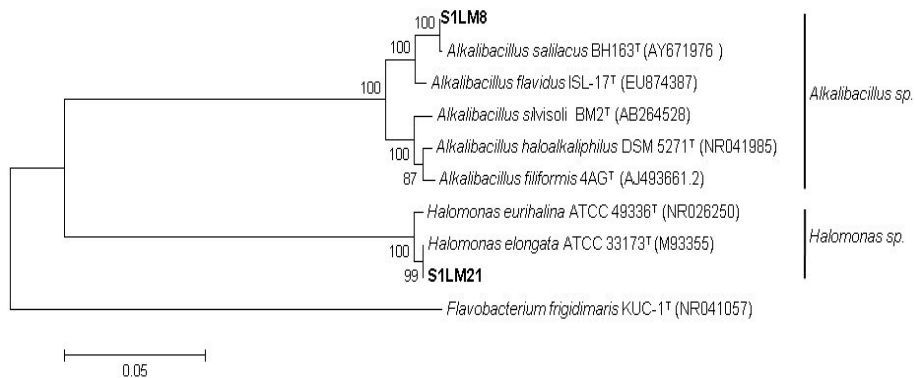


Fig. 51. Árbol filogenético de las secuencias totales del gen del RNAr 16S de las bacterias en estudio y las diferentes especies de colección válidamente descritas. La Malahá (Granada).

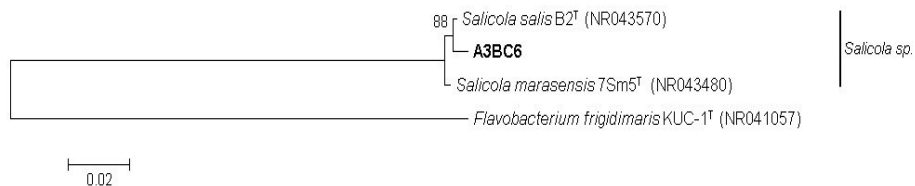


Fig. 52. Árbol filogenético de las secuencias totales del gen del RNAr 16S de las bacterias en estudio y las diferentes especies de colección válidamente descritas. Santa Mª de Jesús (Bahía de Cádiz).

2.3.3. Hibridación DNA-DNA

Los resultados de hibridación DNA-DNA (Ziemke, et al., 1998), se obtuvieron mediante la técnica inmunoenzimática no radiactiva (ELISA), marcando el DNA de las cepas pendientes de asignación a nivel de especie y de aquellas que nos sirvieron como valores de referencia para establecer el rango de unión de relativa DNA-DNA (BR), en cada caso.

A partir del DNA marcado, se realizó la hibridación, de acuerdo a la posición de las cepas en el árbol filogenético completas y a los resultados obtenidos en el alineamiento global mediante BLAST que se han mostrado en las tablas 49, 50, 51, 52, 53 y 54. Los ensayos de hibridación DNA-DNA se realizaron por duplicado y los resultados obtenidos se trataron estadísticamente para ver la viabilidad del método en cada caso. El valor límite del 70 % sirve para delimitar la identidad de una especie (Meier-Kolthoff, et al., 2013).

Las hibridaciones realizadas, los datos de BR y RBR entre los DNAs de las cepas marcadas y el análisis de estos datos se describen a continuación:

Resultados de la hibridación de la cepas S2FP14, A1FP20, A1FP7 y S2FP8

A1FP20, A1FP7, S2FP8 y S2FP14 son arqueas que pertenecen a la salina de Fuente de Piedra, y se localizaban en el fenón A, las cepas S2FP8 y A1FP7, en el Fenón C, la cepa A1FP20, y en el Fenón D, la cepa S2FP14, según los resultados de taxonomía numérica (Figura 32). El resultado de las pruebas bioquímicas, nutricionales, de morfología, etc., indica la semejanza que presentan y demuestran con el análisis comparativo de sus secuencias totales. Estas cuatro cepas fueron identificadas por sus secuencias totales como posibles nuevas especies del género *Halobellus*, ya que el porcentaje de semejanza con *Halobellus salinus*, *Halobellus clavatus*, *Halobellus limi* y *Halobellus rarus* eran inferiores al 97 %. Sin embargo, el

valor de similitud para *Halobellus inordinatus* era superior al 97%, por lo que se debe de realizar la hibridación de las cepas procedentes de Fuente de Piedra con *Halobellus inordinatus*.

Hibridación marcando *Halobellus inordinatus*

A1FP7, A1FP20, S2FP8 y S2FP14 son cepas con una similitud superior al 97 % (99.52 %, 97 %, 99.46% y 99.46 %, respectivamente) con *Halobellus inordinatus* según la comparación filogenética realizada por el CLUSTALW2. Por ello, se realizó una hibridación cuya cepa marcada fue *Halobellus inordinatus*. En la tabla 57.A se resume la hibridación realizada y los resultados se observan en la tabla 57.B.

Tabla 57.A. Hibridación de la cepa S2FP14.

CEPAS MARCADAS	HIBRIDACIÓN CON
<i>Halobellus inordinatus</i> JCM 18648 ^{T*}	A1FP7 A1FP20 S2FP8 S2FP14 <i>Salicola marasensis</i> CECT 7107 ^T

Tabla 57.B. Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada S2FP14*, las cepas seleccionadas y la cepa de referencia.

Cepas	BR%	RBR%
<i>Halobellus inordinatus</i> *- <i>Halobellus inordinatus</i>	2.43 %	100 %
<i>Halobellus inordinatus</i> *- A1FP7	1.44 %	59.29 %
<i>Halobellus inordinatus</i> *- A1FP20	1.15 %	47.47 %
<i>Halobellus inordinatus</i> *- S2FP14	1.23 %	50.98 %
<i>Halobellus inordinatus</i> *- S2FP8	1.30 %	53.90 %
<i>Halobellus inordinatus</i> *- <i>Salicola marasensis</i>	1.00 %	41.22 %

Tras realizar la hibridación DNA-DNA de las 4 cepas pertenecientes al género *Halobellus* sp., se determinó que no poseen semejanza con ninguna especie publicada del género citado. Por ello, el siguiente paso será la comparación entre ellas A1FP7, A1FP20, S2FP8 y S2FP14 para determinar si son diferentes especies o pertenecen a una nueva y única especie de *Halobellus* sp..

Hibridación marcando la cepa S2FP14

La cepa **S2FP14** fue marcada e hibridada con las cepas S2FP8, A1FP7 y A1FP20 que según los resultados del alineamiento global mediante BLAST, y el árbol filogenético correspondiente, presentaban homología con S2FP14; y con *Halobellus inordinatus*, cepa con la que presentaba una similitud del 99.46 %. Así mismo, se introdujo un control negativo, en este caso *Salicola marasensis* CECT 7107^T. En la tabla 57.C. se resume la hibridación realizada y los resultados se observan en la tabla 57.D.

Tabla 57.C. Hibridación de la cepa S2FP14.

CEPAS MARCADAS	HIBRIDACIÓN CON
S2FP14*	A1FP7 A1FP20 S2FP8 <i>Halobellus inordinatus</i> JCM 18648 ^T <i>Salicola marasensis</i> CECT 7107 ^T

Tabla 57.D. Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada S2FP14*, las cepas seleccionadas y la cepa de referencia.

Cepas	BR%	RBR%
S2FP14*- S2FP14	4.49 %	100 %
S2FP14*- A1FP20	2.58 %	50.55 %
S2FP14*- A1FP7	4.03 %	90.34 %
S2FP14*- S2FP8	2.05 %	46.04 %

S2FP14*- <i>Halobellus inordinatus</i>	2.58 %	57.47 %
S2FP14*- <i>Salicola marasensis</i>	1.30 %	28.84 %

Tras realizar la hibridación DNA-DNA de S2FP14, se determinó a A1FP20 como la misma especie que S2FP14* puesto que tiene un valor de 90.34 %. Mientras que A1FP7 (51.55 %) y S2FP8 (46.04 %) son especies diferentes. Estas cuatro especies del genero *Halobellus* poseen un valor de G+C semejante 61.46 %mol S2FP14, 61.425 %mol A1FP20, 61.14 %mol S2FP8 y 62.375 %mol A1FP7. Las dos cepas identificadas como pertenecientes a una misma nueva especie de *Halobellus* sp. son S2FP14^T y A1FP7, las cuales recibieron el nombre de ***Halobellus ramosii* sp. nov.**, y donde las características que describen a esta nueva especie están expuestas en el apartado 4 de “Descripción, morfología, fenotípica y genotípica de las nuevas especies” de resultados y discusión.

Hibridación marcando la cepa A1FP7

Debido a los resultados obtenidos de la anterior hibridación, en la que el porcentaje de RBR no superaba el 70 %, valor que relaciona a la cepa A1FP7 con S2FP14, se realizó un experimento donde se marcó A1FP7, y se hibridó con las cepas que aparecen en la tabla 57.E., donde el control negativo es *Halovivax asiaticus* CECT 7098^T.

Tabla 57.E. Hibridación de la cepa A1FP7*

CEPAS MARCADAS	HIBRIDACIÓN CON
A1FP7 *	S2FP14 S2FP8 <i>Halovivax asiaticus</i> CECT 7098 ^T

Tabla 57.F. Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada A1FP7*, las cepas seleccionadas y la cepa de referencia.

Cepas	BR%	RBR%
A1FP7*- A1FP7	2.67 %	100 %
A1FP7*- S2FP14	19.99 %	77.73 %
A1FP7*- S2FP8	1.51 %	56.73 %
A1FP7*- <i>Halovivax asiaticus</i>	1.30 %	48.66 %

Los resultados demuestran que la cepa A1FP7 no hibrida con S2FP8 (Tabla 57.F.), donde el porcentaje de hibridación es de un 56.73 %. Lo que corrobora la posibilidad de que S2FP8 es una especie diferente a *Halobellus ramosii*.

Las tablas 57.B., 57.D. y 57.F. en la que se recogen los valores de hibridación de la cepa S2FP8 con respecto a cada una de las cepas marcadas en cada caso: 53.90 % (*Halobellus inordinatus**- S2FP8); 46.04 % (S2FP14*- S2FP8) y 56.73 % (A1FP7*- S2FP8). Ante estos datos se concluye que la arquea S2FP8 es una nueva especie perteneciente al género *Halobellus*, donde las características fenotípicas, perfil lipídico y fotografía de microscopio electrónico deben de llevarse a término para realizar una descripción completa de la especie.

Resultados de la hibridación de la Cepa A1FP12

La cepa A1FP12 se encuentra localizada en el fenón B del dendograma de arqueas de la salina de Fuente de Piedra (Figura 32). Cuando se realizó el alineamiento y comparación de la secuencia completa con las disponibles en la base de datos del CLUSTALW2, se relacionó con:

-*Pariobacillus quinghaiensis* 99 %

Pariobacillus quinghaiensis fue marcada e hibridada con la cepa procedente de Fuente de Piedra, con la cual presentaba similitud (Tabla 58.A.), así como con un control negativo.

Tabla 58.A. Hibridación DNA-DNA de la cepa A1FP12 *.

CEPAS MARCADAS	HIBRIDACIÓN CON
<i>Pariobacillus quinghaiensis</i> * DSM 17857 ^T	A1FP12 <i>Salicola marasensis</i> CECT 7107 ^T

Tabla 58.B. Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada A1FP12 *, las cepas seleccionadas y la cepa de referencia.

Cepas	BR%	RBR
<i>Pariobacillus quinghaiensis</i> *- <i>P. quinghaiensis</i>	16.75	100 %
<i>Pariobacillus quinghaiensis</i> *- A1FP12	14.35	86.59 %
<i>Pariobacillus quinghaiensis</i> *- <i>Salicola marasensis</i>	2.27	13.80 %

La cepa A1FP12 presentó un porcentaje de similitud con *Pariobacillus quinghaiensis* del 99 % en el alineamiento realizado por medio de CLUSTALW2, y los resultados de hibridación DNA-DNA con 86.59 % (Tabla 58.B), confirman que la cepa problema no es nueva, sino que se trata de la especie *Pariobacillus quinghaiensis*.

Resultados de la hibridación de la Ceba A3FP22

La arquea A3FP22, recogida del agua del humedal salino de Fuente de Piedra, pertenece al fenón C, del fenograma de arqueas (Figura 32). Habiendo realizado una comparación de la secuencia completa de esta cepa mediante el CLUSTALW2 (Larkin, et al., 2007), se establece una relación con las especies:

- Halovivax asiaticus* 99 %
- Halovivax ruber* 98.7 %

Consecuentemente A3FP22 fue marcada e hibridada con las cepas de referencia *Halovivax asiaticus* CECT 7098^T y *Halovivax ruber* DSM 18193^T, y con un control negativo *Alkalibacillus salilacus* DSM 16460^T (Tabla 59.A.). Los resultados de esta hibridación vienen expuestos en la tabla 59.B.

Tabla 59.A. Hibridación DNA-DNA de la cepa A3FP22*.

CEPAS MARCADAS	HIBRIDACIÓN CON
A3FP22*	<i>Halovivax asiaticus</i> CECT 7098 ^T <i>Halovivax ruber</i> DSM 18193 ^T <i>Alkalibacillus salilacus</i> DSM16460 ^T

Tabla 59.B. Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada A3FP22*, las cepas seleccionadas y la cepa de referencia.

Cepas	BR%	RBR
A3FP22*- A3FP22	6.19	100 %
A3FP22*- <i>Halovivax asiaticus</i>	5.16	83 %
A3FP22*-<i>Halovivax ruber</i>	3.44	56 %
A3FP22*- <i>Alkalibacillus salilacus</i>	1.66	32 %

Los resultados tras la lectura e interpretación de la microplaca de ELISA, revelan que la cepa nombrada como A3FP22 (Tabla 59.B), corresponde a ***Halovivax***

asiaticus, ya que el valor de RBR son superiores al 70 % cuando la cepa marcada se hibridó la cepa validada.

Resultados de la hibridación de la Cepa S2FP25

Localizado en el fenón B del dendograma de arqueas de la salina de Fuente de Piedra (Figura 32) se encuentra S2FP25. Cuando se realizó el alineamiento y comparación de la secuencia completa con las disponibles en la base de datos del CLUSTALW2, se relacionó con las especies:

-*Haloterrigena hispanica* 98.1 %

-*Haloterrigena limicola* 97.5 %

S2FP25 fue marcada e hibridada con las cepas de referencia de las 2 especies con las que presenta similitud (Tabla 60.A.), así como con un control negativo.

Tabla 60.A. Hibridación DNA-DNA de la cepa S2FP25 *.

CEPAS MARCADAS	HIBRIDACIÓN CON
S2FP25 *	<i>Haloterrigena hispanica</i> DSM 18328 ^T <i>Haloterrigena limicola</i> JCM 13563 ^T <i>Alkalibacillus salilacus</i> DSM16460 ^T

Tabla 60.B. Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada A3FP22*, las cepas seleccionadas y la cepa de referencia.

Cepas	BR%	RBR
S2FP25*- S2FP25	6.74	100 %
S2FP25*-<i>Haloterrigena hispanica</i>	3.83	56.86 %
S2FP25*-<i>Haloterrigena limicola</i>	3.44	73.17 %
S2FP25*- <i>Alkalibacillus salilacus</i>	1.66	34.16 %

La cepa S2FP25 presentó un porcentaje de similitud con *Haloterrigena limicola* del 97.5 % en el alineamiento realizado por medio de CLUSTALW2, y los resultados de hibridación con 73.17 % (Tabla 60.B), confirman que la cepa problema no es nueva, sino que se trata de *Haloterrigena limicola*.

Resultados de la hibridación de la Cepa S1LM8

La cepa S1LM8 pertenece al fenón D del dendograma de La Malahá para bacterias (Figura 36), según los resultados de taxonomía numérica. Tras la comparación de la secuencia total del gen del RNAr 16S en el alineamiento global mediante CLUSTALW2, se relaciona con las especies:

- *Alkalibacillus salilacus* 99.8 %
- *Alkalibacillus halophilus* 99.8 %
- *Alkalibacillus flavidus* 98.1 %

Así pues, **S1LM8** fue marcada e hibridada con las cepas de referencias *Alkalibacillus salilacus* DSM 16460^T; *Alkalibacillus halophilus* KCTC 3990^T; *Alkalibacillus flavidus* KCTC 135280^T y con un negativo, *Halovivax asiaticus* CECT 7098^T. En la tabla 61.A. se resume la hibridación realizada y los resultados se observan en la tabla 61.B.

Tabla 61.A. Hibridación de la cepa S1LM8*

CEPAS MARCADAS	HIBRIDACIÓN CON
S1LM8 *	<i>Alkalibacillus salilacus</i> DSM 16460 ^T <i>Alkalibacillus halophilus</i> KCTC 3990 ^T <i>Alkalibacillus flavidus</i> KCTC 135280 ^T <i>Halovivax asiaticus</i> CECT 7098 ^T

Tabla 61.B. Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada S1LM8*, las cepas seleccionadas y la cepa de referencia.

Cepas	BR%	RBR
S1LM8*-S1LM8	0.40	100 %
S1LM8*- <i>Alkalibacillus salilacus</i>	0.07	17.34 %
S1LM8*- <i>Alkalibacillus halophilus</i>	0.10	33.13 %
S1LM8*- <i>Alkalibacillus flavidus</i>	0.06	15.71 %
S1LM8*- <i>Halovivax ruber</i>	0.04	10.75 %

Una vez realizados los experimentos de hibridación, los resultados mostraron que la cepa de estudio presenta un porcentaje de hibridación DNA-DNA con las cepas de referencia inferior al establecido para considerar a una cepa dentro de la misma especie. Con valores inferiores al 70 %, se puede afirmar que nos encontramos ante una nueva especie bacteriana de *Alkalibacillus sp.* S1LM8 se ha denominado *Alkalibacillus almallahenesis*, cuya descripción fenotípica y genotípica está desglosada en el apartado de 4 “Descripción, morfología, fenotípica y genotípica de las nuevas especies” de resultados y discusión.

Resultados de la hibridación de la Cepa S3LM7

Según los resultados de taxonomía numérica la cepa S3LM7 pertenece al fenón C del dendograma de La Malahá para bacterias (Figura 35). La cepa S3LM7 en el alineamiento global de la secuencia completa del gen del RNAr 16S mediante CLUSTALW2 fue relacionada con las especies siguientes:

-*Haloterrigena turkmenica* 98.3 %

-*Haloterrigena salina* 97.6 %

De modo que la hibridación se realizó con estas cepas de colección y con otra cepa de colección que hará de control negativo (Tabla 62.A.). La Hibridación se resume en los resultados presentados en la tabla 62.B.

Tabla 62.A. Hibridación de la cepa S3LM7*

CEPAS MARCADAS	HIBRIDACIÓN CON
S3LM7*	<i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM 5511 ^T <i>Haloterrigena salina</i> CECT 7146 ^T <i>Alkalibacillus salilacus</i> DSM 16460 ^T

Tabla 62.B. Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada S3LM7*, las cepas seleccionadas y la cepa de referencia

Cepas	BR%	RBR
S3LM7*- S3LM7	2.91	100 %
S3LM7*- <i>Haloterrigena turkmenica</i>	0.65	22.53 %
S3LM7*- <i>Haloterrigena salina</i>	2.64	90.64 %
S3LM7*- <i>Alkalibacillus salilacus</i>	0.4	11.85 %

3. CHEMOTAXONOMIC ANALYSIS

The determination of lipids profile was performed in two strains of the present work. A1FP7 and S2FP14 belong to genus *Halobellus*. They were to extremely halophilic archaea. After extracting the total lipids according to methodology of Bligh and Dyer (Kates, 1986), we performed the TLC. These plates were stained by three different methods, which have been described in materials and methods. Lipid biochemistry gave an important contributions to the characterization of this genus, because there is only general information of lipidic profile (Cui, et al., 2012)

Haloquadratum walsbyi was the selected microorganisms for pattern because of its phylogenetic proximity to *Halobellus* sp.. Even though *Halobacterium salinarum* is considered as a model organism of extremely halophilic archaea. The lipidic profile from *Haloquadratum walsbyi* was previously described (Lobasso, et al., 2008, Lopalco, et al., 2011). The lipid profiles from A1FP7 and S2FP14 were identical, which were afterwards confirmed with analyses of MALDI-Tof. The lipidic analysis were performed with strains growth in their optimal culture conditions, because the composition could be different in extreme situation (for example, osmotic shock induces the presence of glycardiolipin) (Lobasso, et al., 2003, Lobasso, et al., 2008).

The important taxonomic weight of the polar lipid composition is shown in the last version of Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The information of 16S rRNA in phylogeny have a correlation with the lipid profile (Koga & Morii, 2005). Figure 53 shows TLC data performed to the total lipid extract stained with 5 % sulfuric acid, sulfoglycolipids stained with Azure A and phospholipids stain with Molibdenum blue. Individual lipid components were identified by comparison of their Rf values (Retention factor) with those of the individual lipid components of the halophilic archaeon *Haloquadratum walsbyi*, classified by their response to specific lipidic staining. It was evident that the main phospholipid present in both extracts

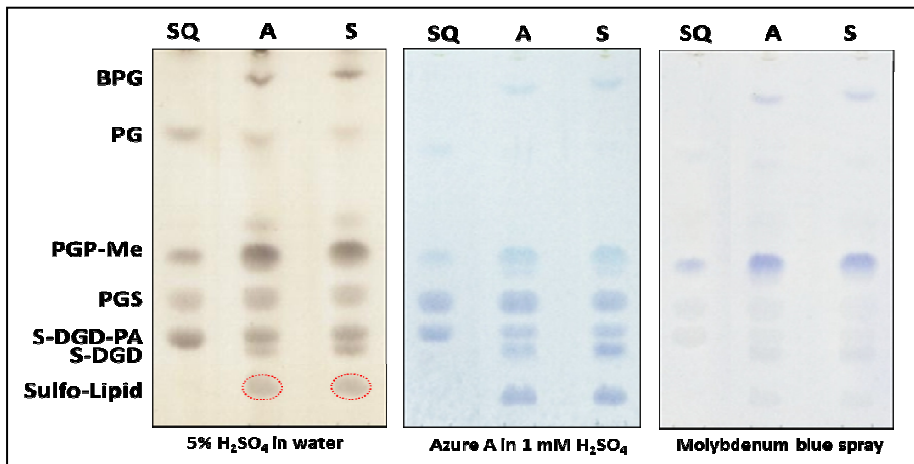


Fig. 53. HPTLC lipids profiles of the total lipid extract of SQ (*Haloquadratum Walsbyi*), A (A1FP7) and S (S2FP14).

was identified as phosphatidylglycerophosphate methyl ester (PGP-Me), which represented about 35.8 % of the total cellular lipids. However, the phosphatidylglycerosulfate (PGS) was considered as other main phospholipid with 13.2%. This value is important data for the description of both strains, because this lipid was absent in an elevated number of other species of halophilic archaea (Antunes, et al., 2008, Kharroub, et al., 2008). On other hand, PG (phosphatidylglycerol) is a minor phospholipid (5.6 %). The glycolipids (S-DGD and S-DGD-PA) are strongly present in *Halobellus* sp., with a whole value of 20 %, while S-DGD-PA is the only visible glycolipid in the extract of *Haloquadratum walsbyi*. Cardiolipins, as bisphosphatidylglycerol (BPG), were seen in the samples like a dark spot and this represent about 13 % of total lipids.

Interestingly, the figure 53 showed a spot corresponding to Sulfo-lipid. This spot is an unknown lipid until now. When we did the TLC, we were describing it as sulfolipid because in the TLC, which was stained with Azure A, showed the spot and this type of stain were used to identify sulfolipids. Furthermore, this unknown spot was afterwards analyzed for assessing its specific sulfated structure.

The next step to identify the lipid composition or structure of the unknown spot was performed by MALDI-ToF. Figure 54 shows the MALDI-ToF mass spectra of the total lipid extracts of S2FP14 and A1FP7 acquired in the negative ion mode using 9-AA as matrix. The value of signals in the spectra is attributable to the negative molecular ions [M-H]⁻, and each value has the name of the correspondent lipid. The spectra profiles from S2FP14 and A1FP7 were similar. This means that we could choose any one of them to do the complete analysis.

MALDI-ToF analysis (Figure 54) showed for both strains a main peak at m/z “1055.9”. This peak was identified as diglycosyl glycerol diether corresponding to its molecular ion [M-H]⁻. Other important peak at m/z “1770.8” was identified as S-DGD-PA ((2'-sulfo) Man α 1-2Glc α 1-1-[sn-2,3-di-O-phytanlyglycerol]). However,

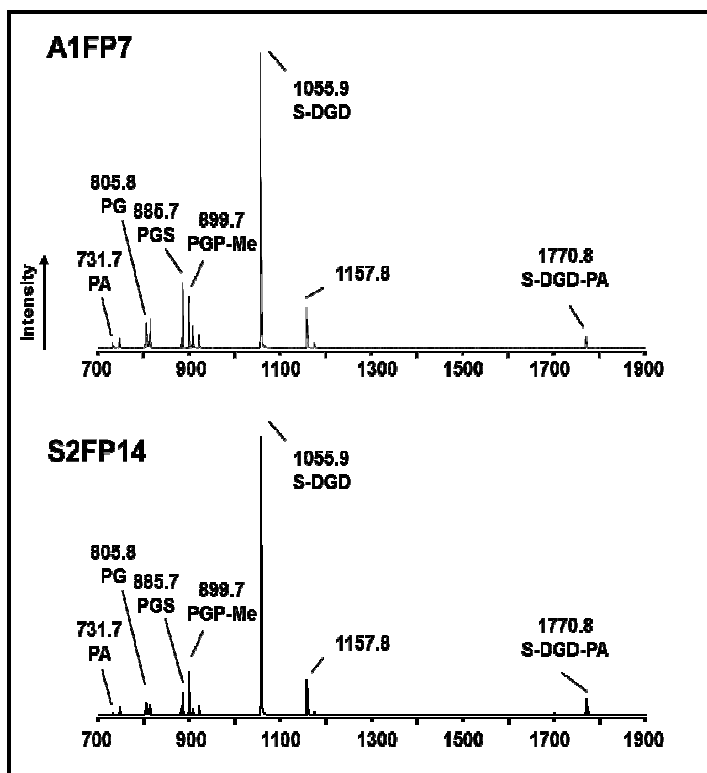


Fig. 54. MALDI-ToF MS analysis (negative mode) of the total lipid extracts of S2FP14 and A1FP7.

there is a peak at m/z "1157.8", which was not identified as known lipid, which could be a new lipid structure, not yet described. For this reason, we performed a deep study of their profiles.

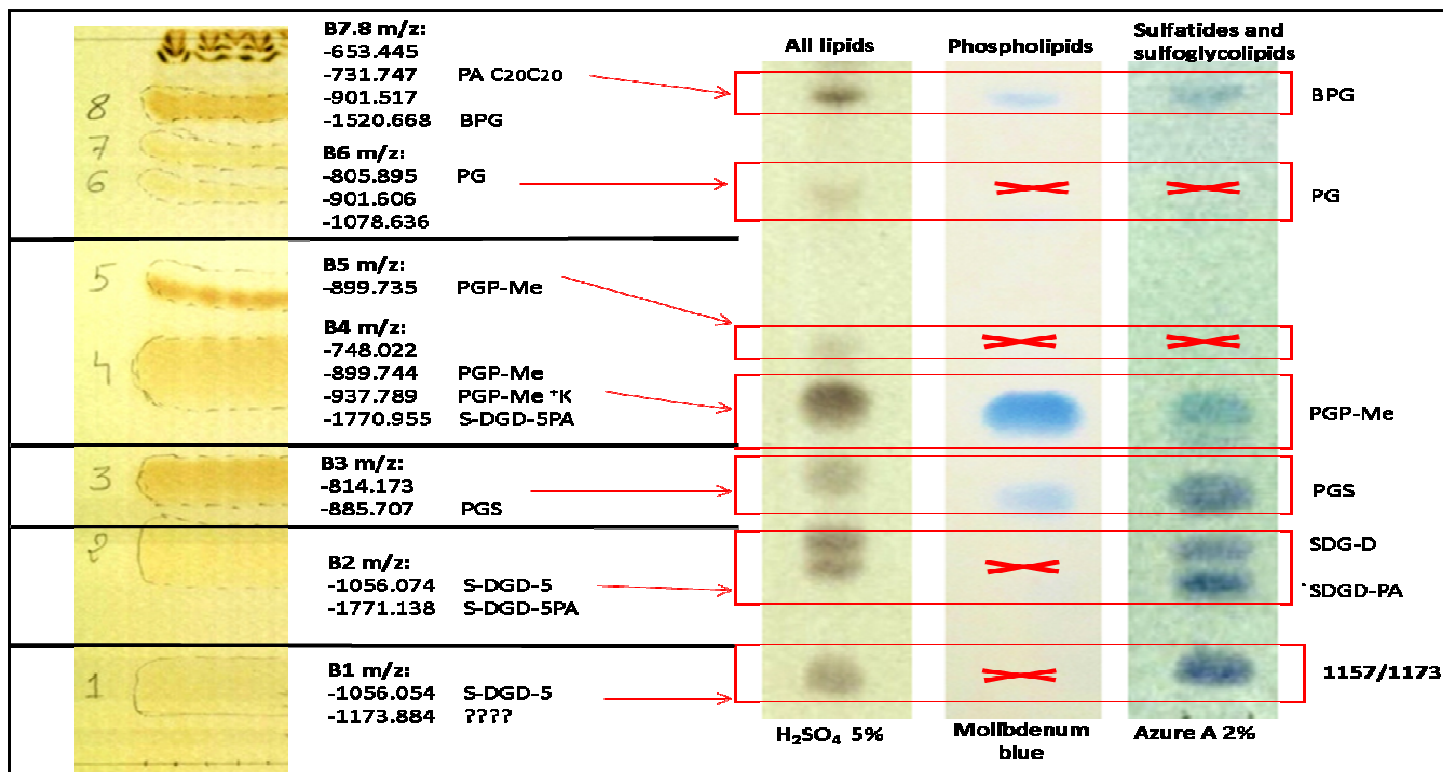


Fig. 55. Comparative of values of MALDI-ToF MS analysis of the total lipid extracts of S2FP14 and the different type of stains for HPTLC.

Figure 55 shows the comparative table about the different values of spectra of MALDI-ToF in relation with the spots of the TLC from total lipid extract (5 % sulfuric acid), sulfoglycolipids (Azure A) and phospholipids (Molibdenum blue), which are found right of the figure. These values are connected by the same time with the different lipids that have been extracted from the bands of the preparative TLC in silicagel that was stained with iodine vapor (Left of the figure).

The most interested band was the first because this generated the unknown peak. The peak "1173.884" is a sulfatide or sulfoglycolipid because was stained with Azure A 2% and it did not stain with Molibdenum blue. And the value of this peak was present in the cluster of peaks between 900-1400 m/z, which were corresponding to glycolipids (Angelini, et al., 2012). For naming this lipid, it was necessary to do the method of direct coupling of HPTLC and MALDI-ToF with the first band (Figure 55).

In order to better characterize the lipid components from the first band belonging to lipid extract from the preparative TLC, we applied the method of direct coupling of HPTLC and MALDI-ToF as was described in detail in Materials and Methods section. The results are shown in figure 56, which reports on whole lipid

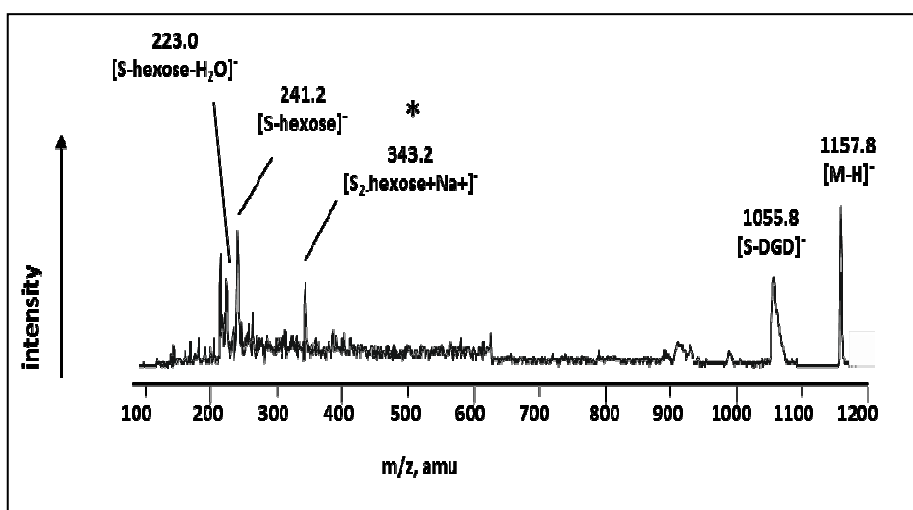


Fig. 56. MALDI-ToF mass spectra of band 1 of *Halobellus* S2FP14 strain by direct coupling of HPTLC and MALDI-ToF.

components from this specific band. Thus, the peak “1055.8” was identified as sulfated diglycosyl diphytanylglycero-5 (S-DGD-5). Nevertheless, the “1157.8” peak was verified as a novel lipid structure. The peaks “223.0, 241.2 and 343.2” corresponded to the structure of S2-hexone-Na⁺, which has been shown in Figure 58.

Thus, the fragmentation behavior of the lipid at m/z 1157.8 was also investigated by using Post Source Decay (PSD) mass spectrometry analysis (Figure 57). The ion peak site at m/z 1157.8 has been tentatively correspondent to a bis-sulfated diglycosil diether (i.e. S2-DGD +Na⁺), while that at m/z 1173.8 was a hydroxyl form, because of the difference between values of m/z correspond to 16.

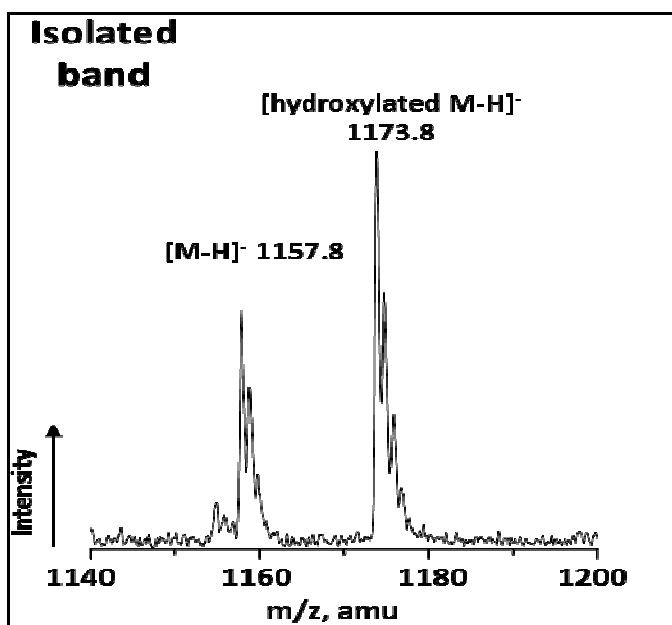


Fig. 57. PSD fragment ion spectra of band 1 of *Halobellus* S2FP14 strain.

The proposed structures of the novel bis-sulfated glycolipids are reported in Figure 58. The difference of the height of the peak is caused because the molecule is most or less ionized. On other hand, the presence of bis-sulfated glycolipids was

previously reported on some membranes of species of the genera *Halobacteriaceae*, *Natrialba*, *Halopiger* and *Haloterrigena* (Cui, et al., 2006, Hezayen, et al., 2010).

The bis -sulfated glycolipid, which was present in S2FP14 and A1FP7 and belong to the genus *Halobellus*, could be the lipid that has been previously reported as unknown on species of *Halobellus* (Cui, et al., 2011, Cui, et al., 2012, Zhang, et al., 2013, Zhao, et al., 2013). Thus, it is described as one sulfo-lipid without specific name until the moment. It is present in low percentage within its composition. For this way, this lipid could be the taxonomic fingerprint of the genus *Halobellus*.

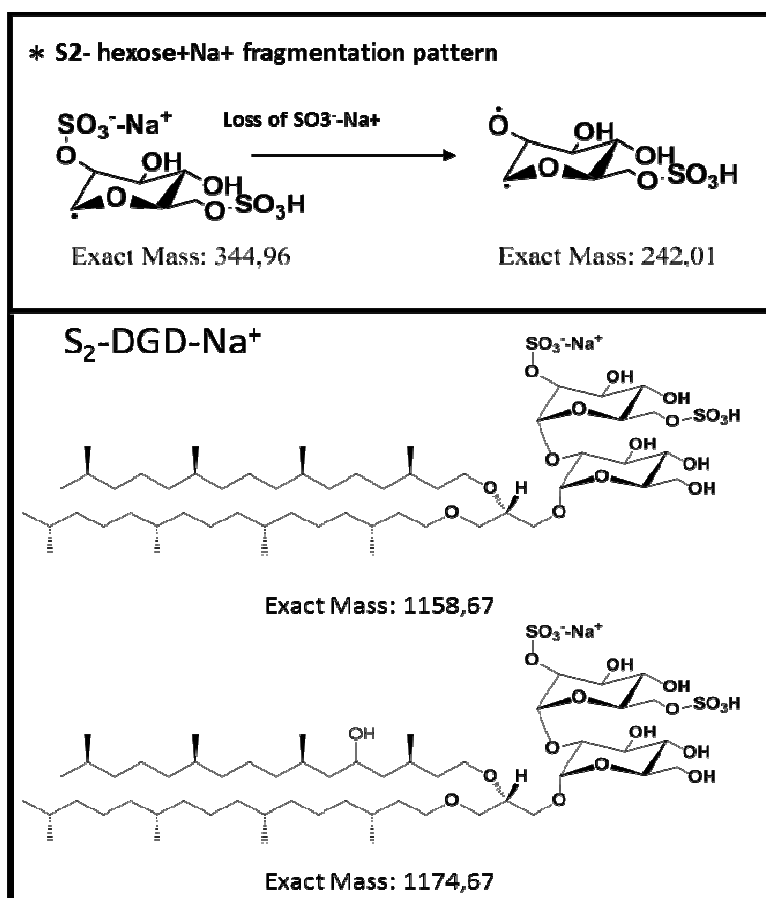


Fig. 58. PDS Proposed structures for the bis-sulfated glycolipid and its hydroxylated form.

4. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA, FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE LAS NUEVAS ESPECIES

4.1. S1LM8^T: *Alkalibacillus almallahensis* spp. nov.

S1LM8 es una bacteria halófila procedente de sedimentos de la atalasohalina de La Malahá, pertenece a la genero *Alkalibacillus* sp., y recibe este nombre debido al término árabe al-Mallaha, que significa "alquería de la sal" (al.ma.lla.hen'sis. N.L. masc. adj. *almallahensis* de *al-mallaha* nombre árabe que se le dio al municipio granadino (Pérez-Davó, et al., 2014, In Press.).

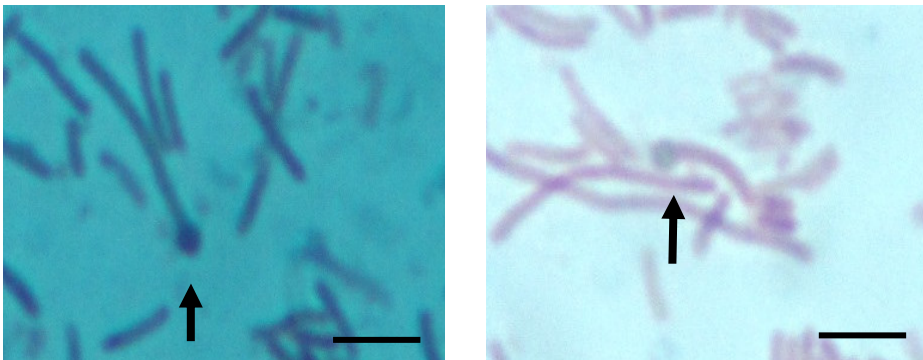


Fig. 59. Fotografías al microscopio óptico mostrando la endoespora terminal, teñida mediante métodos tradicionales (Técnica de Shaeffer-Fulton). Bar 3 μ m.

Las células son bacilos Gram positivos, formadoras de esporas terminales y no móviles, con una longitud de 8.0-10.0 μ m y un ancho de 0.5-0.7 μ m (Figura 59 y 60). Las colonias son lisas, con un diámetro de 2-4 mm, y desarrollan un pigmento blanco, el cual cambia a naranja suave en presencia de un porcentaje de sales del 20 al 30 % en el medio de crecimiento. Cuando se cultivan en medio HM al 15 % de

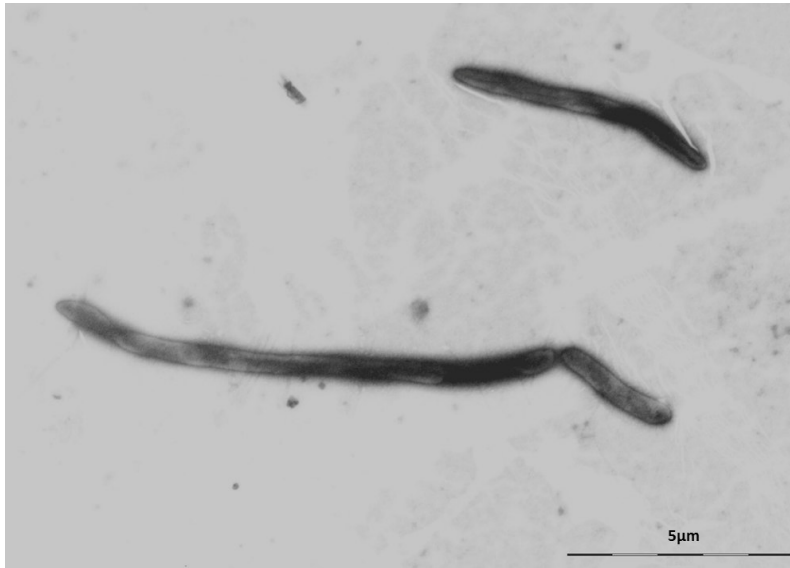


Fig. 60. Fotografía del microscopio electrónico de la cepa S1LM8^T con espora terminal, crecida en el medio HM. Bar 5 μ m.

salinidad a pH de 8 y a una temperatura de 35 °C, tardan 5 días en crecer. Catalasa positiva y oxidasa positiva. Capaces de crecer en un amplio rango de temperaturas de 15 a 50 °C y en ausencia de magnesio en su medio. El rango de pH en donde es capaz de desarrollarse se extendiéndose desde 7 a 10, con su óptimo en 8. El crecimiento se produce en medios que contengan del 7.5-30% de sales totales (p/v). Incapaces de hidrolizar la gelatina, el tween 80, el almidón, la caseína y el DNA. No hay reducción de nitratos, ni indol y no hay presencia de β -galactosidasa, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, arginina deshidrogenasa y triptófano desaminasa. Negativos en la prueba de Voges-Proskauer y en la producción de H₂S. Utiliza el Citrato como única fuente de energía y carbono y es capaz de producir ácido a partir del consumo del glicerol.

Sensible a la ampicilina, bacitracina, cloranfenicol, eritromicina, novobiocina y a la penicilina G. Resistente a la neomicina, ciprofloxacina, rifampicina y norfloxacina. Su valor de G+C es de 38.2 %mol.

Para el análisis de ácidos grasos, quinonas isoprenoides y péptidoglicano fueron cultivadas en medio HM suplementado con un 15% (p/v) de sales totales durante dos días a 35 °C bajo condiciones aerobias. Los ácidos grasos celulares presentes son: iso-C_{13:0} (0.10%), iso-C_{14:0} (2.83%), C_{14:0} (0.37%), “unknown” 14.263 (0.24%), iso-C_{15:0} (26.75%), anteiso-C_{15:0} (34.75%), C_{15:0} (0.48%), iso-C_{16:0} (8.21%), C_{16:0} (2.24%), iso-C_{17:0} (3.92%), anteiso-C_{17:0} (19.79%) y C_{18:0} (0.33%) (Tabla 63). Este perfil posee similitudes con los de especies relacionadas al *Alkalibacillus almallahensis* del mismo género. S1LM8^T posee el péptidoglicano tipo A1X con ácido meso-diaminopimérico (*m*-DAP), componente común a la mayoría de las especies de la familia *Bacillaceae*, Gram positivas, formadoras de endosporas. De igual manera, comparten el mismo tipo de menaquinona, MK-7.

Tabla 63. Composición de ácidos grasos (%) de la cepa S1LM8^T y las especies cercanas pertenecientes al género *Alkalibacillus*

Ácidos grasos	1	2	3	4
Cadena lineal saturada				
C _{15:0}	0.5	0.3	0.9	2.8
C _{16:0}	2.2	1.5	1.8	0.7
Cadena ramificada y saturada				
iso-C _{14:0}	2.8	2.9	1.8	8.5
iso-C _{15:0}	26.7	27.4	11.9	25.9
anteiso-C _{15:0}	34.7	37.3	38.7	28.4
iso-C _{16:0}	8.2	10.2	8.4	23.6
iso-C _{17:0}	3.9	2.1	1.5	1.2
anteiso-C _{17:0}	19.8	16.9	33.9	7.7

Cepa: 1, S1LM8^T; 2, *A. salilacus* DSM 16460^T; 3, *A. halophilus* KCTC 3990^T; 4, *A. flavidus* KCTC 13258^T. Componentes mayoritarios (>10%) se encuentran señalados en negrita. Los ácidos grasos presente en valores inferiores al 1 % no son mostrados.

Las hibridaciones con las cepas más próximas filogenéticamente *Alkalibacillus salilacus*, *Alkalibacillus halophilus* y *Alkalibacillus flavidus* no superaban ninguna el umbral del 70 %. La secuencia completa del gen del RNA 16S se encuentra depositada en las bases de datos del Genbank/EMLB con el número de acceso **KC968225**. Actualmente la cepa se encuentra depositada en la colección española de cepas tipo CECT 8373^T y en la colección de cultivo alemana DSM 27545^T. El árbol filogenético que contiene la secuencia de *Alkalibacillus almallahensis* y de aquellas especies de colección próximas a esta nueva especie se muestra en la figura 61.

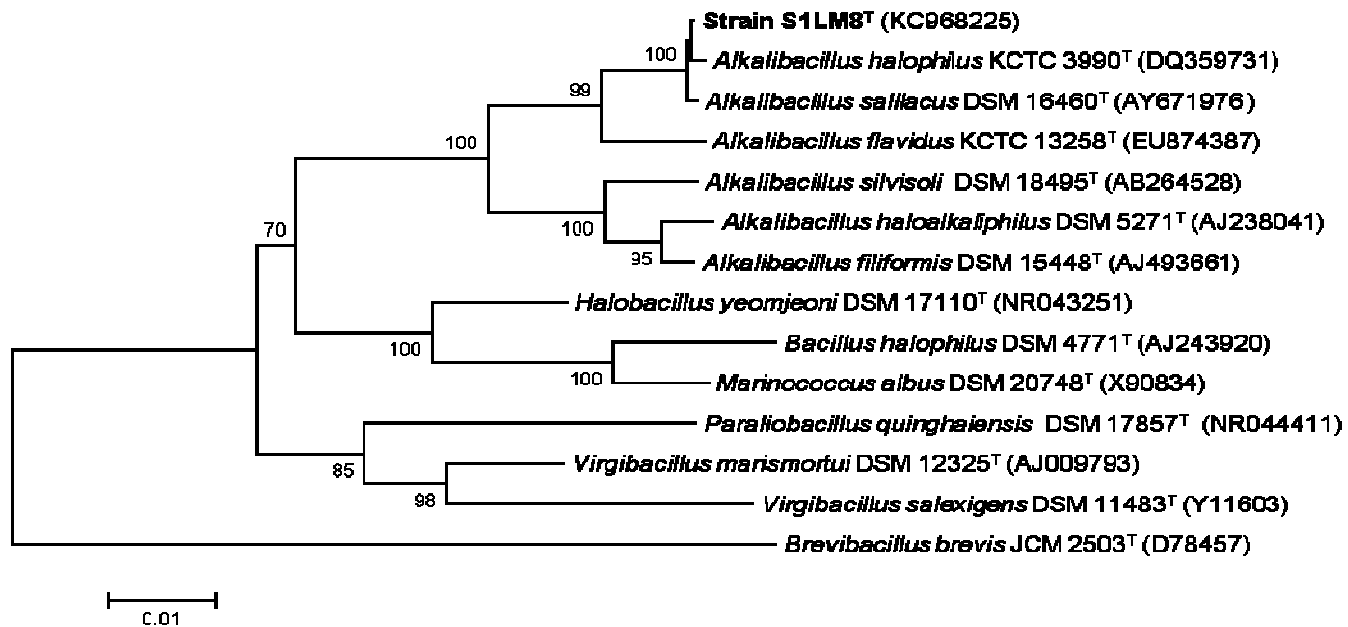


Fig. 61. Árbol basado en el método “Neighbour-joining” que muestra la relación filogenética basada en las secuencias del gen 16S rRNA de la cepa S1LM8^T y otras cepas validadas relacionadas. Los valores de “Bootstrap” son expresados en porcentajes de 1000 replicaciones. Bar, 0.01 cambios por la posición del nucleótido.

4.2. S2FP14^T y A1FP7: *Halobellus ramosii* spp. nov.

S2FP14^T y A1FP7 son arqueas halófila procedente de sedimento y agua de la atalasoalina de Fuente de Piedra, pertenecientes al género *Halobellus*. Esta nueva especie recibe el nombre de *Halobellus ramosii* (ramos.ii NL gen. Masc. N. Ramosii de Ramos). Nombrado así, en honor al Profesor Alberto Ramos-Cormenzana, por sus contribuciones a la taxonomía y a la microbiología.

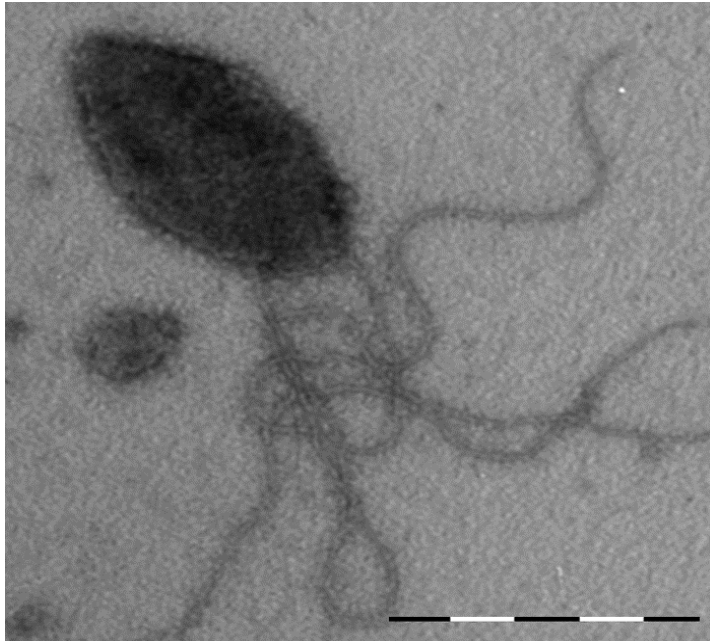


Fig. 62. Imagen de S2FP14 crecida en medio HM de requerimientos mínimos por microscopio de transmisión electrónica. Bar. 500 nm.

Las células son Gram negativas y móviles, con flagelo anfitriico (Figura 62). Bacilo de 1.5 – 2.5 μm de largo por 0.4 - 1.5 μm de ancho. S2FP14^T y A1FP7 crecen en medio MH con un 20% de Subov (Rodríguez-Valera, et al., 1981), siendo óptimo su desarrollo en atmósfera anaeróbica, ya que es un anaerobio facultativo. Las colonias después de incubarlas durante 7 días a 37 $^{\circ}\text{C}$ presentan una pigmentación roja, de

morfología circular y pequeña, alrededor de 1 mm de diámetro. Las células se lisan en presencia de agua destilada.

La cepa tipo (S2FP14^T) crece en un rango de salinidad de 12.5 a 30 % Subov (localizando su óptimo 3.4 M). El rango de pH de crecimiento fue 7-8.5 (crecimiento óptimo en 7.3). La cepa creció en un intervalo de temperatura de 22 - 50 °C, con un óptimo a 37 °C. No es necesaria la presencia de magnesio para el crecimiento. Catalasa y oxidasa positiva. Tipo de crecimiento homogéneo y positivo en condiciones anaeróbicas con L- arginina. El nitrato y el nitrito se reducen. No hidroliza la caseína, la gelatina, el almidón, ni el tween 80. No presenta lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, ni arginina deshidrogenasa. Pero si triptona desaminasa. Respuesta negativa a la prueba de Voges-Proskauer y a la producción de H₂S No produce ácido a partir de los siguientes hidratos de carbono y alcoholes de azúcares: D(+) glucosa, lactosa, D(-) fructosa, D(+) galactosa, maltosa, L(+) arabinosa, D(+) celobiose, almidón, D(+) manosa, D(+) rafinosa, L(+) rammnose, L arabinosa, D melibiosa, D sacarosa, amigdalina, inositol, sorbitol, manitol y glicerol. Mientras que si utiliza glicerol, piruvato y succinato como única fuente de carbono, de nitrógeno o de energía. La formación de indol es negativa. El sulfuro de hidrógeno no se produce a partir de tiosulfato de sodio o cisteína. No se produce β - galactosidasa. Son susceptibles a la bacitracina (10 U) y novobiocina (30 µg); y resistentes a la penicilina G (10 U), cloranfenicol (30 µg), ampicilina (10 µg), eritromicina (15 µg), neomicina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), rifampicina (30 µg) y norfloxacina (10 µg).

Los principales lípidos polares presentes son el fosfatidilglicerol (PG) y el éster metílico de fosfato de fosfatidilglicerol (PGP-Me); destacando dos glicolípidos (GL2 y GL3) es cantidades destacables. En pequeñas cantidades presenta GL1 (Glicolípidos). Los perfiles de lípidos polares de S2FP14^T contenían L1 (Lípido), PL1, PL2, PL3 y PL4 (Fosfolípido) en baja concentración (Figura 63).

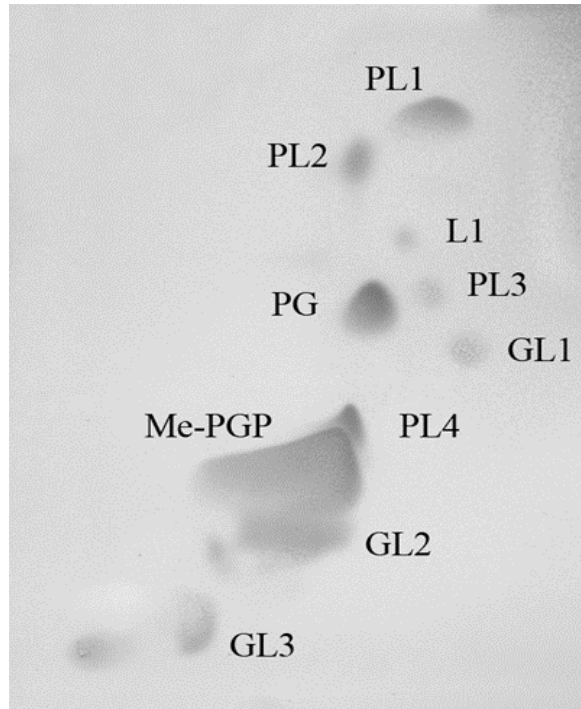


Fig. 63. Perfil lipídico de S2FP14 crecida en medio HM al 20% (v/w) a 37 °C.

El contenido medio de G+ C del DNA de las cepas S2FP14^T y A1FP7 era de 61,14 y 62,37 % en moles (método T_m), respectivamente. Las hibridaciones DNA-DNA con la cepa más próxima filogenéticamente *Halobellus inordinatus*, no superaban ninguna el valor del 70 %. La cepa tipo es S2FP14^T se ha depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, España como CECT 8167^T y en el Instituto Leibniz Colección DSMZ- Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares DSM 26177^T. El árbol filogenético que contiene la secuencia de *Halobellus ramosii* (S2FP14^T y A1FP7) y de aquellas especies de colección próximas a esta nueva especie se muestra en la figura 64.

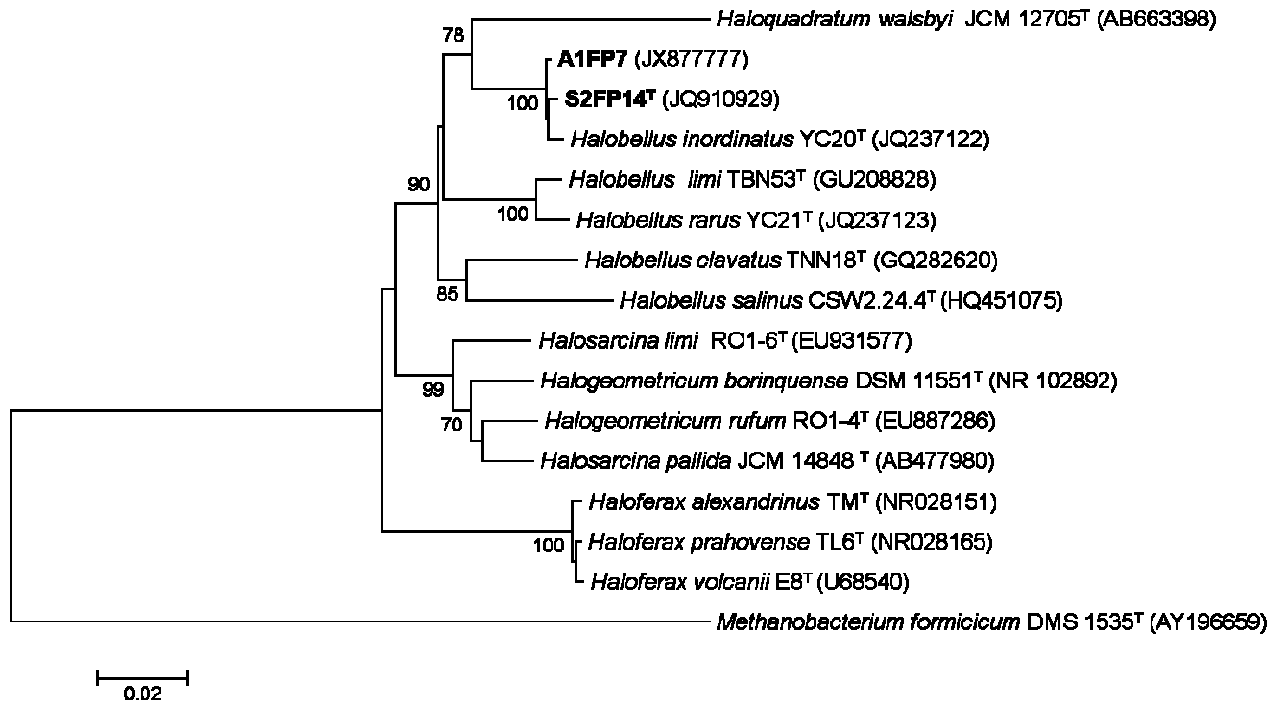


Fig. 64. Árbol basado en el método “Neighbour-joining” que muestra la relación filogenética basada en las secuencias del gen 16S rRNA de las cepas S2FP14^T y A1FP7 y otras cepas validadas relacionadas. Los valores de “Bootstrap” son expresados en porcentajes de 1000 repeticiones. Bar, 0,02 cambios por la posición del nucleótido.

4.3. A4BC2^T: *Halorhabdus gadibusense* spp. nov.

A4BC2^T es una nueva especie de arquea aislada de muestras de agua de la salina marina de Santa María de Jesús, en Chiclana, Bahía de Cádiz. Perteneciente al género *Halorhabdus* sp., recibe este nombre debido a que procede de la provincia gaditana, Gadibus en latín (ga.de.bu.sen.se. N.L. adj. Saladarensis, procedente de Gadibus).

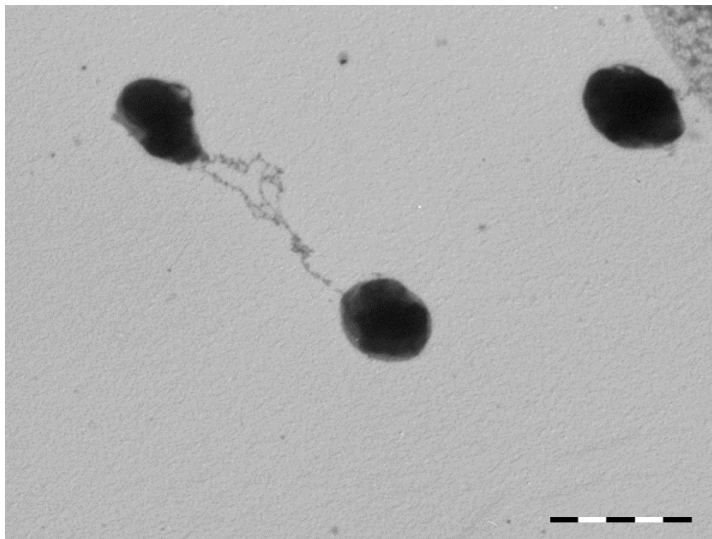


Fig. 65. Imagen de A4BC2 crecida en medio HM de requerimientos mínimos por microscopio de transmisión electrónica. Bar. 2 μm .

Son bacilos pleomorficos, con flagelos monotricos (Figura 65) y Gram negativos. Las colonias en agar HM son redondas, escasamente pigmentados de color rojo. Halófilas extremas, ya que el crecimiento se da entre 17.5 y 30 % (p/v) Subov, con un crecimiento óptimo localizado al 25 % (p/v) Subov. Catalasa positiva y oxidasa negativa. El crecimiento tiene lugar en ausencia de magnesio. Su rango de temperatura para el crecimiento es de entre 15 y 55 °C (temperatura óptima, 45 °C) y el intervalo de pH está entre 5.5 y 8.5 (pH óptimo, 6.5-7.0). Hidroliza el tween 80, pero no la gelatina, ni el almidon, ni la caseína. Indol negativo. Carece de la β -

galactosidasa. Capaz de producir ácido a partir de glucosa y maltosa. La capacidad de utilización de los sustratos testados como fuente única de carbono y energía o carbono, nitrógeno y energía muestra resultados variables. Resistentes a la bacitracina (10 U), novobiocina (30 µg), penicilina G (10 U), cloranfenicol (30 µg), ampicilina (10 µg), eritromicina (15 µg) ciprofloxacina (5 µg), rifampicina (30 µg) y norfloxacina (10 µg).

El principal lípido polar presente es el éster metílico de fosfato de fosfatidilglicerol (PGP-Me). En pequeñas cantidades presenta también dos glicolípidos (GL1a y GL1b) y una pequeña cantidad de fosfatidilglicerol (PG) (Figura 66).

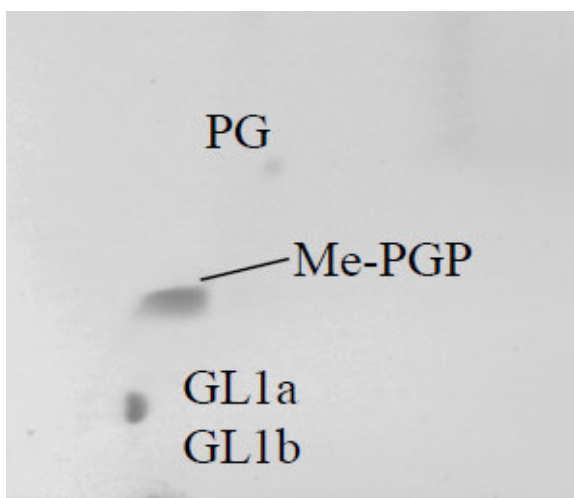


Fig. 66. Perfil lipídico de A4BC2 crecida en medio HM al 25% (v/w) a 45°C.

El contenido de G+ C del DNA tipo de la cepa A2BC4^T es 58.35 mol %. La secuencia completa del gen 16S del rRNA se encuentra depositada en las bases de datos del Genbank/EMLB con el número de acceso **JX134755**.

Esta cepa se encuentra actualmente en proceso de recuperación, debido a las complicadas condiciones de crecimiento y a la imposibilidad de haber creado un medio de cultivo que favorezca su desarrollo, y obtención de suficiente biomasa para cumplir los requisitos mínimos de las colecciones de cultivos existentes y su posterior inclusión como especie nueva en el IJSEM, revista de referencia de la taxonomía microbiana. El árbol filogenético que contiene la secuencia de *Halorhabdus gadibusense* (A4BC2^T) y de aquellas especies de colección próximas a esta nueva especie se muestra en la figura 67.

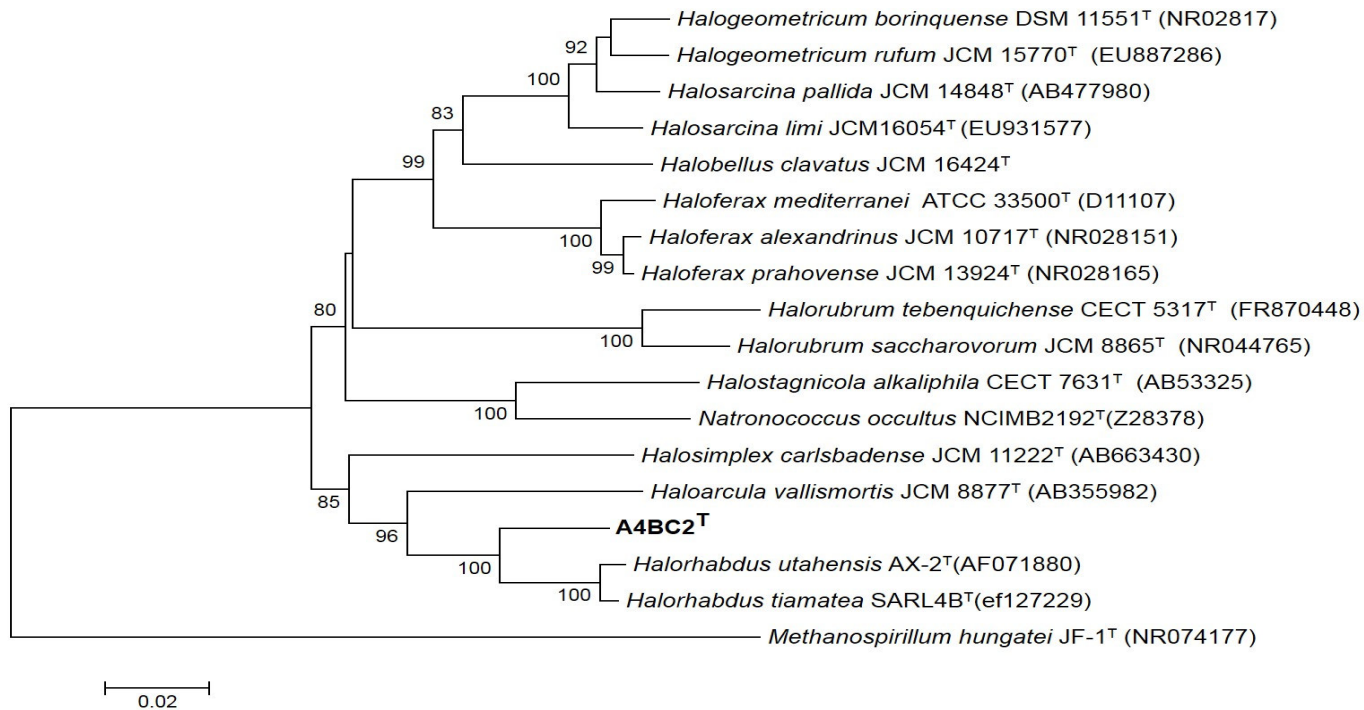


Fig. 67. Árbol basado en el método “Neighbour-joining” que muestra la relación filogenética basada en las secuencias del gen 16S rRNA de la cepa A4BC2^T y otras cepas validadas relacionadas. Los valores de “Bootstrap” son expresados en porcentajes de 1000 replicaciones. Bar, 0.02 cambios por la posición del nucleótido.

CONCLUSIONES

1- Se han aislado y caracterizado un total de 426 cepas microbianas representativas de la diversidad procariota de tres ambientes salinos localizados en distintas provincias andaluzas: Laguna salada de Fuente de Piedra (Málaga); salinas solares de Santa María de Jesús (Cádiz) y salinas de interior de La Malahá (Granada)

2- En los estudios de taxonomía numérica se seleccionaron 91 cepas procedentes de Fuente de Piedra, 76 de La Malahá y 99 de Bahía de Cádiz. Las cepas de arqueas se agruparon en torno al 70% de semejanza, originando 6 fenones para las cepas procedentes de la laguna de Fuente de Piedra, 5 fenones para las aisladas de La Malahá y 7 fenones para las cepas de la Bahía de Cádiz. La población de bacterias, también agrupadas en torno al 70% de semejanza, se distribuyeron en 2 fenones para las procedentes de Fuente de Piedra, 5 fenones para las aisladas de La Malahá y 4 fenones para cepas de las salinas de la Bahía de Cádiz.

3- A partir de los fenones obtenidos por taxonomía numérica, se seleccionaron un total de 65 arqueas y 37 bacterias para realizar los estudios de taxonomía molecular. Procedentes de la Laguna salada de Fuente de Piedra, 30 eran arqueas y 6 bacterias; de las salinas de interior de La Malahá, 16 eran arqueas y 19 bacterias; y procedentes de las salinas solares de la Bahía de Cádiz, 19 eran arqueas y 12 bacterias.

4- La diversidad de arqueas es similar en los tres ambientes salinos estudiados y está representada por los géneros *Halorubrum*, *Haloterrigena*, *Haloarcula* y *Natrinema*. En relación a las bacterias, los géneros que se encuentran en los tres ambientes estudiados son: *Halomonas*, *Salicola*, y *Halobacillus*.

5- En cada ambiente salino estudiado se han encontrado géneros de forma particular, resaltando la presencia de la arquea *Halobellus* en Fuente de Piedra y *Halorhabdus* en Bahía de Cádiz. De igual forma, destaca la presencia de las bacterias *Paraliobacillus*, *Idiomarina* y *Virgibacillus* en Fuente de Piedra; *Alkalibacillus*, *Halospina*, *Salinibacter* y *Salinococcus* en La Malahá; y *Thalassobacillus* en Bahía de Cádiz.

6- La salina de Fuente de Piedra destaca como el ambiente con mayor biodiversidad en el dominio de arqueas, formada por nueve géneros distintos dentro de la familia *Halobacteriaceae*. Las salinas de interior de la Malahá sobresalen por la mayor variabilidad en el dominio bacteriano, presentando nueve géneros localizados en los filos: *γ-Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes*.

7- El perfil lipídico de dos cepas pertenecientes al género *Halobellus*, obtenido mediante las técnicas HPTLC y MALDI-Tof, han definido una nueva estructura lipídica no descrita previamente, el bis-sulfato-diglicosil-diether (S₂-DGD).

8- El presente trabajo ha llevado, hasta el momento, a la descripción de dos nuevas especies:

Alkalibacillus almallahensis spp. nov., bacteria halófila procedente del sedimento de la salina de interior de La Malahá.

Y *Halobellus ramosii* spp. nov., arquea halófila extrema aislada del agua y sedimento de Fuente de Piedra.

ANEXOS

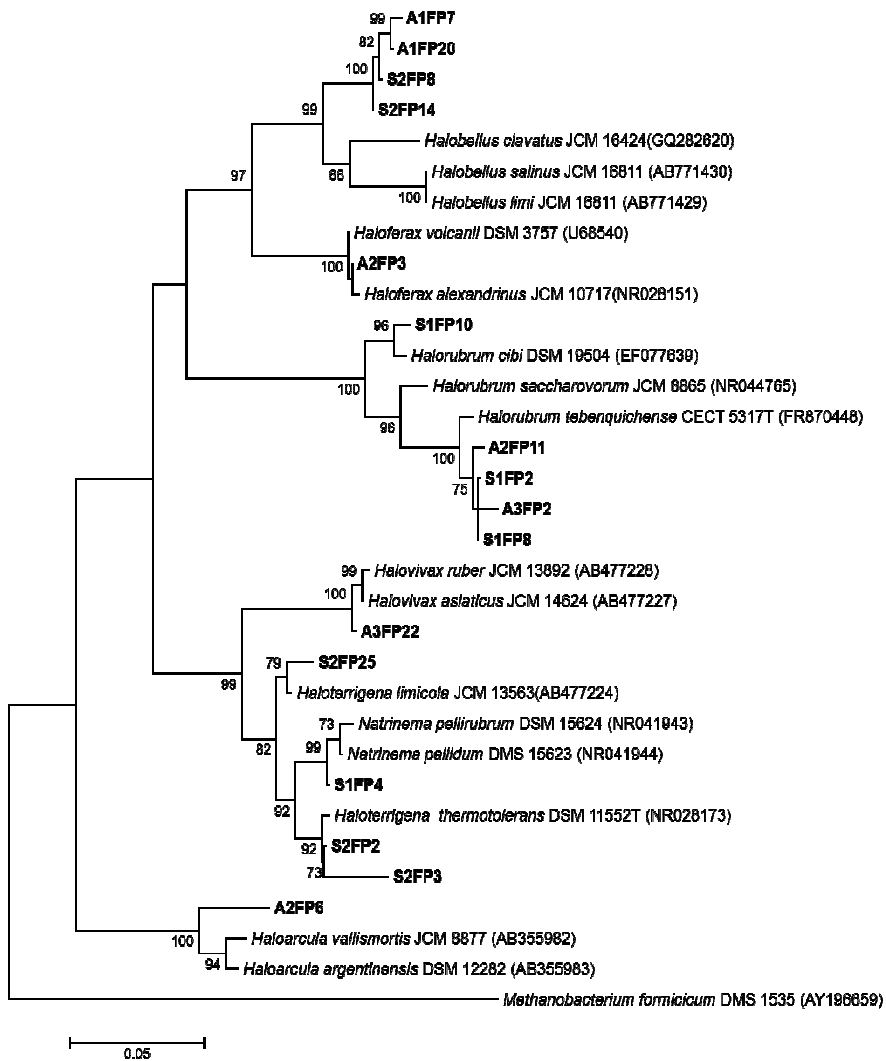


Fig. Anexo 1. Análisis filogenético de las arqueas de Fuente de Piedra (Málaga) por el método de Maximum Likelihood.

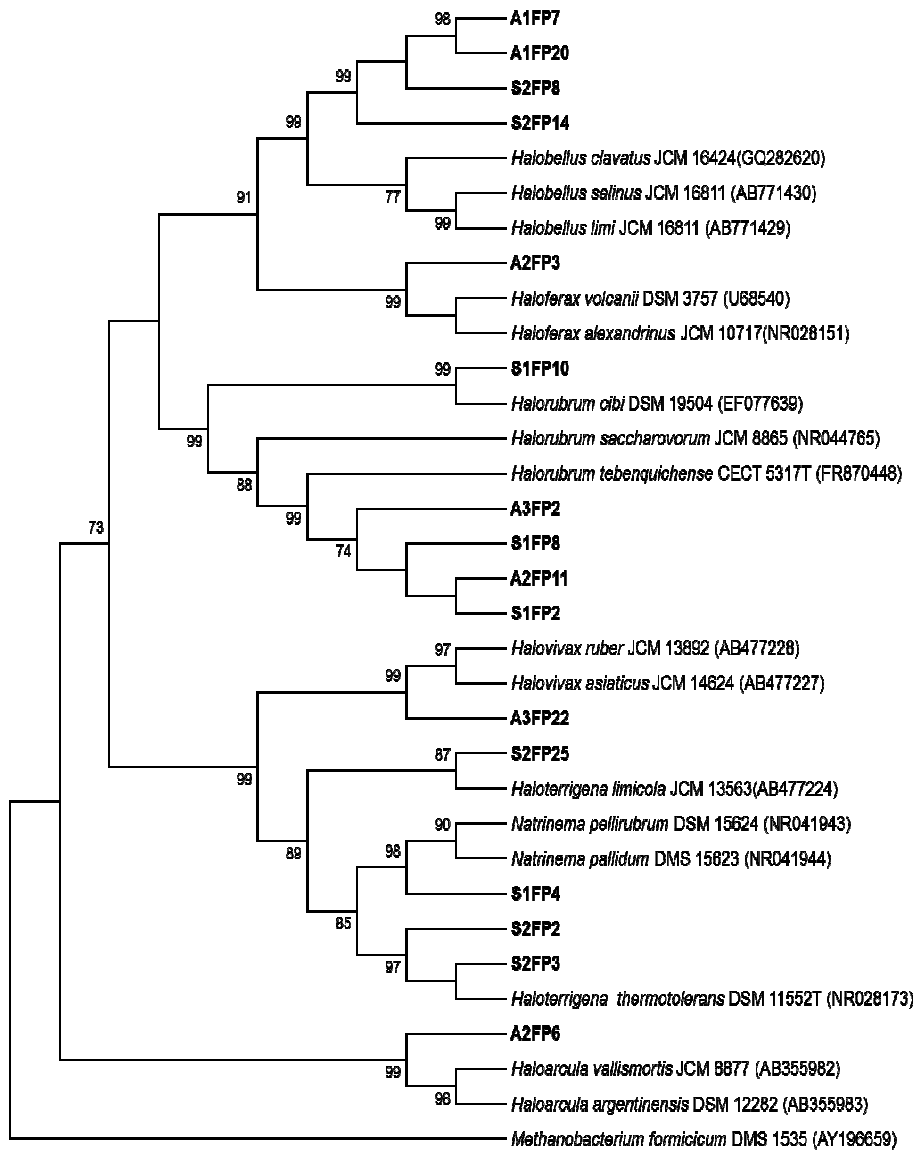


Fig. Anexo 2. Análisis filogenético de las arqueas de Fuente de Piedra (Málaga) por el método de Maximum Parsimony.

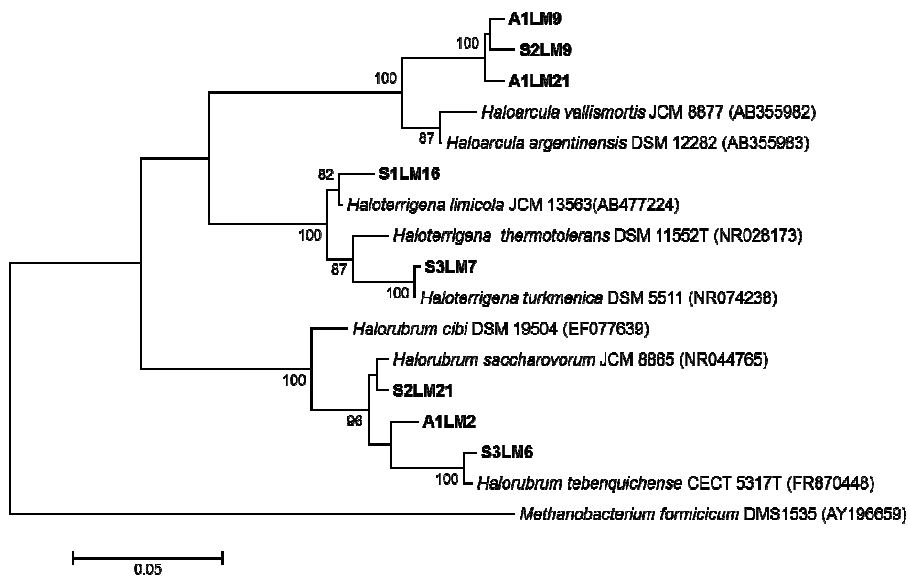


Fig. Anexo 3. Análisis filogenético de las arqueas de La Malahá (Granada) por el método de Maximum Likelihood.

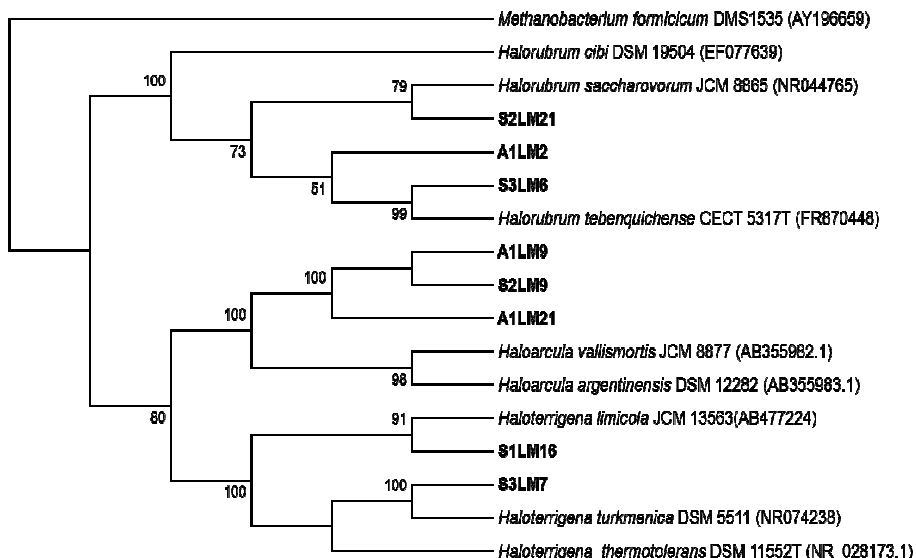


Fig. Anexo 4. Análisis filogenético de las arqueas de La Malahá (Granada) por el método de Maximum Parsimony.

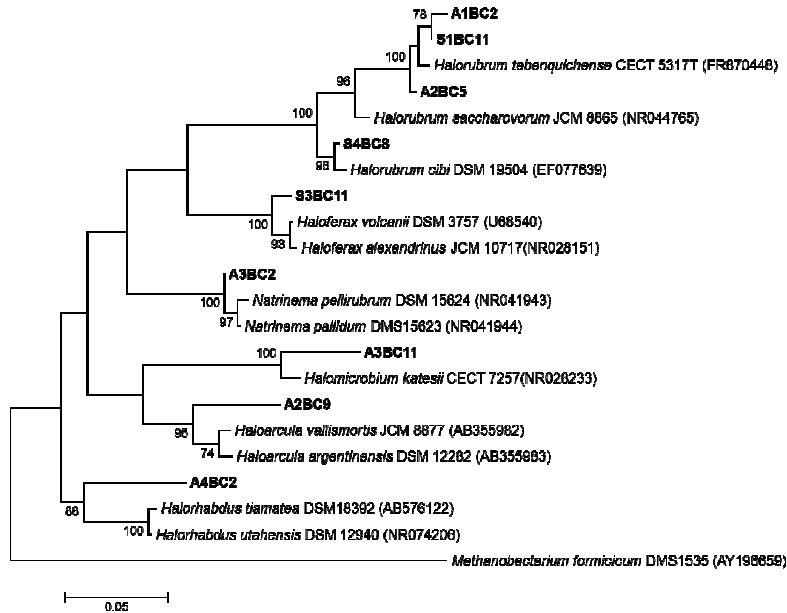


Fig. Anexo 5. Análisis filogenético de las arqueas Santa Mª de Jesús (Bahía de Cádiz) por el método de Maximum Likelihood.

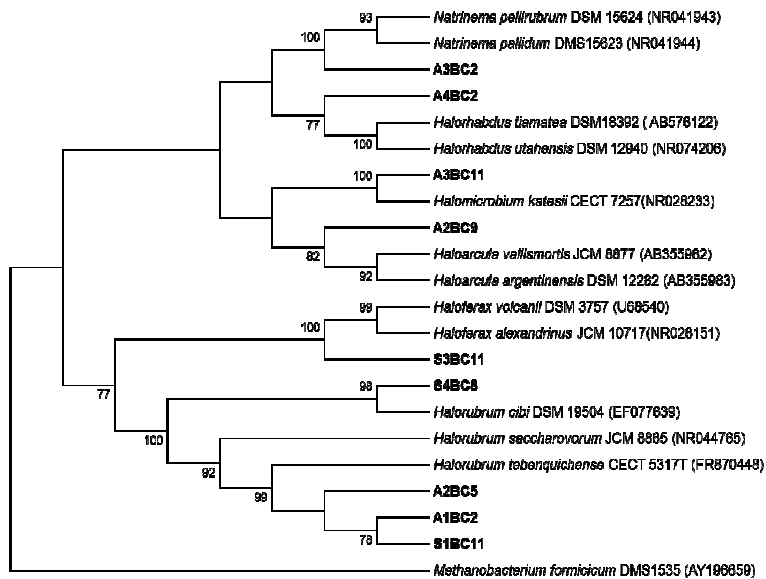


Fig. Anexo 6. Análisis filogenético de las arqueas de Santa Mª de Jesús (Bahía de Cádiz) por el método de Maximum Parsimony.

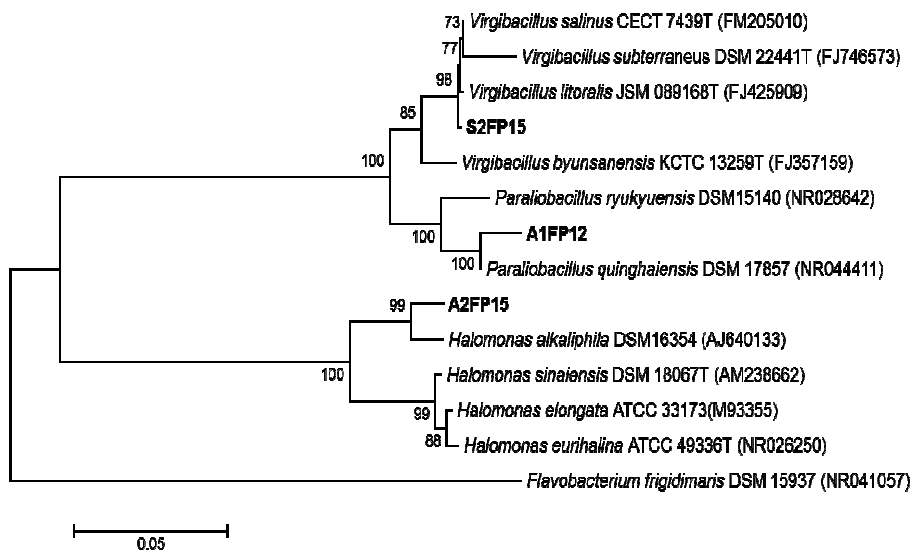


Fig. Anexo7. Análisis filogenético de las bacterias de Fuente de Piedra (Málaga) por el método de Maximum Likelihood.

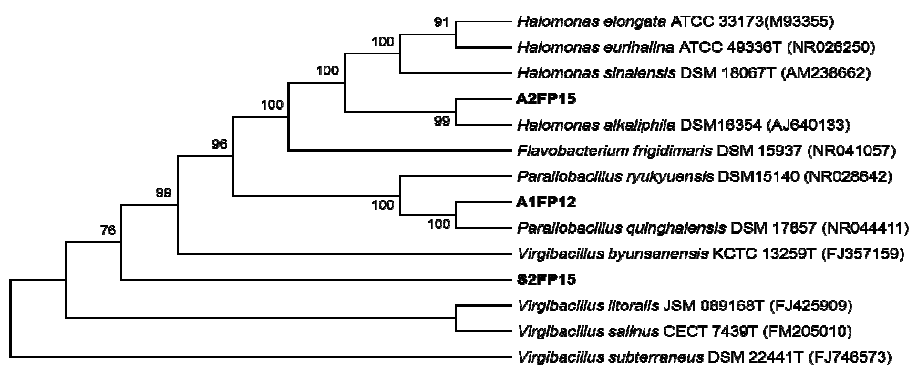


Fig. Anexo 8. Análisis filogenético de las bacterias de Fuente de Piedra (Málaga) por el método de Maximum Parsimony.

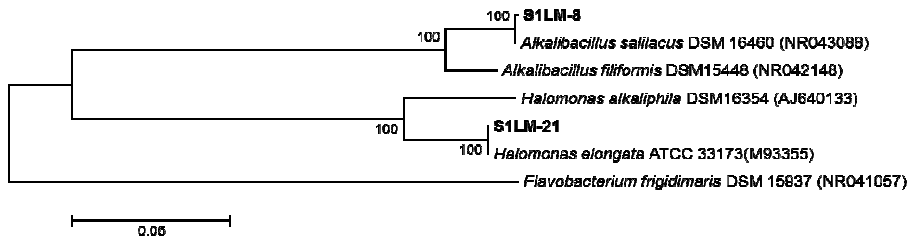


Fig. Anexo 9. Análisis filogenético de las bacterias de La Malahá (Granada) por el método de Maximum Likelihood.

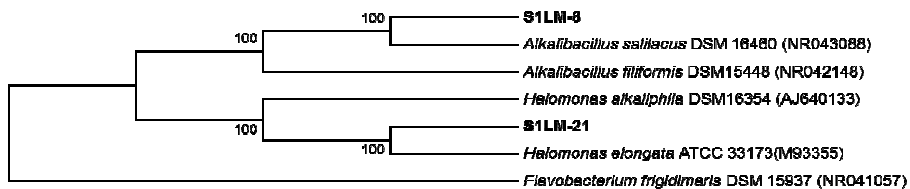


Fig. Anexo 10. Análisis filogenético de las bacterias de La Malahá (Granada) por el método de Maximum Parsimony.

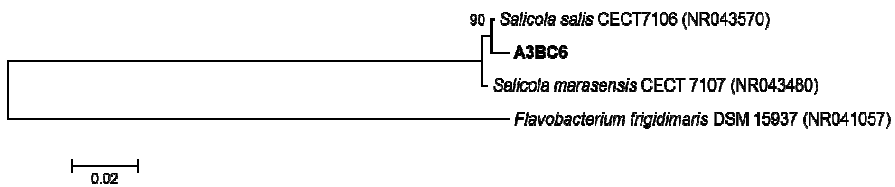


Fig. Anexo 11. Análisis filogenético de las bacterias de Santa Mª de Jesús (Bahía de Cádiz) por el método de Maximum Likelihood.

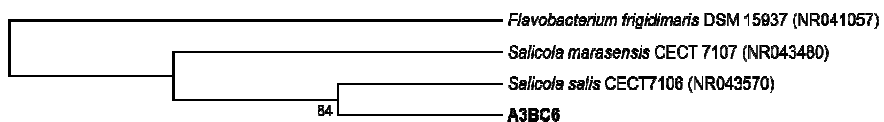


Fig. Anexo 12. Análisis filogenético de las bacterias de Santa Mª de Jesús (Bahía de Cádiz) por el método de Maximum Parsimony.

SECUENCIAS PARCIALES Y TOTALES DEL GEN 16S DEL rRNA

SECUENCIAS PARCIALES DE ARQUEAS DEL GEN 16S DEL rRNA DE FUENTE DE PIEDRA (MALAGA)

>A1FP1

AATGGGGACGAATTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGCGGAATAGCTCAGTAACACG
 TGGCCAACTACCTTCGGAACACAATACCCTCGGGAACTGAGGCTAATAGTGTATACCATACCAC
 CACTGGAATGAGTGGTATGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAG
 ACGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTATGGGTCATGAGAGTGAGAACCCAGAGAC
 GGAATCTGAGACAAGATTCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCCGGAACCTTTACTGTCACGAC
 AGTGCATAGGGGGTCCCAAGTGCACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGGTACCCTAAGGCGGTA
 CCAGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCCGCGGTAATACCGGCAGCCCAAGTGATGG
 CCGATCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAAATCCACCTGCTCA
 ACAGGTGGGCGCCCGGTAGAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCCGGG
 GTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCGCCGATGGCGAAAGCACGTGCGGAGAACGGAT
 CCGACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGAT

>A1FP5

GTATGAGATCGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGCGGAATAGCTCAGTAACACG
 TGGCCAACTACCTTCGGAACACAATACCCTCGGGAACTGAGGCTAATAGTGTATACCACATCAC
 CACTGGAATGAGTGATGTGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAG
 ACGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTACGGGTCATGAGAGTGAGAACCCGGAGAC
 GGAATCTGAGACAAGATTCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCCGGAACCTTTACTGTCACGAC
 AGTGCATAGGGGGTCCCAAGTGCACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGGCACCCCTAAGGCGGTG
 CCAGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCCGCGGTAATACCGGCAGCCCAAGTGATGG
 CCGATCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAAATCCACCTGCTCA
 ACAGGTGGGCGCCCGGTAGAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCCGGG
 GTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCGCCGATGGCGAAAGCACGTGCGGAGAACGGAT
 CCGACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGA

>A1FP7

TACAGAGACGCATAACCTCGGAACTGAGGCTAATCGTCATACCCCTCTCACGCTGGAATGCCAAG
 AGGCACAAACGCTCCCGCGTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGTTGGGGTAACGG
 CCCACCGTGCCATAATCGGTACGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGAATCTGAGACAAG
 ATTCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCCGCGAAACCTTTACTGTCACGCACGTGCGATAAGGGGA
 CTCCGAGTGCGAGGGCATATCGTCCTCGCTTTTGTGTACCGTAGGGCGGTACACGAAACAAGAGCTG
 GGCAAGACCGGTGCCAGCCCGCGGTAATACCGGCAGCTCAAGTGATGGCCGATCTTATTGGGCC
 TAAAGCGTCCGTAGCTGGCCTCGAAAGTCCGTGGGAAATCCACACGCCCAACGTGTGGGCGTCCG
 GCGGAACTCCGAGGCTTGGGACCGGAAGGCTCGAGGGGTACGTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCC
 GTAATCCCGGACGGACCACCGATGGCGAAAGCACCTCGAGAAAACGGATCCGACAGTGAGGGACG
 AAAGCTAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCTAGCCGTAACGATGTTGCTAGGT
 GTGACACAGGCTACGCGCCTGTGTTGTGCCGTAGGGAAGCCGA

>A1FP17

AATGAGGACGATTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGCGGAATAGCTCAGTAACACGTT
 GCCAACTACCTTCGGAACACAATACCCTCGGGAACTGAGGCTAATAGTGTATACCATACCACCA
 CTGGAATGAGTGGTATGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGAC
 GGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTATGGGTCATGAGAGTGAGAACCCAGAGACGG
 AATCTGAGACAAGATTCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCCGGAACCTTTACTGTCACGACAG

TGCGATAGGGGATCCCAAGTGCACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGGTACCCTAAGGCGGTACC
AGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCCCAAGTGATGGCC
GATCTTATTGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAAATCCACCTGCTCAAC
AGGTGGGCGCCCGGTAGAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCCGGGGT
AGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCCCGATGGCGAAAGCACGTGCGGAGAACGGATCC
GACAGTGAGGGACGAAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATA

>A1FP19

GGATGAGATCGATTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGT
GGCCAACTACCTTCGGAACACAATACCCTCGGGAACTGAGGCTAATAGTGATACCATACCACC
ACTGGAATGAGTGGTATGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGA
CGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTATGGGTATGAGAGTGAGAACCAGAGACG
GAATCTGAGACAAGATTCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGTCACGACA
GTGCGATAGGGGGATCCCAAGTGCACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGGTACCCTAAGGCGGTAC
CAGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCCCAAGTGATGGC
CGATCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAAATCCACCTGCTCAA
CAGGTGGGCGCCCGGTAGAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCCGGGGT
AGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCCCGATGGCGAAAGCACGTGCGGAGAACGGATCC
GACAGTGAGGGACGAAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATA

>A2FP11

TCATGGGACGATTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGTG
GCCAACTACCTTCGGAACACAATACCCTCGGGAACTGAGGCTAATAGTGATATCGTACCACCA
CTGGAATGAGTGGTACGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGAC
GGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTATGGGTATGAGAGTGAGAACCAGAGACGG
AATCTGAGACAAGATTCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGTCACGACAG
TGCGATAGGGGGATCCCAAGTGCACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGGCACCCCTAAGGCGGTGCC
AGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCCCAAGTGATGGCC
GATCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAAATCCACCTGCTCAAC
AGGTGGGCGCCCGGTAGAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCCGGGGT
AGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCCCGATGGCGAAAGCACGTGCGGAGAACGGATCC
GACAGTGAGGGACGAAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATA

>A2FP21

TATGGGATCGATTTAGCCATGCTAGTTGTGCGGGTTTAGACCCGACGCGAAAGCTCAGTAACACGTG
GCCAAGCTACCTGTGGACGGGAATACTCTCGGGAACTGAGGCTAATCCCGGATAACGCTTTGCTC
CTGGAAGGGGCAAAGCCGGAACGCTCCGGCGCCACAGGATGCGGCTGCGGTGCGATTAGGTAGAC
GGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGG
AATCTGAGACAAGATTCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGTCACGAAAG
TGCGATAAGGGGACTCCGAGTGTGAAGGCATAGAGCCTTCACTTTGTACACCGTAAGGTGGTGCA
CGAATAAGGACTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGTCCGAGTGATGGCC
GATCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCTGAACAAGTCCGTTGGGAAATCTGTCCGCTTAAC
GGGACGGCGTCCAGCGAAACTGTTTCAGCTTGGGACCGGAAGACCTGAGGGGTACGTCTGGGGTA
GGAGTGAAATCCTGTAATCCTGGACGGACCCCGGTGGCGAAAGCGCCTCAGGAGAACGGATCCG
ACAGTGAGGGACGAAAAGCTAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACC

> S1FP2

AAATGCGACGAATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGT
 GGCCAAACTACCTTCGGAACACAATACCTCGGGAAACTGAGGCTAATAGTGTATACCATACCACC
 ACTGGAATGAGTGGTATGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGA
 CGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTATGGGTCATGAGAGTGAGAACCCAGAGACG
 GAATCTGAGACAAGATTCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACGACGACA
 GTGCGATAGGGGGATCCCAAGTGACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGGTACCCTAAGGCGGTAC
 CAGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACGGCAGCCCAAGTGATGGC
 CGATCTTATTGGCCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGAAATCCACCTGCTCAA
 CAGGTGGGCGCCCGGTAGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCAGCGGTACGTCCGGGGT
 AGGAGTAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCGCCGATGGCGAAAGCACGTGCGGAAACGGATCC
 GACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGA

>S2FP6

AAATGGGATCGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGT
 GGCCAAACTACCTTCGGAACACAATACCTCGGGAAACTGAGGCTAATAGTGTATACCATACCACC
 ACTGGAATGAGTGGTATGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGA
 CGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTACGGGTCATGAGAGTGAGAACCCGGAGACG
 GAATCTGAGACAAGATTCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACGACGACA
 GTGCGATAGGGGGATCCCAAGTGACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGGCACCCCTAAGGCGGTG
 CAGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACGGCAGCCCAAGTGATGGC
 CGATCTTATTGGCCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGAAATCCACCTGCTCAA
 CAGGTGGGCGCCCGGTAGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCAGCGGTACGTCCGGGGT
 AGGAGTAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCGCCGATGGCGAAAGCACGTGCGGAGAACGGATCC
 GACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGAT

>S2FP16

AGTGGGAACGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGTG
 GCCAAACTACCTTCGGAACACAATACCTCGGGAAACTGAGGCTAATAGTGTATACCATACCACCA
 CTGGAATGAGTGGTATGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGAC
 GTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTACGGGTCATGAGAGTGAGAACCCGGAGACGG
 AATCTGAGACAAGATTCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACGACGACG
 TGCGATAGGGGGATCCCAAGTGACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGGCACCCCTAAGGCGGTGCC
 AGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACGGCAGCCCAAGTGATGGCC
 GATCTTATTGGCCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGAAATCCACCTGCTCAAC
 AGGTGGGCGCCCGGTAGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCAGCGGTACGTCCGGGGT
 AGGAGTAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCGCCGATGGCGAAAGCACGTGCGGAGAACGGATCC
 GACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGAT

>A3FP1

AATGGGATCGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGTG
 GCCAAACTACCTTCGGAACACAATACCTCGGGAAACTGAGGCTAATAGTGTATACCATACCACCA
 CTGGAATGAGTGGTATGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGAC
 GGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTATGGGTCATGAGAGTGAGAACCCAGAGACGG
 AATCTGAGACAAGATTCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACGACGACG
 TGCGATAGGGGGATCCCAAGTGACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGGTACCCTAAGGCGGTACC
 AGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACGGCAGCCCAAGTGATGGCC
 GATCTTATTGGCCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGAAATCCACCTGCTCAAC
 AGGTGGGCGCCCGGTAGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCAGCGGTACGTCCGGGGT

AGGAGTGAATCCCGTAATCCTGGACGGACCGCCGATGGCGAAAGCACGTCGCGAGAACGGATCC
GACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGAT

>A3FP21

TGACCGAATTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGTGGCCA
AACTACCCCTCGGAACACAATACCCTCGGGAAACTGAGGCTAATAGTGTATACCATAACCACCTGG
AATGAGTGGTATGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTG
GGGTAACGGCCCACCGTGCCAATAATCGGTATGGGTCATGAGAGTGAGAACCCAGAGACGGAATCT
GAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGCACGACAGTGCG
ATAGGGGGATCCCAAGTGACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGGTACCCTAAGGCGGTACCAGAA
TAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCCCAAGTGTATGGCCGATC
TTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAATCCACCTGCTCAACAGGT
GGGCGCCCGGTAGAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCCGGGGTAGGA
GTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCGCCGATGGCGAAAGCACGTCGCGAGAACGGATCCGACA
GTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGG

>S2FP14

CATGGCTAGTGTGCGAGTTCACACTCGCGGCAATAGCTCATTAAACAGTGGCCTACTACCCTACAGA
GACGCATAACCTCGGAAACTGAGGCTAATTCGTATACCCCTCTCACGCTGGAATGCCAAGAGGCA
CAAACGCTCCCGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCACC
GTGCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCGGAGACGGAATCTGAGACAAGATTCCG
GGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGCACGCACGTGCGATAAGGGGACTCCG
AGTGCGAGGGCATATCGTCTCGTTTTGTGTACCGTAGGGCGGTACACGAACAAGAGCTGGGCAA
GACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCTCAAGTGTATGGCCGATCTTATTGGGCCTAAAG
CGTCCGTAGCTGGCCTGAAAGTCCGTGCGGAAATCCACGCGCCCAACGTGTGGGCGTCCGGCGGA
AACTCCGAGGCTTGGGACCGGAAGGCTCGAGGGGTACGTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAAT
CCCGGACGGACCACCGATGGCGAAAGCACCTCGAGAAAACGGATCCGACAGTGAGGGACGAAAGC
TAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCTAGC

>A3FP5

AGAATGGGACGATTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGT
GGCCAAACTACCCCTCGGAACACAATACCCTCGGGAAACTGAGGCTAATAGTGTATACCATAACCAC
ACTGGAATGAGTGGTATGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGA
CGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTATGGGTCATGAGAGTGAGAACCCAGAGACG
GAATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGCACGACA
GTGCGATAGGGGGATCCCAAGTGACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGGTACCCTAAGGCGGTAC
CAGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCCCAAGTGTATGGC
CGATCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAATCCACCTGCTCAA
CAGGTGGGCGCCCGGTAGAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCCGGGGT
AGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCGCCGATGGCGAAAGCACGTCGCGAGAACGGATCC
GACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGA

>S2FP2

TTGCACGGAAGTTCAGACTCGTAGCAGATAGCTCAGTAACACGTGGCCAAACTACCCATGGATCCGA
ATAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATTCGGAATACGATTACCCGCTGGAGTGGTGTGAATCCGAAA
CGCTCCGGCGCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCACCGTG
CCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGTATCTGAGACAAGATACGGGGC
CCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGCACGAAAGTGCAGATAAGGGGACTCCAAGT
GCGAGGGCATATAGTCTCGTTTTTTCGACCGTAAGGTGGTTCGCGGAATAAGTGTGGGCAAGAC

CGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGCAGAGTGATGACCGCTATTATTGGGCCTAAAGCGT
 CCGTAGCTGGCCGTGCAAGTCCATCGGGAAATCCGCGCGCTAACGCGCGGGCGTCCGGTGAAAC
 TGCATGGCTTTGGGACCGGAAGACCAGAGGGGTACGTCCGGGGTAGGAGTAAATCCCCTAATCCT
 GGACGGACCACCGGTGGCGAAAGCGCCTCTGGAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTC
 GGGTCACGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCGAGCTGTAAA

>A3FP2

TTTGGGGAATGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGT
 GGCCAAACTACCCTTCGGAACACAATACCCTCGGGAAACTGAGGCTAATAGTGATACCATAACCACC
 ACTGGAATGAGTGGTATGCCAAACGCTCCGGCCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGA
 CGGTGGGGTAACGGCCACCCTGCCAATAATCGGTATGGGTGATGAGAGTGAGAACCCAGAGACG
 GAATCTGAGACAAGATTCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACAGACA
 GTGCGATAGGGGGATCCAAGTGCACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGGTACCCTAAGGCGGTAC
 CAGAATAAGGGCTGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCCCAAGTGATGGC
 CGATCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCTATCGGGAAATCCACCTGCTCAA
 CGGGTGGGCGCCCGGTAGAAACTGCGTGGCTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCCGGGG
 TAGGAGTGAAATCCCCTAATCCTGGACGGACCCGATGGCGAAAGCACGTGCGGAGAACGGATC
 CGACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGA

>A2FP6

TTGGCACGAAGTTTAGACCCGTAGCATATAGCTCAGTAACACGTGGCCAAACTACCCTACAGACCGCG
 ATAACCTCGGGAAACTGAGGCCAATAGCGGATATAACTCTCAGGCTGGAGTGCCGAGAGTTAGAAA
 CGTTCGGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGATGGTGGGGTAACGGCCACCATGC
 CGATAATCGGTACAGGTTGTGAGAGCAAGAACCTGGAGACGGTATCTGAGACAAGATACCGGGCC
 CTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACAGACAGTGGATAGGGGGACTCCGAGTG
 TGAGGGCATATAGCCCTCGCTTTTCTGTACCGTAAGGTGGTACAGGAACAAGGACTGGGCAAGACC
 GGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGTCCAAGTGATGGCCGATATTATTGGGCCTAAAGCGTC
 CGTAGCTTGTGTATAAGTCCATTGGGAAATCGACCAGCTCAACTGGTGGCGTCCGGTGGAAACTG
 TACAGCTTGGGGCCGAGAGACTCGACGGGTACGTCCGGGGTAGGAGTAAATCCTGTAATCCTGGA
 CGGACCAACCAATGGGGAAACCACGTTGAGAGACCGGACCCGACAGTGAGGGACGAAAGCTAGGGT
 CTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCTGGCTGTAAACA

>A3FP10

CCTGGGACCGGATTTAGCCATGCTAGTTCGCGAGTTCAGACTCGCAGCAGATAGCTCAGTAACACGT
 GGTCAAGCTACCCTGCAGACACGGACAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATCCGCGATACCGATCCCA
 CGCTGGAATGCCGGGATCTACAAACGCTCCGGCGCTGCAGGATGCGGCTGCGGCCGATTAGGTAGA
 CGGTGGGGTAACGGCCACCCTGCCGATAATCGGTACGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACG
 GAATCTGAGACAAGATTCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACAGCAA
 GTGCGATAAGGGGACTCCGAGTGGGAGGGCATATAGTCTCGCTTTTGAGAACCGTAAGGTGGTTC
 TCGAATAAGAGTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCCGCGGTAATACCGGCAGCTCAAGTGATGGC
 CAATCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGTGAAAGTTCGTGGGAAATCCATCCGCTCAA
 CGGATGGGCGTCCGGCGAAAACCTCACGGCTTGGGACCGGAAGGCTCGAGGGGTACGTCCGGGGT
 AGGAGTGAAATCCTGTAATCCTGGACGGACCCGATGGCGAAAGCACCTCGAGAAGACGGATCC
 GACAGTGAGGGACGAAAGCTAGGGTCTCGAACCGGATTAGA

>A3FP22

GTATTGGGGTCGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCAGATAGCTCAGTAACACG
 TGGCCAAACTACCCTGTGATCGGGACACCCTCGGGAAACTGAGGCTAATCCCGGATACGGCTCGCT
 GCCTGGAGTTGGCGCGAGCTCGAAACGTTAGGCGCGACAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTA

GACGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCGATAATCGGTACGGGTTGTGAAAGCAAGAGCCCGGAGA
CGGAATCTGAGACAAGATTCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGCACGC
GAGTGCATAGGGGGACTCCAAGTGCAGGGCATAACAGTCTCGCTTTTACCACCGTAAGGAGGT
GGTAGAATAAGTGTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCCGCGGTAATACCGGCAGCAGAGTGATG
ACCGCTATTATTGGGCTAAAGCGTCCGTAGCCGGCCAGGCAAGTCCATCGGGAAATCCGCACGCT
AACGTGCGGGCGTCCGGTGGAACTGCTTGGCTTGGGACCGGAAGATCCAGAGGGTACGTCTGGG
GTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGGAAAGACGGAT
CCGACGGTGAGGGACGAAAGCTTGGGTACGAACCGGATTAG

>S1FP4

GGATGGGTCGATTTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCAGATAGCTCAGTAACACGTG
GCCAACTACCTATGGATCCGAATAACCTCGGGAACTGAGGCTAATGCGGAATAGCGTTCATCGC
CTGGAGTGGCACGAACGCGAAACGTTACGGGCCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGAC
GGTGGGGTAACGGCCACCGTCCCATATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGG
TATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCCGCGAAACCTTTACACTGCACGCGAG
TGCGATAAGGGGACTCCGAGTGCAGGGGCATATAGTCTCGCTTTTACGACCGTAAGGTGGTGTG
AGAATAAGTGTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCCGCGGTAATACCGGCAGCAGAGTGATGACC
GCTATTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCACGCAAGTCTATCGGGAAATCCGCGCGCTAAC
GCGCGGGCGTCCGGTGGAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGACCAGAGGGGTACGTCCGGGGT
AGGAGTGAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGGAAAGACGGATCC
GACGGTGAGGGACGAAAGCTCGGGTCACGAACCGGATTAGAT

>S1FP8

GGGGGACCGATTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGTGG
CCAACTACCTTCGGAACACAATACCTCGGGAACTGAGGCTAATAGTGTATACCATACCACCAC
TGGAATGAGTGGTATGCCAAACGCTCCGGCGCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACG
GTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTATGGGTATGAGAGTGAGAACCAGAGACGGGA
ATCTGAGACAAGATTCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCCGCGAAACCTTTACACTGCACGACAGT
GCCATAGGGGGATCCAAGTGCACAGGCATAGCGCTGTGCTTTTCCGTACCCTAAGCGGTACCA
GAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCCGCGGTAATACCGGCAGCCCAAGTGATGGCCG
ATCTTATTGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAAATCCACCTGCTCAACA
GGTGGGCGCCCGGTAGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCCGGGGTA
GGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCAGCGGATGGCGAAAGCACGTGCGGAGAACGGATCCG
ACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATAC

>S2FP22

GCGCGGGATCGATTAGCCATGCTAGTTGCGCGAGTTCAGACTCGCAGCAGATAGCTCAGTAACACGTG
GTCAAGCTACCTGCAGACACGGACAACCTCGGGAACTGAGGCTAATCCGCGATACCGATCCAC
GCTGGAATGCCGGGATCTACAAACGCTCCGGCGCTGCAGGATGCGGCTGCGGCCGATTAGGTAGAC
GGTGGGGTAACGGCCACCGTCCGATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGG
AATCTGAGACAAGATTCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCCGCGAAACCTTTACACTGCACGCAAG
TGCGATAAGGGGACTCCGAGTGCAGGGGCATATAGTCTCGCTTTTGAAGACCGTAAGGTGGTTCT
CGAATAAGAGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCCGCGGTAATACCGGCAGCTCAAGTGATGGCC
AATCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGTGAAAGTTCGTGCGGAAATCCATCCGCTCAAC
GGATGGGCGTCCGGCGAAAACCTCACGGCTTGGGACCGGAAGGCTCGAGGGGTACGTCCGGGGTA
GGAGTGAAATCCTGTAATCCTGGACGGACCAGCGGATGGCGAAAGCACCTCGAGAAAGACGGATCCG
ACAGTGAGGGACGAAAGCTAGGGTCTCGAACCGGATTAGAT

>S2FP20

GATGGGGTCGATTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCATACTCGTGGCGAAAAGCTCAGTAACACGTGG
 CCAAACCTACCTACAGAGAACGATAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATAGTTCATACGGGAGTCATG
 CTGGAATGCCACTCCCCGAAACGCTCAGGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACG
 GTGGGGTAACGGCCACCGTGCCGATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGA
 ATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTACTGCACGCAAGT
 GCGATAAGGGGACCCCAAGTGCAGGGGCATATAGTCTCGCTTTTCTCGACTGTAAGGCGGTGCGAG
 GAATAAGAGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCTCAAGTGATGACCG
 ATATTATTGGCCCTAAAGCGTCCGTAGCCGGCCACGAAGTTCATCGGGAAATCCGCCAGCTCAACT
 GCGGGCGTCCGGTGAACACCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCTCGAGGGGTACGTCGGGGTA
 GGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGATGGCGAAAAGCACCTCGAGAAGACGGATCCG
 ACGGTGAGGGACGAAAGCTAGGGTCTCGAACCGGATTAGATA

>S2FP25

CATGGCATCGATTTAGCCATGCTAGTTGTACGAGTTTACTCGTAGCAGATAGCTCAGTAACACGTG
 GCCAAACTACCTATGGATCCGGACAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATCCGGAATACGGCTCTCAG
 CCTGGAAGTGGCGAGAGTCAGAAACGCCCCGGCGCCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAG
 ACGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGAC
 GGTATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTACTGCACGAC
 AGTCGATAAAGGGGACTCCAAGTGCAGGGCATATAGTCTCGCTTTTACCACCGTAAGGAGGTG
 GTAGAATAAGTGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCCGCGGTAATACCGGCAGCACGAGTGATGA
 CCGCTCTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCACGCAAGTCTATCGGGAAATCCGCGCGCTCA
 ACGCGCGGGCTCCGGTGGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGACAAAAGGGTACGTCGGGG
 TAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGGTGGCGAAAGCGCTTCTGGAAGACGGATCC
 GACGGTGAGGGACGAAAGCTCGGGTACGAACCGGATTAGA

>S1FP10

TTAGTTTCTGACGACTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCGAATAGCTCAGTAACAC
 GTGGCCCAATTACCCTTCGGAGCACCATAACCCTCGGGAAACTGAGGCTAATAGTGCATACCACAGTC
 CACTGGAATGAGGACTGTGCCAACGCTCCGGCGCCGAAAGATGTGGCTGCGGACGATTAGGTA
 GACGGTGGGGTACCGGCCACCGTGCCAATAATCGGTACGGGTGGTGAGAGCCAGAACCCGGGAGA
 CGGAATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTACTGCACGA
 CAGTGCATAAAGGGGATCCCAAGTGCGTAGGCTTAGAGCCTACGCTTTTGTCCACCGTAGGGAGGT
 GGACGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCCCAAGTGATG
 GCCGATCTTATTGGCCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAAATCCACCCGCC
 AACGGGTGGCCGTCCGGTGGAAACTGCGTGGCTTGTGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCGGGG
 GTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGATGGCGAAAAGCACGTCGCGAGAACGGAT
 CCGACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATA

>A1FP20

CATGGCTAGTCGCGAGTTCATAGTCGAGCTGaTAGGTCCTGGACCTGGCTAACTACCCTACAG
 AGACGCATAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATTCGTCATACCCTCTCACGCTGGAATGCCAAGAGGC
 ACAACGCTCCCGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCAC
 CGTGCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGAATCTGAGACAAGATTCC
 GGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTACTGCACGCACGTGCGATAAAGGGACTCC
 GAGTGCAGGGGCATATCGTCTCGCTTTTGTGTACCGTAGGGCGGTACACGAACAAGAGCTGGGCA
 AGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCTCAAGTGATGGCCGATCTTATTGGCCCTAAA
 GCGTCCGTAGCTGGCCTCGAAAGTCCGTGGGAAATCCACACGCCAACGTGTGGGCGTCCGGCGG
 AAACCTCGAGGCTTGGGACCGGAAGGCTCGAGGGGTACGTCGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAA

TCCCGGACGGACCACCGATGGCGAAAGCACCTCGAGAAAACGGATCCGACAGTGAGGGACGAAAAG
CTAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCTAGC

>S2FP27

AAAGGGATCGATTTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCAGATAGCTCAGTAACACGTG
GCCAACTACCTATGGATCCGAATAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATGCGGAATAGCGTTCATCGC
CTGGAGTGGCACGAACCGCAAACGTTACGGCGCCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGAC
GGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCATAATCGGTACGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGG
TATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACGACGCGAG
TGCGATAAGGGGACTCCGAGTGCAGGGGCATATAGTCTCGCTTTTCACGACCGTAAGGTGGTGT
AGAATAAGTGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCAGAGTGATGACC
GCTATTATTGGGCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCACGCAAGTCTATCGGGAAATCCGCGCGCTTAAC
GCGCGGGCGTCCGGTGGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGACCAGAGGGGTACGTCGGGGT
AGGAGTGAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGGTGGCGAAAGCGCCTCTGGAAGACGGATCC
GACGGTGAGGGACGAAAAGCTCGGGTACGAACCGGATTAGAT

>S2FP8

AGTAGATTTAGCATGCTAGTCTGCGAGTTCACACTCGCGGCTGTAGCTCATGGACACGTGGCCTACT
ACCCTACAGAGACGCATAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATTCGCATACCCCTCTCACGCTGGAATG
CCAAGAGGCACAAACGCTCCCGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGT
AACGGCCACCGTGCCATAATCGGTACGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGAATCTGAG
ACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACGACGACGTGCGATAA
GGGACTCCGAGTGCAGGGCATATCGTCTCGCTTTTGTACCGTAGGGCGGTACACGAACAAG
AGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGGTAATACCGGCAGCTCAAGTGATGGCCGATCTTATT
GGGCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCTCGAAAGTCCGTGCGGAAATCCACACGCCAACGTGTGGGC
GTCCGGCGGAAACTCCGAGGCTGGGACCGGAAGGCTCGAGGGGTACGTCGGGGGTAGGAGTGA
AATCCCGTAATCCCGACGGACCACCGATGGCGAAAGCACCTCGAGAAAACGGATCCGACAGTGAG
GGACGAAAAGCTAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGT

>A2FP3

TGAGTTCATACTCGTGGCGAAAAGCTCAGTAACACGTGGCCAAACTACCCACAGAGAACGATAACCT
CGGGAAACTGAGGCTAATAGTTCATACGGAGTCATGCTGGAATGCCGACTCCCCGAAACGCTCAG
GCGCTGATGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCGATAA
TCGGTACGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGAATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGG
GGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACGCAAGTGCAGATAAGGGGACCCCAAGTGCAGAGG
CATATAGTCTCGCTTTTCTGACTGTAAGGCGGTGAGGAATAAGAGCTGGGCAAGACCGGTGCC
AGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCTCAAGTGATGACCGATATTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGC
CGGCCACGAAGGTTATCGGGAAATCCGCCAGCTCAACTGGCGGGCGTCCGGTGAAAACACGTGG
CTTGGGACCGGAAGGCTCGAGGGGTACGTCGGGGTAGGAGTGAATCCCGTAATCCTGGACGGA
CCACCGATGGCGAAAGCACCTCGAGAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAAGCTAGGGTCTCG
AACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCTAGCT

>S2FP3

AGGGGTCTGGGTCCGATTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTGGCAGATAGCTCAGTAACA
CGTGGCCAACTACCCTATGGATCCGAATAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATTCGAATACGTTCA
CTGCCTGGAGTGGAGTGAATCCGAAACGCTCCGGCGCCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTA
GACGGGGGGTAACGGCCACCGTGCCCTAATCGGTACGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGA
CGGTATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACGCA
AAGTGCAGATAAGGGGACTCCAAGTGCAGGGGCATATAGTCTCGCTTTTGTACCGTAAGGTGGT

CGCGGAATAAGTGTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGGTAATACCGGCAGCACGAGTGATG
 ACCGCTATTATTGGGCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGTGCAAGTCCATCGGGAAATCCGCGCGCTT
 AACGCGGGGCGTCCGGAGCAAACGTCATGGCTTGGTGACCGGAAGACCAGAGGGGTACGTCCGG
 GGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACTGCTGTGGCGATAGCCTCTCTGGAAGACGGAT
 CCGACGGTGAGGGACGAAAGCTCGGGATCACGAACCGGA

SECUENCIAS PARCIALES DE ARQUEAS DEL GEN 16S DEL rRNA DE LA MALAHÁ (GRANADA)

>A1LM2

GGACGATTTAGCCATGCTAGTCGTACGAGTTCATACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGTGGCCAA
 ACTACCCTTCGGAACACAATACCCTCGGGAAACTGAGGCTAATAGTGCATACCATACTCCCCCTGGA
 ATGAGGGTTGTGCCAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGG
 GGTAACGCCCCACCGTGCCAATAATCGGTATGGGTTCATGAGAGTGAGAACCCGGAGACGGAATCT
 GAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCCGCGAAACCTTTACACTGCACGCCAGTGCGA
 TAGGGGAATCCCAAGTGCAGGCATAGAGCCTGTGCTTTTGTTCACCGTAGGGAGGTGAACGAAT
 AAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCCCGAGTGATGGCCGATTT
 TATTGGGCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCTGCGCAAGTCCATCGGAAAATCCACCTGCTCAACGGGTG
 GCGTCCGGTGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCCGGGGTAGGAG
 TGAATCCCGTAATCCTGGACGGACCGCCGATGGCGAAAAGCACGTGCGGAGGACGGATCCGACAGT
 GAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCG

>S2LM2

AATGGGACGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGTGG
 CCAAACCTACCTTCGGAACACAATACCCTCGGGAAACTGAGGCTAATAGTGTATACCATACCACCAC
 TGGAATGAGTGGTATGCCAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACG
 GTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTATGGGTTCATGAGAGTGAGAACCAGAGACGGA
 ATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCCGCGAAACCTTTACACTGCACGACAGT
 GCGATAGGGGGTCCCAAGTGACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCCGTACCGTAAGGTGGTACCA
 GAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCCCAAGTATGGCCG
 ATCTTATTGGGCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAAATCCACCTGCTCAACA
 GGTGGGCGCCCGGTAGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCCGGGGTA
 GGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCGCCGATGGCGAAAAGCACGTGCGGAGGACGGATCCG
 ACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATA

>S3LM2

AAATGAATTAGCCATGCTAGTTGTGCGGGTTTAGACCCGCAGCGGAAAGCTCAGTAACACGTGGCCAA
 GCTACCCTGTGGACGGGAATACTCTCGGGAAACTGAGGCTAATCCCGGATAACGCTTTGTCTCTGGA
 AGGGGCAAAGCCGGAACGCTCCGGCGCCACAGGATGCGGCTGCGGTGATTAGGTAGACGGTGG
 GGTAAACGCCCCACCGTGCCATAATCGGTACGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGAATCT
 GAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCCGCGAAACCTTTACACTGTACGAAAAGTGCG
 ATAAGGGGACTCCGAGTGTGAAGGCATAGAGCCTTCACTTTTGTACACCCTAAGGTGGTGACGAA
 TAAGGACTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGTCCGAGTGATGGCCGATCT
 TATTGGGCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCTGAACAAGTCCGTTGGGAAATCTGTCCGCTTAAACGGGCA
 GCGTCCAGCGGAAACTGTTAGCTTGGGACCGGAAGACCTGAGGGGTACGTCTGGGGTAGGAGT
 GAAATCCTGTAATCCTGGACGGACCGCCGATGGCGAAAAGCGCCTCAGGAGAACGGATCCGACAGT
 GAGGGACGAAAGCTAGGGTCTCGAACCGGATTAGATAACCCG

>S2LM9

GCATGGGATCGATTAGCCATGCTAGTCGCACGGGTTTCATGACTCGTGGCATATAGCTCAGTAACACG
TGGCCAACTACCCTACAGACCGCAATAACCTCGGGAACTGAGGCCAATAGCGGATATAACTCTCA
GGCTGGAGTGCCGAGAGTTAGAAACGTTCCGGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAG
ATGGTGGGGTAACGGCCACCATGCCGATAATCGGTACAGTTGTGAGAGCAAGAGCCTGGAGAC
GGTATCTGAGACAAGATAACGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCCGCGAAACCTTTACTGCACGAC
AGTGCATAGGGGGACTCCGAGTGTGAGGGCATATAGCCCTCGCTTTTCTGTACCCTAAGGTGGTA
CAGGAACAAGGACTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGTCCAAGTGTGG
CCGATATTATTGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTTGTGTAAAGTCCATTGGGAAATCGACCAGCTCA
ACTGGTCGGCGTCCGGTGAAACTACACAGCTTGGGGCCGAAAGACTCGACGGGTACGTCCGGGG
TAGGAGTGAAATCTGTAATCTGGACGGACCAATGGGGAAACCAGTTGAGAGACCGGACCC
GACAGTGAGGGACGAAAGCTAGGGTCTCGAACCGGATTAG

>S1LM20

GCTTATGGGATCGATTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCAGATAGCTCAGTAACACG
TTAGCCAACTACCCTATGGATCCGAATAACCTCGGGAACTGAGGCTAATTCGGAATACGATTAC
CACCTGGAGTGGTGTGAGCCGAAACGCTCCGGCGCCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAG
ACGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGAC
GGTATCTGAGACAAGATAACGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCCGCGAAACCTTTACTGCACGAA
AGTGCATAAGGGGACTCCAAGTGCAGGGCATATAGTCTCGCTTTTTGCGACCGTAAGGTGGTC
GCGGAATAAGTGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGCAGAGTGATGA
CCGCTATTATTGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGTGCAAGTCCATCGGGAAATCCGCGCGCTTA
ACGCGCGGGCGTCCGGTGAAACTGCATGGCTTGGGACCGGAAGACCAGAGGGGTACGTCCGGG
GTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCCGGTGGCGAAAGCGCCTCTGGAAGACGGAT
CCGACGGTGAGGGACGAAAGCTCGGGTCACGAACCGGATTA

>S3LM7

GAAGGGAGTCGATTTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCAGATAGCTCAGTAACACGT
GGCCAACTACCCTATGGATCCGAATAACCTCGGGAACTGAGGCTAATTCGGAATACGAATCCCAG
GCTGGAAGTCCGGGATTCCGAAACGTTACGGCGCCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGA
CGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCGATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACG
GTATCTGAGACAAGATAACGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCCGCGAAACCTTTACTGCACGCGA
GTGCGATAAAGGGACTCCAAGTGCAGGGCATATCGTCCTCGCTTTTTCGCGACCGTAAAGGTGGTTCG
CAGAATAAGTGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGCACAAGTGATGAC
CGCTATTATTGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCAGCAAGTCCATCGGGAAATCCGCGTGCTTAA
CGCGCGGGCGTCCGGTGAAACTGGATGGCTTGGGACCGGAAGACCAGAGGGGTACGTCCGGGG
TAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCCGGTGGCGAAAGCGCCTCTGGAAGACGGATCC
GACGGTGAGGGACGAAAGCTCGGGTCACGAACCGGATTAG

>A2LM5

ATCTTGTGGGATTGGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAAC
ACGTGGCCAACTACCCTTCGGAACACAATAACCTCGGGAACTGAGGCTAATAGTGATACCATAC
CACCACTGGAATGAGTGGTATGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGT
AGACGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTATGGGTATGAGAGTGAGAACCAGAG
ACGGAATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCCGCGAAACCTTTACTGCACG
ACAGTGCATAGGGGGATCCAAGTGCACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTTCGGTACCTAAGGCGG
TACCAGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGCCAAGTGTAT
GGCCGATCTTATTGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAAATCCACCTGCT
CAACAGGTGGGCGCCCGGTAGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCCGG
GGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCCGGATGGCGAAAGCACGTCGCGAGAACGGGA
TCCGACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGAT

>A1LM12

GTCACTGGAATCGATTTAGCCATGCTAGTTGTGCGGGTTTAGACCCGCAGCGGAAAGCTCAGTAACAC
 GTGGCCAAGCTACCCTGTGGACGGGAATACTCTCGGGAAACTGAGGCTAATCCCCGATAACGCTTT
 GCTCCTGGAAGGGGCAAAGCCGGAACGCTCCGGGCCACAGGATGCGGCTGCGGTGATTAGGT
 AGACGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAG
 ACGGAATCTGAGACAAGATTCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTACTGTACG
 AAAGTGCATAAGGGGACTCCGAGTGTGAAGGCATAGAGCCTTCACTTTGTACACCGTAAGGTGG
 TGCACGAATAAGGACTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCGGTAATACCGGCAGTCCGAGTGAT
 GGCCGATCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCTGAACAAGTCCGTTGGGAAATCTGTCCGCT
 TAACGGGCAGGCGTCCAGCGGAAACTGTTAGCTTGGGACCGGAAAGACCTGAGGGGTACGTCTGG
 GGTAGGAGTGAATCCTGTAATCCTGGACGGACCGCGGTGGCGAAAGCGCCTCAGGAGAACGGA
 TCCGACAGTGAGGGACGAAAGCTAGGGTCTCGAACCGGATTA

>A1LM21

CCCATGCCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCATATAGCTCAGTAACACGTGGCCAACTACCCTAC
 AGACCGCAATAACCTCGGGAAACTGAGGCCAATAGCGGATATAACTCTCATGCTGGAGTGCCGAGA
 GTTAGAAACGTTCCGGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGATGGTGGGGTAACGGC
 CCACCATGCCGATAATCGGTACAGTGTGAGAGCAAGAGCCTGGAGACGGTATCTGAGACAAGAT
 ACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGGAAACCTTTACTACTGCACGACAGTGCATAGGGGGAC
 TCCGAGTGTGAGGGCATATAGCCCTCGCTTTTCTGAACCGTAAGGTGGTTCAGGAACAAGGACTGG
 GCAAGACCGGTGCCAGCCGCGGTAATACCGGCAGTCCAAGTGATGGCCGATATTATTGGGCCT
 AAAGCGTCCGTAGCTTGTGTGTAAGTCCATTGGGAAATCGACCAGCTCAACTGGTCCGGCGTCCGGT
 GGAAACTACACAGCTTGGGGCCGAGAGACTCGACGGGTACGTCGGGGGTAGGAGTGAATCCTGT
 AATCCTGGACGGACCAATGGGGAAACCACGTTGAGAGACCGGACCGACAGTGAGGGACGAA
 AGCTAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCT

>S3LM6

GTATCGAATTTAAGCCATGCTAGTCGTACGAGTTCACACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGTGGC
 CAAACTACCCTTCGGAGTTCAATACCCTCGGGAAACTGAGGTTAATAGAGCATACCATACCACCACT
 GGAATGAGTGGTATGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGG
 TGGGGTAACGGCCACCCTGCCAATAATCGGTATGGGTCATGAGAGTGAGAACCAGAGACGGAA
 TCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTACTGCACGACAGTG
 CGATAGGGGGATCCCAAGTGACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGACACCCTAAGGCGGTGTCAG
 AATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCGGTAATACCGGCAGCCCAAGTATGGCCGA
 TCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCACGCAAGTCCATCGGGAAATCCACTGCCAACAG
 GTGGGGCGCCCGGTAGAAACTCGTGGCTTGGGACCGGAAAGGCGGACGGGTACGTCGGGGGTAG
 GAGTGAATCCCGTAATCCTGGACGGACCGCGATGGCGAAAGCAGCTCGCGAGAACGGATCCGA
 CAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATAC

>A1LM9

TATGGGGATCGAATTTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTTAGACTCGTAGCATATAGCTCAGTAACACGT
 GGCCAAACTACCCTACAGACCGCAATAACCTCGGGAAACTGAGGCCAATAGCGGATATAACTCTCAT
 GCTGGAGTGCAGAGAGTTAGAAACGTTCCGGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGA
 TGGTGGGGTAACGGCCACCATGCCGATAATCGGTACAGTGTGAGAGCAAGAACCTGGAGACG
 GTATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTACTGCACGACA
 GTGCGATAGGGGGACTCCGAGTGTGAGGGCATATAGCCCTCGCTTTTCTGTACCGTAAGGTGGTAC
 AGGAACAAGGACTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCGGTAATACCGGCAGTCCGAGTGATGGC
 CGATATTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTTGTGTGTAAGTCCATTGGGAAATCGACCAGCTCAA

CTGGTCGGCGTCCGGTGAAACTACACAGCTTGGGGCCGAAAGACTCGACGGGTACGTCCGGGGT
AGGAGTAAAATCCTGTAATCCTGGACGGACCACCAATGGGGAAACCACGTTGAGAGACCGGACCC
GACAGTGAGGGACGAAAAGCTAGGGTCTCGAACCGGATTAG

>S1LM11

AATGGAGTCGATTTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCAGATAGCTCAGTAACACGTG
GCCAAACTACCCTATGGATCCGAATAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATTCGGAATACGATTCACCAC
CTGGAGTGGTGTGAATCCGAAACGCTCCGGCGCCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACG
GTGGGGTAACGGCCACCGTCCCATAAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGT
ATCTGAGACAAGATAACGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGGAAACCTTTACTACTGCACGAAAAT
GCGATAAGGGGACTCCAAGTGCAGAGGCATATAGTCTCGCTTTTTGCGACCGTAAGGTGGTCCGCG
GAATAAGTGTGGCAAGACCGGTGCCAGCCCGCGGTAATACGGGCAGCAGAGTGATGACCG
CTATTATTGGCCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCATGCAAGTCCATCGGGAAATCCGCGCGCTTAACG
CGCGGGCGTCCGGTGAAACTGCATGGCTTGGGACCGGAAGACCAGAGGGGTACGTCCGGGGTAG
GAGTAAAATCCCCTAATCCTGGACGGACCACCGGTGGCGAAAGCGCCTCTGGAAGACGGATCCGAC
GGTGAGGGACGAAAAGCTCGGGTACGAACCGGATTAGAT

>S1LM13

GATGGGATCGATTTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCATATAGCTCAGTAACACGTG
GCCAAACTACCCTACAGACCGCGATAACCTCGGGAAACTGAGGCAATAGCGGATATAACTCCCAG
GCTGGAGTGCCGAGAGTTAGAAACGTTCCGGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGAT
GGTGGGGTAACGGCCACCATGCCGATAATCGGTACAGGTTGTGAGAGCAAGAGCCTGGAGACGG
TATCTGAGACAAGATAACGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGGAAACCTTTACTACTGCACGACAG
TGCGATAGGGGGACTCCGAGTGTGAGGGCATATAGCCCTCGCTTTTCTGAACCGTAAGGTGGTTCA
GGAACAAGGACTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCCGCGGTAATACGGCAGTCCAAGTGATGGCC
GATATTATTGGCCCTAAAGCGTCCGTAGCTTGTGTGTAAGTCCATTGGGAAATCGACCAGCTCAAC
TGGTCGGCGTCCGGTGAAACTGCACAGCTTGGGGCCGAAAGACTCAACGGGTACGTCCGGGGTA
GGAGTAAAATCCTGTAATCCTGGACGGACCACCAATGGGGAAACCAGTTCGAGAGACCGGACCCG
ACAGTGAGGGACGAAAAGCTAGGGTCTCGAACCGGATTAGAT

>S1LM16

GAATGGGGATCGATTTAGCCATGCTAGTTGTACGAGTTTACTCGTAGCAGATAGCTCAGTAACACG
TGGCCAAACTACCCTATGGATCCGGAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATCCGGAATACGGCTCTCA
GCCTGGAAGTGGCGAGAGTCAGAAAACGCTCCGGCGCCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTA
GACGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGA
CGGTATCTGAGACAAGATAACGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGGAAACCTTTACTACTGCACGA
CAGTGCATAAGGGGACTCCAAGTGCAGAGGCATATAGTCTCGCTTTTACCACCGTAAGGAGGT
GGTAGAATAAGTGTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCCGCGGTAATACGGCAGCAGAGTGATG
ACCGCTCTTATTGGCCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCACGCAAGTCTATCGGGAAATCCGCGCGCTC
AACGGCGGGCGTCCGGTGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGATCAAAGGGTACGTCTGGG
GTAGGAGTAAAATCCCCTAATCCTGGACGGACCACCGGTGGCGGAAAGCGCTCTCTGAAAGACGGAT
CCGACGGTGAGGGACGAAAAGCTCGGGTACGAACCGGATTAGAT

>S1LM19

GAAAGGGGGATCGATTTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCAGATAGCTCAGTAACAC
GTTAGCCAAACTACCCTATGGATCCGAATAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATTCGGAATACGATTC
CCACTGGAGTGGTGTGAGCCCGAAACGCTCCGGCGCCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTA
GACGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGA
CGGTATCTGAGACAAGATAACGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGGAAACCTTTACTACTGCACGA

AAGTGCATAAGGGGACTCCAAGTGCAGGGCATATAGTCCTCGCTTTTTGCGACCGTAAGGTGGT
 CGCGGAATAAGTGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCCGCGGTAATACCGGCAGCACGAGTGATG
 ACCGCTATTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCATGCAAGTCCATCGGGAATCCGCGCGCTT
 AACGCGGGGCGTCCGGTGGAACTGCATGGCTTGGGACCGGAAGACCAGAGGGGTACGTCCGGG
 GTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGGTGGCGAAAGCGCCTCTGGAAGACGGAT
 CCGACGGTGAGGGACGAAAGCTCGGGTACGAACCGGATT

>S2LM21

CATGCACGGCGACGATATAGCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACAC
 GTGGCCAACTACCTTCGGAGCACGATACCCTCGGGAACTGAGGCTAATAGTCATACCACAGT
 CAGCTGGAATGAGGACTGTGCCAAACGCTCCGGCGCGGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTA
 GACGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTACGGGTATGAGAGTGAGAACCCGGAGA
 CGGAATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGCACGC
 CAGTGCATAAGGGATCCCAAGTGCAGCAGGCATAGAGCCTCGCTTTTGTACACCGTAGGGAGGT
 GTACGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCCGCGGTAATACCGGCAGCCCGAGTGATG
 GTCGATCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGTGCACAAGTCCATCGGAAATCCACCCGCTC
 AACGGTGGGCGTCCGGTGGAACTGTGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCCGG
 GGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGATGGCGAAAGCACGTGCGGAGGACGGA
 TCCGACAGTGAGGGACGAAAGCCAGAGTCTCGAACCGGATT

SECUENCIAS PARCIALES DE ARQUEAS DEL GEN 16S DEL rRNA DE SANTA M^a DE JESÚS (BAHÍA DE CÁDIZ)

>A1BC2

ATGGGGATCGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGTG
 GCCAACTACCTTCGGAACACAATACCCTCGGGAACTGAGGCTAATAGTGTATACCATACCACCA
 CTGGAATGAGTGATGTGCCAAACGCTCCGGCGCGGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGAC
 GGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTATGGGTATGAGAGTGAGAACCCAGAGACGG
 AATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGCACGACAG
 TGCGATAGGGGGATCCCAAGTGCACAGGCATAGCCCTGTCTTTTCGGTACCGTAAGGTGGTACC
 AGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCCGCGGTAATACCGGCAGCCCAAGTGATGGCC
 GATCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAATCCACCTGCTCAAC
 AGGTGGGCGCCCGGTAGAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCCGGGGT
 AGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGATGGCGAAAGCACGTGCGGAGGACGGATCC
 GACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGAT

>A2BC9

TATGGGAATCGATTTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCATATAGCTCAGTAACACGT
 GGCCAACTACCTACAGACCGGATAACCTCGGGAACTGAGGCCAATAGCGGATATAACTCTCA
 GACTGGAGTGTGAGAGTTAGAAACGTTCCGGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAG
 ATGGTGGGGTAACGGCCACCATGCCGATAATCGGTACAGGTTGTGAGAGCAAGAGCCTGGAGAC
 GGTATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGCACGAC
 AGTGCATAGGGGACTCCGAGTGTGAGGGCATATAGCCCTCGCTTTTCTGAACCGTAAGGTGGTT
 CAGGAACAAGGACTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCCGCGGTAATACCGGCAGTCCAAGTGATGG
 CCGATATTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTTGTGTGTAAGTCCATTGGGAAATCGACCAGCTCA
 ACTGGTCCGGCTCCGGTGGAACTACACAGCTTGGGGCCGGAAGACTCAACGGGTACGTCCGGGG
 TAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTGGACGGACCACCAATGGGGAAACCAGTGTGAGAGACCGGACCC
 GACAGTGAGGGACGAAAGCTAGGGTCTCGAACCGGATTAGA

>A2BC5

TATTGGACGATTTAGCCATGCTAGTCGTACGAGTTCATACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGTGG
CCAAACTACCTTCGAGCTCCATACCTCGGGAAACTGAGGTTAATAGAGCATACCACACCACCAC
TGGAATGAGTAGTGTGTCAAACGCTCCGGCGCGGAAGGATGTGGCTCGGGCCGATTAGGTAGACG
GTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTATGGGTATGAGAGTGAGAACCAGAGACGGA
ATCTGAGACAAGATTCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACGACAGT
GCGATAGGGGATCCCAAGTGCACAGGCATAGCGCTGTGCTTTTCGGTACCCTAAGGCGGTACCA
GAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCGGTAATACCGGCAGCCCAAGTGTAGGCGG
ATCTTATTGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAAATCCACCTGCTCAACA
GGTGGGCGCCCGGTAGAAACTGCGTGGCTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCCGGGGTA
GGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCGCGATGGCGAAAGCACGTCGCGAGAACGGATCCG
ACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATA

>A2BC10

GTATGCGATCGATTTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCAGATAGCTCAGTAACACGT
GGCCAAACTACCTATGGATCCGAATAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATGCGGAATAGCGTTCATC
GCCTGGAGTGGCAGAACCGCAAACGTTACGGCGCCATAGGATGTGGCTCGGGCCGATTAGGTAG
ACGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGAC
GGTATCTGAGACAAGATAACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACGCG
AGTGCATAAGGGGACTCCGAGTGCAGGGGCATATAGTCTCGCTTTTACGACCGTAAGGTGGTC
GTAGAATAAGTGTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCGGTAATACCGGCAGCAGGATGATGA
CCGCTATTATTGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCACGCAAGTCTATCGGGAAATCCGCGCGCTTA
ACGCGCGGGCGTCCGGTGGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGACCAGAGGGGTACGTCCGGG
GTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCGCGTGGCGAAAGCGCTCTGGAAGACGGAT
CCGACGGTGAGGGACGAAAGCTCGGGTACGAACCGGATTAGA

>A3BC2

TTGGCAGGAAGTTCAGACTCGTAGCAGATAGCTCAGTAACACGTGGCCAAACTACCTATGGATCCGA
ATAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATGCGGAATAGCGTTCATCGCTGGAGTGGCAGCAACCGGAAA
CGTTACGGCGCCATAGGATGTGGCTCGGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCACCGTG
CCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGTATCTGAGACAAGATACGGGGC
CCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACGCGAGTGCATAAGGGGACTCCGAGT
GCGAGGGCATATAGTCTCGCTTTTACGACCGTAAGGTGGTCTGAGAATAAGTGTGGGCAAGAC
CGGTGCCAGCCGCGGTAATACCGGCAGCAGGATGATGACCGCTATTATTGGCCTAAAGCGT
CCGTAGCTGGCCACGCAAGTCTATCGGGAAATCCGCGCGCTAACGCGCGGGCGTCCGGTGGAAAC
TGCGTGGCTTGGGACCGGAAGACCAGAGGGGTACGTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCT
GGACGGACCGGTGGCGAAAGCGCCTCTGGAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTC
GGGTACGAACCGGATTAGATACCGGGTAGTCCGAGCTGTAAA

>A3BC7

GACGGGGATCGATTTAGCCATGCTAGTTGCACGGGTTACAGACTCGTGGCATATAGCTCAGTAACACGT
GGCCAAACTACCTACAGACCGCAATAACCTCGGGAAACTGAGGCAATAGCGGATATAACTCTCA
GGCTGGAGTGCCGAGAGTTAGAAACGTTCCGGCGCTGTAGGATGTGGCTCGGGCCGATTAGGTAG
ATGGTGGGGTAACGGCCACCATGCCGATAATCGGTACAGGTTGTGAGAGCAAGAGCCTGGAGAC
GGTATCTGAGACAAGATAACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACGACG
AGTGCATAGGGGACTCCGAGTGTGAGGGCATATAGCCCTCGCTTTTCTGAACCGTAAGGTGGTA
CAGGAACAAGGACTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCGGTAATACCGGCAGTCCAAGTGTGG
CCGATATTATTGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTTGTGTGTAAGTCCATTGGGAAATCGACCAGCTCA

ACTGGTCGGCGTCCGGTGGAACTACACAGCTTGGGGCCGAAAGACTCGACGGGTACGTCCGGGG
TAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTGGACGGACCAATGGGGAAACCAGTTGAGAGAACGGACCC
GACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGA

>A3BC11

CTAGTCGCACGGGCTTAGACCCGTGGCGTATAGCTCAGTAACACGTGGCCAAACTACCCTATGGACCA
TGATAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATCGTGGATATCGCTTTCACACTGGAAGTCCGAATGCGAAA
AACGTTCCGGCGCTTTAGGAGGTGGTTGCGGCCAATTAGGTAACCGGGGGTAACGGCCACCG
GGCCAGTAATCGGTACGGGTGGTGACAGCCAAAACCCGAAACGGTATCTGAAACAAAATACCGG
GCCCTACGGGGCGCAGCAGGCCGAAACCTTTACACTGCACAACAGGGCGATAGGGGGACTCCAA
GGGCAAGGGCATATAGCCTTCGTTTTCTCGACCGTAAGGTGGTCGACAAATAATGACTGGGCAAA
AC
CGGTGCCAGCCCGCGGTAATACCGGCAGTCCAAGTATGGCCGCTGTTATTGGGCCTAAAGCGTC
GGTAGCTGGCGGTGAAATCCGATCGGGAAATCAACGCGTTCACCGCGTCGCTTCCGCTGAAACTG
CTCGGCTTGGGGCCGAAACTCAGGGGTACTCCGGGTAGAATGAAATCCTGAATCCTGACGACACC
GATGCGAGCCCGTGAAGCCGAACCACAGTGAGAACGAAGTCAAGGCTCGAACGGATTAATCCCGG
GTAGTCCTGTGTAACATGCTCGTAGGTTGCGAGC

>A4BC2

AGTCGCACGGGTTTAGACCCGTGGCGGATAGCTCAGTAACACGTGGCCAAACTACCCTGTGGACGGG
AATAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATACCCGATACGACTCGCACGCTGGAGTGCGGCGAGTCGGAA
ACGTCCTGGGCCACAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCACCGT
GCCAATAATCGGTACGGGTATGAGAGTGAGAGCCCGGAGACGGTATCTGAGACAAGATACCGGG
CCCTACGGGGCGCAGCAGGCCGAAACCTTTACACTGCACGACAGTGCATAGGGGGACTCCGAGT
GCGAGGGCATATAGTCTCGCTTTCTGTACCCTAAGGTGGTACAAGAATAAGGGTGGGCAAGAC
CGGTGCCAGCCCGCGGTAATACCGGCAGCCGAGTATGGCCGCTGTTATTGGGCCTAAAGCGTC
CGTAGCCGGCCAGACAAGTCTGTTGGGAAATCGACGCGCTCAACGCGTCGGCGTCCGGCCGAAACT
GTTTGGCTTGGGGCCAGAAGACTCGAGGGGTACGTCCGGGGTAGGAGTGAATCCCGTAATCCTG
GACGGACCACCGGTGGCGAAAGCGCCTCGAGAAGATGGACCCGACGGTCAAGGACGAAAGCTAG
GGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCTAGCT

>A4BC7

TATGGGATCGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGTG
GCCAAACTACCCTTCGGAACACAATACCCTCGGGAAACTGAGGCTAATAGTGTATATCGTACCACCA
CTGGAATGAGTGGTACGCCAACGCTCCGGCCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGAC
GGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTATGGGTATGAGAGTGAGAACCAGAGACGG
AATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGGCGGAAACCTTTACACTGCACGACAG
TGCGATAGGGGGATCCCAAGTGCACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGGCACCCCTAAGGCGGTGCC
AGAATAAGGGTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCCGCGGTAATACCGGCAGCCCAAGTATGGCC
GATCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAAATCCACCTGCTCAAC
AGGTGGGGCCCGGTAGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCAGCGGTACGTCCGGGGT
AGGAGTGAATCCCGTAATCCTGGACGGACCGCGATGGCGAAAGCACGTGCGGAGAACGGATCC
GACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGAT

>A4BC16

AGAGCAAGAGCCCGGAGACGGTATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGGCGCA
AACCTTTACTACTGCACGAAAGTGCATAAGGGGACTCCAAGTGCAGGGGCATATAGTCTCGCTTTT
TGCGACCGTAAGTGGTTCGCGGAATAAGTGTGGCAAGACCGGTGCCAGCCCGCGGTAATAC
CGGCAGCACGAGTATGACCGCTATTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCATGCAAGTCCATC

GGGAAATCCGCGCTTAACGCGCGGGCGTCCGGTGAAACTGCATGGCTGGGACCGGAAGACC
AGAGGGGTACGTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACGGTGGCGAAAGC
GCCTCTGGAAGACGGATCCGACGGTGAGGACGAAAGCTCGGGTACGAACCGGATTAGATACCC
GGGTAGTCCGAGCTGTAACGATGTCTGCTAGGTGTGGCACAGGCTACGAGCCTGTGCTGTGCCG
AGGGAAAGCCGTGAAGCAGACCGCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGG
CGGGGGGAG

>S1BC10

TCCGCGTTGGGTATGATTAGGATGGTACCTCCTTCTTCATACTCGTAGCAGATAGCTCAGTAACACGT
GGCCAAACTACCTATGGATCCGAATAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATTCGGAATACGGCTGTCCA
CCTGGAGTGGTGTCTGTCCGAAACGCTCCGGCGCCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGAC
GGTGGGGTAACGGCCACCGTCCCATAAATCGGTACGGTTGTGAGAGCAAGAGTCCGGAGACGG
AATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGGCGGAAACCTTTACTGACGAAAG
TGCGATAAGGGGACTCCAAGTGCAGGGGCATATAGTCTCGCTTTTTCGACCGTAAGGTGGTCTGA
GGAATAAGTGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCTCGAGTGATGACC
GCTATTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCATGCAAGTCCATCGGGAAATCCGCGCGCTTAAC
GCGCGGGCGTCCGGTGGAAACTGCTTGGCCTTGGGACCCGGAAGGACCCGAGGGGGTACGTCCGG
GGGTAGGGAGTGAAATCCCGTAATCCCGGACGGACCAGGATGGGGAAAAGCCGCTCTGGAA
AAACGGGATCCCAACGGTGAGGGGACGAAAGCCTCGGGT

>S1BC11

GAAAGGGGACGATTTAGCCATGCTAGTGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACG
TGGCCAAACTACCTTCGGAACACAATACCCTCGGGAAACTGAGGCTAATAGTGTATACCATACCAC
CACTGGAATGAGTGGTATGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAG
ACGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTATGGTTCATGAGAGTGAGAACCCAGAGAC
GGAATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGGCGGAAACCTTTACTGACGACGAC
AGTGCGATAGGGGGATCCCAAGTGCACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGGTACCCTAAGGCGGTA
CCAGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCCCAAGTATGG
CCGATCTTATTGGCCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAAATCCACCTGCTCA
ACAGGTGGGCGCCCGGTAGAAACTGCGTGGCTTGGGACCCGGAAGCGCGACGGGTACGTCCGGG
GTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTGGACGGACCAGCCGATGGCGAAAGCACGTCCGAGAACGGAT
CCGACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGA

>S2BC20

AAAGGGGATCGATTTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCAGATAGCTCAGTAACATG
TGGCCAAACTACCTATGGATCCGAATAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATGCGGAATAGCGTTCATC
GCCTGGAGTGGCAGAACCGCAACCGTTACGGCGCCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAG
ACGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCCATAAATCGGTACGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGAC
GGTATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGGCGGAAACCTTTACTGACGACGCG
AGTGCATAAGGGGACTCCGAGTGCAGGGCATATAGTCTCGCTTTTTCAGACCGTAAGGTGGTCT
GTAGAATAAGTGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCAGAGTGATGA
CCGCTATTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCACGCAAGTCTATCGGGAAATCCGCGCGCTTA
ACGCGCGGGCGTCCGGTGGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGACAGAGGGGTACGTCCGGG
GTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCAGCGGTGGCGAAAGCGCCTCTGGAAGACGGAT
CCGACGGTGAGGGACGAAAGCTCGGGTACGAACCGGATTAG

>S2BC27

TCTTTACAGGGGATCGATTAGCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACA
 CGTGGCCAACTACCCTTCGGAGCACGATACCCTCGGGAACTGAGGCTAATAGTCATACCACAGT
 CCAGCTGGAATGAGGACTGTGTCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTA
 GACGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTACGGGTATGAGAGTGAGAACCCGGAGA
 CGGAATCTGAGACAAGATTCCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACGCGC
 CAGTGCATAAGGGGATCCCAAGTGCAGGCGATAGAGCCTGCGCTTTTGTACACCGTAGGGAGGT
 GTACGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGCCCGAGTGATG
 GCCGATCTTATTGGCCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCACAAGTCCATCGGAAAATCCACCCGCTC
 AACGGGTGGGCGTCCGGTGGAACTGTGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCCGG
 GGTAGGAGTGAATCCCGTAATCCTGGACGGACCCGATGGCGAAAGCACGTGCGAGGACGGA
 TCCGACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATT

>S3BC10

GTAATGGGGTTCGATTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCAGATAGCTCAGTAACATG
 TGGCCAACTACCCTATGGATCCGAATAAACCCTCGGGAACTGAGGCTAATGCGGAATAGCGTTTCATC
 GCCTGGAGTGGCAGAACCGCAACCGTTACGGCGCCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAG
 ACGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGAC
 GGTATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACGCGC
 AGTGCATAAGGGGACTCCGAGTGCAGGGCATATAGTCTCGCTTTTACGACCGTAAGGTGGTC
 GTAGAATAAAGTGTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGCACGAGTGATGA
 CCGCTATTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCACGCAAGTCTATCGGAAATCCGCGCGCTTA
 ACGCGCGGGCGTCCGGTGGAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGACCAGAGGGGTACGTCCGGG
 GTAGGAGTGAATCCCGTAATCCTGGACGGACCCGGTGGCGAAAGCGCCTCTGGAAGACGGAT
 CCGACGGTGGGGACGAAAGCTCGGGTCACGAACCGGATTAG

>S3BC11

ATGGGGTTCGATTTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCACACTCGTGGCGAAAAGCTCAGTAACACGTGG
 CCAAACCTACAGAGAACGATAAACCCTCGGGAACTGAGGCTAATAGTTCATACGGGAGTTCATG
 CTTGAATGCCGCTCCCCGAAACGCTCCGGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACG
 GTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAACCCTGGAGACGGA
 ATCTGAGACAAGATTCCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACGCAAGT
 GCGATAAGGGGACCCCAAGTGCAGGGCATATAGTCTCGCTTTTCTGACTGTAAGGCGGTGAG
 GAATAAGAGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGCTCAAGTGATGACCG
 ATATTATTGGCCCTAAAGCGTCCGTAGCCGGCCATGAAGTTTCATCGGAAATCCGCCAGCTCAACT
 GCGGGGCTCCGGTGGAAACCATGGCTTGGGACCGGAAGGCTCGAGGGGTACGTCTGGGGTAG
 GAGTGAATCCTGTAATCCTGGACGGACCCGATGGCGAAAGCACCTCGAGAAGACGGATCCGAC
 GGTGAGGGACGAAAGCTAGGGTCTCGAACCGGATTAGATA

>S4BC3

AATGGGGATCGATTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGT
 GGCCAACTACCCTTCGGAAACATAAACCCTCGGGAACTGAGGCTAATAGTGTATACCATACCACC
 ACTGGAATGAGTGGTATGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGA
 CGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTATGGGTATGAGAGTGAGAACCCAGAGACG
 GAATCTGAGACAAGATTCCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACGACGACA
 GTGCGATAGGGGGATCCCAAGTGCACAGGCGATAGCGCTGTGCTTTTCCGTACCGTAAGGTGGTAC
 CAGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGCCCAAGTGATGGC
 CGATCTTATTGGCCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGAAATCCACCTGCTCAA
 CAGGTGGGCGCCCGTAGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCCGGGGT

AGGAGTGAATCCCGTAATCCTGGACGGACCGCCGATGGCGAAAGCACGTCGCGAGGACGGATCC
GACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGA

>S4BC8

GGATGGGACGATTTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCGAATAGCTCAGTAACACGTC
GCCAACTACCTTCGGAGCACCATACCCTCGGGAAACTGAGGCTAATAGTGCATACCACAGTCCAC
CTGGAATGAGGACTGTGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGAC
GGTGGGGTAACGGCCACCCTGCCAATAATCGGTACGGGTGGTGAAGCCAGAACCCGGAGACGG
AATCTGAGACAAGATCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGCACGACAG
TGCGATAAGGGGATCCCAAGTGCGTAGCATAGAGCCTACGCTTTTGTCCACCGTAGGGAGGTGAA
CGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCCGAGTGATGGCC
GATCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAAATCCACCCGCCAAC
GGGTGGCCGTCCGGTGGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCAGGGTACGTCGGGGTGA
GGAGTGAATCCCGTAATCCTGGACGACCGCCGATGGCGAAAGCACGTCGCGAGAACGGATCCG
ACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGAT

>S4BC12

GGAAGGGATCGATTTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCAGATAGCTCAGTAACACGT
GGCCAACTACCCTATGGATCCGAATAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATTCGAATACGGCTACCA
CCTGGAGTGGTGTGAGCCCGAAACGCTCCGGCGCCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGAC
GGTGGGGTAACGGCCACCCTGCCAATAATCGGTACGGGTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGG
TATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGCACGAAAG
TGCGATAAGGGGACTCCAAGTGCAGGGGCATATAGTCTCGCTTTTTCGACCGTAAGGTGGTCCG
GGAATAAGTGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCAGAGTGATGACC
GCTATTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGTCAAGTCCATCGGGAAATCCGCGCGCTAAC
GCGCGGGCGTCCGGTGGAAACTGCATGGCTTGGGACCGGAAGACCAGAGGGGTACGTCGGGGTGA
GGAGTGAATCCCGTAATCCTGGACGACCGGGTGGCGAAAGCGCCTCTGGAAGACGGATCCG
ACGGTGAGGGACGAAAGCTCGGGTACGAACCGGATTAGA

SECUENCIAS COMPLETAS DE ARQUEAS DEL GEN 16S DEL rRNA DE FUENTE DE PIEDRA (MALAGA)

>A1FP7

TTTGGAGATAGATTTAGCATGCTAGTCGTGCGAGTTCACAGACGCGGCTGTAGGTGCTGGATCACCGG
CTAAACTACCTACAGAGACGCATAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATTCGTCATACCCCTCTCACGG
GGAATGCCAAGAGGCCACAAACGCTCCCGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGG
TGGGGTAACGGCCACCCTGCCAATAATCGGTACGGGTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGAA
TCTGAGACAAGATCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGCACGCACGTG
CGATAAGGGGACTCCGAGTGCAGGGGCATATCGTCTCGCTTTTGTACCGTAGGGCGGTACACG
AACAAGAGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCTCAAGTGATGGCCGA
TCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCTCGAAAGTCCGTCGGGAAATCCACACGCCAACGT
GTGGGGCTCCGGCGGAAACTCCGAGGCTTGGGACCGGAAGGCTCGAGGGGTACGTCGGGGTGA
GAGTGAATCCCGTAATCCCGACGGACCACCGATGGCGAAAGCACCTCGAGAAAACGGATCCGAC
AGTGAGGGACGAAAGCTAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCTAGCCGTAACGAT
GTTTCGTAGGTGTGACACAGGCTACGCGCCTGTGTTGTGCCGTAGGGAAGCCGAGAAGCGAACCCG
CTGGGAAGTACGTCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACTACACCCGGAGGA
GCCTGCGGTTTAAATTGGAAGTCAACGCCGACATCTACCAGCTCCGACTACAGTGATGACGGTCCAG
TTGATGACCTGCCACGACGCTGTAGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGC

GTCCTGTTAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACTCCTAATTGCCAGCAGCAGTCCGACTGGCTG
GGTACATTAGGAGGACTGCCAGTGCCAACTGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTACAGTATGC
CCCCAATGAGCTGGGCTACACGCGGGCTACAATGGCCAAGACAATGGGTTGCAACCTCGAAAGAG
GGCGCTAATCTCCGAACTGGTGTAGTTCGGACTGAGGGCTGAACTCGCCCTACGAAGCTGG
ATTCGGTAGTAGTCGCCTTTACAAGAGGGCGGCGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACACCGCCCG
TCAAAGCACCCGAGTGAGATCCGGATGAGGCCTGTCTACCACAGTCGAATCGTGGCGTCAGCAAG
AGCATCGTACTCGAGTAATAACTG

>A1FP20

TATCGGATTTAGCATGCTAGTCGTGCGAGTTCATAGTCGCACTGTAGGTCCTGGACCTGGCTAACT
ACCCTACAGAGACGCATAACCTCGGGAACTGAGGCTAATTCGTACATCCCTCTCACGCTGGAATG
CCAAGAGGCACAAACGCTCCCGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGT
AACGGCCACCGTGCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGAATCTGAG
ACAAGATTCGGGCCCTACGGGGCGCAGCGGCGGAAACCTTTACTGACGCACGTGCGATAA
GGGGACTCCGAGTGCAGGGCATATCGTCTCGCTTTTGTGTACCGTAGGGCGGTACACGAACAAG
AGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCTCAAGTGATGGCCGATCTTATT
GGGCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCTCGAAAGTCCGTGCGGAAATCCACACGCCAACGTTGGGGC
GTCCGGCGGAACTCCGAGGCTTGGGACCGGAAGGCTCGAGGGGTACGTCGGGGTAGGAGTGA
AATCCGTAATCCCGGACGGACCACCGATGGCGAAAGCACCTCGAGAAAACGGATCCGACAGTGAG
GGACGAAAAGCTAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCTAGCCGTAACCGATGTTCCG
TAGGTGTGACACAGGCTACGCGCCTGTGTTGTGCCGTAGGGAAGCCGAGAAGCGAACCCCTGGG
AAGTACGTCTGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACTACAACCGGAGGAGCCTG
CGGTTAATTGGACTCAACGCCGACATCTACCAGCTCCGACTACAGTGATGACGGTCAGGTTGAT
GACCTGCCACGACGCTGTAGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTAGCTCGTACCGTGAGGCGTCT
GTTAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACTCCTAATTGCCAGCAGCAGTCCGACTGGCTGGGTA
CATTAGGAGGACTGCCAGTGCCAACTGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTACAGTATGCCCCG
AATGAGCTGGGCTACACGCGGGCTACAATGGCCAAGACAATGGGTTGCAACCTCGAAAGAGGGCG
CTAATCTCCGAACTTGGTGTAGTTCGGACTGAGGGCTGAACTCGCCCTACGAAGCTGGATTCCG
GTAGTAGTCGCCTTTACAAGAGGGCGGCGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACACCGCCCGTCAA
GCACCCGAGTGAGATCCGGATGAGTCTGTGTACCACAGTCGAATCGTGGCCTCCGCAAGAGCGT
CGTACTCGAGTGACCGGAA

>A2FP3

CCATATCCGTTGATTAGCCTGCTCGCTGCATGAGTTCATACTCGTGGCGAAAAGCTCAGTAACACGT
GGCCAACTACCTACAGAGAACGATAACCTCGGGAACTGAGGCTAATAGTTCATACGGGAGTCA
TGCTGGAATGCCGACTCCCCGAAACGCTCAGGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGA
CGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCGATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACG
GAATCTGAGACAAGATCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACGCACGAA
GTGCGATAAGGGGACCCCAAGTGCAGGGCATATAGTCTCGCTTTTCTCGACTGTAAGGCGGTGCG
AGGAATAAGAGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCCGCGGTAATACCGGCAGCTCAAGTGATGAC
CGATATTATTGGGCTAAAGCGTCCGTAGCCGGCCACGAAGTTTCATCGGGAAATCCGCCAGCTCA
ACTGGCGGGCGTCCGGTAAAAACACGTGGCTTGGGACCGGAAGGCTCGAGGGGTACGTCCGGG
GTAGGAGTGAAATCCCGTAACTCTGGACGGACCACCGATGGCGAAAGCACCTCGAGAAGACGGAT
CCGACGGTGAGGGACGAAAGCTAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCTAGCTGTAA
ACGATGCTCGTAGGTGTGACACAGGCTACGAGCCTGTGTTGTGCCGTAGGGAAGCCGAGAAGCG
AGCCGCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACTACAACC
GGAGGAGCCTGCGGTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTACCAGCTCCGACTACAGTGATGAC
GATCAGGTTGATGACCTATCACGACGCTGTAGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTAGCTCGTACC
GTGAGGCGTCTGTTAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACTTCTAATTGCCAGCAGCAGTTCG

ACTGGTGGGTACATTAGAAGGACTGCCGCTGCTAAAGCGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGT
CAGTATGCCCCGAATGAGCTGGGCTACACGCGGGCTACAATGGTCGAGACAATGGGTTGCTATCTC
GAAAGAGAACGCTAATCTCTAACTCGATCGTAGTTCGGATTGAGGGGCTGAAACTCGCCCTCATGA
AGCTGGATTCCGTAGTAATCGCATTTCATAGAGTCCGGTGAATACGTCCTCGTCTCTTGCACACAC
CGCCCGTCAAAGCACCCGAGTGAGGTCGGATGAGGCCACCACACGGTGTCTGATCTGTCGG

>A2FP6

TTGGCACGAAGTTTAGACCCGTAGCATATAGCTCAGTAACACGTGGCCAACTACCTACAGACCCGG
ATAACCTCGGGAACTGAGGCCAATAGCGGATATAACTCTCAGGCTGGAGTGGCGAGAGTTAGAAA
CGTTCCGGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGATGGTGGGGTAACGCCACCACATGC
CGATAATCGGTACAGGTTGTGAGAGCAAGAACCTGGAGACGGTATCTGAGACAAGATAACCGGCC
CTACGGGGCGCAGCAGGCGGAAACCTTTACTGACGACAGTGCATAGGGGGACTCCGAGTG
TGAGGGCATATAGCCCTCGCTTTTCTGTACCGTAAGGTGGTACAGGAACAAGGACTGGGCAAGACC
GGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGTCCAAGTGATGGCCGATATTATTGGCCCTAAAGCGTC
CGTAGCTTGCTGTATAAGTCCATTGGGAAATCGACCAGCTCAACTGGTCCGGCGTCCGGTGGAAACTG
TACAGCTTGGGGCCGAGAGACTCGACGGGTACGTCGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTGGA
CGGACCACCAATGGGGAAACCACGTTGAGAGACCCGACCCGACAGTGAGGGACGAAAGCTAGGGT
CTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCTGGCTGTAACAATGCTCGCTAGGTATGTCGCGGGCT
ACGACACCTGATGTGCCGTAGTGAAGACGAGAAGCGAGCCCTGGGAAGTACGCTGCAAGGA
TGAAACTTAAAGGAATTGCGGGGGAGCACCAACCCGAGGAGCTCGGTTTAAATTGGACTCAA
CGCCGGAATCTACCGGTCCCGACAGTAGTAATGACAGTCAGGTTGACGACTTTACTCGACGCTAC
TGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTAGCTCGTACCGTGAGGCGTCTGTTAAGTCAGGCAACGAGC
GAGACCCGCACTTCTAGTTGCCAGCAATACCTTGAGGTAGTTGGGTACTACTAGGAGGACTGCCGCT
GCTAAAGCGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTAGTATGCCCCGAATGGACCGGGCAACACCG
GGGCTACAATGGCTATGACAGTGGGATGCGACGCCGAGAGGCGAAGCTAATCTCCAACGTAAGTC
GTAGTTCCGATTGCGGGGCTGAAACCCGCCCGCATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAATCGCGTGTCA
AGCGCGCGGTGAATACGTCCTGCTCTTGACACACCCGCCGTCAAAGCACCCGAGTGGGGTCCG
GATGAGCCGTCATGCGACGGTCAATCTGGGCTCCGCAAGGGGGCTTAAAGTCGAAGCACGTTGGC
T

>A2FP11

TCATGGGACGATTACGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGTG
GCCAACTACCTTCGGAACACAATACCCTCGGGAACTGAGGCTAATAGTGTATATCGTACCACCA
CTGGAATGAGTGGTACGCCAACGCTCCGGCCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGAC
GGTGGGGTAACGGCCACCGTCCCAATAATCGGTATGGGTATGAGAGTGAGAACCAGAGACGG
AATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCCGAAACCTTTACTGACGACAG
TGCGATAGGGGGATCCCAAGTGCACAGGCATAGCCCTGTGCTTTTCGGCACCCCTAAGGCGGTGCC
AGAATAAGGGTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCCCAAGTGATGGCC
GATCTTATGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCAAGTCCATCGGGAAATCCACCTGCTCAAC
AGGTGGGCGCCCGTAGAAACTGCGTGGCTTGGACCCGGAAGGCGCAGCGGTACGTCGGGGT
AGGAGTGAATCCCGTAATCCTGGACGGACCCGATGGCGAAAGCACGTCGCGAGAACGGATCC
GACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTGCAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCTGGCCGTAAA
CAATGTCTGCTAGGTGTGGCTCCCACTACGAGTGGGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGTAAGCAGA
CCGCTGGGAAGTACGTCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACTACAACCGG
AGGAGCCTGCGGTTAATTGGACTCAACGCCGACATCTACCAGCATGACTGTAATAATGACGAT
CAGGTTGATGACCTTATCCGAGTTTCAGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTAGCTCGTACCGTGAG
GCGTCTGTTAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGACCCCTACTTGCCAGCAGTACCGCGAGGTAG
CTGGGGACAGTAGGGGGACCGCGTGGCTAACACGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTGAGT
ATGCCCCGAATGTGCTGGGCAACACGCGGGCTACAATGGTCGAGACAAAGGGTTCCTACTCCGAAA

GGAGACGGTAATCTCAGAACTCGATCGTAGTTCGGATTGTGGGCTGCAACTCGCCACATGAAGC
 TGGATTCGGTAGTAATCGCGTGTACAAGCGCGGGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACACCCG
 CCGTCAAAGCACCCGAGTGAGGTCCGGATGAGGCGTTCCACGAACGTGAATCTGGGCTTCGCAAG
 GGGGCTAAGTCGAACAACAGCA

>A3FP2

TTTGGGGAATGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGT
 GGCCAACTACCCTTCGGAACAACAATACCCTCGGGAACTGAGGCTAATAGTGATACCATACCACC
 ACTGGAATGAGTGGTATGCCAAACGCTCCGGCGCCAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGA
 CGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTATGGGTCATGAGAGTGAGAACCAGAGACG
 GAATCTGAGACAAGATTCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACGACACA
 GTGCGATAGGGGGATCCCAAGTGCACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGGTACCCTAAGGCGGTAC
 CAGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACGGCAGCCCAAGTGATGGC
 CGATCTTATTGGCCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCTATCGGGAAATCCACCTGCTCAA
 CGGGTGGGCGCCCGTAGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCAGCGGTACGTCCGGGG
 TAGGAGTGAATCCCGTAATCCTGGACGGACCCGATGGCGAAAGCACGTCGCGAGAACGGATC
 CGACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCTGGCCGTAA
 ACAATGTCTGTTAGGTGTGGCTCCCACTACGAGTGGGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGCTAAGCAG
 ACCGCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACTACAACCC
 GAGGAGCCTGCGGTTAATTGGACTCAACGCCGACATCTACCAGCATCGACTGTAGTAATGACG
 ATCAGTTGATGACCTTATCCGAGTTTCAGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCCTG
 AGGCGTCTGTTAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCATCCTTACTTGCAGCAGCACCAGCAAGT
 GGCTGGGGACAGTAGGGGACCGCCGTGGCCAAACACGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTCA
 GTATGCCCCGAATGTGCTGGGCAACACGGGGCTACAATGGTCGAGACAAAGGGTTCCAACCTCGA
 AAGGAGACGGTAATCTCAGAACTCGATCGTAGTTCGGATTGTGGGCTGCAACTCGCCACATGAA
 GCTGGATTCCGGTAGTAATCGCGTGTATAAGCGCGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACACC
 GCCCGTCAAAGCACCCGAGTGAGGTCCGGATGAGGCGTACCTCGTACGTGAATCTGGGCTTCGCA
 AGGGGGCTAAGTCGAACAAGTGCA

>A3FP22

GTATTGGGGTCGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCAGATAGCTCAGTAACACG
 TGCCAACTACCCTGTCGATCGGGACACCCTCGGGAACTGAGGCTAATCCCGGATACGGCTCGCT
 GCCTGGAGTTGGCGCGAGCTCGAAACGTTTCAGGCGCGACAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTA
 GACGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCGATAATCGGTACGGTTGTGAAAGCAAGAGCCCGGAGA
 CGGAATCTGAGACAAGATTCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACGACGC
 GAGTGCATAGGGGGACTCCAAGTGCAGGGCATAACAGTCTCGCTTTTACCACCGTAAGGAGGT
 GGTAGAATAAGTGTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACGGCAGCAGCAGTGTATG
 ACCGCTATTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCCGGCCAGGCAAGTCCATCGGGAAATCCGACGCCT
 AACGTGCGGGCGTCCGTTGAAACTGCTTGGCTTGGGACCGGAAGATCCAGAGGGTACGTCTGGG
 GTAGGAGTGAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGGAAAGACGGAT
 CCGACGGTGAGGGACGAAAGCTTGGGTACGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCAAGCTGTA
 AACGATGTCTGCTAGGTGTGGCACAGGCTACGAGCCTGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCA
 GACCGCTGGGAAGTACGTCTGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACTACAACC
 GGAGGAGCCTGCGGTTAATTGGACTCAACGCCGACATCTACCAGCATCGACAGTACTGTGAC
 GGTCAAGTGTGATGAGCTTACTAGAGCTACTGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCCT
 GAGGCGTCTGTTAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACGCTAATTGCCAGCAACCCACGAG
 GTGGTTGGGTACATTAGGCGGACTGCCAGTGCCAACTGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTC
 AGTATGCCCGAATGTGCTGGGCGACACGCGGGTACAATGGTCGAGACAGTGGGATGCCACCCCG
 AGAGGGGGCGCTAATCTCCGAACTCGATCGTAGTTCGGATTGCGGACTGAACTCGTCCGCATGA

AGCTGGATTCCGGTAGTAATCGCGCCTCAGAAGGGCGCGGTGAATACGTCCTGCTCCTTGACACAC
CGCCCGTCAAAGCACCCGAGTGAGGTCGGATGAGGCTGCCGGTATGGCAGTCGAATCTGGGCTTC
GCAAGGGGGCTAAGTCGAACAACCTGCG

>S1FP2

AAATGCGACGAATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGT
GGCCAACTACCCCTCGGAACACAATACCTCGGGAACTGAGGCTAATAGTGTATACCATAACCACC
ACTGGAATGAGTGGTATGCCAAACGCTCCGGCCGAAGGATGTGGCTCGGCCGATTAGGTAGA
CGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTATGGGTCATGAGAGTGAGAACCAGAGACG
GAATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCAAACCTTTACACTGCACGACA
GTGCGATAGGGGGATCCCAAGTGACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGGTACCCTAAGGCGGTAC
CAGAATAAGGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACGGCAGCCCAAGTGTGGC
CGATCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAAATCCACTGCTCAA
CAGGTGGGCGCCCGTAGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCGGGGT
AGGAGTGAATCCCGTAATCCTGGACGGACCCCGATGGCGAAAGCACGTCGCGAGAACGGATCC
GACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCCGATTAGATACCCGGGTAGTCTGGCCGTA
CAATGTCTGCTAGGTGTGGCTCCCACTACGAGTGGGTGCTGTGCCGAGGGAAGCCGTAAGCAGA
CCGCTGGGAAGTACGTCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACTACAACCGG
AGGACCTGCGGTTAATTGGACTCAACGCCGACATCTACCAGCATCGACTGTAGTAATGACGAT
CAGGTTGATGACCTTATCCGAGCTTACAGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAG
GCGTCTGTTAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGACCCCTACTTGCCAGCAGTACCGCGAGGTAG
CTGGGGACAGTAGGGGGACCGCGTGGCTAACACGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTGAGT
ATGCCCGAATGTGCTGGGCAACACGCGGGCTACAATGGTCGAGACAAAGGGTCCAACTCCGAAA
GGAGACGGTAATCTCAGAACTCGATCGTAGTTCGGATTGTGGGCTGCAACTCGCCACATGAAGC
TGGATTCCGGTAGTAATCCGCTGTACAAGCGCGCGGTGAATACGTCCTGCTCCTTGACACACCCGC
CCGTCAAAGCACCCGAGTGAGGTCCGGATGAGGCGTACCTCGTACGTCGAATCTGGGCTTCGCAAG
GGGGCTAAGTCGAACAACGAGCA

>S1FP4

GGATGGGTGATTTAGCCATGCTAGTTCGCACGAGTTCAGACTCGTAGCAGATAGCTCAGTAACACGTG
GCCAACTACCCATGATCCGAATAACCTCGGGAACTGAGGCTAATGCGGAATAGCGTTATCCGC
CTGGAGTGGCACGAACGCGAAACGTTACGGCCCATAGGATGTGGCTCGGCCGATTAGGTAGAC
GGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGG
TATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCAAACCTTTACACTGCACGCGAG
TGCGATAAGGGGACTCCGAGTGCAGGGGCATATAGTCTCGCTTTTACGACCGTAAGGTGGTCTGT
AGAATAAGTGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCACGATGATGACC
GCTATTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCACGCAAGTCTATCGGGAAATCCGCGCGCTTAAC
GCGCGGGCGTCCGGTGGAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGACCAGAGGGGTACGTCGGGGT
AGGAGTGAATCCCGTAATCCTGGACGGACCCCGGTGGCGAAAGCGCCTCTGGAAGACGGATCC
GACGTTGAGGGACGAAAAGCTCGGGTACGAAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCGAGCTGTAAA
CGATGTCTGCTAGGTGTGGCACAGGCTACGAGCCTGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCAGA
CCGCTGGGAAGTACGTCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACTACAACCCGG
AGGAGCCTGCGGTTAATTGGACTCAACGCCGACATCTACCAGCATCGACAATGTGCAAGTGAAC
GTCAGGTTGATGACCTTACTGGAGCCATTGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTG
AGGCGTCTGTTAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACTCTAATTGCCAGCAACACCCTCGTGGT
GGTTGGGTACATTAGGAGGACTGCCAGTGCCAACTGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTGACG
TATGCCCCGAATGTGCTGGGCGACACGCGGGCTACAATGGCCGAGACAGTGGGATGCAACCCCGA
AAGGGGACGCTAATCTCCGAAACTCGGTGCTAGTTCGGATTGAGGGCTGAAACTCGCCCTCATGAA
GCTGGATTCCGGTAGTAATCGCGCCTCAGAAGGGCGCGGTGAATACGTCCTGCTCCTTGACACACCC

GCCCGTCAAAGCACCCGAGTGGGGTCCGGATGAGGCCGACGCAACGTCGGTCAATCTGGGCTCC
GCAAGGGGGCTTAAGTCGAACAATGTGGCT

>S1FP8

GGGGGACCGATTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGTGG
CCAAACTACCCCTTCGGAACACAATACCCCTCGGGAAACTGAGGCTAATAGTGTATACCATAACCACCAC
TGGAATGAGTGGTATGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACG
GTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTATGGGTATGAGAGTGAGAACCAGAGACGGA
ATCTGAGACAAGATCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGGCGGAAACCTTTACTACTGCACGACAGT
GCGATAGGGGATCCCAAGTGCACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGGTACCCTAAGCGGGTACCA
GAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCGGGTAATACCGGCAGCCCAAGTGATGGCCG
ATCTTATTGGGCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAAATCCACCTGCTCAACA
GGTGGGCGCCCGGTAGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCCGGGGTA
GGAGTGAAATCCCGTAATCTGGACGACCGCCGATGGCGAAAGCACGTGCGGAGAACGGATCCG
ACAGTAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCCTGGCCGTAAC
AATGCTGCTAGGTGTGGCTCCACTACGAGTGGGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGCTAAGCAGAC
CGCCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACTACAACCGGA
GGAGCCTGCGGTTAATTGGACTCAACGCCGACATCTACCAGCATCGACTGTAGTAATGACGATC
AGTTGATGACCTTACCGAGCTTACAGAGGAGGTGCATGGCCCGCTCAGCTCGTACCGTGAGG
CGTCTGTTAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGACCCTTACTTGCCAGCAGTACCGCGAGGTAGCT
GGGGACAGTAGGGGGACCGCGTGGCTAACACGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTCAGTAT
GCCCGAATGTGCTGGGCAACACGCGGGCTACAATGGTCGAGACAAAGGGTTCCAACCTCCGAAAG
GAGACGGTAATCTCAGAACTCGATCGTAGTTCGGATTGTGGGCTGCAACTCGCCACATGAAGCT
GGATTCCGGTAGTAATCGCGTGTACAAGCGCGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACACCGCC
CGTCAAAGCACCCGAGTGAGGTCCGGATGAGGCGTTACCACGAACGTCGAATCTGGGCTTCGCAAG
GGGGCTAAGTCGAACAAGAGGC

>S1FP10

TTAGTTTCTGGACGACTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCGAATAGCTCAGTAACAC
GTGGCCCAATTACCCCTCGGAGCACCATACCCCTCGGGAAACTGAGGCTAATAGTGCATACCACAGTC
CACCTGGAATGAGGACTGTGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAAGATGTGGCTGCGGACGATTAGGTA
GACGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTACGGGTGGTGAGAGCCAGAACCAGGAGA
CGGAATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGGCGGAAACCTTTACTACTGCACGA
CAGTGCATAAGGGGATCCCAAGTGCGTAGGCTTAGAGCCTACGCTTTTGTCCACCGTAGGGAGGT
GGACGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCCGCGGTAATACCGGCAGCCCAAGTGATG
GCCGATCTTATTGGGCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAAATCCACCCGCC
AACGGGTGGCCGTCCGGTGGAAACTGCGTGGCTTGTGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCCGGG
GTAGGAGTGAAATCCCGTAACTCTGGACGACCGCCGATGGCGAAAGCACGTGCGGAGAACGGAT
CCGACAGTGAAGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCTGCGCGTA
AACAAATGCTGTAGGTGTGGCTCCACTACGAGTGGGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGCTAAGCA
GGCCCGCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACTACAACC
GGAGGAGCCTGCGGTTAATTGGACTCAACGCCGACATCTACCAGCATCGACTGTGGTAATGAC
GGTCAGGTTGATGACCTCGCCACGAGCCACAGAGAGGAGGTGCATGGCCCGCTCAGCTCGTACCC
TGAGGCGTCTGTTAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGATTCTACTTCCAGCAACGCTGCGAA
GCGGTTGGGGACAGTAGGAAGACTGCCGTGCCAACACGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGT
CAGTATGCCCCGAATGTGCTGGGCAACACGCGGGCTACAATGGTCGAGACAAAGGGTTCCAACCTC
GAAAGGAGACGGTAATCTCAGAAACTCGATCGTAGTTCGGATTGTGGGCTGAAACTCGCCACATG
AAGCTGGATTCCGGTAGTAATCGCGTGTACAAGCGCGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACA
CCGCC

GTCAAAGCACCCGAGTGAGGTCCGGATGAGGCTCGTCACACGAGTCGAATCTGGGCTTCGCAAGGGG
CTAAGTCGAACAAGAGGCG

>S2FP2

TTGCACGGAAGTTCAGACTCGTAGCAGATAGCTCAGTAACACGTGGCCAACTACCCTATGGATCCGA
ATAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATTCGGAATACGATTACCCGCCTGGAGTGGTGTGAATCCGAAA
CGCTCCGGCGCCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCCACCGTG
CCCATAATCGGTACGGTGTGAGAGCAAGAGCCCCGAGACGGTATCTGAGACAAGATACCGGGC
CCTACGGGGCGCAGCAGGCGCAAACCTTTACACTGCACGAAAGTGCGATAAAGGGGACTCCAAGT
GCGAGGGCATATAGTCTCGCTTTTTCGACCGTAAGGTGGTTCGCGGAATAAGTGCTGGGCAAGAC
CGGTGCCAGCCGCGCGGTAATACCGGCAGCAGAGTGATGACCGCTATTATTGGGCCTAAAGCGT
CCGTAGCTGGCCGTGCAAGTCCATCGGAAATCCGCGCGCTTAACGCGCGGGCGTCCGGTGGAAC
TGCATGGCTTGGGACCGGAAGACCAGAGGGGTACGTCGGGGTAGGAGTGAATCCCGTAATCCT
GGACGGACCACCGGTGGCGAAAGCGCCTCTGGAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTC
GGGTACGAAACCGATTAGATACCCGGGTAGTCCGAGCTGTAAACGATGTCTGCTAGGTGTGGCAC
AGGCTACGAGCCTGTGCTGTGCCGAGGGAAGCCGTGAAGCAGACCCGCTGGGAAGTACGTCGCG
AAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTAATTGG
ACTCAACGCCGGACATCTCACCAGCATCGACAATGTGCAGTAAAAGTACAGTTGATGACCTTACTGG
AGCATTGAGAGGAGGTGCATGCGCCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCTGTAAAGTACGGCA
ACGAGCGAGACCCGCACTCTAATTGCCAGCAACACCTAGCCGTTGGTGGGTACATTAGGAGGACT
GCCAGTGCCAACTGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTCAAGTATGCCCGAATGTGCTGGGCG
ACACGCGGGCTACAATGGCCGAGACAGTGGGATGCAACCCCGAAAGGGGGCGCTAATCTCCGAAA
CTCGGTGCTAGTTCGGATTGAGGGCTGAAACTCGCCCTCATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAATCGGC
CTCAGAAGGGCGCGGTGAATACGTCCTGCTCTTGACACACCCCGCTCAAAGCACCCGAGTGG
GGTCCGGATGAGGCCGCGCAACGCGCGTCAATCTGGGCTCCGCAAGGGGGCTAAGTTCGAACA
ATTTGGT

>S2FP3

AAAAAACCAAGTATTTGGAACCGATTTAGCCATGCTAGTTGTACGAGTTTAGACTCGTAGCAGATAGC
TCAGTAACACGTGGCCAACTACCCTATGGATCCGGACAACCTCGGGAACTGAGGCTAATCCGGA
ATACGGCTCTCAGCCTGGAAGTGGCGAGAGTCAAGAACGCCCGCGCCATAGGATGTGGCTGCG
GCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCATAATCGGTACGGTGTGAGAGCA
AGAGCCCGGAGACGGTATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGGAAACCT
TTACTGCACGACAGTGCATAAAGGGGACTCCAAGTGCAGGGCATATAGTCTCGCTTTTACCA
CCGTAAGGAGGTGGTGAATAAGTGTGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCGCGTAATACCGGCA
GCACGAGTGATGACCGCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCACGCAAGTCTATCGGGA
AATCCGCGCGCTCAACGCGCGGGCGTCCGGTGGAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGACCAGAA
GGGTACGTCTGGGTAGGAGTGAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGGTGGCGAAAGCGCTTC
TGGAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTCGGGTACGAAACCGGATTAGATACCCGGTA
GTCCGAGCTGTAACGATGTCTGCTAGGTGTGCCACAGGCTACGACCTGTGGTGTCCGTAGGGA
AGCCGTGAAGCAGACCGCCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGG
AGCACTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTAATTGGACTCAACGCGGACATCTCACCAGCATCGAC
AATGTGCAGTGAAGGTGAGTTGATGACCTTACTGGAGCATTGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGT
CAGCTCGTACCGTGAGGCGTCTGTAAAGTCAAGCAACGAGCGAGACCCGCACTCCTAATTGCCAGC
AATACCCTTGTGGTAGTTGGGTACATTAGGAGGACTGCCAGTGCAAACTGGAGGAAGGAACGGG
CAACGTTAGGTAGTATGCCCCGAATGTGCTGGGCGACACGCGGGCTACAATGGCCGAGACAGTG
GGATGCAACCCGAAAGGGGACGCTAATCTCCGAAACTCGGTGCTAGTTCCGATTGAGGACTGAAA
CTGTCCTCATGAAGTGGATTCCGGTAGTAATCGCGCCTCAGAAGGGCGCGGTGAATACGTCCTGCT

TCCTTGACACACCGCCCGTCAAAGCACCCGAGTGGGGTCCGGATGAGGCCTTGATCCAAGTCGATC
TGTTTCG

>S2FP8

AGTAGATTTAGCATGCTAGTCGTGCGAGTTCACACTCGCGGCTGTAGCTCATGGACACGTGGCCTACT
ACCCTACAGAGACGCATAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATTCGTATACCCCTCTCACGCTGGAATG
CCAAGAGGCACAAACGCTCCCGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGT
AACGGCCACCCTGCCCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGAATCTGAG
ACAAGATTCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGGCGCAAACCTTTACACTGCACGCACGTGCGATAA
GGGGACTCCGAGTGCAGGGCATATCGTCCTCGCTTTTGTGTACCGTAGGGCGGTACACGAACAAG
AGCTGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACGGCAGCTCAAGTGATGGCCGATCTTATT
GGGCTAAAGCGTCCGTAGTGGCCTCGAAAGTCCGTGCGGAAATCCACACGCCAACGTGTGGGC
GTCCGGCGGAAACTCCGAGGCTTGGGACCGGAAGGCTCGAGGGGTACGTCCGGGTAGGAGTGA
AATCCCGTAATCCCGACGGACCACCGATGGCGAAAGCACCTCGAGAAAACGGATCCGACAGTGAG
GGACGAAAGCTAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCTAGCCGTAACGATGTTCCG
TAGGTGTGACACAGGCTACGCGCCTGTGTTGTGCCGTAGGGAAGCCGAGAAGCGAACCCGCTGGG
AAGTACGTCTGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACTACAACCGGAGGAGCCTG
CGGTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTACCAGCCGACTACAGTGATGACGGTCAGGTTGATG
ACCTCGCCAGCAGCTGTAGAGAGGAGGTGCATGCCCCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCGT
TTAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACTCTAATTGCCAGCAGCAGTTCGACTGGCTGGGTAC
ATTAGGAGGACTGCCAGTGCCAAACTGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTCAAGTATGCCCGA
ATGAGCTGGGCTACACGCGGGCTACAATGGCCAGGACAATGGGTTGCAACCTCGAAAGAGGGCGC
TAATCTCCGAAACCTGGTCGTAGTTCGGACTGAGGGCTGAAACTCGCCCTCACGAAGCTGGATTCCG
TAGTAGTCGCCTTTCACAAGAGGGCGGCGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACACCCGCCGTCAAAG
CACCCGAGTGAGTCCGGATGAGTGCCTGTCTACCACAGTCGAATCGTGGCCTCAGCAAGAGCAT
CGAACTCGAGTAATCGGAA

>S2FP14

CATGGCTAGTCGTGCGAGTTCACACTCGCGGCAAATAGCTCATTAAACAGTGGCCTACTACCCTACAGA
GACGCATAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATTCGTATACCCCTCTCACGCTGGAATGCCAAGAGGCA
CAAACGCTCCCGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAAACGGCCACC
GTGCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGAATCTGAGACAAGATTCCG
GGCCCTACGGGGCGCAGCAGGGCGCAAACCTTTACACTGCACGCACGTGCGATAAGGGGACTCCG
AGTGCAGGGCATATCGTCCTCGCTTTTGTGTACCGTAGGGCGGTACACGAACAAGAGCTGGGCAA
GACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACGGCAGCTCAAGTGATGGCCGATCTTATTGGCCTAAAG
CGTCCGTAGCTGGCCTCGAAAGTCCGTGCGGAAATCCACGCGCCCAACGTGTGGGCGTCCGGCGGA
AACTCCGAGGCTTGGGACCGGAAGGCTCGAGGGGTACGTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAAT
CCCGGACGGACCACCGATGGCGAAAGCACCTCGAGAAAACGGATCCGACAGTGAGGGACGAAAGC
TAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCTAGCCGTAACGATGTTGCTAGGTGTGAC
ACAGGCTACGCGCTGTGTTGTGCCGTAGGGAAAGCCGAGAAGCGAACCCCTGGGAAGTACGTCT
GCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACTACAACCGGAGGAGCTGCGGTTAATT
GGACTCAACGCCGGACATCTACCAGCTCCGACTACAGTGATGACGGTCAGGTTGATGACCTCGCCA
CGACGCTGTAGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTACGCTCGTACCGTGAGGGCGTCTGTTAAGTCAG
GCAACGAGCGAGACCCGCACTCTAATTGCCAGCAGCAGTTCGACTGGCTGGGTACATTAGGAGG
ACTGCCAGTGCCAAACTGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTCAAGTATGCCCGAATGAGCTGG
GCTACACGCGGGTACAATGGCCAAGACAATGGGTTGCAACCTCGAAAGAGGGCGCTAATCTCCGA
AACCTGGTCGTAGTTCGGACTGAGGGCTGAAACTCGCCCTCACGAAGCTGGATTCCGTTAGTAGTCG
CCTTTCACAAGAGGGCGGCGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACACCCGCCGTCAAAGCACCCGAGT

GAGGTCGGATGAGGCTGTGTACCCACAGTCGAATCTGGGCTTCGCAAGGGGGCTAAGTCGAGCAT
CGGGCA

>S2FP25

CATGGCATCGATTTAGCCATGCTAGTTGTACGAGTTTAGACTCGTAGCAGATAGCTCAGTAACACGTG
GCCAACTACCTATGGATCCGGACAACCTCGGGAACTGAGGCTAATCCGGAATACGGCTCTCAG
CCTGGAAGTGCGGAGAGTCAGAAACGCCCCGGCCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAG
ACGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGAC
GGTATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGGAAACCTTTACACTGCACGAC
AGTGCGATAAGGGGACTCCAAGTGCGAGGGCATATAGTCCTCGCTTTCCACCACCGTAAGGAGGTG
GTAGAATAAGTGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCAGAGTGATGA
CCGCTCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCACGCAAGTCTATCGGGAAATCCGCGCGCTCA
ACGCGCGGGCGTCCGGTGGAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGACAAAAGGTACGTCTGGGG
TAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGGTGGCGAAAGCGCTTCTGGAAGACGGATCC
GACGGTGAGGGACGAAAAGCTCGGGTCACGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCGAGCTGTA
CGATGTCTGCTAGGTGTGCCACAGGCTACGAGCCTGTGGTGTGCCGTAGGGGAAGCCGTGAAGCAGA
CCGCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACTACAACCGG
AGGACCTGCGGTTAATTGGACTCAACGCCGACATCTACCAGCATCGACAATGTGCAGTGAAG
GTCAGTTGATGACCTTACTGGACCATGAGAGGAGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTG
AGGCGTCTGTAAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACTCTAATTGCCAGCAATACCCTTGTGGT
AGTTGGGTACATTAGGAGGACTGCCAGTGCCAACTGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTACG
TATGCCCGAATGTGCTGGGCGACACGCGGGCTACAATGGCCGAGACAGTGGGATGCAACCCCGA
AAGGGGACGCTAATCTCGAAACTCGGTCTGATGTTCCGATTGAGGACTGAACTCGTCTCATGAA
GCTGGATTCGGTAGTAATCGGCCTCAGAAGGGCGCGGTGAATACGTCCTGCTCCTGCACACACC
GCCCGTCAAAGCACCCGAGTGGGGTCCGGATGAGGCCTTGATTCCAGGGTCGAATCTGGGCTCCG
AAGGGGGCTTAAGTCGAATAAGTGGCT

SECUENCIAS COMPLETAS DE ARQUEAS DEL GEN 16S DEL rRNA DE LA MALAHÁ (GRANADA)

>A1LM2

GGACGATTTAGCCATGCTAGTCTGACGAGTTCATACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGTGGCCAA
ACTACCCTTCGGAACACAATACCCTCGGGAACTGAGGCTAATAGTGCATACCATACTCCCCTGGA
ATGAGGGTTGTGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGG
GGTAACGCCCCACCGTGCCAATAATCGGTATGGGTCATGAGAGTGAGAACCCGGAGACGGAATCT
GAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGGAAACCTTTACACTGCACGCCAGTGCGA
TAGGGGAATCCCAAGTGCGCAGGCATAGAGCCTGTGCTTTTGTCCACCGTAGGGAGGTGAACGAAT
AAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCCGAGTGATGGCCGATT
TATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCTGCGCAAGTCCATCGGAAAATCCACCTGCTCAACGGGTG
GGCGTCCGGTGGAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCGGGGGTAGGAG
TGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCGCCGATGGCGAAAAGCACGTCGCGAGGACGGATCCGACAGT
GAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCTGT
GCCGTAACAATGTCTGTAGGTGTGGCTCCCGCTACGAGCGGGTGTGTGCCGTAGGGAAAGCCGC
TAAACAGACCCCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACT
ACAACCGGAGGAGCTCGGTTAATTGGACTCAACGCCGACATCTACCAGCATCGACTGTAATA
ATGACGATCAGTTGATGACCTTATCCGAGTTTCAGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTAGCTCGT
ACCGTGAGGCGTCTGTTAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGATCCTTACTTGCCAGCAGCACCG
CGAAGTGGCTGGGGACAGTAGGGAGACCGCGTGGCCAACACGGAGGAAGGAACGGCAACCGT
AGGTACGATATGCCCGAATGTGCTGGGCAACACGCGGGCTACAATGGTCGAGACAAAGGGTCTCTA

CTCCGAAAGGAGACGGTAATCTCAGAACTCGATCGTAGTTCGGATTGTGGGCTGCAACTCGCCAC
 ATGAAGCTGGATTGGTAGTAATCGCGTGTACAAGCGCGGGTGAATACGTCCTGCTCCTTGCAC
 ACACCGCCCGTCAAAGCACCCGAGTGAGGTCCGGATGAGGCGTTGTTACAAAAGTCAATCTGGGC
 TTCGAAGGGGGCTAAGTCAACAACGTGCA

>A1LM9

TATGGGGATCGAATTTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTTAGACTCGTAGCATATAGCTCAGTAACACGT
 GGCCAACTACCTACAGACCCGAATAACCTCGGGAACTGAGGCCAATAGCGGATATAACTCTCAT
 GCTGGAGTGCAGAGAGTTAGAAACGTTCCGGCGCTGTAGGATGTGGCTCGGCGCGATTAGGTAGA
 TGGTGGGGTAACGGCCACCATGCCGATAATCGGTACAGTTGTGAGAGCAAGAACCTGGAGACG
 GTATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACACGACA
 GTGCGATAGGGGACTCCGAGTGTGAGGGCATATAGCCCTCGCTTTTCTGTACCGTAAGGTGGTAC
 AGGAACAAGGACTGGGAAGACCCGGTCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGTCCGAGTGATGGC
 CGATATTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTTGTGTGTAAGTCCATTGGGAAATCGACCAGCTCAA
 CTGGTTCGGCGTCCGGTGGAACTACACAGCTTGGGGCCGAAAGACTCGACGGGTACGTCCGGGGT
 AGGAGTGAATCCTGTAATCCTGGACGGACCACCAATGGGGAAACCACGTTGAGAGACCGGACCC
 GACAGTGAGGGACGAAAGCTAGGGTCTCGAACCCGATTAGATACCCGGGTAGTCTGCTGTAACA
 ATGCTCGTAGGTATGTCACGCGCCACGAGCAGCGATGTGCCGTAGTGAAGACGATAAGCGAGCC
 GCCTGGGAAGTACGTTGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACCACAACCGGGAG
 GAGCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGACATCTCACCGGTCCCGACAGTAGTAATGACAGTCA
 GGTTGACGACTTTACTCGACGCTACTGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGG
 CGTCTGTTAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACTTCTAGTTGCCAGCAATACCCTTGAGGTGGT
 TGGGTACACTAGGAGGACTGCCGCTGCTAAAGCGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTACAGTAT
 GCCCGAATGGACCGGGCAACACGCGGGTACAATGGCTATGACAGTGGGACGCAACGCCGAGAG
 GCGAAGCTAATCTCAAACGTAGTCGTAGTTCGGATTGCGGGCTGAAACCCGCCCGCATGAAGCTG
 GATTCGGTAGTAATCGCGTGTGCAAGCGCGCGTGAATACGTCCTGCTCCTTGACACACCGCC
 GTCAAAGCACCCGAGTGGGGTCCGGATGAGGCCGTATGCGACGGTCAATCTGGGCTCCGCAAG
 GGGGCTAAGTCAATCATTAGGT

>A1LM21

CCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCATATAGCTCAGTAACACGTGGCCAACTACCCATC
 AGACCGCAATAACCTCGGGAACTGAGGCCAATAGCGGATATAACTCTCATGCTGGAGTGCCGAGA
 GTTAGAAACGTTCCGGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGATGGTGGGGTAACGGC
 CCACCATGCCGATAATCGGTACAGTTGTGAGAGCAAGAGCCTGGAGACGGTATCTGAGACAAGAT
 ACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACGACAGTGCATAGGGGGAC
 TCCGAGTGTGAGGGCATATAGCCCTCGCTTTTCTGAACCGTAAGGTGGTTCAGGAACAAGGACTGG
 GCAAGACCCGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGTCCAAGTATGGCCGATATTATTGGGCCT
 AAAGCGTCCGTAGCTTGTGTGTAAGTCCATTGGGAAATCGACCAGTCAACTGGTCCGGCTCCGGT
 GAAACTACACAGCTTGGGGCCGAGAGACTCGACGGGTACGTCGGGGTAGGAGTGAATCCTGT
 AATCCTGGACGGACCAATGGGGAAACACGTTGAGAGACCCGACCCGACAGTGAGGGACGAA
 AGCTAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGTAGTCTGGCTGTAACAATGCTCGCTGGTATGT
 CACGCGCCATGAGCACGTGATGTGCCGTAGTGAAGACGATAAGCGAGCCGCTGGGAAGTACGTC
 GCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACCACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTAATT
 GGACTCAACGCCGAAATCTCACCGGTCCCGACAGTAGTAATGACAGTCAAGTTGACGACTTTACTC
 GACGCTACTGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCTGTTAAGTCAGG
 CAACGAGCGAGACCCGCACTTCTAGTTGCCAGCAACCCCTTGTGGTGGTTGGGTACACTAGGAGG
 ACTGCCGCTGCTAAAGCGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTGAGTATGCCCGAATGGACCGG
 GCAACACGCGGGTACAATGGCTCTGACAGTGGGATGCAACGCCGAGAGGCGACGCTAATCTCAA
 ACGGAGTCGTAGTTCGGATTGCGGGCTGAAACCCGCCCGCATGAAGCTGGATTGGTAGTAATCGC

GTGTCAGAAGCGCGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACACCCGCCGTCAAAGCACCCGAGTG
GGGTCCGGATGAGGCCGTATGCGACGGTCAATCTGGGCTCCGAAGGGGGCTTAAGTCGAACA
ACGTGCT

>S2LM9

GCATGGGATCGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGGGTTTCATGACTCGTGGCATATAGCTCAGTAACACG
TGGCCAACTACCCTACAGACCCGAATAACCTCGGGAACTGAGGCAAATAGCGGATATAACTCTCA
GGCTGGAGTGCCGAGAGTTAGAAACGTTCCGGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAG
ATGGTGGGGTAACGGCCACCATGCCGATAATCGGTACAGTTGTGAGAGCAAGAGCCCTGGAGAC
GGTATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCCGCAAACCTTTACACTGCACGAC
AGTGCATAGGGGGACTCCGAGTGTGAGGGCATATAGCCCTCGCTTTTCTGTACCCTAAGGTGGTA
CAGGAACAAGGACTGGGCAAGACCCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGAGTCCAAGTGATGG
CCGATATTATTGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTTGTGTGTAAGTCCATTGGGAAATCGACCAGCTCA
ACTGGTCGGCGTCCGGTGGAACTACACAGCTTGGGGCCGAAAGACTCGACGGGTACGTCCGGGG
TAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTGGACGGACCACCAATGGGGAAACCACGTTGAGAGACCCGACCC
GACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCCGATTAGATACCCGGGTAGTCTAGCTGTA AAC
AATGCTCGCTAGGTATGTCACGCGCCATGAGCAGCGCATGTGCCGTAGTGAAGACGATAAGCGAGC
CGCCTGGGAAGTACGTCTGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACCACAACCCGA
GGAGCTGCGGTTAATTGGACTCAACGCCGACATCTACCGGTCCCGACAGTAGTAATGACAGTC
AGGTTGACGACTTTACTCGACGCTACTGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTAGCTCGTACCGTGAG
GCGTCTGTTAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCACACTTCTAGTTGCCAGCAACACCCCTGCGGTAG
TTGGGTACACTAGGAGGACTGCCATTGCTAAAATGGAGGAAGGAATGGGCAACGGTAGGTACAGTA
TGCCCCGAATGGACCGGGCAACACGCGGGCTACAATGGCTATGACAGTGGGATGCAACGCCGAGA
GGCGAAGCTAATCTCAAACGTAGTCGTAGTTCGGATTGCGGGCTGAAACCCGCCCGCATGAAGCT
GGATTCCGTAGTAATCGCGTGTGCAAGCGCGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACACCCGG
CGTCAAAGCACCCGAGTGGGGTCCGGATGAGGCCGTATGCGACGGTCAATCTGGGCTCCGCAA
GGGGGCTTAAGTCGAATCATCATGGCT

>S3LM6

GTATCGAATTTAAGCCATGCTAGTCGTACGAGTTCACACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGTGGC
CAAACCTACCCTTCGGAGTTCAATACCCTCGGGAACTGAGGTTAATAGAGCATACCATACCACCACT
GGAATGAGTGGTATGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGG
TGGGGTAACGGCCACCCTGCCAATAATCGGTATGGTTCATGAGAGTGAGAACCAGAGACGGAA
TCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCCGCAAACCTTTACACTGCACGACAGTG
CGATAGGGGGATCCCAAGTGCACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGACACCCTAAGGCGGTGTCAG
AATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCCAAGTATGGCCGA
TCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCACGCAAGTCCATCGGGAAATCCACCTGCCAACAG
GTGGGGCGCCCGTAGAACTGCGTGGCTTGGGACCCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCCGGGGTAG
GAGTGAATCCCGTAATCCTGGACGGACCCCGATGGCGAAAGCACGTGCGGAGAACGGATCCGA
CAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCCGATTAGATACCCGGGTAGTCTTGCCGCTAAACA
ATGTCTGTTAGGTGTGGCTCCCACTACGAGTGGGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGCTAAGCAGACC
GCCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACTACAACCCGAG
GAGCCTGCGGTTAATTGGACTCAACGCCGACATCTACCAGCATCGACTGTAATAATGACGACCA
GGTTGATGACCTTATCCGAGTTTCAGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTAGCTCGTACCGTGAGGC
GTCCTGTTAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCATCCTTACTTGCCAGCAGTATCGCGAGATAGCTG
GGGACAGTAGGGAGACCCGCTGGCTAACACGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTAGTATG
CCCCGAATGTGCTGGGCAACACGCGGGCTACAATGGTTCGAGACAAAGGGTTCAACTCCGAAAGGA
GACGGTAATCTCAGAACTCGATCGTAGTTCGGATTGTGGGCTGCAACTCGCCACATGAAGCTGG
ATTCGGTAGTAATCGCGTGTGCAAGCGCGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACACCCGCCG

TCAAAGCACCCGAGTGAGGTCCGGATGAGGCGGCCACGCGCTCGAATCTGGGCTTCGCAAGGG
GGCTTAAGTCGAACATGAGCA

>S3LM7

GAAGGGAGTCGATTTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCAGATAGCTCAGTAACACGT
GGCCAAACTACCCATGGATCCGAATAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATTCGGAATACGAATCCCAG
GCTGGAAGTCCGGGATTCCGAAACGTTACGGCGCCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGA
CGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCGATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACG
GTATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGCACGCGA
GTGCGATAAGGGGACTCCAAGTGCAGGGCATATCGTCCTCGCTTTTCGCGACCGTAAGGTGGTGC
CAGAATAAGTGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCACAAAGTGATGAC
CGCTATTATTGGGCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCAGCCAAGTCCATCGGGAAATCCGCGTGCTTAA
CGCGCGGGCGTCCGGTGAAACTGGATGGCTTGGGACCGGAAGACCAGAGGGGTACGTCCGGGG
TAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGGAAGACGGATCC
GACGGTGAGGGACGAAAAGCTCGGGTACGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCGAGCTGTAAA
CGATGTCTGCTAGGTGTGACACAGGCTACGAGCCTGTGTTGTGCCGTAGGGGAAGCCGTGAAGCAGA
CCGCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACTACAACCCGG
AGGACCTGCGGTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTACCAGCATCGACAACGTGCCGTGAAG
GTGAGTGTGATGAGCTTACTGGAGCCGTTGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTG
AGGCGTCTGTTAAGTACAGGCAACGAGCGAGACCCGCACTCCTAATTGCCAGCAACACCCCTTGTTG
GGTTGGGTACATTAGGAGGACTGCCAGTGCCAAACTGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTGAG
TATGCCCGAATGTGCTGGGCGACACGCGGGCTACAATGGCCAAGACAGTGGGATGCAACCCCGAA
AGGGGGCGCTAATCTCCGAAACTTGGTCGTAGTTCGGATTGAGGGCTGAAACTCGCCCTCATGAAG
CTGGATTCCGTAGTAATCGGCCTCAGAAGGGCGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCTGCACACACCG
CCCCTCAAAGCACCCGAGTGGGGTCCGGATGAGGCTCTGTAACAGAGGTGCAATCTGGGCTCCGC
AAGGGGGCTTAAGTCGAACAATGTGCT

>S2LM21

CATGCACGGCGACGATATAGCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGCGAATAGCTCAGTAACAC
GTGGCCAAACTACCCCTCGGAGCAGATACCCCTCGGGAAACTGAGGCTAATAGTCATACCACAGTC
CAGCTGGAATGAGGACTGTGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTA
GACGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAAATAATCGGTACGGGTCATGAGAGTGAGAACCCGGAGA
CGGAATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGCACGC
CAGTGCATAAGGGGATCCCAAGTGCAGGCGATAGAGCCTGCGCTTTGTACACCGTAGGGAGGT
GTACGAATAAGGGTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCCCGAGTGATG
GTCGATCTTATTGGGCTAAAGCGTCCGTAGCTGGTGCACAAAGTCCATCGGAAAATCCACCCGCTC
AACGGGTGGGCGTCCGGTGAAACTGTGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCCGG
GGTAGGAGTGAATCCCCTAATCCTGGACGGACCCGATGGCGAAAGCACGTGCGGAGGACGGA
TCCGACAGTGAGGGACGAAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCTGGCCGT
AAACAATGCTGTTAGTGTGGCTCCCACTACGAGTGGGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGCTAAAC
AGACCGCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACTACAAC
CGGAGGAGCTGCGGTTAATTGGACTCAACGCCGACATCTACCAGCATCGACTGTAGTAATGAC
GATCAGGTTGATGACCTTATCCGAGCTTACAGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGT
GAGGCGTCTGTTAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCATCCTTACTTGCCAGCAGCACTGCGAAG
TGGCTGGGACAGTAGGGAGACCCCGTGGCCAACACGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTC
AGTATCCCCGAATGTGCTGGGCAACGCGGGCTACAATGGTCGAGACAAAGGGTTCCTAACTCCG
AAAGGAGACGGTAATCTCAGAAACTCGATCGTAGTTCGGATTGTGGGCTGCAACTCGCCACATGA
AGCTGGATTCCGTAGTAATCGCGTGCACAAGCGCGGGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGCACACAC

CGCCCGTCAAAGCACCCGAGTGAGGTCCGGATGAGGCGCGTTCCACGCGTGAATCTGGGCTTCG
AAGGGGGCTTAAGTCGAACAAAGGATTTGGTCG

>S1LM16

GAATGGGGATCGATTTAGCCATGCTAGTTGTACGAGTTTACTCGTAGCAGATAGCTCAGTAACACG
TGGCAAACCTACCCTATGGATCCGGACAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATCCGGAATACGGCTCTCA
GCCTGGAAGTGGCGAGAGTCAGAAACGCTCCGGCGCCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTA
GACGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGA
CGGTATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGCACGA
CAGTGCATAAAGGGACTCCAAGTGCAGGGCATATAGTCTCGTTTTACCACCGTAAGGAGGT
GGTAGAATAAGTGTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGGTAATACCGGCAGCACGAGTGATG
ACCGCTCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCACGCAAGTCTATCGGGAAATCCGCGCGCTC
AACGCGCGGGCGTCCGGTGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGATCAAAGGGTACGTCTGGG
GTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGGTGGCGAAAGCGCTCTCTGAAAGACGGAT
CCGACCGTGAGGGAGCAAAGCTCGGGTACGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCGAGCTGTA
AACGATGTCTGCTAGGTGTGCCACAGGCTACGAGCCTGTGGTGTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCA
GACCGCTGGGAAGTACGTCCGAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACTACAACC
GGAGGAGCCTGCGGTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTACCAGCATCGACAATGTGCAGTGA
AGGTCAGGTTGATGACCTTACTGGAGCCATTGAGAGGAGGTGCATGGCCCGCTCAGCTCGTACCG
TGAGGCGTCTGTAAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACTCTAATTGCCAGCAATAACCTTGTG
GTAGTTGGGTACATTAGGAGGACTGCCAGTGCCAAACTGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTC
AGTATGCCCGAATGTGTGGGCGACACGCGGGTACAATGGCCGAGACAGTGGGATGCAACCCC
GAAAGGGGACGCTAATTTCCGAAACTCGTCTGATTTCCGATTGAGGACTGAAACTCGTCTCATG
AAGCTGGATTCCGTAGTAATCGCGCCTCAGAAGGGCGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACA
CCGCCCGTCAAAGCACCCGAGTGGGGTCCGGATGAGGCCTTGATTCCAAGGTGAATCTGGGCTCC
GCAAGGGGGCTTAAGTCGAACAAAGGATTTGGTCG

SECUENCIAS COMPLETAS DE ARQUEAS DEL GEN 16S DEL rRNA DE SANTA M^a DE JESÚS (BAHÍA DE CÁDIZ)

>A1BC2

ATGGGGATCGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGTG
GCCAAACTACCCTTCGGAACACAATACCCTCGGGAAACTGAGGCTAATAGTGTATACCATAACCACCA
CTGGAATGAGTGATGTGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGAC
GGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTATGGGTATGAGAGTGAGAACCAGAGACGG
AATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGGCGGAAACCTTTACACTGCACGACAG
TGCGATAGGGGGATCCCAAGTGACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGGTACCGTAAGGTGGTACC
AGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGGTAATACCGGCAGCCCAAGTGTAGGCC
GATCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCAAGTCCATCGGAAATCCACCTGCTCAAC
AGGTGGGCGCCCGGTAGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCAGCGGTACGTCCGGGGT
AGGAGTGAATCCCGTAATCCTGGACGGACCGCGATGGCGAAAGCACGTCGCGAGGACGGATCC
GACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCTGGCCGTAAA
CAATGTCTGCTAGGTGTGGCTCCACTACGAGTGGGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGCTAAGCAGA
CCGCTGGGAAGTACGTCCGAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACTACAACCGG
AGGAGCCTGCGGTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTACCAGCATCGACTGTAAATGACGAC
CAGGTTGATGACCTTGTCCGAGTTTCAGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAG
GCGTCTGTAAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACTTACTTGCCAGCAGTACCGCGAGGTAG
CTGGGGACAGTAGGGGGACCGCCTGGCTAACACGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTACAGT

ATGCCCGAATGTGCTGGGCAACACGCGGGCTACAATGGTCGAGACAAAGGGTTCCAACCTCCGAAA
 GGAGACGGTAATCTCAGAACTCGATCGTAGTTCGGATTGTGGGCTGCAACTCGCCACATGAAGC
 TGGATTGGTAGTAATCGCGTGTACAAGCGCGGGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACACCCGC
 CCGTCAAAGCACCCGAGTGAGGTCCGGATGAGGCGTTCACGAACGTGAATCTGGGCTTCGCAAG
 GGGGCTAAGTCGAACAACAGCA

>A2BC5

TATTGGACGATTAGCCATGCTAGTCGTACGAGTTCATACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGTGG
 CCAAACCTACCTTCGGAGCTCCATACCTCGGGAAACTGAGGTTAATAGAGCATACCACACCACCAC
 TGGAATGAGTAGTGTGTCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTCGCGCCGATTAGGTAGACG
 GTGGGGTAACGGCCACCCTGCCAATAATCGGTATGGGTCATGAGAGTGAGAACCAGAGACGGGA
 ATCTGAGACAAGATTCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGCACGACAGT
 GCGATAGGGGATCCCAAGTGCACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGGTACCCTAAGGCGGTACCA
 GAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCGCGTAATACCGGCAGCCCAAGTATGGCCG
 ATCTTATTGGGCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAAATCCACCTGCTCAACA
 GGTGGGCGCCCGGTAGAAACTGCGTGGCTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCCGGGGTA
 GGAGTGAAATCCCGTAATCTGGACGGACCGCGATGGCGAAAGCACGTGCGGAGAACGGATCCG
 ACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCTGGCCGTAAAC
 AATGCTGTAGGTGTGGCTCCACTACGAGTGGGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGCTAAGCAGAC
 CGCCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACTACAACCGGA
 GGAGCCTGCGGTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTACCAGCATCGACTGTAATAATGACGATC
 AGGTTGATGACCTTATCCGAGTTTCAGAGAGGAGGTGCATGGCCGCGTCAGCTCGTACCGTGAGG
 CGTCTGTAAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCATCCTTACTTGCCAGCAGTATCGCGAGATAGCT
 GGGGACAGTAGGGAGACCGCGTGGCTAACACGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTCAGTAT
 GCCCGAATGTGCTGGGCAACACGCGGGCTACAATGGTCGAGACAAAGGGTTCCAACCTCCGAAAG
 GAGACGGTAATCTCAGAACTCGATCGTAGTTCGGATTGTGGGCTGCAACTCGCCACATGAAGCT
 GGATTCCGGTAGTAATCGCGTGTACAAGCGCGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACACC GCC
 CGTCAAAGCACCCGAGTGAGGTCCGGATGAGGCGCGTCACACGCGTGAATCTGGGCTTCGCAAGG
 GGGCTAAGTCGAACAACGAGGCG

>A2BC9

TATGGGAATCGATTAGCCATGCTAGTTGACAGTTCAGACTCGTAGCATATAGCTCAGTAACACGT
 GGCCAACTACCTACAGACCGGATAACCTCGGGAAACTGAGGCCAATAGCGGATATAACTCTCA
 GACTGGAGTGTGAGAGTTAGAAACGTTCCGGCGCTGTAGGATGTGGCTCGCGCCGATTAGGTAG
 ATGGTGGGGTAACGGCCACCATGCCGATAATCGGTACAGTTGTGAGAGCAAGAGCCTGGAGAC
 GGTATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGCACGAC
 AGTGCGATAGGGGGACTCCGAGTGTGAGGGCATATAGCCCTCGCTTTTCTGAACCGTAAGGTGGTT
 CAGGAACAAGGACTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCGCGTAATACCGGCAGTCCAAGTATGG
 CCGATATTATGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTTGTGTAAAGTCCATTGGGAAATCGACCAGTCA
 ACTGGTCGGCGTCCGGTGGAACTACACAGCTTGGGGCCGGAAGACTCAACGGGTACGTCCGGGG
 TAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTGGACGGACCACCAATGGGGAAACCACGTTGAGAGACCGGACCC
 GACAGTGAGGGACGAAAGCTAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCTAGCTGTAAAC
 AATGCTCGCTAGGTATGTCACGCGCCATGAGCACGTGATGTGCCGTAGTGAAGACGATAAGCGAGC
 CGCCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACCACAACCGGA
 GGAGCCTGCGGTTAATTGGACTCAACGCCGAAATCTACCGGTCCCGACAGTAGTAATGACAGTC
 AGGTTGACGACTTTACTCGACGCTACTGAGAGGAGGTGCATGGCCCGCGTCAGCTCGTACCGTGAG
 GCGTCTGTAAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCACACTTCTAGTTGCCAGCAACACCCCTGCGGTGG
 TTGGGTACTAGGAGGACTGCCATTGCTAAAATGGAGGAAGGAATGGGCAACGGTAGGTCAGTA
 TGCCCCGAATGGACCGGGCAACACGCGGGCTACAATGGCTATGACAGTGGGATGCAACGCGGAGA

GGCGAAGCTAATCTCAAACGTAGTCGTAGTTCGGATTGCGGGCTGAAACCCGCCGCATGAAGCT
GGATTCCGGTAGTAATCGCGTGTGAGCAAGCGCGGGTGAATACGTCCTGCTCCTTGACACACCCGCC
CGTCAAAGCACCCGAGTGGGGTCCGGATGAGGCCGTCATGCGACGGTGAATCTGGGCTCCGCAA
GGGGGCTTAAGTCGAACAACATGCT

>A3BC2

TTGGCACGAAGTTCAGACTCGTAGCAGATAGCTCAGTAACACGTGGCCAACTACCTTATGGATCCGA
ATAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATGCGGAATAGCGTTTCATCGCCTGGAGTGGCACGAACCGGAAA
CGTTACGGCGCCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCACCGTG
CCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGAGACGGTATCTGAGACAAGATACCGGGC
CCTACGGGGCGCAGCAGGCCGCAAACCTTTACTGACGCGAGTGCATAAGGGGACTCCGAGT
GCGAGGGCATATAGTCTCGCTTTTACGACCGTAAGGTGGTCGTAGAATAAGTGTGGGCAAGAC
CGGTGCCAGCCCGCGGTAATACCGGCAGCAGAGTATGACCGCTATTATTGGCCTAAAGCGT
CCGTAGCTGGCCACGCAAGTCTATCGGGAAATCCGCGCGCTAACGCGCGGGCGTCCGGTGGAAAC
TGCGTGGCTTGGGACCGGAAGACCAGAGGGGTACGTCGGGGTAGGAGTGAATCCCGTAATCCT
GGACGGACCACCGGTGGCGAAAGCGCCTCTGGAAGACGGATCCGACGGTGAAGGGACGAAAGCTC
GGGTACGAACCGGATTAGATACCGGGTAGTCCGAGCTGTAACGATGTCTGCTAGGTGTGGCAC
AGGCTACGAGCCTGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCAGACCCCTGGGAAGTACGTCCGC
AAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTAATTGG
ACTCAACGCCGGACATCTCACCAGCATCGACAATGTGCAGTGAACGTCAAGTTGATGACCTTACTGG
AGCCATTGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAAGCGTCTCTGTTAAGTCAGGCA
ACGAGCGAGACCCGCACTCTAATTGCCAGCAACCCCTGTGGTGGTTGGGTACATTAGGAGGAC
TGCCAGTGCCAACTGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTGATGCCCCGAATGTGCTGGGC
GACACGCGGGCTACAATGGCCGAGACAGTGGGATGCAACCCCGAAAGGGGACGCTAATCTCCGAA
ACTCGTCTGATGTTCCGATTGAGGGTGAACCTCGCCCTCATGAAGCTGGATTGCTGATAGTAATCGCG
CCTCAGAAGGGCGCGGTGAATACGTCCTGCTCCTTGACACACCCGCCGTCAAAGCACCCGAGTG
GGGTCCGGATGAGGCCGACGCAACGTCCGTCGAATCTGGGCTCCGCAAGGGGGCTTAAGTCGAAC
AATTTGGT

>A3BC11

GCATGGGATCGATTAGCCATGCTAGTCGCACGGGCTTAGACCCGTGGCGTATAGCTCAGTAACACGT
GGCCAACTACCTTATGGACCATGATAACCTCGGGAACTGAGGCTAATCGTGGATATCGCTTTCAC
ACTGGAAGTCCGAATGCGAAAAACGTTCCGGCGCTTAGGAGGTGGTTGCGGCAATTAGGTAAA
CGGGGGGGTAACGGCCACCGGCCAGTAATCGGTACGGTGGTACAGCCAAAACCGGAAACG
GTATCTGAAACAAAATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGCGCGAAACCTTTACTGACACAACA
GGGCGATAGGGGGACTCCAAGGGCAAGGGCATATAGCCTTCGTTTTCTGACCGTAAGGTGGTCCG
ACAATAATGACTGGGCAAAACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGTCCAAGTGATGGCC
GCTGTTATTGGGCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCGGTGAAATCCGATCGGGAAATCAACGCGTTTAC
CGCGTCGCCTTCCGCTGAACTGCTCGGCTTGGGCGGGAAGATTACGCGGGTACGTCCGGGGTAG
GAGTGAATCCTGTAATCTGGACGACCAACCAATGGCGAAAGCAGCTGAGAAGCCGGACCCGAC
AGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTGAACCGGATTAGATACCCGGTAGTCTGCGCGTAAACGA
TGCTCGTTAGGTCTGCCGTGCACTACGAGTGCACGGTGAAGCGAAGTGAAGACGATAAACGAGCCG
CCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACCACAACCGGAGG
AGCCTGCGGTTAATTGGACTCAACGCCGACATCTCACCAGTCCCGACAGCAATAACGACGGTACG
CTTGACGAGCTTACCGAGTTGCTGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAAGCA
TCCTGTTAAGTCAGGTAACGAGCGAGACCCGATCCGTAGTTGCCAGCGATACCTTGTGTTAGTCCG
GGTACACTACGGAGACCGCCGACGCTAAGTCCGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTGATGATGC
CCCGAATGGACTGGGCAACACGCGGGCTACAATGGTTCGAGACAATGGGATGCGGCACCGAGAGGT
AGAGCTAATCCCCAACTCGGTCTGATGTCGGATTGTGGGCTGAAACTCGCCACATGAAGCTGGA

TTCGGTAGTAATCGCGTGTGAGAAGCGCGGGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACACCCGCCGT
 CAAAGCACCCGAGTGAGGTCCGGATGAGGCCATCATGCGATGTCAAATTGCTGGTAATCTGGGCTT
 CGCAAGGGGGCTTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGAGGAATCTGCGGCTGGATCACCTCT

>S1BC11

GAAAGGGGACGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACG
 TGGCCAACTACCCTTCGGAACACAATACCCTCGGGAACTGAGGCTAATAGTGTATACCATAACCAC
 CACTGGAATGAGTGGTATGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAG
 ACGGTGGGGTAACGGCCACCCTGCCAATAATCGGTATGGGTATGAGAGTGAGAACCAGAGAC
 GGAATCTGAGACAAGATTCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGCACGAC
 AGTGCATAGGGGGATCCAAAGTGCACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGGTACCCTAAGGCGGTA
 CCAGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCGCGTAATACGGCAGCCCAAGTGATGG
 CCGATCTTATTGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGAAATCCACCTGCTCA
 ACAGGTGGGCGCCCGTAGAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGCGCGACGGGTACGTCCGGG
 GTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTGGACGACCGCCGATGGCGAAAGCACGTCCGAGAACGGAT
 CCGACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATAACCGGGTAGTCTGGCCGTA
 AACAATGTCTGCTAGGTGTGGCTCCCACTACGAGTGGGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGCTAAGCA
 GACCGCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACTACAACC
 GGAGGAGCCTGCGGTTAATTGGACTCAACGCCGACATCTACCAGATCGACTGTAGTAATGAC
 GATCAGGTTGATGACCTTATCCGAGCTTCAGAGAGGAGGTGCATGGCCGCGCTCAGCTCGTACCGT
 GAGGCGTCTGTTAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGACCCCTACTTGCCAGCAGTACCGCGAGG
 TAGCTGGGGACAGTAGGGGGACCGCCGTGGCTAACACGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTC
 AGTATGCCCGAATGTGCTGGGCAACACGCGGGCTACAATGGTCGAGACAAAGGGTTCCAACCTCCG
 AAAGGAGACGGTAATCTCAGAACTCGATCGTAGTTCGGATTGTGGGCTGCAACTCGCCACATGA
 AGCTGGATTCCGTTAGTAATCGCGTGTACAAAGCGCGCGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACAC
 CGCCGTCAAAGCACCCGAGTGAGGTCCGGATGAGGCGTACCTCGTACGTGCAATCTGGGCTTCG
 AAGGGGGCTAAGTCGAACAGCTGGCG

>S3BC11

ATGGGGTTCGATTTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCACACTCGTGGCGAAAAGCTCAGTAACACGTTG
 CCAAATACCCTACAGAGAACGATAACCTCGGGAACTGAGGCTAATAGTTCATACGGGAGTCAATG
 CTTGAATGCCGACTCCCCGAAACGCTCCGGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACG
 GTGGGGTAACGGCCACCCTGCCAATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAACCAGGAGACGGA
 ATCTGAGACAAGATTCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGCACGCAAGT
 GCGATAAGGGGACCCCAAGTGCAGGGCATATAGTCTCGTTTTCTCGACTGTAAGCGGGTTCGAG
 GAATAAGAGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCGGTAATACCGGCAGCTCAAGTGATGACCG
 ATATTATTGGGCTAAAGCGTCCGTAGCCGGCCATGAAGGTTTCATCGGGAAATCCGCCAGTCAACT
 GGCGGGCTCCGGTGAACACCATGGCTTGGGACCGGAAGGCTCGAGGGGTACGTCTGGGGTAG
 GAGTGAATCCTGTAATCCTGGACGGACCACCGATGGCGAAAGCACCTCGAGAAGACGGATCCGAC
 GGTGAGGGACGAAAGCTAGGGTCTCGAACCGGATTAGATAACCGGGTAGTCTAGCTGTAACGAT
 GCTCGTAGGTGTGGCACAGGCTACGAGCCTGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCGAGCCG
 CCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACTACAACCGGAGG
 AGCCTGCGGTTAATTGGACTCAACGCCGACATCTACCAGCTCCGACTACAGTAATGACGGTCAG
 GTTGATGACCTTACCACGACGCTGTAGAGAGGAGGTGCATGGCCGCGTACGCTCGTACCGTGAGG
 CGTCTGTTAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACTTCTAATTGCCAGCAACAGTTTCGACTGGTT
 GGGTACATTAGAAGGACTGCCGCTGCTAAAGCGGAGGAAGGAACGGGCAACGTTAGGTAGTATG
 CCCCAGTGAAGCTGGGCTACACGCGGGCTACAATGGTCAAGACAATTGGGTTGCTATCTCGAAAGAG
 AACGCTAATCTCCTAACTTATGATCGTAGTTCGGATTGAGGACTGAAACTCGTCTCATGAAGCTGGA
 TTCGGTAGTAATCGCATTTACAAGAGTGCAGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACACACCCGCCGT

AAAGCACCCGAGTGAGGTCCGGATGAGGCCACCACCGGTGGTGAATCTGGGCTCGCAAGGGGG
CTTAAGTCGAACAAGAGCA

>S4BC8

GGATGGGACGATTTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCGAATAGCTCAGTAACACGTG
GCCAACTACCTTCGGAGCACCATACCCTCGGGAACTGAGGCTAATAGTGCATACCACAGTCCAC
CTGGAATGAGGACTGTGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGAC
GGTGGGGTAACGGCCACCCTGCCAATAATCGGTACGGGTGGTGAAGCCAGAACCCGGAGACGG
AATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGTCACGACAG
TGCGATAAGGGGATCCCAAGTGCCTAGGCATAGAGCCTACGCTTTTGTCCACCGTAGGGAGGTGAA
CGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCCGAGTGATGGCC
GATCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAAATCCACCCGCCAAC
GGGTGGCCGTCCGGTGGAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCGGGGTA
GGAGTGAAATCCCGTAATCTGGACGACCGCGATGGCGAAAGCACGTCGCGAGAACGGATCCG
ACAGTAGGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCTGGCCGTAAAC
AATGCCTGCTAGGTGTGGCTCCACTACGAGTGGGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGCTAAGCAGGC
CGCCTGGGAAGTACGTCGCCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACTACAACCGGA
GGAGCCTGCGGTTAATTGGACTCAACGCCGACATCTACCAGCATCGACTGTGGTAATGACGGTC
AGGTTGATGACCTGCCACGAGCCACAGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAG
GCGTCTGTAAAGTACGCAACGAGCGAGACCCGCATTCTACTTGCCAGCAACGCTGTGAAGCGG
TTGGGGACAGTAGGAAGACTGCCGTGGCCAACACGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTGAGT
ATGCCCGAATGTGCTGGGCAACACGCGGGCTACAATGGTGCAGACAAAGGGTTCCAACCTCCGAA
GGAGACGGCAATCTCAGAACTCGATCGTAGTTCGGATTGTGGGCTGAAACTCGCCACATGAAGC
TGGATTGGTAGTAATCGCGTGTACAAGCGCGGGTGAATACGTCCTGCTCCTTGCACACCCGC
CCGTCAAAGCACCCGAGTGAGGTCCGGATGAGGCTCGTACACGAGTGAATCTGGGCTTCGCAAG
GGGGCTAAGTCGAACAACAGGCA

SECUENCIAS PARCIALES DE BACTERIAS DEL GEN 16S DEL rRNA DE FUENTE DE PIEDRA (MALAGA)

>A2FP15

CCCAGGGCGGGAGGGGAAAGAACGCCTGGGCGGTAATACCCGCCAGGAAAGACATCACTCGCAGAA
GAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATT
ACTGGGCGTAAAGCGCGTAGGTGGCTTGATAAGCCGGTTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGG
GAACGGATCCGGAAGTGTAGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTAGAATCCCGGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAATACAGTGGCGAAGGCGGCCTTCTGGACTGACACTGACACT
GAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTC
GACCAGCCGTTGGGTGCCTAGCGCACTTTGTGGCGAAGTTAACGCGATAAGTCGACCCGCTGGGGA
GTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTTAATTGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCTGCGAACTTGTGAAGAGATCACT
TGGTGCCTTCGGGAACGCAAAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGTTGAAAATGTT
GGGGTTAAAGTCCCGTAACGAGCGCCACCCTTTGTCCTTATTGCCAGCACGTAATGGGTGGGAAAC
TCTAAGGAGACTGCCCGGGGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGGACCAACGTTCACTCATCTTGGCC
CCTTACGAGTAGGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCCGTAACAAAGGGGCTGCAAGCTCGCA
GAGTCACTAAATCCTTAAAGCCCGTCTTCACTGGAATCGG

>A2FP19

GGGACATGGGGGCACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGCAC
 TTTTCAGCAGGGAGGAAAAGCTGATCGTTAATACCGGTCAAGTGTGACGTTACCTGCAGAAGAAGCA
 CCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAACGTTAATCGGAATTACTGGG
 CGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTTGGTAAGCGAGTTGTGAAAGCCCCGGGCTAACCTGGGAATGG
 CAATTCGAAGTCCAAGCTAGAATGCAGCAGAGGGCAGTGAATTCAGGTTAGCGGTGAATGC
 TAGATATCTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTGCCTGGGCTGACATTGACGCTGAGGTGCG
 AAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGCTGAGAACTAGTC
 GTTGGGGCTATTAGAGCCTTAGTGACGCAGTAACCGGATAAGTTCTCCGCCTGGGGAGTACGGCC
 GCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCG
 ACGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCTGCGAACTTGGTAGAGATACCTTGGTGCCTT
 CGGAGCGCAGTGACAGGTGCTGCATGGCCGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
 CGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGAACTCTAGGGAGACTGCCG
 GTGACAAAACGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACAC
 ACGTGTACAATGGGGCGCACAGAGGGCAGCAAGCGCGCGAGT

>A1FP22

GCTACGCATGAGAAGTCTGACGGAGCACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGTTCT
 GTTGTAGGGAAGAACAAGTACCGTGCGAATAGAGCGGTACCTTGACGTTACCTAACGAGGAAGCC
 CCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG
 CGTAAAGCGCGCAGGCGGTTCCCTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTAACCTGGAGGGTGC
 ATTGAAAACCTGGGAACTTGAGGACAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTTAGCGGTGAAATGC
 GTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTTTCTGACGCTGAGGTGCG
 AAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGGT
 GTTAGGGGCTTCCACCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCC
 GCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTC
 GAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTGACATCCTTGGACATCCCTAGAGATAGGGCTTCCCT
 TCGGGGACCAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGT
 CCCGCAACGAGCGCAACCCTAATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGCCG
 GTGACAAAACGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGTACACA
 CGTGTACAATGGATGGTACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGA

>A1FP12

GAGCACGCCGCGTGAACGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTAGGGAAGAACAAGTAC
 CGTTCAAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
 CCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGGCGGT
 TTTTAAAGTCTGATGTGAAATCTTGTGGCTCAACCACAAGCGGTCAATGGAACTGGAGAACTTGAG
 TACAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCA
 GTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGG
 ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGGTTCCGCCCTTA
 GTGCTGCAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGA
 ATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC
 CAGGTCTGACATCCGCTGACAATCCTAGAGATAGGACTTCCCTTCGGGGACAGCGTGACAGGTG
 GTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGT

>S2FP15

GCTGCATGAGAGTCTGACGGTGCACGCCGCGTGAAGGTTTTCCGGATCGTAAACTCTGTTG
 TTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAAGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCCCGG
 CTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTA
 AAGCGCTCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTAACCTGGAGGGTCAATTG

GAAACTGGAGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
AGATGTGGAGGAACACCACTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAA
GCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTT
AGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGC
AAGGCTGAAACTCAAAGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGA
AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTGACATCCTCTGCCAGCGGTAGAGATACCGTGTCCCTC
GGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCTTATGCTTGTAGTCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGT
GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACTGGGCTACACACGT
GCTACATGGATGGAACAAAGGCAGCGAGCGCAGTGAGCAA

>A1FP11

GGCGGCCTACACATGCAGTCGAGCGGTAACAGAGAGAAGCTTGCTTCTCTGCTGACGAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAATACTTGGGAATTTGCCCTTAGGCGGGGGACAACCACGGGAAACTGTGGCTAATACC
GCATAATGTCTACGGACCAAAGTGGGGACCTTCGGGCCTCACACTAAAGATGAGCCAAAGCGGG
ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGTTCTGAGAGGATGATC
AGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACA
ATGGGGGAAACCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTT
CAGCGACGAGGAAGGGTGTGTGTTAATAGCACAGCACATTGACGTTAGTCGAGAAGAAGCACCG
GCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGAATTACTGGGCGT
AAAGCGTACGTAGCGCGGTGTTAAGCAAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATT
TTGAACTGGCATGCTAGAGTCTGAAGAGGGTGGTAGAATTTCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
ATATTGGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCACCTGGTCCAGAGACTGACGCTGAGGTACGAAA
GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGTTGTT
CGTGTCAATTAAGACGTGAGTAACGCAGCTAACGCACTAAGTTGACCGCCCTGGGGGGAGTACGGCC
GCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACCGGGGCCGCCAAG

SECUENCIAS PARCIALES DE BACTERIAS DEL GEN 16S DEL rRNA DE LA MALAHÁ (GRANADA)

>S1LM8

CTCCCATGAGCAGTCTGACGGTGCACGCCGCTGAGCGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGCTCTGTT
GTGAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTCACCAGAAAGCCCC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCG
TAAAGCGCGCAGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGGCCACAGCTCAACTGTGGAGGGCCAT
TGGAAACTGGGAACTTGAAGACAGAAGAGGAGAGCGGAATTCACGCTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGATATGTGGAGGAACACCACTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGA
AAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGAGTGCTAGGTG
TTAGGGGGTCAAACCTTAGTGCTGCAGTTAACGCAATAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGC
AAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCTGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAC
GCAACGGAAGAACCCTACCAGGTCTGACATCTTCGGACAGCCAAAGAGATTGGGTCTTCCTTCG
GGGACCGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
GTAACGAGCGCAACCCCTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAGGATGACTGCCGGT
ACAAACCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACTGGGCTACACACGT
GCTACAATGGATGGTACAAGGAAGCCAAACCGGAGGTCG

>A2LM1

GAGGTCATGGGGGGCACCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTGGGTTGTAAGCA
CTTTCAGCAGGGAGGAAAAGCTGGTCGCTAATACCGGCCAGTGTTGACGTTACCTGCAGAAGAAGC

ACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGG
 GCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTTGATAAGCGGGTTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATT
 GCAATCCGAATATCAGGCTAGAGTGCAGCAGAGGGCAGTGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAAT
 GCGTAGATATCGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTGCCTGGGCTGACTGACGCTGAGGT
 GCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGTTGAGAACTA
 GTCGTTGGGGCTATTAGAGCCTTAGTGACGCACTAACCGGATAAGTTCTCCGCTGGGGAGTACG
 GCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAT
 TCGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGTCTTACATCCTGCGAAGTGTAGAGATAGCTTGGTGC
 CTTCCGGGAGCGAGTACAGGTTGCTGCATGGCCGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAA
 GTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTCAGTTACCAGCACTTCGGGTGGGCACTCTGGGAGACTA
 CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTA
 CACACGTGCTACAATGGGGCGTACAGAGGGCAGCAAGTGCGCG

>A1LM14

TAAAGTTGAGATGTCTGACGGAGCACGCCGCTGAACGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGTTCTGTT
 GTTAGGGAAGAACAAGTACCGTGCAATAGAGCGGTACCTTGACGGTACCTAACGAGGAAGCCCC
 GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCG
 TAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT
 TGAAACTGGGGAACCTGAGGACAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGT
 AGATATGTGGAGGAACACCACTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTTTCTGACGCTGAGGTGCGAA
 AGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGT
 TAGGGGGCTTCCACCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCG
 AAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCGA
 AGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTTGACATCCTTGGACCACCCTAGAGATAGGGTTTTCCCTC
 GGGGACCAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
 CGCAACGAGCGCAACCCCTAATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGT
 GACAAACCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACG
 TGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGG

>A1LM25

CCCATGGAGAAGTCTGACGGAGCACGCCGCTGAACGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGTTCTGTT
 GTTAGGGAAGAACAAGTACCGTGCAATAGAGCGGTACCTTGACGGTACCTAACGAGGAAGCCCC
 GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCG
 TAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT
 TGAAACTGGGGAACCTGAGGACAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGT
 AGATATGTGGAGGAACACCACTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTTTCTGACGCTGAGGTGCGAA
 AGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGT
 TAGGGGGCTTCCACCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCG
 AAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCGA
 AGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTTGACATCCTTGGACCACCCTAGAGATAGGGTCTTCCCTC
 GGGGACCAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
 CGCAACGAGCGCAACCCCTAATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGT
 GACAAACCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACG
 TGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGG

>S3LM13

TCATGGGAGAAGTCTGACGGAGCACGCCGCTGAACGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGTTCTGTT
 GTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTGCAATAGAAGGCGACCTTGACGGTACCTAACGAGGAAGCCCC
 GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCG

TAAAGCGCGCAGGCGGTTCCCTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT
TGGAAGCTGGGGAACCTTGAGGACAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGATATGTGGAGGAACACCACTGAGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTTCTGACGCTGAGGTGCGAA
AGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAGGTGT
TAGGGGGCTTCCACCCCTTAGTGTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCG
AAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGA
AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTGACCACCCTAGAGATAGGGTTTTCCCTC
GGGGACCAAGTGACAGGTGGTGCATGGTGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCCCTAATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGT
GACAAACCGAGGAAGCGGGATGACGTCAAATCATGCCCCCTTAGACTGGGCTACACACG
TGCTACAATGGATGGTACAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGG

>A2LM23

CAATAAATTGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTTCGGGTTGTAAAGC
ACTTTCAGTGGGGAAGAAGGCTTGTGCGCCAATACCCGCAAGAGCGACATCACCCACAGAAGAAG
CACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTG
GGCGTAAAGCGCGGTAGGCGGCTTGTACGCGGGTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAC
GGCATCCGGAACGGGCGAGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTAGAATCCCGGTGTAGCGGTGAA
ATGCTAGAGATCGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGCCTTCTGGACTGACACTGACGCTGAG
GTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCGAC
TAGCCGTTGGGTCCTTGTAGGACTTAGTGGCGAGTTAACGCGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTA
CGGCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA
ATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACCCTTACATCCTGCGAACCCGGAAGATCCGGGGT
GCCTTCGGGAGCGCAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTGAAATGTTGGGTT
AAGTCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCTATTTGCCAGCGATTGGTTCGGGAACTCTAGGGAGAC
TGCCGTTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTACGGGTAGGGC
TACACACGTGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGTTGCGAAGCCGC

>S2LM18

TTGGCATCGGGCACCCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTTCGGGTTGTAAAGCACT
TTCAGCAGGGAGGAAAAGCTGTGCTGTTAATACCGGCCAGTGTGACGTTACCTGCAGAGAAGACAC
CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGC
GTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTTGATAAGCGGTTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGC
AATCCGAACTATCAGGCTAGAGTGCAGCAGAGGGCAGTGGAAATCCCGGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGATATCGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTGCCTGGGCTGACACTGACGCTGAGGTGC
GAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGAGAACTAGT
CGTTGGGGCTATTAGAGCCTTAGTGACGCAGCTAACGCGATAAGTTCTCCGCTGGGGAGTACGGC
CGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTC
GACGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCTGCGAACTTGCTAGAGATAGCTTGGTGCCT
TCGGGAGCGCAGTGACAGGTGCTGCATGGCCGTCTGAGTGTGAGATGTTGGGTTAAGT
CCCCTAACGAGCGCAACCCCTTGTCTCAGTTACCAGCACTTCGGGTGGGCACTCTGGGAGACTGCC
GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTGAGTGCATCATGCCCCCTTACGGCCAGGGCTACA
CACGTGCTACAATGGGGCGTACAGAGGGCAGCAAGTGCGCGA

>A1LM28

GCAGGGGGCGAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTTCGGGTTGTAAAGCACTTT
CAGCGAGGAAGAAAGCGTGCCGGCCAATACCCGGTACGGACGACATCACTCGCAGAAGAAGCACCC
GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGGC
TAAAGCGCGGTAGGCGGCGTGTACGCGGGTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGGCA

TCCGGAACGGGCAGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTAGAATCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCG
 TAGAGATCGGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCCTTCTGGACTGACACTGACGCTGAGGTGCG
 AAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTAGCC
 GTTGGGTCCCTTGAGGACTTAGTGGCGCAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCC
 GCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCG
 ATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACCCTTGACATCCTGCGAACCCGGAAGAGATTCCGGGGTGCCTT
 CGGGAGCGCAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTAGCTCGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTC
 CCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTATTTGCCAGCGATTGCGTCGGGAACCTAGGGAGACTGCCG
 GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGGTAGGGCTACAC
 ACGTGCTACAATGGCCGGTACAAGGGTTGCGAAAAGCGCGAGCTG

>S1LM21

CATTAAGGAGGGGCAACCTGATCAGCCATGCCGCTGTGTGAAGAAGGCCCTCGGGTTGTAAGC
 ACTTTCAGCGAGGAAGAATGCTTGTGCGTTAATACCCGGAAGGGAGACATCACTCGCCTAAGAAG
 CACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTG
 GGCGTAATGCGTGCCTAGGGCGCTTGATAAGCCGTTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAC
 GGCATCCGGAAGTGTAGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTAGAATCCCGGTGTAGCGGTGAA
 TGCGTAGAGATCGGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCCTTCTGGACTGACACTGACGCTGAGG
 TACGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACT
 AGCCGTTGGGGTCCCGAGACCTTTGTGGCGCAGTTAACGCACTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTAC
 GGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA
 ATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACCCTTGACATCGTGCAACTTCCAGAGATGGATTGGT
 GCCTTCGGGAGCGCACAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTAGCTCGTGTGAAATGTTGGGTT
 AAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTATTTGCCAGCGATTGCGTCGGGAACCTAGGGAGAC
 TGCCGCTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCTCTTACGGGTAGGGC
 TACACAGTGTACAATGGCCGGTACAATGGGTTGCAAAGCGG

>A1LM26

GGAGGCATCGGGGGACCTGATCAGCCATGCCGCTGTGTGAAGAAGGCTTTCGGGTTGTAAGCAC
 TTTAGTGGGAGGAAAAGCTAGTCGTTAATACCGGCTAGTGTGACGTTACCGCAGAAGAAGCA
 CCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGG
 CGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTTGGTAAGCGAGTTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATGG
 CAATTCGAAGTGTAGGCTAGAGTGCAGCAGAGGGTAGTGGAAATCCCGGTGTAGCGGTGAAATGC
 GTAGATATCGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTGCCTGGGCTGACACTGACGCTGAGGTGC
 GAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGCTGAGAAGTAGT
 CGTTGGGGCTATTGAAGCCTTAGTGACGCAGCTAACCGGATAAGTCTCCGCTGGGGAGTACGGC
 CGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTC
 GACGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCTGCGAACTTGTAGAGATAGCTTGGTGCCT
 TCGGGAGCGCAGTGACAGGTGCTGCATGGCCGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGT
 CCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCACTTCGGGTGGGAACCTAGGGAGACTGCC
 GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACA
 CACGTGCTACAATGGGGCGCACAGAGGGCAGCTAAGCCGCA

>A1LM10

CTTGTGATGGGGCACCTGATCCAGCCATGCCGCTGTGTGAAGAAGGCCCTTGGGTTGTAAGCAC
 TTTAGCAGGGAGGAAAAGCTGGTCGCTAATACCGGCCAGTGTGACGTTACTGCAGAAGAAGCA
 CCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGG
 CGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTTGGTAAGCGGGTTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTG
 CAATCCGAAGTATCAGGCTAGAGTGCAGCAGAGGGCAGTGGAAATCCCGGTGTAGCGGTGAAATGC

GTAGATATCGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTGCCTGGGCTGACACTGACGCTGAGGTGC
GAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGTTGAGAAGTAGT
CGTTGGGGCTATTAGAGCCTTAGTGACGCAGCTAACGCGATAAGTTCTCCGCTGGGGAGTACGGC
CGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTC
GACGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCTGCGAACTTGCTAGAGATAGCTTGGTGCCT
TCGGGAGCGCAGTGACAGGTGCTGCATGGCCGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGT
CCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCTCAGTTACCAGCACTTCGGGTGGGCACTCTGGGGAGACTGCC
GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACA
CACGTGCTACAATGGGGCGTACAGAGGGCAGCAAGTGCGCG

>A2LM19

ATAAAATGGGGGCACCCTGATCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGCACTT
TCAGCAGGGAGGAAAAGCTGGCGGTTAATACCCGTTAGTGTGACGTTACCTGCAGAAGAAGCACC
GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGGC
TAAAGGGCGCGTAGCGGTTTTGGTAAGCGAGTTGTGAAAGCCCCGGGCTAACCTGGGAATGGCA
ATTCGAACTGCCAGGCTAGAGTGCAGCAGAGGGCAGTGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGATATCGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTGCCTGGGCTGACACTGACGCTGAGGTGCG
AAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGCTGAGAACTAGTC
GTTGGGCTATTAGAGCCTTAGTGACGCAGCTAACGCGATAAGTTCTCCGCTGGGGAGTACGGCC
GTAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCG
ACGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCTGCGAACTTGGTAGAGATACCTTGGTGCCTT
CGGGAGCGCAGTGACAGGTGCTGCATGGCCGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTC
CCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTCAGTTACCAGCACTTCGGGTGGGCACTCTGGGGAGACTGCC
GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACAC
ACGTGCTACAATGGGGCGCACAGAGGGCAGCGAGCGCGGAG

>S1LM4

AGAGGGAATGGGGGTACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGGAGGAAGACACCCTATGGGGCGTAA
ACTCCTTTCTGAACGAAGAAAACCTCTGAGCTTACAGCGAGACGGTAGTTACAGGAATAAGCACCG
GCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTGTCCGGAATCACTGGGTTG
AAAGGGTGTGCAGGGCGGGCAGCAAGTCGGATGTGAAAGCCCGTGGCTCAACCACGGAAGCGCCT
TCGATACTGCTGCTCTTGTAGTCCCGGAGAGGCTGTCGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GATATCAGGAGGAACACCAGAGGCGAAAGCGGACAGCTGGACGGTACTGACGCTCAGGCACGAA
AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGCTCGCCGT
TGCCTCGTTAGGGGGCAGTGCTAAGTTAACGCGTTAAGCATTCCACCTGGGGAGTACGATCGCAA
GGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGCTCAATTGATG
CAACGCGAAGAACCTTACCTAGGCTCGAACGCTAAAGGACCGCTCCTGAAAGGGAGCTTCCCCTTTG
GGGCCTTAGCGAGGTAAGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
AACGAGCGTAACCCTGTTGCTAGTTACCAGCGGATAATGCCGGGACTTAGCGAAACTGCCTGC
GCAAGCAGTGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAAGTCATCATGGTCTTACGCTAGGGCTGCACAC
TGCTACAATGGCCGGTCCAACGAGCAGCCACCTCGCGAGAGG

>S2LM6

GGGGTATGGGGGCACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTTGGGTTGTAAAGCA
CTTTAGCAGGGAGGAAAAGCTGGTCGCTAATACCGGCCAGTGTGACGTTACCTGCAGAAGAAGC
ACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGG
GCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTTTGATAAGCGGGTTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACTGGGAATT
GCAATCCGAACTATCAGGCTAGAGTGCAGCAGAGGGCAGTGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAAT
GCGTAGATATCGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTGCCTGGGCTGACACTGACGCTGAGGT

GCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGAGA
 ACTA GTCGTTGGGGCTATTAGAGCCTTAGTGACGCAGCTAACGCGATAAGTTCTCCGCTGGGGAGTACG
 GCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAT
 TCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCTGCGAACTTGCTAGAGATAGCTTGGTGC
 CTTCCGGGAGCGCAGTGACAGGTGCTGCATGGCCGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAA
 GTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTCAGTTACCAGCACTTCGGGTGGGCACTCTGGGGAGACTG
 CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTA
 CACAGTGTACAATGGGGCGTACAGAGGGCAGCAAGTGCGC

>A1LM24

GGTGCATGGGCGAGCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTTCCGGTTGTAAGCACTTT
 CAGCGAGGAAGAAGCGTGCCGGCCAATACCCGGTACGACGACATCACTCGCAGAAGAAGCACC
 GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCG
 TAAAGCGCGCTAGCGGCGTGTACGCCGGGTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGGCA
 TCCGGAACGGGCAGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTAGAAATCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCG
 TAGAGATCGGGAGGAATACCACTGGCGAAGGCGGCCTTCTGGACTGACACTGACGCTGAGGTGCG
 AAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTAGCC
 GTTGGGTCCCTTAGGACTTAGTGGCGAGTTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCC
 GCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCG
 ATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACCCTTGACATCCTGCGAACCCGGAAGAGATTCGGGGGTGCCTT
 CGGGAGCGCAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTC
 CCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTATTTGCCAGCGATTGCGTGGGAACTCTAGGGAGACTGCCG
 GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGGTAGGGCTACAC
 ACGTGTACAATGGCCGGTACAAAGGGTTGCGAAAGCGCGAGC

>S1LM30

GCATCGCAGCAGAAGTCTGACGGAGCACGCCGCGTGAAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCT
 GTTGTACGGGAAGAACGCCGACGGGAGTAACCTGCCGTCGGGTGACGGTACCTGACCAGAAAGCC
 ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGG
 CGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTCGTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTC
 ATTGGAACCTGGCGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGC
 GCAGAGATATGGAGGAACACCACTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGTGC
 GAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAG
 TGTTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGTGACGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGC
 CGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTC
 GAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTCTGACCACCTGGAGACAGGGTTCCCTT
 CGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
 CGCAACGAGCGCAACCCTTATCATTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGT
 GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACG
 TGCTACAATGGACAGGTTACAAAGGGCAGCTAAGCCGCGAG

>A2LM10

GAGGCATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTTCCGGTTGTAAGCAC
 TTTCACTGGGGAAGAAGGCTTGTCCGGCCAATACCCGGCAAGAGCGACATCACCCAGAGAAGCA
 CCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGG
 CGTAAAGCGCGCTAGGCGGCTTGTACGCCGGGTGTGAAAGCCCCGGCTCAACCTGGGAACGG
 CATCCGGAACGGGCAAGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTAGAATTCGGGTGTAGCGGTGAAATG
 CGTAGAGATCGGGAGGAATACCACTGGCGAAGGCGGCCTTCTGGACTGACACTGACGCTGAGGTG
 CGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTAG

CCGTTGGGTCCCTTGAGGACTTAGTGGCGCAGTTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGG
CCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATT
CGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACCCTTGACATCCTGCGAACCCGGAAGAGATTCCGGGGTGC
CTTCGGGAGCGCAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTACGCTCGTGTGAAATGTTGGGTTAA
GTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCTATTTGCCAGCGATTCCGGTCGGGAACCTTAGGGAGACTG
CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGACATCATGGCCCTTACGGGTAGGGGCTA
CACACGTGCTACAATGGCCGGTACAAGGGTTGCGAAGCCGCGA

>S3LM15

TGAGCATCTGCGCACCTGATCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCACTT
TCAGCAGGGAGGAAAAGCTGATCGTTAATACCGGTCAGTGTGACGTTACCTGCAGAAGAAGCACC
GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCG
TAAAGGGCGCGTAGGCGGTTTGGTAAGCGAGTTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATGGCA
ATTCGAACTGCCAAGCTAGAATGCAGCAGAGGGCAGTGGAAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGATATCTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTGCCTGGGCTGACATTGACGCTGAGGTGCGA
AAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGCTGAGAAGTAGTCG
TTGGGGCTATTAGAGCCTTAGTGACGCAGCTAACGCGATAAGTTCTCCGCTGGGGAGTACGGCCG
CAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCA
CGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGTCTTGACATCCTGCGAACTTGGTAGAGATACCTTGGTGCCTC
GGGAGCGCAGTGACAGGTGCTGCATGGACCGTCGTGAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTC
CCGTACGAGCGCAACCCCTTGTCTTAGTTGCCAGCGGTCGGGCCGGGAACCTTAGGGAGACTGCG
GGTGACAAACGAGAGGTGGGGATGACGTCAGTCATCATGGCCCTTACGGCAGGGCTACACACGTG
CTACATGGGCGCACAGAGGCAGCAGCGCGGAGTGCAAGCG

SECUENCIAS PARCIALES DE BACTERIAS DEL GEN 16S DEL rRNA DE SANTA M^a DE JESÚS (BAHÍA DE CÁDIZ)

>A3BC6

GATGGCATGGGGGACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTGGGTTGTAAAGCA
CTTTCAGCAGGGAGGAAAAGCTGGTCGCTAATACCGGCCAGTGTGACGTTACCTGCAGAAGAAGC
ACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGG
GCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTTGATAAGCGGTTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATT
GCAATCCGAACATCAGGCTAGAGTGCAGCAGAGGGCAGTGGAAATCCCGGTGTAGCGGTGAAAT
GCGTAGATATCGGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTGCCTGGGCTGACACTGACGCTGAGGT
GCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGTTGAGAAGTA
GTCGTTGGGGCTATTAGAGCCTTAGTGACGCAGCTAACGCGATAAGTTCTCCGCTGGGGAGTACG
GCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAT
TCGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGTCTTGACATCCTGCGAACTTGTAGAGATAGCTTGGTGC
CTTCGGGAGCGCAGTGACAGGTGCTGCATGGCCGTCGTGAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAA
GTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGTCTCAGTTACCAGCACTTCCGGTGGGCACTCTGGGGAGACTG
CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGGTGATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCT
ACACACGTGCTACAATGGGGCGTACAGAGGGCAGCAAGTGCGC

>S2BC8

GTTGACATGGGGGACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTGGGTTGTAAAGCA
CTTTCAGCAGGGAGGAAAAGCTGGTCGCTAATACCGGCCAGTGTGACGTTACCTGCAGAAGAAGC
ACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGG

GCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTTGTAAAGCGGGTTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATT
 GCAATCCGAATATCAGGCTAGAGTGCAGCAGAGGGCAGTGGAAATCCCGGTGTAGCGGTGAAAT
 GCGTAGATATCGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCGACTGCCTGGGCTGACTGACGCTGAGGT
 GCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGAGAACTA
 GTCGTTGGGGCTATTAGAGCCTTAGTGACGCAGCTAACGCGATAAGTTCTCCGCTGGGGAGTACG
 GCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAT
 TCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCTGCGAACTTGCTAGAGATAGCTTGGTGC
 CTTCCGGAGCGCAGTGACAGGTGCTGCATGGCCGTGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAA
 GTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTCAGTTACCAGCACTTCGGGTGGGCACTCTGGGGAGACTG
 CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTGAGTTCATCATGCCCCTACGGCCAGGGCTA
 CACACGTGCTACAATGGGGCGTACAGAGGGCAGCAAGTGCAGC

>S2BC28

GGTAGTAAATTGGGCGCAGCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTCGGTTGTAAA
 GCACITTCAGCGAGGAAGAACGCCTGGCGGTTAATACCCGCCAGGAAAGACATCACTCGAGAAGA
 AGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAC
 TGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGCTTGATAAGCCGTTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGA
 ACGGCATCCGGAAGTGTGAGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTAGAATCCCGGTGTAGCGGTGA
 AATCGTAGAGATCGGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGGCGCCTTCTGGACTGACTGACTGACTGA
 GGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATTGTCGA
 CCAGCCGTTGGGTGCCTAGCGCACTTTGTGGCGAAGTTAACGCGATAAGTCGACCCCTGGGGAGT
 ACGGCCCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
 AATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCTGCGAACTTGAGAGATCACTTGG
 TGCCTTCGGGAACGAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTTGTGAAATGTTGGGT
 TAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTATTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTAAGGAG
 ACTCCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTAAGTTCATCATGCCCCTACGAGTAGG
 GCTACACACGTGCTACAATGGCCGTTACAAAGGGCTGCGAGCT

>A2BC21

CTTCCGAGGAGAAGTCTGACGGAGCACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGTTCTG
 TTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTGCGAATAGAGCGGTACCTTGACGGTACCTAACGAGGAAGCCC
 CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGC
 GTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCA
 TTGGAAACTGGGGAACCTTGAGGACAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCG
 TAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCGACTCTCTGGTCTGTTTCTGACGCTGAGGTGCGA
 AAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGTAGGTG
 TTAGGGGGCTTCCACCCCTTAGTGTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCG
 CAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCTG
 AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTGACATCCCTAGAGATAGGGCTTCCCTT
 CGGGGACCAAGTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTC
 CCGCAACGAGCGCAACCCTAATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGCCGG
 TGACAAACCGGAGGAAGGGCGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACAC
 GTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAG

>A3BC4

AATAACATCGGGGCACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTAGGGTTGTAAAGCA
 CTTTCAGCAGGGAGGAAAAGCTGATCGTTAATACCGGTGAGTGTGACGTTACCTGAGAAGAAGC
 ACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGG
 GCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTTGGTAAAGCGAGTTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATG
 GCAATTCGAACTGCCAAGCTAGAATGCAGCAGAGGGCAGTGGAAATCCAGGTGTAGCGGTGAAAT

GCGTAGATATCTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTGCCTGGGCTGACATTGACGCTGAGGT
GCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGCTGAGAACTA
GTCGTTGGGGCTATTAGAGCCTTAGTGACGCAGCTAACGCGATAAGTTCTCCGCTGGGGAGTACG
GCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGTGGAGCATGTGGTTAAT
TCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCTGCGAACTTGGTAGAGATACCTTGGTGC
CTTCGGGAGCGCAGTGACAGGTGCTGCATGGCCGTCGTACGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAA
GTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACTTAGGGAGACT
GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCT
ACACACGTGCTACAATGGGGCGCACAGAGGGCAGCAAGCGCGCG

>A3BC16

ATCCAGGGGGCACCCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCACTTT
CAGCAGGGAGGAAAAGCTGATCGTTAATACCGGTCAGTGTGACGTTACCTGCAGAAGAAGCACCG
GCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTA
AAGGGCGGTAGGCGGTTTTGGTAAGCGAGTTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATGGCAAT
TCGAACTGCCAAGCTAGAATGCAGCAGAGGGCAGTGGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GATATCTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTGCCTGGGCTGACATTGACGCTGAGGTGCGAA
AGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGCTGAGAACTAGTCGT
TGGGGCTATTAGCCTTAGTGACGCAGCTAACGCGATAAGTTCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGC
AAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAC
GCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCTGCGAACTTGGTAGAGATACCTTGGTGCCTTCG
GGAGCGCAGTGACAGGTGCTGCATGGCCGTCGTACGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
GTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACTTAGGGAGACTGCCGG
TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACA
CGTGCTACAATGGGGCGCACAGAGGGCAGCAAGCGCGCGAGTG

>S4BC9

CATCGGCATGTAGAAGTCTGACGGAGCACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGTTCT
GTTGCAGGGAAGAACAAGTCCGTGCGAATAGAGCGGCACCTTGACGGTACCTGACGAGGAAGC
CCCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
GCGTAAAGCGCGCGCAGGCGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGT
CATTGGAACCTGGGGAACCTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGCTGTAGCGGTGAAATG
CGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGC
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAG
GTGTTAGGGGGCTTCCACCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGG
CCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATT
CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCGGACAACCTGGAGACAGGGCGTTCC
CTTCGGGGACCGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGACGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTGACCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGC
CGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA
CACGTGCTACAATGGATGGTACAAAAGGCGAGCGAAGCCGCG

>A1BC5

GCTGGCATTAGCGTAGCTGCTCCAGCGATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTTGGGTTGTAAAGCACT
TTCAGTGGAGTAGAAGGCTTGTCCGGCAATACCCGGGAGGAGCGACATCACCCACCAAGAAGCAC
CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAGGGTCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGC
GTAAAGCGCGCTAGGCGGCTTGTACGCCGGGTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGGC
ATCCGGAACGGGCAGGCTATAGTGCAGGAGAGGAAGGTATAATCCCGGTGTAGCGGTGAAATGC
GTACAGATCGGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCCTTCTGGACTGACACTGACGCTGAGGTGC

GAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTAGC
 CGTTGGGTCCCTTGAGGACTTAGTGGCGCAGTTAACGCGATAAGTCGACCCGCTGGGGAGTACGGC
 CGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTC
 GATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACCCTTGACATCCTGCGAACCCGGAAGAGATTCGGGGTGCCT
 TCGGGAGCGCAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGT
 CCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTATTTGCCAGCGATTCCGGTCGGGAACCTAGGGGAGACTGCC
 GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGGTAGGGCTACA
 CACGTGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGTTGCGAAGCCGCGA

>S3BC8

GTCCAGGGGCACCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTGGGTTGTAAAGCACTTTCA
 GCAGGGAGGAAAAGCTGGTTCGCTAATACCGGCCAGTGTGACGTTACCTGCAGAAGAAGCACCGG
 CTAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGC AAGCGTTAATCGGAATTAAGGGCGTA
 AAGGGCGCGTAGGCGGTTTGATAAGCGGGTTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCAATC
 CGAACTATCAGGCTAGAGTGCAGCAGAGGGCAGTGGAAATCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
 ATATCGGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGACTGCCTGGGCTGACACTGACGCTGAGGTGCGAAA
 GCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGAGAACTAGTCGTT
 GGGGCTATTAGAGCCTTAGTGACGCGAGCTAACGCGATAAGTTCTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA
 AGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGACG
 CAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCTGCGAACTTGCTAGAGATAGCTTGGTGCCTTCGG
 GAGCGCAGTGACAGGTGCTGCATGGCCGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
 TAACGAGCGCAACCTTGTCTCAGTTACCAGCACTTCGGGTGGGCACTCTGGGGAGACTGCCGGT
 GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACAC
 GTGCTACAATGGGGCGTACAGAGGGCAGCAAGTGCGCGAGCGC

>A4BC6

GATATCAGGGGGCACCCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTCGGGTTGTAAAGCAC
 TTTACGCGAGGAAGAATGCTTGTGGTTAATACCCGGCAAGGGAGACATCACTCGCAGAAGAAGCA
 CCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAGGCGTTAATCGGAATTAAGGG
 CGTAAAGCGTGCCTAGGCGGCTTGATAAGCCGGTTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGG
 CATCCGGAAGTGTAGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTAGAATTCGCGGTGTAGCGGTGAAATG
 CGTAGAGATCGGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCCGCTTCTGGACTGACACTGACGCTGAGGTA
 CGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTAG
 CCGTTGGGGTCCCTCGAGACCTTTGTGGCGCAGTTAACGCACTAAGTCGACCCGCTGGGGAGTACGG
 CCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATT
 CGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACCCTTGACATCGTGCAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCC
 TTCGGGAGCGCACAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAG
 TCCCGTAACGAGCGCAACCTTGTCCCTATTTGCCAGCGATTCCGGTCGGGAACCTAGGGGAGACTGC
 CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGGTAGGGCTAC
 ACAGTGTACAATGGCCGGTACAATGGGTTGCAAAGCGGCGA

>A1BC3

GATGATCCATGGGGGCCACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTCGGGTTGTAA
 AGCACTTTACGCGAGGAAGAATGCTTGTGGTTAATACCCGGCAAGGGAGACATCACTCGCAGAAG
 AAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAGGCGTTAATCGGAATTA
 CTGGGGCTAAAGCGTGCCTAGGCGGCTTGATAAGCCGGTTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGG
 AACGGCATCCGGAAGTGTAGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTAGAATTCGCGGTGTAGCGGTG

AAATGCGTAGAGATCGGGAGGAATACCAAGTGGCGAAGGCGGCCTTCTGGACTGACACTGACGCTG
AGGTACGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCG
ACTAGCCGTTGGGGTCTCGAGACCTTTGTGGCGCAGTTAACGCACTAAGTCGACCGCCTGGGGAG
TACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT
TAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACCCTTGACATCGTGCGAACCTTCCAGAGATGGATTG
GTGCCTTCGGGAGCGCACAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAAATGTTGGG
TTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCTATTTGCCAGCGATTGGTTCGGGAACCTTAGGGA
GACTGCCGGTGACAAACCGGGAGGAAGGTGGGACGACGTTAGTCATCATGGGCCCTTACGGG
TAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCCGGGTACAATGGGTTGC

>A2BC18

ATGGTTAAGTGGGGGACCCCTGAATCCGCCATGCCGCTGTGTGAAGAAGGCCCTCGGGTTGGAA
AGCACTTTCAGCGAGGAAGAACGCTTGTGGTTAATACCCGGCAAGGGAGACATCACTCGAGAAG
AAGCACGGGTAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAGGGTGCACGCTTAATCGGAATTA
CTGGGCGTAAAGCGTGCAGTGGCGGCTTGATAAGCCGTTGTGAAAGCCCGGGCTCAACCTGGG
AACGGCATCCGGAACCTTGTAGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTAGAATTCGCGGTGAGCGGTG
AAATGCGTAGAGATCGGGAGGAATACCAAGTGGCGAAGGCGGCCTTCTGGACTGACACTGACGCTG
AGGTACGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACCATGTCG
ACTAGCCGTTGGGGTCTCGAGACCTTTGTGGCGCAGTTAACGCACTAAGTCGACCGCCTGGGGAG
TACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT
TAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACCCTTGACATCGTGCGAACCTTCCAGAGATGGATTG
GTGCCTTCGGGAGCGCACAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAAATGTTG
GGTTAAGTCCCGTAACGAAGCGCAACCCCTTGTCCCTATTTGCCAGCGATTTCGGTTCGGGAAC
CTTAGGGAAGACTGCTTGTGACAAACCGGGAGGAAGGTGGGACAACGTCAAGTCATTCATGGCCT
CTTACGGGTACGGCTACACCACGTGCTACAATGGCCGGGAC

SECUENCIAS COMPLETAS DE BACTERIAS DEL GEN 16S DEL rRNA DE FUENTE DE PIEDRA (MALAGA)

>A1FP-12

GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGCGGGAAGCAAGATGACCCCTTCGGGG
TGATTCTTGTGGAACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGG
ATAACTCGCGAAACGTGAGCTAATACCGGATAACACTTTTTCTTTACCTAAGGAAAAGTTGAAAGGC
GGCTTTTCGGAGCTGTCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCC
TACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC
GCCGCGTGAACGATGAAGTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACGAAGAACAAGT
ACCGTTCAAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACGAGGAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGGCG
GTTTTTAAAGTCTGATGTGAAATCTTGTGGCTCAACCAAGCGGTCAATTGGAAACTGGAGAAGTTG
AGTACAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACAC
CAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCGAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCT
TAGTGCTGAGTTAACGATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAA
GAATTGACGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTT
ACCAGGTCTTGACATCCGCTGACAATCCTAGAGATAGGACTTTCCCTTCGGGGACAGCGTGACAGGT
GGTGCATGGTTGTCGTGAGCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCT

GATCTTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
 GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACA
 AAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGTGAAGCAAATCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTG
 CAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCC
 CGGGTCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTGGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACC
 TTTTAGGAACCGCCGCAAGGTGGGGCAATGATTGGGGTGAAGTCG

>A2FP-15

CCTTTGAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGG
 TAACAGGGGTAGCTTCTACCCGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCATAGGAATTTACCC
 GATAGTGGGGGATAACCTGGGGAAACCCAGGCTAATACCGCATACGCTCTACGGGAGAAAGGGGG
 CTTTGGCTCCCGCTATCGGATGAGCCTATGCCGGATTAGCTGGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAG
 GCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGACTGAGACACGGCCCGAACTC
 CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTG
 TGTGAAGAAGGCCCTCGGGTTGAAAAGCACTTTCAGCGAGGAAGAACGCCCTGGCGGTTAATACCCG
 CCAGGAAAGACATCACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGG
 AGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGCTTGATAAGCCGGTTG
 TGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGGCATCCGGAACGTGACGGCTAGAGTGACAGGAGAGGAA
 GGTAGAATCCCGGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAATACCAAGTGGCGAAGCCGG
 CCTTCTGGACTGACACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCTGG
 TAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACCAGCCGTTGGGTGCTAGCGCACTTTGTGGCGAAGTTAACG
 CGATAAGTCGACCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC
 GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGATGCAACGCGAAGAACCTTACTACTCTTGACATCC
 TGCGAACTTGTGAAGAGATCACTTGGTGCCTTCGGGAACGCAAAGACAGGTGCTGCATGGCTGTC
 GTCAGCTCGTGTGTGAAAATGTTGGGGTTAAAGTCCCGTAACGAGCGCCACCCTTTGTCCTATTTG
 CCAGCACGTAATGGTGGGAACCTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGA
 CGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCT
 GCGAGCTCGCGAGAGTCAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCG
 ACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCT
 TGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGACTGCACCAGAAGTGGTTAGCCTAACGCAAGAGG
 GCGATCACACCGGTGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAG

>S2FP-15

TGGAACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCTATAAGACTGGGATAA
 CTCGGGAAACCGGGGCTAATACCGATAACATTTTTCAGCACATGTTGAGAAATTGAAA
 GGCGGCTTTTAGCTGTCACTTACAGATGGGCCCGCGCGCATTAGTTAGTTGGTAGGGTA
 ACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA
 CGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCATCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGTG
 CAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACC
 GTTTGAATAAGGCGGTACTTACGCTGACCTAACCCAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
 CGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCTCGCAGGCGGTCT
 TTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAAAGTGGAGGACTTGAGT
 GCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAG
 TGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGA
 TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGTAGGTGTTAGGGGGTTCCGCCCTTAG
 TGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAAAGTCAAAGAA
 TTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC
 AGGTCTTGACATCCTCTGCCAGCGGTAGAGATACCGTGTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGG
 TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGA

TCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG
GGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGAACAAA
GGGAGCGAAGCCGCAAGGTGTAGCAAATCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCA
ACTCGCTGCATGAAGCCGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCC
GGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTGGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCA
TTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGGCCAATGATTGGGGTGAAGTCGT

SECUENCIAS COMPLETAS DE BACTERIAS DEL GEN 16S DEL rRNA DE LA MALAHÁ (GRANADA)

>S1LM8

TACATGCAAGTCGAGCGCGGGAAGCGAGCAGAAGCCCTTCGGGGTGGACGCTCGTGGAACGAGCGG
CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCTGTGAGACGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGG
TAATACCGGATAACGCATCGAACCGCATGGTTCGATGATCAAAGATGGCTTCTAGCTATCACTACA
GATGGGCCCGCGGCCATTAGTTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCC
GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTAGGGAATCATCCGCAATGGACGCAAGTCTGACGGTGCAACGCCGCGTGAGCGATGAAGGTCTTC
GGATCGTAAAGCTCTGTTGTGAGGGAAGAACAAGTGCCGTTTGAATAGGGCGGCACCTTGACGGTA
CCTCACAGAAAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTG
TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGGCGTTCCCTTAAGTCTGATGTGAAAGGCCACAGCT
CAACTGTGGAGGGCCATTGAAAAGTGGGAACTTGAGGACAGAAGAGGAGAGCGGAATCCACGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGCGGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAC
TGACGCTGAGGCGCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAA
CGTTGAGTGCTAGGTGTTAGGGGTCCAACCCTTAGTCTGCAGTTAACGAATAAGCACTCCGCT
GGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCTGCACAAGCGGTGGAGC
ATGTGGTTAATTGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCTTCGGACAGCCCAAGAG
ATTGGGTCTTCCCTTCGGGGACCGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGG
ATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTC
TAGGATGACTCCCGTGACAAAACCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATGCCCCCTTATG
ACCTGGGCTACACAGCTGCTACAATGGATGGTACAAAAGGGAAGCCAAACCGGAGGTGCGGTAAT
CCCATAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGTAGT
AATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCAGGCCTGTACACACCGCCCGTACACCACG
AGAGTTGGCAACACCCGAAGTCGGTGG

> S1LM-21

AGGAGGCGTCGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTGCCCGGTAGTGGGGGATAACTT
GAGGAACTCAAGTAATACCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGGCTTTCGGACCTTGCGC
TATCGGATGAGCTTATGTCGGATTAGCTGGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCGT
AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGACTGAGACACGGCCCGAATCCTACGGGAGGC
AGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCTGTGTGAAGAAGG
CCCTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAAGAATGCTTGTGCGTTAATACCCGGCAAGGGAGAC
ATCACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAG
CGTTAATCGGAATTAAGCGTAAAGCGTGCAGGCGGCTTGTAAAGCCGTTGTGAAAGCCCC
GGGCTCAACCTGGGAACGGCATCCGGAAGTGTAGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTAGAATTC
CCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAATACCAGTGCGGAAGGCGGCCTTCTGGAC
TGACACTGACGCTGAGGTACGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC
CGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGGTCTCGAGACCTTTGTGGCGCAGTTAACGCACTAAGTCG
ACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAGTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGG
TGGAGCATGTGGTTAATTGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACCCTTGACATCGTGCAGCACTTC

CAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAGCGCACAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTT
 GTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGCCCTATTTGCCAGCGATTCCGGTCGG
 GAACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGC
 CCTTACGGGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCCGTACAATGGGTTGCAAAGCGGCGACGTGG
 AGCTAATCTCATAAAGCCGGTCTCAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAAT
 CGCTAGTAATCGTGCATCAGAATGGCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCA
 CACCATGGGAGTGGACTGCACCAGAAGTGGTTAGCCTAACTTCGGAGGGCGATCACCACGGTGTGG
 TTCATGACTGGGGTGAAGTCGTA

SECUENCIAS COMPLETAS DE BACTERIAS DEL GEN 16S DEL rRNA DE SANTA M^a DE JESÚS (BAHÍA DE CÁDIZ)

>A3BC6

GCTCAGATTTGAAACGCTGGGCGGGCAGGGCCCTAACACATGGCAAAGTCGAGGCGGGCAGCAG
 GGCCCTTCGGGGGTGCTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCATGGGAACCTACCCAGTAGT
 GGGGGATAGCCCGGGAAACCCGGATTAATACCCGATACGCCCTGAGGGGGAAAGCGGGCTCCGG
 CTCGCGCTATTGGATGGGCCATGTCGGATTAGTTTGGTGGTGAAGTAAACGGCTTACCAAGGGCAG
 GATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACCGGGACTGAGACACGGCCCGGACTCCTACG
 GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGA
 AGAAGGCCTTTGGGTTGTAAGCACTTTCAGCAGGGAGGAAAAGCTGGTGCCTAATACCGGCCAGT
 GTTGACGTTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGT
 GCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTTGATAAGCGGGTTGTGAA
 AGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCAATCCGAATATCAGGCTAGAGTGCAGCAGAGGGCAGTG
 GAATTCGGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGACTGC
 CTGGGCTGACACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
 CCACGCTGTAACGTTGAGAAGTGTGTTGGGGCTATTAGAGCCTTAGTGACGCAGCTAACGCGAT
 AAGTTCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACA
 AGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCTGCGA
 ACTTGCTAGAGATAGCTTGGTGCCTTCGGGAGCGCAGTGACAGGTGCTGCATGGCCGTCGTGAGT
 CGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTGTCTCAGTTACCAGCACTTC
 GGGTGGGCACTCTGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGGTCA
 TCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGGCGTACAGAGGGCAGCAAGTGC
 GAGCGCAAGCGAATCCCTTAAAGCGTCTCTCAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAG
 TCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGAATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCG
 CCCGTACACCATGGGAGTGGACTGCACCAGAAGCGGTTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGATCGCC
 AC

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. & Lipman D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Altschul, S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J. H., Zhang Z., Miller W. & Lipman D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Allison, L. E.** (1994). Diagnóstico y rehabilitación de suelos salinos y sódicos. México D.F.: Limusa, S.A. de C.V.
- Anand, B. S., Schneider F. E., Elzaatari F. A. K., Shawar R. M., Clarridge J. E. & Graham D. Y.** (1994). Diagnosis of intestinal Tuberculosis by Polymerase chain-reaction on endoscopic biopsy specimens. *American Journal of Gastroenterology* 89: 2248-2249.
- Andrei, A.-S., Banciu H. L. & Oren A.** (2012). Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. *Fems Microbiology Letters* 330: 1-9.
- Angelini, R., Babudri F., Lobasso S. & Corcelli A.** (2010). MALDI-TOF/MS analysis of archaeobacterial lipids in lyophilized membranes dry-mixed with 9-aminoacridine. *Journal of Lipid Research* 51: 2818-2825.
- Angelini, R., Corral P., Lopalco P., Ventosa A. & Corcelli A.** (2012). Novel ether lipid cardiolipins in archaeal membranes of extreme haloalkaliphiles. *Biochimica et biophysica acta* 1818: 1365-73.
- Anton, J., Rossello-Mora R., Rodríguez-Valera F. & Amann R.** (2000). Extremely halophilic Bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3052-3057.
- Antunes, A., Taborde M., Huber R., Moissl C., Nobre M. F. & da Costa M. S.** (2008). *Halorhabdus tiamatea* sp nov., a non-pigmented, extremely halophilic archaeon from a deep-sea, hypersaline anoxic basin of the Red Sea, and emended description of the genus *Halorhabdus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 215-220.
- Arahal, D. R., Dewhirst F. E., Paster B. J., Volcani B. E. & Ventosa A.** (1996). Phylogenetic analyses of some extremely halophilic archaea isolated from dead sea water, determined on the basis of their 16S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3779-3786.
- Bachmann, A. & Weaver R. H.** (1951). Rapid microtechnics for identification of cultures V. Reduction of nitrates to nitrites. *Am.J.Clin.Pathol* 21.
- Baker, G. C., Smith J. J. & Cowan D. A.** (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* 55: 541-555.
- Baquero, F. & Nombela C.** (2012). The microbiome as a human organ. *Clinical Microbiology and Infection* 18: 2-4.
- Bardavid, R. E., Ionescu D., Oren A., Rainey F. A., Hollen B. J., Bagaley D. R., Small A. M. & McKay C.** (2007). Selective enrichment, isolation and molecular detection of *Salinibacter* and related extremely halophilic Bacteria from hypersaline environments. *Hydrobiologia* 576: 3-13.
- Barton, N. H., Briggs D. E. G., Eisen J. A., Goldstein D. B. & Patel N. H.** (2007). *Evolution*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bauer, A. W., Kirby W. M. M., Sherris J. C. & Turck M.** (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology* 45: 493-&.
- Becker, E. W., Jakober B., Luft D. & Schmulling R. M.** (1986). Clinical and biochemical evaluations of the alga *Spirulina* with regard to its application in the treatment of obesity-A double-blind crossover study. *Nutrition Reports International* 33: 565-574.
- Becker, V. E. & Evans H. J.** (1969). Influence of monovalent cations and hydrostatic pressure on Beta-galactosidase activity. *Biochimica Et Biophysica Acta* 191: 95-&.

- Benlloch, S., Martínez-Murcia A. J. & Rodríguez-Valera F.** (1996). Sequencing of bacterial and archaeal 16S rRNA genes directly amplified from a hypersaline environment. *Systematic and Applied Microbiology* 18: 574-581.
- Benmahrez, K., Sorokine I., Thierry D., Kawasumi T., Ishii S., Salmon R. & Kohiyama M.** (1991). An archaeobacterial antigen used to study immunological humoral response to c-myc oncogene product.
- Bertrand, J. C., Almallah M., Acquaviva M. & Mille G.** (1990). Isolation of halotolerant, thermotolerant, facultative polymer-producing bacteria and characterization of the exopolymer. *Letters in Applied Microbiology* 11: 260-263.
- Bligh, E. G. & Dyer W. J.** (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Blunt, J. W., Copp B. R., Keyzers R. A., Munro M. H. G. & Prinsep M. R.** (2013). Marine natural products. *Natural Product Reports* 30: 237-323.
- Boone, D. R., Johson R. L., Chen D. C., Mathrant & Mah R. A.** (1989). Methanogenesis and reductive dechlorination in an alkaline, hypersaline sediments and groundwater. In *Microbiology of extreme environments and its potential for biotechnology*, pp. 289-309. Edited by M.S. Da Costa, J.C. Duarte and R.A.D. Williams. London: Elsevier Applied Science.
- Boone, D. R., Liu Y. T., Zhao Z. J., Balkwill D. L., Drake G. R., Stevens T. O. & Aldrich H. C.** (1995). *Bacillus-infernus* sp-nov, an fe(iii)-reducing and mn(iv)-reducing anaerobe from the deep terrestrial subsurface. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 441-448.
- Bourroui, H., Ben Aissa M., Abbassi F., Touzel J. P., O'Donohue M. & Manai M.** (2012). Characterization of *Deinococcus sahariensis* sp nov., a radiation-resistant bacterium isolated from a Saharan hot spring. *Archives of Microbiology* 194: 315-322.
- Bowers, K. J., Mesbah N. M. & Wiegel J.** (2009). Biodiversity of poly-extremophilic Bacteria: does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physico-chemical boundary for life? *Saline Systems* 5: 9.
- Brock, T. D.** (1969). Microbial growth under extreme conditions. *Symposium of the Society for General Microbiology* 19: 15-41.
- Bullock, W. O., Fernández J. M. & Short J. M.** (1987). XL1-BLUE - a high-efficiency plasmid transforming *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection XL1-BLUE - a high-efficiency plasmid transforming *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5: 376-&.
- Canganella, F. & Wiegel J.** (2011). Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. *Naturwissenschaften* 98: 253-279.
- Cerny, G.** (1976). Method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *European Journal of Applied Microbiology* 3: 223-225.
- Cervantes, L. A. & Olivares J.** (1976). Estudio microbiológico de un suelo salino "El Salitre". *Lat. Microbial.* 18: 73-76.
- Colwell, R. R.** (1970). Polyphasic taxonomy of genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and related *Vibrio* species. *Journal of bacteriology* 104: 410-&.
- Colwell, R. R., Litchfield C. D., Vreeland R. H., Kiefer L. A. & Gibbons N. E.** (1979). Taxonomic studies of red halophilic bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 29: 379-399.
- Consejería de Medio Ambiente, A. y. P., Junta de Andalucía** (2013). <http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/servtc5/ventana/mostrarFicha.do?idEspacio=7375>. In, pp. Ficha técnica de la Reserva natural Laguna Fuente de Piedra. Andalucía, Spain: Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía.

- Corcelli, A.** (2009). The cardiolipin analogues of Archaea. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1788: 2101-2106.
- Corcelli, A., Colella M., Mascolo G., Fanizzi F. P. & Kates M.** (2000). A novel glycolipid and phospholipid in the purple membrane. *Biochemistry* 39: 3318-3326.
- Corcelli, A., Colella, M., Mascolo, G., Fanizzi, F. P., Kates, M.** (2000). A novel glycolipid and phospholipid in the purple membrane. *Biochemistry* 39: 3318-3326.
- Corcelli, A., Lattanzio V. M. T. & Oren A.** (2004). The archaeal cardiolipins of the extreme halophiles. In, pp. 205-214. Edited by Springer-Verlag. Berlin.
- Corcelli, A. & Lobasso S.** (2006). Characterization of lipids of halophilic archaea. In *Extremophiles*, pp. 585-613. Edited by F.A. Rainey and A. Oren.
- Cowan, S. T.** (1974). *Cowan and steels manual for the identification of medical bacteria.*
- Cowan, S. T. & Steel K. J.** (1982). *Manual para la identificación de bacterias de importancia médica.* In. México: C.E.C.S.A.
- Cui, H. L., Tohty D., Zhou P. J. & Liu S. J.** (2006). *Haloterrigena longa* sp nov and *Haloterrigena limicola* sp nov., extremely halophilic archaea isolated from a salt lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 1837-1840.
- Cui, H. L., Yang X., Gao X. & Xu X. W.** (2011). *Halobellus clavatus* gen. nov., sp nov and *Halorientalis regularis* gen. nov., sp nov., two new members of the family Halobacteriaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61: 2682-2689.
- Cui, H. L., Yang X., Zhou Y. G., Liu H. C., Zhou P. J. & Dyll-Smith M. L.** (2012). *Halobellus limi* sp. nov. and *Halobellus salinus* sp. nov., isolated from two marine solar salterns. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 1307-13.
- Chenna, R., Sugawara H., Koike T., Lopez R., Gibson T. J., Higgins D. G. & Thompson J. D.** (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research* 31: 3497-3500.
- Chiclana, C. S. d.** (2013). <http://www.salinasdechiclana.com/>. In. Edited by T.y.M.S.L.E.A.d.C.d.I.F. Chiclana Natural S.A.; Alema. Cádiz: Centro de recursos ambientales salinas de chiclana.
- Chitra, D. & Sandip P.** (2012). Microbial Lifestyle and Genome Signatures. *Current Genomics* 13: 153-162.
- De la Haba, R. R., Sánchez-Porro C., Márquez M. C. & Ventosa A.** (2011). Taxonomy of halophiles. In *Extremophiles handbook*, pp. 256-283. Edited by H. K. Tokyo: Springer.
- Dedecker, P.** (1983). Australian salt lakes: their history, chemistry and biota - A review. *Hydrobiologia* 105: 231-244.
- Defrank, J. J. & Cheng T. C.** (1991). Purification and properties of an organophosphorus acid anhydrase from a halophilic bacterium. *Journal of bacteriology* 173: 1938-1943.
- Del Moral, A., Prado B., Quesada E., García T., Ferrer R. & Ramos-Cormenzana A.** (1988). Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods from inland saltern. *Journal of General Microbiology* 134: 733-741.
- Delgado-García, M., Valdivia-Urdiales B., Aguilar-González C. N., Contreras-Esquivel J. C. & Rodríguez-Herrera R.** (2012). Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92: 2575-2580.
- Demergasso, C., Casamayor E. O., Chong G., Galleguillos P., Escudero L. & Pedros-Alío C.** (2004). Distribution of prokaryotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, Northern Chile. *Fems Microbiology Ecology* 48: 57-69.
- Dighe, A. S., Jangid K., Gonzalez J. M., Pidiyar V. J., Patole M. S., Ranade D. R. & Shouche Y. S.** (2004). Comparison of 16S rRNA gene sequences of genus *Methanobrevibacter*. *Bmc Microbiology* 4.

- Dower, W. J., Miller J. F. & Ragsdale C. W.** (1988). High-efficiency transformation of *Escherichia coli* by high-voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* 16: 6127-6145.
- Dussault, H. P.** (1955). An improved techniques for staining red halophilic bacteria. *Journal of Bacteriology* 70: 484-485.
- Eichler, J.** (2001). Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnology Advances* 19: 261-278.
- Elevi, R., Assa P., Birbir M., Ogan A. & Oren A.** (2004). Characterization of extremely halophilic Archaea isolated from the Ayvalik Saltern, Turkey. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20: 719-725.
- Evans, R. W., Kushwaha S. C. & Kates M.** (1980). The lipids of *Halobacterium marismortui*, an extremely halophilic bacterium in the dead-sea. *Biochimica Et Biophysica Acta* 619 (3): 533-544.
- Faulkner, D. J.** (2002). Marine natural products. *Natural Product Reports* 19: 1-48.
- Fendrihan, S., Dornmayr-Pfaffenhuemer M., Gerbl F. W., Holzinger A., Grosbacher M., Briza P., Erler A., Gruber C., Platzer K. & Stan-Lotter H.** (2012). Spherical particles of halophilic archaea correlate with exposure to low water activity - implications for microbial survival in fluid inclusions of ancient halite. *Geobiology* 10: 424-433.
- Fernandes, J., Wang A., Su W., Rozenbloom S. R., Taibi A., Comelli E. M. & Wolever T. M. S.** (2013). Age, dietary fiber, breath methane, and fecal short chain Fatty acids are interrelated in archaea-positive humans. *The Journal of nutrition* 143: 1269-75.
- Fiala, G. & Stetter K. O.** (1986). *Pyrococcus furiosus* sp.nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100-degrees C. *Archives of Microbiology* 145: 56-61.
- Forsyth, M. P. & Kushner D. J.** (1970). Nutrition and distribution of salt response in populations of moderately halophilic bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 16: 253-&.
- Fox, G. E., Pechman K. R. & Woese C. R.** (1977). Comparative cataloguing of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematic. *International Journal of Systematic Bacteriology* 27: 44-57.
- Fox, G. E., Stackebrandt E., Hespell R. B., Gibson J., Maniloff J., Dyer T. A., Wolfe R. S., Balch W. E., Tanner R. S., Magrum L. J., Zablensky L. B., Blakemore R., Gupta R., Bonen L., Lewis B. J., Stahl D. A., Luehrsens K. R., Chen K. N. & Woese C. R.** (1980). The phylogeny of prokaryotes. *Science* 209: 457-463.
- Frazier, W. C.** (1926). A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. *Journal of Infectious Diseases* 39: 302-309.
- Fuchs, B., Schiller J., Suss R., Schurenberg M. & Suckau D.** (2007). A direct and simple method of coupling matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to thin-layer chromatography (TLC) for the analysis of phospholipids from egg yolk. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389: 827-834.
- Galinski, E. A. & Lippert K.** (1991). Novel compatible solutes and their potential application as stabilizers in enzyme technology.
- Gambacorta, A., Gliozzi A. & Derosa M.** (1995). Archaeal lipids and their biotechnological applications. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11: 115-131.
- Gambacorta, A., Trincone A., Nicolaus B., Lama L. & Derosa M.** (1994). Unique features of lipids of archaea. *Systematic and Applied Microbiology* 16: 518-527.
- Garrity, G. M. & Holt J. G.** (2001). Phylum All. *Euryarchaeota* ph. nov.: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 211-355. Edited by D.R. Boone and R.W. Castenholz. New York: Springer-Verlag.

- Gerhardt, P. & et al. (1981). Manual of methods for general bacteriology.
- Gevers, D., Cohan F. M., Lawrence J. G., Spratt B. G., Coenye T., Feil E. J., Stackebrandt E., Van de Peer Y., Vandamme P., Thompson F. L. & Swings J. (2005). Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology* 3: 733-739.
- Gómez, F., Rodríguez-Manfredi J. A., Rodríguez N., Fernández-Sampedro M., Caballero-Castrejón F. J. & Amils R. (2012). Habitability: Where to look for life? Halophilic habitats: Earth analogs to study Mars habitability. *Planetary and Space Science* 68: 48-55.
- Gontia, I., Kavita K., Schmid M., Hartmann A. & Jha B. (2011). *Brachybacterium saurashtrense* sp nov., a halotolerant root-associated bacterium with plant growth-promoting potential. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61: 2799-2804.
- González-Paredes, A., Clares-Naveros B., Ruíz-Martínez M. A., Durban-Fornieles J. J., Ramos-Cormenzana A. & Monteoliva-Sánchez M. (2011). Delivery systems for natural antioxidant compounds: Archaeosomes and archaeosomal hydrogels characterization and release study. *International Journal of Pharmaceutics* 421: 321-331.
- González-Paredes, A., Manconi M., Caddeo C., Ramos-Cormenzana A., Monteoliva-Sánchez M. & Fadda A. M. (2010). Archaeosomes as carriers for topical delivery of betamethasone dipropionate: in vitro skin permeation study. *Journal of Liposome Research* 20: 269-276.
- González-Toril, E., Aguilera A., Rodríguez N., Fernández-Remolar D., Gómez F., Díaz E., García-Moyano A., Sanz J. L. & Amils R. (2009). Microbial ecology of Rio Tinto, a natural extreme acidic environment of biohydrometallurgical interest. *Hydrometallurgy* 104: 329-333.
- Goris, J., De Vos P., Coenye T., Hoste B., Janssens D., Brim H., Diels L., Mergeay M., Kersters K. & Vandamme P. (2001). Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp nov., *Ralstonia metallidurans* sp nov and *Ralstonia basileensis* Steinle et al. 1998 emend. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 1773-1782.
- Grant, W. D., Kamekura M., McGenity T. J. & Ventosa A. (2001). Class III. *Halobacteria*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 294. Edited by D.R. Boone, R.W. Castenholz and G.M. Garrity. New York: Springer.
- Grant, W. D. & Larsen H. (1989). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, pp. 2216-2233. Edited by J.T.B. Staley, M.P.; Pfennig, N.; Holt, J.G. : Williams & Wilkins, Baltimore
- Grant, W. D., Oren A. & Ventosa A. (1998). Proposal of strain NCIMB 13488 as neotype of *Halorubrum trapanicum*. Request for an Opinion. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 1077-1078.
- Guy, L. & Ettema T. J. G. (2011). The archaeal 'TACK' superphylum and the origin of eukaryotes. *Trends in Microbiology* 19: 580-587.
- Han, C., Gu W., Zhang X., Lapidus A., Nolan M., Copeland A., Lucas S., Del Rio T. G., Tice H., Cheng J.-F., Tapia R., Goodwin L., Pitluck S., Pagani I., Ivanova N., Mavromatis K., Mikhailova N., Pati A., Chen A., Palaniappan K., Land M., Hauser L., Chang Y.-J., Jeffries C. D., Schneider S., Rohde M., Goeker M., Pukall R., Woyke T., Bristow J., Eisen J. A., Markowitz V., Hugenholtz P., Kyrpides N. C., Klenk H.-P. & Detter J. C. (2010). Complete genome sequence of *Thermaerobacter marianensis* type strain (7p75a(T)). *Standards in Genomic Sciences* 3: 337-345.
- Harrison, J. P., Gheeraert N., Tsigelnitskiy D. & Cockell C. S. (2013). The limits for life under multiple extremes. *Trends in Microbiology* 21: 204-212.
- Hezayen, F. F., Gutierrez M. C., Steinbuechel A., Tindall B. J. & Rehm B. H. A. (2010). *Halopiger aswanensis* sp nov., a polymer-producing and extremely halophilic archaeon isolated from

- hypersaline soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 633-637.
- Hucker, P.** (1927). *Métodos de Laboratorio*. 5ª edn. Mexico: N.Y. *Agri.Exper.Sta.Tech.Bull.* Interamericana. S.A.
- Irgens, R. L., Gosink J. J. & Staley J. T.** (1996). *Polaromonas vacuolata* gen nov, sp nov, a psychrophilic, marine, gas vacuolate bacterium from Antarctica. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 822-826.
- Irihimovitch, V. & Eichler J.** (2003). Post-translational secretion of fusion proteins in the halophilic archaea *Haloferax volcanii*. *Journal of Biological Chemistry* 278: 12881-12887.
- Javor, B.** (1989). Hypersaline environments: microbiology and biogeochemistry.
- Johnson, D. B.** (1998). Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *Fems Microbiology Ecology* 27: 307-317.
- Jukes, T. H. & Cantor C. R.** (1969). *Evolution of protein molecules*. New York: Academy Press.
- Junta de Andalucía, C. d. t., comercio y deporte.** (2013). <http://www.guiadecadiz.com/es/que-hacer/entornos-naturales/centro-recursos-ambientales-salinas-chiclana>. In. Cádiz: Guía de Cádiz.
- Juste, A., Van Trappen S., Verreth C., Cleenwerck I., De Vos P., Lievens B. & Willems K. A.** (2012). Characterization of *Tetragenococcus* strains from sugar thick juice reveals a novel species, *Tetragenococcus osmophilus* sp nov., and divides *Tetragenococcus halophilus* into two subspecies, *T. halophilus* subsp *halophilus* subsp nov and *T. halophilus* subsp *flandriensis* subsp nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 129-137.
- Kandler, O.** (1994). Cell wall biochemistry and three-domain concept of life. *Systematic and Applied Microbiology* 16: 501-509.
- Kates, M.** (1972). Ether linked lipids in extremely halophilic bacteria.
- Kates, M.** (1978). Phytanyl ether-linked polar lipids and isoprenoid neutral lipids of extremely halophilic bacteria. *Progress in the Chemistry of Fats* 15: 301-342.
- Kates, M.** (1986). *Techniques of lipidology*. Amsterdam: Elsevier B.V.
- Kates, M.** (1993). Membrane-lipids of extreme halophiles -Biosynthesis, fuction and evolutionary significance. *Experientia* 49: 1027-1036.
- Kaurichev, I. S.** (1980). *Prácticas de edafología*. Moscow: Mir Publisher.
- Kharroub, K., Aguilera M., Jiménez-Pranteda M. L., González-Paredes A., Ramos-Cormenzana A. & Monteoliva-Sánchez M.** (2011). *Marinobacter oulmenensis* sp nov., a moderately halophilic bacterium isolated from brine of a salt concentrator. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61: 2210-2214.
- Kharroub, K., Lizama C., Aguilera M., Boulahrouf A., Campos V., Ramos-Cormenzana A. & Monteoliva-Sánchez M.** (2008). *Halomicrobium katesii* sp nov., an extremely halophilic archaeon. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 2354-2358.
- Khatun, M. M., Hossain K. M. & Rahman S. M. M.** (2012). Molecular Characterization of Selected Local and Exotic Cattle Using RAPD Marker. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 25: 751-757.
- Kimura, M.** (1979). Neutral theory of molecular evolution. *Scientific American* 241: 98-&.
- Kiss, H., Cleland D., Lapidus A., Lucas S., Del Rio T. G., Nolan M., Tice H., Han C., Goodwin L., Pitluck S., Liolios K., Ivanova N., Mavromatis K., Ovchinnikova G., Pati A., Chen A., Palaniappan K., Land M., Hauser L., Chang Y.-J., Jeffries C. D., Lu M., Brettin T., Detter J. C., Goeker M., Tindall B. J., Beck B., McDermott T. R., Woyke T., Bristow J., Eisen J. A., Markowitz V., Hugenholtz P., Kyrpides N. C., Klenk H.-P. & Cheng J.-F.** (2010). Complete

- genome sequence of 'Thermobaculum terrenum' type strain (YNP1(T)). *Standards in Genomic Sciences* 3: 153-162.
- Koga, Y., Akagawamatsushita M., Ohga M. & Nishihara M.** (1993). Taxonomic significance of the distribution of component parts of polar ether lipids in methanogens. *Systematic and Applied Microbiology* 16: 342-351.
- Koga, Y. & Morii H.** (2005). Recent advances in structural research on ether lipids from archaea including comparative and physiological aspects. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 69: 2019-2034.
- Kovacs, N.** (1956). Identification of *Pseudomonas-Pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature* 178: 703-703.
- Kumar, S., Tamura K. & Nei M.** (2004). MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150-163.
- Kunte, H. J., Trüper H. & Stan-Lotter H.** (2002). Halophilic microorganisms. In *Astrobiology. The quest for the conditions of life.*, pp. 185-200. Edited by G. Horneck and C. Baumstark-Khan. Berlin: Springer.
- Kushner, D. J. & Kamekura M.** (1988). Physiology of halophilic eubacteria. In *Halophilic bacteria*. Edited by R.H. Vreeland and L.I. Hochstein. Boca-Raton, Florida: CRC Press Inc.
- Kushwaha, S. C., Juez-Perez G., Rodríguez-Valera F., Kates M. & Kushner D. J.** (1982). Survey of lipids of a new group of extremely halophilic bacteria from salt ponds in Spain. *Canadian Journal of Microbiology* 28(12): 1365-1372.
- Lanzotti, V., Nicolaus B., Trincone A. & Grant W. D.** (1988). The glycolipid of halobacterium-Saccharovorum. *Fems Microbiology Letters* 55: 223-228.
- Lapage, S. P., Sneath P. H., Skerman V. B. D., Lessel E. F., Seeliger H. P. R. & Clark W. A.** (1992). *International Code of Nomenclature of Bacteria (1990 Revision)*. Washington, D.C.: ASM.
- Larkin, M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J. & Higgins D. G.** (2007). Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Larsen, H.** (1962). Halophilism. In *the bacteria*, pp. 297-342. Edited by I.C. Gunsalus and R.Y. Stanier. New York: Academic Press.
- Lizama, C., Monteoliva-Sánchez M., Prado B., Ramos-Cormenzana A., Weckesser J. & Campos V.** (2001). Taxonomic study of extreme halophilic archaea isolated from the "Salar de Atacama", Chile. *Systematic and Applied Microbiology* 24: 464-474.
- Lizama, C., Monteoliva-Sánchez M., Suarez-García A., Rosello-Mora R., Aguilera M., Campos V. & Ramos-Cormenzana A.** (2002). *Halorubrum tebenquichense* sp nov., a novel halophilic archaeon isolated from the Atacama Saltern, Chile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 149-155.
- Lobasso, S., Lopalco P., Lattanzio V. M. T. & Corcelli A.** (2003). Osmotic shock induces the presence of glycosylated lipid in the purple membrane of *Halobacterium salinarum*. *Journal of Lipid Research* 44: 2120-2126.
- Lobasso, S., Lopalco P., Mascolo G. & Corcelli A.** (2008). Lipids of the ultra-thin square halophilic archaeon *Haloquadratum walsbyi*. *Archaea (Vancouver, B.C.)* 2: 177-83.
- Logan, N. A., Berge O., Bishop A. H., Busse H. J., De Vos P., Fritze D., Heyndrickx M., Kaempfer P., Rabinovitch L., Salkinoja-Salonen M. S., Seldin L. & Ventosa A.** (2009). Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 2114-2121.

- Lopalco, P., Angelini R., Lobasso S., Koecher S., Thompson M., Mueller V. & Corcelli A.** (2013). Adjusting membrane lipids under salt stress: the case of the moderate halophilic organism *Halobacillus halophilus*. *Environmental Microbiology* 15: 1078-1087.
- Lopalco, P., Lobasso S., Babudri F. & Corcelli A.** (2004). Osmotic shock stimulates de novo synthesis of two cardiolipins in an extreme halophilic archaeon. *Journal of Lipid Research* 45: 194-201.
- Lopalco, P., Lobasso S., Baronio M., Angelini R. & Corcelli A.** (2011). Impact of lipidomics on the microbial world of hypersaline environments. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- Lucena, T., Ruvira M. A., Arahál D. R., Macian M. C. & Pujalte M. J.** (2012). *Vibrio aestivus* sp. nov. and *Vibrio quintilis* sp. nov., related to *Marisflavi* and *Gazogenes* clades, respectively. *Systematic and Applied Microbiology* 35: 427-431.
- Ludwig, W. & Klenk H. P.** (2001). Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. 2nd edn. New York: Springer-Verlag.
- Ma, Y., Galinski E. A., Grant W. D., Oren A. & Ventosa A.** (2010). Halophiles 2010: life in saline environments. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 6971-81.
- Madern, D., Ebel C. & Zaccai G.** (2000). Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles* 4: 91-98.
- Madigan, M., Martinko J. & Parker J.** (2003). Brock. *Microbiología de los microorganismos*. 10 edn: Pearson education.
- Malahá, S. d. L.** (2013). http://www.turgranada.es/municipios/municipio.php?id_municipio=100&id_idioma=1. In: Edited by P.P.d.T.d.G.I.D.d. Granada. Granada: Patronato Provincial de Turismo de Granada I Diputación de Granada.
- Mandel, M., Marmur J. & Lawrence Grossman K. M.** (1968). Use of ultraviolet absorbance-temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA. In *Methods in Enzymology*, pp. 195-206: Academic Press.
- Marmur, J. & Doty P.** (1962). Determination of base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *Journal of Molecular Biology* 5: 109-118.
- Matsumi, R., Atomi H., Driessen A. J. M. & van der Oost J.** (2011). Isoprenoid biosynthesis in Archaea - Biochemical and evolutionary implications. *Research in Microbiology* 162: 39-52.
- Meier-Kolthoff, J. P., Goeker M., Sproeer C. & Klenk H.-P.** (2013). When should a DDH experiment be mandatory in microbial taxonomy? *Archives of Microbiology* 195: 413-418.
- Mesbah, M., Premachandran U. & Whitman W. B.** (1989). Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39: 159-167.
- Mesbah, N. M. & Wiegel J.** (2012). Life under Multiple Extreme Conditions: Diversity and Physiology of the Halophilic Alkalithermophiles. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 4074-4082.
- Mescher, M. F., Hansen U. & Strominger J. L.** (1976). Formation of lipid-linked sugar compound in *Halobacterium salinarium*. *Journal of Biological Chemistry* 251: 7289-7294.
- Montero-Calasanz, M. C., Goeker M., Rohde M., Schumann P., Poetter G., Sproeer C., Gorbushina A. A. & Klenk H.-P.** (2013). *Geodermatophilus siccatus* sp nov., isolated from arid sand of the Saharan desert in Chad. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 103: 449-456.
- Müller, V. & Köschler S.** (2011). Adapting to Changing Salinities: Biochemistry, Genetics, and Regulation in the Moderately Halophilic Bacterium *Halobacillus halophilus*. In *Extremophiles Handbook*, pp. 383-400. Edited by K. Horikoshi: Springer Japan.

- Murillo, N. & Raoult D.** (2013). Skin microbiota: overview and role in the skin diseases acne vulgaris and rosacea. *Future Microbiology* 8: 209-222.
- Mutlu, M. B., Martínez-García M., Santos F., Pena A., Guven K. & Antón J.** (2008). Prokaryotic diversity in Tuz Lake, a hypersaline environment in Inland Turkey. *Fems Microbiology Ecology* 65: 474-483.
- Namwong, S., Tanasupawat S., Kudo T. & Itoh T.** (2011). *Haloarcula salaria* sp. nov. and *Haloarcula tradensis* sp. nov., isolated from salt in Thai fish sauce. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61: 231-236.
- Narasingarao, P., Podell S., Ugalde J. A., Brochier-Armanet C., Emerson J. B., Brocks J. J., Heidelberg K. B., Banfield J. F. & Allen E. E.** (2012). De novo metagenomic assembly reveals abundant novel major lineage of Archaea in hypersaline microbial communities. *Isme Journal* 6: 81-93.
- Nei, M., Suzuki Y. & Nozawa M.** (2010). The Neutral Theory of Molecular Evolution in the Genomic Era. In *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, Vol 11, pp. 265-289. Edited by A. Chakravarti and E. Green.
- Nishihara, M., Morii H. & Koga Y.** (1987). Structure determination of a quartet of novel tetraether lipids from methanobacterium-thermoautotrophicum. *Journal of Biochemistry* 101: 1007-1015.
- Oesterhelt, D. & Stoeckenius W.** (1974). Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane. *Methods in Enzymology* 31: 667-78.
- Ollivier, B., Caumette P., García J. L. & Mah R. A.** (1994). Anaerobic-Bacteria from hypersaline environments. *Microbiological Reviews* 58: 27-38.
- Oren, A.** (2002). Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *Fems Microbiology Ecology* 39: 1-7.
- Oren, A.** (2006). The order halobacteriales. *Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. Third Edition* edn.
- Oren, A.** (2008a). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline systems* 4: 2-2.
- Oren, A.** (2008b). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline systems* 4:2.
- Oren, A.** (2010). Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental Technology* 31: 825-834.
- Oren, A.** (2011a). Diversity of halophiles. In *Extremophiles handbook*, pp. 310-325. Edited by K. Horikoshi. Tokyo: Springer.
- Oren, A.** (2011b). Ecology of halophiles. In *Extremophiles handbook*, pp. 343-361. Edited by K. Horikoshi. Tokyo: Springer.
- Oren, A.** (2012). Taxonomy of the family Halobacteriaceae: a paradigm for changing concepts in prokaryote systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 263-271.
- Oren, A., Arahal D. R. & Ventosa A.** (2009). Emended descriptions of genera of the family Halobacteriaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 637-642.
- Oren, A., Duker S. & Ritter S.** (1996). The polar lipid composition of Walsby's square bacterium. *Fems Microbiology Letters* 138: 135-140.
- Oren, A., Gurevich P. & Henis Y.** (1991). Reduction of nitrosubstituted aromatic compounds by the halophilic anaerobic eubacteria *Haloanaerobium praevalens* and *Sporohalobacter marismortui*. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 3367-3370.

- Oren, A. & Rodríguez-Valera F.** (2001). The contribution of halophilic Bacteria to the red coloration of saltern crystallizer ponds. *Fems Microbiology Ecology* 36: 123-130.
- Oren, A., Ventosa A. & Grant W. D.** (1997). Proposed minimal standards for description of new taxa in the order Halobacteriales. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 233-238.
- Parte, A.** (2013). <http://www.bacterio.cict.fr>. In, pp. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature.
- Patel, J. B.** (2001). 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular Diagnosis* 6: 313-321.
- Patel, J. B., Leonard D. G. B., Pan X., Musser J. M., Berman R. E. & Nachamkin I.** (2000). Sequence-based identification of Mycobacterium species using the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 246-251.
- Patel, S., Panchal H. & Anjaria K.** (2012). Phylogenetic analysis of some Leguminous trees using CLUSTALW2 Bioinformatics Tool. In 2012 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine Workshops. Edited by J. Gao, W. Dubitzky, C. Wu, M. Liebman, R. Alhajj, L. Ungar, A. Christianson and X. Hu.
- Pérez-Davó, A., Aguilera M., Ramos-Cormenzana A. & Monteoliva-Sánchez M.** (2014, In Press.). *Alkalibacillus almallahensis* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from an inland solar saltern
- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: IJS/2013/059121.
- Pérez-Davó, A., Monteoliva-Sánchez M., Jiménez-Valverde A. & Aguilera M.** (2014, In review). Predominance of culturable archaeal and bacterial populations from three Andalusian saline environments. *Microbes and environments*.
- Pettit, R. K.** (2011). Culturability and Secondary Metabolite Diversity of Extreme Microbes: Expanding Contribution of Deep Sea and Deep-Sea Vent Microbes to Natural Product Discovery. *Marine Biotechnology* 13: 1-11.
- Pfiffner, S. M., McInerney M. J., Jenneman G. E. & Knapp R. M.** (1986). Isolation of halotolerant, thermotolerant, facultative polymer-producing bacteria and characterization of the exopolymer. *Applied and Environmental Microbiology* 51: 1224-1229.
- Piedra, A. d. F. d.** (2013). http://www.fuentedepiedra.es/es/Naturaleza/La_Laguna/Introduccion/. In. Edited by <http://www.sopde.es/>. Málaga: Diputación de Málaga.
- Pipkin, B. W., Glorslie D. S., Casey R. E. & Hammond D. E.** (1977). *Laboratory exercises in oceanography*. San Francisco.
- Por, F. D.** (1980). A classification of hypersaline water based on trophic criteria. *Marine Ecology* 1: 121-132.
- Post, F. J., Borowitzka L. J., Borowitzka M. A., Mackay B. & Moulton T.** (1983). The protozoa of a Western Australian hypersaline lagoon. *Hydrobiologia* 105: 95-113.
- Poxton, I. R.** (1993). Prokaryote envelope diversity. *Journal of Applied Bacteriology* 74: S1-S11.
- Prado, B., Delmoral A., Quesada E., Rios R., Monteoliva-Sánchez M., Campos V. & Ramos-Cormenzana A.** (1991). Numerical taxonomy of moderately halophilic gram-negative rods isolated from the salar-de-atacama, Chile. *Systematic and Applied Microbiology* 14: 275-281.
- Purdy, K. J., Cresswell-Maynard T. D., Nedwell D. B., McGenity T. J., Grant W. D., Timmis K. N. & Embley T. M.** (2004). Isolation of haloarchaea that grow at low salinities. *Environmental Microbiology* 6: 591-595.
- Quesada, E., Ventosa A., Ramos-Cormenzana A. & Rodríguez-Valera F.** (1982). Types and properties of some bacteria isolated from hypersaline soils. *Journal of Applied Bacteriology* 53: 155-161.

- Ramos-Cormenzana, A.** (1979). *Taxonomía Bacteriana*. 9º edn. Granada: Universidad de Granada, Hospital Real.
- Ramos-Cormenzana, A.** (1991). Halophilic organisms and the environment.
- Rodríguez-Valera, F.** (1988). Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. Florida: CRC Press Inc., Boca Raton.
- Rodríguez-Valera, F.** (1989). Organización genética de las Halobacterias. In XII Congreso nacional de la asociación española de la microbiología. Pamplona, España.
- Rodríguez-Valera, F., Nieto J. J. & Ruíz-Berraquero F.** (1983). Light as an energy source in continuous culture of bacteriorhodopsin-containing halobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 45: 868-871.
- Rodríguez-Valera, F., Ruíz-Berraquero F. & Ramos-Cormenzana A.** (1981). Characteristics of the heterotrophic bacterial-populations in hypersaline environments of different salt concentrations. *Microbial Ecology* 7: 235-243.
- Rodríguez-Valera, F., Ruíz-Berraquero F. & Ramos-Cormenzana A.** (1981). Characteristics of the heterotrophic bacterial-populations in hypersaline environments of different salt concentrations. *Microbial Ecology* 7: 235-243.
- Rogall, T., Flohr T. & Bottger E. C.** (1990). Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. *Journal of General Microbiology* 136: 1915-1920.
- Roine, E. & Oksanen H. M.** (2011). Viruses from hypersaline environment. In *Halophiles and Hypersaline Environments*, pp. 153-172. Edited by A. Ventosa, A. Oren and Y. Ma: Springer.
- Rossello-Mora, R.** (1999). Sobre el concepto de especies en microbiología. *Artículo de actualidad SEM* 27: 18-22.
- Rossello-Mora, R.** (2012). Towards a taxonomy of Bacteria and Archaea based on interactive and cumulative data repositories. *Environmental Microbiology* 14: 318-334.
- Rossello-Mora, R. & Amann R.** (2001). The species concept for prokaryotes. *Fems Microbiology Reviews* 25: 39-67.
- Rothschild, L. J. & Mancinelli R. L.** (2001). Life in extreme environments. *Nature* 409: 1092-1101.
- Ruiz Jiménez, A.** (2010). Las Salinas de la Malahá. In, pp. 129. Granada: Granada.
- Russell, N. J.** (2000). Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. *Extremophiles* 4: 83-90.
- S.L., S. d. L. M.** (2013). <http://salinasdelamalaha.net/>. In. Granada: Salinas-de-La-Malahá-S.L.
- Sabet, S., Diallo L., Hays L., Jung W. & Dillon J. G.** (2009). Characterization of halophiles isolated from solar salterns in Baja California, Mexico. *Extremophiles* 13: 643-656.
- Saeedi, P., Moosaabadi J. M., Sebtahmadi S. S., Mehrabadi J. F., Behmanesh M. & Mekhilef S.** (2012). Potential applications of bacteriorhodopsin mutants. *Bioengineered* 3: 326-8.
- Sahm, K., John P., Nacke H., Wemheuer B., Grote R., Daniel R. & Antranikian G.** (2013). High abundance of heterotrophic prokaryotes in hydrothermal springs of the Azores as revealed by a network of 16S rRNA gene-based methods. *Extremophiles* 17: 649-662.
- Saiki, R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B. & Erlich H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Saitou, N. & Nei M.** (1987). The neighbor-joining method - A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Sanbrook, J., Fritsch E. F. & Maniatis T.** (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2ºed. edn. NY: Cold Spring Harbor.

- Sanger, F., Nicklen S. & Coulson A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463-5467.
- Sanjukta, R. K., Farooqi M. S., Rai N., Rai A., Sharma N., Mishra D. C. & Singh D. P.** (2013). Expression analysis of genes responsible for amino acid biosynthesis in halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 50: 177-185.
- Sarig, S., Roberson E. B. & Firestone M. K.** (1993). Microbial activity-soil structure: response to saline water irrigation. *Soil Biology & Biochemistry* 25: 693-697.
- Shi, W., Takano T. & Liu S.** (2012). *Anditalea andensis* gen. nov., sp nov., an alkaliphilic, halotolerant bacterium isolated from extreme alkali-saline soil. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 102: 703-710.
- Shivanand, P. & Mugeraya G.** (2011). Halophilic bacteria and their compatible solutes - osmoregulation and potential applications. *Current Science* 100: 1516-1521.
- Sierra, G.** (1957). Studies on bacterial esterases. I. Differentiation of a lipase and two al-esterases during the growth of *Pseudomonas aeruginosa* and some observations on growth and esterase inhibition. *Antonie van Leeuwenhoek* 23: 241-65.
- Sironval, C.** (1993). Spirulina, an arm against malnutrition: History and prospects. *Bulletin de l'Institut Oceanographique (Monaco)* 0: 203-218.
- Smallbone, B. W. & Kates M.** (1981). Structural identification of minor glycolipids in halobacterium-cutirubrum. *Biochimica Et Biophysica Acta* 665 (3): 551-558.
- Sneath, P. H. & Sokal R. R.** (1973). Numerical taxonomy the principles and practice of numerical classification.
- Sneath, P. H. A. & Collins V. G.** (1974). Study in test reproducibility between laboratories - Report of a *Pseudomonas* working party. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 40: 481-527.
- Sokal, R. R. & Michener C. D.** (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. In, pp. 1409-1438. Edited by S.B. University of Kansas. Kansas.
- Sorokin, D. Y.** (2005). Is there a limit for high-pH life? *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 1405-1406.
- Sprott, G. D.** (1992). Structures of archaeobacterial membrane-lipids. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 24: 555-566.
- Sprott, G. D., Larocque S., Cadotte N., Dicaire C. J., McGee M. & Brisson J. R.** (2003). Novel polar lipids of halophilic eubacterium *Planococcus H8* and archaeon *Haloferax volcanii*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1633: 179-188.
- Squyres, S. W. & Knoll A. H.** (2005). Sedimentary rocks at Meridiani Planum: Origin, diagenesis, and implications for life on Mars. *Earth and Planetary Science Letters* 240: 1-10.
- Stackebrandt, E. & Goebel B. M.** (1994). A place for DNA-DNA reassociation and 16S ribosomal-RNA sequence-analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849.
- Subov, N. N.** (1931). *Oceanographical Tables*. Moscow: USSR Oceanographic Institute 29 Hydrometeorological Commission.
- Tajima, F. & Takezaki N.** (1994). Estimation of evolutionary distance for reconstructing molecular phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 11: 278-286.
- Takahashi, K. & Nei M.** (2000). Efficiencies of fast algorithms of phylogenetic inference under the criteria of maximum parsimony, minimum evolution, and maximum likelihood when a large number of sequences are used. *Molecular Biology and Evolution* 17: 1251-1258.
- Takai, K. & Horikoshi K.** (2000). *Thermosiphon japonicus* sp nov., an extremely thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent in Japan. *Extremophiles* 4: 9-17.

- Tamura, K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. & Kumar S.** (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Taylor, M. P., van Zyl L., Tuffin M. & Cowan D.** (2012). *Extremophiles and Biotechnology: How Far have we Come?*
- Thongthai, C. & Suintanalert P.** (1991). Halophiles in Thai fish sauce (nampla). In *General and applied aspects of halophilic microorganism*, pp. 381-388. Edited by F. Rodríguez-Valera. New York: Plenum press.
- Tindall, B. J.** (1990). A comparative-study of the lipids composition of *Halobacterium saccharovororum* from various sources. *Systematic and Applied Microbiology* 13: 128-130.
- Tindall, B. J., Rossello-Mora R., Busse H. J., Ludwig W. & Kampfer P.** (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 249-266.
- Tindall, B. J., Wray V., Huber R. & Collins M. D.** (1991). A novel, fully saturated cyclic menaquinone in the archaebacterium *Pyrobaculum organotrophum*. *Systematic and Applied Microbiology* 14: 218-221.
- Trincone, A., Nicolaus B., Lama L., Derosa M., Gambacorta A. & Grant W. D.** (1990). The glycolipid of *Halobacterium sodomense*. *Journal of General Microbiology* 136: 2327-2331.
- Valenzuela-Encinas, C., Neria-González I., Alcántara-Hernández R. J., Enriquez-Aragón J. A., Estrada-Alvarado I., Hernández-Rodríguez C., Dendooven L. & Marsch R.** (2008). Phylogenetic analysis of the archaeal community in an alkaline-saline soil of the former lake Texcoco (Mexico). *Extremophiles* 12: 247-254.
- Vandamme, P.** (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60: 407-438.
- Vardhan, S., Kaushik R., Saxena A. K. & Arora D. K.** (2011). Restriction analysis and partial sequencing of the 16S rRNA gene as index for rapid identification of *Bacillus* species. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 99: 283-296.
- Ventosa, A.** (1980). Taxonomía numérica de bacilos gram-negativos halófilos moderados. In *Microbiología*. Granada: Granada.
- Ventosa, A., Quesada E., Rodríguez-Valera F., Ruíz-Berraquero F. & Ramos-Cormenzana A.** (1982a). Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. *Journal of General Microbiology* 128: 1959-1968.
- Ventosa, A., Quesada E., Rodríguezvalera F., Ruízberraquero F. & Ramoscormenzana A.** (1982b). NUMERICAL TAXONOMY OF MODERATELY HALOPHILIC GRAM-NEGATIVE RODS. *Journal of General Microbiology* 128: 1959-1968.
- Vijayendra, S. V. N. & Shamala T. R.** (2013). Film forming microbial biopolymers for commercial applications- A review. *Critical Reviews in Biotechnology* 0: 1-20.
- Vreeland, R. H. & Martin E. L.** (1980). Growth characteristics, effects of temperature, and ion specificity of the halotolerant bacterium *Halomonas elongata*. *Canadian Journal of Microbiology* 26: 746-752.
- Wayne, L. G., Brenner D. J., Colwell R. R., Grimont P. A. D., Kandler O., Krichevsky M. I., Moore L. H., Moore W. E. C., Murray R. G. E., Stackebrandt E., Starr M. P. & Truper H. G.** (1987). Report of the ad-hoc-committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics *International Journal of Systematic Bacteriology* 37: 463-464.

- Wilson, Z. E. & Brimble M. A.** (2010). A flexible asymmetric synthesis of the tetracyclic core of berkelic acid using a Horner-Wadsworth-Emmons/oxa-Michael cascade. *Organic & Biomolecular Chemistry* 8: 1284-1286.
- Woese, C. R.** (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 51: 221-271.
- Woese, C. R., Kandler O. & Wheelis M. L.** (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 4576-4579.
- Wu, Q., Wang J. & Yan H.** (2011). An Improved Position Weight Matrix method based on an entropy measure for the recognition of prokaryotic promoters. *International Journal of Data Mining and Bioinformatics* 5: 22-37.
- Yadav, S., Irfan M., Ahmad A. & Hayat S.** (2012). Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: A review. *Journal of Environmental Biology* 32: 667-685.
- Zafrilla, B., Martínez-Espinosa R. M., Alonso M. A. & Bonete M. J.** (2010). Biodiversity of Archaea and floral of two inland saltern ecosystems in the Alto Vinalopo Valley, Spain. *Saline systems* 6: 10-10.
- Zhang, W.-J., Han D., Qiu X.-X., Zhao M.-L., Mou Y.-Z., Cui H.-L. & Li Z.-R.** (2013). *Halobellus rarus* sp. nov., a halophilic archaeon from an inland salt lake of China. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 104: 377-384.
- Zhao, M. L., Qiu X. X., Zhang W. J., Han D., Cui H. L. & Li Z. R.** (2013). *Halobellus litoreus* sp. nov., a Halophilic Archaeon Isolated from a Chinese Marine Solar Saltern. *Current Microbiology*: 1-5.
- Zhi, X.-Y., Zhao W., Li W.-J. & Zhao G.-P.** (2012). Prokaryotic systematics in the genomics era. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 101: 21-34.
- Ziemke, F., Hofle M. G., Lalucat J. & Rossello-Mora R.** (1998). Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 179-186.
- Zuckerka, E. & Pauling L.** (1965). Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology* 8: 357-&.