

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Farmacia

Departamento de Microbiología



**“DIVERSIDAD PROCARIOTA EN EL HUMEDAL DE
AJAUQUE Y RAMBLA SALADA, MURCIA”**

María Rocío Luque Aznar

Tesis Doctoral, 2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María Rocío Luque Aznar
D.L.: GR 604-2012
ISBN: 978-84-694-6668-1



Universidad de Granada

Facultad de Farmacia

Memoria presentada por la Licenciada en Farmacia

Dña. María Rocío Luque Aznar para aspirar al grado de Doctor

Granada, 2011

VºBº Los directores

Fdo. Dra. Emilia Quesada Arroquia

Catedrática de Microbiología

Facultad de Farmacia

Universidad de Granada

Fdo. Dra. Victoria Béjar Luque

Catedrática de Microbiología

Facultad de Farmacia

Universidad de Granada

Fdo. Inmaculada Llamas Company

Profesora Titular de Microbiología

Facultad de Farmacia

Universidad de Granada

La Doctoranda

Fdo. María Rocío Luque Aznar

La presente Tesis Doctoral ha sido subvencionada por los siguientes proyectos de investigación:

Título: “Estudio de la comunidad de procariotas de Rambla Salada (Murcia), un espacio protegido de interés ecológico comunitario. Selección de bacterias de utilidad industrial y ecológica”.

Investigador principal: Dra. Emilia Quesada Arroquia.

Entidad financiadora: CICYT; CGL2005-05947 (2006-2008).

Título: “Origen, biodiversidad y biogeografía del género *Halomonas*”.

Investigador principal: Victoria Béjar Luque.

Entidad financiadora: CICYT; CGL2008-02399 (2008-2010).

Asimismo, durante la realización de la Tesis Doctoral, la doctoranda ha disfrutado de una beca de Formación de Personal Investigador, concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia (2006-2011).

Parte de los resultados de esta Tesis se obtuvieron gracias a las estancias realizadas por la doctoranda en los Departamentos de Microbiología, Química y Screening de la Fundación MEDINA (Fundación Centro de Excelencia en Investigación de Medicamentos Innovadores en Andalucía) bajo la dirección del Dr. Gerald Bills.

De la presente Tesis Doctoral se han extraído las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

Publicaciones

Luque, R., Quesada, E., Béjar, V., Llamas, I. Isolation of strains of the genus *Halomonas* with biotechnological interest from Rambla Salada (Murcia). (2010). *Ars Pharm* (en prensa).

Luque, R., González-Domenech, C., Llamas, I., Quesada, E., Béjar, V. Culturable diversity of halophilic archaea in Rambla Salada, Spain. (2011). *Extremophiles* (en revisión).

Comunicaciones a congresos

Luque, R., Llamas, I., Quesada, E., Béjar, V. Estudio de la biodiversidad procariota en Rambla Salada (Murcia). XXI Congreso Nacional de Microbiología. Sevilla, 2007.

Luque, R., Oueriaghli, N., Llamas, I., Martínez-Checa, F., Béjar, V., Quesada, E. Biodiversidad en Rambla Salada (Murcia). VII Reunión Red Nacional de Organismos Extremófilos. Castalla (Alicante). 2007.

Oueriaghli, N., Luque, R., Martínez-Checa, F., Béjar, V., Quesada, E. Microbiota en Rambla Salada: técnicas moleculares versus técnicas clásicas de aislamiento y selección de microorganismos. VIII Reunión Red Nacional de Organismos Extremófilos. Grazalema (Cadiz), 2008.

Oueriaghli, N., Luque, R., Martínez-Checa, F., Béjar, V., Quesada, E. Estudios de biodiversidad procariota en Rambla Salada. XII Reunión del Grupo de Taxonomía, Filogenia y Biodiversidad Microbiana. Tarragona, 2008.

Luque Aznar, R., Oueriaghli, N., Martínez-Checa, F., Llamas Company, I., Quesada Arroquia, E., Béjar Luque, V. Comparación entre las técnicas clásicas y las técnicas moleculares en el estudio de la biodiversidad procariota en Rambla Salada (Murcia). II Congreso Nacional de Biodiversidad. Santa Susana (Girona), 2009.

Luque Aznar, R., Oueriaghli, N., López Fernández, M., Quesada Arroquia, E., Llamas Company, I. *Halomonas* es la bacteria heterótrofa aerobia que predomina en Rambla Salada (Murcia). XXII Congreso Nacional de Microbiología. Almería, 2009.

Oueriaghli, N., Luque Aznar, R., Béjar Luque, V., Martínez-Checa, F. DGGE Y FISH para el estudio de la biodiversidad procariota en Rambla Salada (Murcia). XXII Congreso Nacional de Microbiología. Almería, 2009.

Luque, R., Oueriaghli, N., Llamas, I., Martínez-Checa, F., Quesada E., Béjar, V. Ubiquity and diversity of the genus *Halomonas*. IX Reunión Red Nacional de Microorganismos Extremófilos. Palma de Mallorca, 2009.

Oueriaghli, N., Luque, R., Martínez-Checa, F., Llamas I., Quesada, E., Béjar, V. Diversity of *Archaea* in saline and non-saline soils. X Reunión de la Red Nacional de Microorganismos Extremófilos. Blanes (Girona), 2010.

Luque, R., Quesada, E., Béjar, R., Llamas, I. Isolation and identification of new prokaryotes from Rambla Salada (Murcia). XIII Meeting on Microbial Taxonomy, Phylogeny and Diversity. Sevilla, 2010.

Oueriaghli, N., Luque R., Llamas, I., Martínez-Checa, F., Béjar, V. Procaryote dans le parc naturel Rambla Salada (Murcia, Espagne). 8ème Congrès National de la Société Française de Microbiologie. Marseille, 2010.

Luque, R., Quesada, E., Béjar, V., Llamas, I. Aislamiento de cepas del género *Halomonas* con interés industrial y biotecnológico en Rambla Salada (Murcia). XXIX Congreso Internacional de la Sociedad Farmacéutica del Mediterraneo Latino. Granada, 2010.

Luque, R., Llamas, I., Béjar, V., González, I., Bills, G., Quesada, E. Explorando la diversidad procariota en Rambla Salada, Murcia. III Congreso Nacional de Biodiversidad. Granada, 2011.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	11
I.1. MICROORGANISMOS HALÓFILOS	21
I.1.1. CONCEPTO	21
I.1.2. CLASIFICACIÓN	21
I.1.3. TAXONOMÍA Y FILOGENIA	22
I.1.3.1. Microorganismos halófilos del Dominio <i>Bacteria</i>	23
I.1.3.2. Microorganismos halófilos del Dominio <i>Archaea</i>	26
I.1.3.3. Microorganismos halófilos del Dominio <i>Eukarya</i>	30
I.2. HÁBITATS HIPERSALINOS	33
I.2.1. HUMEDAL DE AJAUQUE Y RAMBLA SALADA	36
I.3. DIVERSIDAD MICROBIANA	38
I.4. SELECCIÓN DE NUEVOS MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS	42
II. OBJETIVOS	47
III. TRABAJO EXPERIMENTAL	51
CAPÍTULO 1: SELECCIÓN DE LAS CEPAS OBJETO DE ESTUDIO	53
III.1.1. RESUMEN	55
III.1.2. MATERIAL Y MÉTODOS	57
III.1.2.1. Lugares de muestreo y análisis físico-químico	57
III.1.2.2. Aislamiento de bacterias y arqueas	58
III.1.2.3. Conservación de las cepas	58
III.1.3. RESULTADOS	59
III.1.4. DISCUSION	73
CAPÍTULO 2: CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA	75
III.2.1. RESUMEN	77
III.2.2. MATERIAL Y MÉTODOS	79
79III.2.2.1. Caracterización fenotípica	79
III.2.2.2. Análisis numérico de las pruebas fenotípicas	102
III.2.2.3 Microscopía electrónica	103

III.2.2.4. Estudio genotípico	103
III.2.2.5. Estudio filogenético	105
III.2.2.6. Análisis quimiotaxonómico	109
III.2.3. RESULTADOS	110
III.2.3.1. Caracterización taxonómica de las cepas bacterianas	110
III.2.3.2. Caracterización taxonómica de las cepas de arqueas	134
III.2.4. DISCUSIÓN	141
CAPÍTULO 3: DIVERSIDAD PROCARIOTA	149
III.3.1. RESUMEN	151
III.3.2. MATERIAL Y MÉTODOS	153
III.3.2.1. Composición de las comunidades	153
III.3.2.2. Análisis de la diversidad	153
III.3.3. RESULTADOS	159
III.3.3.1. Composición de la comunidad microbiana	159
III.3.3.2. Diversidad microbiana	165
III.3.3.2.1. Diversidad bacteriana	165
III.3.3.2.2. Diversidad de arqueas	167
III.3.4. DISCUSIÓN	171
CAPÍTULO 4: BÚSQUEDA DE SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EN LAS CEPAS BACTERIANAS	175
III.4.1. RESUMEN	177
III.4.2. MATERIAL Y MÉTODOS	179
III.4.2.1. Registro de cepas	179
III.4.2.2. Selección de los medios de cultivo y condiciones de incubación	179
III.4.2.3. Cultivo de las cepas	181
III.4.2.4. Preparación de los extractos	181
III.4.2.5. Ensayo de la actividad antimicrobiana	181
III.4.3. RESULTADOS	191
III.4.3.1. Actividad antibacteriana	193
III.4.3.2. Actividad antifúngica	195
III.4.4. DISCUSIÓN	197
IV. CONCLUSIONES	200
V. BIBLIOGRAFÍA	203

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Géneros del phylum <i>Proteobacteria</i> que contienen especies halófilas.	24
Tabla 2. Géneros del phylum <i>Firmicutes</i> que contienen especies halófilas.	25
Tabla 3. Géneros del phylum <i>Euryarchaeota</i> que contienen especies halófilas.	28
Tabla 4. Compuestos con actividad antibacteriana y antifúngica encontrados durante los años 2007-2008 en cepas de origen marino.	45
Tabla 5. Recuentos de procariotas totales en el Humedal de Ajauque y Rambla Salada.	61
Tabla 6. Procedencia de las cepas seleccionadas para el estudio.	63
Tabla 7. Pruebas fenotípicas seleccionadas para la caracterización de las cepas bacterianas.	80
Tabla 8. Pruebas bioquímicas utilizadas para la caracterización fenotípica de las cepas bacterianas.	89
Tabla 9. Pruebas API 20E e interpretación de los resultados.	90
Tabla 10. Pruebas API 20NE e interpretación de los resultados.	91
Tabla 11. Especies de referencia utilizadas en el estudio taxonómico de las cepas bacterianas.	94
Tabla 12. Pruebas fenotípicas seleccionadas para la caracterización de las cepas de arqueas.	96
Tabla 13. Pruebas bioquímicas utilizadas para la caracterización fenotípica de las cepas de arqueas.	101
Tabla 14. Especies de referencia utilizadas en el estudio taxonómico de las cepas de arqueas.	102
Tabla 15. Oligonucleótidos usados en la amplificación y secuenciación del gen del ARNr 16S en bacterias y arqueas.	105
Tabla 16. Oligonucleótidos usados en la clonación del producto de PCR del gen del ARNr 16S para bacterias y arqueas.	107
Tabla 17. Especies tipo utilizadas como “outgroups”.	109
Tabla 18. Especies de los phyla <i>Actinobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> y <i>Firmicutes</i> identificadas entre las cepas bacterianas aisladas del Humedal de Ajauque y Rambla Salada, según la secuencia parcial del gen del ARNr 16S.	111
Tabla 19. Especies del phylum <i>Proteobacteria</i> identificadas entre las cepas bacterianas aisladas del Humedal de Ajauque y Rambla Salada, según la secuencia parcial del gen del ARNr 16S.	112
Tabla 20. Composición en ácidos grasos de la cepa M3-97.	118
Tabla 21. Características que distinguen la cepa M3-97 de las especies más relacionadas.	119
Tabla 22. Composición en ácidos grasos de la cepa M1-16-X.	123
Tabla 23. Características que distinguen la cepa M1-16-X de las especies relacionadas.	124
Tabla 24. Composición en ácidos grasos de la cepa M4-3M.	128
Tabla 25. Características que distinguen la cepa M4-3M de otras especies relacionadas.	129
Tabla 26. Composición en ácidos grasos de la cepa M1-120.	132
Tabla 27. Características diferenciales entre la cepa M1-120 y <i>Pseudomonas carrageenovora</i> ATCC 43555 ^T .	133
Tabla 28. Asignación taxonómica de las cepas de arqueas aisladas del Humedal de Ajauque y Rambla Salada en base a la secuencia parcial del gen del ARNr 16S.	135

Tabla 29. Características que distinguen la cepa M2-2D de las especies más relacionadas.	138
Tabla 30. Parámetros utilizados en el análisis de la diversidad.	157
Tabla 31. Número de cepas identificadas en cada género según la época de muestreo y la zona estudiada.	160
Tabla 32. Análisis estadístico de la composición de la comunidad bacteriana.	161
Tabla 33. Número de cepas identificadas de cada género según la época de muestreo y la zona estudiada.	163
Tabla 34. Análisis estadístico de la composición de la comunidad de arqueas.	164
Tabla 35. Distribución de OTUs y estimaciones de riqueza de especies bacterianas.	165
Tabla 36. Distribución de OTUs y estimaciones de riqueza de especies de arqueas.	169
Tabla 37. Medios de cultivo utilizados en la búsqueda de sustancias antimicrobianas.	180
Tabla 38. Medios de cultivo empleados y condiciones de incubación.	182
Tabla 39. Antimicrobianos utilizados como controles en los ensayos de determinación de la actividad antimicrobiana.	182
Tabla 40. Preparación de los antimicrobianos.	183
Tabla 41. Cepas bacterianas cuyos extractos mostraron actividad antimicrobiana.	192
Tabla 42. Actividad antibacteriana frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente de los extractos seleccionados.	194
Tabla 43. Actividad antifúngica frente a <i>Aspergillus fumigatus</i> .	196

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol de la vida basado en la secuenciación del gen del ARNr 16S y distribución de algunos de los microorganismos halófilos (Oren, 2008).	22
Figura 2. Ejemplos de hábitats hipersalinos en España.	34
Figura 3. Ejemplos de aguas hipersalinas.	35
Figura 4. Situación geográfica del Humedal de Ajauque y Rambla Salada.	36
Figura 5. Clasificación de los taxones respecto a su abundancia (Pedrós-Alió, 2006).	39
Figura 6. Lugares de muestreo en el Humedal de Ajauque y Rambla Salada.	57
Figura 7. Diversidad colonial encontrada en el recuento de microorganismos.	62
Figura 8. Prueba de la catalasa.	82
Figura 9. Prueba de la oxidasa.	83
Figura 10. Prueba de hemólisis en agar sangre.	83
Figura 11. Prueba de hidrólisis de la esculina.	84
Figura 12. Prueba de hidrólisis de la tirosina.	84
Figura 13. Prueba de hidrólisis de almidón.	84
Figura 14. Prueba de hidrólisis de Tween 20.	85
Figura 15. Prueba de producción de lecitinasa.	85
Figura 16. Producción de ADNasa.	85
Figura 17. Producción de fosfatasa.	86
Figura 18. Prueba de la hidrólisis de la caseína.	86
Figura 19. Prueba de oxido-fermentación de la glucosa.	87
Figura 20. Prueba de reducción de los nitratos	87
Figura 21. Reacción enzimática en la reducción de nitratos y nitritos.	88
Figura 22. Galería API 20E.	90
Figura 23. Turbidez del medio Koser	92
Figura 24. Halos de inhibición	93
Figura 25. Producción de gelatinasa.	98
Figura 26. Prueba de indol.	99
Figura 27. Fermentación ácido-mixta.	99
Figura 28. Fermentación butanodiólica.	100
Figura 29. Producción de ácidos a partir de carbohidratos.	100
Figura 30. Condiciones de amplificación del gen del ARNr 16S.	106
Figura 31. Análisis del gen del ARNr 16S.	106
Figura 32. Dendrograma basado en 76 características fenotípicas, utilizando el coeficiente de Sokal y Michener y la técnica de agrupación UPGMA.	115
Figura 33. Árbol filogenético basado en la secuencia completa del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método Maximum Likelihood.	117
Figura 34. Microfotografía de la cepa M3-97.	118

Figura 35. Árbol filogenético basado en la secuencia completa del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método Maximum Likelihood.	122
Figura 36. Microfotografía de la cepa M1-16-X.	123
Figura 37. Árbol filogenético basado en la secuencia completa del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método Maximum Likelihood.	127
Figura 38. Microfotografía de la cepa M4-3M.	128
Figura 39. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método Máximum Likelihood.	131
Figura 40. Microfotografía de la cepa M1-120.	133
Figura 41. Árbol filogenético basado en la secuencia parcial del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método Máxima Parsimonia.	136
Figura 42. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método Maximum Likelihood.	137
Figura 43. Curvas de acumulación de especies y de rarefacción.	156
Figura 44. Composición de la comunidad bacteriana en el Humedal de Ajauque y Rambla Salada (Murcia) en función del año y de la zona de muestreo (A). Análisis de cluster de la comunidad bacteriana a nivel de género en función de las dos agrupaciones (B).	162
Figura 45. Composición de la comunidad de arqueas en el Humedal de Ajauque y Rambla Salada (Murcia) en función de las épocas del año y las zonas muestreadas (A). Análisis de los cluster de la comunidad de arqueas a nivel de género en función de las dos agrupaciones (B).	164
Figura 46. Curvas de acumulación de especies y de rarefacción de las secuencias del gen del ARNr 16S de las cepas bacterianas aisladas del Humedal de Ajauque y Rambla Salada.	166
Figura 47. Curvas de rarefacción de las secuencias del gen del ARNr 16S de cepas bacterianas en función de las épocas de muestreo (A) y de los hábitats estudiados (B).	167
Figura 48. Curvas de acumulación de especies y de rarefacción de las secuencias del gen del ARNr 16S de cepas de arqueas aisladas del Humedal de Ajauque y Rambla Salada.	168
Figura 49. Formato del programa CTS.	179
Figura 50. Diccionario de Productos Naturales.	179
Figura 51. Posiciones de los viales con los medios de cultivo para cada cepa.	181
Figura 52. Reducción de la resazurina.	184
Figura 53. Distribución de las muestras y los controles en las placas de ensayo.	185
Figura 54. Lectura del cálculo del porcentaje de inhibición en <i>Aspergillus fumigatus</i> .	186
Figura 55. Lectura del cálculo del porcentaje de inhibición en <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i> .	187
Figura 56. Halos de inhibición del crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> .	189

ABREVIATURAS

ACE	Abundance Coverage Estimator
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AMPC	Adenosin Monofosfato cíclico
ARN	Acido Ribonucleico
ARNr	ARN ribosómico
BORM	Boletín Oficial de la Región de Murcia
CTS	Culture Tracking System
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad Óptica
DOTUR	Distance-Based OTU and Richness
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EPS	Exopolisacárido
G+C	Guanina+Citosina
GLC	Gas Liquid Chromatography
HPLC	High-performance Liquid Chromatography
IJSEM	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology
LIC	Lugar de Importancia Comunitaria
MEDINA	Fundación Centro de Excelencia en Investigación de Medicamentos Innovadores en Andalucía
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NRPS	Nonribosomal Peptide Synthetase
NTSYSpc	Numerical Taxonomy System
OTUs	Operational Taxonomic Units
PCR	Polymerase Chain Reaction
PKS	polyketide synthase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SSC	Solución Salina Citrada
T^a	Temperatura
TBE	Tris-Borate-EDTA
T_m	Temperatrua de Desnaturalización
UPGMA	Unweighted Pair Group Mean Average
ZEPA	Zona de Especial Protección para las Aves

COLECCIONES DE CULTIVO

ATCC	American Type Culture Collection
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
DSM (también DSMZ)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
JMC	Japan Collection of Microorganisms
LMG (también BCCM/LMG)	Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms/Division Bacteria Collection

I. INTRODUCCIÓN

I.1. MICROORGANISMOS HALÓFILOS

I.1.1. CONCEPTO

Etimológicamente, el término “halófilo” proviene del griego *hals* (sal) y *phil* (amigo, amor), es decir, “amante o amigo de la sal”. Por lo tanto podemos definir a los microorganismos halófilos como aquellos que requieren ciertas cantidades de sales para crecer (Ventosa y Arahal, 2002a).

I.1.2. CLASIFICACIÓN

La clasificación más aceptada de los microorganismos halófilos se debe a Kushner y Kamekura (Kushner & Kamekura, 1988) quienes dividieron a los microorganismos halófilos en débiles, moderados y extremos de acuerdo a la concentración de NaCl que sustenta el crecimiento óptimo de cada uno de estos tipos:

- No halófilos: su crecimiento óptimo se produce a una concentración de NaCl inferior a 0,2 M (1 %, p/v). Existen microorganismos no halófilos capaces de crecer en medios hasta con 2,5 M de NaCl (15 %, p/v), denominándose halotolerantes.
- Halófilos débiles: su crecimiento óptimo se produce a una concentración de NaCl de entre 0,2 y 0,5 M (1–3 %, p/v). A esta categoría pertenecen las bacterias marinas
- Halófilos moderados: crecen de forma óptima a concentraciones de NaCl comprendidas entre 0,5 y 2,5 M (3–15 %, p/v).
- Halófilos extremos: su crecimiento óptimo se produce a una concentración de NaCl de entre 2,5 y 5 M (15–30 %, p/v).

Cuando Skerman publicó su famosa lista de nombres aprobados de bacterias (Skerman *et al.*, 1980) sólo aparecían una decena de especies halófilas entre las 2500 bacterias que entonces se consideraron. Desde esa época se han descrito cientos de especies de bacterias halófilas, clasificadas dentro de las categorías de débiles, moderadas y extremas.

Las bacterias halófilas moderadas y halófilas extremas son las principales pobladoras de los ambientes hipersalinos, aunque también pueden ser aisladas de otros hábitats. Las primeras son más abundantes a concentraciones salinas intermedias (10–20 %, p/v de NaCl), mientras que las últimas predominan en ambientes con salinidades superiores al 20 % (p/v) de NaCl. Existe un rango salino en el cual coexisten y compiten ambas categorías de

microorganismos (Rodríguez-Valera y col., 1985; Rodríguez-Valera, 1988; Benlloch y col., 2002; Ventosa, 2006).

I.1.3. TAXONOMÍA Y FILOGENIA

Lejos de la ya antigua clasificación de los organismos vivos en cinco reinos, la secuencia del gen del ARNr 16S, utilizada como marcador filogenético, llevó a Carl Woese y colaboradores a proponer una nueva clasificación de los organismos vivos en tres dominios: *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya* (Woese, 1987; Woese y col., 1990), representados en el conocido como “árbol universal de la vida” (Figura 1) y en los que los organismos halófilos están ampliamente distribuidos, aunque sin duda los procariontes son los que incluyen mayor diversidad de microorganismos halófilos y son los más diversos y los mejor estudiados hasta el momento.

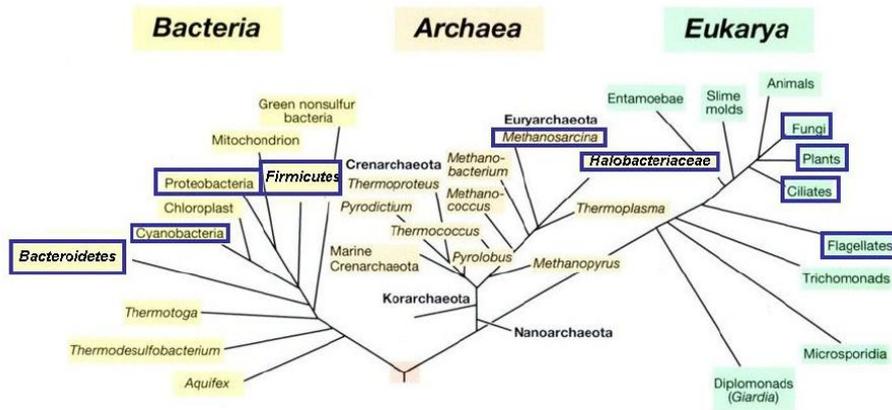


Figura 1. Árbol de la vida basado en la secuenciación del gen del ARNr 16S y distribución de algunos de los microorganismos halófilos (Oren, 2008).

Más adelante se hace una descripción más precisa de los microorganismos halófilos que conocemos en los tres dominios, si bien, podemos adelantar que la mayor representación de estos microorganismos en el Dominio *Archaea* se encuentra dentro del orden *Halobacteriales*, familia *Halobacteriaceae* (Oren, 2006). Por su parte dentro del Dominio *Bacteria*, la familia *Halomonadaceae* (clase *Gammaproteobacteria*, orden *Oceanospirillales*) es la que incluye mayor número de microorganismos halófilos (Arahal y Ventosa, 2006). Los miembros de las familias *Halobacteriaceae* y *Halomonadaceae* son heterótrofos aerobios y mesófilos.

Nuestro conocimiento de la diversidad filogenética y fisiológica dentro de las familias *Halobacteriaceae* y *Halomonadaceae* ha ido en aumento en las últimas décadas gracias a los distintos programas de investigación que se han desarrollado, encaminados al muestreo de distintos ambientes salinos e hipersalinos en diferentes países, y que han llevado a la

caracterización y descripción taxonomica de muchas nuevas especies (Oren, 2008; de la Haba y col., 2011).

I.1.3.1. Microorganismos halófilos del Dominio *Bacteria*

En las Tablas y 1 y 2 se incluyen los órdenes y familias de los phyla *Proteobacteria* y *Firmicutes*, que alojan la mayoría de las bacterias halófilas.

Las bacterias halófilas cultivadas hasta el momento se encuadran esencialmente en las distintas clases de los phyla *Proteobacteria* y *Firmicutes*, aunque también existen algunos representantes en los phyla *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Spirochaetes*, *Bacteroidetes*, *Thermotogae* y *Tenericutes*. 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*).

En los medios acuáticos se han aislado, de forma primordial, especies pertenecientes a los phyla *Cyanobacteria*, *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*, así como miembros de la clase *Clostridia* en sus sedimentos.

Dentro de estos phyla existen grupos taxonómicos que incluyen un elevado número especies halófilas como es el caso de la familia *Halomonadaceae* o del orden *Halanaerobiales*. Por el contrario también existen especies que constituyen casos aislados dentro de un orden u otro taxón de menor rango. También merece la pena señalar que algunos de estos taxa fueron creados exclusivamente para alojar bacterias halófilas y que otros, sin embargo, encierran tanto especies halófilas como no halófilas.

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 phylum *Cyanobacteria* y anoxifotobacterias de las clases *Gammaproteobacteria* y *Alfaproteobacteria*.

Las bacterias quimiotrofas halófilas abarcan proteobacterias (clases *Alfabetaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* y *Epsilonproteobacteria*) con una gran diversidad de tipos morfológicos, fisiológicos y metabólicos.

Tabla 1. Géneros del phylum *Proteobacteria* que contienen especies halófilas.

CLASE	ORDEN	FAMILIA	EJEMPLO
<i>Alfaproteobacteria</i> (33) ^a	<i>Caulobacterales</i>	<i>Hyphomonadaceae</i>	<i>Hyphomonas</i> ^b
	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Rhodovulum</i>
	<i>Rhizobiales</i>	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Dichotomicrobium</i>
		<i>Rhodobiaceae</i>	<i>Rhodobium</i> ^b
	<i>Rhodospirillales</i>	<i>Rhodospirillaceae</i>	<i>Marispirillum</i>
<i>Gammaproteobacteria</i> (51)	<i>Alteromonadales</i>	<i>Alteromonadaceae</i>	<i>Alteromonas</i> ^b
		<i>Idiomarinaceae</i>	<i>Idiomarina</i> ^b
		<i>Pseudoalteromonadaceae</i>	<i>Pseudoalteromonas</i> ^b
		<i>Psychromonadaceae</i>	<i>Psychromonas</i> ^b
	<i>Chromatiales</i>	<i>Chromatiaceae</i>	<i>Halochromatium</i>
		<i>Ectothiorhodospiraceae</i>	<i>Ectothiorhodospira</i> ^b
		<i>Halothiobacillae</i>	<i>Halothiobacillus</i> ^b
	<i>Oceanospirillales</i>	<i>Oceanospirillaceae</i>	<i>Nitrincola</i>
		<i>Alcanivoraceae</i>	<i>Alcanivorax</i> ^b
		<i>Hahellaceae</i>	<i>Halospina</i>
		<i>Halomonadaceae</i>	<i>Halomonas</i> ^b
		<i>Saccharospirillaceae</i>	<i>Saccharospirillum</i> ^b
	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i> ^b
	<i>Salinisphaerales</i>	<i>Salinisphaeraceae</i>	<i>Salinisphaera</i> ^b
	<i>Thiotrichales</i>	<i>Piscirickettsiaceae</i>	<i>Thiomicrospira</i>
<i>Vibrionales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Salinivibrio</i>	
No clasificadas		<i>Methylohalomonas</i>	
<i>Deltaproteobacteria</i> (6)	<i>Desulfobacterales</i>	<i>Desulfobacteraceae</i>	<i>Desulfocella</i>
		<i>Desulfobulbaceae</i>	<i>Desulfurivibrio</i>
	<i>Desulfovibrionales</i>	<i>Desulfohalobiaceae</i>	<i>Desulfohalobium</i> ^b
		<i>Desulfovibrionaceae</i>	<i>Desulfovibrio</i> ^b
<i>Epsilonproteobacteria</i> (3)	<i>Campylobacterales</i>	<i>Campylobacteraceae</i>	<i>Arcobacter</i>
		<i>Helicobacteraceae</i>	<i>Sulfurimonas</i>

^a, número de géneros que incluyen especies halófilas.

^b, género tipo.

Tabla 2. Géneros del phylum *Firmicutes* que contienen especies halófilas.

CLASE	ORDEN	FAMILIA	EJEMPLO
<i>Bacilli</i> (25) ^a	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Halobacillus</i>
		<i>Planococcaceae</i>	<i>Jeotgalibacillus</i>
		<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Salinicoccus</i>
<i>Clostridia</i> (10) ^a	<i>Halanaerobiales</i>	<i>Halanaerobiaceae</i>	<i>Haloanaerobium</i> ^b
		<i>Halobacteroidaceae</i>	<i>Halobacteroides</i> ^b

^a, número de géneros que incluyen especies halófilas.

^b, género tipo.

El género *Halomonas* es sin duda el que aloja más bacterias halófilas. En la actualidad *Halomonas* contiene más de 70 especies (www.bacterio.cict.fr), muchas de las cuales han sido descritas por nuestro grupo de investigación (Euzéby, 2009)(Euzéby, 2009)(Euzéby, 2009) (página web del grupo BIO188: <http://www.ugr.es/~eps/es/index.html>). Las especies de *Halomonas* son bacilos Gram negativos aerobios, quimioheterótrofos y muy versátiles desde el punto de vista ecológico, fisiológico y metabólico, al menos en el laboratorio. Dichas especies han sido aisladas de ambientes muy diversos, desde alimentos a pinturas murales, pasando por los distintos hábitats salinos que existen en la naturaleza.

Por último, y en lo que a los medios acuáticos se refiere, tenemos que hacer una mención especial de *Salinibacter*, un bacteroidete. *Salinibacter ruber* es una bacteria halófila extrema aunque su pariente más próximo es *Rhodothermus marinus*, un microorganismo termófilo del mar. Ambos constituyen una rama muy antigua del phylum y próxima al nodo de bifurcación que constituye el superphylum que incluye a los *Bacteroidetes* y a los *Chlorobi*.

Salinibacter comparte hábitats en los cristalizadores de las salinas con las arqueas halófilas y de hecho también coincide con ellas en muchas de sus características más significativas. Así por ejemplo este microorganismo halófilo extremo tiene metabolismo quimioheterótrofo y es aerobio; sus colonias son pigmentadas de rojo; crece de forma óptima a temperaturas bastante altas; acumula potasio en su citoplasma, y posee en sus membranas xanthorodopsina, una bomba de protones asociada al retinal con un pigmento antena carotenoide. Por sus semejanzas con las arqueas halófilas, la presencia y abundancia de *Salinibacter* en los cristalizadores de las salinas no se conoció hasta finales de los 90 usando técnicas moleculares. Posteriormente se logró su cultivo y en el año 2002 se describió formalmente en el IJSEM (Anton y col., 2002). Actualmente sabemos que *Salinibacter* no sólo representa del 5-30% de la población procariota de los cristalizadores, sino que es un microorganismo diverso y bastante ubicuo. Así, constituye una fracción importante de la microbiota de las salinas de nuestro país, Israel y Turquía. También está presente en las

salinas de Maras en Perú aunque de una forma menos significativa; en estas últimas destaca *Salicola*, otra bacteria halófila extrema (Kharroub y col., 2006; Maturrano y col., 2006).

En relación con las bacterias halófilas que habitan los sedimentos y suelos salinos son básicamente *Firmicutes*, tanto de la clase *Bacilli* como de la clase *Clostridia*, y algunas *Actinobacteria* y *Proteobacteria*. Nuestro grupo de investigación fue pionero en los estudios de los suelos salinos a principio de los años ochenta (Quesada y col., 1982; Quesada y col., 1983). En los suelos salinos se encuentran miembros de la clase *Bacilli*, sobre todo especies halófilas pertenecientes a *Bacillus*, *Gracilibacillus* y *Halobacillus*. Además también se aíslan del suelo algunos representantes de los géneros *Actinospolyspora*, *Nocardiopsis* y *Halomonas*, entre otros. De hecho aunque el suelo es menos diverso en *Proteobacteria* que en *Bacilli*, las *Gammaproteobacteria* podrían ser igual de abundantes que ellos.

En los sedimentos de las aguas salinas e hipersalinas existe una mayor diversidad. Así en la clase *Bacilli* se han descrito especies de una docena de géneros aunque el más abundante y diverso es *Halobacillus* que también se aísla del suelo. De la clase *Clostridia* se encuentran especies de *Halanaerobium* y *Halobacteroides*, entre otras bacterias. Finalmente también se han aislado en los sedimentos de los medios acuáticos algunas *Deltaproteobacteria* sulfatoreductoras, *Actinobacteria* y *Gammaproteobacteria*.

Aunque como puede observarse coexisten en los suelos y en los sedimentos una gran variedad de especies halófilas, estos ambientes son los hermanos pobres de los hábitats salinos en lo que a estudios ecológicos se refiere; por lo tanto aún no conocemos el papel que estos microorganismos realizan en ellos. Las razones son obvias pues el análisis de cualquier suelo es mucho más complejo que el de los medios acuáticos salinos.

Para una revisión más extensa a cerca de los microorganismos halófilos del Dominio *Bacteria* se pueden consultar los artículos publicados por (de la Haba y col., 2011; Dworkin y col., 2007; Garrity col., 2005; Oren y col., 2002).

I.1.3.2. Microorganismos halófilos del Dominio *Archaea*

Arqueas y bacterias están ampliamente distribuidas pero, en la mayoría de los ambientes, las arqueas están en menor proporción que las bacterias; sin embargo esta visión puede cambiar cuando se estudien otros ambientes, tales como los plancton marinos, en los que no se han hecho este tipo de estudios aún, por no considerarse éstos ambientes típicos de arqueas (Ventosa, 2006).

Los costes energéticos de los procesos metabólicos llevados a cabo por las arqueas, al menos en algunos entornos, puede ser tan grande que la diversificación filogenética sea más limitada en comparación con las bacterias (Oren, 1999). Pero las arqueas pueden dominar la

microbiota presente total en algunos ambientes tales como zonas con altas temperaturas y altos pH (Hugenholtz y col., 1998) o las aguas del Mar Muerto (DeLong y col., 1994).

En la Tabla 3 se incluyen los órdenes y familias del phylum *Euryarchaeota* que aloja la mayoría de las arqueas halófilas.

Las arqueas halófilas cultivadas hasta el presente pertenecen al phylum *Euryarchaeota*. Éstas incluyen las arqueas halófilas extremas aerobias o haloarqueas que quedan agrupadas en el orden *Halobacteriales* (Grant y Larsen, 1989), con una sola familia, *Halobacteriaceae* (Gibbons, 1974; Tindall, 1992) que hoy en día agrupa más de 100 especies clasificadas en una treintena de géneros, de entre los cuales, los más representativos son *Halobacterium*, *Halococcus*, *Haloarcula*, *Haloferax*, *Natronococcus* y *Natronobacterium*.

La familia *Halobacteriaceae* incluye cocos, bacilos, y multitud de formas pleomórficas como las triangulares y cuadradas. Requieren al menos un 1,5 M de NaCl, y las colonias de la mayoría de las cepas tienen colores rojizos debido a la presencia de carotenoides C₅₀ (bacteriorrubrina) que proporcionan dichas tonalidades a las aguas que habitan. Son quimioorganotrofos, capaces de usar carbohidratos como fuente de carbono y energía o aminoácidos como única fuente de carbono, nitrógeno y energía (Grant y col., 2001). Algunos de estos microorganismos contienen un pigmento derivado del retinal, denominado bacteriorodopsina, capaz de producir movimientos de iones a través de la membrana celular por acción de la luz, o funcionar como fotosensores (Oren, 1999). La segunda edición del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Grant y col., 2001) incluye una extensa descripción de la misma. Algunos de sus miembros no solo requieren específicamente cloruro sódico sino que exigen un medio alcalino y se denominan haloalcalófilos.

Tabla 3. Géneros del phylum *Euryarchaeota* que contienen especies halófilas.

CLASE	ORDEN	FAMILIA	GENERO
			<i>Haladaptatus</i>
			<i>Halalkalicoccus</i>
			<i>Halarchaeum</i>
			<i>Haloarcula</i>
			<i>Halobacterium</i> ^a
			<i>Halobaculum</i>
			<i>Halobiforma</i>
			<i>Halococcus</i>
			<i>Haloferax</i>
			<i>Halogeometricum</i>
			<i>Halogranum</i>
			<i>Halomarina</i>
			<i>Halomicrobium</i>
			<i>Halonotius</i>
			<i>Halopelagius</i>
			<i>Halopiger</i>
<i>Halobacteria</i>	<i>Halobacteriales</i>	<i>Halobacteriaceae</i>	<i>Haloplanus</i>
			<i>Haloquadratum</i>
			<i>Halorhabdus</i>
			<i>Halorubrum</i>
			<i>Halosarcina</i>
			<i>Halosimplex</i>
			<i>Halostagnicola</i>
			<i>Haloterrigena</i>
			<i>Halovivax</i>
			<i>Natrialba</i>
			<i>Natrinema</i>
			<i>Natronoarchaeum</i>
			<i>Natronobacterium</i>
			<i>Natronococcus</i>
			<i>Natronolimnobius</i>
			<i>Natronomonas</i>
			<i>Natronorubrum</i>

Tabla 3. Continuación.

CLASE	ORDEN	FAMILIA	GENERO
<i>Methanomicrobia</i>	<i>Methanosarciales</i>	<i>Methanosarcinaceae</i>	<i>Methanohalobium</i>
			<i>Methanohalophilus</i>
			<i>Methanosalsum</i>
	<i>Methanomicrobiales</i>	No clasificada	<i>Methanocalculus</i>

^a, género tipo

También son halófilas algunas arqueas metanógenas que habitan en los medios hipersalinos y que incluyen especies halófilas extremas y moderadas pertenecientes a los géneros *Methanohalobium* (Zhilina y Zavarzin, 1987), *Methanosalsum* (Boone y Baker, 2001) y *Methnaohalophilus* (Paterek y Smith, 1988), incluidas en la familia *Methanosarcinaceae*, dentro del orden *Methanosarciales*. Estas arqueas son anaerobias estrictas y productoras de metano (Balch y col., 1979). Además, la especie *Methanocalculus halotolerans* (Ollivier y col., 1998) ha sido descrita como una arquea metanógena halotolerante y aunque pertenece al orden *Methanomicrobiales*, no ha sido asignada a ninguna familia por lo que, hasta el momento, se considera *incertae sedis* dentro de este orden.

Clásicamente se ha considerado que las arqueas eran procariotas halófilos extremos (Kushner & Kamekura, 1988), de hecho, se caracterizan por requerir un mínimo del 1,5M de NaCl para crecer siendo el óptimo del 3,5 al 4,5 M de NaCl, incluso muchas son capaces de crecer a concentraciones saturadas de NaCl (5.2 M). Sin embargo, en los últimos años, se están describiendo arqueas halófilas con menores requerimientos salinos y que habitan en medios de baja salinidad (Purdy col., 2004). Además, las secuencias ambientales acumuladas han hecho evidente que las arqueas son un grupo cosmopolita que no se limita a ambientes extremos (Aller, 2008); así encontramos representantes en aguas del océano (DeLong, 2005), sedimentos del océano (Cambon-Bonavita y col., 2009), lagos de agua de mar (Keough y col., 2003), suelos (Ochsenreiter y col., 2003), raíces de plantas (Simon y col., 2000), acuíferos contaminados con petróleo (Kleikemper y col., 2005) y un largo etcétera. Y es que las arqueas son muy diversas tanto filogenéticamente (Fuhrman y col., 1993; Elshahed y col., 2004; Mills y col., 2003) como fisiológicamente (Ouverney y Fuhrman, 2000; Wuchter y col., 2003; Robertson y col., 2005)

Para una revisión más extensa a cerca de los microorganismos halófilos del Dominio *Archaea* se pueden consultar los artículos publicados por (de la Haba y col., 2011; Dworkin y col., 2007; Garrity y col., 2005; Oren, 2002).

I.1.3.3. Microorganismos halófilos del Dominio *Eukarya*

Los primeros halófilos que se descubrieron fueron las algas, posiblemente debido a su mayor tamaño. En 1833 Darwin hizo una descripción asombrosa de los colores de un lago salado y explicó a que se debían éstos, durante su expedición en el HMS Beagle, cuando visitó el área de la desembocadura del Río Negro, en la ciudad El Carmen, en la Patagonia, en agosto de 1833. Así escribió:

One day I rode to a large salt-lake, or Salina, which is distant fifteen miles from the town. During the winter it consists of a shallow lake of brine, which in summer is converted into a field of snow-white salt. The layer near the margin is from four to five inches thick, but towards the centre its thickness increases. This lake was two and a half miles long, and one broad. Others occur in the neighbourhood many times larger, and with a floor of salt, two and three feet in thickness, even when under water during the winter. One of these brilliantly white and level expanses in the midst of the brown and desolate plain offers an extraordinary spectacle. A large quantity of salt is annually drawn from the salina: and great piles, some hundred tons in weight, were lying ready for exportation. The season for working the salinas forms the harvest of Patagones; for on it the prosperity of the place depends. Nearly the whole population encamps on the bank of the river and the people are employed in drawing out the salt in bullock-waggon. This salt is crystallized in great cubes, and is remarkably pure: Mr. Trenham Reeks has kindly analyzed some for me, and he finds in it only 0.26 of gypsum and 0.22 of earthy matter. It is a singular fact that it does not serve so well for preserving meat as sea-salt from the Cape de Verd islands; and a merchant at Buenos Ayres told me that he considered it as fifty per cent. less valuable. Hence the Cape de Verd salt is constantly imported, and is mixed with that from these salinas.

The border of this lake is formed of mud: and in this numerous large crystals of gypsum, some of which are three inches long, lie embedded; whilst on the surface others of sulphate of soda lie scattered about. The Gauchos call the former the "Padre del sal," and the latter the "Madre;" they state that these progenitive salts always occur on the borders of the salinas, when the water begins to evaporate. The mud is black, and has a fetid odour. I could not at first imagine the cause of this, but I afterwards perceived that the froth which the wind drifted on shore was coloured green, as if by confervae; I attempted to carry home some of this green matter, but from an accident failed. Parts of the lake seen from a short distance appeared of a reddish colour, and this perhaps was owing to some infusorial animalcula. The mud in many places was thrown up by numbers of some kind of worm, or annelidous animal. How surprising it is that any creatures should be able to exist in brine, and that they should be crawling among crystals of sulphate of soda and lime! And what becomes of these worms when, during the long summer, the surface is hardened into a solid layer of salt? Flamingoes in considerable numbers inhabit this lake, and breed here, throughout Patagonia, in Northern Chile, and at the Galapagos Islands, I met with these birds wherever there were lakes of brine. I saw them here wading about in search of food probably for the worms which burrow in the mud; and these latter probably feed on infusoria or confervae. Thus we have a little living world within itself adapted to these inland lakes of brine.

Dentro de los microorganismos eucariotas existen halófilos entre las algas, los protistas y los hongos. En la bibliografía podemos encontrar un número reducido de publicaciones sobre la diversidad de estos microorganismos en los ambientes hipersalinos

(Feazel y col., 2008; Gunde-Cimerman y col., 2004; Gunde-Cimerman y col., 2005a; Gunde-Cimerman y col., 2005b; Javor, 1989; Pedrós-Alió, 2004; Rodríguez-Valera, 1988; Wu y col., 2009).

Algas y protistas

En las algas tenemos representantes de diatomeas y de algas verdes. Las diatomeas halófilas son algunas especies de *Amphora*, *Nitzschia* y *Entomoneis*. Estas algas crecen óptimamente al 7,5 % (p/v) de sal y toleran hasta el 15 % (p/v).

Respecto a las algas verdes, en el año 2000 se aisló *Picocystis salinarum*, en las salinas de San Francisco (California, USA) y posteriormente se ha encontrado en otros lagos salinos (Lewin y col., 2000).

Asteromonas gracilis es otra alga verde eurihalina (crece desde el 0,5 %, p/v de sal hasta la saturación) y en ella se está investigando su osmoregulación (Ben-Amotz y Grunwald, 1981).

Pero sin duda el representante halófilo de las algas verdes más importante, por su abundancia y aplicaciones tecnológicas, es *Dunaliella*, incluida entre las *Chlorophyceae*. *Dunaliella* es conocida desde el siglo XIX. Dunal (1838) la describió como un organismo unicelular rojo al que llamó *Haematococcus salinus*, habitante común de los medios hipersalinos. Los antiguos consideraban que el color rojo de las salinas se debía a causas físico-químicas pero gracias a los estudios de Dunal se atribuyó a esta alga y a las artemias que la consumían. Hoy sabemos que esto es así hasta cierto punto pues, como hemos comentado, también los procariontes contribuyen a dicha coloración.

En 1905 Hamburger y Teodoresco describieron detalladamente el alga de forma independiente, que finalmente fue llamada *Dunaliella*; estudiaron sus pigmentos fotosintéticos y carotenoides rojo-anaranjados (Hamburger, 1905; Teodoresco, 1905).

Actualmente existe un grupo con sede en México y California que está trabajado bastante con este microorganismo (Olmos 2000; Olmos-Soto y col., 2002). En cuanto a las publicaciones sobre *Dunaliella* también merece la pena destacar la revisión que hizo Oren en 2005 (Oren, 2005).

De *Dunaliella* se conocen diferentes tipos desde antiguo. Sin embargo se han realizado pocos estudios taxonómicos y filogenéticos y el análisis de su ARNr 18S no se hizo con dicho fin hasta hace relativamente poco años. Actualmente se consideran numerosas especies: *D. salina*, *D. bardawil*, *D. viridis*, *D. parva*, *D. tertioleta*, entre otras (Teodoresco, 1905; 1906; Nicolai y Baas Becking, 1925; Lerche, 1937; Butcher, 1959).

Con el estudio de Liska y colaboradores (Liska y col., 2004) se inició la proteómica de *Dunaliella*. En el mismo se analizó el patrón de proteínas que se sintetizan a baja y alta concentración de sal, hallándose que existen 76 enzimas que se inducen por la sal. Son enzimas implicadas en el ciclo de Calvin, en la hidrólisis del almidón, transportadoras de sodio, y factores que regulan la biosíntesis y degradación de proteínas.

Las algas son los principales productores primarios en los medios hipersalinos, al menos hasta el 15 % (p/v) de sales; tienen una importante contribución a la biomasa del sistema y son una fuente de glicerol para otros microorganismos halófilos pues acumulan este compuesto como soluto compatible para su osmoregulación.

También existen algunos protistas en los ambientes salinos que pueden tolerar concentraciones más altas que las algas (desde 15 %, p/v hasta la saturación). Se han descrito especies halófilas en los ciliados como *Trachelocerca*, *Metacystis* y *Chilophyria*; en zooflagelados como *Monosiga*, *Rhynchomonas* y *Phyllominus*; y en los sarcodina como *Heteromoeba* y *Naegleria*, entre otros.

Estos protistas se alimentan de bacterias, algas y otros protozoos por lo que juegan un papel importante en los medios ambientes controlando la población de los otros microorganismos halófilos.

Hongos filamentosos y levaduras

Respecto a los hongos, existen muy pocos estudios respecto a los que habitan los medios hipersalinos acuáticos. Como es sabido existen bastantes especies que toleran la sal pero muy pocos halófilos y hasta hace poco tiempo se pensaba que eran sólo habitantes temporales de los hábitats salinos que habían sido transportados hasta allí a través del aire. Hoy en día se cree que deben contribuir significativamente a la biota de los ecosistemas hipersalinos (Buchan y col., 2003; Cantrell y col., 2006; Cantrell y Baez-Félix, 2010; Gunde-Cimerman y col., 2004).

El equipo de Gunde-Cimerman ha aislado varias especies de hongos halófilos que están estudiando en profundidad: *Trimmatostroma salinum*, *Hortaea werneckii*, *Phaeothea triangularis* y *Cladosporium sphaerospermum*, entre otros (Butinar y col., 2005; Gunde-Cimerman y col., 2000; Zalar y col., 1999). Trabajan en una salina del Adriático en Eslovenia. *Hortaea werneckii* produce una tiña negra humana; este microorganismo es capaz de crecer a concentraciones próximas a la saturación y acumula como soluto compatible glicerol y otros polioles. Actualmente sus descubridores investigan su osmoregulación y otros autores han publicado algunos trabajos sobre aislados clínicos.

Un equipo en el que participa Aharon Oren, famoso experto en el campo del halofilismo, también ha realizado algunos estudios sobre hongos aislados del Mar Muerto,

describiendo la especie *Gymnascella marismortui* (Buchalo y col., 1998; Buchalo y col., 1999; Buchalo y col., 2000; Kis-Papo y col., 2003).

Platas y otros autores describieron una nueva especie de ascomiceto, *Monosporascus ibericus*, de plantas que crecían en los suelos salinos del Delta del Ebro. (Collado y col., 2002).

Feazel y sus colaboradores (Feazel y col., 2008) han descrito, usando primers universales para el gen del ARNr 18S, que algunos clones detectados en un tapete microbiano de una salina de Guerrero Negro (México) podían ser asignados a la especie *Metschnikowia bicuspidata* (*Saccharomycotina*).

Finalmente el grupo de investigación formado por Sharon Cantrell y sus colaboradores, combina las técnicas moleculares con las técnicas clásicas de cultivo para la descripción de los hongos en ambiente salinos. Estos investigadores han analizado los hongos de una salina de Cabo Rojo, en la costa sudeste de Puerto Rico, obteniendo numerosos aislados de hongos halotolerantes y halófilos pertenecientes a 36 especies en las muestras tomadas de los estanques y a 26 especies en las muestras de los tapetes salinos, siendo ésta la primera vez que se describe la presencia de hongos en tapetes microbianos (Cantrell y col., 2006). Entre los géneros donde se han aislado especies halófilas moderadas o débiles destaca *Aspergillus*, seguido de *Cladosporium* y *Penicillium*; otros taxa menos abundantes son *Chaetomium*, *Curvularia*, *Dreschlera*, *Graphium*, *Humicola*, y *Myrothecium*. También han publicado la descripción de una nueva especie de *Pericornia*, *P. variicolor* (Cantrell y col., 2007). En su última publicación en este área (Cantrell y Baez-Félix, 2010) señala el hallazgo de secuencias correspondientes a clones de hongos de los que no existen cepas cultivables.

I.2. HÁBITATS HIPERSALINOS

Los hábitats hipersalinos son ambientes extremos que se caracterizan por presentar una elevada concentración de sal así como valores límites de uno o varios parámetros tales como la temperatura, el pH, la radiación solar, la concentración de nutrientes, la presión de oxígeno, la presencia de metales pesados y los compuestos tóxicos (Rodríguez-Valera, 1998).

Estos hábitats están distribuidos por todo el planeta y son bastante abundantes en nuestro país, reflejo de ello son las numerosas salinas litorales en todas las provincias con costa, como son las salinas de Santa Pola (Alicante), Cabo de Gata (Almería), Isla Cristina (Huelva), así como otras interiores que se alimentan de manantiales salinos, como las salinas Espartinas (Madrid) y las salinas de la Malahá (Granada). Otras representaciones son las lagunas saladas como la de Fuente de Piedra (Antequera, Málaga), los suelos salinos como

los de Vera (Almería) y los numerosos humedales y marismas como el Humedal de Ajauque y Rambla Salada (Murcia) del que hablaremos más adelante. Muchos de estos ambientes son espacios protegidos de gran valor ecológico que alojan una diversidad biológica de máximo interés (Figura 2).

Los ambientes hipersalinos están representados principalmente por los sistemas acuáticos y los suelos hipersalinos (Ventosa y col., 2008), aunque también se engloban en esta categoría las minas de sal, algunas plantas del desierto, salmueras próximas a los yacimientos petrolíferos y una gran variedad de productos en salmuera o salazón (Grant y col., 1998, Ventosa, 2006).

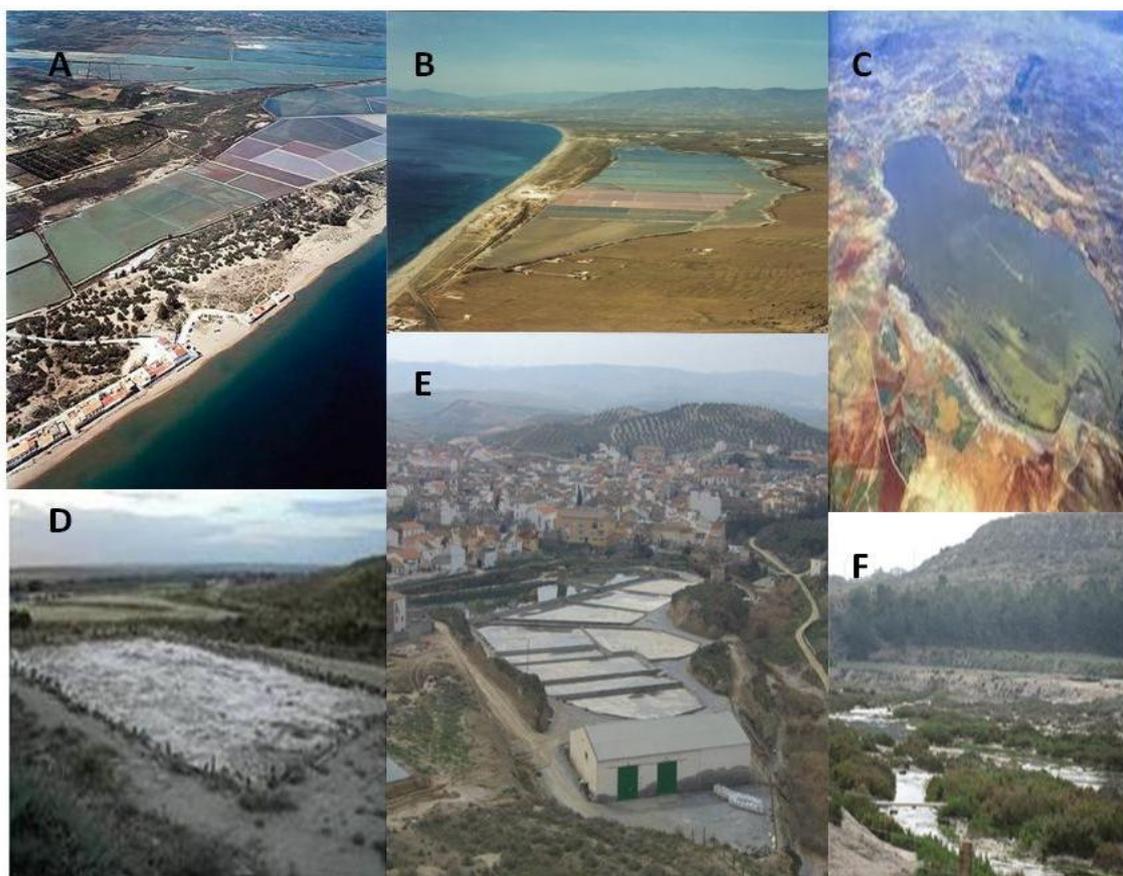


Figura 2. Ejemplos de hábitats hipersalinos en España.

A, Salinas de Santa Pola (Alicante); B, Salinas de Cabo de Gata (Almería); C, Laguna salada de Fuente de Piedra (Málaga); D, Salinas Espartinas (Madrid); E, Salinas de La Malahá (Granada); F, Humedal de Ajauque y Rambla Salada (Murcia).

Se consideran aguas hipersalinas aquellas que tienen un contenido en sales superior al agua del mar (aproximadamente el 3,5 %, p/v) y constituyen el 0,008 % de los sistemas acuáticos (Williams, 1996). Así, las aguas hipersalinas se clasifican en talasosalinas y atalasalinas según su composición de sales sea cualitativamente similar a la de los océanos o sea diferente (Rodríguez-Valera, 1988). Las aguas talasosalinas tienen un origen marino por lo que las cantidades relativas de sus distintas sales inorgánicas son aproximadamente iguales a las del agua del mar; los iones principales presentes en dichas sales son cloruro y sodio y en menor proporción magnesio, sulfato, potasio, calcio, bromuro y fluoruro (Ventosa y Arahál, 2002b). Ejemplos típicos de sistemas de aguas talasosalinas son entre otros, las salinas solares y el Gran Lago Salado (Utah, EEUU) procedente de la disolución de sales de roca pero con una composición relativa de sales similar a la del agua del mar (Post, 1977; Rodríguez-Valera, 1993). Por otro lado, las aguas atalasalinas se producen en gran parte por la disolución de depósitos minerales de origen continental; la proporción de sales es distinta a la del agua del mar con un predominio de los iones calcio y magnesio (Brock, 1979; Rodríguez-Valera y Ruiz-Berraquero, 1983; Rodríguez-Valera, 1993). El Mar Muerto, lagos hipersalinos de la Antártida y los lagos de Wadi Natrun en Egipto son ejemplos de estas aguas atalasalinas (Figura 3).



Figura 3. Ejemplos de aguas hipersalinas.

A, Gran Lago Salado (aguas talasosalinas); B, Mar Muerto (aguas atalasalinas).

Respecto a los suelos salinos, son aquellos que contienen más de un 0,2 % (p/v) de sales (Kaurichev, 1980). A diferencia de los ambientes anteriores, los suelos hipersalinos no están bien definidos, por lo que no hay, de momento, ninguna clasificación más específica. Estos suelos, están ampliamente distribuidos en nuestro planeta, particularmente en regiones áridas o semiáridas. La microbiota representante de los suelos salinos forma comunidades complejas que son reflejo de las interacciones entre factores físicos y químicos del suelo (textura, contenido en nutrientes y materia orgánica, pH, etc) y factores ambientales tales como el clima y la vegetación (Martínez-Alonso y col., 2010; Buckley y col., 2003).

I.2.1. HUMEDAL DE AJAUQUE Y RAMBLA SALADA

El Humedal de Ajauque y Rambla Salada es un hábitat de gran valor ecológico, reconocido como Paisaje Protegido por la Ley 4/1992 de Ordenación y Protección del Territorio de la Región de Murcia. En el año 2000 fue declarado Zona de Especial Protección para las Aves (ZEPA, ES0000195) por la importante colonia cigüeñuela. El área se ha designado como Lugar de Importancia Comunitaria (LIC, ES6140005) en el que se han inventariado seis hábitats naturales de interés. El Embalse de Santomera, localizado en esta zona, se ha declarado Área de Protección para la Fauna por la legislación regional, debido a la importante cantidad de aves acuáticas que aquí invernan y anidan.

El Humedal de Ajauque y Rambla Salada se encuentra situado en la zona nororiental de la Región de Murcia. Tiene una extensión de 1.632 hectáreas que pertenecen a los municipios de Abanilla, Fortuna, Santomera y Molina de Segura (Figura 4).

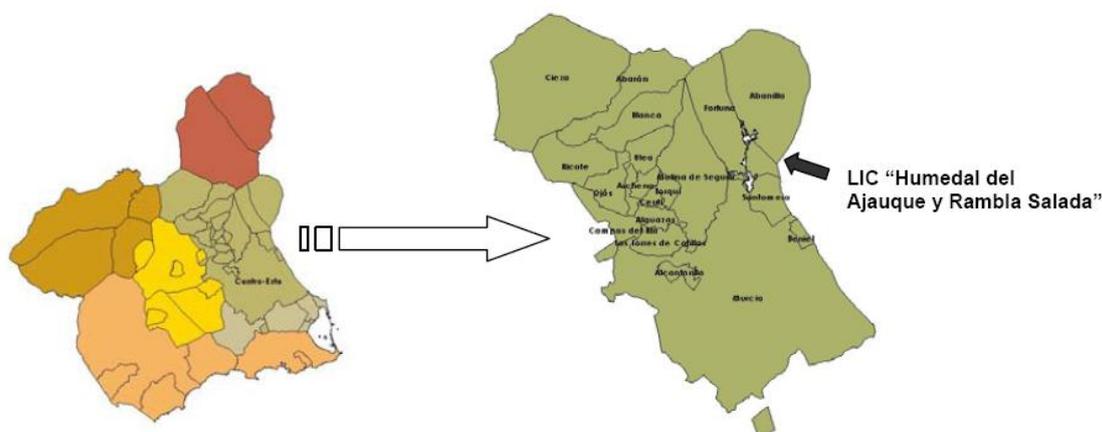


Figura 4. Situación geográfica del Humedal de Ajauque y Rambla Salada.
Imagen tomada de la Dirección General de Patrimonio Natural y Biodiversidad de la Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia

Este humedal nace en Los Baños de Fortuna, lugar conocido como Rambla de las Contiendas. Bajo unas condiciones de sequía extrema, gran irregularidad interanual en las precipitaciones y ocasionales lluvias torrenciales, el Humedal de Ajauque y Rambla Salada se asienta sobre materiales sedimentarios blandos que favorecen la presencia de fenómenos de erosión muy peculiares en algunos casos, con paisajes geomorfológicos de gran valor natural formados por numerosas galerías.

Destacan también las formaciones geológicas de gran interés como son los afloramientos volcánicos de fortunitas en los Cabecicos Negros de Fortuna, cuyo interés de conservación se remonta al año 1917. Importante es también el yacimiento geotérmico, que da origen a las aguas termales en los Baños de Fortuna.

Este Paisaje Protegido es considerado un tipo de humedal asociado a ramblas, que presenta una compleja red de drenaje con tramos de aguas permanentes y temporales y una gran variedad en los valores de salinidad del agua, como consecuencia del sustrato geológico-litológico.

La flora y la fauna en este lugar son un tanto singulares y en muchos casos endémicas. En los tramos de aguas permanentes, las condiciones de salinidad limitan en gran medida la presencia de vegetación acuática sumergida, representada por diversas algas y la planta *Ruppia marítima*. Enraizadas en el agua, pero emergiendo (plantas helófitas), destacan por su abundancia y densidad los carrizales. Su distribución se asocia a zonas de descarga de aguas dulces subterráneas. Conforme las fluctuaciones de las aguas son mayores, las comunidades vegetales se entremezclan siendo frecuente que junto a los carrizales aparezcan juncos. En zonas encharcables y salinas aparecen diferentes especies de saladar, como *Anthrocnemum macrostachyum* y *Sarcocornia fruticosa*, que junto con los tarajes (*Tamarix canariensis* y *Tamarix boveana*) constituyen la vegetación más característica de los humedales asociados a ramblas. En zonas más altas y alejadas del agua destaca la presencia de otras especies vegetales halófilas como *Anabasis hispanica* y *Limonium* spp. o “siemprevivas”. Esta zona cuenta además con comunidades muy singulares como especies gipsícolas, matorrales termófilos e incluso la presencia de elementos en el paisaje de gran valor cultural como es la palmera datilera.

La fauna presente en este espacio natural es muy rica y variada. El inventario faunístico lo constituyen 145 especies de aves, 18 especies de mamíferos, 14 especies de reptiles y 3 especies de anfibios. El embalse de Santomera y las zonas encharcadas de Rambla Salada y Ajauque acogen poblaciones de aves acuáticas como *Anas platyrhynchos* (anade real) y *Ardea cinerea* (garza real europea), las cuales permanecen todo el año; otros son nidificantes habituales como *Charadrius alexandrinus* (chorlitejo patinegro) y *Himantopus himantopus* (cigüeñuela); otras especies aparecen en los meses de otoño e invierno, procedentes de zonas más frías, como *Podiceps nigricollis* (zampullín cuellinegro), etc. Los anfibios que habitan son del tipo de la rana común (*Pelophylax perezi*) y peces como *Gambusia* spp. y *Carassius* spp.

Como ya hemos mencionado este hábitat se caracteriza por presentar grandes cambios estacionales, como ocurre en las zonas del mediterráneo, con la consecuente afectación de los productores primarios ya que la luz es la fuente de energía principal y la temperatura es el mayor regulador de los procesos metabólicos. De los trabajos realizados por el grupo de investigación de Ecología Acuática (E-065-06) de la Universidad de Murcia, se desprende que Rambla Salada es un ecosistema afectado principalmente por las condiciones climáticas que reflejan el patrón típico de la zona del Mediterráneo. Por otro lado, la influencia antropogénica está provocando modificaciones de la concentración de salinidad por la entrada de agua dulce procedente de la desviación de canales de agua para

regadío. Este hecho modifica el funcionamiento de este ecosistema, así por ejemplo hay constancia de que ha disminuido la biomasa de algas epipélicas y aumentado *Cladosphora glomerata*; estos cambios podrían dar lugar a un aumento de los productores primarios con el consiguiente aumento de la biomasa de macroinvertebrados. (Velasco y col., 2003; 2006; Gutierrez-Cánovas y col., 2009).

Una información más exhaustiva acerca de este Paisaje Protegido puede obtenerse de la Dirección General de Patrimonio Natural y Biodiversidad, Consejería de Agricultura y Agua, de la Región de Murcia (<http://www.murcianatural.carm.es>).

I.3. DIVERSIDAD MICROBIANA

Edward O. Wilson, reputado entomólogo norteamericano, pronunciaba por primera vez la palabra “biodiversidad” en 1986 para referirse a la variedad de formas vivas existentes en la Tierra. El estudio de la diversidad procariota es objeto de muchas investigaciones por parte de distintas ramas de la ciencia y esto es así porque la diversidad no conocida oculta una información trascendental sobre especies desconocidas hasta la fecha, con el consecuente desconocimiento de los metabolismos existentes que nos ayuden a entender la evolución (Pedrós-Alió, 2006). Actualmente este término es sinónimo de la riqueza natural de cualquier área.

Dada la importancia del estudio de la biodiversidad, hoy en día se están realizando numerosas investigaciones encaminadas a analizar la presencia de determinadas especies en diferentes entornos. Esto permitirá obtener conclusiones sobre cómo las características del medio ambiente y las propiedades específicas de las especies influyen en los patrones de distribución microbiana (Tamames, 2010).

Los análisis de distribución de abundancia de especies indican que la diversidad se divide en dos grandes grupos; el primero incluye a pocas especies que son muy abundantes, y que fácilmente son detectadas con la mayoría de las técnicas moleculares, por lo que se cree que son las más activas e importantes en los flujos de materia orgánica (Cottrell y Kirchman, 2003); sin embargo, estas especies abundantes representan sólo una pequeña porción de la diversidad microbiana total (Galand y col., 2009). El segundo grupo, llamado “biosfera rara” (Sogin, 2006), comprende a un alto número de especies raras que contiene la mayoría de la diversidad y que son poco abundantes (Pedrós-Alió, 2006) (Figura 5).

Aunque se cree que los grupos taxonómicos abundantes están bien adaptados a su medio ambiente y contribuyen más a la producción de biomasa (Cottrell y Kirchman, 2003; Zhang y col., 2006), algunas especies raras son muy importantes para los ciclos biogeoquímicos globales (Galand, 2009), de donde se desprende la necesidad de intentar cultivar este grupo de microorganismos.

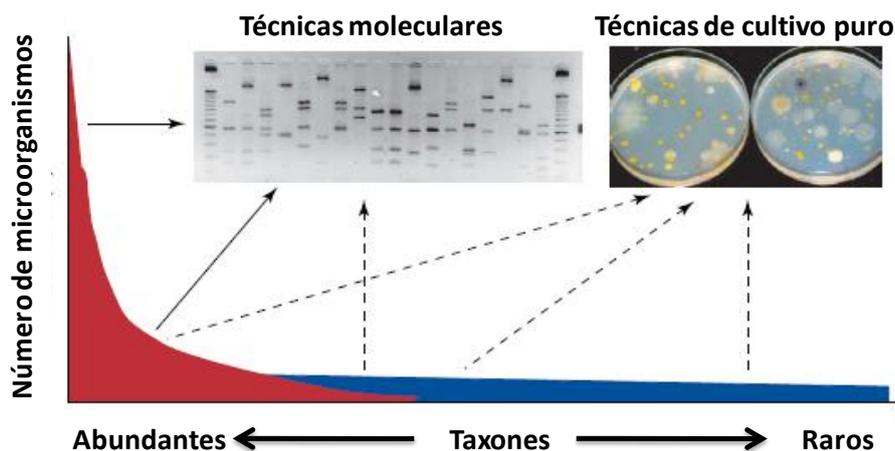


Figura 5. Clasificación de los taxones respecto a su abundancia (Pedrós-Alió, 2006).

La diversidad y los patrones de distribución de las especies se conoce bastante bien en macroinvertebrados, pero no están claros en los microorganismos (Tamames, 2010). Algunas de las tendencias ecológicas que ya se han observado en aquéllos, como la existencia de patrones biogeográficos, han sido propuestas también en los microorganismos, lo que indicaría la existencia de normas comunes o globales que rigen la ecología de todas las formas de vida (Horner-Devine y col., 2004, Cho y Tiedje, 2000; Whitaker y col., 2003; Martiny y col., 2006; Pommier y col., 2007). Sin embargo, algunos análisis indican la ubicuidad de determinadas especies procariotas (Finlay, 2002; Horner-Devine y col., 2004).

La diversidad de los microorganismos parece pues indiscutible y existen importantes razones por las que tal diversidad debe conocerse y preservarse.

La primera y más importante es que los microorganismos mantienen la vida en el planeta pues son responsables de la parte central de los ciclos biogeoquímicos. Sin embargo, a la vista de la plétora de microorganismos que aún no hemos descubierto, posiblemente realicen otras muchas intervenciones en la naturaleza que aún desconocemos y que es importante descubrir.

Un segundo motivo para valorar y estudiar la diversidad microbiana es la cantidad de nuevas sustancias potencialmente beneficiosas que se encuentran escondidas en ella. La cantidad de productos de origen microbiano que utilizamos hoy en día es innumerable. Está disminuyendo la velocidad a la que se conocen nuevas proteínas de mamíferos, pero el número de proteínas de origen microbiano sigue aumentando de manera continuada.

La tercera ventaja que obtenemos del estudio de la diversidad microbiana es el propio arsenal de conocimientos que nos brinda por sí misma. La vida microbiana se encuentra en cualquier lugar del planeta.

Por otro lado, hacer una estimación de la diversidad de las comunidades microbianas es muy complejo debido a la existencia de una larga e inaccesible población. A esto se le añade el problema de la gran complejidad y desafíos metodológicos. Hacerlo con precisión requiere el uso de medios fiables, conocer al microorganismo que se pretende aislar, una definición razonable de especie y una robusta descripción de la frecuencia de distribución de las especies. Así como el censo de un país describe una propiedad fundamental de dicho país, la riqueza de un ambiente es el descriptor fundamental de la estructura de la comunidad (Schloss, 2007).

Pero como dijo Tindall (2004), todavía queda mucho trabajo más allá de hacer un simple inventario y es que la comprensión de la diversidad funcional requiere una comprensión de la diversidad filogenética (Aller, 2008).

I.3.1. LOS MICROORGANISMOS QUE TODAVÍA NO SE HAN LOGRADO CULTIVAR

En la Tierra se estima que existen entre cinco y treinta millones de especies de animales y vegetales (Alain y Querellou, 2009) pero los microorganismos son el principal componente de la diversidad de cualquier ecosistema y los seres que más abundan en nuestro planeta (Ferrer, 2004; Pedrós-Alió, 2006). Hoy se estima que pueden existir hasta 10^9 especies de procariotas (estos datos derivan de las observaciones microscópicas de las muestras naturales y del análisis de las secuencias del gen ribosómico 16S) que en su conjunto contienen más carbono, nitrógeno y fósforo que la totalidad de las plantas y de los animales. Por ello decimos que los microorganismos son el conjunto de mayor biomasa del planeta. Sólo en el mar se calcula que existen 10^{30} células microbianas y 25.000 tipos por cada litro de agua. Los suelos, en general, contienen un orden de magnitud más en riqueza que las aguas debido a su heterogeneidad (Curtis y col., 2002).

La secuenciación del gen ARNr 16S amplificado por PCR de los DNAs extraídos de muestras ambientales ha demostrado ser una potente y muy útil forma de identificación de los procariotas presentes, en detrimento de los métodos de cultivo ya que en muchos casos, los grupos microbianos menos abundantes están ausentes o pobremente representados (Burns y col., 2004). Este hecho comenzó a vislumbrarse cuando a finales de los 80 y principios de los 90 se publicaron una serie de artículos que demostraron que la naturaleza estaba repleta de procariotas que desconocíamos (Amann y col., 1990; Amann y col., 1995; Giovannoni y col., 1990; Green y Keller, 2006; Leadbetter, 2003; Olsen y Bakken, 1987; Pace, 1986). Pero el primer paso para conocer el papel ecológico de los microorganismos en ambientes

hipersalinos incluye la identificación de los organismos presentes a través de la cuantificación y crecimiento de organismos en cultivo puro (Tamaki y col., 2005). Además es preciso cultivar tales microorganismos si se quieren explotar con fines biotecnológicos. Por este motivo, en los últimos años se están intentando desarrollar nuevos métodos de cultivo que sean capaces de aislar los microorganismos que son detectados por técnicas moleculares. Estos métodos, que a continuación comentaremos brevemente, se pueden clasificar dentro de tres categorías (Alain y Querellou, 2009).

Nuevos medios de cultivo y condiciones de incubación

Todas estas técnicas tratan de imitar al máximo las condiciones que existen en la naturaleza o las que se prevé que requieren los microorganismos que se desean cultivar. Fundamentalmente las variaciones consisten en disminuir la concentración de nutrientes (Janssen, 2009; Sait *et al.*, 2002); Hamaki y col., 2005; Hosoya y col., 2009; Stevens y col., 2007; Uphoff y col., 2001), eliminar los carbohidratos simples como fuentes de carbono (Schoenborn y col., 2004), sustituir el agar por otros agentes solidificantes que puedan resultar menos tóxicos (Deguchi y col., 2007; Takahashi y Omura, 2003; Tamaki y col., 2009; Tsudome y col., 2009; Janssen y col., 2002; Taylor, 1951), acidificar o alcalinizar moderadamente el medio (Pankratov y col., 2008; Sait y col., 2006), y simular en las condiciones de incubación la temperatura y la atmósfera natural de la muestra. También es importante prolongar los periodos de incubación hasta doce o más semanas pues muchos de los nuevos microorganismos se caracterizan por su lento crecimiento.

Además podemos utilizar medios que favorezcan el crecimiento de nuevos microorganismos como añadir al medio de cultivo sustancias que minimicen el estrés oxidativo causado por los peróxidos como por ejemplo catalasa o piruvato o usar componentes específicos del suelo como los ácidos húmicos, moléculas señales (N-acil homoserin-lactonas o AMPc) (Bruns y col., 2003; Stevenson y col., 2004) e inhibidores de las bacterias predominantes (antibióticos y otros compuestos).

High-throughput cultivation (cultivo de alto rendimiento)

Son técnicas que requieren como paso previo una dilución muy alta de la muestra para lograr separar casi cada célula microbiana presente en la misma de manera que los microorganismos de crecimiento rápido no inhiban a los de crecimiento lento; estas técnicas utilizan sistemas automáticos que generan microgotas que llegan a contener una sola célula. Posteriormente las muestras, diluidas al límite, son inoculadas en placas microtiter que contienen medios de nuevo diseño como los que hemos descrito en el apartado anterior. Los pioneros de esta última técnica de dilución al límite fueron Button y sus colaboradores (Button y col., 1993). Otros trabajos que han aplicado este método son los siguientes: Bruns y colaboradores (2003), Connon y Giovannoni (2002), Ingham y colaboradores (2007), Koch

y colaboradores (2008), Simu y Hagström (2004), Stingl y colaboradores (2008). Zengler y colaboradores (2002), Zengler y colaboradores (2005) Mediante esta técnica se consiguió aislar y cultivar por primera vez *Pelagibacter ubique*, la bacteria más abundante de los océanos (Rappé y col., 2002). También ha sido aplicada a hongos filamentosos (Collado y col., 2007).

Métodos de cultivo in situ que permiten las interacciones microbianas

Los métodos de cultivo *in situ* se han empleado en los siguientes trabajos: Bollman y colaboradores (2007), Ferrari y colaboradores (2005), Ferrari y colaboradores (2008a), Ferrari y Gillings (2009), Gavrish y colaboradores (2008), Nichols y colaboradores (2008), Sakai y colaboradores (2007), Simon y colaboradores (2005).

Estos dispositivos simulan las interacciones que en el ambiente natural tienen unos microorganismos con otros y también con otros seres vivos y con los elementos abióticos del entorno; consisten en sistemas que retienen las células microbianas en un compartimiento, mientras que sí permite el intercambio bidireccional de pequeñas moléculas. En este sistema los residuos metabólicos pueden ser expulsados del cultivo mientras que los nutrientes y las señales moleculares microbianas pueden difundir hacia el interior.

También se pueden cultivar las muestras sobre superficies inertes como el *sistema de membrana-extracto de suelo* (Ferrari y col., 2005; Ferrari y col., 2008a). Algunos autores afirman que estos métodos permiten a los microorganismos crecer mejor que con los métodos que utilizan cámaras de difusión o realizan dilución al límite (Bollman y col., 2007; Kaeberlein y col., Simu y Hagström, 2004; Watve y col., 2000).

Otra de las técnicas que permite las interacciones microbianas basada en el co-cultivo, ha sido descrita recientemente por D'Onofrio y colaboradores (D'Onofrio y col., 2010) y en ella se ha demostrado que la producción de sideróforos favorece el crecimiento de microorganismos que no han podido ser cultivados previamente en los medios clásicos.

I.4. SELECCIÓN DE NUEVOS MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS

La importancia de los metabolitos bioactivos producidos por microorganismos se conoce desde hace más de medio siglo. Algunos de los fármacos más importantes utilizados hoy día como son la penicilina, la ciclosporina A y la adriamicina, entre otros, proceden de hongos y bacterias (Alanis, 2005).

Actualmente están reemergiendo ciertas enfermedades infecciosas producidas por bacterias (Jones y col., 2008) y apareciendo otras nuevas que constituyen un importante

problema para la salud pública y las economías globales (Cetina 2010; Ahmed y col., 2008). Los casos en los que algunos patógenos son cada vez más resistentes a los antibióticos convencionales está aumentando de manera vertiginosa (Witte, 1999). Así, por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista, principal causante de infecciones nosocomiales por la resistencia intrínseca a muchos agentes antimicrobianos (Kollef 2005, Depardieu y col., 2007). En *Staphylococcus aureus*, la resistencia a los antibióticos y su virulencia está contribuyendo al resurgimiento de infecciones nosocomiales y comunitarias (Lowy 2003, Livermore, 2004). Por lo tanto, hay una gran necesidad de encontrar nuevas sustancias con actividad antibiótica con nuevas estructuras químicas y nuevos mecanismos de acción. Por otra parte, *Aspergillus fumigatus*, es en la actualidad, el hongo filamentoso más patógeno que se propaga por el aire, causando diferentes enfermedades dependiendo del estado inmunitario de la persona infectada (enfermedades pulmonares invasivas o no invasivas y aspergilosis pulmonar alérgica) (McCormick y col., 2010).

Los organismos de origen marino no tienen un historial significativo en cuanto a su uso en medicina tradicional, de hecho, el primer antibiótico de bacteria marina fue identificado y caracterizado en 1966 por Burkholder y colaboradores (Burkholder y col., 1966), pero en los últimos años se han convertido en un importante punto de estudio para la búsqueda de nuevos productos antimicrobianos (Anand y col., 2006). Aunque existe un gran vacío en cuanto al conocimiento de las aplicaciones que los microorganismos halófilos presentan en el campo de la biomedicina y especialmente en el campo de los antimicrobianos, se tiene constancia de que los productos marinos naturales contienen una amplia gama de nuevos antibióticos con estructuras químicas que no están presentes en los microorganismos que habitan el medio terrestre (Bernan y col. 1997). La adaptación de las bacterias a diversos hábitats salinos podría ser responsable de las habilidades específicas para la producción de metabolitos secundarios considerados únicos por el momento (Bernan y col. 1997) y que han mostrado tener actividades antimicrobianas, antivirales, inmunosupresoras, antitumorales y anticoagulantes (Carte 1993, Reichenbach 2001).

El gran interés en la obtención de moléculas bioactivas procedentes de microorganismos halófilos o halotolerantes (Faulkner, 2002) se debe también a su alta diversidad (McCarthy y col., 2004, Blunt y col., 2004) y a sus propiedades específicas que les han permitido adaptarse al medio hipersalino y que posiblemente se traduzcan en la producción de nuevos metabolitos primarios y secundarios. Los resultados que se han obtenido hasta el momento mediante el screening de bacterias marinas aisladas de algas e invertebrados han mostrado ser una fuente importante de metabolitos antimicrobianos (Burgess y col., 1999).

En la última revisión realizada por Mayer y colaboradores (2011), sobre los compuestos marinos con actividad antimicrobiana, se pone de manifiesto la importancia de éstos en el campo de la medicina. El estudio llevado a cabo por investigadores de 26 países

reveló que sólo durante los años 2007-2008 se encontraron 197 compuestos marinos. De ellos 74 tenían actividad antibacteriana, anticoagulante, antifúngica, antimalárica, antituberculosa, antiprotozoaria y antiviral; 59 compuestos afectaban a los sistemas cardiovascular, inmunológico y nervioso, y tenían actividad antiinflamatoria; y los 64 restantes mostraron uniones a diferentes receptores y dianas moleculares que indicaban la pertenencia a distintas clases farmacológicas (Tabla 4). Por lo tanto, aunque hasta ahora la síntesis o modificación química de sustancias antimicrobianas ha sido una buena opción, la diversidad de los microorganismos y sus metabolitos es incomparable y de una gran importancia médica.

El principal problema con que se enfrentaban las empresas farmacéuticas era la incapacidad para cultivar los nuevos microorganismos fuera de su medio ambiente (Davis, 2005) a pesar de conocer su existencia a través de las técnicas moleculares (Antón y col., 2000; 2008; Benlloch y col., 2001; Rappé y Giovannoni, 2003; Burns y col., 2004; Pedrós-Alió, 2005; Maturrano y col., 2006; Pagaling y col., 2010). Como ya hemos comentado anteriormente, se calcula que en nuestro planeta pueden existir del orden de 10^9 especies de procariotas y hasta el presente se han descrito únicamente unas 8000 (Oren y Papke, 2010), por lo que sólo se han podido cultivar del 0,1-1% de su población (Amann y col., 1995; Green y Keller, 2006; Leadbetter, 2003). Esto, unido al alto porcentaje de redescubrimiento de compuestos ya conocidos y a la baja probabilidad de hallazgo de nuevas moléculas, hizo que las empresas farmacéuticas abandonasen la búsqueda de nuevos antibióticos a partir de los microorganismos.

Por fortuna hoy sabemos que los microorganismos que aún no hemos logrado cultivar podrían ser productores de sustancias de interés biotecnológico según los estudios de metagenómica han puesto de manifiesto (Nichols, 2007; Alain y Querellou, 2009; Zengler, 2009).

Por otro lado sabemos que la mayoría de las especies halófilas cultivables hasta la fecha, se encuadran dentro de los phyla *Proteobacteria* y *Firmicutes* (Oren, 2002), mientras que los estudios ecológicos moleculares están poniendo de manifiesto la abundancia de *Bacteroidetes*, *Plantomyces* y otros taxones de los cuales tenemos aislados pocos representantes (Antón y col., 2002; 2008; Benlloch y col., 2001; Burns y col., 2004; Pedrós-Alió, 2005; Maturrano y col., 2006). Los genes que codifican las rutas de metabolitos secundarios no están distribuidos al azar entre las bacterias sino que son ciertos taxa con genomas extensos (>4Mb), por ejemplo *Bacillus*, *Pseudomonas*, mixobacterias, cianobacterias, acidobacterias y actinobacterias los que tienen desde unos pocos a múltiples rutas metabólicas secundarias de sintetisas de poliketidos y péptidos no ribosomales (Donadio y col., 2007). Por ello sería posible encontrar dichos genes tanto en las bacterias halófilas cultivables como en las que hemos detectado a través de técnicas moleculares ya

que pertenecen a esos taxa (Ward y col., 2009; Nett y col., 2009; Eichorst y col., 2007; Koch y col., 2008; Pankratov y col., 2008).

Tabla 4. Compuestos con actividad antibacteriana y antifúngica encontrados durante los años 2007-2008 en cepas de origen marino.

TIPO	COMPUESTO	ORGANISMO	METABOLITO	ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA	REFERENCIAS
Antibacteriano	Ascochyatin	Hongo	Poliketido	Inhibición de <i>B. subtilis</i>	Kanoh y col., 2008b
Antibacteriano	L-amino acid oxidase SSAP	peces de roca	Proteína	Inhibición de <i>A. salmonicida</i> , <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscida</i> y <i>V. parahaemolyticus</i>	Kitani y col., 2008
Antibacteriano	Arenicin-1	Anélido	Péptido	Inhibición de <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i>	Lee y col., 2007
Antibacteriano	Isoaptamine	Esponja	Alcaloide	Inhibición de <i>S. aureus</i>	Jang y col., 2007c
Antibacteriano	Sesterterpenes	Esponja	Terpenoide	Inhibición de <i>B. subtilis</i>	Lee y col., 2008
Antibacteriano	Sulfoalhyldresorcinol	Hongo	Poliketido	Inhibición de <i>S. aureus</i> metilina resistente	Kanoh y col., 2008a
Antibacteriano	Ambiguines H and I	Bacteria	Alcaloide	Inhibición de <i>S. albus</i> y <i>B. subtilis</i>	Raveh y Carmeli, 2007
Antibacteriano	Ariakemins A and B	Bacteria	Poliketido	Inhibición de <i>S. aureus</i> metilina resistente	Oku y co., 2008
Antibacteriano	Ayamycin	Bacteria	Poliketido	Inhibición de bacterias Gram positivas y Gram negativas	El-Gendy y col., 2008a
Antibacteriano	Batzelladine L and M	Esponja	Alcaloide	Inhibición de <i>S. aureus</i> y <i>S. aureus</i> metilina resistente	Hua y col., 2007
Antibacteriano	Diphenyl eter	Esponja	Poliketido	Inhibición de <i>B. subtilis</i>	Hanif y col., 2007
Antibacteriano	Essaramycin	Bacteria	Alcaloide	Inhibición de <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> y <i>M. luteus</i>	El-Gendy y col., 2008b
Antibacteriano	Isojaspic acid	Esponja	Terpenoide	Inhibición de <i>S. epidermidis</i>	Rubio y col., 2007
Antibacteriano	Lynamicins A-D	Bacteria	Alcaloide	Inhibición de <i>S. aureus</i> metilina resistente	McArthur y col., 2008
Antibacteriano	Lipoxazolidinones A and B	Bacteria	Alcaloide	Inhibición de <i>Staphylococcus</i> sp., <i>S. pneumoniae</i> y <i>E. faecalis</i>	Macherla y col., 2007
Antibacteriano	Marinopyrrole A	Bacteria	Alcaloide	Inhibición de <i>S. aureus</i> metilina resistente	Hughes y col., 2008
Antibacteriano	Microcionin-1	Esponja	Terpenoide	Inhibición de <i>M. luteus</i>	Gapar y col., 2008
Antibacteriano	Phomolide B	Hongo	Poliketido	Inhibición de <i>E. coli</i>	Du y col., 2008
Antibacteriano	Sargaguinoic acid derivate	Alga	Terpenoide	Inhibición de <i>S. aureus</i>	Horie y col., 2008
Antibacteriano	Tauramide	Bacteria	Peptido	Inhibición de <i>Enterococcus</i> sp.	Desjardina y col., 2007
Antifúngico	Bromophenol	Alga	Poliketido	Inhibición de <i>Magnaporthe grisea</i>	Lee y col., 2007
Antifúngico	Callipeltins J and K	Esponja	Péptido	Inhibición de <i>C. albicans</i>	D'Auria y col., 2007
Antifúngico	Halothurin B	Equinodermo	Triterpenoide glicosilado	Inhibición de T. mentagrophytes y <i>S. schenckii</i>	Kumar y co., 2007
Antifúngico	Neopeltolide	Esponja	Poliketido	Inhibición de <i>C. albicans</i>	Wright y col., 2007
Antifúngico	Pedein A	Bacteria	Péptido	Inhibición de <i>R. glutinis</i> , <i>S. cerevisiae</i> y <i>C. albicans</i>	Kunze y col., 2008
Antifúngico	Pseudoceratins A and B	Esponja	Metabolitos que contienen nitrógeno	Inhibición de <i>C. albicans</i> y <i>S. cerevisiae</i>	Jang y col., 2007c

Por el momento, sólo en unos pocos casos se han podido extraer del medio ambiente los “clusters” de genes de metabolitos secundarios de microorganismos desconocidos, clonar grandes insertos en genotecas y expresarlos heterológamente usando técnicas de biología molecular (Brady, 2007; Craig y col., 2009; King y col., 2009). Sin embargo, debido a limitaciones tecnológicas, estos métodos son todavía incapaces de revelar el espectro completo de las capacidades fisiológicas y biosintéticas de una especie bacteriana o de su relación con la ecología que la rodea. A pesar del potencial de las aproximaciones de la metagenómica y de la recombinación genética en la investigación de antibióticos, las aproximaciones basadas en el cultivo de microorganismos siguen siendo esenciales en el descubrimiento de antibióticos. Las células vivas aisladas en un cultivo puro pueden manipularse fisiológica y genéticamente y puede aumentarse la escala de producción. Así pues, a corto plazo, las investigaciones basadas en el cultivo siguen siendo cruciales en el descubrimiento y producción de antibióticos (Nichols, 2007; Alain y Querellou, 2009; Zengler, 2009).

Empresas como la Fundación MEDINA (Fundación Centro de Excelencia en Investigación de Medicamentos Innovadores en Andalucía, <http://www.medinaandalucia.es>), con más de 50 años de experiencia en el descubrimiento de fármacos a partir de productos naturales y la evaluación preclínica de candidatos a fármacos, están redireccionando su investigación hacia el descubrimiento de nuevos productos naturales bioactivos de origen microbiano en ambientes hipersalinos de Andalucía, ya que la variación topográfica y geofísica así como la biodiversidad endémica intrínseca a la región, se refleja en altos niveles de diversidad microbiana y endemismos. Debido a todo lo anteriormente expuesto, dicha Fundación y nuestro grupo de investigación han comenzado un trabajo en colaboración, financiado por el Proyecto de Excelencia “Descubrimiento de nuevos antibióticos mediante la combinación de dos estrategias: cultivo de bacterias no cultivadas previamente y muestreo de hábitats salinos de Andalucía” el cual se incluye en el Capítulo 4 de esta tesis doctoral.

Como ya hemos comentado los microorganismos halófilos tienen un alto potencial biotecnológico. Por una parte, las aplicaciones más interesantes de haloarqueas son la producción de bacteriorrodopsina, enzimas, exopolisacáridos, polihidroxicanoatos, bioplásticos y halocinas. Al parecer, pudieran ser utilizadas también en la biodegradación de hidrocarburos y compuestos tóxicos e incluso en el diagnóstico de algunos tipos de cáncer (Rodríguez-Valera, 1991, Galinski y Tindall, 1992; Ventosa y Arahál, 2002a; Mellado y Ventosa, 2003). Por otra parte, las bacterias halófilas también han sido consideradas como un grupo de organismos con un enorme potencial biotecnológico (Mellado y Ventosa, 2003; Ventosa, 2004; 2006; 2008). No sólo producen enzimas, solutos compatibles o biopolímeros de interés industrial o médico (Arias y col., 2003; Béjar y col., 1998; Calvo y col., 1998; Margesin y Schinner 2001; Quesada y col., 1993; 2004; Sánchez-Porro y col., 2003; Ventosa y col., 1998; Luque y col., 2010), sino que, además, poseen propiedades que facilitan su explotación comercial. A este respecto, señalaremos su marcado carácter eurihalino, su fácil cultivo y manipulación en el laboratorio y su falta de patogenicidad.

II. OBJETIVOS

Nuestro grupo de investigación "Exopolisacáridos Microbianos" (BIO 188, (<http://www.ugr.es/~eps/es/index.html>)) está dedicado principalmente al estudio de nuevas especies de bacterias halófilas, incluyendo sus potenciales aplicaciones en biotecnología y medicina, el desarrollo de herramientas genéticas, los estudios de "quorum sensing" y al análisis de la biodiversidad de ambientes hipersalinos.

La presente tesis doctoral se enmarca dentro de los estudios realizados en el proyecto de investigación: "Estudio de la comunidad de procariotas de Rambla salada (Murcia), un espacio protegido de interés ecológico y comunitario. Selección de bacterias de utilidad industrial y ecológica" (CGL2005-05947; IP: Emilia Quesada Arroquia).

El Humedal de Ajauque y Rambla Salada es un ambiente hipersalino que está siendo estudiado por investigadores del grupo de Ecología Acuática de la Universidad de Murcia (Josefa Velasco, Andrés Millán y otros) y cuyos resultados han demostrado su singularidad en términos de especies eucariotas. Dichos investigadores han señalado que la biodiversidad de este espacio protegido puede verse afectada por la pérdida de salinidad debida al trasvase Tajo-Segura y otras actividades humanas como la agricultura.

Desde el punto de vista microbiológico el Humedal de Ajauque y Rambla Salada era un paraje inexplorado hasta el comienzo de nuestro estudio. El grupo de la Universidad de Murcia recabó nuestra participación y nuestro equipo consideró que este hábitat podría constituir un modelo apropiado para estudiar la diversidad microbiana de los ambientes hipersalinos, utilizando técnicas clásicas de cultivo y selección, al mismo tiempo que técnicas moleculares, en un entorno donde pudiéramos analizar aguas, sedimentos y suelos salinos.

Por otra parte nuestro grupo de investigación estaba interesado en aislar nuevas bacterias halófilas de interés biotecnológico que podríamos hallar en este ambiente hipersalino aún inexplorado.

Los objetivos del proyecto CGL2005-05947 eran los siguientes:

1. Estudiar la comunidad procariota mediante métodos clásicos de cultivo y nuevos métodos moleculares, y comparar los resultados obtenidos con ambos tipos de técnicas.
2. Hacer una estimación de la diversidad, estructura y dinámica de las poblaciones de bacterias y arqueas.
3. Identificar actividades microbianas de interés ecológico
4. Seleccionar cepas de interés biotecnológico.

Para desarrollar todos los estudios previstos se incorporaron al equipo investigador del proyecto CGL2005-05947 dos becarias predoctorales, Nahid Oueriaghli, quien se haría cargo de los estudios de ecología molecular en el Humedal de Ajauque y Rambla Salada, y la autora de la presente tesis doctoral, María Rocío Luque Aznar, quien tendría que llevar a cabo el estudio de biodiversidad empleando técnicas de cultivo clásicas y la selección de cepas de interés tecnológico. Ambas investigadoras deberían realizar sus estudios en paralelo, muestreando local y temporalmente las estaciones de muestreo seleccionadas en el Humedal de Ajauque y Rambla Salada y trabajando sobre idénticas muestras de suelos, aguas y sedimentos salinos. De esta forma sus resultados permitirían comparar la microbiota total y cultivable, haciendo una estimación real de la diversidad microbiota de los distintos hábitats salinos del Humedal de Ajauque y Rambla Salada, principal objetivo del proyecto de investigación.

Por todo ello los objetivos de la presente tesis doctoral han sido los siguientes:

Realizar un muestreo y estudio microbiológico de los diversos ambientes salinos que existen en el Humedal de Ajauque y Rambla Salada que, repetidos a lo largo de dos años y en diferentes estaciones, nos permitiera:

1. Enumerar los procariotas cultivables en las diferentes muestras de aguas, suelos y sedimentos salinos.
2. Aislar un número significativo de cepas bacterianas y arqueas, que a su vez nos permitiera:
 - 2.1 Identificar taxonómicamente un número elevado de las especies procariotas del Humedal de Ajauque y Rambla Salada y hallar nuevos tipos de microorganismos halófilos o halotolerantes.
 - 2.2 Analizar la diversidad procariota en función de la salinidad del medio y otros parámetros físico-químicos, así como la época de muestreo.
 - 2.3 Hallar nuevos procariotas de interés biotecnológico.

Finalmente todo este estudio lleva implícito una comparación posterior con los resultados obtenidos al aplicar técnicas de ecología molecular en el Humedal de Ajauque y Rambla Salada. Como ya hemos indicado anteriormente, dichos estudios no forman parte de esta tesis doctoral pero se han hecho en paralelo a ella. Que sepamos ésta es la primera vez que se plantea en un hábitat hipersalino tal estudio paralelo, por lo que consideramos que nuestros resultados pueden tener un gran interés en el campo del halofilismo.

III. TRABAJO EXPERIMENTAL

**CAPÍTULO 1: *SELECCIÓN DE LAS
CEPAS OBJETO DE ESTUDIO***

III.1.1. RESUMEN

El Humedal de Ajauque y Rambla Salada es un paraje natural que forma parte del espacio protegido por la comunidad de Murcia (BORM 10/9/1998). La mayor parte del año predomina en este hábitat los llamados “cauces secos”, aunque existen tramos o puntos donde afloran aguas subterráneas. Las sales proceden de materiales evaporíticos (fundamentalmente yesos) que forman parte de los sedimentos de las cuencas vertientes de las ramblas. El rango de salinidad es muy amplio y se alcanzan valores en algunos puntos de entre el 15 y el 18% (p/v). Con el propósito de conocer la comunidad de procariotas existente en el Humedal de Ajauque y Rambla Salada se llevaron a cabo cuatro muestreos en los años 2006 y 2007 en los que se recogieron muestras de suelos, aguas y sedimentos en las zonas de la finca de la Salina, una surgencia de agua sulfurosa salina, rambla Ajauque en el humedal de Derramadores y las aguas abajo del canal del trasvase Tajo-Segura. En cada una de las zonas muestreadas se realizó un análisis físico-químico que incluía el contenido de sales, la conductividad, el pH y la tensión de oxígeno.

Las muestras fueron procesadas mediante las técnicas de microbiología clásica. Se hicieron diluciones de las mismas y se sembraron en el medio nutritivo MY a distintas concentraciones salinas, tras lo cual se hicieron los recuentos para cada muestra y concentración de sal y se seleccionaron 477 cepas en función de su diversidad colonial.

III.1.2. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1.2.1. Lugares de muestreo y análisis físico-químico

Para el aislamiento de las cepas se realizaron cuatro muestreos en el Humedal de Ajauque y Rambla Salada (Murcia) en los meses de febrero y junio de 2006 y febrero y noviembre de 2007. En cada uno de ellos se tomaron ocho muestras en cuatro lugares diferentes, concretamente la finca de la Salina (muestras M1, M2, M4 y M5), una surgencia de agua sulfurosa salina (muestras M7 y M8), el canal del trasvase Tajo-Segura (muestra M9), y la rambla Ajauque en el humedal de Derramadores (muestra M6) (Figura 6). Las muestras M1, M4 y M7 eran de agua, las muestras M2, M5 y M6 eran de suelo, y las muestras M8 y M9 eran de sedimento. Las muestras se guardaron a 4 °C hasta que se procesaron en el laboratorio 24 horas después.

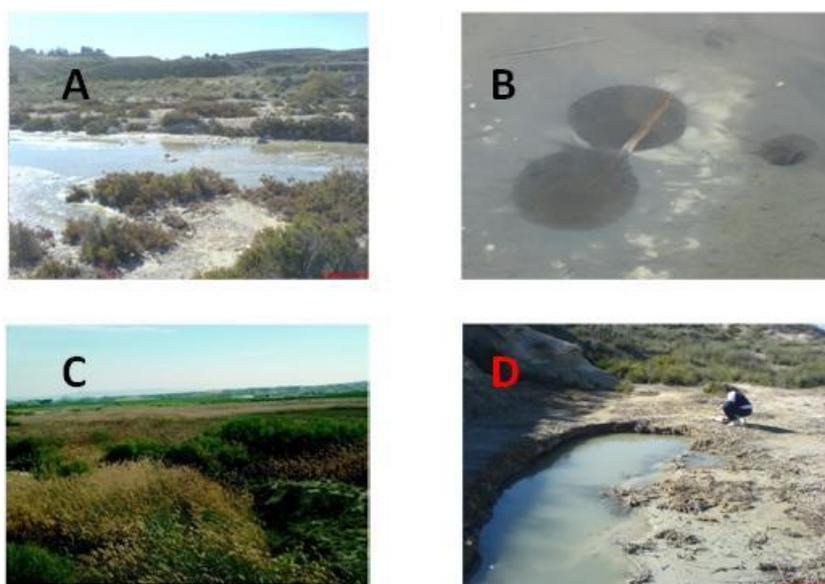


Figura 6. Lugares de muestreo en el Humedal de Ajauque y Rambla Salada.
A, Finca de la Salina; B, Traspase Tajo-Segura; C, Humedal de Derramadores; D, Surgencia de agua sulfurosa salina.

Al mismo tiempo que se hizo el muestreo en las distintas zonas mencionadas, se realizó un análisis físico-químico, midiendo los valores de pH, contenido en sales y contenido en oxígeno.

III.1.2.2. Aislamiento de bacterias y arqueas

En el laboratorio, 1g de cada muestra de suelo o sedimento fue homogeneizado y suspendido en 9 ml de solución salina de sales y se mantuvo en agitación a 150 rpm durante 15 minutos para disgregar las partículas del suelo y facilitar la dispersión de los microorganismos. Para las muestras de agua se procesaron 10 ml. A continuación se hicieron diluciones seriadas. Cada dilución (100 µl) se sembró en el medio nutritivo MY (Moraine y Rogovin 1966; Quesada y col., 1993) con la cantidad necesaria de una solución stock de sales al 30 % (p/v) (Rodríguez-Valera y col., 1981) con el fin de aislar la población quimioheterótrofa aerobia. Se utilizaron las siguientes concentraciones de sales: 0,5; 3; 5; 10; 20 y 30 % (p/v). La composición detallada del medio MY, así como de la solución de sales se incluye en el anexo I. Dicho medio se preparó a un valor de pH igual a 7 ajustado con el medidor de pH *CRISON micro pH2000* y se esterilizó en autoclave a 112 °C durante 30 minutos distribuyéndose a continuación en placas tras su enfriamiento a 50-60 °C.

La selección de las colonias de bacterias se hizo tras 5 días de incubación a 32 °C en función de su morfología colonial (Ventosa y col., 1982; Quesada y col., 1982); los posteriores aislamientos de cada cepa se hicieron en el mismo medio de cultivo.

Para la selección de arqueas el procedimiento fue el mismo, utilizando en este caso una concentración de sales del 30 % (p/v) tanto para las soluciones seriadas como para el medio MY. La incubación se realizó a 41 °C durante dos semanas. Como en el caso anterior, la selección de colonias se hizo en función de su aspecto y los subcultivos se hicieron en el mismo medio de cultivo.

III.1.2.3. Conservación de las cepas

Los microorganismos se mantuvieron a una temperatura de 4°C en el medio sólido MY al 5 % (p/v) en el caso de las cepas bacterianas y al 25 % (p/v) en el caso de las cepas de arqueas. Para conservarlos a largo plazo se mantuvieron congelados a una temperatura de -80 °C en medio líquido MY a igual concentración y se utilizó como crioprotector dimetil sulfóxido (DMSO) o glicerol a una concentración del 20 % (v/v)

III.1.3. RESULTADOS

En general, los valores medidos de salinidad, pH, oxígeno y conductividad presentaron diferencias en las distintas épocas del año muestreados ya que están directamente relacionados con la estación meteorológica, de manera que en la época de lluvia se produce una disolución de las concentraciones de cloruro y variaciones del oxígeno disuelto. Los meses de junio de 2006 y noviembre de 2007 se caracterizaron por la escasez de precipitaciones, concretamente, la Agencia Estatal de Meteorología (www.aemet.es) recoge unos valores medios de lluvias para cada mes de 5,08 y 5,58 mm respectivamente. En el mes de febrero de 2006 las lluvias en el cómputo del mes fueron de 18,53 mm y 7,36 mm en febrero de 2007.

También hubo diferencias con respecto a los distintos hábitats muestreados. En la muestra de agua M1 de la finca de la Salina, la concentración salina fue mayor en junio de 2006 (44,4 g/l), época caracterizada por la escasez de precipitaciones mientras que en las otras épocas, dicha concentración osciló entre los 11,8 g/l y los 33,8 g/l. Directamente relacionado con esta concentración, los valores de conductividad fueron más elevados en junio de 2006 (65,9 Ωcm) y menor la concentración de oxígeno disuelto (10,20 mg/l) en dicha época con respecto a las otras épocas de muestreo de este hábitat en las que la conductividad osciló entre 20,1 Ωcm y 58,8 Ωcm , y el oxígeno disuelto entre 13 mg/ml y 17,2 mg/ml. Lo mismo ocurrió en la muestra M4, en donde la concentración salina fue mayor en junio de 2006 (83,1 g/l) y los valores de conductividad y oxígeno disuelto fueron 120,12 Ωcm y 4,46 mg/ml, respectivamente. En cambio los valores de salinidad, conductividad y oxígenos disueltos en las otras épocas de muestreo oscilaron entre 20-36,7 g/l, 35,9-57 Ωcm y 7,9-19,8 mg/ml respectivamente. En cuanto a los valores de pH, en la muestra M1, oscilaron entre los 6,3 en junio de 2006 y los 8,36 en noviembre de 2007, y en el caso de la muestra M4, oscilaron entre los 3,85 en junio de 2006 y los 8,03 en noviembre de 2007. Resultados similares se obtuvieron en las muestras M2 y M5 de la finca de la Salina.

Por otra parte, la zona de la surgencia (muestras M7 y M8), destacó por presentar los mayores valores de concentración salina con respecto al resto de hábitats. Los valores medidos oscilaron entre los 140 g/l registrados en junio de 2006 y los 177 g/l medidos en febrero de 2007. Se trata de una poza de agua sulfurosa salina de peculiares características por su alto contenido en cloruro y elevada proporción de sulfatos procedentes del yeso. Los valores medidos de conductividad en cada caso fueron 188 Ωcm y 265 Ωcm y los de oxígeno disuelto 1 mg/ml y 0,6 mg/ml respectivamente. Este nacimiento de agua se mantiene constante a lo largo del año lo que hace que los parámetros físico-químicos estudiados no registren altas variaciones en las distintas épocas del año muestreadas como sí ocurrió en la finca de la Salina. Los valores de pH medidos estuvieron próximos a la neutralidad (entre 6,55 y 6,98).

Al contrario que en la surgencia, la concentración de sal medida en el trasvase Tajo-Segura (muestra M9) fue la más baja con respecto al resto de hábitats debido a la desviación del agua de riego para los cultivos aledaños; los valores medidos de salinidad, conductividad y oxígeno disuelto oscilaron entre 2,9-6,8 g/l, 5,58-7,3 Ω cm, y 20,6-10,3 mg/ml respectivamente. Respecto a los valores de pH, éstos oscilaron entre 7,7 y 9,7.

Por último, el humedal de Derramadores (muestra M6), se caracterizó por presentar valores intermedios en los parámetros físico-químicos con respecto al resto de los hábitats. Así, la concentración de sal fue de 25,2 g/l, la conductividad 40 Ω cm, el oxígeno disuelto de 20,3 mg/ml y el pH de 8,46.

Por otra parte, en los recuentos de la microbiota que se llevaron a cabo para cada zona muestreada, el número de microorganismos osciló entre los 1×10^3 UFC/ml en febrero de 2007 y los $6,6 \times 10^7$ UFC/ml en junio de 2006 a las concentraciones del medio MY al 20 % (p/v) y 3 % (p/v) respectivamente. En la Tabla 5 se detallan los recuentos obtenidos para cada muestra en cada uno de los hábitats estudiados. En el medio MY al 30 % (p/v), sólo se observó crecimiento en las placas incubadas a 41 °C durante dos semanas en las que se pretendía aislar arqueas. El mismo medio incubado a menor temperatura para aislar bacterias no dio lugar a crecimiento alguno. Por otro lado, en las muestras M2 y M9 tomadas en febrero de 2006 y las muestras M7 y M8 recogidas en noviembre de 2007, no se observó crecimiento a ninguna concentración salina cuando las placas se incubaron a 32 °C durante cinco días y sí cuando se incubaron a 41 °C durante dos semanas.

Teniendo en cuenta las distintas épocas de muestreo, se observó que pudiera existir una relación entre la época del año y el número de microorganismos en el hábitat, de manera que los mayores recuentos, del orden de 10^6 - 10^7 UFC/ml, se obtuvieron en el mes de junio de 2006 y noviembre de 2007 coincidiendo con un menor registro de lluvias.

Respecto a las zonas de muestreo, el recuento de microorganismos en la finca de la Salina fue mayor en los meses de febrero de 2006 y noviembre de 2007; en la surgencia y humedal de Derramadores, los mayores recuentos correspondían al mes de junio de 2006, y por último, en la zona correspondiente al trasvase Tajo-Segura, los recuentos fueron similares en junio de 2006, febrero de 2007 y noviembre de 2007.

Sin embargo no existió una relación entre los recuentos y la salinidad del medio empleado. En función de lo expuesto anteriormente las zonas con las mayores salinidades, tales como la surgencia podrían haber dado mayores recuentos en los medios de mayor salinidad. De igual forma los recuentos en la zona de menor salinidad, el trasvase Tajo-Segura, no fueron mayores en las placas de aislamiento con menor contenido en sales. Este hecho podría estar en relación con el marcado carácter eurihalino de las bacterias halófilas presentes en este hábitat, tal y como hemos podido comprobar posteriormente en el Capítulo 2.

Tabla 5. Recuentos de procariotas totales en el Humedal de Ajauque y Rambla Salada.

MUESTREO			RECuentos*					
ZONA	ÉPOCA	ÁREA	0,5 ^a	3 ^a	5 ^a	10 ^a	20 ^a	30 ^{a,b}
FINCA DE LA SALINA	Febrero, 2006	M1	1,8 x 10 ⁴	1,8 x 10 ⁴	3,3 x 10 ⁴	8,5 x 10 ⁴	2,8 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁴
		M2	nc	nc	nc	nc	nc	1 x 10 ⁴
		M4	4 x 10 ⁴	5,7 x 10 ⁴	7,8 x 10 ⁵	8 x 10 ⁵	4,2 x 10 ³	2,8 x 10 ⁴
		M5	5,5 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁷	1,3 x 10 ⁶	9 x 10 ⁴	1,9 x 10 ³	1,3 x 10 ⁴
	Junio, 2006	M1	2 x 10 ⁵	2 x 10 ⁶	8 x 10 ⁵	9 x 10 ⁵	2 x 10 ⁴	1 x 10 ⁷
		M2	6 x 10 ⁴	8 x 10 ⁵	2 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁶	6 x 10 ⁶	2 x 10 ⁷
		M4	3 x 10 ³	1 x 10 ⁵	3 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁶	3,9 x 10 ⁶	2 x 10 ⁶
		M5	3 x 10 ⁶	2,4 x 10 ⁶	8,5 x 10 ⁴	8,3 x 10 ⁴	1,4 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁶
	Febrero, 2007	M1	6.6 x 10 ⁵	8 x 10 ⁵	5 x 10 ⁶	5 x 10 ⁶	nc	1 x 10 ⁵
		M2	1.8 x 10 ⁶	7.8 x 10 ⁶	5.6 x 10 ⁶	7.1 x 10 ⁶	1 x 10 ³	2.6 x 10 ⁵
		M4	3 x 10 ⁴	2.5 x 10 ⁵	2.5 x 10 ⁵	1.2 x 10 ⁵	nc	2.5 x 10 ⁵
		M5	9.2 x 10 ⁶	5.2 x 10 ⁶	4.2 x 10 ⁶	1.8 x 10 ⁵	nc	1.2 x 10 ⁵
	Noviembre, 2007	M1	2.4 x 10 ⁵	7 x 10 ⁶	4.5 x 10 ⁶	1.1 x 10 ⁶	1.38 x 10 ⁶	1.5 x 10 ⁶
		M2	3.5 x 10 ⁶	4.9 x 10 ⁷	6.6 x 10 ⁷	3.2 x 10 ⁷	1.1 x 10 ⁷	1.6 x 10 ⁵
		M4	7.3 x 10 ⁵	2.4 x 10 ⁶	5.5 x 10 ⁶	3.8 x 10 ⁶	6 x 10 ⁶	2.5 x 10 ⁵
M5		1 x 10 ⁴	2.5 x 10 ⁶	1 x 10 ⁶	3.5 x 10 ⁶	1,4 x 10 ³	1 x 10 ⁵	
SURGENCIA	Febrero, 2006	M7	3 x 10 ⁴	4 x 10 ⁵	4,3 x 10 ⁵	4,7 x 10 ⁶	7 x 10 ⁴	4,3 x 10 ⁴
		M8	nc	nc	nc	nc	nc	3 x 10 ⁴
	Junio, 2006	M7	6 x 10 ³	3 x 10 ³	3,6 x 10 ⁵	2 x 10 ⁴	2 x 10 ³	2,6 x 10 ⁶
		M8	3 x 10 ⁴	3,7 x 10 ⁵	6,5 x 10 ⁵	6 x 10 ⁵	7 x 10 ⁵	4,5 x 10 ⁷
	Febrero, 2007	M7	3.4 x 10 ⁵	5.5 x 10 ⁵	1.7 x 10 ⁶	4.7 x 10 ⁵	nc	1.3 x 10 ⁵
		M8	1.5 x 10 ⁵	4 x 10 ⁵	4.7 x 10 ⁵	1.5 x 10 ⁶	nc	1.7 x 10 ⁵
	Noviembre, 2007	M7	nc	nc	nc	nc	nc	3 x 10 ⁴
		M8	nc	nc	nc	nc	nc	1 x 10 ⁴
HUMEDAL	Febrero, 2006		1,3 x 10 ⁵	5 x 10 ⁴	6 x 10 ⁴	4,2 x 10 ⁴	7,4 x 10 ³	2 x 10 ⁴
	Junio, 2006	M6	1 x 10 ⁵	6,7 x 10 ⁵	1 x 10 ⁶	1,9 x 10 ⁶	2,3 x 10 ⁶	1 x 10 ⁷
	Noviembre, 2007		3 x 10 ³	1,22 x 10 ⁴	1,6 x 10 ⁴	8,5 x 10 ⁴	3,5 x 10 ⁴	1,8 x 10 ⁵
TRASVAS E TAJO-SEGURA	Febrero, 2006		nc	nc	nc	nc	nc	1,2 x 10 ⁴
	Junio, 2006		3 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁷	1,2 x 10 ⁷	1,3 x 10 ⁷	1,8 x 10 ⁷	1,2 x 10 ⁶
	Febrero, 2007	M9	1.05 x 10 ⁶	3.46 x 10 ⁶	5.3 x 10 ⁶	5.38 x 10 ⁶	nc	2.3 x 10 ⁵
	Noviembre, 2007		5.5 x 10 ⁴	5.2 x 10 ⁶	9.3 x 10 ⁶	4 x 10 ⁶	2.35 x 10 ⁴	1.8 x 10 ⁴

*, % (p/v); nc, no crecimiento; ^a, recuentos obtenidos utilizando el medio MY a distintas concentraciones de sal e incubados a 32 °C durante cinco días; ^b, recuentos obtenidos utilizando el medio el MY al 30 (p/v) e incubado a 41°C durante dos semanas.

Por último, en cuanto a la selección de cepas, ésta se hizo en función de su diversidad colonial. En la Figura 7 se muestra un imagen tomada del recuento de microorganismos realizado en el medio MY al 10 % (p/v) a partir de una dilución de 10^{-3} (v/v) de la muestra M5 de la finca la Salina en junio de 2006.

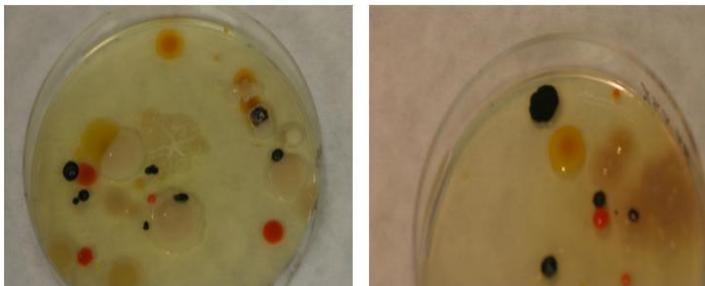


Figura 7. Diversidad colonial encontrada en el recuento de microorganismos.

En total se seleccionaron 428 cepas de las placas incubadas a 32 °C durante cinco días, de las cuales, 76 y 127 cepas, se seleccionaron de los meses febrero y junio de 2006 respectivamente y 123 y 102 cepas, de los meses de febrero y noviembre de 2007. Respecto a las zonas de muestreo, se seleccionaron 221 cepas en la finca de la Salina, 89 en la surgencia, 50 en el humedal de Derramadores y 68 en el trasvase Tajo-Segura. La mayoría de dichas cepas se seleccionaron a las concentraciones intermedias de sal; así un total de 135, se seleccionaron del medio MY al 5 % (p/v), 117 cepas fueron seleccionadas del medio MY al 10 % (p/v), y 87 cepas se aislaron del medio MY al 3 % (p/v), todas ellas incubadas a 32 °C durante 5 días. En cambio, las 49 cepas aisladas del medio MY al 30 % (p/v), provenían de una incubación a 41 °C durante dos semanas, no observándose crecimiento cuando dicho medio se incubó a 32 °C durante 5 días. Respecto a la distribución de las 49 cepas por épocas del año, 9 cepas se aislaron en febrero de 2006, 17 cepas en junio de 2006, 13 cepas en febrero de 2007 y 10 cepas en noviembre de 2007; y en cuanto a la distribución por zonas muestreadas 29 cepas se aislaron de la finca de la Salina, 11 cepas pertenecían a la surgencia, 6 cepas al humedal de Derramadores y 3 cepas al trasvase Tajo-Segura.

En la Tabla 6 se especifican los datos relativos al lugar de procedencia, tipo de muestra, época de muestreo y medio de cultivo de donde se aislaron cada una de las cepas seleccionadas para este estudio.

Tabla 6. Procedencia de las cepas seleccionadas para el estudio.

CEPA	MUESTRA	ÉPOCA DE MUESTREO	LUGAR DE MUESTREO	MEDIO DE AISLAMIENTO (% p/v)*
M1-10	Suelo	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 30
M1-100	Agua	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M1-101	Agua	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 20
M1-102	Agua	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 2
M1-103	Agua	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M1-103-X	Agua	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M1-104	Agua	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M1-106	Agua	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 2
M1-107	Sedimento	Febrero, 2006	Surgencia	MY 10
M1-108	Sedimento	Febrero, 2006	Surgencia	MY 20
M1-109	Sedimento	Febrero, 2006	Surgencia	MY 10
M1-110	Sedimento	Febrero, 2006	Surgencia	MY 10
M1-111	Sedimento	Febrero, 2006	Surgencia	MY 5
M1-112	Sedimento	Febrero, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 5
M1-113	Sedimento	Febrero, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 5
M1-114	Sedimento	Febrero, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 20
M1-115-I	Suelo	Febrero, 2006	Humedal de Derramadores	MY 5
M1-115-II	Suelo	Febrero, 2006	Humedal de Derramadores	MY 5
M1-116	Suelo	Febrero, 2006	Humedal de Derramadores	MY 5
M1-117	Suelo	Febrero, 2006	Humedal de Derramadores	MY 10
M1-118	Suelo	Febrero, 2006	Humedal de Derramadores	MY 10
M1-120	Agua	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M1-122	Agua	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 20
M1-123	Sedimento	Febrero, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 10
M1-123-X	Agua	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M1-124	Agua	Febrero, 2006	Surgencia	MY 3
M1-125	Agua	Febrero, 2006	Surgencia	MY 5
M1-126	Agua	Febrero, 2006	Surgencia	MY 10
M1-127	Agua	Febrero, 2006	Surgencia	MY 10
M1-128	Suelo	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M1-13	Suelo	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 30
M1-130	Agua	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M1-131	Agua	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 20
M1-133-I	Agua	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 3
M1-133-II	Agua	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 3
M1-134	Agua	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 20
M1-135	Suelo	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 0,5
M1-136	Suelo	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M1-138	Suelo	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 20
M1-141	Suelo	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M1-142	Suelo	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M1-143	Suelo	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 0,5
M1-144	Agua	Febrero, 2006	Surgencia	MY 10
M1-145	Agua	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 20
M1-14-X	Agua	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 10

Tabla 6. Continuación.

CEPA	MUESTRA	ÉPOCA DE MUESTREO	LUGAR DE MUESTREO	MEDIO DE AISLAMIENTO (% p/v)*
M1-159	Suelo	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M1-16-X	Agua	Febrero, 2006	Surgencia	MY 5
M1-17	Suelo	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 30
M1-18	Sedimento	Febrero, 2006	Surgencia	MY 30
M1-180	Suelo	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 20
M1-184	Sedimento	Febrero, 2006	Surgencia	MY 10
M1-185	Sedimento	Febrero, 2006	Surgencia	MY 10
M1-186	Sedimento	Febrero, 2006	Surgencia	MY 5
M1-187-I	Agua	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M1-187-II	Agua	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M1-188	Agua	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 3
M1-19	Sedimento	Febrero, 2006	Surgencia	MY 30
M1-190	Suelo	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M1-191-I	Sedimento	Febrero, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 10
M1-191-II	Sedimento	Febrero, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 10
M1-192	Sedimento	Febrero, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 10
M1-193-I	Sedimento	Febrero, 2006	Surgencia	MY 20
M1-193-II	Sedimento	Febrero, 2006	Surgencia	MY 20
M1-194	Agua	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 4
M1-195	Agua	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 3
M1-196	Suelo	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 4
M1-198	Suelo	Febrero, 2006	Humedal de Derramadores	MY 5
M1-199	Suelo	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M1-20	Suelo	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 30
M1-200	Suelo	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M1-201	Suelo	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M1-202	Sedimento	Febrero, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 10
M1-21-X	Suelo	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 20
M1-23	Suelo	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 30
M1-5-X	Agua	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M1-7	Suelo	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 30
M1-9	Suelo	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 30
M1-97	Suelo	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 2
M1-X	Sedimento	Febrero, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 10
M1-XX	Suelo	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M2-1	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 0,5
M2-10	Suelo	Junio, 2006	Humedal de Derramadores	MY 5
M2-11	Suelo	Junio, 2006	Humedal de Derramadores	MY 5
M2-11a	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 30
M2-11d	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 30
M2-12	Suelo	Junio, 2006	Humedal de Derramadores	MY 5
M2-13	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M2-139	Sedimento	Junio, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 3
M2-14	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M2-140-I	Sedimento	Junio, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 3

Tabla 6. Continuación.

CEPA	MUESTRA	ÉPOCA DE MUESTREO	LUGAR DE MUESTREO	MEDIO DE AISLAMIENTO (% p/v)*
M2-140-II	Sedimento	Junio, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 3
M2-146	Agua	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 3
M2-147	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 20
M2-148	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M2-149	Sedimento	Junio, 2006	Surgencia	MY 5
M2-15	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M2-150	Sedimento	Junio, 2006	Surgencia	MY 3
M2-151	Sedimento	Junio, 2006	Surgencia	MY 3
M2-153	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M2-154	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M2-155	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M2-156	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M2-157	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M2-158	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M2-159	Sedimento	Junio, 2006	Surgencia	MY 5
M2-16	Suelo	Junio, 2006	Humedal de Derramadores	MY 10
M2-160	Sedimento	Junio, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 5
M2-162	Sedimento	Junio, 2006	Surgencia	MY 20
M2-163	Agua	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M2-164	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M2-165	Sedimento	Junio, 2006	Surgencia	MY 3
M2-166	Sedimento	Junio, 2006	Surgencia	MY 5
M2-167	Sedimento	Junio, 2006	Surgencia	MY 10
M2-168	Agua	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M2-169	Agua	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M2-17	Suelo	Junio, 2006	Humedal de Derramadores	MY 10
M2-171	Suelo	Junio, 2006	Humedal de Derramadores	MY 5
M2-173	Agua	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M2-174	Agua	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M2-175	Agua	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M2-176	Agua	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M2-177	Agua	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M2-178	Agua	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M2-179	Suelo	Junio, 2006	Humedal de Derramadores	MY 10
M2-18	Suelo	Junio, 2006	Humedal de Derramadores	MY 10
M2-180	Agua	Junio, 2006	Surgencia	MY 20
M2-181	Agua	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M2-182	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 3
M2-183	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M2-183-X	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M2-19	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M2-1c	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 30
M2-1d	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 30
M2-2	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 0,5
M2-204	Suelo	Junio, 2006	Humedal de Derramadores	MY 5

Tabla 6. Continuación.

CEPA	MUESTRA	ÉPOCA DE MUESTREO	LUGAR DE MUESTREO	MEDIO DE AISLAMIENTO (% p/v)*
M2-21	Agua	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M2-22	Agua	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 20
M2-23	Suelo	Junio, 2006	Humedal de Derramadores	MY 5
M2-24	Suelo	Junio, 2006	Humedal de Derramadores	MY 20
M2-25	Suelo	Junio, 2006	Humedal de Derramadores	MY 20
M2-26	Agua	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M2-27	Agua	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M2-28	Sedimento	Junio, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 0,5
M2-29	Sedimento	Junio, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 10
M2-2a	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 30
M2-2b	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 30
M2-2d	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 30
M2-2-X	Suelo	Febrero, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M2-3	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 0,5
M2-30	Sedimento	Junio, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 20
M2-31	Sedimento	Junio, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 5
M2-32	Sedimento	Junio, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 5
M2-33	Suelo	Junio, 2006	Humedal de Derramadores	MY 5
M2-34	Sedimento	Junio, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 3
M2-35	Sedimento	Junio, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 5
M2-37	Agua	Junio, 2006	Surgencia	MY 10
M2-38	Agua	Junio, 2006	Surgencia	MY 5
M2-39	Agua	Junio, 2006	Surgencia	MY 10
M2-4	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M2-40	Agua	Junio, 2006	Surgencia	MY 0,5
M2-41	Agua	Junio, 2006	Surgencia	MY 0,5
M2-42	Suelo	Junio, 2006	Humedal de Derramadores	MY 0,5
M2-43	Suelo	Junio, 2006	Humedal de Derramadores	MY 0,5
M2-44	Suelo	Junio, 2006	Humedal de Derramadores	MY 10
M2-45	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 3
M2-46	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 3
M2-47	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M2-49	Sedimento	Junio, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 3
M2-4a	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 30
M2-4b	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 30
M2-4c	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 30
M2-4d	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 30
M2-5	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M2-50	Sedimento	Junio, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 10
M2-52	Sedimento	Junio, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 10
M2-53	Agua	Junio, 2006	Surgencia	MY 0,5
M2-55	Agua	Junio, 2006	Surgencia	MY 0,5
M2-56	Sedimento	Junio, 2006	Surgencia	MY 3
M2-57	Suelo	Junio, 2006	Humedal de Derramadores	MY 3
M2-58	Suelo	Junio, 2006	Humedal de Derramadores	MY 10

Tabla 6. Continuación.

CEPA	MUESTRA	ÉPOCA DE MUESTREO	LUGAR DE MUESTREO	MEDIO DE AISLAMIENTO (% p/v)*
M2-59	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M2-6	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M2-61	Agua	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 3
M2-62	Suelo	Junio, 2006	Humedal de Derramadores	MY 0,5
M2-63	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M2-64	Suelo	Junio, 2006	Humedal de Derramadores	MY 0,5
M2-65	Suelo	Junio, 2006	Humedal de Derramadores	MY 5
M2-66-B	Suelo	Junio, 2006	Humedal de Derramadores	MY 10
M2-66-M	Suelo	Junio, 2006	Humedal de Derramadores	MY 10
M2-67	Sedimento	Junio, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 10
M2-68	Agua	Junio, 2006	Surgencia	MY 0,5
M2-69	Agua	Junio, 2006	Surgencia	MY 10
M2-7	Agua	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 3
M2-70	Agua	Junio, 2006	Surgencia	MY 10
M2-72	Sedimento	Junio, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 3
M2-74	Sedimento	Junio, 2006	Surgencia	MY 20
M2-76	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M2-77	Agua	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 3
M2-78	Agua	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M2-79	Agua	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M2-7a	Sedimento	Junio, 2006	Surgencia	MY 30
M2-7b	Sedimento	Junio, 2006	Surgencia	MY 30
M2-7c	Sedimento	Junio, 2006	Surgencia	MY 30
M2-8	Sedimento	Junio, 2006	Surgencia	MY 30
M2-81	Agua	Junio, 2006	Surgencia	MY 10
M2-82	Sedimento	Junio, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 5
M2-83	Suelo	Junio, 2006	Humedal de Derramadores	MY 5
M2-85	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M2-86	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 5
M2-87-I	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 3
M2-87-II	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 3
M2-88	Agua	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 20
M2-89	Agua	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 20
M2-9	Agua	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 10
M2-90	Sedimento	Junio, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 0,5
M2-91	Sedimento	Junio, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 0,5
M2-93	Sedimento	Junio, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 3
M2-9a	Agua	Junio, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 30
M2-9b	Agua	Junio, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 30
M2-X	Suelo	Junio, 2006	Finca de la Salina	MY 3
M2-XX	Suelo	Junio, 2006	Humedal de Derramadores	MY 5
M2-3X	Sedimento	Junio, 2006	Trasvase Tajo-Segura	MY 3
M2-4X	Agua	Junio, 2006	Surgencia	MY 5
M3-1	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 3
M3-10	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 10

Tabla 6. Continuación.

CEPA	MUESTRA	ÉPOCA DE MUESTREO	LUGAR DE MUESTREO	MEDIO DE AISLAMIENTO (% p/v)*
M3-100	Agua	Febrero, 2007	Surgencia	MY 0,5
M3-101	Agua	Febrero, 2007	Surgencia	MY 0,5
M3-102	Agua	Febrero, 2007	Surgencia	MY 3
M3-103	Agua	Febrero, 2007	Surgencia	MY 3
M3-104	Agua	Febrero, 2007	Surgencia	MY 3
M3-105	Agua	Febrero, 2007	Surgencia	MY 3
M3-106	Agua	Febrero, 2007	Surgencia	MY 3
M3-107	Agua	Febrero, 2007	Surgencia	MY 10
M3-109	Agua	Febrero, 2007	Surgencia	MY 10
M3-11	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 10
M3-110	Agua	Febrero, 2007	Surgencia	MY 10
M3-111	Agua	Febrero, 2007	Surgencia	MY 10
M3-112	Agua	Febrero, 2007	Surgencia	MY 10
M3-12	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 20
M3-120	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 0,5
M3-121	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 10
M3-122	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 0,5
M3-123	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 10
M3-125	Sedimento	Febrero, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 3
M3-126	Sedimento	Febrero, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 3
M3-127	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 0,5
M3-128	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 3
M3-129	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-13	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 20
M3-130	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 3
M3-131	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-14	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 0,5
M3-15	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 0,5
M3-17	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 3
M3-18	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 3
M3-19	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 0,5
M3-1a	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 30
M3-1c	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 30
M3-1d	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 30
M3-2	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 3
M3-20	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 3
M3-21	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 3
M3-22	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 3
M3-23	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-24	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-25	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-26	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 10
M3-27	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 10
M3-28	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 10
M3-29	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 10

Tabla 6. Continuación.

CEPA	MUESTRA	ÉPOCA DE MUESTREO	LUGAR DE MUESTREO	MEDIO DE AISLAMIENTO (% p/v)*
M3-2a	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 30
M3-2b	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 30
M3-2d	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 30
M3-3	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-31	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 0,5
M3-32	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 0,5
M3-33	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 3
M3-34	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 3
M3-35	Sedimento	Febrero, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 3
M3-36	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 3
M3-37	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 3
M3-38	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 3
M3-39	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 5
M3-4	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-40	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 5
M3-41	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 5
M3-42	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 5
M3-43	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 5
M3-44	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 5
M3-45	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 10
M3-46	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 10
M3-47	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 20
M3-48	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 10
M3-49	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 10
M3-4a	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 30
M3-4X	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 5
M3-5	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-50	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 10
M3-51	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 10
M3-52	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 10
M3-53	Sedimento	Febrero, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 0,5
M3-54	Sedimento	Febrero, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 0,5
M3-55	Sedimento	Febrero, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 0,5
M3-56	Sedimento	Febrero, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 3
M3-57	Sedimento	Febrero, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 3
M3-58	Sedimento	Febrero, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 3
M3-59	Sedimento	Febrero, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 3
M3-6	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-60	Sedimento	Febrero, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 3
M3-61	Sedimento	Febrero, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 3
M3-62	Sedimento	Febrero, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 5
M3-63	Sedimento	Febrero, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 5
M3-64	Sedimento	Febrero, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 5
M3-65	Sedimento	Febrero, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 10
M3-66	Sedimento	Febrero, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 10

Tabla 6. Continuación.

CEPA	MUESTRA	ÉPOCA DE MUESTREO	LUGAR DE MUESTREO	MEDIO DE AISLAMIENTO (% p/v)*
M3-67	Sedimento	Febrero, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 10
M3-68	Sedimento	Febrero, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 10
M3-69	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 0,5
M3-7	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-70	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 0,5
M3-70-X	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 0,5
M3-72	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 0,5
M3-73	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 0,5
M3-74	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 0,5
M3-75	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 0,5
M3-76	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 3
M3-77	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 3
M3-78	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 3
M3-79	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-7b	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 30
M3-8	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 10
M3-80	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-81	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-82	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-83	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 10
M3-84	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 10
M3-85	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-86	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-87	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-88	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-89	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-8a	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 30
M3-8b	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 30
M3-8c	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 30
M3-8d	Sedimento	Febrero, 2007	Surgencia	MY 30
M3-9	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 10
M3-90	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-91	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-92	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-93	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-94	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-95	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-96	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-97	Agua	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M3-9b	Agua	Febrero, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 30
M3-X	Suelo	Febrero, 2007	Finca de la Salina	MY 0,5
M3-XX	Sedimento	Febrero, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 10
M3-3X	Agua	Febrero, 2007	Surgencia	MY 0,5
M4-1	Agua	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 0,5
M4-10	Agua	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 10

Tabla 6. Continuación.

CEPA	MUESTRA	ÉPOCA DE MUESTREO	LUGAR DE MUESTREO	MEDIO DE AISLAMIENTO (% p/v)*
M4-100	Sedimento	Noviembre, 2007	Surgencia	MY 3
M4-101	Sedimento	Noviembre, 2007	Surgencia	MY 3
M4-102	Sedimento	Noviembre, 2007	Surgencia	MY 5
M4-103	Sedimento	Noviembre, 2007	Surgencia	MY 5
M4-104	Sedimento	Noviembre, 2007	Surgencia	MY 5
M4-105	Sedimento	Noviembre, 2007	Surgencia	MY 10
M4-106	Sedimento	Noviembre, 2007	Surgencia	MY 10
M4-107	Sedimento	Noviembre, 2007	Surgencia	MY 10
M4-11	Agua	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 10
M4-12	Agua	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 10
M4-13	Agua	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 10
M4-14	Agua	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 20
M4-15	Agua	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 20
M4-16	Agua	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 20
M4-17	Agua	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 20
M4-18	Suelo	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 0,5
M4-19	Suelo	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 0,5
M4-1a	Suelo	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 30
M4-1b	Suelo	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 30
M4-1c	Suelo	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 30
M4-2	Agua	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 0,5
M4-20	Suelo	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 3
M4-21	Suelo	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 3
M4-22	Suelo	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 3
M4-23	Suelo	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 3
M4-24	Suelo	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 3
M4-26	Suelo	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M4-28	Suelo	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M4-29	Suelo	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M4-3	Agua	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 0,5
M4-30	Suelo	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M4-31	Suelo	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M4-32	Suelo	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 10
M4-33	Suelo	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 10
M4-34	Suelo	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 10
M4-35	Suelo	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 10
M4-36	Suelo	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 20
M4-37	Sedimento	Noviembre, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 0,5
M4-38	Sedimento	Noviembre, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 3
M4-39	Sedimento	Noviembre, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 3
M4-3B	Agua	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M4-3M	Agua	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 5
M4-4	Agua	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 0,5
M4-40	Sedimento	Noviembre, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 5
M4-42	Sedimento	Noviembre, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 5

Tabla 6. Continuación.

CEPA	MUESTRA	ÉPOCA DE MUESTREO	LUGAR DE MUESTREO	MEDIO DE AISLAMIENTO (% p/v)*
M4-43	Sedimento	Noviembre, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 5
M4-44	Sedimento	Noviembre, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 5
M4-45	Sedimento	Noviembre, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 5
M4-46	Sedimento	Noviembre, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 5
M4-47	Sedimento	Noviembre, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 5
M4-48	Sedimento	Noviembre, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 5
M4-49	Sedimento	Noviembre, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 5
M4-4a	Suelo	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 30
M4-4b	Suelo	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 30
M4-4c	Suelo	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 30
M4-4d	Suelo	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 30
M4-5	Agua	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 3
M4-50	Sedimento	Noviembre, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 10
M4-51	Sedimento	Noviembre, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 10
M4-52	Sedimento	Noviembre, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 10
M4-53	Sedimento	Noviembre, 2007	Trasvase Tajo-Segura	MY 20
M4-54	Agua	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 0,5
M4-55	Agua	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 0,5
M4-56	Agua	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 3
M4-57	Agua	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 3
M4-58	Agua	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 3
M4-59	Agua	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 3
M4-5a	Agua	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 3
M4-6	Agua	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 3
M4-60	Agua	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 3
M4-61	Agua	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 3
M4-62	Agua	Noviembre, 2007	Finca de la Salina	MY 5

*. se pudo comprobar que todas las cepas que se aislaron en el medio MY al 30 % (p/v) era arqueas (véase el Capítulo 2).

III.1.4. DISCUSION

Los cambios de salinidad, afectan al funcionamiento de los ecosistemas alterando los procesos bióticos y abióticos (Nielsen y col., 2003). Los cambios de la biota se deben fundamentalmente a que los iones cloruro afectan directamente al pH, oxígeno disuelto y balance de nutrientes (Bailey, 2002). Además, el efecto que este cambio produce en la microbiota depende de la tolerancia a la sal de las especies (Csonka y Hanson, 1991).

En este estudio se observó que existía cierta relación entre la época del año y el número de microorganismos en el hábitat, de manera que los mayores recuentos, del orden de 10^6 - 10^7 UFC/ml, se obtuvieron en los meses de junio de 2006 y noviembre de 2007, en los que las precipitaciones fueron prácticamente nulas según consta en los registros de la Agencia Estatal de Meteorología. Esto parece lógico si se tiene en cuenta que, aunque en el Humedal de Ajauque y Rambla Salada llueve poco, en invierno las lluvias producen una dilución de la microbiota de la rizosfera en general y de la halófila en particular ya que disminuye la concentración de cloruro (Velasco y col., 2006). Por otra parte, dichos recuentos se mantuvieron con valores similares en un amplio margen de concentración de sales utilizadas en los medios y que oscilaron entre el 3 y el 20 % (p/v). Este hecho puede deberse a la adaptación de los microorganismos a las distintas concentraciones de sal que se producen en un mismo hábitat a lo largo de las distintas épocas del año a causa de las variaciones climatológicas, como es la pluviosidad, que afectan directamente a los parámetros físico-químicos y por consiguiente, a la microbiota existente.

La mayoría de la cepas seleccionadas procedían de los medios MY al 5 % (p/v) y MY al 10 % (p/v), incubados a 32 °C durante cinco días, con 135 y 117 cepas seleccionadas respectivamente, ya que en estos medios, además de elevados recuentos también se observó una gran diversidad colonial lo que sin duda influyó en la selección de colonias; además casi todas las cepas seleccionadas a estas concentraciones de sales fueron subcultivadas con éxito, cosa que no siempre sucedió con las colonias seleccionadas a mayores y menores concentraciones. Este hecho pudiera indicar que en el Humedal de Ajauque y Rambla Salada existe una diversidad procariota dominada por las bacterias halófilas moderadas; pero también podría indicar el marcado carácter eurihalino de las bacterias de este hábitat; es decir, muchas de las cepas que crecieron al 5 y 10% (p/v) de sales en los medios de aislamiento posiblemente eran las mismas que crecieron, aunque peor, en los medios de baja y alta salinidad y que en resiembras posteriores se perdieron al no ser cultivadas en una concentración óptima.

Por otro lado, las cepas seleccionadas a partir del medio MY al 30 % (p/v) eran sólo arqueas, como posteriormente se pudo observar en el Capítulo 2, y procedían únicamente de la incubación de este medio a 41 °C durante dos semanas, no observándose crecimiento en el lote de placas que se incubaron a 37 °C durante cinco días. Este hecho es algo inusual porque

en otros hábitats hipersalinos hemos logrado aislar bacterias en medios con estas elevadas concentraciones de sales (Martínez-Cánovas y col., 2004). Por otra parte también merece la pena destacar el hallazgo de un número tan significativo de arqueas halófilas en un hábitat donde la salinidad más alta registrada fue del 17,76 % (p/v). La mayoría de estas cepas se aislaron de los ambientes de mayor salinidad como son algunas de las muestras de la finca de la Salina y la surgencia (Figura 6), pero también se hallaron algunas de ellas en las otras estaciones de muestreo que tenían un contenido salino muy bajo, confirmándose el hecho de que estos microorganismos pueden permanecer viables en medios de baja concentración de sales (Ventosa, 2006; Elshahed y col., 2004).

También podemos adelantar, como se comprueba más adelante en el Capítulo 2, que tampoco hemos encontrado en ninguno de nuestros muestreos la bacteria *Salinibacter* que es halófila extrema y que coincide con las arqueas en muchas de sus características más significativas como es, entre otras, el crecimiento óptimo a temperaturas bastante elevadas (Anton y col., 2002).

Finalmente diremos que los elevados recuentos obtenidos en las cuatro zonas estudiadas del Humedal de Ajauque y Rambla Salada, indican que existe una elevada comunidad de procariotas, cuyo estudio es importante para conocer mejor el Espacio Protegido que constituye este hábitat, ya que hasta la fecha sólo ha sido estudiado a nivel eucariota (Velasco y col., 2006; 2009; Gutiérrez-Cánovas y col., 2009).

CAPÍTULO 2: *CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA*

III.2.1. RESUMEN

Las cepas seleccionadas en el capítulo anterior fueron caracterizadas taxonómicamente mediante un análisis polifásico que incluía estudios fenotípicos y filogenéticos y en algunos casos también genotípicos y quimiotáxonómicos.

La metodología empleada para la caracterización fenotípica se basó en las descripciones hechas por Ventosa y colaboradores (1982), Quesada y colaboradores (1983) y Mata y colaboradores (2002), así como en las recomendaciones del Comité Internacional de Taxonomía para la descripción de nuevas especies de la familia *Halomonadaceae* (Arahal y col., 2007) y del orden *Halobacteriales* (Oren y col., 1997b). El estudio filogenético se realizó mediante el análisis de la secuenciación parcial del gen del ARNr 16S (Ludwig y Schleifer, 1999; Ludwig y Klenk, 2001). Para la propuesta de nuevas especies se procedió a la secuenciación total de dicho gen.

El análisis se completó mediante estudios genotípicos para la determinación del contenido en G+C del ADN genómico mediante el método gráfico descrito por Ferragut y Leclerc (1976) en aquellas nuevas especies filogenéticamente muy próximas a las ya descritas.

Por último, se determinó también el contenido en ácidos grasos y quinonas respiratorias en todas aquellas cepas candidatas a constituir nuevos taxa.

Como resultado de este estudio hemos identificado, hasta el momento, dos nuevas especies pertenecientes al género *Halomonas*, una nueva especie del género *Marinobacter*, otra especie del género *Pseudoalteromonas* y un nuevo género de la familia *Halobacteriaceae*. Estas especies son: *Halomonas lipolytica*, *Halomonas proteolytica*, *Marinobacter halophilus*, *Pseudoalteromonas salina* y *Salinearchaeom rambliculum*.

III.2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

III.2.2.1. Caracterización fenotípica

III.2.2.1.1. Caracterización fenotípica de las cepas bacterianas

Para la identificación de las cepas bacterianas se realizaron un total de 88 pruebas fenotípicas que se detallan en la Tabla 7. Las cepas que posteriormente fueron identificadas como *Halomonas* spp. fueron caracterizadas con 50 pruebas adicionales las cuales se señalan en dicha tabla mediante un asterisco (*).

La metodología seguida se recoge en los artículos de Ventosa y colaboradores (1982), Quesada y colaboradores (1983), Mata y colaboradores (2002) y Arahál y colaboradores (2007).

La composición detallada de todos los medios así como las soluciones o reactivos necesarios para la lectura de las pruebas se describe en el anexo II. Salvo indicación explícita todos los medios empleados en este capítulo se prepararon a un valor de pH igual a 7 con el medidor de pH *CRISON micro pH2000* y se esterilizaron en autoclave a 112 °C durante 30 minutos.

Tabla 7. Pruebas fenotípicas seleccionadas para la caracterización de las cepas bacterianas.

MORFOLÓGICAS Y CULTURALES	FISIOLÓGICAS	BIOQUÍMICAS	NUTRICIONALES		SENSIBILIDAD A AGENTES ANTIMICROBIANOS
Morfología colonial y celular	Crecimiento a distintas	Arginina deshidrolasa	Carbohidratos	Alcoholes	Aminoglucosidos
Tinción de Gram	• concentraciones de sal (% p/v): 1; 3; 5; 7,5; 10; 15; 20 y 30	β-galactosidasa	• Almidón*	• Adonitol*	• Gentamicina (10 µg)
Movilidad	• temperaturas (°C): 22; 32; 37; 41 y 55	Catalasa	• L-arabinosa*	• Etanol*	• Tobramicina (10 µg)
Tinción de esporas	• valores de pH: 5; 6; 7; 8 y 9	DNAsa	• D-celobiosa*	• Glicerol	β-lactámicos
	Crecimiento	Fosfatasa	• Esculina*	• mio-inositol*	• Amoxicilina (25 µg)
	• tras calentamiento a 80 °C	Gelatinasa	• D-fructosa	• D-manitol*	• Ampicilina (10 µg)
	• en anaerobiosis	Hemólisis en agar sangre	• D-galactosa	• 2-propanol*	• Penicilina G (10 UI)
		Lecitinasa	• D-glucosa	• D-sorbitol*	Macrólidos
		Ornitina descarboxilasa	• Lactosa	Aminoácidos	• Eritromicina (15 µg)
		Oxidasa	• D-maltosa*	• L-alanina	Polipeptidos
		Triptófano desaminasa	• D-manosa*	• L-arginina*	• Polimixina B (300 UI)
		Ureaasa	• D-meicitosa*	• Creatina*	Quinolonas
		Voges-Proskauer	• Melibiosa*	• L-cisteína*	• Ácido Nalidixico (30 µg)
		Producción de H ₂ S	• D-rafinosa*	• L-histidina	Rifamicinas
		Producción de indol	• L-ramnosa*	• L-isoleucina*	• Rifampicina (5 µg)
		Crecimiento en agar	• Ribosa*	• L-leucina*	Sulfamidas
		• Cetrimida	• D-salicina*	• L-lisina*	• Sulfamida (300 UI)
		• Mac Conkey	• D-trealosa*	• L-metionina*	Tetraciclinas
		Hidrólisis de	• D-xilosa*	• L-ornitina*	• Tetraciclina (30 UI)
		• Almidón	Ácidos	• L-fenilalanina*	
		• Caseína	• Acetato*	• L-prolina*	
		• Esculina	• L-aspartato*	• L-serina*	
		• Tirosina y pigmento	• Benzoato*	• L-treonina*	
		• Tween 20 y 80	• Caprilato*	• L-triptófano*	
		Óxido-fermentación de la glucosa	• Citrato	• L-valina*	
		Reducción de nitratos y nitritos	• Formato*		
		Respiración sobre nitratos	• D-gluconato*		
		Respiración sobre fumarato*	• D-glutamato*		
		Producción de ácidos a partir de	• Hipurato*		
		• Amigdalina	• DL-β-hidroxybutirato*		
		• L-arabinosa	• DL-lactato*		
		• D-glucosa	• Malato*		
		• D-celobiosa	• Malonato*		
		• D-manitol	• Propionato*		
		• mio-inositol	• Piruvato*		
		• Sacarosa	• Succinato		
		• D-sorbitol	• Tartrato*		
		• L-ramnosa			

*, pruebas realizadas únicamente sobre las cepas identificadas como especies de *Halomonas* que pudieran constituir nuevos taxa.

A) Pruebas morfológicas

Las pruebas que se describen en este apartado se llevaron a cabo utilizando el medio sólido de MY al 5 % (p/v) tras 24 horas de incubación a 32 °C a excepción de la tinción de esporas, para la cual el cultivo se incubó durante 5 días.

Tinción de Gram

Se siguió la técnica usual para observar la movilidad y la respuesta tintorial de cada microorganismo. Se observó también la tendencia a la formación de asociaciones celulares y la capacidad de las células de teñirse de forma homogénea.

Movilidad

Para esta prueba se añadieron al cultivo 2 ml de solución de sales al 5 % (p/v) y pasadas 2 horas, se observó la suspensión resultante al microscopio óptico mediante el método de la gota pendiente.

Tinción de esporas

Se siguió el método de Schaeffer y Fulton (1933). En los casos dudosos se cultivó el microorganismo en el medio de Norris y colaboradores (1981), modificado convenientemente con la adición de almidón al 1 % (p/v) para favorecer la esporulación y añadiendo solución de sales al 5 % (p/v).

Morfología colonial

Se observó la morfología colonial de cada cepa en cuanto a tamaño, forma, consistencia y borde. La pigmentación de las colonias se anotó tras incubar el cultivo durante una semana.

B) Pruebas fisiológicas

Para las siguientes pruebas se utilizaron 10 µl de inóculo de la cepa objeto de estudio que se había cultivado previamente en 5 ml de medio MY al 5 % (p/v) a 32 °C durante 24 horas con una agitación de 100 rpm.

Crecimiento a distintas concentraciones de sales, temperatura y pH

Se ensayaron las siguientes condiciones:

- a) Concentración de sales (% p/v): 1; 3; 5; 7,5; 10; 15; 20 y 30.
- b) Temperaturas (°C): 22; 32; 37; 41 y 55.
- c) Valores de pH: 5; 6; 7; 8; 9 y 10.

Para determinar las condiciones de crecimiento óptimo, se realizó una primera lectura de las placas a las 24 horas. Posteriormente se hizo una segunda lectura tras 7 días de incubación para comprobar si el microorganismo era capaz de crecer o no en el resto de las condiciones.

Crecimiento en anaerobiosis

Las placas se incubaron durante 7 días en las jarras de anaerobiosis comercializadas por OXOID®. Para crear un ambiente exento de oxígeno se empleó el Sistema Anaeróbico AnaeroGen™, de la misma casa comercial. Paralelamente se realizó un control en aerobiosis del mismo inóculo y medio.

Producción de esporas

Para conocer de forma indirecta si las cepas eran capaces de producir esporas, se sometieron los inóculos a un calentamiento a 80 °C durante 60 minutos y posteriormente se observó si el microorganismo era capaz de crecer en el medio MY al 5 % (p/v) de sales.

C) Pruebas bioquímicas

Estas pruebas se hicieron mediante siembra de 10 µl de un inóculo de 24 horas en medio MY líquido al 5 % (p/v) en cada uno de los medios a ensayar, con excepción de las pruebas de catalasa y de oxidasa, que se realizaron con un cultivo de 24 horas en el medio MY sólido al 5 % (p/v). En la Tabla 8 se incluye una relación de las mismas.

Catalasa

Para la realización de esta prueba se adicionó directamente agua oxigenada de 10 volúmenes a un cultivo de 24 horas. La aparición de burbujas indicó la formación de oxígeno y por tanto, la presencia de la enzima (Figura 8).

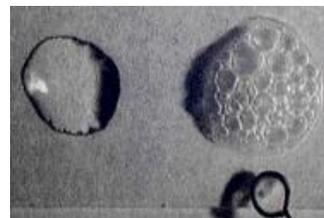


Figura 8. Prueba de la catalasa.

Oxidasa

Para detectar la enzima citocromo C oxidasa se realizó la extensión de un cultivo de 24 horas sobre un papel de filtro y rápidamente se depositó una gota de solución acuosa de N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilendiamina al 1 % (p/v).



Figura 9. Prueba de la oxidasa.

Se dio la prueba como positiva si el reactivo era oxidado a un color azul-violáceo oscuro antes de 10 segundos (Figura 9).

Crecimiento en agar Mac Conkey*

Con esta prueba se puede analizar si el microorganismo tolera los medios de baja tensión superficial.

El medio se preparó suspendiendo 51,5 g del medio deshidratado Agar Mac Conkey (Panreac[®]) en 1.000 ml de solución de sales al 5 % (p/v). En ésta y las siguientes pruebas marcadas con asterisco (*) la incubación se realizó a 32 °C durante 7 días con lecturas diarias.

Crecimiento en agar Cetrimida*

Se suspendieron 45,7 g del medio deshidratado Agar Cetrimida (Difco[®]) en 1.000 ml de solución de sales al 5 % (p/v). Se observó si la cepa era capaz de crecer en este medio ya que la cetrimida actúa inhibiendo el crecimiento de la mayoría de los microorganismos con excepción de *Pseudomonas aeruginosa* y otros microorganismos Gram negativos no fermentadores.

Hemolisis en agar-sangre*

Esta prueba permitió observar la actividad hemolítica de los microorganismos mediante la aparición de un halo transparente (hemolisis total o β) o verdoso (hemolisis parcial o α) alrededor del crecimiento bacteriano (Figura 10).

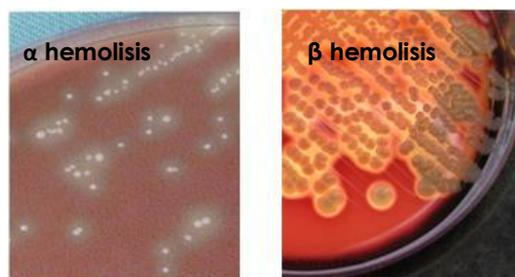


Figura 10. Prueba de hemolisis en agar sangre.

Hidrólisis de la esculina*

Se observó si aparecía un ennegrecimiento sobre y alrededor del crecimiento bacteriano, lo que nos indica la hidrólisis de la esculina y la formación de esculetina, la cual, con el ión férrico presente en el medio de cultivo, forma un complejo férrico de color negro (Figura 11).

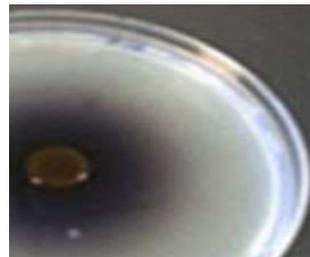


Figura 11. Prueba de hidrólisis de la esculina.

Hidrólisis de la tirosina y formación de pigmento*

Mediante esta prueba se observó la hidrólisis de este compuesto por la disolución de los cristales de tirosina debajo y alrededor del crecimiento bacteriano. Se observó también la aparición de un color marrón sobre y alrededor de la zona de crecimiento lo que indicó la formación de pigmento (Figura 12).



Figura 12. Prueba de hidrólisis de la tirosina.

Hidrólisis del almidón*

Se utilizó el medio sólido de MY al 5 % (p/v) al que se le suprimió la glucosa, adicionándole en su defecto almidón (ADSA[®]) al 1 % (p/v) (Cowan y Steel, 1993). La lectura se realizó inundando la placa con una solución de lugol.

El medio adquirió un color marrón oscuro allí donde existía almidón sin hidrolizar. La hidrólisis se observó por la aparición de halos sin teñir alrededor de la extensión del microorganismo que poseía la enzima amilasa (Figura 13).



Figura 13. Prueba de hidrólisis de almidón.

Hidrólisis del Tween 20* y Tween 80*

Se siguió el método de Sierra (1957) para el estudio de la actividad lipolítica y se ensayaron dos derivados del polioxietilén sorbitan, el Tween 20 y el Tween 80.

Se observó, en los casos positivos, la aparición de un halo opaco alrededor del crecimiento bacteriano debido a la precipitación de la sal cálcica del ácido liberado (Figura 14).



Figura 14. Prueba de hidrólisis de Tween 20.

Producción de lecitinasa*

Esta prueba se realizó siguiendo la metodología descrita por Larpent y Larpent-Gourgand (1957).

Se observó en los casos positivos la opalescencia del medio alrededor de la zona de crecimiento. Cuando la actividad lecitinasa se acompañaba de propiedades lipolíticas, se formaba una capa superficial de coloración alrededor del crecimiento bacteriano (Figura 15).

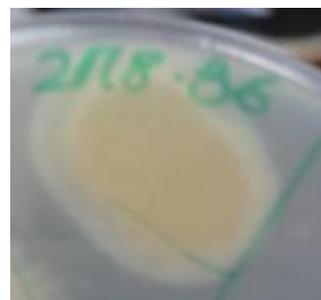


Figura 15. Prueba de producción de lecitinasa.

Producción de ADNasa*

Se utilizó el medio deshidratado ADNasa Agar (ADSA[®]), el cual se preparó suspendiendo 42g en 1.000 ml de solución de sales al 5 % (p/v).

Para la lectura se vertió HCl 1N (Panreac[®]) sobre la placa, que precipita el ADN intacto confiriendo opacidad al medio. En los microorganismos productores de la enzima aparece un halo claro alrededor del crecimiento (Jeffries y col., 1957) (Figura 16).



Figura 16. Producción de ADNasa.

Producción de fosfatasa*

Se llevó a cabo la lectura adicionando sobre la placa una solución de amoníaco concentrado (Panreac®). La aparición de un color rosa sobre y alrededor del crecimiento bacteriano indicó la liberación de la fenolftaleína, que con el amonio adquiere color rosado (Baird-Parker, 1963) (Figura 17).



Figura 17. Producción de fosfatasa.

Hidrólisis de la caseína*

Se siguió el método modificado de Hastings (1904). A 500 ml de leche desnatada se le añadió el mismo volumen de medio sólido de MY al 5 % (p/v) y elaborado a doble concentración en todos sus componentes; tanto la leche como el medio deben estar previamente estériles y atemperados a 55-60°C. La mezcla resultante se repartió en placas.

En la lectura se observaron halos de aclaramiento alrededor de la extensión del microorganismo cuando la prueba era positiva. Para los casos dudosos, se utilizó el reactivo de Frazier (Frazier, 1926); si la zona de aclaramiento decrecía tras la adición del mismo, era indicativo de que la caseína no había sido hidrolizada totalmente (Cowan y Steel, 1993) (Figura 18).



Figura 18. Prueba de la hidrólisis de la caseína.

Prueba de oxido-fermentación de la glucosa*

Se utilizó como medio base el descrito por Ventosa y colaboradores (1982), adicionado de un 1% (p/v) de glucosa y distribuido en tubos Weimberg. La bacteria se inoculó en profundidad utilizando una pipeta Pasteur estéril en el medio previamente regenerado. Rápidamente se cubrió con agar estéril al 1 % (p/v) calentado a sobrefusión, formando un tapón de unos dos centímetros y a continuación se añadió parafina estéril.

Se hicieron lecturas diarias y se anotaron la producción de ácidos en ausencia de oxígeno mediante el viraje del indicador rojo fenol a amarillo. La observación diaria de los tubos es fundamental para evitar falsos resultados negativos debidos al reviraje del indicador con el tiempo. Se anotó también la producción de gas observada por el desplazamiento del tapón de agar o burbujas en el fondo del tubo (Callies y Mannhein, 1978) (Figura 19).



Figura 19. Prueba de oxido-fermentación de la glucosa.

Respiración sobre nitratos* y fumarato*

Se utilizó el mismo medio de cultivo que para la prueba de óxido-fermentación de la glucosa y se le añadió nitrato potásico al 0,1 % (p/v) o fumarato potásico al 0,08 % (p/v). Las condiciones de inoculación e incubación no se modificaron.

En el caso de la respiración sobre nitratos, para el inóculo se transfirieron 50µl de un cultivo líquido de 24 horas crecido en medio MY al 5 % (p/v) al mismo medio adicionado de 0,1 % de nitrato potásico y se incubó de nuevo 24 horas sin agitación para su posterior inoculación en los tubos Weimberg.

La prueba se consideró positiva cuando se observó crecimiento en el tubo sin producción de ácidos, lo que indicaba que se había producido una respiración. Como en el caso anterior se anotó también la producción de gas observada por el desplazamiento del tapón de agar o burbujas en el fondo del tubo (Callies y Mannhein, 1978) (Figura 20).



Figura 20. Prueba de respiración sobre nitratos.

Reducción de nitratos y nitritos

En este ensayo se detectaron las actividades nitrato y nitrito reductasa.

Se siguió el método propuesto por Skerman en 1967. El medio, que contenía nitrato potásico (Panreac®), se distribuyó en tubos de hemolisis con campana Durham previo a su esterilización. Tras 5 días de incubación a 32 °C se procedió a la lectura, observándose en primer lugar la presencia o ausencia de gas en el interior de la campana. La presencia de gas

indicó que no había nitratos en el medio, por haberse reducido inicialmente a nitritos y éstos haberse reducido nuevamente hasta dinitrógeno gas u otras especies gaseosas intermedias. En los tubos en los que no había gases en la campana, se adicionó 1 ml de los reactivos de nitratos A y B. La aparición de un color rojo intenso indicó la presencia de nitritos en el medio. En los casos negativos se añadió a cada tubo granalla de zinc (aproximadamente 5 mg/ml); la aparición de un color rojo indicó que aún existían nitratos en el medio, con lo cual la prueba era dada como negativa.

El esquema a seguir para la interpretación de los resultados se detalla en la Figura 21.

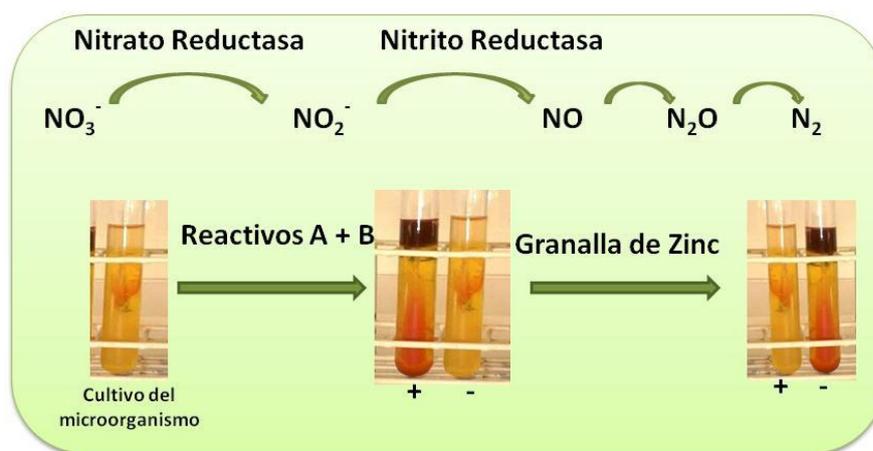


Figura 21. Reacción enzimática en la reducción de nitratos y nitritos.

En la Tabla 8, se muestra un cuadro resumen con los medios de cultivo descritos.

Batería de pruebas API 20E (Biomerieux®)

API 20E es un sistema estandarizado que permite la identificación de bacterias no exigentes, mediante 20 pruebas bioquímicas miniaturizadas. Los microtubos, que contienen los sustratos deshidratados, se inoculan con una suspensión bacteriana en solución de sales al 5 % (p/v) procedentes de un cultivo bacteriano en MY al 5 % (p/v). Dicha solución debe ajustarse al número 0,5 de la escala de MacFarlad equivalente a la concentración de 10^7 - 10^8 UFC/ml. Las reacciones producidas durante el periodo de incubación se traducen en cambios de color o son revelados mediante la adición de reactivos siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 22; Tabla 9).

Tabla 8. Pruebas bioquímicas utilizadas para la caracterización fenotípica de las cepas bacterianas.

PRUEBA*	MEDIO DE CULTIVO
Crecimiento en:	
•Agar Cetrimida	Agar Cetrimica preparado en 5 % (p/v) de sales
•Agar Mac Conkey	Agar Mac Conkey preparado en 5 % (p/v) de sales
Hemolisis	MY al 3 % (p/v) + Sangre bovina 5 % (p/v)
Hidrólisis de	
•Almidón	MY al 5 % (p/v) (sin glucosa) + Almidón (1 %, p/v)
•Caseína	MY al 5 % (p/v) con doble concentración en su composición + Leche desnatada en igual volumen que el medio MY
•Esculina	MY al 5 % (p/v) + Esculina (0,1 %, p/v) + Citrato férrico (0,05 %, p/v)
•Tirosina y producción de pigmento	MY al 5 % (p/v) + Tirosina (0,5 %, p/v)
•Tween 20 y 80	MY al 5 % (p/v) + Tween 20 o Tween 80 (1 %, p/v)
Producción de	
•ADNasa	ADNasa Agar preparado en 5 % (p/v) de sales
•Fosfatasa	MY al 5 % (p/v) + Solución acuosa de difosfato de fenoltaleína (0,01 %, p/v)
•Lecitinasa	MY al 5 % (p/v) + 10 % (v/v) de emulsión de yema estéril preparada en 250 ml de solución salina estéril
Oxido/Fermentación de la glucosa	Glucosa (1 %, p/v) + Extracto de levadura (1 %, p/v) + Proteosa peptona (0,5 %, p/v) + Rojo fenol (0,04 %, p/v) + Sales 5 % (p/v)
Respiración sobre nitratos	Glucosa (1 %, p/v) + Extracto de levadura (1 %, p/v) + Proteosa peptona (0,5 %, p/v) + Rojo fenol (0,04 %, p/v) + Sales 5 % (p/v) + Nitrato potásico (0,1 %, p/v)
Respiración sobre fumarato	Glucosa (1 %, p/v) + Extracto de levadura (1 %, p/v) + Proteosa peptona (0,5 %, p/v) + Rojo fenol (0,04 %, p/v) + Sales 5 % (p/v) + Fumarato potásico (0,008 %, p/v)
Reducción de nitratos y nitritos	Extracto de levadura (1 %, p/v) + Proteosa peptona (0,5 %, p/v) + Glucosa (0,1 %, p/v) + Nitrato potásico (0,1 %, p/v) + Sales 5 % (p/v)

*, las pruebas de catalasa y oxidasa se realizaron con agua oxigenada de 10 volúmenes y solución acuosa de N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilendiamina al 1 % (p/v), respectivamente.



Figura 22. Galería API 20E. Crecimiento de la cepa M1-192 tras su inoculación e incubación a 32°C durante 24 horas

En la Tabla 9 se detallan las pruebas bioquímicas que componen el sistema *API20E* así como las enzimas que intervienen en cada reacción y la lectura de los resultados.

Tabla 9. Pruebas API 20E e interpretación de los resultados.

PRUEBA	REACCIÓN / ENZIMAS	NEGATIVO	POSITIVO
ONPG	Beta-galactosidasa	sin color	amarillo
ADH	Arginina deshidrolasa	amarillo	rojo o naranja
LDC	Lisina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
ODC	Ornitina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
CIT	Utilización del citrato como única fuente de carbono y energía	verde	azul
H₂S	Producción de H ₂ S	sin precipitado negro	precipitado negro
URE	Ureasa	amarillo	rojo o naranja
TDA	Triptófano desaminasa	amarillo	marrón-rojo
IND	Producción de indol	amarillo	color rosa o anillo rosa-rojo
VP	Producción de acetoina (Voges-Proskauer)	sin color	rosa-rojo
GEL	Gelatinasa	sin difusión	difusión de pigmento
GLU	Fermentación de la glucosa	azul o verde	amarillo
MAN	Fermentación del manitol	azul o verde	amarillo
INO	Fermentación del inositol	azul o verde	amarillo
SOR	Fermentación del sorbitol	azul o verde	amarillo
RHA	Fermentación de la ramnosa	azul o verde	amarillo
SAC	Fermentación de la sacarosa	azul o verde	amarillo
MEL	Fermentación de la melobiosa	azul o verde	amarillo
AMY	Fermentación de la amigdalina	azul o verde	amarillo
ARA	Fermentación de la arabinosa	azul o verde	amarillo

Batería de pruebas API 20NE (Biomerieux®)

Se trata también de un sistema estandarizado para la identificación de especies de bacilos Gram negativos no exigentes que no sean enterobacterias mediante la inclusión de 20 pruebas compuestas por 8 pruebas bioquímicas y 12 pruebas de asimilación de sustratos.

La preparación del inóculo se realizó de igual manera a la llevada a cabo para el sistema *API20E*. La lectura de los 8 microtubos que contienen las pruebas bioquímicas se realizó por cambios de color en el medio o tras la adición del reactivo correspondiente. En el caso de las 12 pruebas de asimilación de sustratos, la lectura se realiza únicamente observando crecimiento bacteriano en los microtubos. En la Tabla 10 se detallan las pruebas bioquímicas que componen el sistema *API 20NE* así como las enzimas que intervienen en cada reacción y la lectura de los resultados.

Tabla 10. Pruebas API 20NE e interpretación de los resultados.

PRUEBA	REACCIÓN / ENZIMAS	NEGATIVO	POSITIVO
NO₃	Reducción de nitratos a nitritos	sin color	rojo
	Producción de gas	rojo	sin color
GLU	Fermentación de la glucosa	azul-verdoso	amarillo
ADH	Arginina dihidrolasa	amarillo	rojo o naranja
ESC	Hidrólisis de la esculina	sin color	gris o marrón
URE	Hidrólisis de la urea	sin color	rojo o naranja
TRP	Producción de indol	amarillo	color rosa o anillo rosa-rojo
GEL	Gelatinasa	sin difusión	difusión del pigmento
OPNPG	β-galactosidasa	sin color	amarillo
GLU	Asimilación de glucosa	transparente	turbio
ARA	Asimilación de arabinosa	transparente	turbio
MNE	Asimilación de manosa	transparente	turbio
MAN	Asimilación de manitol	transparente	turbio
NAG	Asimilación de N-acetilglucosamina	transparente	turbio
MAL	Asimilación de malonato	transparente	turbio
GNT	Asimilación de gluconato	transparente	turbio
CAP	Asimilación de caprato	transparente	turbio
ADI	Asimilación de adipato	transparente	turbio
MLT	Asimilación de malato	transparente	turbio
CIT	Asimilación de citrato	transparente	turbio
PAC	Asimilación de fenilacetato	transparente	turbio

D) Pruebas nutricionales

Se estudió el empleo de diversos carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos como

única fuente de carbono y energía. Asimismo, se ensayaron varios aminoácidos para estudiar la capacidad de los microorganismos para usarlos como único aporte de carbono, nitrógeno y energía. Todos los sustratos ensayados fueron suministrados por Sigma® y pueden consultarse en la Tabla 7.

Para los estudios nutricionales de carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos se siguió la técnica de Koser (1923), modificada por Ventosa y colaboradores (1982), utilizando un medio base de sales.

El sustrato ensayado se adicionó al medio hasta la concentración final de 0,2 % (p/v) en el caso de los carbohidratos y de 0,1 % (p/v) en el caso de los alcoholes y los ácidos orgánicos. Para su esterilización, el medio se repartió en tubos de hemolisis y se trató en autoclave a vapor fluente durante 30 minutos para evitar la degradación de los compuestos. El proceso se repitió dos veces con un intervalo de 24 horas, durante el cual los tubos se incubaron a 32 °C.

Para la siembra de todas las pruebas nutricionales se utilizó un cultivo de 24 horas en el medio Koser, que a su vez se había inoculado a partir de un cultivo de 24 horas en medio MY líquido al 5 % (p/v). Este paso previo se realizó para asegurar la utilización del sustrato añadido como único aporte de carbono y energía. Los cultivos se incubaron a 32 °C durante siete días.

En cada ensayo se utilizó un tubo control sin sustrato para cada microorganismo, que se inoculó al mismo tiempo que el resto de las pruebas con el fin de evitar falsos positivos. Se utilizó también un control positivo mediante la siembra en medio MY líquido al 5% (p/v) para comprobar que el microorganismo había crecido. Se dieron como positivos los casos en que apareció una turbidez manifiesta mediante comparación con el tubo control (Figura 23).



Figura 23. Turbidez del medio Koser con glucosa tras su inoculación e incubación.

En el caso de la utilización de aminoácidos como única fuente de carbono, nitrógeno y energía, se empleó el mismo medio anterior al que se eliminó el nitrato potásico y se sustituyó el fosfato amónico dibásico por la sal sódica. Los aminoácidos en concentración del 0,1 % (p/v), se adicionaron por filtración después de haber esterilizado el medio base en autoclave.

E) Pruebas de sensibilidad a agentes antimicrobianos

Para el estudio de la sensibilidad frente a agentes antimicrobianos se siguió la técnica de Bauer y colaboradores (1966). Se utilizaron discos de celulosa de 6 mm de diámetro de Oxoid® impregnados de los distintos agentes antimicrobianos (Figura 24).

Los antibióticos gentamicina y tobramicina se ensayaron en medio MY al 2 % (p/v) ya que se inactivan a concentraciones mayores (Coronado y col., 1995); el resto de los compuesto se ensayaron en medio MY al 5 % (p/v). Los agentes antimicrobianos utilizados se muestran en la Tabla 7

Como inóculo se utilizó una suspensión del microorganismo en solución de sales al 2 % (p/v) ajustada al número 0,5 de la escala de Mac Farland. La lectura se realizó a las 24 horas de incubación a 32 °C midiendo el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento y el microorganismo se clasificó como resistente, sensible o intermedio de acuerdo con las tablas estandarizadas establecidas por Barrit y Thornsberry (1980).



Figura 24. Halos de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco de antibiótico.

En la Tabla 11 se detallan las especies válidamente descritas utilizadas como referencia.

Tabla 11. Especies de referencia utilizadas en el estudio taxonómico de las cepas bacterianas.

ESPECIE	
R1 , <i>Brevundimonas mediterranea</i>	R28 , <i>Pseudomonas halophila</i>
R2 , <i>Halomonas alimentaria</i>	R29 , <i>Salinicola marasensis</i>
R3 , <i>Halomonas almeriensis</i>	R30 , <i>Salinivibrio costicola</i>
R4 , <i>Halomonas anticariensis</i>	R31 , <i>Salipiger mucescens</i>
R5 , <i>Halomonas campaniensis</i>	R32 , <i>Vibrio aerogenes</i>
R6 , <i>Halomonas campisalis</i>	R33 , <i>Vibrio furniissi</i>
R7 , <i>Halomonas cerina</i>	R34 , <i>Yersinia massiliensis</i>
R8 , <i>Halomonas denitrificans</i>	R35 , <i>Bacillus atrophaeus</i>
R9 , <i>Halomonas desiderata</i>	R36 , <i>Bacillus badius</i>
R10 , <i>Halomonas eurihalina</i>	R37 , <i>Bacillus licheniformes</i>
R11 , <i>Halomonas fontilapidosi</i>	R38 , <i>Bacillus megaterium</i>
R12 , <i>Halomonas gudaonensis</i>	R39 , <i>Bacillus micoydes</i>
R13 , <i>Halomonas koreensis</i>	R40 , <i>Bacillus mojavenis</i>
R14 , <i>Halomonas nitroreducens</i>	R41 , <i>Bacillus pumilus</i>
R15 , <i>Halomonas organivorans</i>	R42 , <i>Bacillus subtilis</i>
R16 , <i>Halomonas shengliensis</i>	R43 , <i>Bacillus thuringiensis</i>
R17 , <i>Halomonas subglaciescola</i>	R44 , <i>Bacillus vallismortis</i>
R18 , <i>Halomonas ventosae</i>	R45 , <i>Bacillus velezensis</i>
R19 , <i>Idiomarina fortilapidosi</i>	R46 , <i>Brevibacterium marinum</i>
R20 , <i>Idiomarina ramblicola</i>	R47 , <i>Marinococcus halotolerans</i>
R21 , <i>Kushneria marisflavi</i>	R48 , <i>Oceanobacillus profundus</i>
R22 , <i>Marinobacter algicola</i>	R49 , <i>Planococcus mariticolymbae</i>
R23 , <i>Marinobacter guineae</i>	R50 , <i>Staphylococcus fleoretii</i>
R24 , <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	R51 , <i>Staphylococcus nepalensis</i>
R25 , <i>Marinobacter lipolyticus</i>	R52 , <i>Staphylococcus pasteurii</i>
R26 , <i>Palleronia marismirons</i>	R53 , <i>Virgibacillus halophilus</i>
R27 , <i>Pseudoalteromonas carragenovera</i>	R54 , <i>Virgibacillus salarius</i>

III.2.2.1.2. Caracterización fenotípica de las arqueas

Se realizaron un total de 82 pruebas fenotípicas (Tabla 12) siguiendo las recomendaciones del Comité Internacional de Taxonomía para la descripción de nuevas especies del orden *Halobacteriales* (Oren y col., 1997b).

La composición detallada de los medios así como las soluciones o reactivos necesarios para la lectura de las pruebas se describe en el anexo II.

Tabla 12. Pruebas fenotípicas seleccionadas para la caracterización de las cepas de arqueas.

MORFOLÓGICAS	FISIOLÓGICAS	NUTRICIONALES	BIOQUÍMICAS	SENSIBILIDAD A AGENTES ANTIMICROBIANOS
<p>Morfología colonial y celular</p> <p>Tinción de Gram</p> <p>Movilidad</p>	<p>Crecimiento a distintas</p> <ul style="list-style-type: none"> • concentraciones de sal (% p/v): 0; 1; 3; 5; 10; 15; 20 y 30 • temperaturas (°C): 22; 32; 37; 41 y 51. • valores de pH: 5; 6; 7; 8; 9 y 10 • concentraciones de magnesio (% p/v): 0; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 y 30 <p>Crecimiento en anaerobiosis</p> <ul style="list-style-type: none"> • en presencia de L-arginina • en presencia de nitratos 	<p>Carbohidratos</p> <ul style="list-style-type: none"> • D-fructosa • D-galactosa • D-glucosa • D-Lactosa • D-trehalosa • L-arabinosa • D-xilosa <p>Alcoholes</p> <ul style="list-style-type: none"> • D-manitol • D-sorbitol • DL-glicerol <p>Aminoácidos</p> <ul style="list-style-type: none"> • DL-alanina • L-cisteina • L-valina • L-serina 	<p>Catalasa</p> <p>Oxidasa</p> <p>Hidrólisis de</p> <ul style="list-style-type: none"> • Almidón • Tween 80 <p>Producción de</p> <ul style="list-style-type: none"> • ADNasa • Gelatinasa <p>Voges-Proskauer</p> <p>Producción de indol</p> <p>Reducción de nitratos y nitritos</p> <p>Respiración sobre nitratos</p> <p>Rojo de metilo</p> <p>Producción de ácidos a partir de carbohidratos</p> <ul style="list-style-type: none"> • L-arabinosa • D-fructosa • D-galactosa • DL-glicerol • D-glucosa • D-lactosa • D-manitol • Sacarosa • D-trealosa • D-xilosa 	<p>Aminoglicósidos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Estreptomicina (10 µg) <p>β-Lactámicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ampicilina (10 µg) • Penicilina G (10 UI) • Cefalotina (30 µg) <p>Tetraciclinas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tetraciclina (30 µg) <p>Polipéptidos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bacitracina (10 UI) <p>Macrólidos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eritromicina (15 µg) <p>Quinolonas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ácido nalidixico (30 µg) • Ciprofloxacino (5 µg) <p>Rifamicinas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Rifampicina (5 µg) <p>Sulfonamidas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Trimetropim (1,25 µg) + Sulfametoxazol (23,75 µg) <p>Fenicoles</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cloranfenicol (30 µg)

A) Pruebas morfológicas

Las pruebas de movilidad, tinción de Gram y morfología colonial se llevaron a cabo de la misma manera que las detalladas anteriormente para la caracterización de las cepas bacterianas. Únicamente se ajustó la concentración de solución de sales al 25 % (p/v) y las condiciones para un óptimo crecimiento mediante la incubación a 37 °C durante 15 días.

B) Pruebas fisiológicas

En las siguientes pruebas se utilizaron como inóculo 10 µl de un cultivo en medio MY líquido al 25 % (p/v) incubado durante 7 días a 37 °C a 100 rpm.

Crecimiento a distintas concentraciones de sales, temperatura, pH y magnesio

Siguiendo las recomendaciones de Tindall y Collins (1986), se utilizó el medio casamino (CA) para ensayar las siguientes condiciones:

- a) Concentración de sales (% p/v): 0; 1; 3; 5; 10; 15; 20 y 30.
- b) Temperaturas (°C): 22; 32; 37; 41 y 51.
- c) Valores de pH: 5; 6; 7; 8; 9 y 10.
- d) Concentraciones de magnesio (% p/v): 0; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 30. Este ensayo se llevó a cabo utilizando el medio descrito por Oren (1977b).

Para aquellas cepas en donde el crecimiento óptimo tenía lugar a altos valores de pH, se repitió el ensayo para las distintas concentraciones de sal y de temperatura utilizando el medio CA convenientemente modificado (Tindall, 1992).

Crecimiento en anaerobiosis

Se utilizó el medio M1 al que se adicionó nitrato potásico al 3 % (p/v) o L-arginina al 4 % (p/v) para estudiar si las cepas utilizaban algunos de estos compuestos como último aceptor de electrones (Oren y col., 1977b). Las placas se incubaron durante 14 días en jarras de anaerobiosis comercializadas por OXOID®. Para crear un ambiente exento de oxígeno se empleó el Sistema Anaeróbico AnaeroGen™, de la misma casa comercial que las jarras. Paralelamente se realizó un control en aerobiosis del mismo inóculo y medio.

C) Pruebas bioquímicas

Estas pruebas se realizaron utilizando como inóculo 10 µl de un cultivo del microorganismo objeto de estudio crecido a 37 °C durante 7 días en medio MY líquido al 25 % (p/v), con excepción de las pruebas de catalasa y de oxidasa que se hicieron con un cultivo de 7 días crecido en medio MY sólido al 25 % (p/v). Ambas pruebas se llevaron a cabo de igual forma a la descrita para la caracterización de las cepas bacterianas.

Las pruebas de hidrólisis del almidón y del Tween 80, producción de ADNasa, reducción de nitratos y nitritos, así como respiración sobre nitratos, se llevaron a cabo siguiendo el mismo protocolo que el utilizado en la caracterización de las cepas bacterianas (apartado III.2.2.1.1.C) con los medios y las condiciones de crecimiento óptimos para las cepas de arqueas. El resto de las pruebas bioquímicas ensayadas se describen a continuación.

Producción de gelatinasa*

Se siguió el método de Frazier (1926), modificado en placa siguiendo las recomendaciones de Sneath y Collins (1974).

La detección de la enzima se realizó añadiendo el reactivo de Frazier, el cual reacciona con la gelatina dando lugar a un complejo opaco blanquecino. La observación de un halo transparente sobre un fondo opaco indicó que la prueba era positiva (Figura 25).

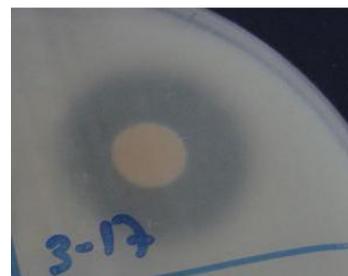


Figura 25. Producción de gelatinasa.

Esta prueba y todas las que a continuación aparecen marcadas con asterisco (*) se incubaron a 37°C durante 14 días con lecturas diarias.

Producción de indol*

Con esta prueba se determinó si el microorganismo poseía la enzima triptofanasa, capaz de actuar sobre el triptófano dando lugar a indol más alanina. Para ello se siguieron las directrices de Kovacs (1928). En este caso el medio se distribuyó en tubos de hemolisis.

Para detectar la presencia de indol, se añadieron unas gotas de reactivo de Kovacs y se agitó. La prueba se consideró positiva cuando se formaba un anillo rojo en la superficie y negativa si el anillo formado era de color amarillo (Figura 26).

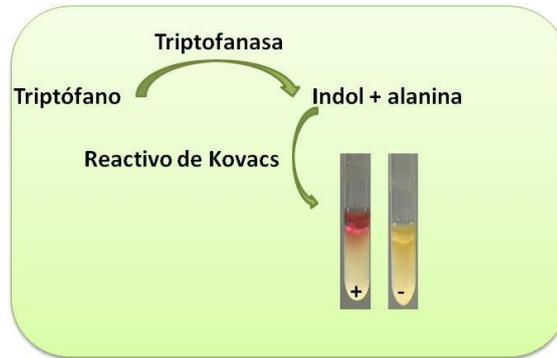


Figura 26. Prueba de indol.

Prueba de rojo de metilo*

Esta prueba se realizó para determinar si los microorganismos realizaban fermentación ácido-mixta en la cual se produce una mezcla de ácidos a partir de la glucosa que disminuyen el pH del medio. Para ello se utilizó el medio de Clark-Lubbs modificado convenientemente y se distribuyó en tubos de hemolisis.

Para su lectura, se añadieron unas gotas de solución de rojo de metilo, se agitó y se observó el posible cambio de color. Un viraje a rojo indicó que la prueba era positiva, naranja dudosa y amarillo negativa (Cowan y Steel, 1982) (Figura 27)).

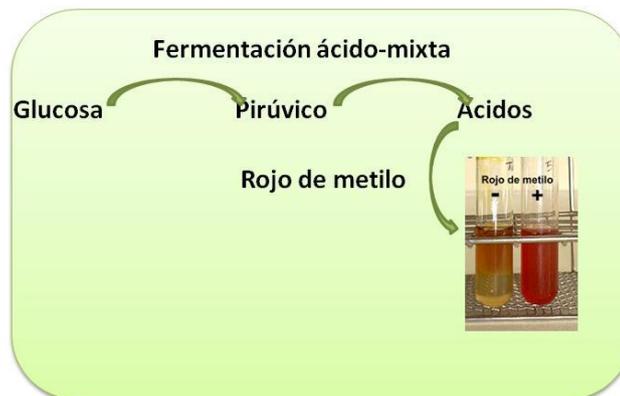


Figura 27. Fermentación ácido-mixta.

Prueba de Voges Proskauer*

Se llevó a cabo esta prueba para comprobar si los microorganismos objeto de estudio realizaban fermentación butanodiólica. El medio y condiciones utilizadas fueron las mismas que las utilizadas para la prueba anterior.

Para la lectura se añadieron unas gotas de α -naftol al 0,5 % (p/v) en etanol y a continuación solución acuosa de KOH al 40 % (p/v). La lectura se realizó a los 20 minutos de añadir los reactivos. Las cepas que dieron la prueba negativa se volvieron a leer después de mantener los tubos a 37 °C durante 2 horas. La reacción positiva viene indicada por la aparición de un color rojo intenso (Barrit, 1936) (Figura 28).

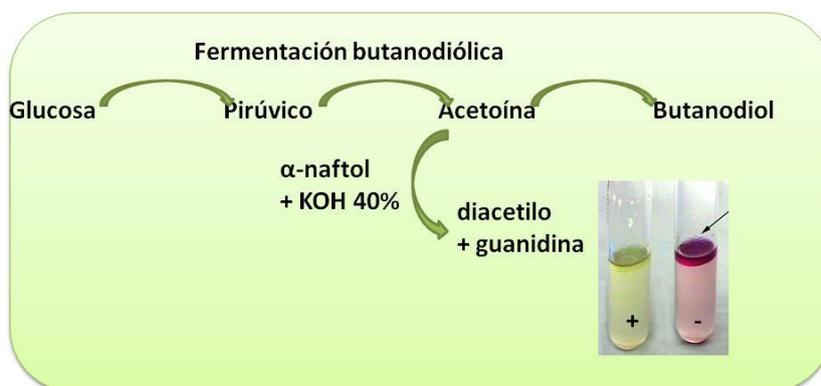


Figura 28. Fermentación butanodiólica.

Producción de ácidos a partir de carbohidratos

Se determinó la producción de ácidos a partir de los carbohidratos que se detallan en la Tabla 12, todos ellos suministrados por Sigma[®]. Se utilizó el medio M1 al 25 % (p/v) suplementado con rojo fenol al 0,04 % (p/v) que se distribuyó en tubos de hemolisis.

Los carbohidratos a una concentración final del 1 % (p/v), se añadieron por filtración una vez esterilizado el medio.

La producción de ácidos se manifestó mediante el viraje del indicador a color amarillo (Cowan y Steel, 1982) (Figura 29) tras la incubación durante dos semanas a 37 °C.



Figura 29. Producción de ácidos a partir de carbohidratos.

En la Tabla 13 se muestra un cuadro resumen con los medios de cultivo de las pruebas bioquímicas descritas anteriormente.

Tabla 13. Pruebas bioquímicas utilizadas para la caracterización fenotípica de las cepas de arqueas.

PRUEBA*	MEDIO DE CULTIVO
Hidrólisis de	
•Almidón	M1 al 25 % (p/v) (sin glucosa) + Almidón (1 %, p/v)
•Tween 80	M1 al 25 % (p/v) + Tween 80 (1 %, p/v) .
Producción de	
•ADNsa	ADNsa Agar preparado en 25 % (p/v) de sales
•Gelatinasa	M1 al 25 % (p/v) (sin glucosa) + Gelatina (1 %, p/v)
Producción de indol	M1 al 25 % (p/v) (sin glucosa) + Triptona (1 %, p/v)
Rojo de metilo	Glucosa al 0,5 % (p/v) + Sales al 25 % (p/v)
Voges-Proskauer	Glucosa al 0,5 % (p/v) + Sales al 25 % (p/v)
Producción de ácidos a partir de carbohidratos	M1 al 25 % (p/v) (sin glucosa) + Rojo fenol (0,04 %, p/v) + Carbohidrato al 1 % (p/v))
Respiración sobre nitratos	Glucosa (1 %, p/v) + Extracto de levadura (1 %, p/v) + Proteosa peptona (0,5 %, p/v) + Rojo fenol (0,04 %, p/v) + sales 5 % (p/v) + Nitrato potásico (0,02 %, p/v)
Reducción de nitratos y nitritos	M1 al 25 % (p/v) (sin glucosa) + Nitrato potásico (0,2 %, p/v)

*, las pruebas de catalasa y oxidasa se realizaron con agua oxigenada de 10 volúmenes y solución acuosa de N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilendiamina al 1 % (p/v), respectivamente.

D) Pruebas nutricionales

Se estudió el empleo de diversos carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía. Asimismo, se ensayaron varios aminoácidos para estudiar la capacidad de los microorganismos para usarlos como único aporte de carbono, nitrógeno y energía. Todos los sustratos ensayados fueron suministrados por Sigma® y se recogen en la Tabla 12.

Para el ensayo se siguió la técnica de Koser (1923), modificada por Ventosa y colaboradores (1982), de la misma manera que se procedió para las pruebas nutricionales en las cepas bacterianas (véase el apartado III.2.2.1.1.D), ajustando las concentraciones de sales al 25 % (p/v) así como la temperatura y tiempo de incubación a 37 °C durante 15 días.

E) Pruebas de sensibilidad a agentes antimicrobianos

Para el estudio de la sensibilidad frente a agentes antimicrobianos se siguió la técnica de Bauer y col., 1966, empleando el medio MY sólido al 25 % (p/v).

Como inóculo se utilizó una suspensión del microorganismo en solución salina ajustada al número 0,5 de la escala de Mac Farland. La lectura se realizó a los 10 días de incubación a 37 °C midiendo la zona de inhibición del crecimiento y el microorganismo se clasificó como resistente, sensible o intermedio de acuerdo con los valores establecidos por Barrit y Thornsberry (1980). Los agentes antimicrobianos utilizados, así como las concentraciones de cada uno de ellos se muestran en la Tabla 12.

En la Tabla 14, se detallan las especies válidamente descritas que hemos usado como referencia.

Tabla 14. Especies de referencia utilizadas en el estudio taxonómico de las cepas de arqueas.

ESPECIE	
R1 , <i>Haladaptatus paucihalophilus</i>	R11 , <i>Halorubrum aidingense</i>
R2 , <i>Haloarcula argentinensis</i>	R12 , <i>Halostagnicola kamekurae</i>
R3 , <i>Haloarcula quadrata</i>	R13 , <i>Halostagnicola larsenii</i>
R4 , <i>Halococcus hamelinensis</i>	R14 , <i>Haloterrigena jeotgali</i>
R5 , <i>Haloferax mediterranei</i>	R15 , <i>Haloterrigena thermotolerans</i>
R6 , <i>Haloferax mucosum</i>	R16 , <i>Natrialba aegyptiaca</i>
R7 , <i>Haloferax prahovense</i>	R17 , <i>Natrinema altunense</i>
R8 , <i>Halogeometricum borinquense</i>	R18 , <i>Natrinema gari</i>
R9 , <i>Halomicrobium mukohataei</i>	R19 , <i>Natrinema pallidum</i>
R10 , <i>Halorhabdus tiamatea</i>	

III.2.2.2. Análisis numérico de las pruebas fenotípicas

A partir de los resultados de las pruebas morfológicas, culturales, fisiológicas, bioquímicas, nutricionales y de sensibilidad a agentes antimicrobianos, se realizó un análisis numérico para determinar la semejanza fenotípica de las bacterias y arqueas objeto de estudio.

Este análisis numérico se llevó a cabo con el programa informático *NTSYSpc 2.02*. La codificación de las pruebas se realizó dando el valor 1 a las pruebas positivas y 0 a las negativas. Las pruebas en las cuales la comparación no era posible, bien porque resultarían dudosas o bien porque no se disponía del dato, se codificaron como 9.

La valoración de los datos para obtener el grado de semejanza entre las distintas cepas, se realizó empleando el coeficiente de semejanza de Sokal y Michener (1958) de apareamiento simple. Los resultados obtenidos con dicho coeficiente de semejanza se sometieron a un análisis de agrupación según la técnica *UPGMA* (del inglés *Unweighted Pair Group Mean Average*) o de acoplamiento promedio binario contrapesado, obteniéndose el correspondiente coeficiente de correlación cofenética (Sneath y Sokal, 1973).

III.2.2.3 Microscopía electrónica

Este estudio se realizó, en algunas cepas bacterianas, en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Se utilizó un cultivo en medio MY líquido al 5 % (p/v) del microorganismo en fase exponencial, crecido a 32 °C durante 24 horas sin agitación. Se determinó el tamaño y morfología celular, así como la disposición de los flagelos, en las cepas móviles, para lo cual las células fueron teñidas con rojo de rutenio. La posible presencia de inclusiones de reserva u orgánulos se observaron realizando secciones con un *ultramicrotomo Reichert Ultracut S*. Las secciones se tiñeron con acetato de uranilo (1%, p/v) y citrato de plomo. En ambos casos, se utilizó el microscopio de transmisión *Zeiss TEM EM 10C*, con 30 µm de apertura de objetivo y 80 KV de voltaje de aceleración.

III.2.2.4. Estudio genotípico

III.2.2.4.1. Extracción de ADN

La extracción del ADN de las cepas bacterianas y de las arqueas se llevó a cabo por el método descrito por Martín-Platero y colaboradores (2007). Las soluciones utilizadas para tal fin, así como las utilizadas en el estudio filogenético, se pueden consultar en el anexo II.

Se utilizó un inóculo en fase exponencial del microorganismo crecido en medio MY al 5 % (p/v) o al 25 % (p/v) según la cepa a estudiar. En el caso de cepas bacterianas, cuando éstas eran productoras de exopolisacárido (EPS), se utilizó un cultivo en medio mínimo MM al 5 % (p/v) de sales al que se le adicionó tioglicolato sódico 1M con el fin de reducir la producción del polímero y facilitar la extracción de ADN.

Para la extracción de ADN se centrifugó 1 ml de un cultivo de 24 horas, (aproximadamente 10^9 UFC/ml) a 13.000 rpm en la centrifuga *BIOFUGE 13* (Heraeus Instruments). A continuación las células se resuspendieron en 100 µl de la solución 1, se les añadió 0,1g de lisozima y 0,5 µl de una solución de ARNasa (40 µg/ml) y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos, tras lo cual, se añadieron 600 µl de tampón de lisis (solución 2) y se mezclaron por inversión suave hasta observar su clarificación, dejando a continuación la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Seguidamente se añadieron 0,5 µl de proteinasa K (20 mg/ml) para eliminar las proteínas que interfieren en la extracción de ADN y las células se dejaron de nuevo 10 minutos a temperatura ambiente.

La inactivación enzimática se llevó a cabo incubando la mezcla a 80 °C durante 10 minutos de forma que durante este tiempo gran parte de las proteínas solubles, así como la solución enzimática empleada al inicio de la extracción, se desnaturalizan.

Después de atemperarse, las proteínas se precipitaron mediante la adición de 200 μ l de solución 3, se agitó suavemente, se enfrió en hielo durante 10 minutos y se centrifugó durante 5 minutos a 4 °C y una velocidad de 14.000 rpm en la centrifuga de tubos eppendorf *CENTRIFUGE 5415* (Eppendorf®).

Para precipitar el ADN, el sobrenadante se transfirió a un tubo que contenía 600 μ l de isopropanol y el ADN se recogió por centrifugación y se lavó dos veces con etanol al 70 % (v/v), previamente enfriado a -20°C; a continuación se centrifugó durante 5 minutos a 14.000 rpm a temperatura ambiente.

La muestra que contenía el ADN se dejó secar ligeramente a temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente se disolvió en agua bidestilada estéril para la secuenciación del gel del ARNr 16S o en solución salina citrada 0,1X (SSC 0,1X) para la determinación del contenido en G+C.

III.2.2.4.2. Determinación de la concentración de ADN

La concentración de ADN se determinó utilizando un espectrofotómetro del tipo *NANODROP*, adoptando las recomendaciones del manual de Sambrook y Russell (2001). La concentración de ADN de la muestra se expresó respecto al valor estándar de $DO_{260}=1$ para soluciones con 50 μ g de ADN de cadena doble. La pureza de la muestra viene dada por la relación DO_{260}/DO_{280} de forma que un valor de esta relación por debajo de 1,8 es indicativo de contaminación por proteínas, EPS y/o fenol.

III.2.2.4.3. Determinación del contenido en G+C

El contenido en bases guanina más citosina del ADN (G+C moles %) fue determinado a partir de la temperatura media de desnaturalización (T_m), mediante el método gráfico descrito por Ferragut y Leclerc (1976). Se empleó para ello el perfil de desnaturalización térmica (Marmur y Doty, 1962) dado por un espectrofotómetro *UV-Vis Lambda3B* (Perkin-Elmer®), a una longitud de onda de 260 nm. La muestra se calentó desde 50 °C hasta 110 °C a una velocidad constante de 1 °C por minuto mediante un programador de temperatura modelo *PTP-1* (Perkin-Elmer®). La variación de la DO con la temperatura se recogió en un registrador modelo *Waters 746 Data Module* (Waters-Millipore®), a una velocidad constante de 1 cm por minuto. El ensayo se hizo por triplicado.

El porcentaje en G+C se obtuvo utilizando la ecuación de Owen y Pitcher (1985). Se escogió como referencia la temperatura media de desnaturalización de 74,6 °C en SSC 0,1X de *Escherichia coli* NCTC 9001^T y su porcentaje de G+C de 50,9 moles %. Dicha ecuación se expresa como:

$$G + C \text{ moles } \% = 50,9 + 2,09 (T_m - 74,6)$$

III.2.2.5. Estudio filogenético

III.2.2.5.1. Obtención de las secuencias del gen del ARNr 16s

A) Amplificación del gen

Se utilizó el ADN genómico extraído mediante el método de Martín-Platero y col., (2007) descrito anteriormente (apartado III.2.2.4.1).

El gen del ARNr 16S (1500pb) se amplificó por PCR, siguiendo el protocolo de Saiki y colaboradores (1988) y empleando la enzima ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Lawyer y col., 1989).

Para la amplificación del gen en las cepas bacterianas se utilizó el cebador directo 16F_B27 que se une a las posiciones 8-27, y el cebador reverso 16R_B1488 que se une a las posiciones 1511-1488 (Lane, 1991); para las cepas de arqueas se utilizó el cebador directo 16F_A17 que se une a las posiciones 1-17, y el cebador reverso 16R_A1492 que se une a las posiciones 1492-1513 (Ihara y col., 1997 y Grant y col., 1999).

Todos los cebadores fueron sintetizados Sigma-Genosys® y sus secuencias se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Oligonucleótidos usados en la amplificación y secuenciación del gen del ARNr 16S en bacterias y arqueas.

CEBADOR	SECUENCIA (5'→3')	REFERENCIA
16F_B27	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	Lane, 1991
16R_B1488	CGGTTACCTTGTTAGGACTTCA	Lane, 1991
16F_A17	ATTCCGGTTGATCCTGC	Ihara y col., 1997
16R_A1492	ACGGHTACCTTGTTACGACTT	Grant y col., 1999

La reacción de amplificación fue distinta según se tratase de cepas bacterianas o de arqueas. En la Figura 30 se especifican las condiciones de amplificación para cada caso.

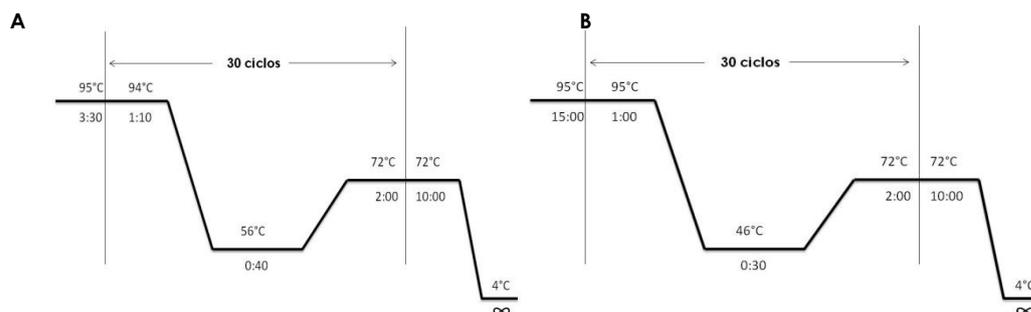


Figura 30. Condiciones de amplificación del gen del ARNr 16S. A, condiciones para las cepas de bacterias; B, condiciones para las cepas de arqueas.

B) Análisis de los productos de PCR mediante electroforesis

La electroforesis se realizó en geles horizontales de agarosa (Seakem GTG[®], FMC Corp.) sumergidos en tampón TBE 1X y preparados al 1 % (p/v) con el mismo tampón. Como tampón de carga se utilizó el tampón 5X DNA Loading Buffer Blue de Bioline[®] adicionando 1µl por cada 5 µl de ADN. Las condiciones de electroforesis fueron 100V durante 40 minutos. Paralelamente, se usó el marcador HyperLadder[™] I de 10Kb de Bioline[®]. A continuación, el ADN se tiñó con una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante 15 minutos y se visualizó mediante exposición del gel a la luz U.V. (245 nm) en un transiluminador modelo *Universal Hood II* (Bio-Rad[®]) (Figura 31).

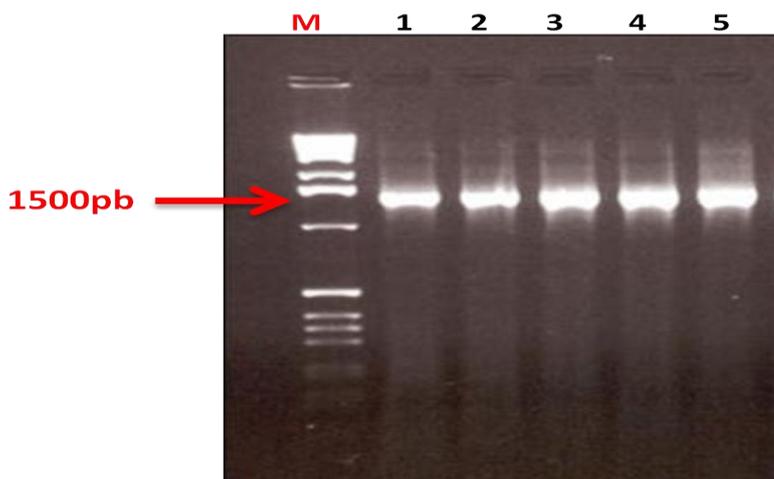


Figura 31. Análisis del gen del ARNr 16S. Carril M, marcador de peso molecular HyperLadder[™]; carriles 1-5, fragmento amplificado por PCR de las cepas bacterianas M2-2, M2-3, M2-14, M2-15 y M2-19.

C) Clonación del fragmento de ADN amplificado

Esta etapa requiere la purificación previa de los productos de PCR para el cual se utilizó el kit Illustra[®] GFX ADN (GE Healthcare[®]) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

A continuación se procedió a insertar el fragmento en el vector de clonación p-GEM-T de Promega[®], para su posterior secuenciación con los cebadores universales T7 y SP6 (Tabla 16). Este proceso se llevó a cabo en aquellas cepas que pudieran constituir nuevos taxa. El procedimiento seguido se describe a continuación.

Tabla 16. Oligonucleótidos usados en la clonación del producto de PCR del gen del ARNr 16S para bacterias y arqueas.

CEBADOR	SECUENCIA (5' → 3')	REFERENCIA
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Cebador universal vector pGEM-T (Promega [®])
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	Cebador universal vector pGEM-T (Promega [®])

Ligación del inserto en el vector P-GEM-T

Una vez realizada la purificación del fragmento de PCR deseado, se procedió a ligar éste con el vector mediante la enzima *ADN ligasa* del bacteriófago T4 en un volumen de reacción de 10 µl. La reacción se incubó durante 18 horas a 16 °C.

Preparación de células competentes con CaCl₂ y transformación por choque térmico

La preparación de células competentes de *Escherichia coli* DH5α CaCl₂ y su posterior transformación se realizó siguiendo el protocolo descrito en el manual de Sambrook y Russell (2001). Éstas se transformaron con ADN plasmídico mediante choque térmico. Las células que habían adquirido el plásmido se seleccionaron mediante la siembra de 100 µl de la suspensión celular en medio LB sólido suplementado con ampicilina, IPTG y X-Gal. Tras una incubación a 37 °C durante 24 horas se seleccionaron las colonias blancas que tenían el inserto.

Extracción del ADN plasmídico

Se procedió a extraer el ADN plasmídico para la posterior secuenciación, empleando para ello el kit comercial *GenElute™ HP Plasmid Miniprep* de Sigma[®]. Como paso previo a la secuenciación, se comprobó el éxito de la clonación mediante una electroforesis en gel

de agarosa al 1 % (p/v), con un voltaje de 100V durante un tiempo de 50 minutos usando como control negativo el ADN del plásmido p-GEM-T.

D) Secuenciación del fragmento de ADN.

La secuenciación se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación Automática del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra de Granada, utilizando el secuenciador *Applied Biosystems* (modelo 373 STRECHT). El método seguido fue el comercializado por Perkin Elmer, ABI PRISM™ “*Big Dye Terminators*”, que utiliza en la reacción de extensión el enzima *AmpliTaq DNA polymerase* (ref, 402122) y emplea dideoxinucleótidos marcados con cromóforos fluorescentes.

Los cromatogramas de las secuencias del gen del ARNr 16S fueron comprobados visualmente para corregir los posibles errores con el programa *Chromas 2.33*. Seguidamente, estas secuencias se compararon con las disponibles en las bases de datos EMBL y GenBank mediante el programa *BLAST* (Altschul y col., 1990) disponible en el servidor de internet del NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nih.gov>), y el programa *EzTaxon Server 2.1* (www.eztaxon.org) (Chun y col., 2007).

El análisis filogenético realizado permitió comparar las secuencias del gen del ARNr 16S de nuestras cepas con las especies de referencia. En una primera etapa, se secuenciaron 600 pb de la región hipervariable V1-V3 y a continuación, se secuenció el gen completo en aquellas cepas que podrían constituir nuevos taxa, es decir, aquellas cuyos porcentajes de identidad con las secuencias de otros microorganismos depositados en la base de datos eran inferiores al 97 %.

III.2.2.5.2. Construcción de los árboles filogenéticos

El análisis filogenético se realizó mediante el software *MEGA* (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 4.0.2 (Kumar y col., 2008) después de alinear las secuencias mediante el método *CLUSTALX* (Thompson y col., 1994). Las distancias evolutivas, incluyendo un factor de corrección para las mutaciones reversas (Jukes y Cantor, 1969), se calcularon en función del número de pares de bases en que difieren o asemejan dos genes mediante los métodos del vecino más cercano o *neighbour joining* (Saitou y Nei, 1987) y máxima parsimonia; asimismo, se determinaron los valores de remuestreo o *bootstrap* basados en 1000 repeticiones. Por último, para corregir posibles sesgos en las relaciones de parentesco entre los microorganismos en estudio, se utilizaron las secuencias del gen del ARNr 16S de especies tipo de referencia que se incluyen como externas u “*outgroups*”, las cuales se especifican en la Tabla 17.

Tabla 17. Especies tipo utilizadas como “outgroups”.

ESPECIES	REFERENCIAS
<i>Methermicoccus shengliensis</i> (ZC-1 ^T)	Cheng y col., 2007
<i>Methanolobus profundus</i> (MobM ^T)	Mochimaru y col., 2009
<i>Halotalea alkalilenta</i> (AW-7 ^T)	Ntougias y col., 2007
<i>Modicisalibacter tunisiensis</i> (LIT2 ^T)	Ben Ali Gam y col., 2007
<i>Alteromonas macleodii</i> (DSM 6062 ^T)	Baumann y col., 1972
<i>Algicola bacteriolítica</i> (ATCC 700679 ^T)	Sawabe y col., 1998
<i>Methanospirillum hungatei</i> (ATCC 2789 ^T)	Ferry y col., 1974

*, los números de acceso al Genbank se muestran entre paréntesis

La consistencia de una determinada relación filogenética se evaluó, por un lado, por su permanencia independientemente del algoritmo usado (Chelo y col., 2007) y, por otro, por el valor de remuestreo o “bootstrap” de la agrupación, mediante el cual, se comprobó estadística y aleatoriamente si el orden en que se habían introducido las secuencias afectaba a las características del modelo empleado (Felsenstein, 1985).

III.2.2.6. Análisis quimiotaconómico

Se realizó a partir de 250 ml de un cultivo del microorganismo de las cepas bacterianas en medio MY líquido al 5% (p/v) incubado a 32 °C durante 24 horas a 100 rpm. Tras este tiempo, el cultivo se centrifugó y el sedimento fue enviado al Servicio de Identificación de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ, Braunschweig, Germany), donde se realizó tanto la determinación de ácidos grasos como la de las quinonas respiratorias. En el análisis de los primeros se empleó la técnica de cromatografía de gases (GLC), mientras que para la determinación de las quinonas respiratorias se usó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

III.2.3. RESULTADOS

III.2.3.1. Caracterización taxonómica de las cepas bacterianas

Las 428 cepas bacterianas fueron caracterizadas taxonómicamente mediante el estudio de 88 pruebas fenotípicas, cuyos resultados pueden consultarse en el anexo III, en el que se incluyen también los datos fenotípicos de las cepas de referencia utilizadas para el estudio taxonómico.

La secuencia parcial del gen del ARNr 16S se resolvió de manera satisfactoria en 366 aislados e indicó una alta diversidad bacteriana representada por 101 especies incluidas en 33 géneros, 20 familias, 14 órdenes, 6 clases y 4 phyla (Tablas 18 y 19). El porcentaje de identidad de cada una de ellas puede consultarse en el anexo IV. Para la identificación a nivel de género se ha utilizado un porcentaje de identidad del 95 % y para la de especie del 97 %.

La familia *Halomonadaceae* fue la más representada con 155 cepas, seguido de las familias *Bacillaceae* con 59 cepas, *Alteromonadaceae* con 52 cepas, *Staphylococcaceae* con 28 cepas, *Vibrionaceae* con 18 cepas e *Idiomarinaceae* con 10 cepas. Los géneros más abundantes de cada familia fueron *Halomonas* con 151 cepas, *Marinobacter* con 48 cepas, *Bacillus* con 46 cepas, *Staphylococcus* con 28 cepas, *Salinivibrio* con 13 cepas e *Idiomarina* con 10 cepas.

Por otra parte, se realizó un análisis filogenético empleando las secuencias del gen del ARNr 16S de las cepas seleccionadas mediante el algoritmo Máxima Parsimonia (véase el anexo V).

Las secuencias parciales del gen del ARNr 16S de 21 de las cepas (18 cepas Gram negativas y 3 Gram positivas) presentaron porcentajes de identidad inferiores al 98 % con respecto a las secuencias depositadas en la base de datos EMBL y *EzTaxon Server 2.1*. A este grupo se les secuenció el gen completo. De ellas, las cepas M3-97 y M1-16-X, presentaron homología con especies del género *Halomonas*, concretamente, la cepa M3-97 mostró un porcentaje de identidad del 97,23 % con *Halomonas cerina* SP4^T y la cepa M1-16-X un porcentaje del 96,94 % con *Halomonas fontilapidosi* 5CR^T. La cepa M4-3M presentó un porcentaje de identidad del 97,9 % con *Marinobacter segnicrescens* SS011B1-4^T, y la cepa M1-120 un porcentaje de identidad del 98,2 % con *Pseudoalteromonas carrageenovora* ATCC 43555^T. Estas cuatro cepas fueron elegidas para una descripción más completa por considerarlas candidatas a constituir nuevas especies. En el resto de cepas, el análisis de la secuencia completa del gen del ARNr 16S mostró un porcentaje de identidad cercanos al 99 % con otras secuencias depositadas en la base de datos y que serán también estudiadas próximamente con objeto de conocer su posición taxonómica exacta.

Tabla 18. Especies de los phyla *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* identificadas entre las cepas bacterianas aisladas del Humedal de Ajauque y Rambla Salada, según la secuencia parcial del gen del ARNr 16S.

PHYLUM	CLASE	ORDEN	FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Micrococccineae</i>	<i>Brevibacteriaceae</i> (5)*	<i>Brevibacterium</i> (5)	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> DSM 8801 ^T (5)
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i> (1)	<i>Riemerella</i> (1)	<i>Riemerella anatipestifer</i> ATCC 11845 ^T (1)
			<i>Bacillaceae</i> (59)	<i>Bacillus</i> (46)	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578 ^T (3) <i>Bacillus beringensis</i> BR035 ^T (1) <i>Bacillus butanolivorans</i> K9 ^T (2) <i>Bacillus endophyticus</i> 2DT ^T (3) <i>Bacillus muralis</i> LMG 20238 ^T (2) <i>Bacillus oceanisediminis</i> H2 ^T (2) <i>Bacillus safensis</i> FO-036b ^T (10) <i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 ^T (7) <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> BGSC 3A28 ^T (1) <i>Bacillus tequilensis</i> NRRL B-41771 ^T (8) <i>Bacillus vallismortis</i> DSM 11031 ^T (7)
				<i>Marinococcus</i>	<i>Marinococcus luteus</i> YIM 91094 ^T (3)
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>			<i>Oceanobacillus manasiensis</i> YD3-56 ^T (3)
				<i>Virgibacillus</i> (7)	<i>Virgibacillus olivae</i> E308 ^T (2) <i>Virgibacillus salarius</i> SA-Vb1 ^T (5)
			<i>Planococcaceae</i> (5)	<i>Planococcus</i> (5)	<i>Planococcus riftetoensis</i> M8 ^T (5)
			<i>Staphylococcaceae</i> (28)	<i>Staphylococcus</i> (28)	<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i> ATCC 27840 ^T (2) <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990 ^T (2) <i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>hominis</i> DSM 20328 ^T (1) <i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> GTC 1228 ^T (1) <i>Staphylococcus pasteurii</i> ATCC 51129 ^T (13) <i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> ATCC 15305 ^T (3) <i>Staphylococcus warneri</i> ATCC 27836 ^T (6)

*, los números entre paréntesis indican el número de aislados de cada taxón.

Tabla 19. Especies del phylum *Proteobacteria* identificadas entre las cepas bacterianas aisladas del Humedal de Ajauque y Rambla Salada, según la secuencia parcial del gen del ARNr 16S.

CLASE	ORDEN	FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE
Alfaproteobacteria	Caulobacterales	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Brevundimonas</i>	<i>Brevundimonas aurantiaca</i> DSM 4731 ^T (1)
		(6)*	(6)	<i>Brevundimonas bacteroides</i> LMG15096 ^T (1)
				<i>Brevundimonas mediterranea</i> V4.BO.10 ^T (1)
				<i>Brevundimonas vesicularis</i> LMG 2350 ^T (3)
	Rhizobiales	<i>Aurantimonadaceae</i>	<i>Aurantimonas</i>	<i>Aurantimonas altamirensis</i> S21B ^T (1)
		(2)	(2)	<i>Aurantimonas coralicida</i> WPI ^T (1)
		<i>Bartonellaceae</i>	<i>Bartonella</i>	<i>Bartonella vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i> OK94-513 ^T (1)
		(1)	(1)	
	Rhodobacterales	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Labrenzia</i>	<i>Labrenzia aggregata</i> IAM 12614 ^T (1)
			(5)	<i>Labrenzia marina</i> mano18 ^T (1)
		<i>Nesiotobacter</i>	<i>Nesiotobacter exalbescens</i> LA33B ^T (1)	
		(1)		
		<i>Palleronia</i>	<i>Palleronia marisminoris</i> B33 ^T (1)	
	(1)			
	<i>Paracoccus</i>	<i>Paracoccus marcusii</i> DSM 11574 ^T (1)		
	(1)			
	Rhodospirillales	<i>Acetobacteraceae</i>	<i>Swaminathania</i>	<i>Swaminathania salitolerans</i> PA51 ^T (1)
	(1)	(1)		
Betaproteobacteria	Burkholderiales	<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Achromobacter</i>	<i>Achromobacter spanius</i> LMG 5911 ^T (1)
		(1)	(1)	

Tabla 19. Continuación

PHYLUM	CLASE	ORDEN	FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE		
Alfaproteobacteria	Caulobacterales		Caulobacteraceae	Brevundimonas	<i>Brevundimonas aurantiaca</i> DSM 4731 ^T (1) <i>Brevundimonas bacteroides</i> LMG15096 ^T (1) <i>Brevundimonas mediterranea</i> V-4 BO.10 ^T (1) <i>Brevundimonas vesicularis</i> LMG 2350 ^T (3)		
			Aurantimonadaceae	Aurantimonas	<i>Aurantimonas altamirensis</i> S21B ^T (1) <i>Aurantimonas coralicida</i> WPI ^T (1)		
			Bartonellaceae	Bartonella	<i>Bartonella vinsonii subsp. arupensis</i> OK94-513 ^T (1)		
			Rhodobacteraceae	Labrenzia	<i>Labrenzia aggregata</i> IAM 12614 ^T (1) <i>Labrenzia marina</i> mmo18 ^T (1)		
	Rhodobacterales			Nesiotobacter	<i>Nesiotobacter exalbescens</i> LA33B ^T (1)		
				Palleronia	<i>Palleronia marimmonis</i> B33 ^T (1)		
				Paracoccus	<i>Paracoccus marcusii</i> DSM 11574 ^T (1)		
				Swaminathania	<i>Swaminathania salitolerans</i> PA51 ^T (1)		
	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Achromobacter	<i>Achromobacter spanius</i> LMG 5911 ^T (1)		
			Alteromonadaceae	Marinobacter	<i>Marinobacter algicola</i> D6893 ^T (2) <i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T (25) <i>Marinobacter gudaonensis</i> SL014B61A ^T (1) <i>Marinobacter pelagus</i> HS225 ^T (4) <i>Marinobacter salsuginis</i> SD-14B ^T (8) <i>Marinobacter santoriniensis</i> NKSG1 ^T (1) <i>Marinobacter segnicrescens</i> SSO11B1-47 ^T (7) <i>Microbulbifer donghaiensis</i> CNS5 ^T (1)		
	Proteobacteria	Enterobacteriales		Salinimonas	<i>Salinimonas chungwhensis</i> BH030046 ^T (3)		
				Idiomarina	<i>Idiomarina abyssalis</i> KMM 227 ^T (1) <i>Idiomarina homiensis</i> PO-M2 ^T (1) <i>Idiomarina loihensis</i> L2TR ^T (3) <i>Idiomarina ramblicola</i> R22 ^T (1) <i>Idiomarina seosinensis</i> CL-SP19 ^T (2) <i>Idiomarina zobellii</i> KMM 231 ^T (2)		
Pseudoalteromonas				<i>Pseudoalteromonas byunsanensis</i> FE1199 ^T (2) <i>Pseudoalteromonas undina</i> NCIMB 2128 ^T (2)			
Cronobacter				<i>Cronobacter dublinensis subsp. dublinensis</i> DES187 ^T (1)			
Pantoea				<i>Pantoea eucrina</i> LMG 2781 ^T (1) <i>Pantoea stewartii subsp. stewartii</i> LMG 2715 ^T (1)			
Yersinia				<i>Yersinia intermedia</i> ATCC 29909 ^T (6)			
Gammaproteobacteria						Halomonas	<i>Halomonas alimentaria</i> YKJ-16 ^T (1) <i>Halomonas almeriensis</i> MB7 ^T (1) <i>Halomonas arcis</i> AJ282 ^T (1) <i>Halomonas boliviensis</i> LC1 ^T (2) <i>Halomonas campaniensis</i> 5AG ^T (1) <i>Halomonas campyialis</i> ATCC 700597 ^T (3) <i>Halomonas caseinilytica</i> AJ261 ^T (7) <i>Halomonas cerina</i> SP4 ^T (3) <i>Halomonas dalingensis</i> DQD2-30 ^T (4) <i>Halomonas elongata</i> ATCC 33173 ^T (10) <i>Halomonas fontilapidosi</i> SCR ^T (9) <i>Halomonas gomseomensis</i> MI2 ^T (4) <i>Halomonas gudaonensis</i> SL014B-69 ^T (1) <i>Halomonas halmophila</i> ATCC 19717 ^T (1) <i>Halomonas hydrothermalis</i> Sth12 ^T (20) <i>Halomonas koreensis</i> SS20 ^T (6) <i>Halomonas latae</i> YIM91125 ^T (5) <i>Halomonas neptunia</i> Eplumel ^T (1) <i>Halomonas pacifica</i> DSM 4742 ^T (2) <i>Halomonas saccharovitans</i> AJ275 ^T (5) <i>Halomonas saltfodinae</i> BC7 ^T (1) <i>Halomonas salina</i> FS-11 ^T (8) <i>Halomonas shengliensis</i> SL014B-85 ^T (1) <i>Halomonas subterranea</i> ZG16 ^T (8) <i>Halomonas sulfidaeris</i> ATCC BAA-803 ^T (4) <i>Halomonas taeanensis</i> BH539 ^T (3) <i>Halomonas variabilis</i> DSM 3051 ^T (1) <i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T (30) <i>Halomonas xinjiangensis</i> TRM 0175 ^T (1) <i>Halomonas zhanjiangensis</i> ISM 078169 ^T (4)
						Kushneria	<i>Kushneria indalimna</i> CG2.1 ^T (3)
						Salinicola	<i>Salinicola halophilus</i> CG 4.1 ^T (1)
						Acinetobacter	<i>Acinetobacter baumannii</i> DSM 30007 ^T (1)
	Pseudomonas	<i>Pseudomonas xanthomarina</i> EMM 1447 ^T (1) <i>Pseudomonas vancoaverensis</i> ATCC 700688 ^T (1)					
	Salinivibrio	<i>Salinivibrio costicola subsp. alcaliphilus</i> DSM 16359 ^T <i>Salinivibrio praeoebticus</i> AF-2004 ^T					
	Vibrio	<i>Vibrio azureus</i> LC2-005 ^T (2) <i>Vibrio owensii</i> DY05 ^T (1) <i>Vibrio runoiensis</i> S-1 ^T (2)					
	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Luteimonas			<i>Luteimonas terricola</i> BZ92r ^T (1)	

*, los números entre paréntesis indican el número de aislados de cada taxón.

A continuación se recogen los resultados obtenidos en el estudio polifásico llevado a cabo sobre estas cuatro cepas candidatas a constituir nuevas taxa. Los árboles resultantes de la aplicación de los algoritmos Máxima Parsimonia, Neighbour Joining y Maximum Likelihood utilizados en el estudio filogenético que no se muestran en este capítulo, pueden consultarse en el anexo VI.

La caracterización taxonómica de las cepas se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones del Comité Internacional de Taxonomía para la descripción de nuevas especies de la familia *Halomonadaceae* (Arahal y col., 2007) y la metodología descrita en los artículos publicados por Ventosa y colaboradores (1982), Quesada y colaboradores (1983) y Mata y colaboradores (2002).

III.2.3.1.1. Identificación taxonómica de las cepas M3-97 y M1-16-X

El estudio fenotípico llevado a cabo en las cepas M3-97 y M1-16-X indicó que ambas cepas poseían las características comunes a todas las especies del género *Halomonas*. Las especies de este género son bacilos Gram negativos con metabolismo respiratorio y catalasa positivos. Crecen entre el 1% y el 20 % (p/v) de sales, a temperaturas entre 15°C y 41°C y en un intervalo de pH de 6 a 9. Todas las cepas son indol, Voges-Proskauer y hemolisina negativas. Ninguna de ellas produce esporas, incluso cuando se incuban en el medio de Norris (Norris y col., 1981). La producción de ácidos a partir de diversos azúcares no es frecuente y sí la utilización de una gran cantidad de sustratos como única fuente de carbono y energía y de compuestos como única fuente de carbono, nitrógeno y energía. Todas son sensibles a la rifampicina y, además, excepto las especies *Halomonas almeriensis*, *Halomonas halodenitrificans* y *Halomonas salina* todas son sensibles a la sulfamida.

En la Figura 32 se muestra el dendrograma obtenido en el análisis numérico de los resultados de las pruebas fenotípicas con el programa *NTSYSpc 2.02*, utilizando el coeficiente de Sokal y Michener y la técnica de agrupación UPGMA. En este análisis numérico hemos incluido aquellas especies de *Halomonas* que guardan mayor relación fenotípica con las cepas M3-97 y M1-16-X.

La cepa M3-97 presentó un 87 % de semejanza con el grupo formado por las especies *Halomonas fontilapidosi*, *Halomonas cerina*, *Halomonas nitroreducens* y *Halomonas ventosae*. La cepa M1-16-X se encuentra relacionada con la especie *Halomonas alkaliphila* con un porcentaje de semejanza del 90,5 %.

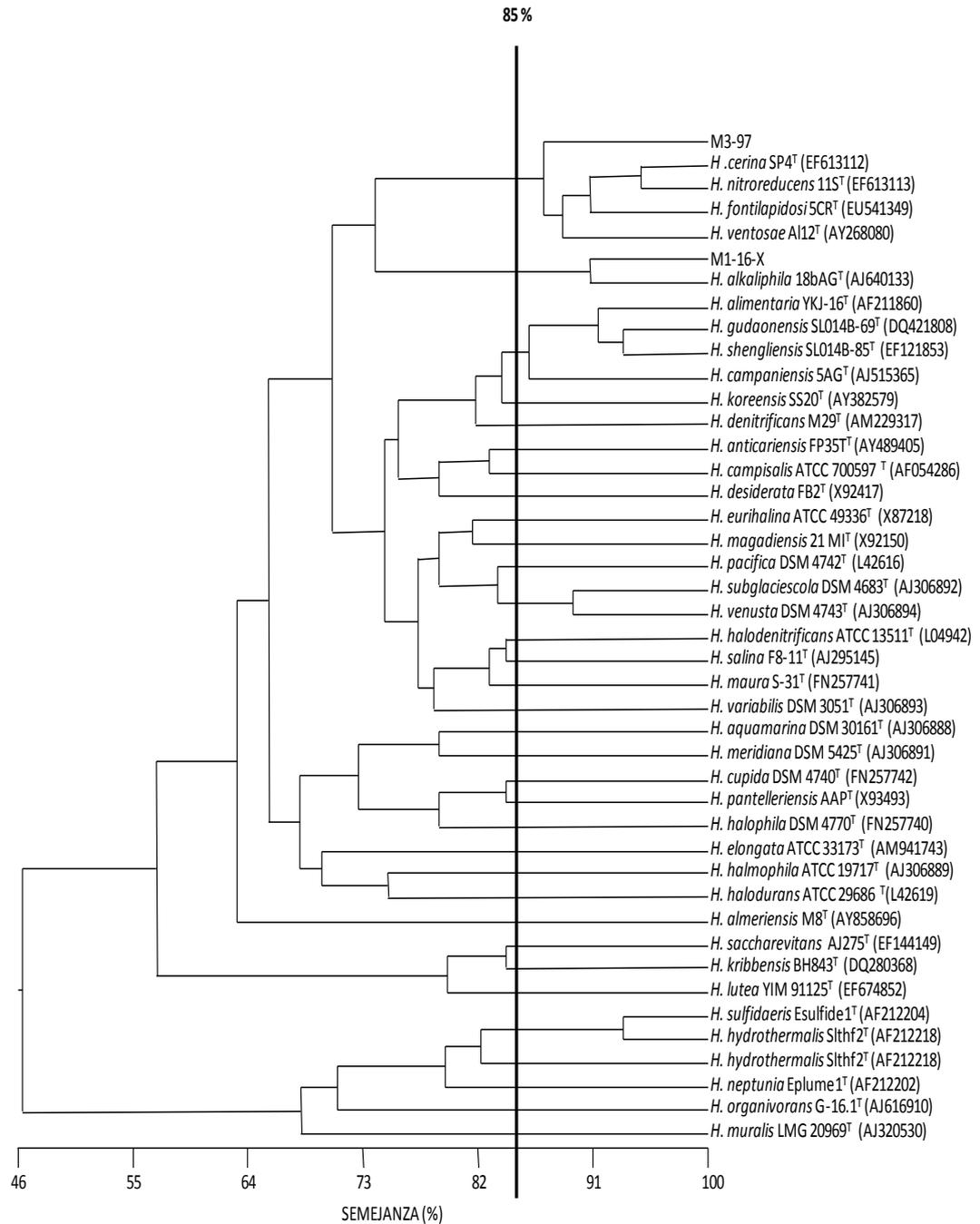


Figura 32. Dendrograma basado en 76 características fenotípicas, utilizando el coeficiente de Sokal y Michener y la técnica de agrupación UPGMA.

Identificación de la cepa M3-97

Como indicábamos con anterioridad, el dendrograma mostrado en la Figura 32 reveló que la cepa M3-97 presenta una semejanza del 87 % con el grupo formado por las especies *Halomonas cerina*, *Halomonas nitroreducens*, *Halomonas fontilapidosi* y *Halomonas ventosae*.

La secuencia completa (1501 pb) del gen del ARNr 16S en la cepa M3-97 presentaba los 15 nucleótidos característicos de la familia *Halomonadaceae* y los 4 nucleótidos del género *Halomonas*. El análisis de la misma mediante los algoritmos Neighbour Joining, Máxima Parsimonia y Maximun Likelihood confirmó la pertenencia al género *Halomonas*, siendo la topología de todos estos árboles similar. En la Figura 33 se muestra el árbol resultado del análisis mediante el algoritmo Maximun Likelihood. Las especies más cercanas filogenéticamente fueron *Halomonas cerina* SP4^T, *Halomonas fontilapidosi* 5CR^T y *Halomonas ventosae* A112^T con porcentajes de identidad del 97,23 %, 97,09 % y 97,06 % respectivamente.

Los estudios genotípicos mostraron un contenido en G+C de 66,9 moles %, el cual queda incluido en el rango de G+C establecido para el género *Halomonas*, que se extiende desde 53,8 moles % de *H. denitrificans* (Kim y col., 2007) y *H. venusta* (Baumann y col., 1972) a 74,3 moles % de *H. ventosae* (Martínez-Cánovas y col., 2004).

Respecto a los estudios quimiotaconómicos llevados a cabo revelaron que los ácidos grasos predominantes en la cepa M3-97 eran 18:1 ω 7c (45,01%, p/p) y 16:0 (25,93%, p/p), así como que la quinona mayoritaria era la ubiquinona 9 (92 %, p/p).

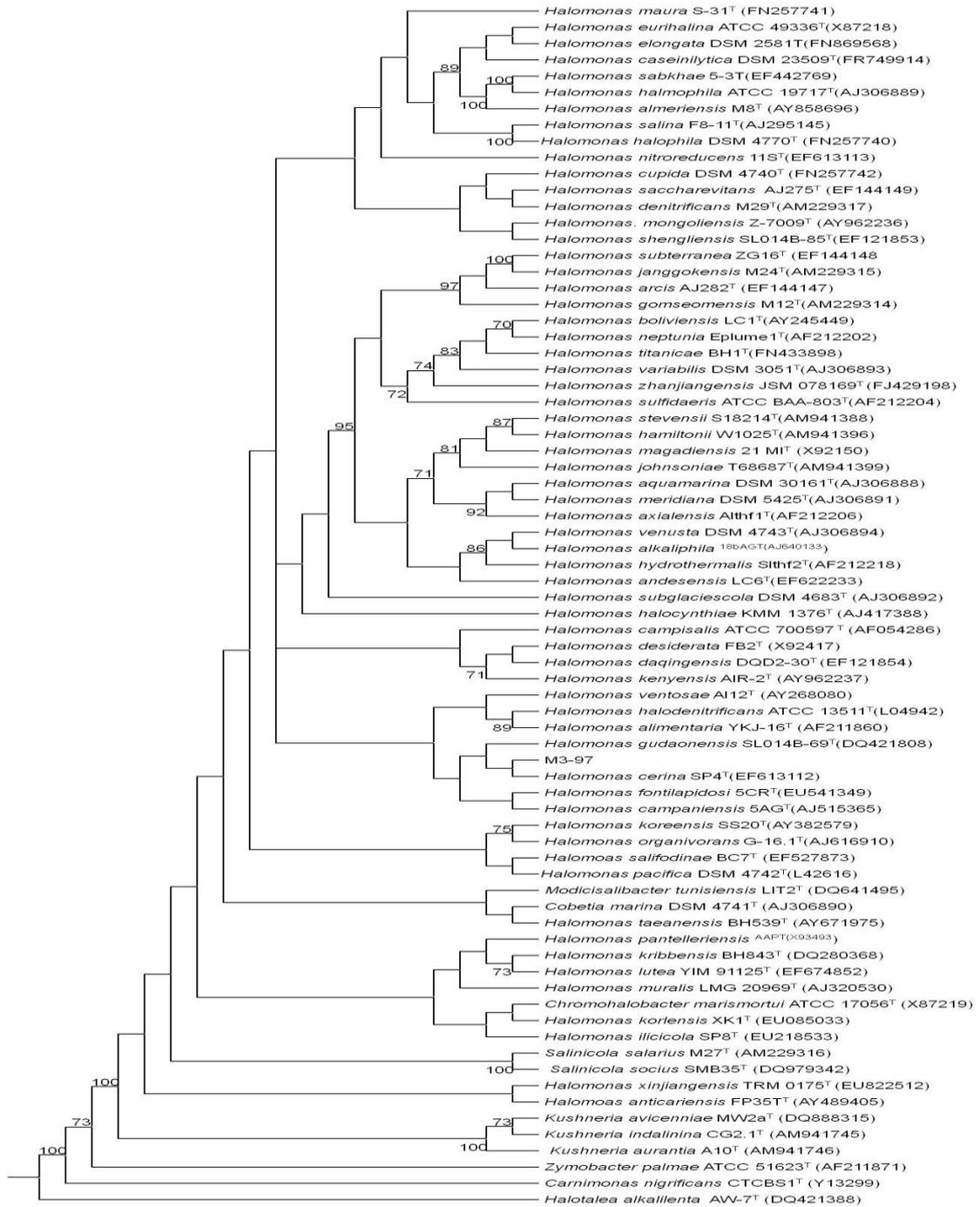


Figura 33. Árbol filogenético basado en la secuencia completa del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método Máximo Likelihood. Se utilizó como “outgroup” la secuencia de la cepa tipo de *Halotalea alkalilenta* AW-7^T. Los números de acceso al GenBank se muestran entre paréntesis. Se indican los valores de “bootstrap” mayores del 70 %.

En la Tabla 20 se recoge el contenido total en ácidos grasos de la cepa M3-97 expresado en tantos por ciento.

Tabla 20. Composición en ácidos grasos de la cepa M3-97. Resultados expresados como porcentaje del total de ácidos grasos.

CEPA	ÁCIDOS GRASOS (% p/p)							
	10:0	10:0 3OH	12:0 3OH	16:0	17:0 CYCLO	18:1 ω7c	18:0	19:0 CYCLO ω 8c
M3-97	2,85	0,23	6,73	25,93	1,10	45,01	0,74	9,66

La imagen tomada al microscopio electrónico de transmisión, reveló que se trataba de una cepa móvil mediante flagelos peritricos (Figura 34).

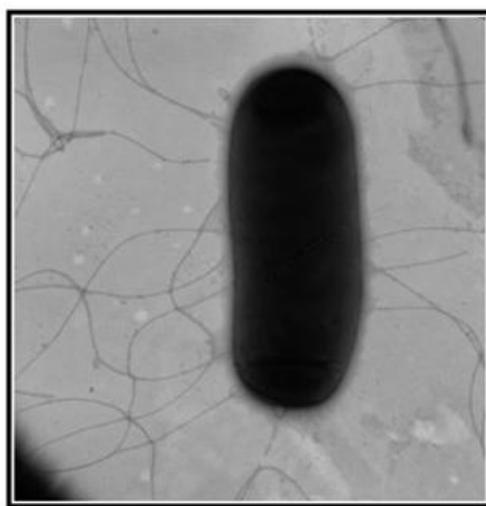


Figura 34. Microfotografía de la cepa M3-97, donde se muestran sus flagelos peritricos (16.000X).

En la Tabla 21 presentamos las características fenotípicas diferenciales entre la cepa M3-97 y las especies más relacionadas. En el pie de dicha de tabla aparecen las características comunes con ellas.

Tabla 21. Características que distinguen la cepa M3-97 de las especies más relacionadas.

1, cepa M3-97^T; 2, *Halomonas cerina* SP4^T; 3, *Halomonas fontilapidosi* 5CR^T; 4, *Halomonas ventosae* A112^T; 5, *Halomonas nitroreducens* 11S^T; 6, *Halomonas elongata* ATCC 33173^T; Símbolos: +, positivo; -, negativo; ND, no determinado; D, dudoso.

CARACTERÍSTICA	1	2	3	4	5	6
Morfología	Bacilo	Cocobacilo	Bacilo corto	Bacilo	Cocobacilo	Bacilo
Tamaño (µm)	1,2-1,4 x 3,2-3,5	0,8 x 1,1±	0,96 x 1,73§	0,7-0,8 x 1,2-1,4¶	0,6-0,8 x 1,0-1,6¶	0,8 x 1,1Ξ
Movilidad	+	-	+	+	-	+
Pigmentación	Crema	Crema-amarillo	Crema-marrón	Crema	Crema	Blanco
Producción de EPS	+	+	-	+	-	-
Flagelos	Peritricos	-	Polar§	Lateral¶	-	Polar/ Peritricos Ξ
Crecimiento a						
Concentración de sales						
% (p/v)						
Rango	3-25	3-25	3-25	1-15	0,5-30	0-20
Óptimo	5	7,5-10	7,5-10	8	5-7,5	3,5-8
Temperatura (°C)						
Rango	21-41	4-45	15-45	25-37	5-41	4-45
Óptimo	32	32-35	32-35	32	32-37	30-37
Valores de pH						
Rango	5-10	5-10	5-9	6-10	5-10	5-10
Óptimo	7	6-7	6-8	7-8	7-9	7
Hidrólisis de						
ADN	-	+	+	-	-	+
Tween 80	+	+	-	-	-	-
Tirosina	-	+	+	+	-	-
Producción de pigmento de la tirosina	-	-	+	-	-	-
H₂S	-	-	+	+	+	-
Lecitinasa	+	-	+	-	-	+
Fosfatasa	+	-	-	-	+	+
Ureasa	-	+	-	-	+	+
Respiración sobre nitratos	+	+	+	+	+	-
Respiración sobre nitritos	+	+	+	+	+	-
Ornitina descarboxilasa	-	D	-	-	ND	+
Crecimiento en						
Agar MacConkey	+	-	+	+	+	+
Agar Cetrimida	+	+	-	+	-	+
Crecimiento en*						
Acetato	+	+	-	+	+	+
Adonitol	-	-	+	-	-	+
Almidón	-	-	+	+	-	+
Caprilato	-	-	-	-	D	-
Citrato	+	+	+	-	+	+
D-celobiosa	+	+	-	+	D	+
D-fructosa	+	-	+	+	+	+

Tabla 21. Continuación

CARACTERÍSTICA	1	2	3	4	5	6
D-galactosa	+	-	+	+	+	+
D-gluconato	-	-	+	+	+	+
D-manitol	-	-	-	-	+	+
D-manosa	-	-	+	-	+	+
D-rafinosa	-	-	-	-	D	+
Esculina	-	-	-	+	-	+
Etanol	+	-	-	+	+	-
Glicerol	-	D	+	+	+	-
Lactosa	-	-	-	-	+	+
L-alanina	+	-	+	-	+	+
L-arabinosa	-	-	+	-	+	+
L-fenilalanina	-	+	+	-	D	-
L-histidina	+	-	+	-	+	+
L-ramnosa	+	-	+	+	-	+
L-serina	+	-	+	+	+	+
L-valina	+	-	-	-	-	+
<i>mio</i> -inositol	+	+	-	-	-	+
Propionato	-	-	-	-	+	+
Sorbitol	-	-	+	+	+	+
Producción de ácidos de						
amigdalina	-	-	-	-	D	+
D-melibiosa	-	-	-	-	D	+
L-ramnosa	-	-	-	-	-	+
Sensibilidad a:						
Amoxicilina (25 µg)	+	+	+	+	+	-
Ampicilina (10 µg)	+	+	+	+	+	-
Cefalotina (30 µg)	+	D	+	ND	+	-
Eritromicina (15 µg)	-	-	-	+	D	-
Gentamicina (10 µg)	+	D	+	ND	D	-
Penicilina G (10 µg)	-	D	+	ND	D	-
Polimixina B (300 IU)	+	+	-	+	+	-
Sulfamida (300 µg)	+	+	+	+	+	-
Tetraciclina (30 µg)	+	ND	+	ND	D	-
Tobramicina (10 µg)	+	-	+	-	-	+
Contenido en G+C (moles %)	66,9	62,7	65,7	74,3	65,3	60,5
Contenido en ácidos grasos^a						
(%, p/p)						
16:0	25,93	30,91	25,55	ND	27,8	ND
16:1ω7c	ND	20,81	ND	ND	ND	ND
18:1ω7c	45,01	27,76	31,36	ND	29,92	ND
16:1ω7c/15:0 ISO 2OH	ND	ND	22,33	ND	22,30	ND

*, como única fuente de carbono y energía o única fuente de carbono, nitrógeno y energía.

^a, la quinona mayoritaria en todas las cepas es la ubiquinona 9.

Todas las cepas incluidas en esta tabla son positivas para la hidrólisis de Twen 20, la reducción aerobia del nitrato, el crecimiento en succinato y D-trealosa, y la sensibilidad a ácido nalidixico (30 µg) y rifampicina (5 µg). Son negativas para la actividad amilasa, la hidrólisis de la caseína, la gelatina, la hemólisis en agar sangre, el crecimiento en DL-lactato, L-metionina y salicilina, la producción de ácidos de L-arabinosa, D-glucosa, D-manitol, *mio*-inositol, sacarosa y D-sorbitol.

Datos obtenidos de: ±, González-Domenech y col. (2008) §, González-Domenech y col. (2009); ¶. Marínez-Cánovas y col. (2004); ¥, González-Domenech y col. (2008); ☒ Vreeland y col. (1980).

Como puede observarse, la cepa M3-97 se distinguió de estas especies en un número significativo de pruebas morfológicas, bioquímicas, fisiológicas, nutricionales y de sensibilidad a agentes antimicrobianos, destacando por la gran cantidad de antimicrobianos a los cuales es sensible y especialmente por su actividad lipolítica sobre Tween 80.

Identificación de la cepa M1-16-X

Como describíamos con anterioridad, la cepa M1-16-X y la especie *Halomonas alkaliphila* formaron un fenón con un porcentaje de semejanza del 90,5 % (Figura 32).

El análisis filogenético basado en el gen completo (1494 pb) del ARNr 16S empleando los algoritmos Neighbour Joining, Máxima Parsimonia y Maximun Likelihood confirmaron la pertenencia de dicha cepa al género *Halomonas*. La secuencia contenía además los 15 nucleótidos característicos de la familia *Halomonadaceae* y los 4 nucleótidos del género *Halomonas*.

En la Figura 35 se muestra el árbol resultado del algoritmo Maximun Likelihood el cual mostró una topología similar a los árboles obtenidos mediante los algoritmos Neighbour Joining y Máxima Parsimonia. Las especies más cercanas filogenéticamente fueron *Halomonas fontilapidosi* 5CR^T y *Halomonas alkaliphila* 18bAG^T con porcentajes de identidad del 96,94% y 96,88% respectivamente.

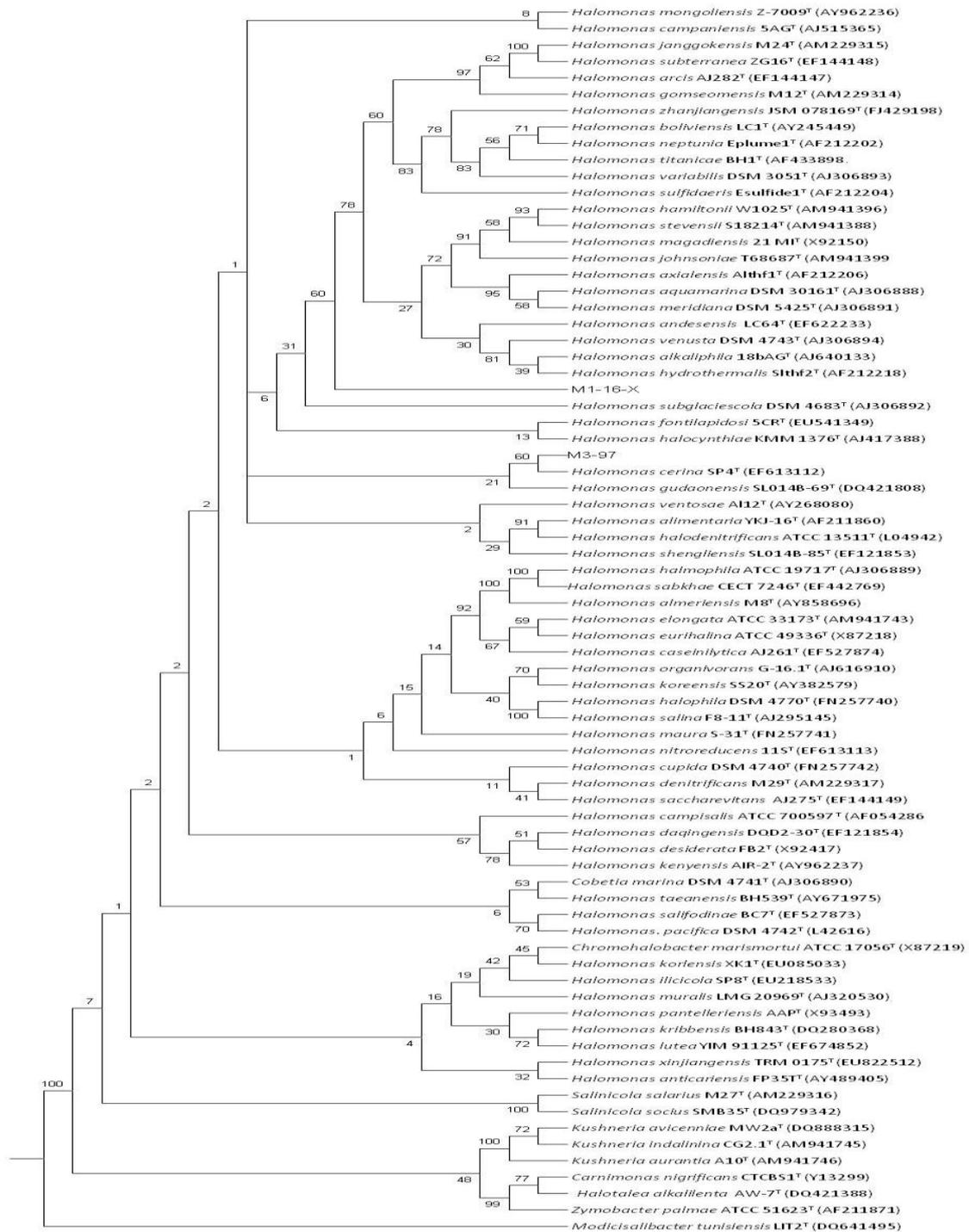


Figura 35. Árbol filogenético basado en la secuencia completa del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método Maximum Likelihood. Se utilizó como “outgroup” la secuencia de la cepa tipo de *Modicisalibacter tunisiensis* LIT2^T. Los números de acceso al GenBank de las secuencias de las cepas de referencia se encuentran entre paréntesis. Se indican los valores de “bootstrap” mayores del 70 %.

En base a los resultados fenotípicos y filogenéticos, se hicieron estudios genotípicos y quimiotaxonómicos con objeto de confirmar la posición taxonómica de la cepa M1-16-X. El contenido en G+C fue de 56,2 moles % incluido en el rango de G+C establecido para el género *Halomonas*. Los ácidos grasos predominantes fueron 18:1 ω 7c (58,02 %, p/p) y 16:0 (24,19 %, p/p). El análisis de las quinonas mostró que la cepa contenía la ubiquinona 9 (Q9) como lipoquinona respiratoria predominante (97 %, p/p), aunque también presentaba una pequeña cantidad de ubiquinona 8 (3 %, p/p). El contenido expresado en tantos por ciento de los ácidos grasos se muestra en la Tabla 22.

Tabla 22. Composición en ácidos grasos de la cepa M1-16-X. Resultados expresados como porcentaje del total de ácidos grasos.

CEPA	ÁCIDOS GRASOS (% , p/p)						
	10:0	10:0 3OH	12:0	12:0 2OH	12:0 3OH	14:0	16:0
M1-16-X	1,51	0,08	0,63	0,09	4,70	2,79	24,19
	17:0	18:1 ω7c	18:1 ω5c	18:0	11 metil 18:1 ω7c	20:1 ω7c	
	0,11	58,02	0,22	1,03	0,69	0,11	

Al microscopio electrónico de transmisión, se confirmó la movilidad de dicha cepa al observar la presencia de flagelos peritricos (Figura 36).

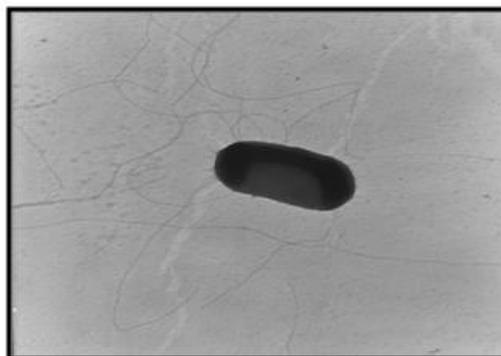


Figura 36. Microfotografía de la cepa M1-16-X donde se muestran sus flagelos peritricos (16.000X).

La comparación fenotípica y genotípica de la cepa M1-16-X y de las especies fenotípica y filogenéticamente más cercanas se muestran en la Tabla 23. Las características comunes en todas ellas se describen en el pie de la tabla.

Tabla 23. Características que distinguen la cepa M1-16-X de las especies relacionadas.
 1, cepa M1-16-X^T; 2, *Halomonas fontilapidosi* 5CR^T; 3, *Halomonas alkaliphila* 18bAG^T; 4, *Halomonas elongata* ATCC 33173^T; Símbolos: +, positivo; -, negativo; ND, no determinado.

CARACTERÍSTICA	1	2	3	4
Morfología	Bacilo	Cocobacilo	Bacilo	Bacilo
Tamaño (µm)	2,4-2,5 x 1,2-1,3	0,96 x 1,73	2,3-2,6 x 0,6-0,7¶	0,8 x 1,1
Pigmentación	Crema	Crema-marrón	Crema	Blanco
Producción de EPS	+	-	+	-
Flagelos	Peritricos	Polar	ND	Polar/ Peritricos ∃
Crecimiento a				
Concentración de sales % (p/v)				
Rango	1-30	3-25	0-20	0-20
Óptimo	5	7,5-10	10	3,5-8
Temperatura (°C)				
Rango	22-41	15-45	5-20	4-45
Óptimo	32	32-35	37	30-37
Valores de pH				
Rango	5-10	5-9	7,5-10	5-10
Óptimo	7	6-8	9	7
Hidrólisis de				
ADN	-	+	-	+
Gelatina	+	-	+	-
Tween 20	+	+	-	+
Tirosina	-	+	+	-
Producción de pigmento de la tirosina	-	+	+	-
H₂S	-	+	-	-
Lecitinasa	-	+	-	+
Fosfatasa	-	-	+	+
Ureasa	-	-	-	+
Respiración sobre nitratos	+	+	-	-
Respiración sobre nitritos	-	+	-	-
Ornitina descarboxilasa	-	-	-	+
Crecimiento en agar MacConkey	-	-	+	+
Crecimiento en:*				
Acetato	+	-	+	+
Adonitol	-	+	-	+
Caprilato	+	-	+	-
D-celobiosa	+	-	+	+
D-fructosa	-	+	+	+
D-manitol	-	-	-	+
D-manosa	-	+	+	+
D-rafinosa	-	-	-	+
D-salicina	-	-	-	-
Esculina	-	-	-	+
Glicerol	+	+	+	-
Lactosa	-	-	+	+
mió-inositol	+	-	+	+
Propionato	+	-	+	+

Tabla 23. Continuación

CARACTERÍSTICA	1	2	3	4
D-salicina	-	-	-	-
Esculina	-	-	-	+
Glicerol	+	+	+	-
Lactosa	-	-	+	+
<i>mio</i> -inositol	+	-	+	+
Propionato	+	-	+	+
L-arabinosa	-	+	+	+
L-fenilalanina	-	+	+	-
L-serina	+	+	-	+
L-valina	-	-	+	+
Producción de ácidos de:				
amigdalina	-	-	-	+
D-glucosa	+	-	-	-
D-melibiosa	-	-	-	+
<i>mio</i> -inositol	+	-	-	-
L-ramnosa	-	-	-	+
Sensibilidad a				
Ampicilina (10 µg)	+	+	+	-
Penicilina G (10 µg)	+	+	+	-
Tetraciclina (30 µg)	+	+	+	-
Contenido en G+C (moles %)	56,2	65,7	53,1	60,5
Contenido en ácidos grasos^a (% p/p)				
16:0	24,19	25,55	56	ND
16:1	ND	ND	22	ND
16:1 ω 7c	ND	ND	ND	ND
18:1 ω 7c	58,02	31,36	ND	ND

*, como única fuente de carbono y energía o única fuente de carbono, nitrógeno y energía.

^a, la quinona mayoritaria en todas las cepas es la ubiquinona 9.

Todas las cepas incluidas en esta tabla son positivas para la movilidad, la reducción aerobia del nitrato, el crecimiento en L-alanina, citrato, D-galactosa, D-gluconato, D-glucosa, L-histidina, L-ramnosa, sorbitol, almidón, succinato y D-trealosa y el crecimiento en agar cetrimida. Son negativas para la actividad amilasa, la hidrólisis de caseína y Tween 80, hemolisina, el crecimiento en DL-lactato, L-metionina y etanol, la producción de ácidos de L-arabinosa, D-manitol, sacarosa y D-sorbitol y son resistentes a eritromicina (15 µg).

§, Datos obtenidos de González-Domenech y col. (2009); ¶, Datos obtenidos de Romano y col. (2006); ☒, Datos obtenidos de Vreeland y col. (1980).

Como ocurría con el caso anterior, la cepa M1-16-X se distinguió de las especies más relacionadas en un número significativo de pruebas morfológicas, bioquímicas, fisiológicas, nutricionales y de sensibilidad a agentes antimicrobianos, mostrando además características fenotípicas que no son muy frecuentes entre las especies que componen el género *Halomonas* como es la hidrólisis de la gelatina.

III.2.3.1.2. Identificación taxonómica de la cepa M4-3M

La secuencia del gen del ARNr 16S (1445 pb) de la cepa M4-3M fue analizada mediante los algoritmos Neighbour Joining, Máxima Parsimonia y Maximum Likelihood, mostrando la pertenencia de dicha cepa al género *Marinobacter*. En la Figura 37 se muestra el árbol filogenético basado en el algoritmo Neighbour Joining. La topología del árbol mostró alta similitud con los obtenidos mediante los otros algoritmos utilizados.

Las especies más relacionadas filogenéticamente fueron *Marinobacter segricrescens* con un porcentaje de identidad del 97,9 %, seguida de las cepas *Marinobacter adhaerens*, *Marinobacter flavimaris* y *Marinobacter salsuginis* con porcentajes de identidad del 97,5 %; 97,5% y 97,4 % respectivamente.

El análisis genotípico de la cepa M4-3M mostró que tenía un contenido en G+C de 56,92 moles %, incluido en el rango establecido para el género *Marinobacter* que se extiende desde 53 a 59,6 moles % (Liebgott y col., 2006). En cuanto a la composición en ácidos grasos, en la Tabla 24 se muestra el contenido total expresado en tantos por ciento, siendo los predominantes los ácidos grasos 15:0 ANTEISO (34,30 %, p/p), 17:0 ANTEISO (13,98 %, p/p) y 16:0 (13,28 %, p/p). La ubiquinona Q9, fue la quinona predominante (93%, p/p).

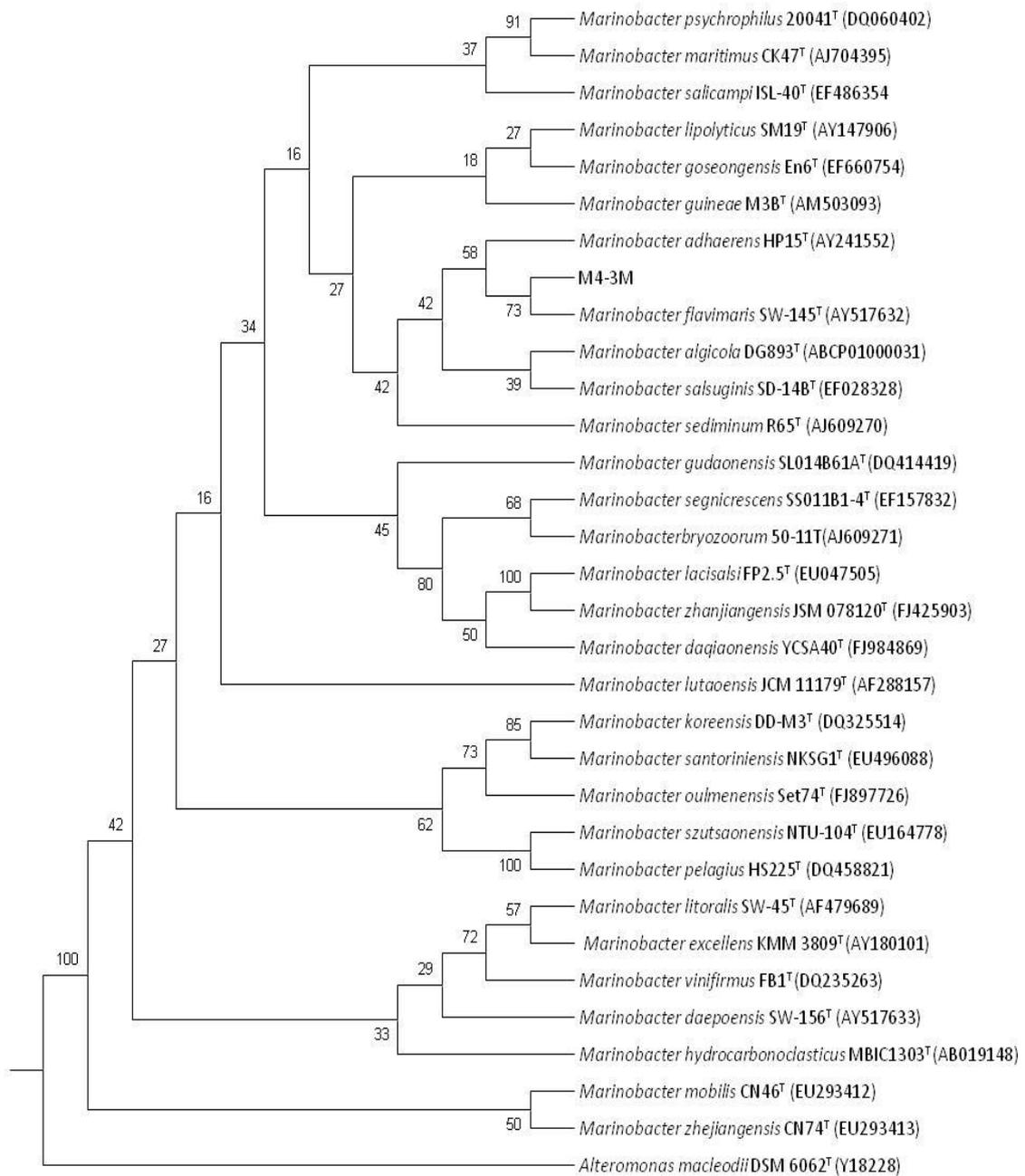


Figura 37. Árbol filogenético basado en la secuencia completa del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método Maximum Likelihood. Se utilizó como “outgroup” la secuencia de la cepa tipo de *Alteromonas macleodii* DSM 6062^T. Los números de acceso al GenBank de las secuencias de las cepas de referencia se encuentran entre paréntesis.

Tabla 24. Composición en ácidos grasos de la cepa M4-3M. Resultados expresados como porcentaje del total de ácidos grasos.

CEPA	ÁCIDOS GRASOS (% p/p)				
M4-3M	14:0 ISO	14:0	15:0 ISO	15:0 ANTEISO	16:0 ISO
	2,14	1,16	7,37	34,30	6,14
	16:0	15:0 2OH	17:0 ISO	17:0 ANTEISO	
	13,28	1,07	8,88	13,98	
	18:0 ISO	18:0	19:0 ANTEISO	20:0	
0,91	7,70	1,21	1,26		

El estudio fenotípico realizado indicó que la cepa M4-3M presenta características comunes a las especies del género *Marinobacter*. Las especies de dicho género son bacilos Gram negativos con metabolismo respiratorio y catalasa positivos. Crecen en un amplio margen de concentraciones de sales (entre el 1 % y el 20%, p/v), de temperaturas (entre 4 °C y 45 °C) y de pH (entre 6 y 9,5). La mayoría de las especies son móviles por flagelos peritricos o por un único flagelo polar. Son capaces de utilizar una gran cantidad de sustratos como única fuente de carbono y energía y como única fuente de carbono, nitrógeno y energía.

La observación al microscopio electrónico de transmisión de la cepa M4-3M (Figura 38) reveló, que al igual que muchas de las especies del género *Marinobacter*, presentaba un único flagelo polar.

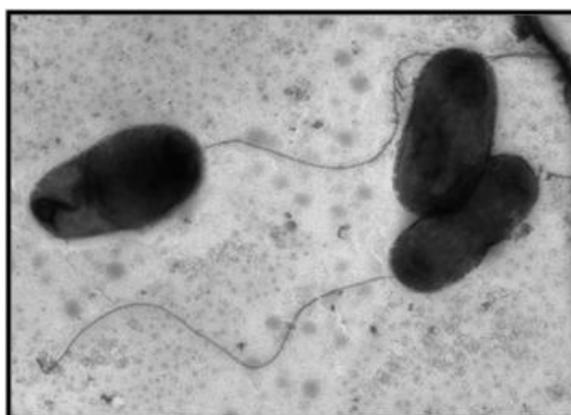


Figura 38. Microfotografía de la cepa M4-3M mostrando su único flagelo polar (16.000X).

En la Tabla 25 se muestran las características fenotípicas de la cepa M4-3M y las especies fenotípicas y filogenéticamente más relacionadas.

Tabla 25. Características que distinguen la cepa M4-3M de otras especies relacionadas. 1, cepa M4-3M^T; 2, *Marinobacter segnicrescens* SS011B1-4^T; 3, *Marinobacter adhaerens* HP15^T; 4, *Marinobacter sediminum* R65^T; 5, *Marinobacter flavimaris* SW-145^T; 6, *Marinobacter algicola* DG893^T; 7, *Marinobacter salsuginis* SD-14B^T; 8, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* MBIC1303^T; Símbolos: +, positivo; -, negativo. ND, no determinado; D, dudoso.

CARACTERÍSTICA	1	2 ^Y	3 ^Y	4 ^Y	5 ^Y	6 ^Y	7 ^Y	8
Morfología	Bacilo	Coco-bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Tamaño (µm)	0,5 x 1,9	0,7 x 2	0,7 x 1,9	0,3 x 2	0,7 x 2,2	0,5 x 2,1	1 x 2	0,3 x 2,1
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+	+
Pigmentación	Crema	Crema-amarillo	Crema-marrón	Crema	Crema	Crema	Crema	Blanco
Flagelos	Polar	Polar	Polar	ND	Polar	Polar	Polar	Polar
Crecimiento a								
Concentraciones de sales % (p/v)								
Rango	3-20	1-20	0,5-20	0,5-18	2-20	3-20	1-20	1-20
Óptimo	5	4-8	10	10	7,5	3-6	5	7,5
Temperatura (°C)								
Rango	32-51	15-45	5-45	4-42	5-41	15-51	15-45	32-45
Óptimo	32	30-37	34-38	37	32	25-30	30-37	32
Valores de pH								
Rango	7-9	5-9	6-9	6-9	6-8	7-9	6-9	7-10
Óptimo	7	7,5-8	7,5-8	7	7	7,5	7,5-8	7
Hidrólisis de								
Almidón	-	-	-	-	-	+	-	-
Gelatina	+	+	-	-	-	-	+	-
Tween 20	+	-	ND	-	+	-	+	+
Tween 80	+	+	ND	+	-	-	+	-
Tirosina	+	-	-	-	-	-	-	-
Producción de pigmento de la tirosina	+	-	-	-	-	-	-	-
Reducción aerobia del nitrato	+	+	-	+	-	-	+	+
Reducción aerobia del nitrito	-	-	-	-	-	-	+	-
Respiración sobre nitratos	+	D	-	ND	D	+	+	-
Respiración sobre nitritos	-	D	-	ND	D	-	+	-
Ornitina descarboxilasa	-	ND	-	+	ND	-	+	-
Crecimiento en*								
Acetato	+	+	-	-	-	-	+	+
Citrato	+	+	-	-	-	+	-	+
D-fructosa	+	+	-	-	-	+	-	-
D-galactosa	+	-	-	-	-	+	-	-
D-glucosa	+	+	-	+	-	-	+	-
Glicerol	+	-	-	+	-	+	+	-
Lactosa	+	-	-	-	-	+	-	-
L-alanina	+	-	+	-	-	+	+	-

Tabla 25. Continuación

CARACTERÍSTICA	1	2¥	3¥	4¥	5¥	6¥	7¥	8
L-histidina	+	-	-	-	-	-	-	-
Succinato	+	-	-	-	+	+	-	+
Producción de ácidos de								
amigdalina	-	-	-	-	-	-	-	-
D-fructosa	+	-	-	-	+	-	+	-
D-glucosa	+	-	-	-	-	+	+	-
Contenido en G+C (moles %)	56,92	59,5	56,9	56,9	57	54	55,9	53
Contenido en ácidos grasos ^a (% p/p)								
15:0 ANTEISO	34,30	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16:0	13,98	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
17:0 ANTEISO	13,28	2,12	ND	21,78	24,8	25,5	22,9	23,59

*, como única fuente de carbono y energía o carbono, nitrógeno y energía

^a, la quinona mayoritaria es la ubiquinona Q9.

Todas las cepas fueron negativas para la hidrólisis de la urea y la producción de ácidos a partir de D-manitol, D-melibiosa, D-sorbitol, L-arabinosa, L-ramnosa, *mio*-inositol y sacarosa.

¥, Datos tomados de los autores: Guo y col., 2007; Kaepfel y col., 2011; Romanenko y col., 2005; Yoon y col., 2004; Green y col., 2006; Achtman y Wagner, 2008; Gauthier y col., 1992.

La cepa M4-3M se diferencia especialmente de las especies relacionadas filogenéticamente, por sus temperaturas de crecimiento y por una variable actividad hidrolítica sobre proteínas, lípidos y otros compuestos. Además también parece ser nutricionalmente más versátil que el resto y muy sensible a los antimicrobianos.

III.2.3.1.3 Identificación taxonómica de la cepa M1-120

La secuencia del gen del ARNr 16S (1305 pb) de la cepa M1-120 se comparó con las secuencias de las cepas tipo de las especies del género *Pseudoalteromonas*, mediante los tres algoritmos Neighbour Joining, Máxima Parsimonia y Maximum Likelihood confirmándose la pertenencia de dicha cepa al género *Pseudoalteromonas*. En la Figura 39 se muestra el árbol filogenético basado en el algoritmo Neighbour Joining. Esta cepa mostró una similitud del 97,9 % con la especie *Pseudoalteromonas carrageenovora* ATCC 43555^T.

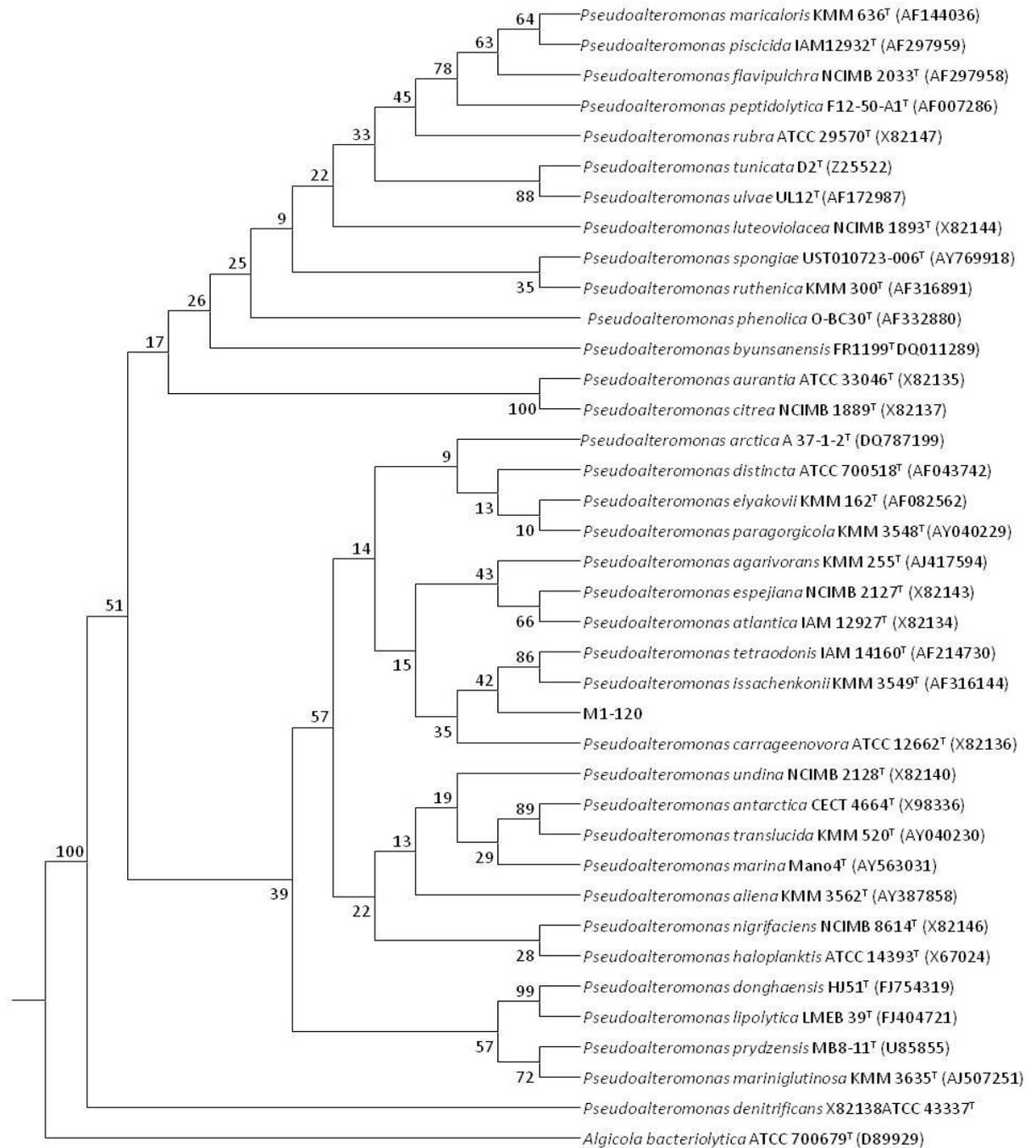


Figura 39. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método **Máximo Likelihood**. Se utilizó como “outgroup” la secuencia de la cepa tipo de *Algalcola bacteriolytica* ATCC 700679^T. Los números de acceso al GenBank de las secuencias de las cepas de referencia se encuentran entre paréntesis.

Los estudios genotípicos realizados indicaron que el valor medio en G+C era de 37,9 moles % para la cepa M1-120, próximo a 39,5 moles % de *Pseudoalteromonas carrageenovora*.

Respecto al análisis quimiotaxonómico los ácidos grasos predominantes fueron 16:0 (29,85 %, p/p) y 12:0 3OH (8,26 %, p/p). En la Tabla 26 se especifica el contenido total en ácidos grasos de la cepa M1-120 con un contenido superior al 1 %, p/p.

Tabla 26. Composición en ácidos grasos de la cepa M1-120. Resultados expresados como porcentaje del total de ácidos grasos.

CEPA	ÁCIDOS GRASOS			
	12:0	12:0 3OH	14:0	16:0
M1-120	3,49	8,26	1,59	29,85
	17:1 ω8c	17:0	18:1 ω7c	18:0
	1,38	1,00	5,76	2,86

La cepa M1-120, al igual que el resto de especies del género *Pseudoalteromonas*, es un bacilo Gram negativo con un metabolismo respiratorio; crece en un rango de temperaturas de entre 4 °C y 37°C. Es móvil y catalasa positivo. Hidroliza la gelatina, el DNA y el Tween 80.

La cepa M1-120 presenta un único flagelo polar observable al microscopio electrónico de transmisión (Figura 40).

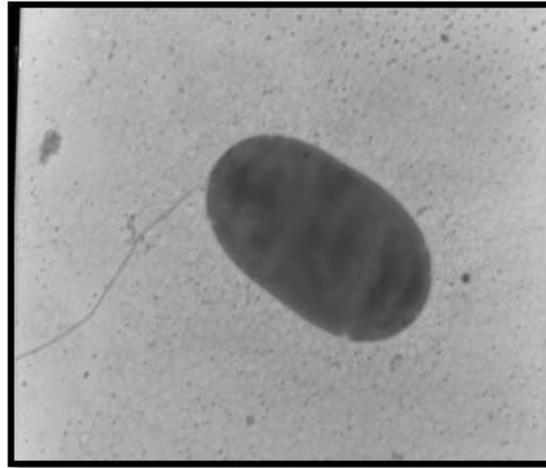


Figura 40. Microfotografía de la cepa M1-120 mostrando su único flagelo polar (16.000X).

Las principales diferencias entre la cepa M1-120 y la especie *Pseudomonas carrageenovora*, con la que se relaciona filogenéticamente, se describen en la Tabla 27.

Tabla 27. Características diferenciales entre la cepa M1-120 y *Pseudomonas carrageenovora* ATCC 43555^T.

CARACTERÍSTICA	M1-120	<i>P. carrageenovora</i> ^a ATCC 43555 ^T
Tamaño (µm)	0,9-1,0 x 2,1-2,3	0,7-0,8 x 1,9-2,5
Morfología	Bacilo	Cocobacilo
Crecimiento en sales (% p/v)	1-15	1-7,5
Crecimiento en pH	6-10	6-9
Crecimiento en*		
Acetato	-	+
D-galactosa	-	+
Glicerol	-	+
L-Lactosa	-	+
Citrato	-	+
L-alanina	+	-
Sensibilidad a		
Eritromicina (15µg)	-	D
Contenido en G+C (moles %)	37,9	39,5

*, sustratos utilizados como única fuente de carbono y energía o como única fuente de carbono, energía y nitrógeno.
D, dudoso.

^a, datos obtenidos de Kagawa-Matsuhita y colaboradores (1992) y Gauthier y colaboradores (1995).

La cepa M1-120 se diferencia especialmente por su capacidad para crecer a concentraciones salinas más elevadas y por su escasa versatilidad nutricional, ya que utiliza pocos sustratos como única fuente de carbono y energía, y la producción de ácidos a partir de diferentes carbohidratos es bastante escasa. Por el contrario la actividad hidrolítica es amplia aunque no destaca sobre el resto de especies del género *Pseudoalteromonas*; finalmente es sensible a la mayoría de los antimicrobianos.

III.2.3.2. Caracterización taxonómica de las cepas de arqueas

Las 49 cepas pertenecientes al Dominio *Archaea*, aisladas del Humedal de Ajauque y Rambla Salada, fueron identificadas inicialmente en base a la secuencia parcial del gen del ARNr 16S. En la Tabla 28 se muestran las distintas asignaciones taxonómicas.

Entre las 49 cepas aisladas, se identificaron 19 especies incluidas en 12 géneros. *Haloferax* y *Natrinema* fueron los géneros más representados con un 20,4 % del total cada uno, seguido de los géneros *Halostagnicola* (12,2 %), *Haloarcula* (8,2 %), *Halorubrum* (8,2 %), *Haloterrigena* (8,2 %), *Halococcus* (6,1 %), *Haladaptatus* (4,1 %), *Halomicrobium* (4,1 %), *Natrialba* (4,1 %), *Halogeometricum* (2,1 %) y *Halorhabdus* (2,1 %).

El análisis de las secuencias parciales del gen del ARNr 16S mediante el algoritmo Máxima Parsimonia confirmó la pertenencia de todas las cepas a la familia *Halobacteriaceae* (Figura 41). Los resultados de las pruebas fenotípicas y el porcentaje de identidad en las secuencias del ARNr 16S de cada una de las cepas puede consultarse en los anexos VII y VIII respectivamente.

A continuación, se procedió a la secuenciación completa del gen del ARNr 16S de cinco de las cepas por considerarlas candidatas a constituir nuevos taxa ya que su porcentaje de identidad con las secuencias de las bases de datos era inferior al 97 %. Concretamente nos referimos a las cepas M2-2D, M4-6a, M4-6b, M3-1c y M2-7b que de acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 28 se habrían asignado en un principio a los géneros *Halorhabdus*, *Haladaptatus*, *Halomicrobium*, *Natrinema*, respectivamente. El análisis filogenético reveló que la cepa M2-2D podría constituir un nuevo género ya que sólo presentó un 92,35 % de identidad con la especie *Halomarina oriensis* JMC 16495^T y por tanto fue con esta cepa con la que se continuó el estudio taxonómico. El resto de cepas presentaron unos porcentajes de identidad superiores al 98,4 %; concretamente, las cepas M4-6a y M4-6b presentaron un porcentaje del 98,7 % y 98,4 % con *Haladaptatus paucihalophilus* DX253^T, la cepa M3-1c un 98,5 % con *Halomicrobium mukohataei* arg-2^T y la cepa M2-7b un 98,9 % con *Natrinema pallidum* CIP 106292^T y se continuará en un futuro próximo con su estudio.

Tabla 28. Asignación taxonómica de las cepas de arqueas aisladas del Humedal de Ajauque y Rambla Salada en base a la secuencia parcial del gen del ARNr 16S.

PHYLUM	CLASE	ORDEN	FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Halobacteria</i>	<i>Halobacteriales</i>	<i>Halobacteriaceae</i>	<i>Haladaptatus</i> (2)*	<i>Haladaptatus paucihalophilus</i> DX253 ^T (2)
				<i>Haloarcula</i> (4)	<i>Haloarcula argentinensis</i> arg-1 ^T (2) <i>Haloarcula quadrata</i> 801030/1 ^T (2)
				<i>Halococcus</i> (3)	<i>Halococcus hamelinensis</i> 100A6 ^T (3)
				<i>Haloferax</i> (10)	<i>Haloferax mediterranei</i> R-4 ^T (6) <i>Haloferax mucosum</i> PA12 ^T (2) <i>Haloferax prahovense</i> TL6 ^T (2)
				<i>Halogeometricum</i> (1)	<i>Halogeometricum borinquense</i> PR3 ^T (1)
				<i>Halomicrobium</i> (2)	<i>Halomicrobium mukohataei</i> arg-2 ^T (2)
				<i>Halorhabdus</i> (1)	<i>Halorhabdus tiamatea</i> SARL4B ^T (1)
				<i>Halorubrum</i> (4)	<i>Halorubrum aidingense</i> 31-hong ^T (4)
				<i>Halostagnicola</i> 6	<i>Halostagnicola kamekurae</i> 194-10 ^T (3) <i>Halostagnicola larsenii</i> XH-48 ^T (3)
				<i>Haloterrigena</i> (4)	<i>Haloterrigena jeotgali</i> A29 ^T (2) <i>Haloterrigena thermotolerans</i> PR5 ^T (2)
				<i>Natrialba</i> (2)	<i>Natrialba aegyptia</i> 40 ^T (2)
				<i>Natrinema</i> (10)	<i>Natrinema altunense</i> AJ2 ^T (3) <i>Natrinema gari</i> HIS40-3 ^T (1) <i>Natrinema pallidum</i> CIP 106292 ^T (6)

*, los números entre paréntesis indican el número de aislados de cada taxón.

La caracterización taxonómica de las cepas se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones del Comité Internacional de Taxonomía para la descripción de nuevas especies del orden *Halobacteriales* (Oren y col., 1997b).

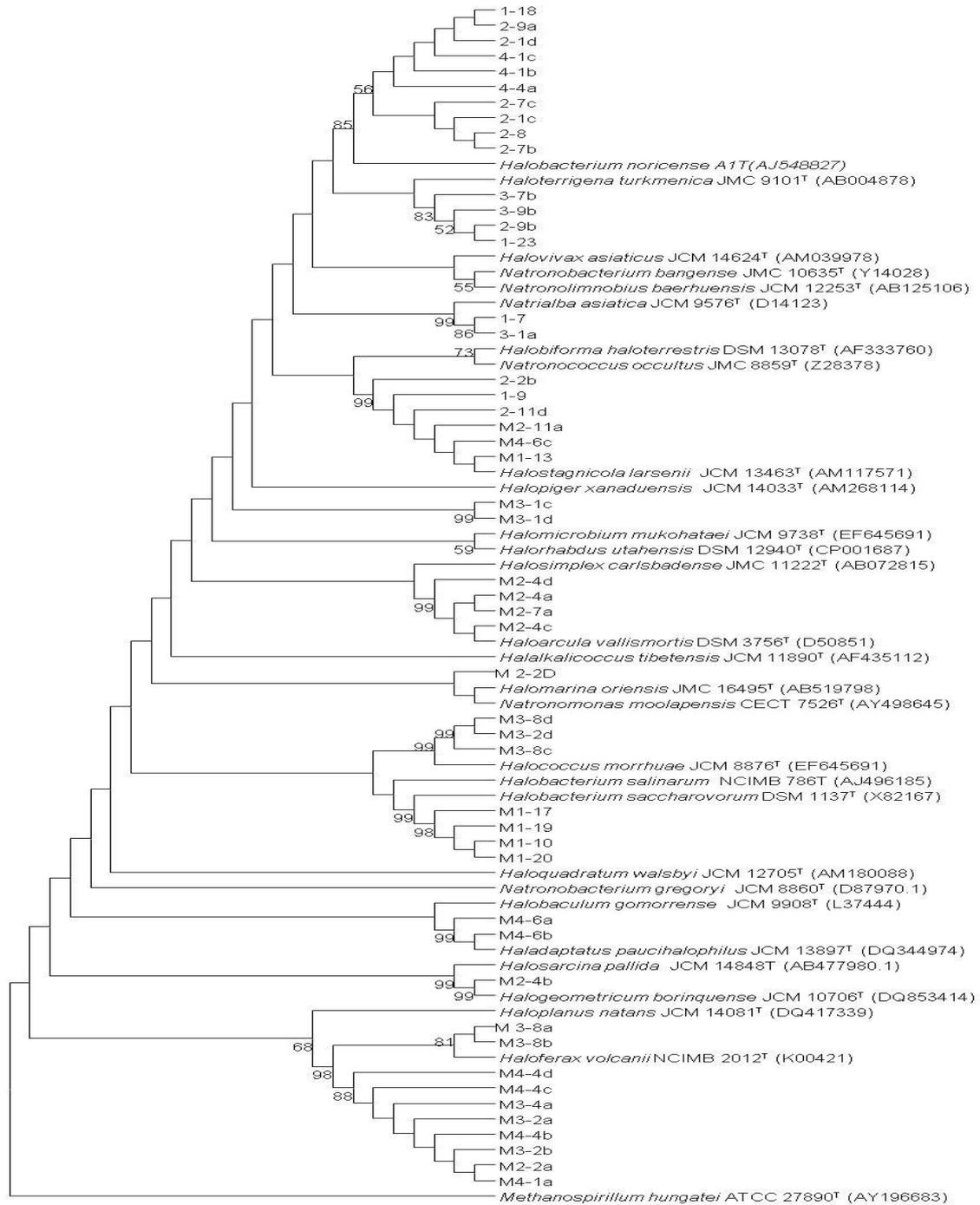


Figura 41. Árbol filogenético basado en la secuencia parcial del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método Máxima Parsimonia. Se utilizó como “outgroup” la secuencia de la cepa tipo de *Methanospirillum hungatei* JF-1^T. Se indican los valores de “bootstrap” mayores del 50 %. Los números de acceso al GenBank se muestran entre paréntesis.

III.2.3.2.1. Identificación taxonómica de la cepa M2-2D

Como ya se ha indicado, la secuencia del gen del ARNr 16S de la cepa M2-2D (1470 pb) mostró un porcentaje de identidad del 92,35 % con *Halomarina oriensis* JMC 16495^T. Los porcentajes de identidad con otras especies relacionadas filogenéticamente fueron 91,98 % con *Natronomonas moolapensis*, 91,69 % con *Natronomonas pharaonis*, 91,1 % con *Halorhabdus utahensis* y 91,03 % con *Halobacterium noricense*. Dicha secuencia fue analizada mediante los algoritmos Neighbour Joining, Máxima Parsimonia y Maximum Likelihood, confirmando la pertenencia de la cepa M2-2D a la familia *Halobacteriaceae*. En la Figura 42 se muestra el árbol basado en el algoritmo Maximum Likelihood y en el anexo IX pueden consultarse los árboles resultados de aplicar los otros dos algoritmos.

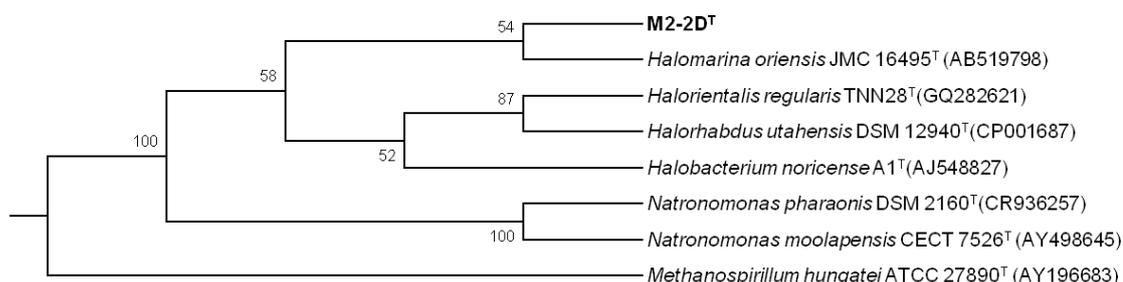


Figura 42. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método **Maximum Likelihood**. Se utilizó como “outgroup” la secuencia de la cepa tipo de *Methanospirillum hungatei* ATCC 27890^T. Los números de acceso al GenBank/EMBL/DDBJ se muestran entre paréntesis. Se indican los valores de “bootstrap” superiores al 50 %.

Las cepas de la familia *Halobacteriaceae* crecen a partir del 15 % (p/v) de sal y de un valor de pH de 6. Necesitan una concentración mínima del 0,5 % (p/v) de magnesio para crecer. La mayoría reducen el nitrato de forma aerobia y ninguna de ellas crece con citrato como única fuente de carbono y energía ni DL-alanina como única fuente de carbono, nitrógeno y energía. Son resistentes a sulfamida, eritromicina, ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol.

Del análisis fenotípico realizado se desprende que la cepa M2-2D presentaba numerosas diferencias fenotípicas con las especies de la familia *Halobacteriaceae*, mostrando mayor semejanza con *Halomarina oriensis*, *Natronomonas moolapensis*, *Natronomonas pharaonis*, *Halorhabdus utahensis*, *Halobacterium noricense* y *Halorientalis regularis*.

La comparación fenotípica de esta cepa y de las especies más relacionadas se muestra en la Tabla 29. En el pie de tabla, se indican las características comunes a todas ellas.

Tabla 29. Características que distinguen la cepa M2-2D de las especies más relacionadas.

1, cepa 2-2D; 2, *Halomarina oriensis* JMC 16495^T; 3, *Natronomonas moolapensis* CECT 7526^T; 4, *Natronomonas pharaonis* DSM 21620^T; 5, *Halorhabdus utahensis* DSM 12940^T; 6, *Halobacterium noricense* DSM 15987^T; 7, *Halorientalis regularis* JMC 16425^T. Símbolos: +, positivo; -, negativo. ND: no determinado; P, pleomorfo; C, coco; B, bacilo.

CARACTERÍSTICA	1	2 ^Y	3 ^L	4 [¶]	5 [†]	6 [•]	7 ^Φ
Morfología	P	C	P	P	P	P	B
Pigmentación	Rosa	Roja	Roja	Roja	Roja	Roja	Roja
Crecimiento a							
Concentraciones de magnesio (% p/v)							
Rango	0,5-30	0,5-31	1-30	0,5-30	0,5-20	0,5-30	0,5-10
Óptimo	10	5	7,5	5	3	5	3
pH							
Rango	6-9	7-9	6-8	7-10	6-9	6-8	6-9
Óptimo	7,5	8	8	8	7	7	7
Concentraciones de sales (% p/v)							
Rango	15-30	10-30	15-30	10-30	15-30	15-30	20-30
Óptimo	25	25	25	20	25	25	25
Temperatura (°C)							
Rango	25-51	25-41	25-42	25-43	25-51	32-41	25-41
Óptimo	37	37	40	40	41	37	37
Hidrólisis de							
Almidón	+	-	ND	-	-	-	+
Gelatina	+	+	ND	ND	-	-	-
Producción de indol	-	-	ND	-	-	ND	+
Reducción aerobia de nitratos	+	+	+	+	+	-	+
Crecimiento anaerobio en							
L-arginina	-	-	ND	-	-	+	-
Nitrato	-	-	ND	-	+	+	-
Crecimiento en*							
L-arabinosa	-	+	-	-	-	+	+
Cistina	-	-	ND	-	-	-	+
D-fructosa	+	+	-	-	+	+	-
D-lactosa	+	+	-	+	-	-	+
DL-glicerol	+	+	+	+	-	-	+
D-glucosa	+	+	+	+	+	-	+
D-lactosa	-	+	-	-	-	+	-
D-manitol	-	+	-	-	-	+	+
L-serina	-	-	-	-	-	-	+
D-trealosa	-	+	ND	-	-	+	+
L-valina	-	-	-	-	-	-	+
D-xilosa	+	+	-	+	+	-	-

Tabla 29. Continuación

CARACTERÍSTICA	1	2 [¥]	3 ^L	4 ^ℱ	5 [‡]	6 [•]	7 [‡]
Producción de ácidos a partir de							
L-arabinosa	-	+	-	-	+	-	-
D-fructosa	-	+	-	-	+	-	-
D-galactosa	+	+	-	-	+	-	+
DL-glicerol	-	+	-	-	-	-	-
D-glucosa	+	+	-	-	+	-	+
D-lactosa	-	+	-	-	+	-	-
D-trealosa	-	+	-	-	-	-	+
D-xilosa	-	+	-	-	-	-	+
Suceptibilidad a							
Ácido nalidíxico (30µg)	-	-	ND	-	-	-	-
Bacitracina (10UI)	-	+	-	+	+	-	+
Ciprofloxacina (5µg)	-	-	ND	-	ND	ND	-
Penicilina G (10UI)	-	-	ND	-	-	ND	-
Rifampicina (5µg)	+	+	+	+	-	ND	+
Trimetropim (1,25µg) + Sulfametoxazol (23,75µg)	-	-	ND	-	ND	ND	-

*, como única fuente de carbono y energía o única fuente de carbono, nitrógeno y energía.

Todas las cepas incluidas en esta tabla son resistentes a ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), estreptomina (10 µg) y tetraciclina (30 µg).

Ninguna de estas cepas utiliza alanina como única fuente de carbono, nitrógeno y energía, ni citrato como única fuente de carbono y energía.

Datos de ¥, Inoue y col. (aceptada); L, Burn y col. (2010); ℱ, Soliman y Tryper (1983); ‡, Waino y col. (2000); •, Gruber y col. (2004); ‡, Cui y col. (aceptada).

La cepa M2-2D se distingue de las especies más relacionadas en un alto número de pruebas fenotípicas, tanto morfológicas como bioquímicas, nutricionales y de sensibilidad a agentes antimicrobianos, destacando por la pigmentación rosa de sus colonias y la capacidad para crecer a la temperatura de 51 °C. Además, hidroliza el almidón, no presenta la enzima ADNasa, y produce ácidos de la D-glucosa y de la D-galactosa. Por otra parte, es sensible únicamente a la rifampicina de entre todos los antimicrobianos ensayados.

III.2.4. DISCUSIÓN

La identificación de las cepas encontradas en el Humedal de Ajauque y Rambla Salada constituye una importante fuente de información acerca de este hábitat inexplorado desde el punto de vista microbiológico. Dentro de las comunidades microbianas, los procariotas heterótrofos (Dortch y Packard, 1989; Marie y col., 1999) llevan a cabo funciones de importancia fundamental ya que controlan los flujos de nutrientes en el sistema a través de la mineralización de la materia orgánica (Fuhrman y Azam, 1982; Azam y col., 1983; Schut y col., 1997) y la producción secundaria de carbono (Azam y col., 1983). Por lo tanto, la identificación y estudio de los aislados confiere información sobre los procesos metabólicos que llevan a cabo y que son necesarios para el entendimiento de los ecosistemas así como para el conocimiento de patrones biogeográficos (Staley y Gosink, 1999). Además, al analizar un hábitat inexplorado desde el punto de vista microbiológico es posible encontrar nuevas especies no descritas hasta el momento y con potencial aplicación industrial.

El conocimiento de la diversidad procariota está íntimamente relacionada con la taxonomía procariota (Oren, 2004), de manera que el estudio y descripción de la diversidad implica un conocimiento previo de las especies procariotas y, por consiguiente, una definición clara de especie. La taxonomía se basa en tres elementos clave: identificación, clasificación y nomenclatura. Los tres elementos son campos dinámicos, y cada elemento depende del que le precede. Mientras que la nomenclatura se rige por el Código Bacteriológico (Lapage y col., 1992), la clasificación y la identificación de los procariotas son áreas que no están formalmente reguladas y en las que se han producido numerosos cambios en los últimos 50 años (Tindall, y col., 2010). Incluso hoy día, a pesar de la información de que disponemos acerca de la diversidad, la fisiología y la genómica de los microorganismos procariotas, todavía no existe una definición clara de especie procariota.

Desde los primeros días de la Microbiología como ciencia, existen dificultades para establecer un sistema de clasificación satisfactorio de los procariotas. Aún siendo la especie, de forma jerárquica, la base de la taxonomía, su concepto aún carece de una base teórica, y todas son definiciones pragmáticas tales como, por ejemplo, la definición dada por Cowell y colaboradores (1995) “una especie consiste en un conjunto de cepas que muestran un alto grado de similitud fenotípica comparado con otros grupos de cepas relacionadas”. Ward (1998) propuso establecer un concepto “natural” basado en la evolución de las especies. Así pues, la definición de especie es tremendamente subjetiva ya que no somos capaces de determinar y definir conceptos como “gran parecido”, “características esenciales” “características distintivas”. Cuántos y qué caracteres debe tener una especie es, por ahora, una cuestión de criterio personal, que carece de directrices claras.

De las definiciones de especie procariota dadas por algunos autores (Dykhuisen y Green, 1991; Istock y col., 1996; Payls y col., 1997; Stackebrandt 2000; Roselló-Mora y Amann, 2001), se deduce un concepto filo-fenotípico; se trata pues de “una categoría que

circunscribe a (preferiblemente) un grupo coherente de individuos aislados mostrando un alto grado de similitud en (muchas) características independientes, analizadas bajo condiciones estandarizadas (Tindall y col., 2010). El actual concepto de especie está basado en las recomendaciones publicadas en 1987 por el Comité de Expertos (Wayne y col., 1987), posteriormente confirmados y extendidos por el Comité especial para la reevaluación de la definición de especie en bacteriología (Stackebrandt y col., 2002) y más recientemente por Tindall y colaboradores (2010), los cuales han descrito los métodos que deben ser considerados para la correcta caracterización procariota.

Teniendo en cuenta que la caracterización de una cepa es un elemento clave para la sistemática procariota, tanto las metodologías más recientes como las que se consideran "tradicionales" siguen siendo elementos clave para determinar si una cepa pertenece a un taxón conocido o constituye uno nuevo, en este último caso, la cepa o conjunto de cepas debe caracterizarse lo más completamente posible (Tindall y col., 2010). Para ello está ampliamente aceptado que una descripción taxonómica adecuada de los procariotas, en particular de la especie, sólo puede lograrse cuando se lleva a cabo un estudio polifásico en la que se tengan en cuenta las características fenotípicas, filogenéticas, genómicas y quimiotaxonómicas. El término taxonomía polifásica fue concebido por Colwell (1968) y revisado por Vandamme y col., (1996). Si bien aún no existe un consenso sobre el número de características distintivas que son necesarias para describir a una nueva especie, la coherencia entre estas características es necesaria para la clasificación correcta de los procariotas; de forma individual, muchos de los caracteres son insuficientes para delimitar las especies, pero en su conjunto proporcionan una información descriptiva que nos permite reconocerlas (Vandamme y col., (1996).

La caracterización fenotípica constituye una de las líneas esenciales en taxonomía polifásica (Vandamme y col., 1996), ya que aunque no representa toda la información potencial del genoma de los microorganismos (Logan, 1994; Rosselló-Mora y Amann, 2001) es esencial para establecer una concordancia con los datos genéticos y filogenéticos (Stackebrandt y Goebel, 1994; Stackebrandt y col., 2002).

Por otro lado, el contenido en G+C puede resultar útil como información orientativa; una discrepancia elevada entre dos cepas podría ser indicativa de diferencias taxonómicas entre las mismas (Goodfellow y col., 1997). No obstante, en los casos en los que los valores son semejantes, debería considerarse como un dato más en la confirmación de la relación taxonómica, ya que no se puede descartar la existencia de grupos diferentes con similar contenido en guanina y citosina. La información que aporta este análisis no indica la semejanza de genomas, sino la proporción en determinados nucleótidos (Roselló-Mora y Amann, 2001).

Por su parte, el análisis quimiotaxonómico resulta interesante como dato complementario para una caracterización taxonómica (Arahal, 2007) y de especial interés en el caso de la caracterización de las especies de arqueas (Oren y col., 1997b).

En este trabajo, el estudio polifásico realizado en las cepas M3-97, M1-16-X, M4-3M y M1-120 revelan que pudieran constituir nuevas taxa, todas ellos incluidos dentro de la clase *Gammaproteobacteria*, donde se incluye el mayor número de especies de bacterias halófilas (Tabla 1).

Las cepas M3-97 y M1-16-X constituyen nuevas especies del género *Halomonas* (Dobson y Franzmann 1996), *Halomonas lipolytica* y *Halomonas proteolytica*. Este es el género tipo de la familia *Halomonadaceae* (Franzmann y col., 1988), incluido en el orden *Oceanospirillales* (Garrity y col., 2005), el que contiene mayor número de especies halófilas dentro de las proteobacterias. Otros géneros dentro de esta familia que incluyen bacterias halófilas moderadas son *Aidingimonas* (Wang y col., 2009d), *Carnimonas* (Garriga y col., 1998), *Chromohalobacter* (Ventosa y col., 1989), *Cobetia* (Arahal y col., 2002a), *Kushneria* (Sánchez-Porro y col., 2009b), *Modicisalibacter* (Ben Ali Gam y col., 2007), y *Salinicola* (Anan'ina y col., 2007). Los miembros de esta familia han sido aislados de muy hábitats, tales como aguas marinas, lagos salinos y/o alcalinos, salinas solares, aguas residuales, suelos salinos, alimentos, plantas y también, recientemente, de muestras biológicas (Kim y col., 2010). Este hecho, puede ser el motivo por el cual se trate de un grupo de especies con gran heterogeneidad fenotípica.

La cepa M4-3M es una nueva especie del género *Marinobacter* (*Marinobacter halophilus*) que se incluye en la familia *Alteromonadaceae* (Ivanova y Mikhailov, 2001; Ivanova y col., 2004), en el orden *Alteromonadales* (Bowman and McMeeking 2005), otro de los grupos importantes que contienen microorganismos halófilos moderados. El género *Marinobacter* (Gauthier y col., 1992) es el que más mayor número de especies incluye dentro de esta familia; concretamente 27 especies se han aislado de sitios muy diversos, como agua de mar, suelo y lagos hipersalinos, aguas residuales, cultivos de dinoflagelados, sedimentos marinos, etc. Dentro de esta familia, se incluyen otros géneros con representantes halófilos como son *Melitea* (Urios y col., 2008), *Microbulbifer* (González y col., 1997), *Marinobacterium* (González y col., 1997), *Marinimicrobium* (Lim y col., 2006), *Haliea* (Urios y col., 2008), *Glaciecola* (Bowman y col., 1998), *Bowmanella* (Jean y col., 2006), *Alteromonas* (Baumann y col., 1972), *Aliagarivorans* (Jean y col., 2009), *Agarivorans* (Kurahashi y Yokota 2004), *Aestuariibacter* (Yi y col., 2004), *Salinimonas* (Jeon y col., 2005), *Saccharophagus* (Ekborg y col., 2005). Solamente en el género *Alishewanella* (Vogel y col., 2000) no se ha descrito hasta el momento ninguna especie halófila.

La cepa M1-120 constituye una nueva especie del género *Pseudoalteromonas* (*Pseudoalteromonas salina*) perteneciente a la familia *Pseudoalteromonadaceae* (Ivanova y col., 2004) que también se clasifica dentro del orden *Alteromonadales*. Esta familia incluye a

los géneros *Algicola* (Ivanova y col., 2004), *Pseudoalteromonas* (Gauthier y col., 1995), *Psychrosphaera* (Park y col., 2010), de los cuales, sólo el género *Pseudoalteromonas* tiene representantes halófilos. Los miembros de esta familia han sido aislados predominantemente de agua de mar, lagos y sedimentos salinos.

En lo que se refiere a las arqueas, la cepa M2-2D es un miembro de la familia *Halobacteriaceae* dentro del orden *Halobacteriales*, también llamadas haloarqueas. Las arqueas se incluyen en dos phyla llamados *Eryarchaeota* y *Crenarchaeota*. Todas las arqueas halófilas que se han podido cultivar hasta el momento pertenecen al phylum *Euryarchaeota* pero los estudios de ecología molecular también han puesto de manifiesto que existen *Crenarchaeota* en los medios hipersalinos. La familia *Halobacteriaceae* incluye 33 géneros (de la Haba y col., 2011; Dworkin y col., 2007a; Garrity y col., 2005a; Oren, 2002) pero la cepa M2-2D no guarda suficiente relación con ninguno de ellos por lo que será descrita como especie tipo dentro de un nuevo género con el nombre de *Saliniarchaeom ramblicolum*

III.2.4.1. Cepa M3-97

Teniendo en cuenta que la cepa M3-97 sólo está relacionada filogenéticamente con *Halomonas cerina* con un porcentaje de identidad del 97,23 % y que además difiere de una forma significativa en sus características fenotípicas y en su contenido en G+C del ADN, consideramos que puede constituir un nuevo taxa, por lo que proponemos la cepa M3-97^T como la cepa tipo de la nueva especie *Halomonas lipolytica* dentro del género *Halomonas*.

Descripción de *Halomonas lipolytica* sp. nov.

Halomonas lipolytica (1i.po.ly'ti.ca. Gr. n. *lipos* grasa; Gr. adj. *lytikos* disolvente; M.L. adj. *lipolytica* que disuelve la grasa).

Las células son bacilos Gram negativos con un tamaño de 1,2-1,4 x 3,2-3,5 µm, móviles mediante flagelos peritricos. Catalasa positivo y oxidasa negativo, con metabolismo respiratorio con oxígeno, nitrato y nitrito como aceptor final de electrones. Reduce el nitrato en aerobiosis. En medio sólido forma colonias convexas de color crema y mucosas. Los rangos de concentraciones salinas, de temperatura y pH en los que puede crecer son los siguientes: entre el 3 % y el 25 % (p/v) de sales, entre 21 y 41 °C y entre los valores 5 y 10 de pH, siendo el crecimiento óptimo a 5 % (p/v) de sales, 32 °C y pH 7. Crece en agar MacConkey y Agar Cetrimida. Hidroliza el Tween 20 y el Tween 80 pero no la caseína, el DNA, la gelatina, ni la tirosina. No produce sulfhídrico. Presenta las enzimas lecitinasa y fosfatasa pero no produce amilasa, hemolisina, ornitina descarboxilasa ni ureasa. No produce ácidos de ninguno de los sustratos ensayados (amigdalina, L-arabinosa, D-glucosa, D-manitol, D-melibiosa, *mio*-inositol, L-ramnosa, sacarosa y D-sorbitol). Utiliza como única fuente de carbono y energía: acetato, citrato, D-celobiosa, D-fructosa, D-galactosa, etanol,

mio-inositol, L-ramnosa, succinato y D-trealosa; emplea como única fuente de carbono, nitrógeno y energía: L-alanina, L-histidina, L-serina, L-valina. No utiliza los siguientes sustratos como única fuente de carbono y energía: L-arabinosa, adonitol, almidón, caprilato, D-gluconato, DL-lactato, D-manitol, D-manosa, D-rafinosa, esculina, glicerol, lactosa, propionato, salicina y sorbitol. No emplea L-metionina ni L-fenilalanina, como única fuente de carbono, nitrógeno y energía. Es sensible a ácido nalidíxico (30 µg), amoxicilina (25 µg), ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), gentamicina (10 µg), polimixina B (300 UI), rifampicina (5 µg), sulfamida (300 µg), tetraciclina (30 µg) y tobramicina (10 µg), y resistente a eritromicina (15 µg) y penicilina G (10 µg). Presenta un contenido de G+C de 66,9 moles %. Sus ácidos grasos predominantes son C18:1ω7c (45,01%, p/p) y C16:0 (25,93%, p/p). Su principal ubiquinona es la ubiquinona 9 (92 %, p/p).

La cepa tipo M3-97^T fue aislada de una muestra de agua salina de la finca de la Salina, un área perteneciente al Humedal de Ajauque y Rambla Salada (Murcia, España).

III.2.4.2. Cepa M1-16-X

Considerando que la cepa M1-16-X sólo está relacionada filogenéticamente con *Halomonas fontilapidosi* y *Halomonas alkaliphila* con un porcentaje de identidad del 96,94 % y 96,88 %, respectivamente y que además difiere de una forma significativa en sus características fenotípicas y en su contenido en G+C del ADN, proponemos a la cepa M1-16-X^T como la cepa tipo de la nueva especie *Halomonas proteolytica* dentro del género *Halomonas*.

Descripción de *Halomonas proteolytica* sp. nov.

Pseudomonas proteolytica (pro.te.o.ly'ti.ca. N.L. fem. adj. *proteolytica* proteolítica).

Las células son bacilos Gram negativos de tamaño comprendido entre 2,4-2,5 x 1,2-1,3 µm, móviles mediante flagelos peritricos. En medio sólido forma colonias convexas, mucosas, circulares, de color crema. Crece en un rango de soluciones de sales comprendido entre el 1 y el 30 % (p/v) con un óptimo de crecimiento a 5 % (p/v). Crece en un rango de temperatura que oscila entre 22 y 41 °C y pH entre 5 y 10, con óptimo crecimiento a 32 °C y a pH 7. Catalasa positivo y Oxidasa negativo. Con metabolismo respiratorio con oxígeno y nitrato como último aceptor de electrones. No respira sobre nitrito ni sobre fumarato. Reduce anaeróbicamente el nitrato. Crece en agar Cetrimida pero no en agar MacConkey. Es capaz de hidrolizar la gelatina y el Tween 20, pero no el almidón, la caseína, el ADN, la tirosina ni el Tween 80. No produce fosfatasa, hemolisina, lecitinasa, ornitina descarboxilasa ni ureasa. No produce sulfhídrico. Produce ácidos de D-glucosa y *mio*-inositol pero no de amigdalina, L-arabinosa, D-manitol, D-melibiosa, sacarosa, D-sorbitol y L-ramnosa. Utiliza como única fuente de carbono y energía acetato, almidón, caprilato, D-celobiosa, citrato, D-galactosa, glicerol, D-gluconato, D-glucosa, *mio*-inositol, propionato, L-ramnosa, sorbitol, succinato y

D-trealosa. Como única fuente de carbono, nitrógeno y energía emplea L-alanina, L-histidina y L-serina. No utiliza adonitol, D-fructosa, D-manitol, D-manosa, L-lactosa, etanol, D-rafinosa, D-salicilina, esculina ni lactosa, como única fuente de carbono y energía. No emplea L-arabinosa, L-metionina, L-valina ni L-fenilalanina como única fuente de carbono, nitrógeno y energía. Es sensible a amoxicilina (25 µg), ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), gentamicina (10 µg), ácido nalidíxico (30 µg), penicilina G (10 µg), rifampicina (5 µg), sulfamida (300 µg) y tetraciclina (30 µg), y resistente a eritromicina (15 µg). Presenta un contenido en G+C de 56,2 moles %. Sus ácidos grasos predominantes son C18:1ω7c (58,02%, p/p) y C16:0 (24,19%, p/p). Su principal ubiquinona es la ubiquinona 9 (97 %, p/p).

La cepa tipo M1-16-X^T fue aislada de una muestra de agua de una surgencia salina en el Humedal de Ajaque y Rambla Salada (Murcia, España).

III.2.4.3. Cepa M4-3M

La cepa M4-3M presentó en la secuencia del gen de su ARNr 16S un porcentaje de identidad del 97,9% con *Marinobacter segnicrescens*, con quién, sin embargo, mantiene considerables diferencias fenotípicas. Por tanto creemos que podemos hallarnos ante una nueva especie del género *Marinobacter*, para la cual, proponemos el nombre de *Marinobacter halophilus*.

Descripción de *Marinobacter halophilus* sp. nov.

Marinobacter halophilus (ha.lo.phi'lus. Gr. n. *halos* sal; Gr. adj. *philos* amigo; N.L. masc. adj. *halophilus* amigo de la sal).

Las células son bacilos Gram negativos con un tamaño de 0,5 x 1,9 µm, móviles mediante un único flagelo polar. En medio sólido forma colonias convexas de color crema Catalasa positivo y oxidasa negativo. Reduce el nitrato en condiciones de aerobiosis. Presenta metabolismo respiratorio con nitrato y oxígeno pero no nitrito como último aceptor de electrones. Crece entre 3% y 20 % (p/v) de sales y en un rango de 7 a 9 de pH y temperatura entre 32 y 51°C. El crecimiento óptimo se observa a 5 % (p/v) de sales, 32 °C y pH 7. Crece en agar MacConkey y agar Cetrimida. Hidroliza la esculina, la gelatina, el Tween 20, el Tween 80 y la tirosina y produce pigmento de la tirosina. No hidroliza el almidón. No produce las enzimas lecitinasa, ornitina descarboxilasa ni ureasa. Crece en todos los compuestos ensayados como única fuente de carbono y energía o fuente de carbono, nitrógeno y energía (acetato, citrato, D-fructosa, D-galactosa, D-glucosa, glicerol, lactosa, L-alanina, L-histidina y succinato). Produce ácidos a partir de D-fructosa y D-glucosa pero no a partir de amigdalina, D-manitol, D-melibiosa, D-sorbitol, L-arabinosa, L-ramnosa, *mio*-inositol ni sacarosa. Es sensible a ácido nalidíxico (30 µg), polimixina B (300 UI) y sulfamida (300 µg), y resistente a amoxicilina (25 µg), ampicilina (10 µg), cefalotina

(30 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), penicilina G (10 µg), rifampicina (5 µg) y tetraciclina (30 µg). El contenido en G+C es de 56,2 moles %. Sus ácidos grasos predominantes son grasos 15:0 ANTEISO (34,30 %, p/p), 17:0 ANTEISO (13,98 %, p/p) y 16:0 (13,28 %, p/p). Su principal ubiquinona es la ubiquinona 9 (93 %, p/p).

La cepa tipo M4-3M^T fue aislada de una muestra de agua salina de la finca de la Salina, un área perteneciente al Humedal de Ajauque y Rambla Salada (Murcia, España).

III.2.4.4. Cepa M1-120

La cepa M1-120 presentó en la secuencia del gen de su ARNr 16S un porcentaje de identidad del 97,9% con *Pseudoalteromonas carrageenovora*, con quién, sin embargo, mantiene considerables diferencias fenotípicas. Por tanto creemos que podemos hallarnos ante una nueva especie del género *Pseudoalteromonas*, para la cual, proponemos el nombre de *Pseudoalteromonas salina*.

Descripción de *Pseudoalteromonas salina* sp. nov.

Pseudoalteromonas salina (sa.li'na. L. fem. adj. *salina* salado, salina).

Las células son bacilos Gram negativos con un tamaño de 0,9-1,0 x 2,1-2,3 µm, móviles mediante un único flagelo polar. En medio sólido forma colonias convexas de color blanco-crema. Catalasa positivo y oxidasa negativo. Presenta metabolismo respiratorio con oxígeno como último aceptor de electrones. Crece entre el 1% y 15 % (p/v) de sales, en un rango de pH de 6 a 10 y de temperatura entre 22 y 37°C. El crecimiento óptimo de la cepa se observa a 5 % (p/v) de sales, 32 °C y pH 7. Crece en agar MacConkey. Produce la enzima fosfatasa y ureasa pero no hemolisina. Hidroliza la caseína, la esculina, el Tween 20 y el Tween 80 pero no el almidón ni la tirosina. Crece sobre D-fructosa, L-lactosa, D-glucosa y succinato como única fuente de carbono y energía, y sobre L-alanina como única fuente de carbono, nitrógeno y energía. Es sensible a polimixina B (300 UI), amoxicilina (25 µg), tetraciclina (30 µg), tobramicina (10 µg), gentamicina (10 µg), ampicilina (10 µg), rifampicina (5 µg) y cefalotina (30 µg), y resistente a la sulfamida (300 µg), eritromicina (15 µg), ácido nalidíxico (30 µg) y penicilina G (10 µg). El contenido en G+C es de 37,9 moles %. Sus ácidos grasos predominantes son 16:0 (29,85 %, p/p) y 12:0 3OH (8,26 %, p/p).

La cepa tipo M1-120^T fue aislada de una muestra de agua salina de la finca de la Salina, un área perteneciente al Humedal de Ajauque y Rambla Salada (Murcia, España).

III.2.4.5. Cepa M2-2D

En base a las diferencias tanto fenotípicas como filogenéticas de la cepa M2-2D respecto a los géneros y especies válidamente descritos de la familia *Halobacteriaceae*, consideramos que esta cepa debe ser reconocida como tipo de una nueva especie, dentro de

un nuevo género para los cuales proponemos los nombre *Saliniarchaeom* y *Saliniarchaeom ramblicolum*

Descripción de *Saliniarchaeom* gen. nov.

Saliniarchaeom

Las células son pleomórficas. Catalasa positivo. En medio sólido forma colonias circulares, convexas, mucosas y son pigmentadas de rosa. Metabolismo respiratorio. Produce ácidos de la glucosa. Presenta una alta versatilidad nutricional. Halófilo extremo. Requiere Na⁺ y Mg²⁺. La especie tipo es *Saliniarchaeom ramblicolum*.

Descripción de *Saliniarchaeom ramblicolum* sp. nov.

ramblicolum [ram.bli.co'la. Español sb. fem. *rambla* del Árabe sb. *ramla* lit. terreno arenoso; L. suff. [*in*]cola habitante de; N.L. sb. fem. nom. *ramblicola* habitante de una rambla.

Además de las características ya descritas para el nuevo género, la especie es oxidasa negativo. En medio sólido forma colonias circulares y convexas de color rosa y mucosas. Crece entre un 15 % y 30 % (p/v) de sales con un crecimiento óptimo al 25 % (p/v). Requiere un mínimo de magnesio del 0,5 % (p/v) para su crecimiento siendo el óptimo a 10 % (p/v). Crece en un rango de temperatura entre 25-51 °C y de pH entre 6 y 9 con un óptimo de crecimiento a 37 °C y a pH 7,5. Su metabolismo es respiratorio con oxígeno y nitrato como último aceptor de electrones. Reduce el nitrato en aerobiosis. Hidroliza el almidón y la gelatina pero no el Tween 80. Indol negativo. Produce fosfatasa pero no ADNasa. No crece en anaerobiosis con L-arginina ni nitrato. Produce ácidos de D-galactosa y D-glucosa, pero no de L-arabinosa, D-fructosa, DL-glicerol, D-lactosa, D-trealosa ni D-xilosa. Utiliza D-fructosa, D-galactosa, DL-glicerol, D-glucosa y D-xilosa como única fuente de carbono y energía. Es sensible a la rifampicina (5 µg) y resistente al ácido nalidíxico (30 µg), bacitracina (10 UI), ciprofloxacina (5 µg), penicilina G (10 UI), Trimetropin-Sulfametoxazol (1,25 µg + 23,75 µg), ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), estreptomycin (10 µg) y tetraciclina (30 µg).

La cepa tipo M2-2D^T fue aislada de una muestra de suelo salino de la Finca de la Salina, un área perteneciente al Humedal de Ajauque y Rambla Salada (Murcia, España).

**CAPÍTULO 3: *DIVERSIDAD
PROCARIOTA***

III.3.1. RESUMEN

Conocer la diversidad microbiana se considera parte primordial del estudio de los ecosistemas. El Humedal de Ajauque y Rambla Salada, un paraje inexplorado desde el punto de vista microbiológico, está considerado Espacio Protegido de la comunidad Murciana (BORM 10/9/1998), de ahí el gran interés que suscita este estudio.

El análisis de la composición microbiana para cada época y zona de muestreo se llevó a cabo mediante la métrica de distancia euclidiana cuadrada. La matriz de datos se elaboró con la asignación taxonómica a nivel de género dada por el programa *EzTaxon Server 2.1* utilizando la secuencia parcial de la región hipervariable V1-V3 del gen del ARNr 16S con un porcentaje de identidad de al menos el 95 %. El estudio global se realizó mediante el cálculo del parámetro estadístico Chi-Cuadrado con el programa *Statgraphics Centurion versión 16.1.11*.

Analizada la composición microbiana, se hizo un estudio de diversidad utilizando el programa informático *DOTUR* el cual calculó los índices de diversidad y estimadores de riqueza mediante el análisis de la secuencia parcial del gen del ARNr 16S a un nivel de distancia genética del 3 %.

Este estudio nos permitió poner de manifiesto la alta diversidad procariota existente en el Humedal de Ajauque y Rambla Salada, diversidad que no se ve afectada por la época de muestreo.

III.3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

III.3.2.1. Composición de las comunidades

El análisis de las comunidades se llevó a cabo para las cuatro épocas de muestreo y los cuatro hábitats seleccionados en el Humdal de Ajauque y Rambla Salada (véase el Capítulo 1).

Mediante la identificación taxonómica, obtenida de la secuencia parcial del gen del ARNr 16S (véase el Capítulo 2), se construyó una matriz de datos con el número total de cepas de cada género en función de las dos agrupaciones mencionadas (épocas y zonas de muestreo).

Esta matriz se importó al programa *Statgraphics Centurion versión 16.1.11* y se hizo un análisis de agrupación empleando la métrica de distancia euclidiana cuadrada para obtener el dendrograma correspondiente mediante el análisis UPGMA (Hair y col., 1992). El rango de valores de la distancia euclidiana toma valores desde cero a infinito, por tanto, cuanto más próximo a cero, más parecidas son las variables, en nuestro caso, las distintas épocas y zonas de muestreo (Herrera, 2000).

A continuación se realizó el test de hipótesis Chi-cuadrado (χ^2) para ambas agrupaciones, el cual da como resultado un valor numérico cuyo *p-valor* debe ser comparado con el nivel de significancia $\alpha = 0,05$. Si el valor calculado es menor se podrá concluir que existe una asociación estadísticamente significativa entre las cepas aisladas, es decir, los distintos géneros identificados están representados en las dos agrupaciones realizadas.

La fórmula de Chi-cuadrado es:

$$\chi^2 = \frac{(O - E)^2}{E}$$

donde O y E representan las frecuencias observadas y las esperadas respectivamente.

III.3.2.2. Análisis de la diversidad

La evaluación y comparación de la diversidad procariota se llevó a cabo mediante la agrupación de los microorganismos en Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs, del inglés *Operational Taxonomic Units*), las cuales se obtuvieron utilizando las secuencias parciales del gen del ARNr 16S de cada microorganismo y estableciendo un nivel de distancia del 3 %.

El análisis de la diversidad se hizo para las dos agrupaciones mencionadas utilizando el programa informático *DOTUR* (Schloss y Handelsman, 2005). Para ello, tras el alineamiento de las secuencias mediante el método *CLUSTALX* (Thompson y col., 1994), se construyó una matriz de distancias corregida empleando el método de Jukes-Cantor con el programa *dnadist* del paquete de programas *PHYLIP* (Felsenstein, 2002). Dicha matriz fue entonces importada al programa *DOTUR* que nos permitió obtener la agrupación de las secuencias en OTUs, la estimación de la riqueza en especies (Chao1 y ACE) los índices de diversidad de Shannon-Weaver (H') y el recíproco de Simpson ($1/D$), así como las curvas de acumulación de especies y de rarefacción. Para los estudios de rarefacción, el número de remuestreos fue de 1.000.

III.3.2.2.1. Estimación del número de OTUs

El método aplicado para la agrupación de secuencias en OTUs fue el algoritmo de distancia máxima o “*furthest neighbour*” a un nivel de distancia del 3%.

III.3.2.2.2. Índices de diversidad

La diversidad de una comunidad depende de la riqueza (número de especies) y de la abundancia relativa de éstas (equitatividad o evenness, Begon y col., 1986). Los estimadores no paramétricos ponderan de diferente manera a las especies abundantes en relación con las especies menos abundantes. La medida más simple de diversidad que toma en cuenta tanto la abundancia como la riqueza de especies es el índice de diversidad de Simpson (D) (Simpson, 1949), el cual se calcula a partir de la proporción de individuos de cada especie i que contribuyen al total de la muestra. Este índice está basado en la probabilidad de que si se toman dos individuos, estos sean de la misma especie (Brown y Bowman, 2001); valores cercanos a 1 indican que sólo unas pocas especies predominan en la muestra. La ecuación para su cálculo es:

$$D = \frac{\sum_{i=1}^S n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

donde S es el número de especies, N es el total de especies presentes y n es el número de ejemplares por especie.

Otro índice de diversidad muy utilizado es el denominado índice de Shannon-Weaver (H') (Shannon y Weaver, 1949), el cual calcula la probabilidad de predecir la especie de un individuo tomado al azar de la comunidad. Su valor más bajo es 0 y se corresponde con comunidades con una sola especie; valores altos indican que las comunidades están representadas por muchas especies, cada una con pocos individuos (Brown y Bowman, 2001). Este índice se calcula como:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

donde S es el número de especies (la riqueza de especies), p_i la proporción de individuos de la especie i respecto al total de individuos; es decir, la abundancia relativa de la especie i , medida como la razón del número de individuos de la especie i (n_i) sobre el número de todos los individuos de todas las especies (N).

III.3.2.2.3. Estimadores de riqueza

Se utilizaron los estimadores Chao1 y ACE para evaluar la riqueza total de especies (Chao, 1984; Chao y col., 1993). Ambos consideran la proporción de especies observadas en relación a aquellas que han sido observadas solo una vez. Como se ha mencionado antes, en una comunidad muy diversa, la probabilidad de que las especies sean observadas más de una vez será baja ya que la mayoría de las especies estarán representadas por un solo individuo. Chao 1 estima el número de especies presentes en una comunidad basándose en aquellas que son menos abundantes (Chao y Lee, 1992; Smith y Van Belle, 1984), por lo tanto, toma los datos de las especies que están representadas por un solo individuo en la muestra (*singletons*) y las que están representadas por dos individuos (*doubletons*); este estimador es particularmente útil para muestras que tengan bajo número de especies, (Hughes y col., 2001). En cambio, ACE (Chao y Lee, 1992) incorpora también datos de todas las especies con menos de 10 individuos.

La fórmula para calcular cada uno de estos estimadores es:

-Chao1:

$$S_{\text{Chao1}} = S_{\text{obs}} + (n_1^2 / 2n_2)$$

donde S_{Chao1} es la riqueza total de especies, S_{obs} es el número de especies observadas, n_1 es el número de especies observadas una vez y n_2 es el número de especies observadas dos veces.

-ACE (Abundance Coverage Estimator):

$$S_{\text{ACE}} = S_{\text{abund}} + (S_{\text{rare}} / C_{\text{ACE}}) + (F_1 / C_{\text{ACE}})$$

donde S_{ACE} es la riqueza total de especies, S_{abund} es el número de especies abundantes (>10), S_{rare} es el número de especies poco abundantes (≤ 10), C_{ACE} es la cobertura de la muestra y F_1 el número de especies con un individuo en la muestra.

El concepto de *cobertura muestral* fue introducido por Good en 1953 (Good, 1953) para corregir el sesgo producido en la estimación de la riqueza, ya que cuando se cuantifica la riqueza observada en la muestra como el número total de especies presentes en ella, se obtiene siempre un límite inferior para la riqueza. La *cobertura muestral* es por tanto la proporción que representa la abundancia total de las especies presentes en una muestra, con relación a la abundancia total de la comunidad

III.3.2.2.4. Curvas de acumulación de especies y curvas de rarefacción

Se utilizó la curva de acumulación de especies para visualizar gráficamente el total de la diversidad de la comunidad procariota, mediante la representación del número de OTUs observados en función del número de secuencias obtenidas.

Mediante las curvas de rarefacción se representó la expectativa estadística para las correspondientes curvas de acumulación.

En ambas representaciones, a medida que la curva va alcanzando la asíntota mejor es la calidad del muestreo y se podrá conocer el valor real del número de OTUs de la comunidad y, por tanto, se considerará que el muestreo realizado representa fielmente la comunidad existente (Figura 43).

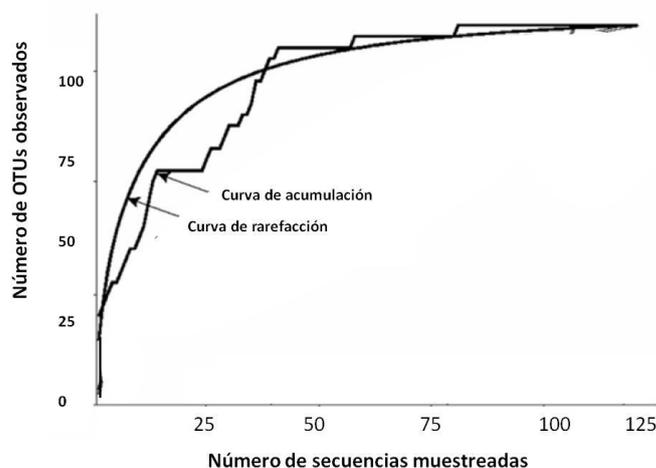


Figura 43. Curvas de acumulación de especies y de rarefacción.

En la Tabla 30 se muestra un resumen de la agrupación de secuencias, índices de diversidad, estimadores de riqueza y curvas utilizadas en el análisis de la diversidad.

Tabla 30. Parámetros utilizados en el análisis de la diversidad.

INDICES	REFERENCIAS
OTUs	Staley, 1997
Índice de diversidad de Shannon (H')	Shannon y Weaver, 1949
Recíproco del índice de diversidad de Simpson ($1/D$)	Simpson, 1949
Estimadores de riqueza (S_{ACE} , S_{Chao1})	Chao, 1984; Chao y Lee, 1992
Curvas de rarefacción	Sanders, 1968; Hurlbert, 1971
Curvas de acumulación de especies	Colwell y Coddington, 1994

III.3.3. RESULTADOS

III.3.3.1. Composición de la comunidad microbiana

III.3.3.1.1. Composición de la comunidad bacteriana

En la Tabla 31 se muestra el número de cepas bacterianas identificadas en cada género en función de cada época de muestreo y de las cuatro zonas estudiadas. El número de cepas identificadas fue mayor en junio de 2006 y en la zona de la finca de la Salina con 127 y 232 aislados respectivamente (véase la Tabla 31).

Se utilizó como criterio para la asignación a un determinado género el porcentaje de identidad superior o igual al 95% de la región hipervariable V1 a V3 de la secuencia del gen del ARNr 16S.

El género *Halomonas* constituye el grupo más abundante, seguido de *Bacillus*, *Marinobacter* y *Staphylococcus*. Analizando cada uno de estos géneros, se observó que la representación de *Bacillus* y *Halomonas* fue similar en las distintas épocas de muestreo, no así en el estudio por zonas en el que el número de cepas fue mayor en la finca de la Salina seguida de la surgencia, humedal de Derramadores y trasvase Tajo-Segura; esto mismo ocurrió con las especies identificadas de *Marinobacter*.

Tabla 31. Número de cepas identificadas en cada género según la época de muestreo y la zona estudiada.

GÉNERO	ÉPOCA DE MUESTREO				ZONA DE MUESTREO			
	F-06	J-06	N-07	F-07	FS	S	HD	TT-S
<i>Acinetobacter</i>	0	0	0	1	1	0	0	0
<i>Achromobacter</i>	0	1	0	0	1	0	0	0
<i>Aurantimonas</i>	0	0	2	0	2	0	0	0
<i>Bacillus</i>	14	15	10	7	30	11	4	1
<i>Bartonella</i>	0	0	1	0	1	0	0	0
<i>Brevibacterium</i>	0	3	0	2	2	2	1	0
<i>Brevundimonas</i>	0	0	6	0	6	0	0	0
<i>Cronobacter</i>	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Halomonas</i>	32	43	36	40	78	29	23	21
<i>Idiomarina</i>	0	1	6	3	3	5	2	0
<i>Kushneria</i>	1	1	1	0	2	0	1	0
<i>Labrencia</i>	0	0	2	0	0	0	0	2
<i>Luteimonas</i>	0	1	0	0	1	0	0	0
<i>Marinobacter</i>	1	18	9	20	28	8	7	5
<i>Marinococcus</i>	0	2	0	1	1	0	2	0
<i>Microbulbifer</i>	0	1	0	0	1	0	0	0
<i>Nesiotobacter</i>	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Oceanobacillus</i>	1	0	2	0	0	3	0	0
<i>Palleronia</i>	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Pantoea</i>	0	0	0	2	1	1	0	0
<i>Paracoccus</i>	0	0	0	1	1	0	0	0
<i>Planococcus</i>	0	0	1	4	4	0	0	1
<i>Pseudoalteromonas</i>	2	0	0	2	4	0	0	0
<i>Pseudomonas</i>	0	0	1	1	1	0	0	1
<i>Riemerella</i>	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>Salinicola</i>	0	1	0	0	0	1	0	0
<i>Salinimonas</i>	0	0	0	3	0	0	0	3
<i>Salinivibrio</i>	4	8	1	0	6	2	0	5
<i>Swaminathania</i>	0	0	1	0	1	0	0	0
<i>Staphylococcus</i>	5	3	18	2	15	11	2	0
<i>Vibrio</i>	0	3	0	2	4	0	0	1
<i>Virgibacillus</i>	0	7	0	0	4	2	1	0
<i>Yersinia</i>	0	0	0	6	3	2	1	0
Cepas no identificadas	14	18	22	8	31	9	10	12
TOTAL	74	127	122	105	232	87	54	55

F-06: febrero 2006; J-06: junio 2006; N-07: noviembre 2007; F-07: febrero 2007; FS: finca La Salina; S: surgencia; HD: humedal de Derramadores; TT-S: trasvase Tajo-Segura.

El análisis mediante distancia euclidiana cuadrada (Figura 44) reveló que en febrero de 2006 la comunidad bacteriana presentaba mayores diferencias en cuanto a diversidad, con una distancia de 135 con respecto al resto. En este mes no se aisló ninguna cepa perteneciente al género *Idiomarina* y un único aislado fue identificado como *Marinobacter*

sp. A una distancia de 120 se agruparon los muestreos realizados en junio de 2006 y noviembre de 2007 en los cuales no se identificó ningún aislado de los géneros *Acinetobacter*, *Pantoea*, *Paracoccus*, *Pseudoalteromonas*, *Salinimonas* y *Yersinia* y por el contrario, sólo en ambas épocas se aislaron cepas pertenecientes a los géneros *Kushneria* y *Salinivibrio*.

Con respecto a las zonas muestreadas, la finca de la Salina mostró mayor diversidad formando un único grupo a una distancia euclidiana cuadrada de 85 (Figura 44). A su vez, a una distancia de 35 se agruparon las zonas de la surgencia y humedal de Derramadores. En el primer caso, la finca de la Salina fue la única zona en la que se aislaron los géneros *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Bartonella*, *Luteimonas*, *Kushneria*, *Microbulbifer*, *Pantoea*, *Paracoccus*, *Swaminathania*, *Aurantimonas*, *Brevundimonas*, *Planococcus* y *Pseudoalteromonas*. Además las cepas identificadas como *Bacillus*, *Halomonas*, *Marinobacter* y *Staphylococcus* se aislaron en una proporción muy superior al resto de las zonas. En el caso de la surgencia y humedal de Derramadores, se observó que sólo en estas zonas se aislaron cepas pertenecientes a los géneros, *Oceanobacillus*, *Riemerella* y *Salinicola*; mientras que en la zona del trasvase Tajo-Segura se identificaron especies de *Cronobacter*, *Labrencia*, *Nesiotobacter*, *Palleronia*, *Labrencia* y *Salinimonas* que no estaban presentes en el resto de zonas (Tabla 31).

Sin embargo, las diferencias mencionadas resultaron no ser significativas cuando se llevó a cabo el estudio estadístico global mediante el parámetro chi-cuadrado (χ^2). Éste indicó que existía una representación significativa de los géneros con la época y zona muestreada ya que en ambos casos el *p-valor* fue menor de 0,05 con un nivel de confianza del 95,0 % (Tabla 32).

Tabla 32. Análisis estadístico de la composición de la comunidad bacteriana.

GRUPO DE ESTUDIO	Chi-Cuadrado (χ^2)	Valor-P
ÉPOCA DE MUESTREO	209,944*	0,0000
ZONAS DE MUESTREO	164,462*	0,0001

* 99 grados de libertad.

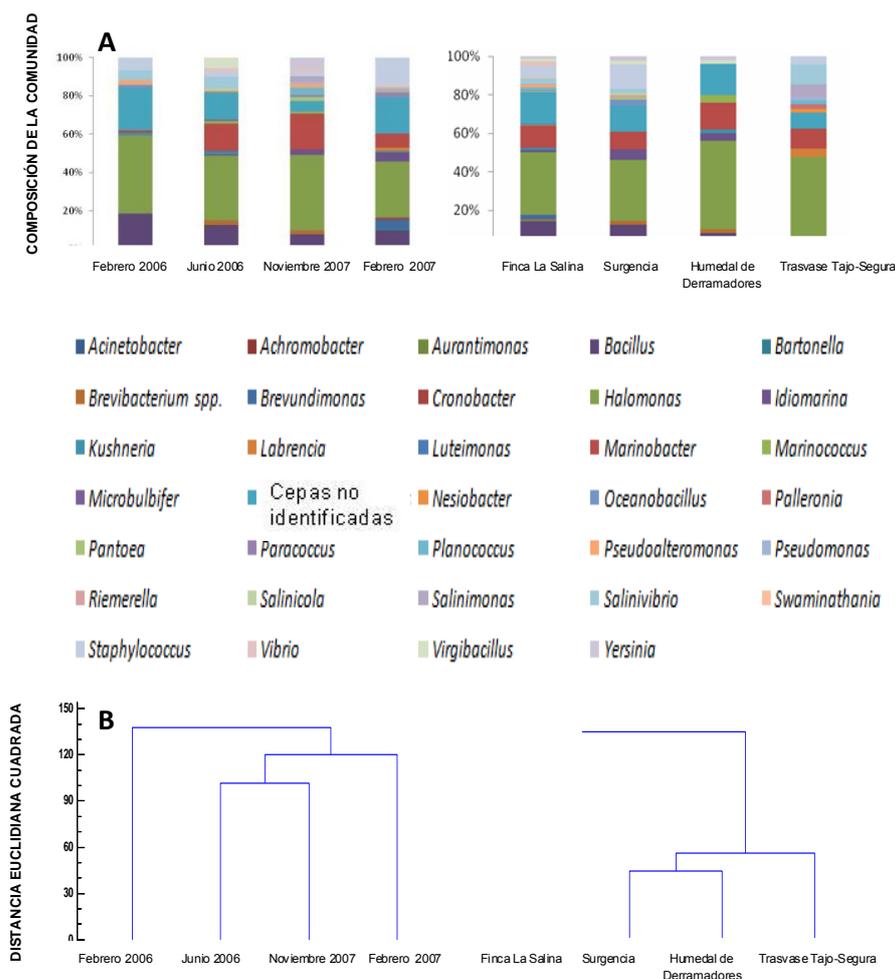


Figura 44. Composición de la comunidad bacteriana en el Humedal de Ajauque y Rambla Salada (Murcia) en función del año y de la zona de muestreo (A). Análisis de cluster de la comunidad bacteriana a nivel de género en función de las dos agrupaciones (B).

III.3.3.1.2. Composición de la comunidad de arqueas

En la Tabla 33 se muestra el número de cepas identificadas en cada género en función de la época y de la zona muestreada. Como puede observarse el número fue mayor en junio de 2006 (17 cepas) y menor en noviembre de 2007 (10 cepas). La finca de la Salina fue el hábitat con mayor número de representantes (29 cepas).

Los géneros más abundantes fueron *Haloferax* y *Natrinema* con 10 aislados cada uno de ellos y *Halostagnicola* con 6 cepas.

Por otro lado, los géneros *Haladaptatus*, *Halogeometricum*, *Halomicrobium* y *Halorhabdus* estaban representados únicamente en uno de los años muestreados y en una zona de muestreo. La distribución de cepas fue homogénea en las distintas épocas del año; en cambio, cuando hicimos el estudio por zonas de muestreo, observamos que las cepas de arqueas fueron aisladas de la finca de la Salina y de la surgencia principalmente.

Tabla 33. Número de cepas identificadas de cada género según la época de muestreo y la zona estudiada.

GÉNERO	ÉPOCA DE MUESTREO				ZONAS DE MUESTREO			
	F-06	J-06	N-07	F-07	FS	S	HD	TT-S
<i>Haladaptatus</i>	0	0	2	0	0	0	2	0
<i>Haloarcula</i>	0	4	0	0	3	1	0	0
<i>Halococcus</i>	0	0	0	3	1	2	0	0
<i>Haloferax</i>	0	1	4	5	8	2	0	0
<i>Halogeometricum</i>	0	1	0	0	1	0	0	0
<i>Halomicrobium</i>	0	0	0	2	2	0	0	0
<i>Halorhabdus</i>	0	1	0	0	1	0	0	0
<i>Halorubrum.</i>	4	0	0	0	3	1	0	0
<i>Halostagnicola</i>	2	3	1	0	2	0	4	0
<i>Haloterrigena</i>	3	1	0	0	1	1	0	2
<i>Natrialba</i>	1	0	0	1	2	0	0	0
<i>Natrinema</i>	1	6	3	0	5	4	0	1
TOTAL	11	17	10	11	29	11	6	3

F-06: febrero 2006; J-06: junio 2006; N-07: noviembre 2007; F-07: febrero 2007; FS: Finca La Salina; S: Surgencia; HD: Humedal de Derramadores; TT-S: Tránsito Tajo-Segura.

Mediante el análisis de distancia euclidiana cuadrada se obtuvieron dos grandes grupos respecto a la época de muestreo. El primero incluía a las épocas de febrero y junio de 2006 y noviembre de 2007; el segundo grupo, correspondiente a febrero de 2007, se separó del resto a una distancia de 25. El muestreo de febrero de 2007 se diferenció en que sólo en esa época se aislaron cepas de *Halococcus* y *Halomicrobium* y no se aisló ninguna cepa perteneciente al género *Halostagnicola* (Figura 45). A una distancia de 15 se formó un subgrupo con los muestreos de junio de 2006 y noviembre de 2007 los cuales se diferenciaron de febrero de 2006 por no haber aislado ninguna cepa de los géneros *Halomicrobium*, *Halococcus*, *Halorubrum* ni *Natrialba*.

Con respecto a las zonas muestreadas, el dendrograma, obtenido por la métrica de distancia euclidiana cuadrada mostró dos grupos a una distancia de 25 y un subgrupo con una distancia de 15. La finca de la Salina fue el hábitat que presentó mayores diferencias ya que en esta zona se cuantificaron más aislados (29 cepas) de los cuales las cepas identificadas como *Halogeometricum* spp., *Halorhabdus* spp., *Halomicrobium* spp. y

Natrialba spp. sólo estuvieron representados en este hábitat. Con respecto al subgrupo formado por la surgencia y humedal de Derramadores, en ambas zonas el número de aislados fue superior al del trasvase Tajo-Segura. (Figura 45).

Al igual que ocurrió en la comunidad bacteriana, el análisis global del estudio de la composición de la comunidad de arqueas del Humedal de Ajauque y Rambla Salada mediante el estadístico Chi-Cuadrado (χ^2) resultó en un *p-valor* inferior a 0,05 con un nivel de confianza del 95 % en ambas agrupaciones lo que indicó nuevamente que estas diferencias obtenidas no eran significativas (Tabla 34).

Tabla 34. Análisis estadístico de la composición de la comunidad de arqueas.

GRUPO DE ESTUDIO	Chi-Cuadrado (χ^2)	Valor-P
ÉPOCA DE MUESTREO	43,657*	0,0039
ZONAS DE MUESTREO	60,159**	0,0027

*, 22 grados de libertad; **, 33 grados de libertad

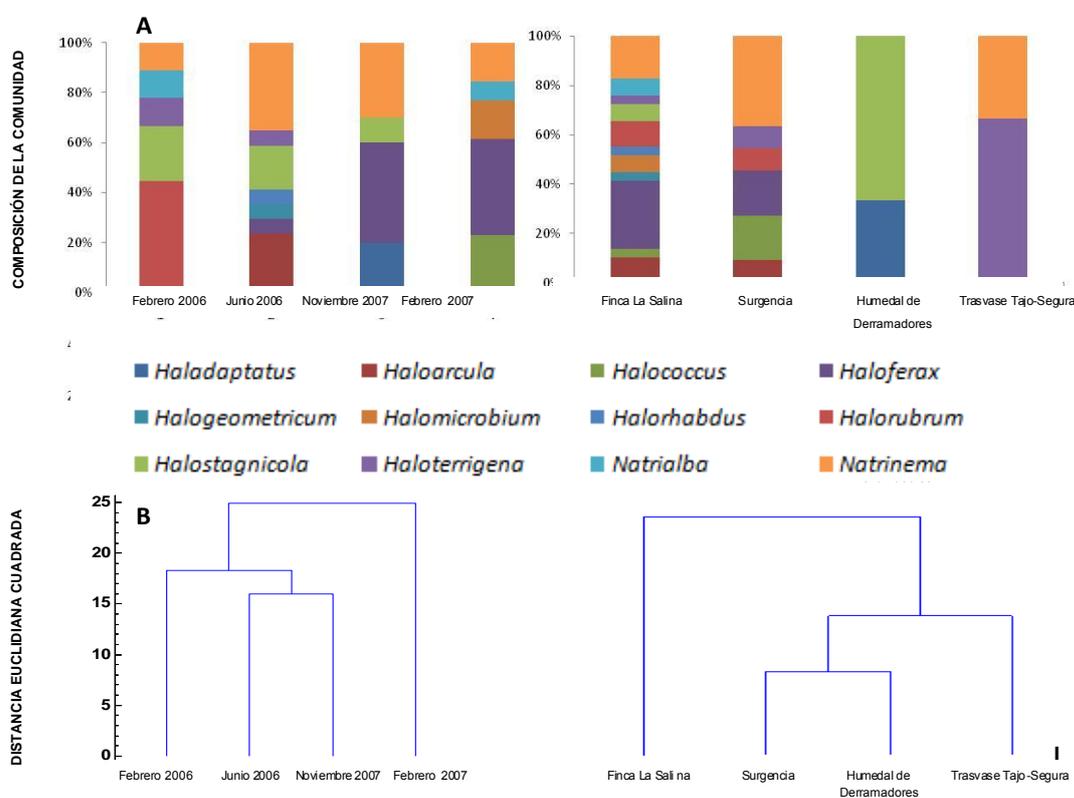


Figura 45. Composición de la comunidad de arqueas en el Humedal de Ajauque y Rambla Salada (Murcia) en función de las épocas del año y las zonas muestreadas (A). Análisis de los cluster de la comunidad de arqueas a nivel de género en función de las dos agrupaciones (B).

III.3.3.2. Diversidad microbiana

III.3.3.2.1. Diversidad bacteriana

El estudio de la diversidad se llevó a cabo mediante el cálculo de los índices de diversidad y estimadores de riqueza con el programa informático *DOTUR*, así como con la representación de las curvas de acumulación de especies y de rarefacción.

De las 428 cepas bacterianas aisladas, se obtuvo la secuencia parcial del gen del ARNr 16S de 366 aislados, los cuales se agruparon en 139 OTUs a un nivel de distancia del 3 %. De acuerdo al método de agrupamiento de distancia máxima, la mayoría de las cepas identificadas, un total de 44 OTUs, se aislaron en junio de 2006; teniendo en cuenta las zonas de muestreo, el mayor número de secuencias se obtuvo de la Finca de la Salina (83 OTUs) (Tabla 35).

Tabla 35. Distribución de OTUs y estimaciones de riqueza de especies bacterianas.

	OTUs*	H'*	1/D*	ACE*	Chao 1*
TOTAL DE SECUENCIAS	139	4,50	67	235,84	241,24
ÉPOCA DE MUESTREO					
FEBRERO 2006	29	3,06	20	69,53	59,60
JUNIO 2006	44	3,43	26	75,69	69,67
NOVIEMBRE 2007	36	3,54	51	37,11	36,50
FEBRERO 2007	37	3,31	27	55,82	54,00
ZONA DE MUESTREO					
FINCA LA SALINA	83	4,80	52	152,78	128,05
SURGENCIA	44	3,62	51	75,12	69,00
HUMEDAD DE DERRAMADORES	24	3,05	32	34,50	31,33
TRASVASE TAJO-SEGURA	31	3,17	25	80,93	66,00

*, Datos obtenidos a nivel de distancia del 3 %.

H', índice de diversidad de Shannon; 1/D, recíproco del índice de diversidad de Simpson; ACE, estimador de riqueza ACE; Chao 1, estimador de riqueza Chao 1.

En febrero de 2006, los índices de diversidad ($H' = 3,06$ y $1/D = 20$) y el número de OTUs (29) fueron más bajos con respecto al resto de épocas muestreadas. Por el contrario, la mayor diversidad se obtuvo en noviembre de 2007 ($H' = 3,54$ y $1/D = 51$).

Teniendo en cuenta las zonas de muestreo, se consideró de mayor diversidad bacteriana la zona de la Finca de la Salina en la cual los índices de diversidad fueron $H' = 4,80$ y $1/D = 52$ y los estimadores de riqueza Chao 1 = 128,05 y ACE = 152,78.

La relación entre el número de OTUs observados y el total de las secuencias analizadas mediante la curva de acumulación de especies se representa en la Figura 46. En dicha figura, se incluyen también las curvas de rarefacción y la representación gráfica de los estimadores de riqueza Chao 1 y ACE. La calidad del muestreo llevado a cabo se observó mediante la curva de rarefacción, la cual tiende a la asíntota y esto indicó que el número total de secuencias muestreadas pertenecientes al Humedal de Ajaque y Rambla Salada, representan una estimación inicial de la diversidad de bacterias cultivables que habitan en esta zona y por tanto, aunque se siguiese muestreando, el valor real del número de OTUs no variaría considerablemente.

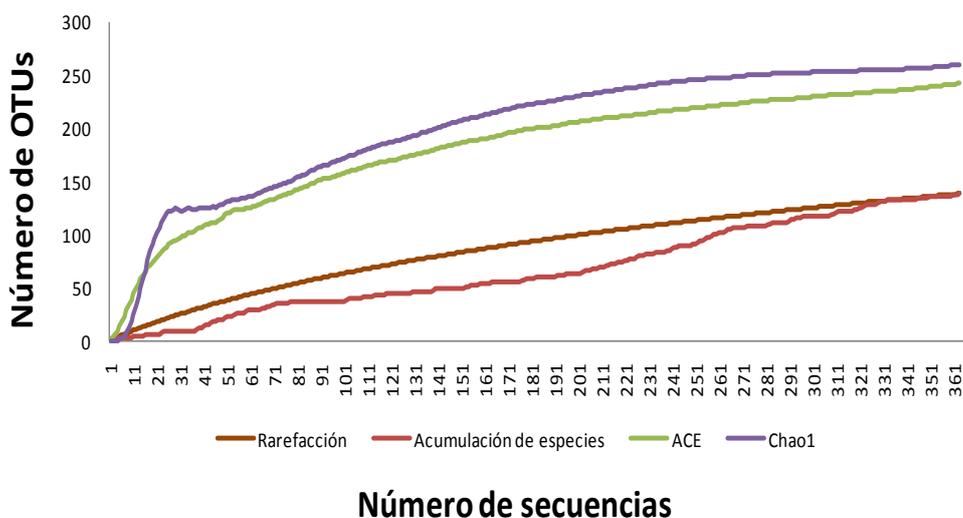


Figura 46. Curvas de acumulación de especies y de rarefacción de las secuencias del gen del ARNr 16S de las cepas bacterianas aisladas del Humedal de Ajauque y Rambla Salada. La riqueza en OTUs estimada se representa mediante las curvas de los estimadores Cha1 y ACE.

Por otro lado, la calidad del muestreo se puede observar en la Figura 47 (A y B) en la que se muestra el análisis de rarefacción, también a un nivel de distancia genética del 3 %, para las distintas épocas de muestreo (A) y las distintas zonas estudiadas (B).

La curva obtenida del análisis de rarefacción en el mes de febrero de 2006, aún tendiendo a la asíntota, sugiere un bajo número de secuencias muestreadas y por tanto la necesidad de realizar nuevos aislamientos para conocer la diversidad real de este hábitat. Estas observaciones se relacionan con los índices más bajos de Shannon y Simpson (3,06 y 20 respectivamente) con respecto a los valores de riqueza obtenidos en las otras épocas de muestreo.

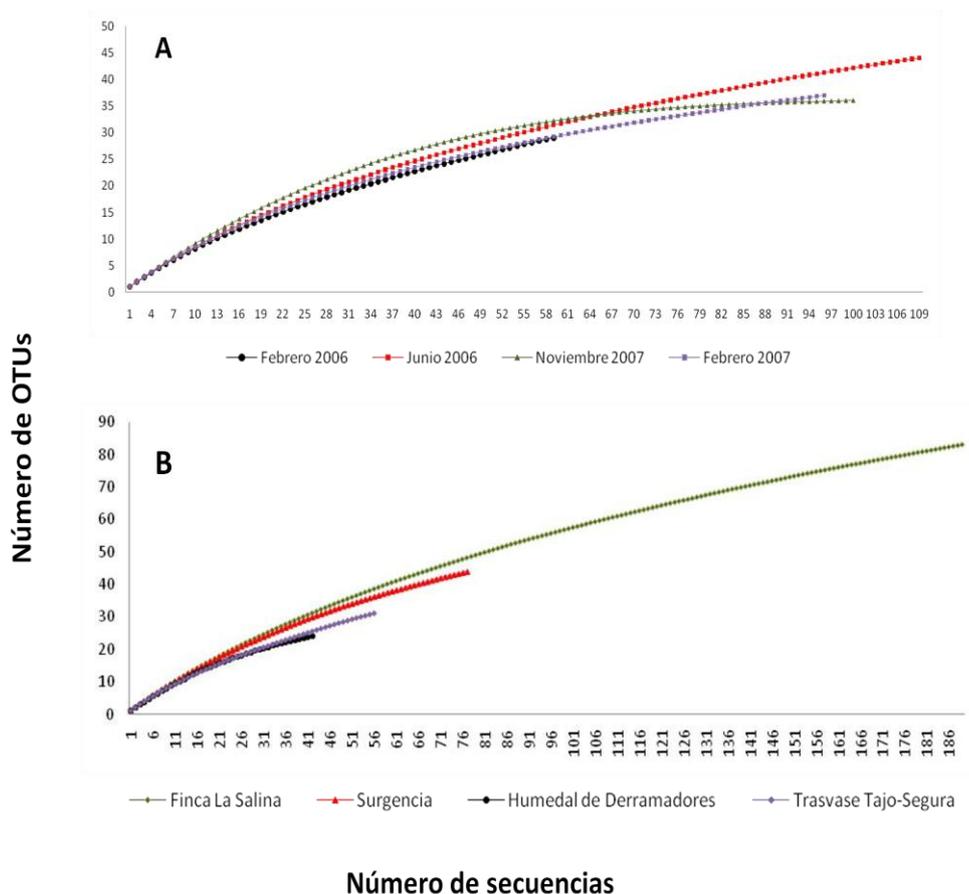
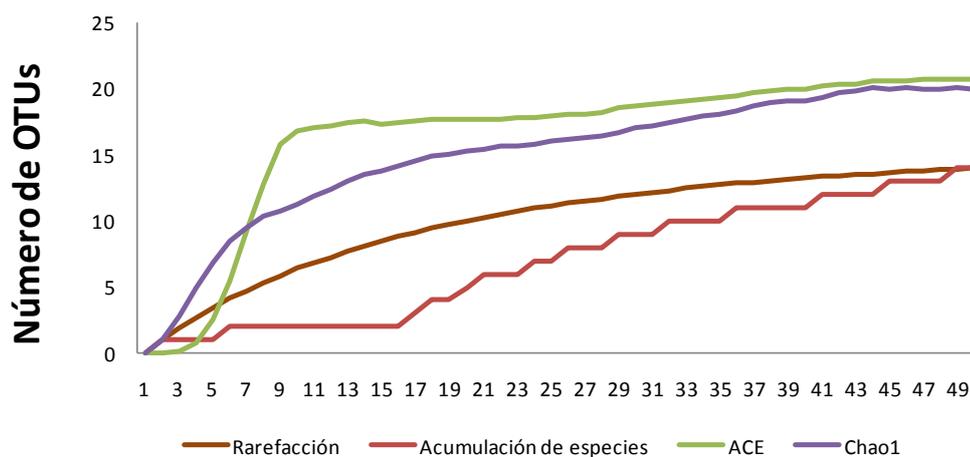


Figura 47. Curvas de rarefacción de las secuencias del gen del ARNr 16S de cepas bacterianas en función de las épocas de muestreo (A) y de los hábitats estudiados (B).

III.3.3.2.2. Diversidad de arqueas

El estudio de la diversidad de las especies de arqueas existentes en el Humedal de Ajauque y Rambla Salada se llevó a cabo mediante al análisis de la secuencia parcial del gen del ARNr 16S de las 49 cepas aisladas.

En la Figura 48 se muestra la curva de acumulación de especies y de rarefacción como representación de la calidad del muestreo llevado a cabo, mediante la relación del número de OTUs observados y el total de las secuencias analizadas con un porcentaje de similitud del 97 %. Se representa también la estimación de riqueza en OTUs mediante los estimadores Chao 1 y ACE. La tendencia a la asíntota de la curva de rarefacción indicó que el número total de cepas aisladas fue suficiente para poder estimar la diversidad de arqueas cultivables en el Humedal de Ajauque y Rambla Salada.



Número de secuencias

Figura 48. Curvas de acumulación de especies y de rarefacción de las secuencias del gen del ARNr 16S de cepas de arqueas aisladas del Humedal de Ajauque y Rambla Salada. La riqueza en OTUs estimada se representa mediante las curvas de los estimadores Chao1 y ACE.

A un nivel de distancia del 3 % las cepas se agruparon en 14 OTUs, los cuales provenían principalmente de las muestras de junio de 2006 (17 aislados agrupados con 8 OTUs) y de la zona de la Finca de la Salina (29 aislados agrupados con 11 OTUs) (Tabla 36).

Los menores índices de diversidad ($H' = 1,42$ y $1/D = 5$) se obtuvieron en el mes de febrero de 2006 (5 OTUs).

Teniendo en cuenta los hábitat estudiados, se considera de mayor diversidad bacteriana la zona de la Finca de la Salina (11 OTUs) en donde los correspondientes índices fueron $H' = 2,12$ y $1/D = 8,50$ y los estimadores de riqueza Chao 1 = 15,34 y ACE = 12,50.

Tabla 36. Distribución de OTUs y estimaciones de riqueza de especies de arqueas.

	OTUs*	H*	1/D*	ACE*	Chao 1*
TOTAL DE SECUENCIAS	14	2,35	10,50	16,78	15,50
ÉPOCA DE MUESTREO					
FEBRERO 2006	5	1,42	5	9,56	6,5
JUNIO 2006	8	1,84	7	48,32	18,0
NOVIEMBRE 2007	5	1,47	5	5,46	5,0
FEBRERO 2007	5	1,43	5	6,14	5,5
ZONA DE MUESTREO					
FINCA LA SALINA	11	2,12	8,50	15,34	12,50
SURGENCIA	6	1,84	10,99	11,00	9,00
HUMEDAD DE DERRAMADORES	1	0,63	2,14	2	2
TRASVASE TAJO-SEGURA	1	0,63	3,03	3	2

*Datos obtenidos a nivel de distancia del 3 %.

H*, índice de diversidad de Shannon; 1/D, recíproco del índice de diversidad de Simpson; ACE, estimador de riqueza ACE; Chao 1, estimador de riqueza Chao 1.

III.3.4. DISCUSIÓN

El interés por conocer los microorganismos presentes en los ambientes salinos se hace indiscutible si pensamos que nos permitirá comprender la evolución de la vida en la Tierra, ya que se piensa que en este tipo de ambientes extremos comenzó la vida (Zafrilla y col., 2010); además, conocer la población microbiana en hábitats salinos terrestres nos ayudará a conocer las propiedades de estos ecosistemas (Gendrin y col., 2005; Langevin y col., 2005), así como encontrar nuevas aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos halófilos (Oren, 2002; DasSarma y col., 2010).

La población microbiana de los hábitats salinos está compuesta fundamentalmente por miembros de los dominios *Bacteria* y *Archaea* (Burns y col., 2004; Maturrano y col., 2006; Hedi y col., 2009), sin embargo la diversidad microbiana del Humedal de Ajauque y Rambla Salada no había sido nunca analizada previamente a este trabajo.

En nuestro estudio se aislaron 428 cepas bacterianas y 49 cepas de arqueas. De las 366 secuencias de bacterias analizadas se identificaron miembros de 6 clases y 4 phyla. La mayoría de nuestros aislados pertenecían al phylum *Proteobacteria* (75 %) y dentro de este, a la clase *Gammaproteobacteria* (42 %), y al phylum *Firmicutes* (17 %), con el predominio de la clase *Bacilli* (17 %). En el caso de las cepas de arqueas, todas ellas pertenecían a la familia *Halobacteriaceae*. Nuestros resultados son similares a los de otros trabajos en los que se confirma que en los ambientes salinos predominan las especies cultivables del phylum *Proteobacteria* (Nemergut y col., 2011) y de la familia *Halobacteriaceae* (Moschetti y col., 2006; Oh y col., 2010). Los medios utilizados en este estudio para el aislamiento y recuento de bacterias y arqueas así como las condiciones de incubación pueden haber influido notablemente en la selección de cepas, de manera que en las distintas épocas del año y zonas de muestreo se han aislado bacterias y arqueas con identidades taxonómicas muy próximas (Rodríguez-Valera, 2002). Si tenemos en cuenta que sólo somos capaces de cultivar del 1-10 % de la microbiota existente en la naturaleza (Oren y Papke, 2010), este porcentaje se corresponde principalmente con los phyla *Proteobacteria* y *Firmicutes*, dejando atrás más de una veintena de phyla con la consiguiente pérdida de información muy valiosa como son los patrones biogeográficos, procesos metabólicos, y un largo etcétera.

Esta situación, está cobrando cada vez mayor interés entre los microbiólogos. Por el momento, sólo se ha podido aislar los microorganismos de forma axénica, y por consiguiente estudiar y explotar una ínfima parte de los microorganismos que existen en la naturaleza. Esta información comenzó a vislumbrarse cuando a finales de los años 80 y principios de los 90 se publicaron una serie de artículos que demostraron que la naturaleza estaba repleta de procariotas que desconocíamos. Los autores de estos trabajos, (Amann y col., 1990; 1995; Giovannoni y col., 1990; Green y Keller, 2006; Leadbetter, 2003; Olsen y Bakken, 1987; Pace, 1986) habían aplicado dos de las técnicas que más han influido en el desarrollo de la

ciencia moderna, la PCR y la secuenciación del ADN, para identificar directamente los organismos, que estaban presentes en una determinada muestra, a través de la secuencia de su gen ribosómico 16S. Desde entonces, no sólo sabemos que la naturaleza está repleta de procariotas, y posiblemente de pequeños eucariotas que aún no hemos descubierto ni hemos logrado cultivar, sino que también sospechamos que éstos podrían ser incluso más abundantes en el medio ambiente que las cepas que ahora cultivamos y tener una actividad importante en su ecología. Además se conoce que el 90% de la diversidad procariota se encuentra en el subsuelo de la corteza terrestre y sólo el 10% se alberga en la biosfera superficial (aguas, sedimentos, aires y suelo superficial) (Roselló-Mora y López-López, 2008).

Como ya hemos expuesto con anterioridad, las bacterias halófilas moderadas que se han aislado hasta el momento pertenecen principalmente a las Gammaproteobacterias y a los Firmicutes. Nuestros resultados están relacionados con la bibliografía existente ya que de nuestro estudio se deduce que el 35 % de las cepas aisladas se corresponden con especies del género *Halomonas* y el 11 % con especies de *Bacillus*. Estos datos son muy importantes si tenemos en cuenta que los estudios de diversidad en ambientes salinos en nuestro país son escasos (Ventosa y col., 1998), destacando los estudios realizados desde los años ochenta por Rodríguez-Valera en las salinas de Santa Pola (Alicante) (Rodríguez-Valera y col., 1981, 1985, 1991; Martínez-Murcia y col., 1995; Benlloch y col., 2002) y más recientemente en la zona mediterránea (Danovaro y col., 2010; Coll y col., 2010).

Por otro lado, se puede observar como los taxa más abundantes (*Halomonas*, *Bacillus* y *Marinobacter*) tienen patrones de distribución similares, lo cual está relacionado con los resultados obtenidos por Nemergut y colaboradores (2011). En cambio, el resto de especies parecen tener patrones biogeográficos distintos pudiendo estar controlados por variables ambientales (Horner-Devine y col., 2004). Se considera además que las interacciones bióticas son también responsables de la composición de las comunidades microbianas mediante interacciones competitivas o nichos de especialización (Horner-Devine y col., 2007).

El estudio estadístico llevado a cabo sobre el total de las cepas bacterianas aisladas e identificadas a nivel de género utilizando como criterio el porcentaje del 95 % de identidad del gen del ARNr 16S, mostró que existía una relación entre los géneros seleccionados y las épocas del año y zonas muestreadas. Esto puede ser debido al alto porcentaje de cepas identificadas como especies de *Halomonas*, *Bacillus* y *Marinobacter*, los cuales se caracterizan por su alta versatilidad metabólica lo que les confiere un elevado grado de ubicuidad (Ventosa, A., 2008).

Similares resultados se produjeron en el estudio de la comunidad de arqueas. En este caso, la totalidad de las cepas aisladas se identificaron como miembros de la familia *Halobacteriaceae*. Las arqueas halófilas de esta la familia son los microorganismos halófilos

por excelencia, representados en distintos ambientes salinos como el Mar Muerto, lagos hipersalino de Magadi y Kenia y cristalizadores salinos (Bodaker y col., 2009; Grant y col., 1999; Baati y col., 2008; Oh y col., 2010, Ozcan y col., 2007). Aunque las arqueas han estado tradicionalmente asociadas a ambientes extremos como lagos (Mutlu, 2008), hoy día se conoce que dichas especies habitan también otros ambientes salinos no extremos (Ventosa, 2006; Elshahed y col., 2004).

En cuanto al análisis global de la diversidad bacteriana, tanto los índices de diversidad de Shannon y el recíproco de Simpson así como los estimadores de riqueza ACE y Chao 1 en las distintas épocas y zonas muestreadas fueron bastante elevados, lo que nos indica una alta diversidad bacteriana en el Humedal de Ajauque y Rambla Salada (Shannon y Weaver, 1949; Simpson, 1949 y Chao y Lee, 1992). Además, si tenemos en cuenta el total de secuencias (366), el índice de Shannon con un valor de 4,5 se aproxima a 5, el cual se considera de gran diversidad (Shannon y Weaver, 1949).

Por otro lado, los índices de diversidad y estimadores de riqueza calculados para el estudio de la diversidad de arqueas son notablemente inferiores con respecto a la comunidad bacteriana, no obstante, si tenemos en cuenta el total cepas de arqueas, el índice de Shannon con un valor de 2,35 nos indican que la diversidad es elevada y dada la tendencia a la asíntota de la curva de rarefacción, se considera que dicha diversidad está bien representada por las cepas aisladas (Sanders, 1968; Hurlbert, 1971).

Son muchos los hábitats salinos estudiados que muestran una elevada diversidad procariota (Moschetti y col., 2006; Baati y col., 2008; Hedi y col., 2009; Oren, 2008); sin embargo, pocos son los trabajos recogidos en los que se calculen estos índices y estimadores de riqueza que reflejen un verdadero estudio de la diversidad (Galand y col., 2009; Tamames y col., 2010; Auguet y col., 2009; Lozupone y col., 2007). Existen diferentes métodos todavía bastante complejos para analizar el genoma completo de los microorganismos aislados que en un futuro proporcionarán información acerca de la “biogeografía funcional” (Green y col., 2008), pero hasta ese momento, estos índices nos ayudan a conocer los patrones de distribución microbianas.

**CAPÍTULO 4: *BÚSQUEDA DE
SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS
EN LAS CEPAS BACTERIANAS***

III.4.1. RESUMEN

Esta parte del estudio se realizó en colaboración con los departamentos de Microbiología, Química y Screening de la Fundación MEDINA (Fundación Centro de Excelencia en Investigación de Medicamentos Innovadores en Andalucía).

Las resistencias, a veces múltiples, a los antimicrobianos así como el no descubrimiento de nuevos productos en los últimos años a partir de los microorganismos productores de antibióticos clásicos, ha impulsado la búsqueda de antimicrobianos en otros microorganismos. En este trabajo hemos realizado este estudio en nuestras cepas halófilas.

Las 428 cepas bacterianas aisladas en el Humedal de Ajauque y Rambla Salada fueron cultivadas en cuatro medios de cultivo diferentes y los metabolitos producidos se recogieron mediante un proceso de extracción con acetona y posterior concentración. Los extractos fueron enfrentados a cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus* mediante ensayo en medio líquido. Aquellos extractos que presentaron un porcentaje de inhibición de la actividad microbiana superior al 60% fueron confirmados mediante repetición del ensayo en medio líquido y en medio sólido.

Se encontraron un total de 20 extractos bacterianos con actividad frente a *Staphylococcus aureus* y 5 frente a *Aspergillus fumigatus*. Estos resultados confirman el interés biotecnológico de las bacterias halófilas y la necesidad de seguir investigando en este campo teniendo en cuenta que son pocos los estudios que hasta estos días se han realizado en ambientes salinos.

III.4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

III.4.2.1. Registro de cepas

Las 428 cepas bacterianas a ensayar fueron registradas en la base de datos CTS (del inglés *Culture Tracking System*) (Figura 49) en la que se incluyeron los datos referentes al lugar de procedencia, la fecha de recogida, el tipo de muestra (suelo, agua o sedimento), el nombre de referencia, su asignación taxonómica y algunas observaciones adicionales de interés.

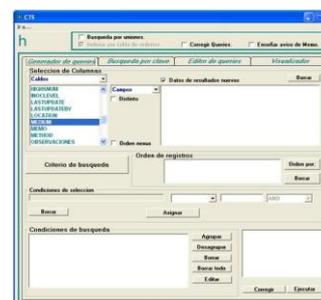


Figura 49. Formato del programa CTS.

III.4.2.2. Selección de los medios de cultivo y condiciones de incubación

Cada cepa fue cultivada en cuatro medios distintos con objeto de aumentar las posibilidades de encontrar moléculas activas frente a bacterias, hongos filamentosos y/o levaduras (Tabla 37). El medio M1 correspondiente al medio MY al 5 % de sales (Moraine y Rogovin, 1966; Quesada y col., 1993) se empleó con todas las cepas. Los otros medios de cultivo empleados se obtuvieron de la bibliografía consultada en el *Diccionario de Productos Naturales* (CRC Press Taylor and Francis Group) (Figura 50). La composición de todos los medios de cultivo utilizados en este capítulo se detalla en el anexo X.

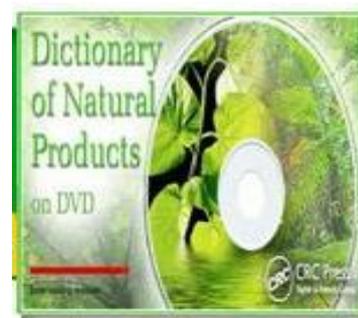


Figura 50. Diccionario de Productos Naturales.

Tabla 37. Medios de cultivo utilizados en la búsqueda de sustancias antimicrobianas.

GÉNERO	M2	M3	M4	REFERENCIAS*
<i>Bacillus</i>	GSSm	LM	JM	Zheng y col., 2007; Landy y col., 1948; Akpa y col., 2001.
<i>Brevibacterium</i>	NB	TSB	NM	Guyomarc'h, 2000; Dias y Weimer, 1998; Ogata y col., 1971.
<i>Halomonas</i>	AnRS	GINR	ASG-Fe	Bitzer y col., 2006; Hoagland, 1933; Van-Thuoc y col., 2010.
<i>Idiomarina</i>	MM 5% (p/v)	MB	HM	Argandoña y col., 2001; Yoshikawa y col., 1997; Ventosa y col., 1998.
<i>Marinobacter</i>	ASW	HS	MM5 % (p/v)	Rontani y col., 1997; Hickford y col., 2004; Argandoña y col., 2001.
<i>Microbulbifer</i>	MB	HM	MM 5% (p/v)	Quévrain y col., 2009; Ventosa y col., 1998; Argandoña y col., 2001.
<i>Pseudoalteromonas</i>	TSB	MB	Zobell	Dias y Weimer, 1998; Feher y col., 2011; Isnansetyo y Kamei, 2003.
<i>Salinimonas</i>	Mm	C1	B1	Nys y col., 2001; medios M2 y M3: Al-Zereini y col., 2010.
<i>Salinivibrio</i>	Mm	C1	B1	Nys y col., 2001; medios M2 y M3: Al-Zereini y col., 2010.
<i>Serratia</i>	PN	TSB	MM5 % (p/v)	Foulds y Shemin, 1969; Dias y Weimer, 1998; Argandoña y col., 2001.
<i>Staphylococcus</i>	MM5% (p/v)	BHI m.	2X-YT m.	Argandoña y col., 2001; Nascimento y col., 2004; Crupper y Landolo, 1996.
<i>Vibrio</i>	Mm	C1	B1	Nys y col., 2001; medios M2 y M3: Al-Zereini y col., 2010.
<i>Yersinia</i>	NBD	M9 m.	LB	Pelludat y col., 1998; Strauch y col., 2001; Mokracka y col., 2004.
Otros géneros	MB	HM	MM 5% (p/v)	Quévrain y col., 2009; Ventosa y col., 1998; Argandoña y col., 2001.
Cepas no identificadas	MM 5% (p/v)	HM	MB	Argandoña y col., 2001; Ventosa y col., 1998; Quévrain y col., 2009.

AnRS, Medio Anranflico; BHI, Infusión cerebro-corazón; GINR, Medio Glutamato; GSSm, Medio GSS; HS, medio hipersalino; JM, Medio Jacques; LB, Caldo Luria-Bertani; LM, Medio Landy; MB, Caldo Marino; Mm, medio mínimo con glucosa; MM5%, medio mínimo; NB, Caldo nutritivo NBD, caldo nutritivo deficiente en hierro; PN, Caldo Penassay; TSB, Caldo tripticasa soja.

*, el orden de las citas bibliográficas se corresponde para cada género con los medios M2, M3 y M4, respectivamente.

Las cepas a ensayar se sembraron en placas con medio MY 5% (p/v) durante 5 días a 32 °C para comprobar que no existiese ningún tipo de contaminación, tras lo cual, dichas placas se utilizaron para obtener el inóculo correspondiente. Cada inóculo se preparó mediante la siembra de una colonia aislada en un tubo con 10 ml de medio MY al 5 % (p/v) que se incubó a 32 °C, en agitación a 200 rpm, con un 70 % de humedad relativa durante 48 horas en la estufa *Kühner ISF-4-V*. Estos inóculos se utilizaron para la posterior siembra en viales con 16 ml del medio de cultivo, los cuales se incubaron durante 5 días, a 32 °C, en agitación a 200 rpm y una humedad relativa del 70 %.

III.4.2.3. Cultivo de las cepas

Se establecieron distintos grupos de cultivo en función de la asignación taxonómica de cada cepa. A continuación se prepararon los viales en gradillas de 24 unidades y a su vez en grupos de 4, de forma que cada gradilla contenía 6 cepas (Figura 51).

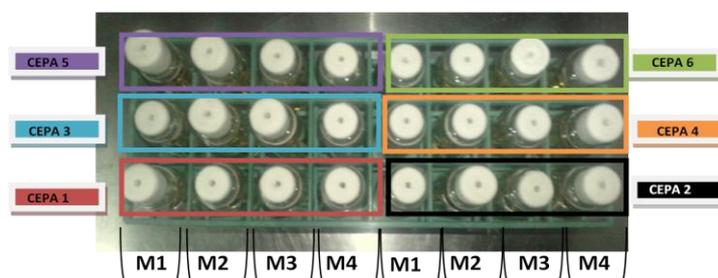


Figura 51. Posiciones de los viales con los medios de cultivo para cada cepa.

Se transfirieron 0,5 ml de cada inóculo a 4 viales con distintos medios de cultivo en las condiciones mencionadas anteriormente. Con objeto de confirmar que no se había producido ninguna contaminación durante el proceso, se sembró paralelamente 1 ml de cada inóculo en medio MY sólido al 5 % (p/v) y se incubaron en las mismas condiciones. Se utilizó como control negativo los medios de cultivo sin inocular e incubados en iguales condiciones.

III.4.2.4. Preparación de los extractos

Una vez finalizado el cultivo se procedió a la preparación de cada uno de los extractos. Para ello en primer lugar se procedió a lisar las células bacterianas con acetona para que liberasen al exterior su contenido intracelular de metabolitos. Tras concentrar el volumen de cada vial por evaporación en atmósfera de nitrógeno, se utilizó la resina SP207ss en fase reversa para captar las sales del medio del cultivo utilizado, eliminándolas posteriormente mediante un doble proceso de lavado y centrifugación. Finalmente los extractos fueron concentrados nuevamente por evaporación en atmósfera de nitrógeno.

III.4.2.5. Ensayo de la actividad antimicrobiana

III.4.2.5.1. Medios de cultivo

Se emplearon medios de cultivo comerciales suministrados por diferentes proveedores. En la Tabla 38 se incluyen los medios de cultivo y las condiciones de incubación utilizados para cada microorganismo frente al que se ensayó la actividad antimicrobiana. Dichos medios se esterizaron a 121°C durante 30 minutos, con excepción del medio RPMI modificado que se esterilizó por filtración mediante el sistema *Millipore ExpressTM Plus*[®].

Los microorganismos utilizados en el ensayo pertenecen a la colección de cepas de la Fundación MEDINA.

Tabla 38. Medios de cultivo empleados y condiciones de incubación.

CEPA	MEDIO SÓLIDO	MEDIO LÍQUIDO*	INCUBACIÓN
<i>Acinetobacter baumannii</i>	LB Agar	LB Broth	20h, 37 °C
<i>Aspergillus fumigatus</i>	PD Agar	RPMI modificado + resazorina 0.002 % (p/v)	30h, 37 °C
<i>Candida albicans</i>	SD Agar	RPMI modificado	20h, 37 °C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LB Agar	LB Broth	20h, 37 °C
<i>Staphylococcus aureus</i>	M1	M2	20h, 37 °C
<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente	LB Agar	LB Broth	20h, 37 °C

*, M1: LB Agar con cloranfenicol; M2: LB Broth con cloranfenicol ; PD Agar: Potato Dextrose Agar; RPMI: Roswell Park Memorial Institute; SD Agar: Sabouraud Dextrose Agar.

III.4.2.5.2. Preparación de las disoluciones de antimicrobianos

Los antimicrobianos utilizados como controles se muestran en la Tabla 39; todos ellos fueron suministrados por Sigma®.

Tabla 39. Antimicrobianos utilizados como controles en los ensayos de determinación de la actividad antimicrobiana.

CEPA	CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Rifampicina	Anfotericina B
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Anfotericina B, Itraconazol y Caspofungina	-
<i>Candida albicans</i>	Anfotericina B	Penicilina G
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	Ciprofloxacina	Anfotericina B
<i>Staphylococcus aureus</i>	Penicilina G	Anfotericina B
<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente	Imipenen	Anfotericina B

Los disolventes y las concentraciones utilizadas en la preparación de los antimicrobianos se muestran en la Tabla 40.

Tabla 40. Preparación de los antimicrobianos.

ANTIMICROBIANO	DISOLVENTE	CONCENTRACIÓN DEL ENSAYO (µg/ml)
Anfotericina B	DMSO puro	<i>Aspergillus</i> sp. 4 - 0,5*
		Bacterias y levadura 0,625 - 0,078
Caspofungina	DMSO 20 % (p/v)	1 x 10 ³ - 0,48
Ciprofloxacina	Agua estéril	1.57 - 0.19
Imipenen	Agua estéril	16 - 2
Itraconazol	DMSO 20 % (p/v)	1 x 10 ³ - 0,48
Penicilina G	Agua estéril	0,03 – 3,9 x 10 ⁻³
Rifampicina	DMSO 20 % (p/v)	2,5 – 0,3

*, en el caso del ensayo en medio sólido, las concentraciones utilizadas de Anfotericina B en *Aspergillus fumigatus* fueron desde 1 x 10³ a 0,48 µg/ml mediante diluciones al medio (1/2).

III.4.2.5.3. Determinación de la actividad antimicrobiana

A) Preparación del cultivo de los microorganismos de ensayo

En función del microorganismo a ensayar, el inóculo utilizado se preparó a partir de un cultivo de 24 horas o directamente de una colonia.

Aspergillus fumigatus

Este hongo filamentoso se conserva habitualmente aislado en el medio PD Agar. A partir de este cultivo se preparó una suspensión de esporas añadiendo 30 ml de Tween 80 salino estéril; las esporas fueron transferidas a un tubo con 50 ml de la misma solución; dichas esporas se contaron seguidamente en una cámara de Neubauer® ajustando su concentración a 2,4 x 10⁴ esporas/ml.

Para medir la actividad antifúngica de los compuestos se utilizó el colorante resazurina (Martín y col., 2007; Taneja y col., 2007). Dicho colorante es azul no fluorescente y cuando las células viables lo reducen a resorufina, adquiere un color rosa altamente fluorescente (Figura 52).

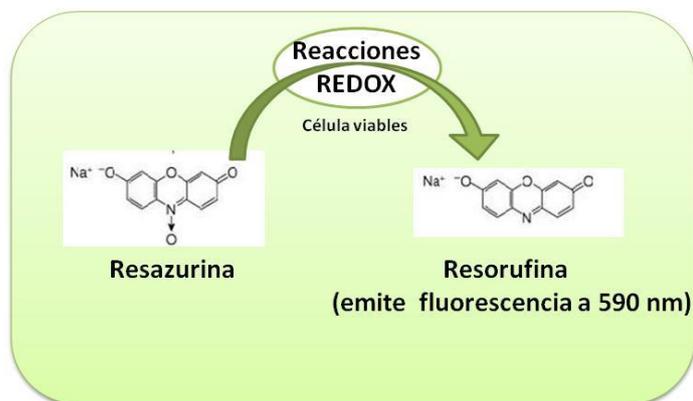


Figura 52. Reducción de la resazurina.

Staphylococcus aureus y *Candida albicans*

En el caso de *Staphylococcus aureus* el inóculo se preparó directamente resuspendiendo las colonias en medio LB hasta alcanzar una DO_{600} de 0,3. A esta suspensión se le añadió cloranfenicol a una concentración final de 34 $\mu\text{g/ml}$ y a continuación se preparó una dilución 1:100. En el caso de *Candida albicans* la preparación del inóculo se hizo suspendiendo sus colonias en el medio RPMI modificado a una DO_{600} de 0,25 y posterior dilución 1:10 en el mismo medio (Roemer y col., 2003; Bills y col., 2009; Vicente y col., 2009). De esta manera los inóculos de partida tenían una concentración de $6,25 \times 10^5$ UFC/ml y 1×10^7 UFC/ml respectivamente, de acuerdo con las curvas de regresión establecidas previamente.

Pseudomonas aeruginosa y *Acinetobacter baumannii*

Los inóculos se prepararon suspendiendo varias colonias en 10 ml de medio LB que se incubó a 37 °C en agitación a 200 rpm durante 18 horas. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* se preparó una dilución 1:100 para que la concentración final fuese de 5×10^5 UFC/ml de acuerdo con los valores establecidos en ensayos previos para los que a una $DO_{600} = 0,35$ le corresponde una concentración de 1×10^{10} UFC/ml. Para *Acinetobacter baumannii* se preparó una dilución para una DO_{612} de 0,3 de manera que el inóculo tuviese una concentración final de 5×10^5 UFC/ml.

B) Ensayo para determinar la actividad antimicrobiana

Los ensayos se realizaron en medio líquido empleando placas *Microtiter*[®] de 96 pocillos (Costar 3370, Corning, NY, USA). En primer lugar se dispensaron 10 μl de extracto de los microorganismos objeto de estudio en las posiciones A2-H11 mediante el sistema automático *Tecan Aquarius*. Un ejemplo de la distribución de las muestras en la placa se incluye en la Figura 53.

A continuación se añadieron con la ayuda de una pipeta multicanal, 100 μ l de medio de cultivo en las posiciones A1-D1 que corresponderían con un valor de 100% de inhibición (“blancos”); 100 μ l de inóculo en las posiciones E1-H1 que corresponderían con un valor de 100% de crecimiento (“totales”); 10 μ l de control positivo a distintas concentraciones de antimicrobiano que inhibe el crecimiento (posiciones A12-D12) y 10 μ l de control negativo también a distintas concentraciones de antimicrobiano que no inhibe el crecimiento (posiciones E12-H12). Seguidamente con un dispositivo *Multridop Combi* (Thermo®) se distribuyeron 90 μ l de inóculo en las posiciones A2-H12 (muestras y controles positivos y negativos).

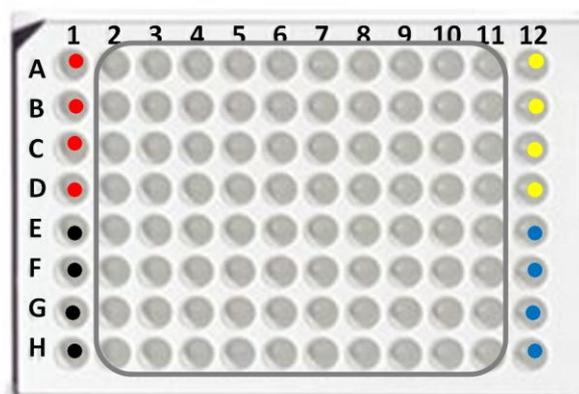


Figura 53. Distribución de las muestras y los controles en las placas de ensayo; •: blancos; •: totales; •: control positivo; •: control negativo. En el resto de los pocillos se dispensan los extractos.

En el caso de *Aspergillus fumigatus* las placas se incubaron estáticamente según las condiciones indicadas en la Tabla 38. El crecimiento se midió por fluorescencia con el lector de placas multipocillos Victor 1TM (PerkinElmer®) utilizando los filtros de emisión y excitación de 615 nm y 590 nm respectivamente. Se tuvo en cuenta los posibles falsos negativos debido al sobrecrecimiento; en estos casos no se recibió señal fluorescente ya que el crecimiento fue tan alto que la resazurina se agotó y el medio quedó transparente.

En los casos restantes (*Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*) se hizo una lectura de absorbancia a 600-612 nm correspondiente al tiempo cero, en un espectrofotómetro *Tecan Ultraevolution*. Seguidamente, las placas se incubaron estáticamente durante 18-20 horas según las condiciones indicadas en la Tabla 38. Una vez transcurrido este tiempo y antes de realizar la lectura a tiempo final, se agitaron todas las placas en un *Micromix* (AB-gene 0661, Thermo Fisher Scientific) con el fin de disolver los posibles precipitados que se pudieran haber formado.

C) Cálculo del porcentaje de inhibición

La actividad antimicrobiana se estimó mediante el programa *Genedata Screener*[®]. En el caso de *Aspergillus fumigatus* la fórmula empleada para calcular el porcentaje de inhibición de los diferentes extractos a través de la reducción del colorante resazurina fue:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \% \text{ de reducción}$$

Siendo el cálculo del porcentaje de reducción:

$$\% \text{ reducción de resazurina} = \left(\frac{\text{IF}_{\text{MUESTRA}} - \text{IF}_{\text{BLANCO}}}{\text{IF}_{\text{TOTALES}} - \text{IF}_{\text{BLANCO}}} \right) \times 100$$

IF_{MUESTRA} se corresponde con la medida de fluorescencia (615 nm y 590 nm de emisión y excitación respectivamente) del microorganismo incubado en presencia de los extractos; IF_{BLANCO} se corresponde con la medida de fluorescencia, a las mismas longitudes de onda, del medio de cultivo incubado en presencia de DMSO y IF_{TOTALES} se corresponde con la medida de fluorescencia del microorganismo incubado en ausencia de los extractos. Sólo se consideraron activos los valores de inhibiciones superiores o iguales al 60 % en valor absoluto (Figura 54).

		Muestras de extractos											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Blancos	A	-97	28	23	23	25	19	11	12	17	11	14	8
	B	-100	1	9	8	0	5	2	10	3	10	3	-1
	C	-100	9	1	12	3	-106	-70	3	-2	3	0	0
	D	-100	7	-11	7	-11	8	9	5	4	3	5	0
Controles positivos	E	-99	0	-9	-8	6	3	-2	4	0	4	2	-98
	F	-100	-43	6	12	0	10	-61	4	7	-89	-1	-98
	G	-54	6	9	7	5	1	10	4	6	4	2	-27
	H	-2	3	2	2	1	8	-84	5	5	3	-5	2
		Ejemplos de activos											

Figura 54. Lectura del cálculo del porcentaje de inhibición en *Aspergillus fumigatus*.

En los casos restantes (*Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*), la fórmula empleada para calcular el porcentaje de inhibición de los diferentes extractos fue la siguiente:

$$\% \text{ Inhibición} = 1 - \left[\frac{(TF_{\text{Muestra}} - TO_{\text{Muestra}}) - (TF_{\text{Blancos}} - TO_{\text{Blancos}})}{(TF_{\text{Totales}} - TO_{\text{Totales}}) - (TF_{\text{Blancos}} - TO_{\text{Blancos}})} \right] \times 100$$

TO_{Muestra} y TF_{Muestra} se corresponden con la absorbancia a 612 nm del microorganismo sin incubar e incubado en presencia de los extractos, respectivamente; TO_{Blancos} y TF_{Blancos} se corresponden con la absorbancia, a igual longitud de onda, del medio de cultivo sin incubar e incubado en presencia del DMSO; y TO_{Totales} y TF_{Totales} se corresponden con la absorbancia del microorganismo sin incubar e incubado en ausencia de los extractos. Como en el caso anterior sólo se consideraron los activos valores de inhibición mayor o igual al 60 % (Figura 55).

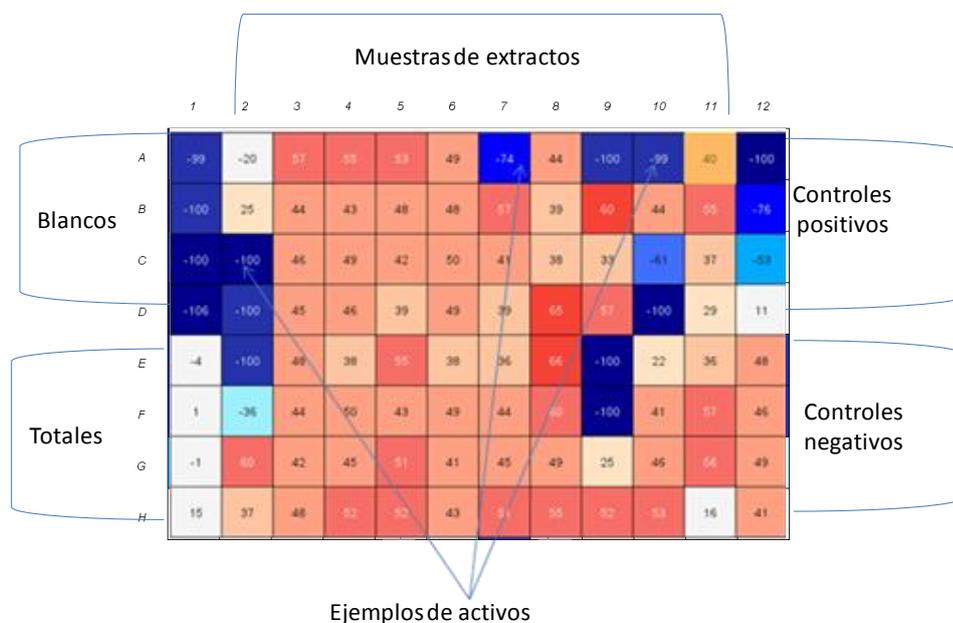


Figura 55. Lectura del cálculo del porcentaje de inhibición en *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.

III.4.2.5.4. Confirmación de los extractos con actividad antimicrobiana

Los extractos que presentaron un porcentaje de inhibición de la actividad antimicrobiana superior o igual al 60% frente a las bacterias y los hongos ensayados fueron

confirmados mediante repetición del ensayo en medio líquido a doble concentración, y en medio sólido.

La precisión del examen se confirmó mediante el factor corregido Z el cual viene dado por los parámetros de la media y desviación estándar. Un valor próximo a la unidad se considera que se ha realizado un ensayo exacto (Zhang JH, 1999).

A) Determinación de la actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* en medio líquido

El ensayo se llevó a cabo utilizando las cepas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus aureus* meticilina resistente. La técnica usada para la determinación de la actividad antimicrobiana en el caso de *Staphylococcus aureus* fue similar al protocolo descrito anteriormente (véase el apartado III.4.2.5.3.A). En el caso de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente se siguió el mismo protocolo, utilizando en este caso como control positivo cuatro concentraciones del antimicrobiano Imipenen, desde 16 µg/ml hasta 2 µg/ml mediante diluciones al medio.

En ambos casos el ensayo se hizo utilizando 10 µl y 5 µl de cada extracto para conocer la curva que representa la pérdida de la actividad antimicrobiana y establecer así cuál es el volumen necesario para obtener el mayor porcentaje de inhibición.

B) Determinación de la actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* en medio sólido

Se prepararon los inóculos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus aureus* meticilina resistente en medio LB con cloranfenicol y medio BHI, respectivamente, incubando durante 18 horas.

En el caso de *Staphylococcus aureus*, al medio LB agar atemperado se le añadió un 0,1 % (v/v) de inóculo (a una DO_{600} de 0,3), 0,2 % (p/v) de glucosa y 15µg/ml de cloranfenicol, y se repartió en placas *OMNY TRAY* de 48 pocillos. El inóculo de 18 horas de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente se ajustó a una DO_{660} de 0,2 y se añadieron 3,3 % (v/v) de éste al medio BHI agar atemperado, antes de su reparto en placa.

A continuación ambas placas se inocularon con 10 µl de extracto en cada pocillo, junto con los antimicrobianos correspondientes utilizados como controles, y se dejaron incubar durante 24 horas a 37°C. Para la lectura de los halos de inhibición se anotó tanto el diámetro del halo como la transparencia o turbidez del mismo ya que ambos datos son criterios a tener en cuenta a la hora de seleccionar las posibles cepas productoras de sustancias antimicrobianas. En la Figura 56 se pueden observar dichos halos.

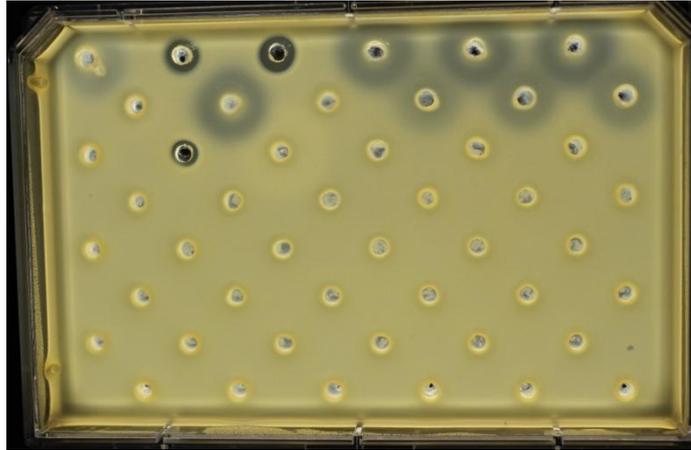


Figura 56. Halos de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

C) Determinación de la actividad antimicrobiana frente a *Aspergillus fumigatus* en medio líquido

Este ensayo se hizo siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado III.4.2.5.3. A, empleando volúmenes de 10 μ l y 5 μ l.

D) Determinación de la actividad antimicrobiana frente a *Aspergillus fumigatus* en medio sólido.

Para este estudio se utilizaron placas *OMNY TRAY* con 48 pocillos preparadas con el medio nitrógeno base-glucosa (YNB-G) agar, al cual se le añadió una suspensión de esporas de *Aspergillus fumigatus* a una concentración de $7,5 \times 10^5$ esporas/ml. A cada pocillo se le añadieron 10 μ l de extracto. Los controles se realizaron añadiendo el mismo volumen de los antimicrobianos anfotericina B, itraconazol y caspofungina mediante diluciones al medio, desde una concentración inicial de 1 mg/ml hasta 0,48 μ l/ml, utilizando DMSO al 20 % (v/v).

III.4.3. RESULTADOS

De las 428 cepas bacterianas ensayadas, el 8,2 % (35 cepas) presentaron intensidades de antibiosis comprendidas entre el 60 % y 100 %; el resto presentó actividad antimicrobiana inferior al 60 % o dieron lugar a resultados dudosos por lo que fueron considerados no interesantes desde el punto de vista industrial.

De las 35 cepas con actividad antimicrobiana, 25 presentaron actividad frente a *Staphylococcus aureus*, mientras que 10 cepas fueron biológicamente activas frente a *Aspergillus fumigatus*, no detectándose actividad antimicrobiana frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* ni *Acinetobacter braumanii*.

En la Tabla 41 se muestran las cepas bacterianas ensayadas junto con su identificación taxonómica a nivel de género y el número de éstas que mostraron un porcentaje de inhibición superior o igual al 60% en el estudio realizado frente a *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus fumigatus*, empleando el sistema automático *Tecan Aquarius*.

Los géneros que presentaron actividad antimicrobiana superior al 60 % fueron *Halomonas* (13 cepas), *Bacillus* (7 cepas), *Salinivibrio* (3 cepas), *Vibrio* (3 cepas), *Oceanobacillus* (2 cepas), *Yersinia* (2 cepas), *Marinobacter* (1 cepa), *Nesiotobacter* (1 cepa), y *Pantoea* (1 cepa), y dos aislados no identificados filogenéticamente.

Con actividad antibacteriana, el género *Bacillus* incluía a las especies *Bacillus endophyticus* (1 cepa), *Bacillus vallismortis* (1 cepa), *Bacillus subtilis* subespecie *inaquosorum* (1 cepa) y *Bacillus simplex* (3 cepas). Respecto al género *Halomonas*, se identificaron las especies *Halomonas caseinilytica* (2 cepas), *Halomonas hydrothermalis* (2 cepas), *Halomonas gomseomensis* (1 cepa), *Halomonas pacífica* (1 cepa) y *Halomonas ventosae* (3 cepas). De los géneros *Oceanobacillus* y *Salinivibrio* solamente se identificaron las especies *Oceanobacillus manasiensis* (2 cepas) y *Salinivibrio proteolyticus* (3 cepas) y del género *Vibrio* se identificaron las especies *Vibrio azureus*, *Vibrio owensii* y *Vibrio rumoiensis* con una cepa cada una. Por último se identificó una sola cepa como *Nesiotobacter exalbescens*.

Tabla 41. Cepas bacterianas cuyos extractos mostraron actividad antimicrobiana.

	NÚMERO DE CEPAS	ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA*	ACTIVIDAD ANTIFUNGICA*
<i>Acinetobacter</i> sp.	1	0	0
<i>Achromobacter</i> sp.	1	0	0
<i>Aurantimonas</i> spp.	2	0	0
<i>Bacillus</i> spp.	46	6	1
<i>Bartonella</i> sp.	1	0	0
<i>Brevibacterium</i> spp.	5	0	0
<i>Brevundimonas</i> spp.	6	0	0
<i>Cronobacter</i> sp.	1	0	0
<i>Halomonas</i> spp.	151	9	4
<i>Idiomarina</i> spp.	10	0	0
<i>Kushneria</i> spp.	3	0	0
<i>Labrencia</i> spp.	2	0	0
<i>Luteimonas</i> sp.	1	0	0
<i>Marinobacter</i> spp.	48	0	1
<i>Marinococcus</i> spp.	3	0	0
<i>Microbulbifer</i> sp.	1	0	0
<i>Nesiotobacter</i> sp.	1	1	0
<i>Oceanobacillus</i> spp.	3	2	0
<i>Palleronia</i> sp.	1	0	0
<i>Pantoea</i> spp.	2	0	1
<i>Paracoccus</i> sp.	1	0	0
<i>Planococcus</i> spp.	5	0	0
<i>Pseudoalteromonas</i> spp.	4	0	0
<i>Pseudomonas</i> spp.	2	0	0
<i>Riemerella</i> sp.	1	0	0
<i>Salinicola</i> sp.	1	0	0
<i>Salinimonas</i> spp.	3	0	0
<i>Salinivibrio</i> spp.	13	3	0
<i>Swaminathania</i> sp.	1	0	0
<i>Staphylococcus</i> spp.	28	0	0
<i>Vibrio</i> spp.	5	3	0
<i>Virgibacillus</i> spp.	7	0	0
<i>Yersinia</i> spp.	6	0	2
Cepas no identificadas	62	1	1
TOTAL	428	25	10

*Porcentaje de actividad antimicrobiana superior o igual al 60 %.

Con respecto a la actividad antifúngica, los aislados pertenecían a las especies *Bacillus vallismortis* (1 cepa), *Halomonas caseinilytica* (1 cepa), *Halomonas hydrothermalis* (1 cepa), *Halomonas ventosae* (2 cepas), *Yersinia intermedia* (2 cepas), *Marinobacter flavimaris* (1 cepa) y *Pantoea stewartii* subespecie *stewartii* (1 cepa).

En todos los casos, la identificación se hizo mediante el análisis con el programa *EzTaxon Server 2.1* de la secuencia parcial del gen del ARNr 16S hallándose un porcentaje de identidad superior al 97 % (véase el Capítulo 2).

III.4.3.1. Actividad antibacteriana

Los extractos que dieron un porcentaje de actividad antimicrobiana superior o igual al 60 %, se confirmaron manualmente mediante la repetición del ensayo en medio líquido y en medio sólido como se describe en el apartado III.4.2.5.4. Los resultados se encuentran recogidos en la Tabla 42; en dicha tabla se han resaltado con fondo gris aquellos extractos que dieron lugar a porcentajes de inhibición del 100 % al utilizar 10 μ l y que mantuvieron prácticamente dicho porcentaje al utilizar 5 μ l del mismo. Con fondo verde se resaltan los extractos que mostraron porcentajes de inhibición superiores al 60 % al utilizar 10 μ l.

En la Tabla 42 se puede observar como 7 cepas (sombreadas en gris) mostraron porcentajes de inhibición del 100 % en medio líquido de *Staphylococcus aureus* y estos se mantuvieron cuando se utilizó la concentración de extracto a la mitad. Otras 13 cepas (sombreadas en verde) resultaron también interesantes por el alto porcentaje de inhibición al que dieron lugar cuando se utilizaron 10 μ l de extracto. Además 8 de ellas también dieron lugar a halos de inhibición en medio sólido del mismo microorganismo.

Seis de estas cepas se habían identificado como especies del género *Bacillus* (M1-185, M1-113, M2-16, M3-82, M3-31 y M4-54), seis *Halomonas* spp. (M1-126, M1-111, M1-14-X, M2-15, M2-66-M y M3-41), tres *Salinivibrio* spp. (M2-78, M2-28 y M2-2-X), dos *Oceanobacillus* spp. (M3-111 y M3-109), dos *Vibrio* spp. (M2-164 y M4-26) mientras que la cepa M3-4X no pudo ser identificada.

Las cepas M3-82, M3-111, M3-31 y M4-54 presentaron también actividad frente a *Staphylococcus aureus* meticilina resistente, lo que podría indicar que producen compuestos no relacionados con los antibióticos betalactámicos.

Tabla 42. Actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus aureus* meticilina resistente de los extractos seleccionados.

CEPA	ASIGNACIÓN TAXONÓMICA	<i>Staphylococcus aureus</i>			CEPA	<i>Staphylococcus aureus</i> MR		
		ENSAYO EN MEDIO LÍQUIDO		ENSAYO EN AGAR		ENSAYO EN MEDIO LÍQUIDO		ENSAYO EN AGAR
		10 µl	5 µl	10 µl		10 µl	5 µl	10 µl
M1-126	<i>Halomonas</i> sp.	96 ^a	52	-	M1-126	13	0	-
M1-125	<i>Halomonas</i> sp.	54	52	-	M1-125	19	10	-
M1-185	<i>Bacillus</i> sp.	100	100	75C ^b	M1-185	48	38	70C
M1-111	<i>Halomonas</i> sp.	100	70	-	M1-111	36	0	-
M1-113	<i>Bacillus</i> sp.	100	34	-	M1-113	47	7	-
M1-14-X	<i>Halomonas</i> sp.	100	71	-	M1-14-X	38	9	-
M2-15	<i>Halomonas</i> sp.	97	59	-	M2-15	23	19	-
M2-164	<i>Vibrio</i> sp.	80	54	-	M2-164	0	0	-
M2-146	<i>Nesiotobacter</i> sp.	24	11	-	M2-146	5	0	-
M2-78	<i>Salinivibrio</i> sp.	100	57	-	M2-78	2	4	-
M2-16	<i>Bacillus</i> sp.	100	9	65C	M2-16	71	7	50C
M2-66-M	<i>Halomonas</i> sp.	98	62	-	M2-66-M	34	0	-
M2-28	<i>Salinivibrio</i> sp.	64	47	-	M2-28	4	0	-
M2-2-X	<i>Salinivibrio</i> sp.	66	49	-	M2-2-X	8	0	-
M3-82	<i>Bacillus</i> sp.	100	99	85C	M3-82	42	42	140T
M3-111	<i>Oceanobacillus</i> sp.	100	99	150C	M3-111	49	42	120T
M3-109	<i>Oceanobacillus</i> sp.	100	100	50C	M3-109	8	17	135T
M3-41	<i>Halomonas</i> sp.	99	70	-	M3-41	36	1	-
M3-31	<i>Bacillus</i> sp.	100	94	150C	M3-31	47	41	120T
M3-4X	Cepa no identificada	100	99	-	M3-4X	41	32	-
M4-2	<i>Halomonas</i> sp.	52	35	-	M4-2	8	0	-
M4-26	<i>Vibrio</i> sp.	80	30	60C	M4-26	6	4	-
M4-54	<i>Bacillus</i> sp.	100	100	150C	M4-54	64	52	120T
Controles					Controles			
	Penicilina G	99	97	98C	Imipenen	87	86	85C
	Anfotericina B	2	0	-	Anfotericina B	2	0	-

Staphylococcus aureus MR, *Staphylococcus aureus* meticilina resistente,

^a, porcentaje de inhibición del crecimiento según medida de DO_{600nm}; ^b, halo de inhibición en milímetros; C, halo de inhibición claro; T, halo de inhibición turbio.

En relación con la procedencia de los extractos ensayados y su actividad, las cepas del género *Bacillus* M1-185, M3-31 y M3-54 y *Oceanobacillus* M3-111 dieron lugar a extractos activos en dos de los medios empleados para su cultivo, los medios GSS y JM, mientras que el resto de las cepas sólo dieron lugar a extractos activos cuando se les cultivó en uno de los medios. Dichos medios fueron MY al 5 % (p/v) para las seis cepas del género *Halomonas* (M1-126, M1-111, M1-14-X, M2-15, M2-66-M y M3-41), Mm para los tres cepas de *Salinivibrio* (M2-78, M2-28 y M2-2-X) y las dos cepas de *Vibrio* (M2-164 y M4-26) y el medio GSS para el resto.

El factor de corrección Z del ensayo fue de $0,87 \pm 0,1$ y $0,88 \pm 0,2$ con las cepas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus aureus* meticilina resistente, respectivamente, lo que muestra la rigurosidad del ensayo, puesto que su valor se aproxima a uno (Zhang JH, 1999).

III.4.3.2. Actividad antifúngica

El ensayo de actividad antifúngica se repitió de nuevo en medio líquido y en medio sólido en aquellas cepas que mostraron un porcentaje de actividad superior al 60 % de acuerdo a como se describe en el apartado III.4.2.5.4.

En la Tabla 43 se muestran las cepas cuyos extractos presentaron un porcentaje de inhibición superior o igual al 60 % de *Aspergillus fumigatus* en medio líquido. En medio sólido ninguna cepa inhibió el crecimiento de este microorganismo.

Las cepas M4-107, M4-76 y M2-59 alcanzaron porcentajes de inhibición próximos al 100 % con 10 µl de extracto y este porcentaje no disminuyó significativamente cuando se utilizaron 5 µl del mismo. Estos aislados se identificaron como *Yersinia intermedia* y *Marinobacter flavimaris* de acuerdo con el análisis de la secuencia parcial de su gen ARNr 16S (véase el Capítulo 2). Las cepas M2-10 y M1-115-I mostraron altos porcentajes de inhibición sólo cuando se utilizaron 10µl de extracto.

Tabla 43. Actividad antifúngica frente a *Aspergillus fumigatus*.

CEPA	ASIGNACIÓN TAXONÓMICA	<i>Aspergillus fumigatus</i> ENSAYO EN MEDIO LÍQUIDO ^a	
		10 µl	5 µl
M4-107	<i>Yersinia</i> sp.	99	95
M4-76	<i>Yersinia</i> sp.	97	84
M2-59	<i>Marinobacter</i> sp.	96	89
M2-10	<i>Halomonas</i> sp.	94	60
M1-115-I	<i>Halomonas</i> sp.	85	58
M4-104	<i>Pantoea</i> sp.	36	19
M2-93	<i>Bacillus</i> sp.	35	18
M1-2x	Cepa no identificada	22	0
Control			
Anfotericina B		1	0

^a, porcentaje de inhibición del crecimiento según medida de fluorescencia a 615 nm y 590 nm de emisión y excitación respectivamente.

Se han resaltado con fondo gris aquellos extractos que dieron lugar a porcentajes de inhibición próximos al 100 % al utilizar 10 µl y que mantuvieron altos porcentajes de inhibición al utilizar 5 µl del mismo. Con fondo verde se resaltan los extractos que mostraron porcentajes de inhibición superiores al 60 % al utilizar 10 µl.

Entre las bacterias analizadas, sólo la cepa M4-107 identificada como *Yersinia* presentó actividad en tres de los cuatro medios de cultivo utilizados (LB, M9 y MY al 5 %, p/v) (véase el apartado III.4.2.2). La cepa M2-93 de *Bacillus* dio lugar a extractos activos cuando se utilizaron los medios GSS y LM. El resto sólo fueron activos cuando se cultivaron en uno de los cuatro medios utilizados, que fueron ASG-Fe para las dos cepas identificadas como especies de *Halomonas* (M2-10 y M1-115-X), M9 para la cepa M4-76 identificada como una especie de *Yersinia*, HS para la cepa M2-59 identificada como una especie de *Marinobacter*, LB para la cepa M4-104 identificada como una especie de *Pantoea* y MaB para la cepa no identificada filogenéticamente M1-2X (véase la Tabla 37).

La fiabilidad del ensayo estuvo representada mediante un factor de corrección Z de $0,92 \pm 0,2$.

III.4.4. DISCUSIÓN

Los antibióticos más ampliamente utilizados en clínica son metabolitos producidos por bacterias o sus derivados obtenidos de especies fácilmente cultivables del phylum *Actinobacteria*, de *Pseudomonas* y *Bacilli*. Sin embargo, los metabolitos bacterianos no se están incluyendo en los programas de búsqueda de antibióticos debido a las altas frecuencias de redescubrimiento y a la baja probabilidad de hallazgo de nuevas moléculas.

Respecto al potencial de las aproximaciones de la metagenómica y de la recombinación genética en la investigación de antibióticos, pensamos que las aproximaciones basadas en el cultivo de microorganismos siguen siendo esenciales en el descubrimiento de antibióticos ya que, por el momento, sólo en unos pocos casos se han podido extraer del medio ambiente los “clusters” de genes de metabolitos secundarios de microorganismos desconocidos, clonar grandes insertos en genotecas y expresarlos heterológamente usando técnicas de biología molecular (Brady, 2007; Craig y col., 2009; King y col., 2009). Sin embargo las células vivas aisladas en un cultivo puro pueden manipularse fisiológica y genéticamente y puede aumentarse la escala de producción. Así pues, a corto plazo, las investigaciones basadas en el cultivo siguen siendo cruciales en el descubrimiento y producción de antibióticos (Nichols, 2007; Alain y Querellou, 2009; Zengler, 2009).

En estos momentos es urgente el hallazgo de nuevos antimicrobianos que sean capaces de combatir enfermedades infecciosas emergentes, reemergentes y aquellas que son producidas por cepas resistentes a los compuestos que actualmente existen en el mercado. Por ello consideramos que la búsqueda de nuevos productos a partir de microorganismos no explorados hasta el momento puede ser una alternativa válida.

En nuestro trabajo, hemos aislado 428 cepas bacterianas del Humedal de Ajauque y Rambla Salada, que han sido estudiadas entre otros fines con el propósito de hallar posibles nuevas moléculas con actividad antimicrobiana. Debido a que la expresión de determinadas rutas biosintéticas dependen de las condiciones de ensayo utilizadas, las cepas se cultivaron en cuatro medios de cultivo distintos, variando las condiciones nutricionales y aumentando así la probabilidad de obtener un resultado positivo (Bode y col., 2002; Bills y col., 2004); esto nos permitirá, además, conocer mejor cuáles son las condiciones más favorables para la producción de la molécula antibiótica.

Los resultados de este trabajo muestran que alrededor de 8,2 % de las cepas ensayadas producen extractos activos frente a bacterias u hongos. Como se recoge en otros trabajos de Mendoza (1997), Cárdenas (1998), Pérez (1998) y Coya (1999), la actividad antibacteriana de nuestras cepas resultó mayor que la actividad antifúngica; concretamente el 5,8 % de los aislados fueron activos frente a *Staphylococcus aureus* y 2,3 % frente a *Aspergillus fumigatus*.

Los aislados con actividades antimicrobianas fueron identificados como especies de los géneros *Bacillus*, *Halomonas*, *Marinobacter*, *Oceanobacillus* *Vibrio* y *Yersinia*, lo que muestra una gran diversidad microbiana con potencial actividad antibacteriana y antifúngica. Se trata de bacterias halófilas o halotolerantes que, al igual que otros microorganismos extremófilos, han sido consideradas como un grupo de organismos con un enorme potencial biotecnológico (Mellado y Ventosa, 2003; Ventosa, 2004; 2006; 2008; Castillo y col., 2001) debido a sus características metabólicas que facilitan su explotación comercial como son su carácter eurihalino, su fácil cultivo y manipulación en el laboratorio, y su falta de patogenicidad.

Un resultado interesante ha sido que cinco de las bacterias ensayadas presentaron un porcentaje de inhibición superior al 60 % frente a *Aspergillus fumigatus*. Este hongo filamentoso causa importantes enfermedades en individuos inmunodeprimidos (Kradin y col., 2008; McCormick y col., 2010) y además, es responsable de diversas enfermedades en plantas y árboles y de frecuentes contaminaciones de alimentos ricos en almidón como el pan y la patata (Wilson, 1971).

En el estudio realizado por Ortega-Morales y colaboradores (2009), la actividad antifúngica detectada en bacterias marinas fue mayor en medios cuya composición era principalmente de sales marinas lo cual puede deberse a que sean mejores condiciones para la síntesis de moléculas bioactivas. Además numerosos investigadores han puesto de manifiesto que las bacterias marinas modulan la síntesis de metabolitos extracelulares en función de parámetros como la temperatura, composición del medio, salinidad y el tiempo de incubación (Yakimov y col., 1997; Alexeeva y col., 2003). En nuestro trabajo, en las cepas ensayadas hemos detectado actividad frente a *Aspergillus fumigatus* al emplear medios con distinto contenido en sales como fueron los medios LB, M9, MY al 5 % (p/v), MaB, Hs, ASG-Fe, GSS y LM.

Destaca el hecho de que 20 de los microorganismos estudiados produzcan extractos que inhiben en más del 60 % el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y cuatro de ellos además inhiban la cepa meticilina resistente ya que se trata de uno de los principales agentes etiológicos de infecciones tanto nosocomiales como comunitarias que ha adquirido una elevada resistencia a diferentes antibióticos (De Lencastre y col., 2007). Las infecciones producidas por *Staphylococcus aureus* son muy frecuentes en pacientes pediátricos y sus opciones de tratamiento son muy limitadas (Isnansetyo y Kamei 2003, Depardieu y col., 2007). Las cepas meticilina resistente presentan una alta resistencia cruzada a prácticamente todos los antibióticos β -lactámicos y constituyen más del 50% de todos los aislados clínicos (Styers y col., 2006).

Ahmed y colaboradores (2008) observaron que las especies del género *Bacillus* eran únicamente activas frente a bacterias Gram positivas. En nuestro trabajo, la mayoría de las

cepas con actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes pertenecían al género *Bacillus*, hecho que también se recoge en diversos trabajos realizados con bacterias marinas (Holmstrom y Kjelleberg 1999;).

Las bacterias Gram positivas representan una fuente potencial de sustancias antibióticas como se puede constatar en ésta y otras investigaciones (Nair y Simidu, 1987; Cárdenas, 1998; Pérez, 1998; Lugioyo y col., 2003; León y col., 2010).

Por otro lado, de las 428 cepas ensayadas, ningún extracto presentó actividad frente a las bacterias Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*; estos mismos resultados se recogen en diversos estudios sobre microorganismos marinos en donde la actividad encontrada fue mayor frente a patógenos Gram positivos (Rosenfeld y ZoBell 1947, Saadoun y col., 1999 y Basilio y col., 2003).

Resumiendo, las especies de *Bacillus* y *Halomonas* fueron principalmente las que dieron lugar a mayor número de extractos con actividad antimicrobiana. Respecto al primer caso, resultados similares se recogen en diferentes trabajos (Baam y col., 1966; Cárdenas (1998); Pérez (1998) y Coya (1999). De hecho, el género *Bacillus* constituye uno de los grupos de microorganismos de alto potencial biomédico (Fenical y Jensen, 1993).

Respecto al género *Halomonas*, no hay referencias bibliográficas que indiquen la presencia de sustancias activas en dicho género, lo cual indica que nos hallamos frente a los primeros aislados con interés en este importante campo.

Nuestros resultados relativos a la actividad antifúngica resultan de enorme interés puesto que los trabajos relacionados con el halofilismo, están en su mayoría relacionados con la detección de bacterias productoras de sustancias antibacterianas (Dopazo y col., 1988; Fábregas y col., 1991; Lodeiros y col., 1991). Sin embargo, pocos estudios se han realizado para la detección de nuevas bacterias con actividad antifúngica (Fábregas y col., 1991; Pérez, 1998).

IV. CONCLUSIONES

Como hemos descrito en los objetivos de esta memoria, la presente tesis doctoral se ha realizado para describir la diversidad procariota de una importante región de la provincia de Murcia, el Humedal de Ajauque y Rambla Salada, donde nunca se había realizando antes un estudio de tipo microbiológico. Partiendo de esta premisa, este estudio tiene su complemento indispensable en otro trabajo de investigación, la tesis doctoral de la licenciada Nahid Oueriaghli, cuya defensa se hará en breve.

De la presente tesis doctoral hemos extraído las conclusiones que enumeramos a continuación pero como prólogo a las mismas hemos de exponer que el resultado más importante que se desprende de la comparación de ambos trabajos de tesis doctoral es que la microbiota que logramos cultivar a partir de las muestras tomadas en Rambla Salada es sustancialmente diferente de la que se detecta por técnicas moleculares, donde los grupos predominantes parecen ser las especies pertenecientes a los *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Planctomycetes* (N.O. comunicación personal). Nuestros resultados están en consonancia con los obtenidos por otros autores en otros hábitats salinos pero nunca hasta la fecha se habían hecho ambos tipos de estudios de forma simultánea; es decir estudiando las mismas muestras por técnicas clásicas y técnicas moleculares, en un amplio estudio que incluyera muestreos locales y estacionales de un hábitat salino donde coexisten suelos, aguas y sedimentos de distinta salinidad. Por todo ello consideramos que nuestro estudio es innovador y sus resultados significativos para el área del halofilismo.

Conclusiones

1. En las distintas estaciones de muestreo que hemos analizado en el Humedal de Ajauque y Rambla Salada se obtienen elevados recuentos de bacterias totales empleando medios ricos en nutrientes con concentraciones de sales comprendidas entre el 0,5 y el 20% (p/v) de sales. El recuento de arqueas halófilas y su posterior aislamiento sólo es posible si se emplea una concentración de sales del 30% (p/v) y una temperatura de incubación próxima a los 40 °C.
2. Los resultados de los recuentos apenas si son afectados por la época del muestreo y el lugar concreto de la toma de muestra por lo que en general podemos concluir que en todas las zonas analizadas de Rambla Salada existe una abundante población de procariotas mesófilos, heterótrofos y aerobios, que incluyen tanto bacterias como arqueas.
3. El aislamiento de cepas utilizando como único criterio la selección de colonias lo más diversas posible ha permitido obtener una amplia colección de procariotas (477 cepas) con una gran diversidad de especies tanto bacterianas como de arqueas. Así entre ellas, y de acuerdo con la secuencia parcial del gen del ARNr 16S, hemos

- encontrado al menos representantes de 120 especies conocidas, incluidas en 45 géneros, 21 familias, 15 órdenes, 7 clases y 5 phyla.
4. La colección de bacterias analizadas en este estudio (428 cepas) incluye cepas halotolerantes, halófilas débiles y moderadas pero ninguna cepa halófila extrema, destacando la ausencia de los taxa que alojan a estas últimas (*Salinibacter*, *Salicola*). El grupo más abundante fue el de las bacterias halófilas moderadas que representaron el 60 % de las cepas bacterianas aisladas.
 5. Todas las arqueas aisladas en este trabajo (49 cepas) eran microorganismos halófilos extremos.
 6. La mayoría de las bacterias aisladas en Rambla Salada pertenecen al phylum *Proteobacteria*, clase *Gammaproteobacteria*, y al phylum *Firmicutes*, clase *Bacilli*, destacando las especies del género *Halomonas*, dentro de la familia *Halomonadaceae* que supusieron más del 30% de los aislados. Por ello podemos afirmar que *Halomonas* es la bacteria cultivable que con más frecuencia se aísla en Rambla Salada en las condiciones empleadas en este trabajo.
 7. Respecto a la arqueas sólo hemos podido cultivar representantes del phylum *Euryarchaeota*, y todos ellos fueron miembros de la familia *Halobacteriaceae*.
 8. En el Humedal de Ajauque y Rambla Salada hemos descubierto hasta el momento cinco nuevas especies de procariotas, cuatro bacterias para las cuales proponemos los nombres de *Halomonas lipolytica*, *Halomonas proteolytica*, *Marinobacter halophilus* y *Pseudoalteromonas salina* y una arquea que constituiría un nuevo género y especie con el nombre de *Saliniarchaeum ramblicola*.
 9. El análisis de la riqueza y abundancia de especies del Humedal de Ajauque y Rambla Salada realizado mediante el programa DOTUR pone de manifiesto la elevada diversidad de este ambiente. Así mismo hemos podido comprobar que el número de aislados que se han analizado en este trabajo representan perfectamente tal diversidad.
 10. Entre las cepas bacterianas aisladas del Humedal de Ajauque y Rambla Salada existe un número significativo (20 cepas con actividad antibiótica y 5 cepas con actividad antifúngica) de posibles productoras de nuevas sustancias con actividad antimicrobiana entre las que destacan las identificadas como especies de *Halomonas* y *Bacillus*. Por ello concluimos que la búsqueda de nuevos productos bioactivos entre los procariotas que habitan ambientes inexplorados en este sentido, como lo son los hábitats hipersalinos, puede tener un gran interés científico e industrial.

V. BIBLIOGRAFÍA

- Achtman, M., Wagner, M. (2008).** Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat Rev Microbiol* **6**, 431-440.
- Ahmed, N., Uzair, B., Ayaz, S., Ahmed, V.U. (2008).** Antibacterial activity of marine bacteria from Arabian Sea of Pakistan. *The Internet Journal of Microbiology* **4**.
- Akagawa-Matsushita, M., Matsuo, M., Koga, Y., Yamasato, K. (1992).** *Alteromonas atlantica* sp. nov. and *Alteromonas carrageenovora* sp. nov., bacteria that decompose algal polysaccharides. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 621-627.
- Akpa, E., Jacques, P., Wathélet, B., Paquot, M., Fuchs, R., Budzikiewicz, H., Thonart, P. (2001).** Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **91-93**, 551-561.
- Al-Zereini, W., Fotso Fondja Yao, C. B., Laatsch, H., Anke, H. (2010).** ChemInform Abstract: Aqabamycins A-G: Novel Nitro Maleimides from a Marine *Vibrio* Species. Part 1. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activities. *ChemInform* **41**.
- Alain, K., Querellou, J. (2009).** Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles* **13**, 583-594.
- Alanis, A. J. (2005).** Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research* **36**, 697-705.
- Alexeeva, S., Hellingwerf, K. J. Teixeira de Mattos, M. J. (2003).** Requirement of ArcA for Redox Regulation in *Escherichia coli* under Microaerobic but Not Anaerobic or Aerobic Conditions. *J Bacteriol* **185**, 204-209.
- Aller, J. Y., Kemp, P. F. (2008).** Are *Archaea* inherently less diverse than *Bacteria* in the same environments? *FEMS Microbiology Ecology* **65**, 74-87.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R. Stahl, D. A. (1990).** Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* **56**, 1919-1925.
- Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1995).** Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**, 143-169.
- Anan'ina, L., Plotnikova, E., Gavrish, E., Demakov, V., Evtushenko, L. (2007).** *Salinicola socius*; gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a naphthalene-utilizing microbial association. *Microbiology* **76**, 324-330.

Anand, T. P., Bhat, A. W., Shouche, Y. S., Roy, U., Siddharth, J., Sarma, S. P. (2006). Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. *Microbiological Research* **161**, 252-262.

Anton, J., Oren, A., Benloch, S., Rodríguez-Valera, F., Amann, R., Rosselló-Mora, R. (2002). *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the *Bacteria* from saltern crystallizer ponds. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 485-491.

Antón, J., Rosselló-Mora, R., Rodríguez-Valera, F., Amann, R. (2000). Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3052-3057.

Antón, J., Peña, A., Santos, F., Martínez-García, M., Schmitt-Kopplin, P., Rosselló-Mora, R. (2008). Distribution, abundance and diversity of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter rubber*. *Saline Systems* **4**, 15.

Arahal, D. R., Castillo, A. M., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Ventosa, A. (2002). Proposal of *Cobetia marina* gen. nov., comb. nov., within the Family *Halomonadaceae*, to include the species *Halomonas marina*. *Systematic and Applied Microbiology* **25**, 207-211.

Arahal, D. R., Vreeland, R. H., Litchfield, C. D., Mormile, M. R., Tindall, B. J., Oren, A., Bejar, V., Quesada, E., Ventosa, A. (2007). Recommended minimal standards for describing new taxa of the family *Halomonadaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2436-2446.

Arahal, D. R., Ventosa, A. (2006). The family *Halomonadaceae*. *In* The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria Volume 6 3rd edition Edited by: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E New York: Springer, 811-835.

Argandoña, M., Béjar, V., Quesada, E., del Moral, A. (2001). Genome size and physical map of *Halomonas maura*, a new moderately halophilic microorganism. *International conference on halophilic microorganisms* Comunicación personal.

Arias, S., del Moral A., Ferrer M. R., Tallon R., Quesada E., Bejar, V. (2003). Mauran, an exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura*, with a novel composition and interesting properties for biotechnology. *Extremophiles* **7**, 319-326.

Auguet, J.-C., Barberan, A., Casamayor, E.O. (2009). Global ecological patterns in uncultured *Archaea*. *ISME J* **4**, 182-190.

Azam, F., Fenchel, T., Field, J.g., Meyer-Reil, R.A., Thingstad, F. (1983). The cycling of organic matter by bacterioplanktonic pelagic marine systems: Microenvironmental considerations. *In* M. J. R. Fashman ed., *Flows of Energy and Materials in Marine*

Ecosystems: Theory and Practice. NATO Conference Series 4, Marine Sciences. Plenum Press, New York, pp. 345-360.

Baam, R. B., Gandhi, N. M., Freitas, Y. M. (1966). Antibiotic activity of marine microorganisms. *Helgoland Marine Research* **13**, 181-187.

Baati, H., Guermazi, S., Amdouni, R., Gharsallah, N., Sghir, A., Ammar, E. (2008). Prokaryotic diversity of a Tunisian multipond solar saltern. *Extremophiles* **12**, 505-518.

Bailey, P., Boon, P., Morris, K. (2002). Australian biodiversity salt sensitivity database. land water Australia. <http://www.rivers.gov.au/research/contaminants/saltsen.htm>.

Baird-Parker, A. C. (1963). A Classification of *Micrococci* and *Staphylococci* based on physiological and biochemical tests. *J Gen Microbiol* **30**, 409-427.

Balch, W., Fox, G., Magrum, L., Woese, C., Wolfe, R. (1979). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol Mol Biol Rev* **43**, 260-296.

Barrit, A., Thornsberry, C. (1980). Susceptibility testing: Diffusion test procedures. *In: Manual of Clinical Microbiology*. Lennette, Haussler and Truant (eds.) A.S.M., Washington, D.C.

Basilio, A., González, I., Vicente, M. F., Gorrochategui, J., Cabello, A., González, A., Genilloud, O. (2003). Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *Journal of Applied Microbiology* **95**, 814-823.

Bauer, A. W., Serris, J.C., Kirby, W.M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardised 7single disc method. *Am J Clin Path* **45**, 493-496.

Baumann, L., Baumann, P., Mandel, M., Allen, R. D. (1972). Taxonomy of Aerobic Marine *Eubacteria*. *J Bacteriol* **110**, 402-429.

Bowman, J., McMeekin, TA. (2005). Order X. *Alteromonadales* ord. nov. *In: D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley and G. M. Garroty (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol. 2 (The Proteobacteria), part B (The Gammaproteobacteria)*, Springer, New York, p. 443.

Begon, M., Mortimer, M. (1986). Population ecology: a unified study of animals and plants, 2nd Blackwell. A general textbook on population biology.

Béjar, V., Llamas, I., Calvo, C., Quesada, E. (1998). Characterization of exopolysaccharides produced by 19 halophilic strains of the species *Halomonas eurihalina*. *Journal of Biotechnology* **61**, 135-141.

Ben-Amotz, A., Grunwald, T. (1981). Osmoregulation in the halotolerant alga *Asteromonas gracilis*. *Plant Physiol* **67**, 613-616.

Ben Ali Gam, Z., Abdelkafi, S., Casalot, L., Tholozan, J. L., Oueslati, R., Labat, M. (2007). *Modicisalibacter tunisiensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic, moderately halophilic bacterium isolated from an oilfield-water injection sample, and emended description of the family *Halomonadaceae* Franzmann et al. 1989 emend Dobson and Franzmann 1996 emend. Ntougias et al. 2007. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 2307-2313.

Benloch, S., Acinas, S. G., Anton, J., López-López, A., Luz, S. P., Rodríguez-Valera, F. (2001). Archaeal biodiversity in crystallizer ponds from a solar saltern: culture versus PCR. *Microb Ecol* **41**, 12-19.

Benloch, S., López-López, A., Casamayor, E. O., y otros autores (2002). Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environmental Microbiology* **4**, 349-360.

Bernan, V. S., Greenstein, M., Maiese, W. M. (1997). Marine microorganisms as a source of new natural products. In *Advances in Applied Microbiology*, pp. 57-90. Edited by L. N. Saul I. L. Allen: Academic Press.

Bills, G. F., Christensen, M., Powell, M., Thorn, G. (2004). Saprobic soil fungi. In: Mueller, G., Bills, G.F. and Foster, M.S. (eds.), *Biodiversity of Fungi, Inventory and Monitoring Methods*. Oxford: Elsevier Academic Press, pp. 271-302.

Bills, G. F., Platas, G., Overy, D. P., y otros autores (2009). Discovery of the parnafungins, antifungal metabolites that inhibit mRNA polyadenylation, from the *Fusarium larvarum* complex and other *Hypocrealean* fungi. *Mycologia* **101**, 449-472.

Bitzer, J., Grosse, T., Wang, L., Lang, S., Beil, W., Zeeck, A. (2006). New aminophenoxazinones from a marine *Halomonas* sp.: fermentation, structure elucidation, and biological activity. *ChemInform* **37**, no-no.

Blunt, J. W., Copp, B. R., Munro, M. H. G., Northcote, P. T., Prinsep, M. R. (2004). Marine natural products. *Natural Product Reports* **21**, 1-49.

Bodaker, I., Sharon, I., Suzuki, M. T., y otros autores (2009). Comparative community genomics in the Dead Sea: an increasingly extreme environment. *ISME J* **4**, 399-407.

Bode, H. B., Bethe, B., Höfs, R., Zeek, A. (2002). Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem* **3**, 619-627.

- Bollmann, A., Lewis, K., Epstein, S. S. (2007).** Incubation of environmental samples in a diffusion chamber increases the diversity of recovered isolates. *Appl Environ Microbiol* **73**, 6386-6390.
- Boone, D. R., Baker, C.C. (2001).** Genus VI. *Methanosalsum* gen. nov. In: D.R. Boone, R.W. Castenholz y G.M. Garrity (eds): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol. 1 (The *Archaea* and the deeply branching and phototrophic Bacteria), Springer-Verlag, New York, pp. 287-289.
- Bowman, J. P., McCammon, S. A., Brown, J. L., McMeekin, T. A. (1998).** *Glaciecocola punicea* gen. nov., sp. nov. and *Glaciecocola pallidula* gen. nov., sp. nov.: psychrophilic bacteria from Antarctic sea-ice habitats. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**, 1213-1222.
- Brady, S. F. (2007).** Construction of soil environmental DNA cosmid libraries and screening for clones that produce biologically active small molecules. *Nat Protoc* **2**, 1297-1305.
- Brock, T. D. (1979).** Ecology of saline lakes. In Strategies of microbial life in extreme environments, ed M Shilo, 29-47 Berlin: Dahlem Konferenzen.
- Brown, M. V., Bowman, J. P. (2001).** A molecular phylogenetic survey of sea-ice microbial communities (SIMCO). *FEMS Microbiology Ecology* **35**, 267-275.
- Bruns, A., Nubel, U., Cypionka, H., Overmann, J. (2003).** Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1980-1989.
- Buchalo, A. S., Nevo, E., Wasser, S. P., Oren, A., Molitoris, H. P. (1998).** Fungal life in the extremely hypersaline water of the Dead Sea: first records. *Proc Biol Sci* **265**, 1461-1465.
- Buchalo, A. S., Wasser, S. P., Molitoris, H. P., Volz, P. A., Kurchenko, I., Lauer, I., Rawal, B. (1999).** Species diversity and biology of fungal life in the extremely hypersaline water of the Dead Sea. In: SP Wasser (ed) Evolutionary Theory and Processes: Modern Perspectives Papers in Honour of Eviatar Nevo Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 293-300.
- Buchalo, A. S., Nevo, E., Wasser, S. P., Oren, A., Molitoris, H. P., Volz, P. A. (2000).** Fungi discovered in the Dead Sea. *Mycol Res News* **104**, 132-133.
- Buchan, A., Newell, S. Y., Butler, M., Biers, E. J., Hollibaugh, J. T., Moran, M. A. (2003).** Dynamics of bacteria and fungal communities on decaying salt marsh grass. *Appl Environ Microbiol* **69**, 6676-6687.

Buckley, D. H., Schmidt, T. M. (2003). Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environmental Microbiology* **5**, 441-452.

Burgess, J. G., Jordan, E. M., Bregu, M., Mearns-Spragg, A., Boyd, K. G. (1999). Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *In Progress in Industrial Microbiology*, pp. 27-32. Edited by J. T. J. G. B. R. Osinga R. H. Wijffels: Elsevier.

Burkholder, P. R., Pfister, R. M., Leitz, F. H. (1966). Production of a pyrrole antibiotic by a marine bacterium. *Appl Environ Microbiol* **14**, 649-653.

Burns, D. G., Camakarlis, H. M., Janssen, P. H., Dyall-Smith, M. L. (2004). combined use of cultivation-dependent and cultivation-independent methods indicates that members of most *haloarchaeal* groups in an Australian crystallizer pond are cultivable. *Appl Environ Microbiol* **70**, 5258-5265.

Burns, D. G., Janssen, P. H., Itoh, T., Minegishi, H., Usami, R., Kamekura, M., Dyall-Smith, M. L. (2010). *Natronomonas moolapensis* sp. nov., non-alkaliphilic isolates recovered from a solar saltern crystallizer pond, and emended description of the genus *Natronomonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 1173-1176.

Butcher, R. (1959). An introductory account of the smaller algae of britishcoastal waters. Part I: introduction and chlorophyceae london: ministry for agriculture, fisheries and food, fishery investigations, Series IV. Her Majesty's Stationery Office.

Butinar, L., Sonjak, S., Zalar, P., Plemenitaš, A., Gunde-Cimerman, N. (2005). *Melanized halophilic* fungi are eukaryotic members of microbial communities in hypersaline waters of solar salterns. *Botanica Marina* **48**, 73-79.

Button, D. K., Schut, F., Quang, P., Martin, R., Robertson, B. R. (1993). Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: Theory, procedures, and initial results. *Appl Environ Microbiol* **59**, 881-891.

Callies, E., Mannheim, W. (1978). Classification of the *Flavobacterium-Cytophaga* Complex on the basis of respiratory quinones and fumarate respiration. *Int J Syst Bacteriol* **28**, 14-19.

Calvo, C., García de la Paz, A. M., Martínez-Checa, F., Caba, M. A. (1994). Behaviour of two *D. halophila* bacteriophages with respect to salt concentrations and other environmental factors. *Toxicol Environ Chem* **43**, 85-93.

Cambon-Bonavita, M. A., Nadalig, T., Roussel, E., Delage, E., Duperron, S., Caprais, J. C., Boetius, A., Sibuet, M. (2009). Diversity and distribution of methane-oxidizing microbial communities associated with different faunal assemblages in a giant pockmark of

the Gabon continental margin. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **56**, 2248-2258.

Cantrell, S. A., Casillas-Martínez, L., Molina, M. (2006). Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. *Mycological Research* **110**, 962-970.

Cantrell, S. A., Hanlin, R. T., Emiliano, A. (2007). *Periconia variicolor* sp. nov., a new species from Puerto Rico. *Mycologia* **99**, 482-487.

Cantrell, S. A., Baez-Félix, C. (2010). Fungal molecular diversity of a Puerto Rican subtropical hypersaline microbial mat. *Fungal Ecology* **3**, 402-405.

Cárdenas, D. (1998). Bacterioplankton de las aguas oceánicas al norte de Cuba en la época de invierno: distribución y taxonomía. Tesis para optar por el Título de Licenciado en Microbiología. Facultad de Biología.

Carte, B. K. (1993). Marine natural products as a source of novel pharmacological agents. *Current Opinion in Biotechnology* **4**, 275-279.

Castillo, I., Lodeiros, C., Núñez, M., Isabel, C. (2001). Evaluación in vitro de sustancias antibacterianas producidas por bacterias aisladas de diferentes organismos marinos. *Revista de Biología Tropical* **49**, 1213-1221.

Cetina, A., Matos, A., Garma, G., Barba, H., Vázquez, R., Zepeda-Rodríguez, A., Jay, D., Monteón, V., López-A, R. (2010). Antimicrobial activity of marine bacteria isolated from Gulf of Mexico. *Rev peru biol* **17**, 231-235.

Chao, A. (1984). Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics* **11**.

Chao, A. Lee, S. (1992). Estimating the number of classes via sample coverage. *Journal of the American Statistical Association* **87**, 210-217.

Chao, A., Ma, M.C., Yang, K. (1993). Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. *Biometrics* **4**, 783-791.

Chelo, I. M., Ze-Ze, L., Tenreiro, R. (2007). Congruence of evolutionary relationships inside the *Leuconostoc-Oenococcus-Weissella* clade assessed by phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene, dnaA, gyrB, rpoC and dnaK. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 276-286.

Cheng, L., Qiu, T.-L., Yin, X.-B., Wu, X.-L., Hu, G.-Q., Deng, Y., Zhang, H. (2007). *Methermicoccus shengliensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, methylotrophic

methanogen isolated from oil-production water, and proposal of *Methermicocaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 2964-2969.

Cho, J., Tiedje, J. (2000). Biogeography and degree of endemicity of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. *Appl Environ Microbiol* **66**, 5448 - 5456.

Chun, J., Lee, J.-H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K., Lim, Y.-W. (2007). EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2259-2261.

Coll, M., Piroddi, C., Steenbeek, J., y otros autores (2010). The biodiversity of the mediterranean sea: estimates, patterns, and threats. *PLoS ONE* **5**, e11842.

Collado, J., González, A., Platas, G., Stchiegel, A., Guarro, J., Peláez, F. (2002). *Monosporascus ibericus* sp. nov., an endophytic ascomycete from plants growing on saline soils in the Ebro Delta (Spain). *Mycol Res* **106**, 118-127.

Collado, J., Platas, G., Paulus, B., Bills, G. F. (2007). High-throughput culturing of fungi from plant litter by a dilution-to-extinction technique. *FEMS Microbiol Ecol* **60**, 521-533.

Colwell, R. K., Coddington, J. A. (1994). Estimating Terrestrial Biodiversity through Extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* **345**, 101-118.

Colwell, R. R. (1968). Polyphasic taxonomy of bacteria. . Symposium on taxonomic studies of microorganisms by instrumental analysis of their components and metabolites International conference on culture collections, Tokyo, Japan ICRO/UNESCO, University Park Press, Baltimore, Md.

Connon, S. A., Giovannoni, S. J. (2002). High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3878-3885.

Coronado, M.-J., Vargas, C., Kunte, H. J., Galinski, E. A., Ventosa, A., Nieto, J. J. (1995). Influence of salt concentration on the susceptibility of moderately halophilic bacteria to antimicrobials and its potential use for genetic transfer studies. *Current Microbiology* **31**, 365-371.

Cottrell, M., Kirchman, D.L. (2003). Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the *Delaware estuary*. Waco, TX, ETATS-UNIS: *American Society of Limnology and Oceanography*.

Cowan, S. T. Steel., K.J. (1993). Manual for the identification of medical bacteria, 3rd edition. Cambridge University Press. Cambridge.

- Cowell, C. (1995).** Presettlement piedmont forests: patterns of composition and disturbance in central georgia. *Annals of the Association of American Geographers* **85**, 65-83.
- Coya, L. (1999).** Bacterioplancton del archipiélago “Los Jardines de la Reina” al sur de Cuba, en la época de verano: distribución, taxonomía y actividad antimicrobiana. Tesis para optar por el Título de Licenciado en Microbiología. Facultad de Biología.
- Craig, J. W., Chang, F.Y., Brady, S.F. (2009).** Natural products from environmental DNA hosted in *Ralstonia metallidurans*. *ACS Chem Biol* **4**, 23-28.
- Crupper, S., Iandolo, J. (1996).** Purification and partial characterization of a novel antibacterial agent (Bac1829) Produced by *Staphylococcus aureus* KSI1829. *Appl Environ Microbiol* **62**, 3171-3175.
- Csonka, L. N., Hanson, A. D. (1991).** Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annual Review of Microbiology* **45**, 569-606.
- Cui, H.-L., Yang, X., Gao, X. Xu, X.-W. (2010).** *Halobellus clavatus* gen. nov., sp. nov. and *Halorientalis regularis* gen. nov., sp. nov., two new members of the family Halobacteriaceae. *Int J Syst Evol Microbiol*, ijs.0.025841-025840.
- Curtis, T. P., Sloan, W. T., Scannell, J. W. (2002).** Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc Nat Acad Sci USA* **99**, 10494–10499.
- D'onofrio, A., Crawford, J. M., Stewart, E. J., Witt, K., Gavrish, E., Epstein, S., Clardy, J., Lewis, K. (2010).** Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria. *Chemistry and Biology* **17**, 254-264.
- Danovaro, R., Company, J. B., Corinaldesi, C., y otros autores (2010).** Deep-Sea biodiversity in the mediterranean sea: the known, the unknown, and the unknowable. *PLoS ONE* **5**, e11832.
- DasSarma, P., Coker, J.A., Huse, V., DasSarma, S. (2010).** Halophiles, industrial applications. In *Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation and cell technology* Edited by: Michael C Flickinger John Wiley Sons, Inc.
- Davis, K. E. R., Joseph, S. J., Janssen, P. H. (2005).** Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* **71**, 826-834.
- de la Haba, R. R., Sánchez-Porro, C., Márquez, M. C., Ventosa, A. (2011).** Taxonomy of Halophiles In: *Extremophiles: Halophiles Part 3* Koki Horikoshi (ed), *Extremophiles handbook*, DOI 101007/978-4-431-53898-1_31 Springer

- de Lencastre, H., Oliveira, D., Tomasz, A. (2007).** Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. *Current Opinion in Microbiology* **10**, 428-435.
- de Nys, R., Kumar, N., Sharara, K. A., Srinivasan, S., Ball, G., Kjelleberg, S. (2001).** A new metabolite from the marine bacterium *Vibrio angustum* S14. *Journal of Natural Products* **64**, 531-532.
- Deguchi, S., Tsudome, M., Shen, Y., Konishi, S., Tsuji, K., Ito, S., Horisoshi, K. (2007).** Preparation and characterisation of nanofibrous cellulose plate as a new solid support for microbial culture. *Soft Matter* **3**, 1170-1175.
- DeLong, E. F., Wu, K. Y., Prezelin, B. B., Jovine, R. V. M. (1994).** High abundance of Archaea in Antarctic marine picoplankton. *Nature* **371**, 695-697.
- DeLong, E. F. (2005).** Microbial community genomics in the ocean. *Nat Rev Micro* **3**, 459-469.
- Depardieu, F., Podglajen, I., Leclercq, R., Collatz, E., Courvalin, P. (2007).** Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin Microbiol Rev* **20**, 79-114.
- Dias, B., Weimer, B. (1998).** Purification and Characterization of L-Methionine gamma - Lyase from *Brevibacterium linens* BL2. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3327-3331.
- Dopazo, C. P., Lemos, M. L., Lodeiros, C., Bolinches, J., Barja, J. L., Toranzo, A. E. (1988).** Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *Journal of Applied Microbiology* **65**, 97-101.
- Dortch, Q., Packard, T. T. (1989).** Differences in biomass structure between oligotrophic and eutrophic marine ecosystems. *Deep Sea Research Part A Oceanographic Research Papers* **36**, 223-240.
- Dunal, F. (1938).** Extrait d'un mémoire sur les algues qui colorent en rouge certains eaux des marais salants méditerranéens. *Ann Sc Nat Bot 2 Sér* **9**, 172.
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (2007).** *Proteobacteria*: Gamma Subclass. In: *The Prokaryotes. A handbook of the Biology of Bacteria*. vol. 6, Springer.
- Dykhuisen, D. E., Green, L. (1991).** Recombination in *Escherichia coli* and the definition of biological species. *J Bacteriol* **173**, 7257-7268.

- Eichorst, S. A., Breznak, J. A., Schmidt, T. M. (2007).** Isolation and characterization of soil bacteria that define *Teniglobus* gen. nov., in the phylum *Acidobacteria*. . *Appl Environ Microbiol* **73**, 2708-2717.
- Ekborg, N. A., Gonzalez, J. M., Howard, M. B., Taylor, L. E., Hutcheson, S. W., Weiner, R. M. (2005).** *Saccharophagus degradans* gen. nov., sp. nov., a versatile marine degrader of complex polysaccharides. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 1545-1549.
- Elshahed, M. S., Najar, F. Z., Roe, B. A., Oren, A., Dewers, T. A., Krumholz, L. R. (2004).** Survey of *Archaeal* Diversity reveals an abundance of halophilic *Archaea* in a low-salt, sulfide- and sulfur-rich spring. *Appl Environ Microbiol* **70**, 2230-2239.
- Fábregas, J. M., A.;Otero, A.; Barja, J. L.,Romaris,M. (1991).** A preliminary study on antimicrobial activities of some bacteria isolated from marine environment. *Nippon Suisan Gakkaishi* **57**, 1377-1382.
- Faulkner, D. J. (2002).** Marine natural products. *Nat Prod Rep* **19**, 1-48.
- Feazel, L. M., Spear, J. R., Berger, A. B., Kirk Harris, J., Frank, D. N., Ley, R. E., Pace, N. R. (2008).** *Eukaryotic* diversity in a hyperaline microbial mat. *Appl Environ Microbiol* **74**, 329-332.
- Feher, D., Donachie, S., Ward, J., Barlow, r., Nagata, i.,Trapido-Rosenthal, H., Hemscheidt. T. K. (2011).** *Pseudoalteromonas hawaiiensis* sp. nov., an indolmycin producing marine bacterium isolated from Oahu, Hawaii. . *Int J System Evol Microbiol En prensa*.
- Felsenstein, J. (1985).** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Felsenstein, J. (2002).** PHYLIP (phylogenetic inference package), version 3,6a. Distributed by the author. Department of Genome Sciences. University of Washington, Seattle, USA.
- Fenical, W. (1993).** Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. *Chemical Reviews* **93**, 1673-1683.
- Ferragut, C., Leclerc, H (1976).** Etude comparative des methodes de determination du Tm de l'ADN bactérien. *Ann Microbiol* **127**, 223-235.
- Ferrari, B. C., Binnerup, S., Gillings, M. (2005).** Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* **71**, 8714-8720.

- Ferrari, B. C., Winsley, T., Gillings, M., Binnerup, S. (2008).** Cultivating previously uncultured soil bacteria using a soil substrate membrane system. . *Nat Protoc* **3**, 1261-1269.
- Ferrari, B. C., Gillings, M. R. (2009).** Cultivation of fastidious bacteria by viability staining and micromanipulation in a soil substrate membrane system. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 3352-3354.
- Ferrer, M. (2004).** Metagenoma: acceso a los recursos potencialmente ilimitados de los microorganismos no cultivados. *Actualidad SEM* **38**, 11-19.
- Ferry, J. G., Smith, P. H., Wolfe, R. S. (1974).** *Methanospirillum*, a new genus of methanogenic bacteria, and characterization of *Methanospirillum hungatii* sp.nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **24**, 465-469.
- Finlay, B. (2002).** Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* **296**, 1061 - 1063.
- Foulds, J. D., Shemin, D. (1969).** Properties and characteristics of a bacteriocin from *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* **99**, 655-660.
- Frazier, W. C. (1926).** A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. . *J Infect Dis* **39**, 302.
- Franzmann, P., Wehmeyer, U., Stackebrandt, E. (1988).** *Halomonadaceae* fam. nov., a new family of the class *Proteobacteria* to accommodate the genera *Halomonas* and *Deleya*. . *Syst Appl Microbiol*, **11**, 16-19.
- Fuhrman, J. A., Azam, F. (1982).** Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: Evaluation and field results. *Marine Biology* **66**, 109-120.
- Fuhrman, J. A., McCallum, K., Davis, A. A. (1993).** Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. *Appl Environ Microbiol* **59**, 1294-1302.
- Galand, P. E., Casamayor, E. O., Kirchman, D. L., Lovejoy, C. (2009).** Ecology of the rare microbial biosphere of the Arctic Ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 22427-22432.
- Galinski, E., Tindall, B.J. (1992).** Biotechnological prospects for halophiles and halotolerant microorganisms. *In: Molecular biology and biotechnology of extremophiles* (R D HERBERT, R J SHARP (eds) London, Blackie

- Garriga, M., Ehrmann, M. A., Arnau, J., Hugas, M., Vogel, R. F. (1998).** *Carnimonas nigrificans* gen. nov., sp. nov., a bacterial causative agent for black spot formation on cured meat products. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**, 677-686.
- Garrity, G. M., Boone, D. R., Castenholz, R. W. (2005a).** The *Archaea* and the deeply branching and phototrophic bacteria. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, Springer, Verlag.
- Garrity, G. M., Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. (2005b).** The *Proteobacteria*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, Springer, Verlag.
- Gauthier, G., Gauthier, M., Christen, R. (1995).** Phylogenetic analysis of the Genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the Genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (Emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 755-761.
- Gauthier, M. J., Lafay, B., Christen, R., Fernandez, L., Acquaviva, M., Bonin, P., Bertrand, J.-C. (1992).** *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 568-576.
- Gavriš, E., Bollmann, A., Epstein, S., Lewis, K. (2008).** A trap for in situ cultivation of filamentous actinobacteria. *J Microbiol Methods* **72**, 257-262.
- Gendrin, A., Mangold, N., Bibring, J.-P., y otros autores (2005).** Sulfates in martian layered terrains: The OMEGA/Mars Express View. *Science* **307**, 1587-1591.
- Gibbons, N. E. (1974).** Family V. *Halobacteriaceae*. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Ed., Buchanan, R.E. y Gibbons, N.E. (Eds), pp. 269-273. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Giovannoni, S. J., Britschgi, T. B., Moyer, C. L., Field, K. G. (1990).** Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* **345**, 60-63.
- Gonzalez-Domenech, C. M., Bejar, V., Martinez-Checa, F., Quesada, E. (2008a).** *Halomonas nitroreducens* sp. nov., a novel nitrate- and nitrite-reducing species. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 872-876.
- Gonzalez-Domenech, C. M., Martinez-Checa, F., Quesada, E., Bejar, V. (2008b).** *Halomonas cerina* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 803-809.

- Gonzalez-Domenech, C. M., Martinez-Checa, F., Quesada, E., Bejar, V. (2009).** *Halomonas fontilapidosi* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 1290-1296.
- Gonzalez, J. M., Mayer, F., Moran, M. A., Hodson, R. E., Whitman, W. B. (1997).** *Microbulbifer hydrolyticus* gen. nov., sp. nov., and *Marinobacterium georgiense* gen. nov., sp. nov., Two marine bacteria from a lignin-rich pulp mill waste enrichment community. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 369-376.
- Good, I. J. (1953).** The Population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* **40**, 237-264.
- Goodfellow, M., Manfio, G.P., Chun, J. (1997).** Towards a practical species concept for cultivable bacteria. In: Species: The Units of Biodiversity (Claridge, M.F. y Dawah, H.A., eds.), pp. 25-59. Chapman and Hall, London.
- Grant, S., Grant, W. D., Jones, B. E., Kato, C., Li, L. (1999).** Novel *archaeal* phylotypes from an East African alkaline saltern. *Extremophiles* **3**, 139-145.
- Grant, W. D., Kamekura, M., McGenity, T. J., Ventosa, A. (2001).** Class III. *Halobacteria* class. nov. In: D R Boone, R W Castenholz and G M Garrity (eds) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition, vol 1, Springer, New York, pp 294-301.
- Grant, W. D., Gemmel, R.T., McGenity, T.J., (1998).** Halophiles. In Horikoshi, K and Grant, W D, eds, *Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environments*, Wiley-Liss, Inc pp 93-132.
- Grant, W. D., Larsen, H. (1989).** Extremely halophilic *archaeobacteria*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1st ed., Vol.3. Staley, Bryant, Pfennig, and Holt (eds). Baltimore: The Williams and Wilkins Co., 2216-2219.
- Green, B. D., Keller, M. (2006).** Capturing the uncultivated majority. *Curr Opin Biotechnol* **17**, 236-240.
- Green, D. H., Bowman, J. P., Smith, E. A., Gutierrez, T., Bolch, C. J. S. (2006).** *Marinobacter algicola* sp. nov., isolated from laboratory cultures of paralytic shellfish toxin-producing dinoflagellates. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 523-527.
- Green, J. L., Bohannan, B. J. M., Whitaker, R. J. (2008).** Microbial biogeography: from taxonomy to traits. *Science* **320**, 1039-1043.
- Gruber, C., Legat, A., Pfaffenhuemer, M., Radax, C., Weidler, G., Busse, H. J., Stan-Lotter, H. (2004).** *Halobacterium noricense* sp. nov., an archaeal isolate from a bore core of

an alpine Permian salt deposit, classification of *Halobacterium* sp. NRC-1 as a strain of *H. salinarum* and emended description of *H. salinarum*. *Extremophiles* **8**, 431-439.

Gunde-Cimerman, N., Zalarb, P., de Hoog, S., Plemenitasd, A. (2000). Hypersaline waters in salterns-natural ecological niches for halophilic black yeast. *FEMS Microbiol Ecol* **32**, 235-240.

Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., Petrovic, U., Turk, M., Kogej, T., de Hoog, G. S., Plemenitaš, A. (2004). Fungi in the salterns. In: Ventosa, A. (ed), *Halophilic Microorganisms*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 103-113.

Gunde-Cimerman, N., Oren, A., Plemenitaš, A. (2005a). Adaptation to life at high salt concentrations in *Archaea*, *Bacteria* and *Eukarya*. Springer, Dordrecht.

Gunde-Cimerman, N., Oren, A., Plemenitaš, A. (2005b). Mikrosafari. the beautiful world of microorganisms in the salterns. Drzavna Zalozba Slovenije, Ljubljana.

Guo, B., Gu, J., Ye, Y.-G., Tang, Y.-Q., Kida, K., Wu, X.-L. (2007). *Marinobacter segnicrescens* sp. nov., a moderate halophile isolated from benthic sediment of the South China Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 1970-1974.

Gutiérrez-Cánovas, C., Velasco, J., Millán, A. (2009). Effects of dilution stress on the functioning of a saline Mediterranean stream. *Hydrobiologia* **619**, 119-132.

Guyomarc'h, F., Binet, A., Dufossé, L. (2000). Characterization of *Brevibacterium linens* pigmentation using spectrophotometry. *International Journal of Food Microbiology* **57**, 201-210.

Hair, J. F., Anderson, R.E., Tatham, R.L., Black, W.C. (1992). Multivariate data analysis (3rd ed.). New York: Macmillan. Publishing Co. New York, USA. 544p.

Hamaki, T., Suzuki M., Fudou, R., Jojima, Y., Kajiura, T., Tabuchi, A., Sen, K., Shibai, H. (2005). Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. *J Biosci Bioeng* **99**, 485-492.

Hamburger, C. (1905). Zur Kenntnis der *Dunaliella* salina und einer Amöbe aus Salinenwasser von Cagliari. *Arch f rotistenkd* **6**, 111-131.

Hastings, E. G. (1904). The action of various classes of bacteria on casein as shown by milk-agar plates. *Zentbl Bakt ParasitKde Abt II* **12**.

Hedi, A., Sadfi, N., Fardeau, M.-L., Rebib, H., Cayol, J.-L., Ollivier, B., Boudabous, A. (2009). Studies on the biodiversity of halophilic microorganisms isolated from El-Djerid Salt Lake (Tunisia) under aerobic conditions. *International Journal of Microbiology*, 1-17.

- Herrera Moreno, A. (2000).** La clasificación numérica y su aplicación en la ecología. Instituto Tecnológico de Santo Domingo. Pp31. Intec.
- Hickford, S. J. H., Küpper, F. C., Zhang, G., Carrano, C. J., Blunt, J. W., Butler, A. (2004).** Petrobactin sulfonate, a new siderophore produced by the marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. *Journal of Natural Products* **67**, 1897-1899.
- Hoagland, H. (1933).** Quantitative analysis of responses from lateral line nerves of fishes. . *J Gen Physiol* **16**, 715-732.
- Holmström, C., Kjelleberg, S. (1999).** Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiology Ecology* **30**, 285-293.
- Horner-Devine, M., Carney, K., Bohannon, B. (2004a).** An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proc Biol Sci* **271**, 113 - 122.
- Horner-Devine, M., Bohannon, B. (2006).** Phylogenetic clustering and overdispersion in bacterial communities. *Ecology* **87**, S100 - 108.
- Horner-Devine, M. C., Lage, M., Hughes, J. B., Bohannon, B. J. M. (2004b).** A taxa-area relationship for bacteria. *Nature* **432**, 750-753.
- Horner-Devine, M. C., Silver, J. M., Leibold, M. A., y otros autores (2007).** A comparison of taxon co-occurrence patterns for macro- and microorganisms. *Ecology* **88**, 1345-1353.
- Hosoya, S., Jang, J. H., Yasumoto-Hirose, M., Matsuda, S., Kasai, H. (2009).** *Psychromonas agarivorans* sp. nov., a novel agarolytic bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 1262-1266.
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M., Pace, N. R. (1998).** Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* **180**, 4765-4774.
- Hughes, J. B., Hellmann, J. J., Ricketts, T. H., Bohannon, B. J. M. (2001).** Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl Environ Microbiol* **67**, 4399-4406.
- Hurlbert, S. (1971).** The nonconcept of species diversity: a critique and alternate paradigms. *Ecology* **52**, 577-586.
- Ihara, K., Watanabe, S., Tamura, T. (1997).** *Haloarcula argentinensis* sp. nov. and *Haloarcula mukohataei* sp. nov., two new extremely halophilic *Archaea* collected in Argentina. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 73-77.

- Ingham, C. J., Sprenkels, A., Bomer, J., Molenaar, D., van den Berg, A., van Hylckama Vlieg, J. E., de Vos, W. M. (2007).** The micro-Petri dish, a million-well growth chip for the culture and high-throughput screening of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 18217-18222.
- Inoue, K., Itoh, T., Ohkuma, M., Kogure, K. (2010).** *Halomarina oriensis* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon isolated from seawater aquarium. *Int J Syst Evol Microbiol*, ijs.0.020677-020670.
- Isnansetyo, A., Kamei, Y. (2003).** MC21-A, a bactericidal antibiotic produced by a new marine bacterium, *Pseudoalteromonas phenolica* sp. nov. O-BC30T, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 480-488.
- Istock, C. A., Bell, J. A., Ferguson, N., Istock, N. L. (1996).** Bacterial species and evolution: Theoretical and practical perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **17**, 137-150.
- Ivanova, EP.,Mikhailov, W. (2001).** A new family, *Alteromonadaceae* fam. nov., including marine *Proteobacteria* of the genera *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Idiomarina*, and *Colwellia*. New York, NY, ETATS-UNIS: Springer.
- Ivanova, EP., Flavier, S., Christen, R. (2004).** Phylogenetic relationships among marine *Alteromonas*-like *proteobacteria*: emended description of the family *Alteromonadaceae* and proposal of *Pseudoalteromonadaceae* fam. nov., *Colwelliaceae* fam. nov., *Shewanellaceae* fam. nov., *Moritellaceae* fam. nov., *Ferrimonadaceae* fam. nov., *Idiomarinaceae* fam. nov. and *Psychromonadaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1773-1788.
- Janssen, P. H., Yates, P. S., Grinton, B. E., Taylor, P. M., Sait, M. (2002).** Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Appl Environ Microbiol* **68**, 2391-2396.
- Janssen, P. H. (2009).** Dormant microbes: scouting ahead or plodding along? *Nature* **458**, 831.
- Javor, B. J. (1989).** *Hipersaline Environments Microbiology and Biogeochemistry Springer-Verlag, Berlin*
- Jean, W. D., Chen, J.-S., Lin, Y.-T., Shieh, W. Y. (2006).** *Bowmanella denitrificans* gen. nov., sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from seawater from An-Ping Harbour, Taiwan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**, 2463-2467.
- Jean, W. D., Huang, S.-P., Liu, T. Y., Chen, J.-S., Shieh, W. Y. (2009).** *Aliagarivorans marinus* gen. nov., sp. nov. and *Aliagarivorans taiwanensis* sp. nov., facultatively anaerobic

marine bacteria capable of agar degradation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 1880-1887.

Jeffries, C. D., Holtman, D.F., Guse, D.G. (1957). Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. *J Bacteriol* **70**, 591.

Jeon, C. O., Lim, J.-M., Park, D. J., Kim, C. J. (2005). *Salinimonas chungwhensis* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a solar saltern in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 239-243.

Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* **451**, 990-993.

Jukes, T. H. C., C.R. (1969). Evolution of protein molecules. :In *Mammalian Protein Metabolism*. Munro, H. N. (Ed.). pp. 21-132. Boca Raton: Academic Press.

Kaerberlein, T., Lewis, K., Epstein, S. S. (2002). Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* **296**, 1127-1129.

Kaepfel, E. C., Gärdes, A., Seebah, S., Grossart, H.P., Ullrich, M.S. (2011). *Marinobacter adhaerens* sp. nov., prominent in aggregate formation with the diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Int J Syst Bacteriol* **In press**.

Kaurichev, I. S. (1980). *Prácticas de edafología*. Mir, Moscow.

Keough, B., Schmidt, T., Hicks, R. (2003). *Archaeal* nucleic acids in picoplankton from great lakes on three continents. *Microbial ecology* **46**, 238-248.

Kharroub, K., Aguilera, M., Quesada, T., Morillo, J. A., Ramos-Cormenzana, A. Monteoliva-Sánchez, M. (2006). *Salicola salis* sp. nov., an extremely halophilic bacterium isolated from Ezzemoul sabkha in Algeria. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 2647-2652.

Kim, K. K., Jin, L., Yang, H. C., Lee, S. T. (2007). *Halomonas gomseomensis* sp. nov., *Halomonas janggokensis* sp. nov., *Halomonas salaria* sp. nov. and *Halomonas denitrificans* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from saline water. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 675-681.

Kim, K. K., Lee, K. C., Oh, H. M. Lee, J., S. (2010). *Halomonas stevensii* sp. nov., *Halomonas hamiltonii* sp. nov. and *Halomonas johnsoniae* sp. nov., isolated from a renal care centre. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**, 369-377.

Kis-Papo, T., Oren, A., Wasser, S. P., Nevo, E. (2003). Survival of filamentous fungi in hypersaline Deas Sea water. *FEMS Microbiol Ecol* **45**, 183-190.

- Kleikemper, J., Pombo, S. A., Schroth, M. H., Sigler, W. V., Pesaro, M., Zeyer, J. (2005).** Activity and diversity of methanogens in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *Appl Environ Microbiol* **71**, 149-158.
- Koch, I. H., Gich, F., Dunfield, P. F., Overmann, J. (2008).** *Edaphobacter modestus* gen. nov., sp. nov., and *Edaphobacter aggregans* sp. nov., acidobacteria isolated from alpine and forest soils. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1114-1122.
- Kollef, M. H. (2005).** Gram-negative bacterial resistance: evolving patterns and treatment paradigms. *Clinical Infectious Diseases* **40**, S85-S88.
- Koser, S. A. (1923).** Utilization of the salts of organic acids by the colon-aerogenes group. *J Bacteriol* **8**, 493-520.
- Kradin, R. L., Mark, E. J. (2008).** The pathology of pulmonary disorders due to *Aspergillus* spp. *Archives of Pathology Laboratory Medicine* **132**, 606-614.
- Kumar, S., Dudley, J., Nei, M., Tamura, K. (2008).** MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* **9**, 299-306.
- Kurahashi, M., Yokota, A. (2004).** *Agarivorans albus* gen. nov., sp. nov., a γ -proteobacterium isolated from marine animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**, 693-697.
- Kushner, D. J., Kamekura, M. (1988).** Physiology of halophilic eubacteria. In: Halophilic bacteria. F. Rodríguez-Valera. (ed.), vol. 1, Boca Raton: CRC Press, pp. 109-138. .
- Landy, M., Warren, G.H., Rosenman, S.B., Clolis, L.G. (1948).** Bacillomycin an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi *Proc Soc Exper Biol* **67**, 539-541.
- Lane, D. J. (1991).** 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. E. Stackebrandt y M. Goodfellow (Ed.). pp. 115–148. Chichester, UK: Wiley.
- Langevin, Y., Poulet, F., Bibring, J. P., Gondet, B. (2005).** Sulfates in the north polar region of mars detected by OMEGA/Mars Express. *Science* **307**, 1584-1586.
- Lapage, S. P., Sneath, P. H. A., Lessel, E. F., Skerman, V. B. D., Seeliger, H. P. R., Clark, W. A. (editors). (1992).** International Code of Nomenclature of Bacteria (1990 Revision). Bacteriological Code. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Larpent, J. P., Larpent-Gourgand, M. (1957).** Mémento technique de microbiologie. technique et documentation, Paris.

- Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saiki, R. K., Myambo, K., Drummond, R., Gelfand, D. H. (1989).** Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 6427-6437.
- Leadbetter, J. R. (2003).** Cultivation of recalcitrant microbes: cells are alive, well and revealing their secrets in the 21st century laboratory. *Curr Opin Microbiol* **6**, 274-281.
- León, J., Liza, L., Soto, I., Torres, M., Orosco, A. (2010).** Bacterias marinas productoras de compuestos antibacterianos aisladas a partir de invertebrados intermareales. *Rev peru med exp salud publica* **27**, 215-221.
- Lerche, W. (1937).** Untersuchungen über Entwicklung und fortpflanzung in der gattung *Dunaliella*. *Arch f Protistenkd* **88**, 236-268.
- Lewin, R. A., Krienitz, L., Goericke, R., Takeda, H., Hepperle, D. (2000).** *Picocystis salinarum* gen. et sp. nov. (Chlorophyta) a new picoplanktonic green alga. *Phycologia* **39**, 560-565.
- Lieb Gott, P. P., Casalot, L., Paillard, S., Lorquin, J., Labat, M. (2006).** *Marinobacter vinifirmus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a wine-barrel-decalcification wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**, 2511-2516.
- Lim, J. M., Jeon, C. O., Lee, J. C., Song, S.-M., Kim, K.-Y., Kim, C. J. (2006).** *Marinimicrobium koreense* gen. nov., sp. nov. and *Marinimicrobium agarilyticum* sp. nov., novel moderately halotolerant bacteria isolated from tidal flat sediment in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**, 653-657.
- Liska, A. J., Shevchenko, A. Pick, U., Katz, A. (2004).** Enhanced photosynthesis and redox energy production contribute to salinity tolerance in *Dunaliella* as revealed by homology-based proteomics. *Plant Physiol* **136**, 2806-2817.
- Livermore, D. M. (2004).** The need for new antibiotics. *Clinical Microbiology and Infection* **10**, 1-9.
- Lodeiros, C., Campos, Y., Marín, N. (1991).** Producción de antibióticos por la flora bacteriana asociada a monocultivos microalgales de utilidad en acuicultura. *Soc Cien Natur La Salle* **60**, 213-223.
- Logan, N. A. (1994).** *Bacterial systematics*. Blackwell Scientific Publications: Oxford ;.
- Lowy, F. D. (2003).** Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation* **111**, 1265-1273.

- Lozupone, C., Knight, R. (2007).** Global patterns in bacterial diversity. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 11436 - 11440.
- Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1999).** Phylogeny of *Bacteria* beyond the 16Sr RNA standard. **65**, 752-757.
- Ludwig, W. K., H.P. (2001).** Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed D R Boone, R W Castenholz y G M Garrity (Ed) pp 49-65 Springer New York.
- Lugioyo, G. M., Cabrera, D., Miravet, M. E., Núñez, R., Delgado, Y., Cabrera, H. Martí, J. (2003).** Identificación y detección de la actividad antimicrobiana de cepas de bacterias aisladas de la Zona Exclusiva Económica al sur de Cuba. *Serie Oceanológica* **1**, 59-67.
- Luque, R., Quesada, E., Béjar, V., Llamas, I. (2010).** Isolation of strains of the genus *Halomonas* with biotechnological interest from Rambla Salada (Murcia). *Ars Pharm (en prensa)*.
- Margesin, R., Schinner, F. (2001).** Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* **5**, 73-83.
- Marie, D., Brussaard, C. P. D., Thyraug, R., Bratbak, G., Vault, D. (1999).** Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* **65**, 45-52.
- Marmur, J., Doty, P. (1962).** Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *Journal of Molecular Biology* **5**, 109-118.
- Martín-Platero, A. M., Valdivia, E., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M. (2007).** Fast, convenient, and economical method for isolating genomic DNA from lactic acid bacteria using a modification of the protein "salting-out" procedure. *Analytical Biochemistry* **366**, 102-104.
- Martin, A., Portaels, F., Palomino, J. C. (2007).** Colorimetric redox-indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **59**, 175-183.
- Martinez-Alonso, M., Escolano, J., Montesinos, E., Gaju, N. (2010).** Diversity of the bacterial community in the surface soil of a pear orchard based on 16S rRNA gene analysis. *Int Microbiol* **13**, 123-134.

- Martínez-Canovas, M. J., Quesada, E., Llamas, I., Bejar, V. (2004).** *Halomonas ventosae* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 733-737.
- Martínez-Cánovas, M. J., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Páez, R., Quesada, E. (2004a).** *Idiomarina fontislapidosi* sp. nov. and *Idiomarina ramblicola* sp. nov., isolated from inland hypersaline habitats in Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**, 1793-1797.
- Martínez-Cánovas, M. J., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Quesada, E. (2004b).** *Halomonas anticariensis* sp. nov., from Fuente de Piedra, a saline-wetland, wildfowl reserve in Málaga, Southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1329-1332.
- Martínez-Murcia, A. J., Acinas, S. G., Rodríguez-Valera, F. (1995).** Evaluation of prokaryotic diversity by restrictase digestion of 16S rDNA directly amplified from hypersaline environments. *FEMS Microbiology Ecology* **17**, 247-255.
- Martiny, J. B. H., Bohannan, B. J. M., Brown, J. H., y otros autores (2006).** Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nat Rev Micro* **4**, 102-112.
- Mata, J. A., Martínez-Canovas J., Quesada E., Béjar, V. (2002).** A detailed phenotypic characterisation of the type strains of *Halomonas* species. *Syst Appl Microbiol* **25**, 360-375.
- Maturrano, L., Santos, F., Rosselló-Mora, R., Antón, J. (2006a).** Microbial diversity in Maras salterns, a hypersaline environment in the Peruvian Andes. *Appl Environ Microbiol* **72**, 3887-3895.
- Maturrano, L., Valens-Vadell, M., Rosselló-Mora, R., Antón, J. (2006b).** *Salicola marasensis* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic bacterium isolated from the Maras solar salterns in Peru. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1685-1691.
- Mayer, A. M. S., Rodríguez, A. D., Berlinck, R. G. S., Fusetani, N. (2011).** Marine pharmacology in 2007-8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology Pharmacology* **153**, 191-222.
- McCarthy, S. A., Johnson, R. M., Kakimoto, D. (1994).** Characterization of an antibiotic produced by *Alteromonas luteoviolacea* isolated from Kinko Bay, Japan. *Journal of Applied Microbiology* **77**, 426-432.
- McCormick, A., Loeffler, J., Ebel, F. (2010).** *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. *Cellular Microbiology* **12**, 1535-1543.

- Mellado, E., Ventosa, A. (2003).** Biotechnological potential of moderately and extremely halophilic microorganisms. In J.L. Barredo (ed.), *Microorganisms for Health Care, Food and Enzyme Production*. Kerala: Research Signpost. pp. 233-256.
- Mendoza, Y. (1997).** Bacterioplancton de aguas oceánicas al Norte de Cuba: Distribución espacial. Tesis para optar por el Título de Licenciado en Microbiología. Facultad de Biología,.
- Mills, H. J., Hodges, C., Wilson, K., MacDonald, I. R., Sobecky, P. A. (2003).** Microbial diversity in sediments associated with surface-breaching gas hydrate mounds in the Gulf of Mexico. *FEMS Microbiology Ecology* **46**, 39-52.
- Mochimaru, H., Tamaki, H., Hanada, S., Imachi, H., Nakamura, K., Sakata, S., Kamagata, Y. (2009).** *Methanolobus profundus* sp. nov., a methylotrophic methanogen isolated from deep subsurface sediments in a natural gas field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 714-718.
- Mokracka, J., Koczura, R., Kaznowski, A. (2004).** Yersiniabactin and other siderophores produced by clinical isolates of *Enterobacter* spp. and *Citrobacter* spp. *FEMS Immunology Medical Microbiology* **40**, 51-55.
- Moraine, R. A., Rogovin, P. (1966).** Kinetics of polysaccharide B-1459 fermentation. . *Biotechnol Bioeng* **8** 511-524.
- Moschetti, G., Aponte, M., Blaiotta, G., Casaburi, A., Chiurazzi, M., Ventrino, V., Villani, F. (2006).** Characterization of halophilic *Archaea* isolated from different hypersaline ecosystems. *Annals of Microbiology* **56**, 119-127.
- Nair, S., Simidu, U. (1987).** Distribution and significance of heterotrophic marine bacteria with antibacterial activity. *Appl Environ Microbiol* **53**, 2957-2962.
- Nascimento, J. d. S., Abrantes, J., Giambiagi-deMarval, M. Bastos, M. C. (2004).** Growth conditions required for bacteriocin production by strains of *Staphylococcus aureus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **20**, 941-947.
- Nemergut, D. R., Costello, E. K., Hamady, M., y otros autores (2011).** Global patterns in the biogeography of bacterial taxa. *Environmental Microbiology* **13**, 135-144.
- Nett, M., Ikeda, H., Moore, B. S. (2009).** Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat Prod Rep* **26**, 1362-1384.
- Nichols, D. (2007).** Cultivation gives context to the microbial ecologist. *FEMS Microbiology Ecology* **60**, 351-357.

Nichols, D., Lewis, K., Orjala, J., y otros autores (2008). Short peptide induces an "uncultivable" microorganism to grow in vitro. *Appl Environ Microbiol* **74**, 4889-4897.

Nichols, D., Cahoon, N., Trakhtenberg, E. M., Pham, L., Mehta, A., Balanger, A., Kanigan, T., Lewis, L., Epstein, S. S. (2010). Use of Ichip for high-throughput in situ cultivation of "uncultivable" microbial species. *Appl Environ Microbiol* **76**, 2445-2450.

Nicolai FE, Baas Becking. LGM. (1925). Einige Notizen über Salzflagellaten. *Arch f Protistenkd* **85**, 319-328.

Nielsen, D. L., Brock, M. A., Rees, G. N., Baldwin, D. S. (2003). Effects of increasing salinity on freshwater ecosystems in Australia. *Australian Journal of Botany* **51**, 655-665.

Norris, J. R., Berkeley, R.C.W., Logan, N.A., O'Donnell, A.G. (1981). The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. . In: The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria MP Starr y col (Ed) Vol 2 p 1711 Berlin: Springer-Verlag.

Ntougias, S., Zervakis, G. I., Fasseas, C. (2007). *Halotalea alkalilenta* gen. nov., sp. nov., a novel osmotolerant and alkalitolerant bacterium from alkaline olive mill wastes, and emended description of the family *Halomonadaceae* Franzmann et al. 1989, emend. Dobson and Franzmann 1996. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 1975-1983.

Ochsenreiter, T., Selez, D., Quaiser, A., Bonch-Osmolovskaya, L., Schleper, C. (2003). Diversity and abundance of *Crenarchaeota* in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environmental Microbiology* **5**, 787-797.

Oh, D., Porter, K., Russ, B., Burns, D., Dyll-Smith, M. (2010). Diversity of *Haloquadratum* and other *haloarchaea* in three, geographically distant, Australian saltern crystallizer ponds. *Extremophiles* **14**, 161-169.

Ollivier, B., Fardeau, M.-L., Cayol, J.-L., Magot, M., Patel, B. K. C., Prensier, G., Garcia, J.-L. (1998). *Methanocalculus halotolerans* gen. nov., sp. nov., isolated from an oil-producing well. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**, 821-828.

Olmos-Soto, J., Paniagua-Michel, J., Contreras, R. (2002). Molecular identification of b-carotene hyper-producing strains of *Dunaliella* from saline environments using species specific oligonucleotides. *Biotechnol Lett* **24**, 365-369.

Olmos, J., Paniagua, J., Contreras, R. (2000). Molecular identification of *Dunaliella* sp. utilizing the 18S rDNA gene. *Letters in Applied Microbiology* **30**, 80-84.

- Olsen, R. A., Bakken, L. R. (1987).** Viability of soil bacteria: optimization of plate-counting techniques and comparisons between total counts and plate counts within different size groups. *Microbiol Ecol* **13**, 59-74.
- Oren, A., Ventosa, A. Grant, W. D. (1997).** Proposed minimal standards for description of new taxa in the order *Halobacteriales*. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 233-238.
- Oren, A. (1999).** Microbiological studies in the Dead Sea: future challenges toward the understanding of life at the limit of salt concentrations. *Hydrobiologia* **405**, 1-9.
- Oren, A. (2002a).** Halophilic microorganisms and their environments. *Kluwer Academic Publishers London*.
- Oren, A. (2002b).** Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* **28**, 56-63.
- Oren, A. (2005).** A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005. *Saline Systems* **1**, 2.
- Oren, A. (2008).** Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* **4**, 2.
- Oren, A., Papke, T. (2010).** Molecular phylogeny of microorganisms. *Ed by Aharon Oren and R Thane Papke Caister Academic Press*
- Oren, A., Rodríguez-Valera, F., Antón, J., Benlloch, S., Rosselló-Mora, R., Amann, R., Coleman, J., Russell, NJ. (2004).** Red, extremely halophilic, but not *archaeal*: the physiology and ecology of *Salinibacter ruber*, a bacterium isolated from saltern crystallizer ponds. En *Halophilic Microorganisms* Edited by: Ventosa A. Berlin: Springer-Verlag; 63-76
- Oren, A. T. (2006).** The order *Halobacteriales*. In *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria Volume 3 3rd edition* Edited by: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E New York: Springer, 113-164.
- Ortega-Morales, B., Ortega-Morales, F., Lara-Reyna, J., De la Rosa-García, S., Martínez-Hernández, A., Montero-M, J. (2009).** Antagonism of *Bacillus* spp. Isolated from Marine Biofilms Against Terrestrial Phytopathogenic Fungi. *Marine Biotechnology* **11**, 375-383.
- Ouverney, C. C., Fuhrman, J. A. (2000).** Marine planktonic *Archaea* Take up amino acids. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4829-4833.
- Owen, R. J., Pitcher, D. (1985).** Current methods for estimating DNA base composition and levels of DNA-DNA hybridization. In: *Chemical methods in bacterial systematic* M Good-Fellow y E Minnikin (Ed) pp 67-93 Academic Press London.

- Ozcan, B., Ozcengiz, G., Coleri, A., Cokmus, C. (2007).** Diversity of halophilic archaea from six hypersaline environments in Turkey. *J Microbiol Biotechnol* **17**, 985-992.
- Pace, N. R. (1986).** The analyses of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv Microb Ecol* **9**, 1-55.
- Pagaling, E., Haigh, R. D., Grant, W. D., Cowan, D. A., Jones, B. E., Ma, Y., Ventosa, A., Heaphy, S. (2007).** Sequence analysis of an *Archaeal* virus isolated from a hypersaline lake in Inner Mongolia, China. *BMC Genomics* **8**, 410.
- Pagaling, E., Wang, H., Venables, M., y otros autores (2010).** Microbial biogeography of six salt lakes in Inner Mongolia China and a salt lake in Argentina. *Appl Environ Microbiol* (en prensa).
- Palys, T., Nakamura, L., Cohan, F. (1997).** Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: The role of DNA sequence data. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 1145-1156.
- Pankratov, T. A., Serkebaeva, Y. M., Kulichevskaya, I. S., Liesack, W., Dedysh, S. N. (2008).** Substrateinduced growth and isolation of *Acidobacteria* from acidic Sphagnum peat. *ISME J* **2**, 551-560.
- Park, S., Yoshizawa, S., Hamasaki, K., Kogure, K., Yokota, A. (2010).** *Psychrosphaera saromensis* gen. nov., sp. nov., within the family *Pseudoalteromonadaceae*, isolated from Lake Saroma, Japan. *The Journal of General and Applied Microbiology* **56**, 475-480.
- Paterek, J. R., Smith, P. H. (1988).** *Methanohalophilus mahii* gen. nov., sp. nov., a methylotrophic halophilic methanogen. *Int J Syst Bacteriol* **38**, 122-123.
- Pedrós-Alió, C. (2004).** Trophic ecology of solar salterns. In: A Ventosa (ed) *Halophilic Microorganisms* Springer, Berlin, pp 33-48.
- Pedrós-Alió, C. (2005).** Diversity of microbial communities: the case of solar salterns. . In: N GundeCimerman, A Oren A Plemenitas (eds) *Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria and Eukarya*, Springer, Dordrecht, pp 73-90
- Pedrós-Alió, C. (2006).** Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends in Microbiology* **14**, 257-363.
- Pelludat, C., Rakin, A., Jacobi, C. A., Schubert, S., Heesemann, J. (1998).** The Yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica*: organization and siderophore-dependent regulation. *J Bacteriol* **180**, 538-546.

- Pommier, T., Canbäck, B., Riemann, L., Boström, K. H., Simu, K., Lundberg, P., Tunlid, A., Hagström, A. (2007). Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. *Molecular Ecology* **16**, 867-880.
- Post, F. J. (1977). The microbial ecology of the Great Salt Lake. *Microbial ecology* **3**, 143-165.
- 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. *Environ Microbiol* **6**, 591-595.
- Quesada, E., Ventosa, A., Rodríguez-Valera, F., Ramos-Cormenzana, A. (1982). Types and properties of some bacteria isolated from hypersaline soils. *J Appl Bacteriol* **53**, 155-161.
- Quesada, E., Ventosa, A., Rodríguez-Valera, F., Ramos-Cormenzana, A. (1983). Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative bacteria from hypersaline soils. *J Gen Microbiol* **129** 2649-2657.
- Quesada, E., Béjar, V., Calvo, C. (1993). Exopolysaccharide production by *Volcaniella eurihalina*. *Experientia* **49**, 1037-1041.
- Quesada, E., Béjar, V., Ferrer, M. R., y otros autores (2004). Moderately halophilic bacteria which produces exopolysaccharides. In *Halophilic microorganisms*. (ed). Heildeberg: Springer-Verlang, pp. 297-314.
- Quévrain, E., Domart-Coulon, I., Pernice, M., Bourguet-Kondracki, M.-L. (2009). Novel natural parabens produced by a *Microbulbifer* bacterium in its calcareous sponge host *Leuconia nivea*. *Environmental Microbiology* **11**, 1527-1539.
- Rappé, M. S., Connon, S. A., Vergin, K. L., Giovannoni, S. J. (2002). Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* **418**, 630-633.
- Reichenbach, H. (2001). *Myxobacteria*, producers of novel bioactive substances. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **27**, 149-156.
- Robertson, C. E., Harris, J. K., Spear, J. R., Pace, N. R. (2005). Phylogenetic diversity and ecology of environmental *Archaea*. *Current Opinion in Microbiology* **8**, 638-642.
- Rodríguez-Valera, F., Ventosa, A., Juez, G., Imhoff, J. F. (1985). Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern. *Microbial ecology*, 107-115.

- Rodríguez-Valera, F. (1988).** Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. In : F Rodríguez-Valera (ed) *Halophilic Bacteria* CRC Press, Boca Raton, pp 3-30.
- Rodríguez-Valera, F., Ruíz-Berraquero, F., Ramos-Cormenzana, A. (1981).** Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations. *Microb Ecol* **7** 235-243.
- Rodríguez-Valera, F. (1993).** Introduction to saline environments. *Biology of Halophilic Bacteria* Eds R Vreeland, L Hochstein CRC Press, Boca Raton, Florida pp1-23
- Rodríguez-Valera, F. (2002).** Approaches to prokaryotic biodiversity: a population genetics perspective. *Environmental Microbiology* **4**, 628-633.
- Rodríguez-Valera, F., Garcia Lillo, J.A., Anton, J., Meseguer, I. (1991).** Biopolymer production by *Haloferax mediterranei*. In: General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms (F. Rodríguez- Valera, Ed.) , 373-380, New York.
- Rodríguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F. (1983).** Halobacterias. *Investigación y Ciencia* **80**, 94-102.
- Roemer, T., Jiang, B., Davison, J., y otros autores (2003).** Large-scale essential gene identification in *Candida albicans* and applications to antifungal drug discovery. *Molecular Microbiology* **50**, 167-181.
- Romanenko, L. A., Schumann, P., Rohde, M., Zhukova, N. V., Mikhailov, V. V., Stackebrandt, E. (2005).** *Marinobacter bryozorum* sp. nov. and *Marinobacter sediminum* sp. nov., novel bacteria from the marine environment. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 143-148.
- Romano, I., Lama, L., Nicolaus, B., Poli, A., Gambacorta, A., Giordano, A. (2006).** *Halomonas alkaliphila* sp. nov., a novel halotolerant alkaliphilic bacterium isolated from a salt pool in Campania (Italy). *The Journal of General and Applied Microbiology* **52**, 339-348.
- Rontani, J., Gilewicz, M., Michotey, V., Zheng, T., Bonin, P., Bertrand, J. (1997).** Aerobic and anaerobic metabolism of 6,10,14-trimethylpentadecan-2-one by a denitrifying bacterium isolated from marine sediments. *Appl Environ Microbiol* **63**, 636-643.
- Rosenfeld, W. D., ZoBell, C. E. (1947).** Antibiotic production by marine microorganisms. *J Bacteriol* **54**, 393-b-398.
- Rosselló-Mora, R., Amann, R. (2001).** The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* **25**, 39-67.

- Saadoun, I., Hameed, K.M., Moussauui, A. (1999).** Characterization and analysis of antibiotic activity of some aquatic actinomycetes. *Microbios* **99**, 173-179.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K., Erlich, H. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sait, M., Hugenholtz, P., Janssen, P. H. (2002).** Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environ Microbiol* **4**, 654-666.
- Sait, M., Davis, K. E. R., Janssen, P. H. (2006).** Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum *Acidobacteria* occurring in soil. *Appl Environ Microbiol* **72**, 1852-1857.
- Saitou, N., Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.
- Sakai, S., Imachi, H., Sekiguchi, Y., Ohashi, A., Harada, H., Kamagata, Y. (2007).** Isolation of key methanogens for global methane emission from rice paddy fields: a novel isolate affiliated with the clone cluster rice cluster I. *Appl Environ Microbiol* **73**, 4326-4331.
- Sambrook, J., Russel, D. W. (2001).** Molecular cloning: a laboratory manual cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sánchez-Porro, C., Martín, S., Mellado, E., Ventosa, A. (2003).** Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology* **94**, 295-300.
- Sánchez-Porro, C., de la Haba, R. R., Soto-Ramírez, N., Márquez, M. C., Montalvo-Rodríguez, R., Ventosa, A. (2009).** Description of *Kushneria aurantia* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Halomonadaceae*, and a proposal for reclassification of *Halomonas marisflavi* as *Kushneria marisflavi* comb. nov., of *Halomonas indalinina* as *Kushneria indalinina* comb. nov. and of *Halomonas avicenniae* as *Kushneria avicenniae* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 397-405.
- Sanders, H. (1968).** Marine benthic diversity: a comparative study. *The American Naturalist* **102**, 243-283.
- Sawabe, T., Makino, H., Tatsumi, M., Nakano, K., Tajima, K., Iqbal, M. M., Yumoto, I., Ezura, Y., Christen, R. (1998).** *Pseudoalteromonas bacteriolytica* sp. nov., a marine bacterium that is the causative agent of red spot disease of *Laminaria japonica*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**, 769-774.

- Schaeffer, A. B., Fulton, M. D. (1933).** A simplified method of staining endospores. *Science* **77**, 194.
- Schloss, P., Handelsman, J. (2006).** Toward a census of bacteria in soil. *PLoS Comput Biol* **2**, e92.
- Schloss, P., Handelsman, J. (2007).** The last word. . *Annual Reviews in Microbiology* **61**, 23-34.
- Schloss, P. D., Handelsman, J. (2005).** Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microbiol* **71**, 1501-1506.
- Schoenborn, L., Yates, P. S., Grinton, B. E., Hugenholtz, P., Janssen, P. H. (2004).** Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representative of the phylum-level diversity of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**, 4363-4366.
- Schut, F., Prins, R. A., Gottschal, J. C. (1997).** Oligotrophy and pelagic marine bacteria: facts and fiction. *Aquatic Microbial Ecology* **12**, 177-202.
- Shannon, C. E., Weaver, W. (1949).** A Mathematical model of communication. urbana, In: University of Illinois Press.
- Sierra, G. (1957).** A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek* **23**, 15.
- Simon, H. M., Dodsworth, J. A., Goodman, R. M. (2000).** *Crenarchaeota* colonize terrestrial plant roots. *Environmental Microbiology* **2**, 495-505.
- Simon, H. M., Jahn, C. E., Bergerud, L. T., Sliwinski, M. K., Weimer, P. J., Willis, D. K., Goodman, R. M. (2005).** Cultivation of mesophilic soil crenarchaeotes in enrichment cultures from plant roots. *Appl Environ Microbiol* **71**, 4751-4760.
- Simpson, E. H. (1949).** Measurement of diversity. . *Nature* 163:688.
- Simu, K., Hagström, A. (2004).** Oligotrophic bacterioplankton with novel single-cell life strategy. *Appl Environ Microbiol* **70**, 2445-2451.
- Skerman, V. B. D. (1967).** A guide to identification of the genera of bacteria. 1st ed. Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- Skerman, V. B. D., McGowan, V., Sneath, P. H. A. (1980).** Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol* **30**, 225-420.

- Smith, E. P., Van Belle, G. (1984).** Nonparametric estimation of species richness. . *Biometrics* **40**, 119-129.
- Sneath, P. H. A., Collins, V. G. (1974).** A study in test reproducibility between laboratories: Report of a *Pseudomonas* Working Party. *Antonie van Leeuwenhoek* **40**, 481-527.
- Sneath, P. H. A., Sokal, R.R. (1973).** Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. *Freeman, WH y Co San Francisco*.
- Sogin, M., Morrison, H., Huber, J., Mark Welch, D., Huse, S., Neal, P., Arrieta, J., Herndl, G. (2006).** Microbial diversity in the deep sea and the unexplored "rare biosphere". *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 15 - 20.
- Sokal, R. R., Michener, C. D. (1958).** A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Scientific Bulletin* **28**, 1409-1438.
- Soliman, G.S.H., Trüper. H. G. (1982).** *Halobacterium pharaonis* sp. nov., a new, extremely haloalkaliphilic *archaeobacterium* with low magnesium requirement. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt C3*, 318-329.
- Stackebrandt, E., Goebel, B. M. (1994).** Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 846-849.
- Stackebrandt, E. (2000).** Defining taxonomic ranks. *In* The Prokaryotes. An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community, release 3.1. Edited by M Dworkin and others New York: Springer.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., y otros autores (2002).** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1043-1047.
- Staley, J. T. (1997).** Biodiversity: are microbial species threatened? . *Curr Opin Biotechnol* **8**, 340-345.
- Staley, J. T., Gosink, J. J. (1999).** POLES APART: Biodiversity and biogeography of sea ice bacteria. *Annual Review of Microbiology* **53**, 189-215.
- Stevens, H., Brinkhoff, T., Rink, B., Vollmers, J., Simon, M. (2007).** Diversity and abundance of Gram positive bacteria in a tidal flat ecosystem. *Environ Microbiol* **9**, 1810-1822.

- Stevenson, B. S., Eichorst, S. A., Wertz, J. T., Schmidt, T. M. Breznak, J. A. (2004).** New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. . *Appl Environ Microbiol* **70**, 4748- 4755.
- Stingl, U., Cho, J. C., Foo, W., Vergin, K. L., Lanoil, B., Giovannoni, S. J. (2008).** Dilution-to-extinction culturing of psychrotolerant planktonic bacteria from permanently ice-covered lakes in the McMurdo dry valleys, antarctica *Microb Ecol* **55**, 395-405.
- Strauch, E., Kaspar, H., Schaudinn, C., Dersch, P., Madela, K., Gewinner, C., Hertwig, S., Wecke, J., Appel, B. (2001).** Characterization of Enterocolitcin, a phage tail-like bacteriocin, and its effect on pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5634-5642.
- Styers, D., Sheehan, D. J., Hogan, P., Sahn, D. F. (2006).** Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among *Staphylococcus aureus*: 2005 status in the United States. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **5**, 2.
- Takahashi, Y., Omura, S. (2003).** Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *J Gen Appl Microbiol* **49**, 141-154.
- Tamaki, H., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Nakamura, K., Nomura, N., Matsumura, M., Kamagata, Y. (2005).** Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques. *Appl Environ Microbiol* **71**, 2162-2169.
- Tamaki, H., Hanada, S., Sekiguchi, Y., Tanaka, Y., Kamagata, Y. (2009).** Effect of gelling agent on colony formation in solid cultivation of microbial community in lake sediment. *Environ Microbiol* **11**, 1827-1834.
- Tamames, J., Abellan, J., Pignatelli, M., Camacho, A., Moya, A. (2010).** Environmental distribution of prokaryotic taxa. *BMC Microbiology* **10**, 85.
- Taneja, N. K., Tyagi, J. S. (2007).** Resazurin reduction assays for screening of anti-tubercular compounds against dormant and actively growing *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **60**, 288-293.
- Taylor, C. B. (1951).** Nature of the factor in soil-extract responsible for bacterial growth-stimulation. *Nature* **168**, 115-116.
- Teodoresco, E. C. (1905).** Organisation et développement du *Dunaliella*, nouveau genre de Volvocacée-Polyblepharidée. . *Beih z Bot Centralbl* **XVIII**, 215-232.

- Teodoresco, E. C. (1906).** Observations morphologiques et biologiques sur le genre *Dunaliella*. . *Rev Gén Bot* **18**, 353-371.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994).** Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* **22**, 4673-4680.
- Tindall, B. J., Collins, M. D. (1986).** Structure of 2-methyl-3-VIII-dihydrooctaprenyl-1,4-naphthoquinone from *Halococcus morrhuae*. *FEMS Microbiology Letters* **37**, 117-119.
- Tindall, B. J. (1992).** The family *Halobacteriaceae*. In: The Prokaryotes. A Handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. 2^a Ed. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. y Schleifer, K.H. (Eds), pp.768-808. Springer-Verlag, New York.
- Tindall, B. J. (2004).** Prokaryotic diversity in the Antarctic: the tip of the iceberg. *Microbial ecology* **47**, 271-283.
- Tindall, B. J., Rosselló-Mora, R., Busse, H. J., Ludwig, W., Kämpfer, P. (2010).** Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 249-266.
- Tsudome, M., Deguchi, S., Tsujii, K., Ito, S., Horikoshi, K. V. (2009).** Versatile *Solidified Nanofibrous Cellulose-Containing Media for Growth of Extremophiles*. *Appl Environ Microbiol* **75**, 4616-4619.
- Uphoff, H. U., Felske, A., Fehr, W., Wagner-Dobler, I. (2001).** The microbial diversity in picoplankton enrichment cultures: a molecular screening of marine isolates. *FEMS Microbiol Ecol* **35**, 249-258.
- Urios, L., Agogué, H., Intertaglia, L., Lesongeur, F., Lebaron, P. (2008).** *Melitea salexigens* gen. nov., sp. nov., a gammaproteobacterium from the Mediterranean Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**, 2479-2483.
- Van-Thuoc, D., Guzmán, H., Thi-Hang, M., Hatti-Kaul, R. (2010).** Ectoine production by *Halomonas boliviensis*: optimization using response surface methodology. *Marine Biotechnology* **12**, 586-593.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., Swings, J. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* **60**, 407 - 438.
- Velasco, J., Millan, A., Vidal-Abarca, M. R., Suarez, M. L., Guerrero, C., Ortega, M. (2003).** Macrophytic, epipelagic and epilithic primary production in a semiarid Mediterranean stream. *Freshwater Biology* **48**, 1408-1420.

- Velasco, J., Millan, A., Hernandez, J., Gutierrez, C., Abellan, P., Sanchez, D., Ruiz, M. (2006).** Response of biotic communities to salinity changes in a Mediterranean hypersaline stream. *Saline Systems* **2**, 12.
- Ventosa, A., Quesada, E., Rodríguez-Valera, F., Ruíz-Berraquero F., Ramos-Cormenzana, A. (1982).** Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. . *J Gen Microbiol* **128** 1959-1968.
- Ventosa, A., Gutierrez, M. C., Garcia, M. T., Ruiz-Berraquero, F. (1989).** Classification of “*Chromobacterium marismortui*” in a New Genus, *Chromohalobacter* gen. nov., as *Chromohalobacter marismortui* comb. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* **39**, 382-386.
- Ventosa, A., Nieto, J. J., Oren, A. (1998).** Biology of *Moderately Halophilic Aerobic Bacteria*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 504-544.
- Ventosa, A. (2004).** Halophilic Microorganisms. *Springer-Verlag: Heidelberg*
- Ventosa, A., N. A. Logan, H. M. L. S., Oyston, P. C. F. (2006).** Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environments *Prokaryotic Diversity*: Cambridge University Press.
- Ventosa, A., Mellado, E., Sánchez-Porro, C., Márquez, M. C. (2008).** Halophilic and halotolerant micro-organisms from soils. *In* : Microbiology of Extreme Soils P Dion and C S Nautiyal (eds) pp 87-115, New York Springer
- Ventosa, A., Arahal, D. (2002).** Physico-Chemical characteristics of hypersaline environments and their biodiversity. *Encyclopedia of Life Support System*. París. Eolss Publishers Co. Ltd. Pag. 10020-10031.
- Vicente, F., Basilio, A., Platas, G., y otros autores (2009).** Distribution of the antifungal agents sordarins across filamentous fungi. *Mycological Research* **113**, 754-770.
- Vogel, B. F., Venkateswaran, K., Christensen, H., Falsen, E., Christiansen, G., Gram, L. (2000).** Polyphasic taxonomic approach in the description of *Alishewanella fetalis* gen. nov., sp. nov., isolated from a human foetus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 1133-1142.
- Vreeland, R. H., Litchfield, C. D., Martin, E. L. Elliot, E. (1980).** *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. *Int J Syst Bacteriol* **30**, 485-495.
- Waino, M., Tindall, B., Ingvorsen, K. (2000).** *Halorhabdus utahensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic member of the *Archaea* from Great Salt Lake, Utah. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 183-190.

- Wang, Y., Tang, S. K., Lou, K., Lee, J. C., Jeon, C. O., Xu, L. H., Kim, C. J., Li, W. J. (2009). *Aidingimonas halophila* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a salt lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 3088-3094.
- Ward, D. M. (1998). A natural species concept for prokaryotes. *Curr Opin Microbiol* **1**, 271-277.
- Ward, N. L., Challacombe, J. F., Janssen, P. H., y otros autores (2009). Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Appl Environ Microbiol* **75**, 2046-2056.
- Watve, M., Shejval, V., Sonawane, C., y otros autores (2000). The "K" selected oligotrophic bacteria: a key to uncultured diversity? *Curr Sci* **78**, 1535-1542.
- 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., y otros autores (1987). International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 463-464.
- Whitaker, R., Grogan, D., Taylor, J. (2003). Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science* **301**, 976 - 978.
- William, S. (1996). Size-aggregation in models of aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment* **183**, 107-114.
- Wilson, B. J. (1971). Miscellaneous *Aspergillus* toxins. pp. 208-295 In: Microbial Toxins. Volumen 6: Fungal Toxins. Ciegler A et al, eds. Academic Press, Nueva York.
- Witte, W. (1999). Antibiotic resistance in Gram-positive bacteria: epidemiological aspects. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **44**, 1-9.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* **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* **87**, 4576-4579.
- Wu, Q. L., Chatzinotas, A., Wang, J., Boeigk, J. (2009). Genetic diversity of eukaryotic plankton assemblages in eastern Tibetan lakes differing by their salinity and altitude. *Microb Ecol* **58**, 569-581.

- Wuchter, C., Schouten, S., Boschker, H. T. S., Sinninghe Damsté, J. S. (2003).** Bicarbonate uptake by marine *Crenarchaeota*. *FEMS Microbiology Letters* **219**, 203-207.
- Yakimov, M. M., Amro, M. M., Bock, M., Boseker, K., Fredrickson, H. L., Kessel, D., G. Timmis, K. N. (1997).** The potential of *Bacillus licheniformis* strains for in situ enhanced oil recovery. *Journal of Petroleum Science and Engineering* **18**, 147-160.
- Yi, H., Bae, K. S., Chun, J. (2004).** *Aestuariibacter salexigens* gen. nov., sp. nov. and *Aestuariibacter halophilus* sp. nov., isolated from tidal flat sediment, and emended description of *Alteromonas macleodii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**, 571-576.
- Yoon, J.-H., Yeo, S. H., Kim, I. G., Oh, T. K. (2004).** *Marinobacter flavimaris* sp. nov. and *Marinobacter daepoensis* sp. nov., slightly halophilic organisms isolated from sea water of the Yellow Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1799-1803.
- Yoshikawa, K., Takadera, T., Adachi, K., Nishijima, M., Sano, H. (1997).** Korormicin, a novel antibiotic specifically active against marine gram-negative bacteria, produced by a marine bacterium. *The Journal of antibiotics* **50**, 949-953.
- Zafrilla, B., Martinez-Espinosa, R., Alonso, M., Bonete, M. (2010).** Biodiversity of *Archaea* and floral of two inland saltern ecosystems in the Alto Vinalopo Valley, Spain. *Saline Systems* **6**, 10.
- Zalar, P., de Hoog, G. S., Gunde-Cimerman, N. (1999).** *Trimmatostroma salinum*, a new species from hypersaline water. *Stud Mycol* **43**, 57-62.
- Zengler, K., Toledo, G., Rappe, M., Elkins, J., Mathur, E. J., Short, J. M., Keller, M. (2002).** Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 15681-15686.
- Zengler, K., Walcher, M., Clark, G., y otros autores (2005).** High-throughput cultivation of microorganisms using microcapsules. *Methods Enzymol* **397**, 124-130.
- Zengler, K. (2009a).** Central role of the cell in microbial ecology. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**, 712-729.
- Zengler, K. (2009b).** Central Role of the Cell in Microbial Ecology. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**, 712-729.
- Zhang, J.-H., Chung, T. D. Y., Oldenburg, K. R. (1999).** A Simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *Journal of Biomolecular Screening* **4**, 67-73.

Zhang, Y., Jiao, N., Cottrell, M. T., Kirchman, D. L. (2006). Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production along a salinity gradient in the South China Sea. *Aquatic Microbial Ecology* **43**, 233-241.

Zheng, C. J., Lee, S., Lee, C. H. Kim, W.-G. (2007). Macrolactins O–R, Glycosylated 24-membered lactones from *Bacillus* sp. AH159-1. *Journal of Natural Products* **70**, 1632-1635.

Zhilina, T. N., Zavarzin, G. A. (1987). *Methanohalobium evestigatus*, n. gen., n. sp. The extremely halophilic methanogenic *Archaeobacterium*. *Doklady Akademii Nauk SSSR* **293**, 464-468.

ANEXOS

COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO UTILIZADO EN LA SELECCIÓN DE CEPAS

Medio MY modificado

(Moraine y Rogovin, 1966; Quesada y col., 1993)

Glucosa (Panreac [®])	1,0 g
Extracto de levadura (Difco [®])	0,3 g
Proteosa-peptona (Difco [®])	0,5 g
Extracto de malta (Panreac [®])	0,3 g
Solución de sales al 30 % c.s.p.	100 ml

Sales de Subow al 30% (p/v)

(Rodríguez-Valera y col., 1981)

NaCl (Panreac [®])	234,0 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O (Merck [®])	41,6 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O (Merck [®])	59,8 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O (Merck [®])	1,1 g
KCl (Merck [®])	6,0 g
NaHCO ₃ (Merck [®])	0,2 g
NaBr (Merck [®])	0,7 g
FeCl ₃ x 6H ₂ O (solución al 0,5 % (p/v))	0,65 ml
Agua destilada c.s.p	1.000 ml

COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO, SOLUCIONES Y REACTIVOS UTILIZADOS PARA LA CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS

Agar Mac Conkey (ADSA®) (McConkey, 1908)

Extracto de peptona	20,0 g
Lactosa	10,0 g
Sales biliares	2,5 g
NaCl	5,0 g
Agar	15,0 g
Rojo neutro	0,05 g
Cristal violeta	0,001 g
Solución de sales al 5,0 % (p/v) c.s.p.	1.000 ml

Medio de Norris y col. (1981)

Peptona (Panreac®)	5,0 g
Extracto de levadura (Panreac®)	3,0 g
Agar (Panreac®)	15,0 g
MnSO ₄ x H ₂ O (Merck®)	0,005 g
Solución de sales al 5,0 % (p/v) c.s.p.	1.000 ml

Medio para la prueba de hemolisis

Sangre bovina (Oxoid®)	50 ml
Agar (Panreac®)	2 g
Medio MY al 3 % (p/v) c.s.p.	100 ml

Preparación: al medio MY al 3 % (p/v) con agar esterilizado y enfriado a 50 °C se le añadió un 5 % (v/v) de sangre bovina y se repartió en placas

Medio para la prueba de hidrólisis de la tirosina

Tirosina (Sigma®)	0,5 g
Agar (Panreac®)	2 g
Medio MY al 5 % (p/v) c.s.p.	100 ml

Medio para la producción de lecitinasa

Emulsión de yema de huevo estéril	10 ml
Agar (Panreac®)	2 g
Medio MY al 5 % (p/v) c.s.p.	90 ml

Preparación: se preparó la emulsión recogiendo la yema de huevo sobre 250 ml de solución de sales al 5 % (p/v) y se le añadió al medio MY estéril para repartir en placas

Agar Cetrimida (Difco®)

Peptona	20,0 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O	1,4 g
K ₂ SO ₄	10,0 g
Cetrimida	0,3 g
Agar	13,6 g
Solución de sales al 5,0 % (p/v) c.s.p.	1.000 ml

Agar DNAsa (ADSA®)

Triptona	20,0 g
ADN	2,0 g
NaCl	5,0 g
Agar	13,6 g
Solución de sales al 5,0 % (p/v) c.s.p.	1.000 ml

Medio para la prueba de hidrólisis de la esculina

Esculina (Avocado®)	0,1 g
Citrato férrico (Panreac®)	0,05 g
Agar (Panreac®)	2 g
Medio MY al 5 % (p/v) c.s.p.	100 ml

Medio para la prueba de hidrólisis de tween 20 y tween 80

Tween 20 o Tween 80	1 ml
Agar (Panreac®)	2 g
Medio MY al 5 % (p/v) c.s.p.	100 ml

Preparación: se esterilizó el tween mediante calor seco y se añadió al medio MY al 5 % (p/v) estéril previo a repartirlo en placas

Medio para la producción de fosfatasa

Solución acuosa de difosfato de fenoltaleína al 1 % (p/v)	0,01 ml
Agar (Panreac®)	2 g
Medio MY al 5 % (p/v) c.s.p.	100 ml

Preparación: La solución acuosa se filtró y se añadió al medio MY estéril. Se repartió después en placas

Medio para la hidrólisis de la caseína

Lecha desnatada	500 ml
Agar (Panreac®)	10 g
Medio MY al 5 % (p/v) c.s.p.	500 ml

Preparación: se esterilizó el medio MY preparado a doble concentración. Una vez enfriado, se añadió el mismo volumen de leche desnatada y se repartió en placas

Medio de cultivo para la reducción de nitratos

Extracto de levadura (Difco®)	10,0 g
Proteosa-peptona n°3 (Difco®)	5,0 g
Glucosa (Panreac®)	1,0 g
Nitrato potásico (Panreac®)	1,0 g
Solución de sales al 5 % (p/v) c.s.p	1.000 ml

Reactivos para la detección de nitritos en el medio

(Skerman, 1967)

Reactivo A: solución al 0,8 % (p/v), de ácido sulfanílico en ácido acético 5N

Reactivo B: solución al 0,5 % (p/v), de α -naftilamina en ácido acético 5 N

Medio de Koser

Koser (1923)

NaCl (Panreac®)	75,0 g
KCl (Merck®)	2,0 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O (Merck®)	0,2 g
KNO ₃ (Merck®)	1,0 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄ (Panreac®)	1,0 g
KH ₂ PO ₄ (Panreac®)	0,5 g
Agua destilada c.s.p	1.000 ml

Medio M1

Extracto de levadura (Panreac®)	5 g
Solución de sales al 25 % (p/v) c.s.p.	1.000 ml

Medio de cultivo para producción de ácidos de la glucosa

(Ventosa y col., 1982)

Extracto de levadura (Difco®)	10,0 g
Proteosa-peptona (Difco®)	5,0 g

Rojo fenol (solución acuosa al 0,04 %, p/v) 20 ml

Glucosa (Panreac®)	0,1 g
Solución de sales al 5 % (p/v) c.s.p	1.000 ml

Medio de cultivo para la respiración sobre nitratos

(Stanier y col., 1966)

Glicerol (Panreac®)	1,0 g
Extracto de levadura (Difco®)	0,3 g
Proteosa-peptona n°3 (Difco®)	0,5 g
Nitrato potásico (Merck®)	1 g
Rojo fenol (solución acuosa al 0,04 %, p/v)	20 ml
Solución de sales al 5 % (p/v) c.s.p	1.000 ml

Solución de lugol

(Cowan y Steel, 1993)

I ₂ (Panreac®)	3,0 g
Agua destilada c.s.p	1.000 ml

Preparación: Se mezclaron todos los reactivos. La mezcla se dejó reposar durante 24 horas y se filtró.

Medio Casamino modificado

(Tindall, 1992)

Casaminoácidos (Sigma®)	0,5 g
Glutamato sódico (Difco®)	0,1 g
KCl (Merck®)	0,2 g
Na ₃ C ₃ H ₅ O (COO) ₃ (Merck®)	0,3 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O (Merck®)	2,0 g
NaCl (Panreac®)	20 g
Extracto de levadura (Panreac®)	0,5 g
MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,036 g
FeCl ₂ x 4H ₂ O	3,6 mg
Agua destilada c.s.p	1.000 ml

Anexo II

Medio Casamino

(Tindall y Collins, 1986)

Casaminoácidos (Sigma [®])	1,5 g
Na ₃ C ₃ H ₅ O (COO) ₃ x 2H ₂ O (Merck [®])	0,3 g
Glutamato sódico (Difco [®])	0,25 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O (Merck [®])	0,25 g
KCl (Merck [®])	0,2 g
NaCl (Panreac [®])	25 g
Agua destilada c.s.p	1.000 ml

Medio de cultivo para el requerimiento de magnesio

(Oren, 1977b)

Extracto de Levadura (Panreac [®])	5 g
Glucosa (Panreac [®])	2,0 g
NaCl (Panreac [®])	195 g
Na ₂ SO ₄ (Panreac [®])	35 g
KCl (Merck [®])	5 g
CaCl ₂ (Panreac [®])	0,83 g
NaBr (Panreac [®])	0,58 g
NaHCO ₃ (Panreac [®])	0,17 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O (Panreac [®])	
Agua destilada c.s.p	1.000 ml

Preparación: Se mezclaron todos los componentes y añadiendo MgCl₂ x 6 H₂O en concentraciones crecientes

Medio para la fermentación de la glucosa

(Cowan y Steel, 1982)

Medio de Clark-Lubbs c.s.p.	100 ml
Glucosa	0,5 g
Solución de sales al 25 % (p/v) s.s.p.	100 ml

Solución de rojo de metilo

(Barritt, 1936)

Rojo de metilo (Merck [®])	0,4 g
Etanol (Probus [®])	400 ml
Agua destilada c.s.p	1.000 ml

Reactivo de Kovacs

(Kovacs, 1928)

<i>p</i> -dimetilaminobenzaldehído	5 g
HCl concentrado (Panreac [®])	75 ml
Alcohol amílico (Panreac [®])	25 ml

Preparación: Se disolvió el aldehído en alcohol por calentamiento suave en baño María, se dejó enfriar y se añadió el ácido clorhídrico

Medio para la producción de gelatinasa

(Kovacs, 1928)

Triptona (Panreac [®])	0,1 g
Agar (Panreac [®])	2 g
Medio M1 al 25 % (p/v) c.s.p.	100 ml

Medio para la producción de gelatinasa

(Frazier, 1926; Sneath y Collins, 1974)

Gelatina (Panreac [®])	1 g
Agar (Panreac [®])	2 g
Medio M1 al 25 % (p/v) c.s.p.	100 ml

Medio para la producción de ácidos

Solución acuosa de rojo fenol (0,04 %, p/v)	20 ml
Medio M1 al 25 % (p/v) c.s.p.	100 ml

Reactivo de Frazier

(Frazier, 1926)

Cloruro de mercurio (Sigma [®])	12,0 g
HCl concentrado (Panreac [®])	16 ml
Agua destilada c.s.p	80 ml

Preparación: Se mezcló el cloruro de mercurio con el agua y a continuación se añadió el ácido clorhídrico agitándose hasta completa disolución.

COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES UTILIZADAS EN EL ESTUDIO GENOTÍPICO Y FILOGENÉTICO

Solución 1 (extracción de ADN)

(Martín-Platero y col., 2007)

Sacarosa (10 %, p/v)	5 g
Tris-HCl 1 M (pH 8)	1,25 ml
Agua bidestilada c.s.p	50 ml

Solución 2 (extracción de ADN)

(Martín-Platero y col., 2007)

Tris-HCl 1M (pH8)	5 ml
EDTA 0,5m	10 ml
NaCl 5 M	20 µl
SDS 10 % (p/v)	1 ml
Agua bidestilada c.s.p	50 ml

Solución 3 (extracción de ADN)

(Martín-Platero y col., 2007)

Acetato sódico 3 M (pH5)	60 ml
--------------------------	-------

SSC 0,1X

Citrato sódico (Sigma®)	0,4 g
NaCl (Sigma®)	0,08 g
Agua bidestilada c.s.p	100 ml

Medio para selección de colonias con plásmido

Solución de X-Gal (80 mg/ml de dimetilformamida)(Sigma®)
Ampicilina 1.000x) (Sigma®)
Medio LB

500 µl
800 µl
500 µl
500 ml

Medio mínimo

(Argandoña y col., 2001)

Extracto de levadura (Difco®)	0,4 g
Proteosa-peptona nº3 (Difco®)	0,2 g
Solución de sales al 5 % (p/v)	16,6 ml
Agua bidestilada c.s.p	100 ml

TBE 10X

Trizma Base (Sigma®)	54 g
Ácido bórico (Sigma®)	27,5 g
EDTA (Sigma®) 0,5 M, pH 8	20 ml
Agua bidestilada c.s.p	500 ml

Medio LB sólido

Tripton (Panreac®)	1 g
Extracto de levadura (Panreac®)	0,5 g
NaCl (Panreac®)	1 g
Agar (Panreac®)	2 g
Agua bidestilada c.s.p	100 ml

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS FENOTÍPICAS REALIZADAS EN LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Tabla 1. Características morfológicas y coloniales

Gram: Tinción de Gram

Morf: Morfología

Pig: Pigmentación de las colonias. C: crema; A: amarillo;

Muc: Mucosidad de las colonias. 0: no mucosas; 1: mucosas; 2: muy mucosas

CEPAS UTILIZADAS COMO DE REFERENCIA

R1 , <i>Brevundimonas mediterranea</i>	R18 , <i>Halomonas ventosae</i>
R2 , <i>Halomonas alimentaria</i>	R19 , <i>Idiomarina fortilapidosi</i>
R3 , <i>Halomonas almeriensis</i>	R20 , <i>Idiomarina ramblicola</i>
R4 , <i>Halomonas anticariensis</i>	R21 , <i>Kushneria marisflavi</i>
R5 , <i>Halomonas campaniensis</i>	R22 , <i>Marinobacter algicola</i>
R6 , <i>Halomonas campisalis</i>	R23 , <i>Marinobacter guineae</i>
R7 , <i>Halomonas cerina</i>	R24 , <i>Marinobacter hydrocarbonoclastic</i>
R8 , <i>Halomonas denitrificans</i>	R25 , <i>Marinobacter lipolyticus</i>
R9 , <i>Halomonas desiderata</i>	R26 , <i>Palleronia marismirons</i>
R10 , <i>Halomonas eurihalina</i>	R27 , <i>Pseudoalteromonas carragenovera</i>
R11 , <i>Halomonas fontilapidosi</i>	R28 , <i>Pseudomonas halophila</i>
R12 , <i>Halomonas gudaonensis</i>	R29 , <i>Salinicola marasensis</i>
R13 , <i>Halomonas koreensis</i>	R30 , <i>Salinivibrio costicola</i>
R14 , <i>Halomonas nitroreducens</i>	R31 , <i>Salipiger mucescens</i>
R15 , <i>Halomonas organivorans</i>	R32 , <i>Vibrio aerogenes</i>
R16 , <i>Halomonas shengliensis</i>	R33 , <i>Vibrio furniissi</i>
R17 , <i>Halomonas subglaciescola</i>	R34 , <i>Yersinia massiliensis</i>

Tabla 1. Características morfológicas y coloniales

CEPA	Gram	Morf	Pig	Muc	Mov	CEPA	Gram	Morf	Pig	Muc	Mov	CEPA	Gram	Morf	Pig	Muc	Mov
M2-87-I	-	B	C	2	+	M2-41	-	B	C	2	D	M4-1	-	B	C	2	+
M1-100	-	B	C	2	-	M2-42	-	B	C	2	+	M4-101	-	B	C	2	+
M1-103	-	B	C	2	+	M2-43	-	B	C	2	+	M4-102	-	B	C	2	+
M1-103-X	-	B	C	2	+	M2-5	-	B	C	2	+	M4-104	-	B	C	2	+
M1-107	-	B	C	2	+	M2-56	-	B	C	2	-	M4-107	-	B	C	2	+
M1-110	-	B	C	2	-	M2-57	-	B	C	2	+	M4-11	-	B	C	2	+
M1-111	-	B	C	2	-	M2-58	-	B	C	2	+	M4-12	-	B	C	2	-
M1-112	-	B	C	2	-	M2-59	-	B	C	2	+	M4-13	-	B	C	2	+
M1-114	-	B	C	2	-	M2-6	-	B	C	2	-	M4-15	-	B	C	2	-
M1-115-I	-	B	C	2	+	M2-61	-	B	C	2	-	M4-16	-	B	C	2	+
M1-115-II	-	B	C	2	+	M2-62	-	B	C	2	+	M4-17	-	B	C	2	+
M1-116	-	B	C	2	+	M2-63	-	B	C	2	+	M4-19	-	B	C	2	-
M1-117	-	B	C	2	-	M2-66-B	-	B	C	2	+	M4-2	-	B	C	2	-
M1-118	-	B	C	2	+	M2-66-M	-	B	C	2	+	M4-20	-	B	C	2	+
M1-120	-	B	C	2	-	M2-69	-	B	C	2	D	M4-22	-	B	C	2	+
M1-122	-	B	C	2	+	M2-7	-	B	C	2	+	M4-23	-	B	C	2	+
M1-124	-	B	C	2	+	M2-71	-	B	C	2	+	M4-24	-	B	C	2	-
M1-125	-	B	C	2	-	M2-72	-	B	C	2	+	M4-26	-	B	C	2	+
M1-126	-	B	C	2	+	M2-76	-	B	C	2	+	M4-28	-	B	C	2	+
M1-127	-	B	C	2	-	M2-77	-	B	C	2	+	M4-29	-	B	C	2	+
M1-130	-	B	C	2	-	M2-78	-	B	C	2	+	M4-3	-	B	C	2	+
M1-131	-	B	C	2	+	M2-79	-	B	C	2	-	M4-30	-	B	C	2	+
M1-135	-	B	C	2	+	M2-81	-	B	C	2	D	M4-31	-	B	C	2	-

Anexo III

Tabla 1. Continuación

CEPA	Gram	Morf	Pig	Muc	Mov	CEPA	Gram	Morf	Pig	Muc	Mov	CEPA	Gram	Morf	Pig	Muc	Mov
M1-137	-	B	C	2	-	M2-82	-	B	C	2	-	M4-33	-	B	C	2	+
M1-138	-	B	C	2	-	M2-83	-	B	C	2	+	M4-35	-	B	C	2	+
M1-141	-	B	C	2	+	M2-85	-	B	C	2	-	M4-36	-	B	C	2	+
M1-142	-	B	C	2	+	M2-87-II	-	B	C	2	+	M4-37	-	B	C	2	+
M1-144	-	B	C	2	+	M2-88	-	B	C	2	+	M4-38	-	B	C	2	-
M1-145	-	B	C	2	+	M2-89	-	B	C	2	+	M4-39	-	B	C	2	-
M1-14-X	-	B	C	2	-	M2-9	-	B	C	2	+	M4-3B	-	B	C	2	+
M1-16-X	-	B	C	2	-	M2-X	-	B	C	2	-	M4-3M	-	B	C	2	+
M1-180	-	B	C	2	+	M2-XX	-	B	C	2	+	M4-4	-	B	C	2	-
M1-187-I	-	B	C	2	+	M2-XXX	-	B	C	2	-	M4-40	-	B	C	2	-
M1-187-II	-	B	C	2	-	M2-3X	-	B	C	2	+	M4-43	-	B	C	2	+
M1-190	-	B	C	2	+	M3-1	-	B	C	2	+	M4-44	-	B	C	2	+
M1-191-I	-	B	C	2	+	M3-100	-	B	C	2	+	M4-45	-	B	C	2	-
M1-191-II	-	B	C	2	+	M3-110	-	B	C	2	+	M4-46	-	B	C	2	-
M1-192	-	B	C	2	+	M3-112	-	B	C	2	+	M4-47	-	B	C	2	-
M1-193-I	-	B	C	2	+	M3-12	-	B	C	2	+	M4-48	-	B	C	2	-
M1-193-II	-	B	C	2	+	M3-120	-	B	C	2	+	M4-49	-	B	C	2	+
M1-194	-	B	C	2	-	M3-121	-	B	C	2	+	M4-5	-	B	C	2	-
M1-196	-	B	C	2	+	M3-125	-	B	C	2	+	M4-50	-	B	C	2	-
M1-198	-	B	C	2	-	M3-127	-	B	C	2	+	M4-51	-	B	C	2	-
M1-199	-	B	C	2	-	M3-128	-	B	C	2	+	M4-52	-	B	C	2	+
M1-200	-	B	C	2	-	M3-129	-	B	C	2	+	M4-53	-	B	C	2	+
M1-201	-	B	C	2	-	M3-13	-	B	C	2	+	M4-55	-	B	C	2	-
M1-202	-	B	C	2	+	M3-130	-	B	C	2	+	M4-56	-	B	C	2	-
M1-21-X	-	B	C	2	-	M3-131	-	B	C	2	+	M4-57	-	B	C	2	-
M1-5-X	-	B	C	2	-	M3-15	-	B	C	2	+	M4-58	-	B	C	2	-
M1-X	-	B	C	2	+	M3-18	-	B	C	2	+	M4-59	-	B	C	2	-

Tabla 1. Continuación

CEPA	Gram	Morf	Pig	Muc	Mov	CEPA	Gram	Morf	Pig	Muc	Mov	CEPA	Gram	Morf	Pig	Muc	Mov
M1-XX	-	B	C	2	+	M3-2	-	B	C	2	+	M4-5a	-	B	C	2	-
M2-10	-	B	C	2	+	M3-22	-	B	C	2	+	M4-6	-	B	C	2	-
M2-11	-	B	C	2	+	M3-23	-	B	C	2	+	M4-60	-	B	C	2	-
M2-12	-	B	C	2	+	M3-24	-	B	C	2	+	M4-62	-	B	C	2	-
M2-13	-	B	C	2	+	M3-25	-	B	C	2	+	M4-63	-	B	C	2	-
M2-139	-	B	C	2	+	M3-26	-	B	C	2	+	M4-64	-	B	C	2	-
M2-14	-	B	C	2	-	M3-27	-	B	C	2	+	M4-65	-	B	C	2	-
M2-140-II	-	B	C	2	+	M3-28	-	B	C	2	+	M4-66	-	B	C	2	-
M2-146	-	B	C	2	-	M3-3	-	B	C	2	+	M4-67	-	B	C	2	+
M2-147	-	B	C	2	+	M3-32	-	B	C	2	+	M4-68	-	B	C	2	+
M2-148	-	B	C	2	-	M3-33	-	B	C	2	+	M4-69	-	B	C	2	+
M2-149	-	B	C	2	+	M3-34	-	B	C	2	+	M4-7	-	B	C	2	+
M2-15	-	B	C	2	-	M3-35	-	B	C	2	+	M4-70	-	B	C	2	+
M2-150	-	B	C	2	+	M3-36	-	B	C	2	-	M4-71	-	B	C	2	+
M2-151	-	B	C	2	+	M3-37	-	B	C	2	+	M4-72	-	B	C	2	+
M2-153	-	B	C	2	-	M3-38	-	B	C	2	+	M4-73	-	B	C	2	+
M2-154	-	B	C	2	-	M3-39	-	B	C	2	+	M4-74	-	B	C	2	+
M2-155	-	B	C	2	+	M3-4	-	B	C	2	-	M4-76	-	B	C	2	+
M2-156	-	B	C	2	+	M3-40	-	B	C	2	+	M4-79	-	B	C	2	+
M2-157	-	B	C	2	+	M3-41	-	B	C	2	+	M4-80	-	B	C	2	+
M2-158	-	B	C	2	+	M3-42	-	B	C	2	+	M4-81	-	B	C	2	+
M2-160	-	B	C	2	-	M3-43	-	B	C	2	-	M4-82	-	B	C	2	+
M2-162	-	B	C	2	-	M3-44	-	B	C	2	+	M4-83	-	B	C	2	+

Anexo III

Tabla 1. Continuación

CEPA	Gram	Morf	Pig	Muc	Mov	CEPA	Gram	Morf	Pig	Muc	Mov	CEPA	Gram	Morf	Pig	Muc	Mov
M2-163	-	B	C	2	+	M3-45	-	B	C	2	+	M4-84	-	B	C	2	+
M2-164	-	B	C	2	+	M3-46	-	B	C	2	+	M4-85	-	B	C	2	+
M2-165	-	B	C	2	+	M3-47	-	B	C	2	+	M4-86	-	B	C	2	+
M2-166	-	B	C	2	-	M3-48	-	B	C	2	+	M4-87	-	B	C	2	+
M2-167	-	B	C	2	-	M3-50	-	B	C	2	+	M4-91	-	B	C	2	+
M2-168	-	B	C	2	+	M3-52	-	B	C	2	+	M4-92	-	B	C	2	+
M2-169	-	B	C	2	-	M3-55	-	B	C	2	+	M4-93	-	B	C	2	+
M2-17	-	B	C	2	+	M3-56	-	B	C	2	+	R1	-	B	C	1	ND
M2-171	-	B	C	2	+	M3-57	-	B	C	2	+	R2	-	B	C	1	-
M2-173	-	B	C	2	-	M3-59	-	B	C	2	-	R3	-	B	C	2	-
M2-174	-	B	C	2	-	M3-6	-	B	C	2	+	R4	-	B	C	1	+
M2-175	-	B	C	2	+	M3-60	-	B	C	2	+	R5	-	B	C	1	+
M2-176	-	B	C	2	+	M3-61	-	B	C	2	+	R6	-	B	C	1	+
M2-177	-	B	C	2	-	M3-62	-	B	C	2	+	R7	-	B	C	2	-
M2-178	-	B	C	2	+	M3-63	-	B	C	2	+	R8	-	B	C	1	+
M2-18	-	B	C	2	+	M3-64	-	B	C	2	+	R9	-	B	C	1	+
M2-180	-	B	C	2	D	M3-7	-	B	C	2	+	R10	-	B	C	2	-
M2-182	-	B	C	2	-	M3-70	-	B	C	2	+	R11	-	B	C	2	+
M2-183	-	B	C	2	+	M3-73	-	B	C	2	-	R12	-	B	C	1	+
M2-183-X	-	B	C	2	+	M3-74	-	B	C	2	+	R13	-	B	C	1	+
M2-19	-	B	C	2	+	M3-78	-	B	C	2	+	R14	-	B	C	2	-
M2-204	-	B	C	2	+	M3-79	-	B	C	2	+	R15	-	B	C	1	+
M2-21	-	B	C	2	+	M3-8	-	B	C	2	+	R16	-	B	C	1	+
M2-22	-	B	C	2	-	M3-80	-	B	C	2	+	R17	-	B	C	2	+
M2-23	-	B	C	2	+	M3-81	-	B	C	2	+	R18	-	B	C	2	+
M2-25	-	B	C	2	-	M3-84	-	B	C	2	+	R19	-	B	C	1	+
M2-26	-	B	C	2	+	M3-85	-	B	C	2	+	R20	-	B	C	1	+

Tabla 1. Continuación

CEPA	Gram	Morf	Pig	Muc	Mov	CEPA	Gram	Morf	Pig	Muc	Mov	CEPA	Gram	Morf	Pig	Muc	Mov
M2-27	-	B	C	2	-	M3-86	-	B	C	2	+	R21	-	B	A	1	+
M2-28	-	B	C	2	+	M3-87	-	B	C	2	+	R22	-	B	C	1	+
M2-29	-	B	C	2	+	M3-88	-	B	C	2	+	R23	-	B	C	1	+
M2-2-X	-	B	C	2	+	M3-89	-	B	C	2	+	R24	-	B	C	1	-
M2-30	-	B	C	2	-	M3-9	-	B	C	2	-	R25	-	B	C	1	+
M2-31	-	B	C	2	-	M3-90	-	B	C	2	+	R26	-	B	C	1	-
M2-32	-	B	C	2	-	M3-91	-	B	C	2	+	R27	-	B	C	1	+
M2-33	-	B	C	2	-	M3-93	-	B	C	2	+	R28	-	B	C	1	+
M2-34	-	B	C	2	+	M3-94	-	B	C	2	+	R29	-	b	c	1	+
M2-35	-	B	C	2	+	M3-95	-	B	C	2	+	R30	-	B	C	1	+
M2-36	-	B	C	2	D	M3-97	-	B	C	2	+	R31	-	B	C	1	+
M2-37	-	B	C	2	D	M3-XX	-	B	C	2	+	R32	-	B	C	1	+
M2-38	-	B	C	2	D	M4-88	-	B	C	2	+	R33	-	B	C	1	+
M2-4	-	B	C	2	+	M4-89	-	B	C	2	+	R34	-	B	C	1	+
M3-49	-	B	C	2	+	M4-9	-	B	C	2	+						
M3-5	-	B	C	2	+	M4-90	-	B	C	2	+						

Anexo III

Tabla 2. Características fisiológicas

Crecimiento distintas concentraciones de sal (% p/v)

Crecimiento a distintas temperaturas (°C)

Crecimiento a distintos valores de pH

Tabla 2. Características fisiológicas

CEPA	sales (%)								pH						T (°C)				
	1	3	5	7,5	10	15	20	30	5	6	7	8	9	10	22	32	37	45	55
M2-87-I	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-103	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-103-X	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-107	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-110	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-111	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-112	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-114	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-115-I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-115-II	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-116	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-117	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-118	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-120	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D	-
M1-122	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-124	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-126	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-127	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-130	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D
M1-131	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-135	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M1-137	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-138	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-141	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-142	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M1-144	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-145	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-14-X	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-16-X	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-180	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-187-I	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-187-II	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-190	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-191-I	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-191-II	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-192	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M1-193-I	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-193-II	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Tabla 2. Características fisiológicas

CEPA	sales (%)								pH						T (°C)				
	1	3	5	7,5	10	15	20	30	5	6	7	8	9	10	22	32	37	45	55
M2-175	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-176	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-177	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M2-178	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-18	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-180	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M2-182	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-183	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-183-X	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-19	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-204	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-21	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-22	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M2-23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-26	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-27	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-28	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-29	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M2-2-X	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-30	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	D	+	+	+	+	D
M2-31	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-32	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-33	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-34	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-35	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M2-36	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M2-37	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-38	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M2-4	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-41	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M2-42	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-43	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-5	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-56	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-57	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-58	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-59	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
M2-6	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-61	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-62	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Tabla 2. Características fisiológicas

CEPA	sales (%)								pH						T (°C)				
	1	3	5	7,5	10	15	20	30	5	6	7	8	9	10	22	32	37	45	55
M3-23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-24	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-25	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
M3-26	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-27	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-28	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-3	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-33	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-34	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-35	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-36	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-4	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-41	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-42	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-43	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-45	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-46	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-47	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-48	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-49	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-50	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-52	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-55	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-56	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-57	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-59	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M3-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-61	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-62	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-63	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-7	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-70	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Anexo III

Tabla 2. Características fisiológicas

CEPA	sales (%)								pH						T (°C)				
	1	3	5	7,5	10	15	20	30	5	6	7	8	9	10	22	32	37	45	55
M3-73	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
M3-74	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
M3-78	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
M3-79	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
M3-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-80	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
M3-81	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-84	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-85	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-86	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-87	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-88	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-89	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
M3-9	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-90	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
M3-91	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-93	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-94	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-95	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-97	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-XX	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-3X	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-1	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-101	+	D	D	+	D	D	D	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M4-102	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-
M4-104	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-107	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-11	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-12	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-13	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-15	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-16	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-19	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-2	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-20	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M4-22	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-23	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-24	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M4-26	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
M4-28	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
M4-29	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-3	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-30	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-31	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-

Tabla 2. Características fisiológicas

CEPA	sales (%)								pH						T (°C)				
	1	3	5	7,5	10	15	20	30	5	6	7	8	9	10	22	32	37	45	55
M4-33	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-35	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-36	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-37	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M4-38	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-39	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-3B	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M4-3M	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M4-4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M4-40	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-43	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-44	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M4-45	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-46	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-47	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-48	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-49	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M4-50	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-51	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-52	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
M4-53	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-55	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-56	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-57	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-
M4-58	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M4-59	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-5a	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-6	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M4-60	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-62	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-63	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M4-64	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-65	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-66	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M4-67	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-68	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
M4-69	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-7	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-70	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Tabla 2. Características fisiológicas

CEPA	sales (%)								pH						T (°C)				
	1	3	5	7,5	10	15	20	30	5	6	7	8	9	10	22	32	37	45	55
M4-71	-	D	D	+	+	D	D	D	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
M4-72	-	D	D	+	+	D	D	D	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
M4-73	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-74	-	D	D	+	+	D	D	D	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
M4-76	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-79	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-80	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-81	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M4-82	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-83	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-84	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-85	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-86	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-87	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M4-88	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-89	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-9	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M4-90	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M4-91	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
M4-92	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-93	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R1	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
R2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R3	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
R4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	D
R5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D
R6	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	D
R7	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D
R8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D
R9	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R10	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R11	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	D
R12	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D
R13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D
R14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D
R15	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D
R17	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R18	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
R19	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D
R20	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
R21	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
R22	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R23	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-

Tabla 2. Características fisiológicas

CEPA	sales (%)								pH						T (°C)				
	1	3	5	7,5	10	15	20	30	5	6	7	8	9	10	22	32	37	45	55
R24	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R25	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R26	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
R27	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
R28	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	D
R29	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
R30	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R31	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
R32	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
R33	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
R34	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-

Tabla 3. Pruebas bioquímicas (I).

Cat: catalasa

Ox: oxidasa

NR: presencia de nitrato reductasa

nr: presencia de nitrito reductasa

Esp: producción de esporas

CA: crecimiento en anaerobiosis

O/F: oxido-fermentación

Resp. NO₃⁻: respiración sobre nitrato

Prod. gas: producción de gas por
respiración sobre nitrato

McC: crecimiento en agar McConkey

Alm: hidrólisis del almidón

Lec: producción de lecitinasa

Fosf: producción de fosfatasa

Esc: hidrólisis de la esculina

DNA: producción de DNAsa

TW20 y 80: hidrólisis del Tween20 y 80

AS: hemolisis

Cas: hidrólisis de la caseína

Tir: hidrólisis de la tirosina

P.Tir: pigmento de la tirosina

Cet: crecimiento en agar cetrimida

Tabla 3. Pruebas bioquímicas (I).

CEPA	Cat	Ox	NR	nr	Esp	CA	O/F	Resp. NO ₃	Prod. gas	McC	Alm	Lec	Fosf	Esc	DNA	TW20	TW80	AS	Cas	Tir	P.Tir	Cet
M2-87-I	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
M1-100	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-
M1-103	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
M1-103-X	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
M1-107	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
M1-110	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
M1-111	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
M1-112	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-
M1-114	+	-	+	-	-	D	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
M1-115-I	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
M1-115-II	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
M1-116	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
M1-117	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
M1-118	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
M1-120	+	-	-	-	-	D	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
M1-122	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
M1-124	+	+	+	+	-	D	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M1-125	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
M1-126	+	+	+	+	-	D	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-
M1-127	+	+	+	-	-	D	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
M1-130	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
M1-131	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
M1-135	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-

Tabla 3. Continuación

CEPA	Cat	Ox	NR	nr	Esp	CA	O/F	Resp. NO ₃	Prod. gas	McC	Alm	Lec	Fosf	Esc	DNA	TW20	TW80	AS	Cas	Tir	P.Tir	Cet
M1-137	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
M1-138	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
M1-141	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
M1-142	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
M1-144	+	+	+	-	+	D	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
M1-145	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-14-X	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
M1-16-X	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
M1-180	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
M1-187-I	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
M1-187-II	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+
M1-190	+	+	+	-	-	D	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M1-191-I	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
M1-191-II	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
M1-192	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
M1-193-I	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
M1-193-II	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
M1-194	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+
M1-196	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
M1-198	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
M1-199	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M1-200	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M1-201	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+
M1-202	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-

Tabla 3. Continuación

CEPA	Cat	Ox	NR	nr	Esp	CA	O/F	Resp. NO ₃	Prod. gas	McC	Alm	Lec	Fosf	Esc	DNA	TW20	TW80	AS	Cas	Tir	P.Tir	Cet	
M1-21-X	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	
M1-5-X	+	-	-	-	-	D	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	
M1-X	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	
M1-XX	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
M2-10	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	
M2-11	+	+	+	+	-	D	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	
M2-12	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	
M2-13	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	
M2-139	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
M2-14	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	
M2-140-II	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
M2-146	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	
M2-147	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	
M2-148	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	
M2-149	+	+	+	+	-	D	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	
M2-15	+	+	+	+	-	D	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	
M2-150	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	
M2-151	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	
M2-153	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	
M2-154	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	
M2-155	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	
M2-156	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	
M2-157	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	
M2-158	+	-	+	-	-	D	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	

Tabla 3. Continuación

CEPA	Cat	Ox	NR	nr	Esp	CA	O/F	Resp. NO ₃	Prod. gas	McC	Alm	Lec	Fosf	Esc	DNA	TW20	TW80	AS	Cas	Tir	P.Tir	Cet
M2-160	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
M2-162	+	-	+	-	-	D	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
M2-163	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
M2-164	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
M2-165	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
M2-166	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
M2-167	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
M2-168	+	+	+	+	-	D	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
M2-169	+	+	+	-	-	D	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
M2-17	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
M2-171	+	+	+	-	-	D	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
M2-173	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
M2-174	+	+	+	-	-	D	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
M2-175	+	+	+	-	-	D	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
M2-176	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
M2-177	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
M2-178	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
M2-18	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
M2-180	-	-	+	-	-	D	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
M2-182	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-183	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
M2-183-X	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
M2-19	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+
M2-204	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
M2-21	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+

Tabla 3. Continuación

CEPA	Cat	Ox	NR	nr	Esp	CA	O/F	Resp. NO ₃	Prod. gas	McC	Alm	Lec	Fosf	Esc	DNA	TW20	TW80	AS	Cas	Tir	P.Tir	Cet
M2-22	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+
M2-23	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+
M2-25	+	-	+	-	-	D	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
M2-26	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
M2-27	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M2-28	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
M2-29	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M2-2-X	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
M2-30	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
M2-31	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
M2-32	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
M2-33	+	+	+	+	-	D	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+
M2-34	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
M2-35	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M2-36	-	+	+	-	-	D	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
M2-37	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
M2-38	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
M2-4	+	+	+	+	-	D	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
M2-41	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
M2-42	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
M2-43	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
M2-5	+	+	+	+	-	D	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
M2-56	+	-	+	-	-	D	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
M2-57	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+

Tabla 3. Continuación

CEPA	Cat	Ox	NR	nr	Esp	CA	O/F	Resp. NO ₃	Prod. gas	McC	Alm	Lec	Fosf	Esc	DNA	TW20	TW80	AS	Cas	Tir	P.Tir	Cet
M2-58	+	-	+	+	-	D	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
M2-59	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
M2-6	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
M2-62	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
M2-63	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
M2-66-B	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
M2-66-M	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
M2-69	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
M2-7	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
M2-71	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
M2-72	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M2-76	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
M2-77	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
M2-78	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M2-79	+	-	-	-	-	D	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
M2-81	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
M2-82	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M2-83	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
M2-85	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
M2-87-II	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
M2-88	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
M2-89	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
M2-9	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
M2-X	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+
M2-XX	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+
M2-XXX	+	-	+	-	-	D	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

Tabla 3. Continuación

CEPA	Cat	Ox	NR	nr	Esp	CA	O/F	Resp. NO ₃	Prod. gas	McC	Alm	Lec	Fosf	Esc	DNA	TW20	TW80	AS	Cas	Tir	P.Tir	Cet
M2-4X	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
M3-1	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
M3-100	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
M3-110	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
M3-112	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-
M3-12	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
M3-120	+	+	+	-	-	-	D	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
M3-121	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
M3-125	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
M3-127	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
M3-128	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
M3-129	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
M3-13	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
M3-130	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
M3-131	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
M3-15	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
M3-18	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
M3-2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
M3-22	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
M3-23	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
M3-24	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
M3-25	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
M3-26	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+

Tabla 3. Continuación

CEPA	Cat	Ox	NR	nr	Esp	CA	O/F	Resp. NO ₃	Prod. gas	McC	Alm	Lec	Fosf	Esc	DNA	TW20	TW80	AS	Cas	Tir	P.Tir	Cet
M3-27	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
M3-28	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
M3-3	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
M3-32	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
M3-33	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
M3-34	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
M3-35	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
M3-36	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
M3-37	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
M3-38	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
M3-39	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
M3-4	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
M3-40	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
M3-41	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
M3-42	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
M3-43	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-
M3-44	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
M3-45	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
M3-46	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-
M3-47	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
M3-48	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+
M3-49	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
M3-5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
M3-50	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
M3-52	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M3-55	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+

Tabla 3. Continuación

CEPA	Cat	Ox	NR	nr	Esp	CA	O/F	Resp. NO ₃	Prod. gas	McC	Alm	Lec	Fosf	Esc	DNA	TW20	TW80	AS	Cas	Tir	P.Tir	Cet
M3-56	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
M3-57	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
M3-59	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
M3-6	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
M3-60	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
M3-61	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
M3-62	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
M3-63	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
M3-64	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
M3-7	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
M3-70	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
M3-73	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
M3-74	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
M3-78	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
M3-79	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
M3-8	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
M3-80	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
M3-81	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
M3-84	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
M3-85	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
M3-86	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-87	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
M3-88	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
M3-89	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

Tabla 3. Continuación

CEPA	Cat	Ox	NR	nr	Esp	CA	O/F	Resp. NO ₃	Prod. gas	McC	Alm	Lec	Fosf	Esc	DNA	TW20	TW80	AS	Cas	Tir	P.Tir	Cet
M3-9	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
M3-90	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
M3-91	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-93	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
M3-94	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
M3-95	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
M3-97	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
M3-XX	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
M3-4X	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
M4-1	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
M4-101	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M4-102	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
M4-104	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+
M4-107	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
M4-11	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
M4-12	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M4-13	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
M4-15	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
M4-16	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
M4-17	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
M4-19	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M4-2	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M4-20	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M4-22	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
M4-23	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M4-24	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+

Tabla 3. Continuación

CEPA	Cat	Ox	NR	nr	Esp	CA	O/F	Resp. NO ₃	Prod. gas	McC	Alm	Lec	Fosf	Esc	DNA	TW20	TW80	AS	Cas	Tir	P.Tir	Cet
M4-26	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
M4-28	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
M4-29	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M4-3	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
M4-30	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
M4-31	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
M4-33	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
M4-35	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
M4-36	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
M4-37	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M4-38	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
M4-39	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
M4-3B	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M4-3M	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M4-4	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
M4-40	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
M4-43	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+
M4-44	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M4-45	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M4-46	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
M4-47	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
M4-48	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
M4-49	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+

Tabla 3. Continuación

CEPA	Cat	Ox	NR	nr	Esp	CA	O/F	Resp. NO ₃	Prod. gas	McC	Alm	Lec	Fosf	Esc	DNA	TW20	TW80	AS	Cas	Tir	P.Tir	Cet	
M4-5	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	
M4-50	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
M4-51	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
M4-52	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
M4-53	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
M4-55	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
M4-56	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
M4-57	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
M4-58	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-
M4-59	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
M4-5a	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+
M4-6	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
M4-60	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-
M4-62	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
M4-63	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
M4-64	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+
M4-65	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
M4-66	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
M4-67	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
M4-68	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
M4-69	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
M4-7	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
M4-70	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
M4-71	+	+	+	-	-	+	-	-	-	D	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
M4-72	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
M4-73	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-

Tabla 3. Continuación

CEPA	Cat	Ox	NR	nr	Esp	CA	O/F	Resp. NO ₃	Prod. gas	McC	Alm	Lec	Fosf	Esc	DNA	TW20	TW80	AS	Cas	Tir	P.Tir	Cet
M4-74	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
M4-76	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
M4-79	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
M4-80	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
M4-81	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
M4-82	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
M4-83	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+
M4-84	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
M4-85	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
M4-86	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
M4-87	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+
M4-88	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
M4-89	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-
M4-9	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
M4-90	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+
M4-91	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-
M4-92	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
M4-93	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
R1	+	-	-	-	-	-	+	-	-	ND	ND	ND	ND	+	-	-	-	-	+	ND	ND	ND
R2	+	+	+	+	-	-	D	+	+	+	-	-	D	-	+	-	-	-	-	-	-	+
R3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
R5	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-

Tabla 3. Continuación

CEPA	Cat	Ox	NR	nr	Esp	CA	O/F	Resp. NO ₃	Prod. gas	McC	Alm	Lec	Fosf	Esc	DNA	TW20	TW80	AS	Cas	Tir	P.Tir	Cet
R6	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
R7	+	+	+	D	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
R8	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	D	-	-	+	-	-	-	+	-	+
R9	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+
R10	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+
R11	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
R12	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
R13	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+
R14	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
R15	+	-	D	D	-	-	-	D	D	D	-	D	D	+	-	D	+	D	-	D	D	D
R16	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
R17	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
R18	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
R19	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
R20	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
R21	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
R22	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
R23	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
R24	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
R25	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
R26	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
R27	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
R28	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R29	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	ND	-	-	+	+	ND	ND	ND	ND	+	-	-	+
R30	+	+	-	-	-	D	+	-	-	-	-	+	-	+	-	D	-	-	-	-	-	+
R31	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Tabla 3. Continuación

CEPA	Cat	Ox	NR	nr	Esp	CA	O/F	Resp. NO ₃	Prod. gas	McC	Alm	Lec	Fosf	Esc	DNA	TW20	TW80	AS	Cas	Tir	P.Tir	Cet
R32	-	-	+	-	-	+	+	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	+	+	+	ND	+	-	-	ND
R33	-	+	+	-	-	+	+	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	-	+	+	ND	+	-	-	ND
R34	+	-	ND	ND	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tabla 4. Pruebas bioquímicas (II). Utilización de diferentes sustratos como única fuente de carbono y energía o como única fuente de carbono, nitrógeno y energía

Glu: D-glucosa

Gal: D-galactosa

Fruc: D-fructosa

Lac: lactosa

Suc: succinato

Ac: acetato

Cit: citrato

Glic: glicerol

His: L-histidina

Alan: DL-alanina

Tabla 4. Pruebas bioquímicas (II). Utilización de diferentes sustratos como única fuente de carbono y energía o como única fuente de carbono, nitrógeno y energía

CEPA	Glu	Gal	Frac	Lac	Suc	Ac	Cit	Glic	His	Alan	CEPA	Glu	Gal	Frac	Lac	Suc	Ac	Cit	Glic	His	Alan	
M2-87-I	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	M3-32	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M1-100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M3-33	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
M1-103	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M3-34	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
M1-103-X	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	M3-35	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
M1-107	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M3-36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-110	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M3-37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-111	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M3-38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-112	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	M3-39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-114	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	M3-4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
M1-115-I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M3-40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-115-II	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	M3-41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-116	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M3-42	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-117	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	M3-43	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-118	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	M3-44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-120	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	M3-45	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M1-122	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	M3-46	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-124	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	M3-47	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M3-48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-126	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	M3-49	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-127	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M3-5	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
M1-130	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M3-50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-131	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	M3-52	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 4. Continuación

CEPA	Glu	Gal	Frac	Lac	Suc	Ac	Cit	Glic	His	Alan	CEPA	Glu	Gal	Frac	Lac	Suc	Ac	Cit	Glic	His	Alan
M1-5-X	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	M3-90	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-X	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M3-91	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-XX	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	M3-93	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
M2-10	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	M3-94	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
M2-11	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	M3-95	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M3-97	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-13	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	M3-XX	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-139	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	M3-4X	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-14	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	M4-1	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
M2-140-II	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	M4-101	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
M2-146	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	M4-102	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-147	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	M4-104	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-148	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-107	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-149	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	M4-11	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
M2-15	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	M4-12	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
M2-150	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	M4-13	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
M2-151	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	M4-15	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
M2-153	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	M4-16	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
M2-154	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	M4-17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-155	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	M4-19	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+
M2-156	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	M4-2	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
M2-157	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	M4-20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-158	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 4. Continuación

CEPA	Glu	Gal	Frac	Lac	Suc	Ac	Cit	Glic	His	Alan	CEPA	Glu	Gal	Frac	Lac	Suc	Ac	Cit	Glic	His	Alan	
M2-160	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	M4-23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
M2-162	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	M4-24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-163	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	M4-26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-164	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	M4-28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-165	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-29	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-166	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	M4-3	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M2-167	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	M4-30	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M2-168	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-31	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M2-169	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-33	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M2-17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-171	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-173	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	M4-37	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
M2-174	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-38	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
M2-175	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-176	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-3B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M2-177	+	+	+	-	-	-	ND	-	+	+	M4-3M	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M2-178	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-4	+	ND	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M2-18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-40	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-180	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	M4-43	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-182	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	M4-44	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M2-183	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	M4-45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-183-X	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	M4-46	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
M2-19	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	M4-47	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
M2-204	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-48	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
M2-21	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	M4-49	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-22	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-5	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+

Tabla 4. Continuación

CEPA	Glu	Gal	Frac	Lac	Suc	Ac	Cit	Glic	His	Alan	CEPA	Glu	Gal	Frac	Lac	Suc	Ac	Cit	Glic	His	Alan
M2-23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-51	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
M2-26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-52	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M2-27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-53	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
M2-28	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-55	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
M2-29	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	M4-56	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
M2-2-X	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	M4-57	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-30	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	M4-58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-31	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	M4-59	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
M2-32	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	M4-5a	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+
M2-33	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	M4-6	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
M2-34	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	M4-60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-35	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	M4-62	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
M2-36	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	M4-63	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-64	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	M4-66	+	+	+	+	+	+	+	+	9	-
M2-41	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	M4-67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-42	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	M4-68	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-43	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	M4-69	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
M2-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-7	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+
M2-56	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-70	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
M2-57	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-71	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Anexo III

Tabla 4. Continuación

CEPA	Glu	Gal	Frac	Lac	Suc	Ac	Cit	Glic	His	Alan	CEPA	Glu	Gal	Frac	Lac	Suc	Ac	Cit	Glic	His	Alan
M2-58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-72	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-73	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
M2-6	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	M4-74	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-61	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	M4-76	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
M2-62	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	M4-79	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
M2-63	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-80	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
M2-66-B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-81	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
M2-66-M	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-82	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
M2-69	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	M4-83	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M2-7	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	M4-84	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-71	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-85	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
M2-72	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	M4-86	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
M2-76	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	M4-87	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-77	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	M4-88	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
M2-78	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	M4-89	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
M2-79	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	M4-9	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
M2-81	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	M4-90	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
M2-82	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	M4-91	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	M4-92	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
M2-85	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	M4-93	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
M2-87-II	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R1	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
M2-88	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	R2	+	9	-	+	-	+	+	+	+	+
M2-89	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	R3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
M2-9	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	R4	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
M2-X	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	R5	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
M2-XX	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	R6	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
M2-XXX	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	R7	+	-	-	-	+	+	+	9	-	-

Tabla 4. Continuación

CEPA	Glu	Gal	Frac	Lac	Suc	Ac	Cit	Glic	His	Alan	CEPA	Glu	Gal	Frac	Lac	Suc	Ac	Cit	Glic	His	Alan
M2-4X	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	R8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
M3-1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	R9	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
M3-100	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	R10	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
M3-110	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R11	+	+	+	+	+	-	+	9	-	-
M3-112	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R12	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M3-12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R13	+	-	9	-	+	+	+	-	+	+
M3-120	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	R14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M3-121	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R15	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
M3-125	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	R16	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
M3-127	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R17	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+
M3-128	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R18	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M3-129	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-13	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	R20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-130	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R21	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
M3-131	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R22	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+
M3-15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
M3-2	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	R25	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
M3-22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R27	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
M3-24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R28	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
M3-25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M3-26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R30	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+

Anexo III

Tabla 4. Continuación

CEPA	Glu	Gal	Frac	Lac	Suc	Ac	Cit	Glic	His	Alan	CEPA	Glu	Gal	Frac	Lac	Suc	Ac	Cit	Glic	His	Alan
M3-27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-28	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	R32	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
M3-3	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	R33	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+

Tabla 5. Pruebas bioquímicas (III). Galerías API

ONPG: ortho-Nitrophenyl- β -galactoside

ADH: arginina dehidrolasa

LCD: lactate descarboxilasa

ODC: ornitina descarboxilasa

Cit: utilización del citrato

H₂S: producción de sulfídrico

Ure: producción de ureasa

TDA: triptofano desaminasa

Ind: indol

VP: Voges-Proskawer

Gel: producción de gelatinasa

Producción de ácidos de:

Glu: glucosa

Man: anitol

Ino: inositol

Sor: sorbitol

Rha: ramnosa

Mec: melobiosa

Amy: amigdalina

Ara: arabinosa

Tabla 5. Pruebas bioquímicas (III). Galerías API

CEPA	ONPG	ADH	LCD	ODC	Cit	H ₂ S	Ure	TDA	Ind	VP	Gel	Glu	Man	Ino	Sor	Rha	Sac	Mec	Amy	Ara
M2-87-I	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-100	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
M1-103	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
M1-103-X	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-107	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
M1-110	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-111	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
M1-112	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-114	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-115-I	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
M1-115-II	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
M1-116	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-117	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-118	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
M1-120	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
M1-122	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-124	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-125	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+
M1-126	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-127	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-130	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
M1-131	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
M1-135	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
M1-137	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
M1-138	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
M1-141	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-

Tabla 5. Continuación

CEPA	ONPG	ADH	LCD	ODC	Cit	H ₂ S	Ure	TDA	Ind	VP	Gel	Glu	Man	Ino	Sor	Rha	Sac	Mec	Amy	Ara
M1-142	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
M1-144	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
M1-145	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-14-X	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+
M1-16-X	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+
M1-180	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
M1-187-I	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+
M1-187-II	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+
M1-190	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
M1-191-I	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
M1-191-II	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
M1-192	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
M1-193-I	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
M1-193-II	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-194	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+
M1-196	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
M1-198	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
M1-199	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-200	-	-	-	-	D	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
M1-201	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
M1-202	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-21-X	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
M1-5-X	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-

Tabla 5. Continuación

CEPA	ONPG	ADH	LCD	ODC	Cit	H ₂ S	Ure	TDA	Ind	VP	Gel	Glu	Man	Ino	Sor	Rha	Sac	Mec	Amy	Ara
M2-165	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-166	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
M2-167	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
M2-168	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-169	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-17	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-171	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-173	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-174	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
M2-175	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-176	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-177	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-178	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-18	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-180	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-182	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-183	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-183-X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-19	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-204	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-21	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
M2-22	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
M2-23	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 5. Continuación

CEPA	ONPG	ADH	LCD	ODC	Cit	H ₂ S	Ure	TDA	Ind	VP	Gel	Glu	Man	Ino	Sor	Rha	Sac	Mec	Amy	Ara
M2-62	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-63	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-66-B	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-66-M	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-69	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
M2-7	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-71	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-72	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-
M2-76	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
M2-77	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-78	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-79	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
M2-81	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-82	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
M2-83	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-85	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-87-II	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
M2-88	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-89	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-9	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
M2-X	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-XX	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-XXX	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-

Tabla 5. Continuación

CEPA	ONPG	ADH	LCD	ODC	Cit	H ₂ S	Ure	TDA	Ind	VP	Gel	Glu	Man	Ino	Sor	Rha	Sac	Mec	Amy	Ara
M2-4X	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
M3-1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
M3-100	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-110	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-112	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-12	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-120	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-121	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-125	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-127	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-128	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-129	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-13	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-130	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-131	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-15	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-18	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-22	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
M3-23	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
M3-24	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
M3-25	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
M3-26	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-27	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-28	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-3	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Tabla 5. Continuación

CEPA	ONPG	ADH	LCD	ODC	Cit	H ₂ S	Ure	TDA	Ind	VP	Gel	Glu	Man	Ino	Sor	Rha	Sac	Mec	Amy	Ara
M3-32	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-33	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-34	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-35	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-36	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-37	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-38	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
M3-39	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	D	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-4	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-40	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-41	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-42	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
M3-43	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-44	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-45	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-46	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-47	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-48	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-49	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-50	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
M3-52	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
M3-55	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Tabla 5. Continuación

CEPA	ONPG	ADH	LCD	ODC	Cit	H ₂ S	Ure	TDA	Ind	VP	Gel	Glu	Man	Ino	Sor	Rha	Sac	Mec	Amy	Ara
M3-91	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-93	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-94	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-95	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-97	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-XX	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
M3-3X	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
M4-1	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
M4-101	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4-102	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4-104	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
M4-107	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
M4-11	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
M4-12	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
M4-13	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
M4-15	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
M4-16	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
M4-17	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
M4-19	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
M4-2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
M4-20	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
M4-22	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
M4-23	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Tabla 5. Continuación

CEPA	ONPG	ADH	LCD	ODC	Cit	H ₂ S	Ure	TDA	Ind	VP	Gel	Glu	Man	Ino	Sor	Rha	Sac	Mec	Amy	Ara
M4-51	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4-52	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
M4-53	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4-55	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
M4-56	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4-57	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
M4-58	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
M4-59	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
M4-5a	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
M4-6	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
M4-60	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
M4-62	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4-63	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
M4-64	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4-65	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4-66	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4-67	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4-68	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
M4-69	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4-7	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
M4-70	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4-71	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
M4-72	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

M4-73	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4-74	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
M4-76	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M4-79	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4-80	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4-81	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R8	D	ND	D	D	+	+	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R9	-	ND	-	-	-	+	+	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R10	+	ND	-	-	+	+	+	ND	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R11	-	ND	D	D	+	+	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R12	D	ND	D	D	+	+	+	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R13	D	ND	D	D	+	+	+	ND	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
R14	-	ND	D	D	+	+	+	ND	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R15	D	ND	D	D	+	+	D	ND	-	-	-	D	D	D	D	D	D	-	-	-
R16	D	ND	D	D	-	+	+	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R17	-	ND	-	-	+	-	+	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R18	-	ND	D	-	+	+	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R19	+	ND	D	D	-	+	-	ND	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R20	-	ND	D	D	-	+	-	ND	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R21	-	ND	-	-	+	-	-	ND	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
R22	-	+	-	-	+	D	-	ND	-	ND	ND	+	-	-	-	-	-	-	-	-
R23	-	-	-	-	+	D	-	ND	+	ND	ND	+	-	-	-	-	-	-	-	-
R24	-	ND	D	D	+	+	-	ND	-	ND	ND	+	-	-	-	-	-	-	-	-
R25	-	-	-	-	+	D	-	ND	-	-	ND	+	+	-	-	-	-	-	-	-
R26	+	ND	D	D	-	+	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D
R27	+	ND	D	D	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 5. Continuación

CEPA	ONPG	ADH	LCD	ODC	Cit	H₂S	Ure	TDA	Ind	VP	Gel	Glu	Man	Ino	Sor	Rha	Sac	Mec	Amy	Ara
R28	-	ND	D	D	-	+	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D
R29	-	+	+	-	+	D	+	ND	ND	ND	+	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
R30	D	ND	D	D	-	-	D	ND	-	ND	+	+	+	+	+	D	+	-	-	D
R31	-	ND	D	D	-	+	+	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D
R32	-	+	-	-	+	D	+	ND	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	ND	ND
R33	-	+	-	-	+	+	D	ND	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	ND	ND
R34	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-

Tabla 6. Sensibilidad a agentes antimicrobianos

CN: Gentamicina (10µg)

TOB: Tobramicina (10µg)

AML: Amoxicilina (25µg)

AMP: Ampicilina (10µg)

P: Penicilina G (10UI)

KF: Cefalotina (30µg)

TE:Tetraciclina (30 UI)

E: Eritromicina (15µg)

PB: Polimixina B (300UI)

NA: Ácido nalidíxico (30µg)

RD: Rifampicina (5µg)

S: Sulfamida (300UI)

Tabla 6. Sensibilidad a agentes antimicrobianos

CEPA	PB	AML	TE	TOB	CN	S	E	NA	AMP	KF	P	RD
M2-87-I	+	D	D	-	D	-	-	-	-	-	-	-
M1-100	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
M1-103	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M1-103-X	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+	+	+
M1-107	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M1-110	+	+	D	+	+	+	-	+	+	+	D	+
M1-111	+	D	D	+	+	+	-	+	+	+	D	+
M1-112	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
M1-114	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	D	+
M1-115-I	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M1-115-II	+	+	+	+	+	+	D	+	+	-	D	+
M1-116	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	D	D
M1-117	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M1-118	+	+	+	+	+	+	D	+	+	-	D	+
M1-120	-	+	+	-	-	D	-	-	+	+	-	D
M1-122	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	D	+
M1-124	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
M1-125	+	D	D	-	+	+	-	+	+	+	D	+
M1-126	+	+	+	+	D	+	-	+	+	+	D	+
M1-127	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M1-130	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	D	+
M1-131	-	+	D	+	D	D	-	+	+	+	D	+
M1-135	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-137	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
M1-138	+	+	D	+	+	+	-	+	+	-	-	+
M1-141	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M1-142	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-144	-	+	-	+	D	+	-	D	+	-	D	+
M1-145	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	D	+
M1-14-X	+	D	D	-	+	+	-	+	+	+	D	+
M1-16-X	+	D	D	-	+	+	-	+	+	+	D	+
M1-180	+	+	+	+	+	+	D	+	+	-	D	+
M1-187-I	+	+	+	+	D	+	D	+	+	+	D	+
M1-187-II	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	D	+
M1-190	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M1-191-I	+	+	+	+	+	+	D	+	+	-	D	+
M1-191-II	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	D	+
M1-192	+	+	+	-	D	+	-	+	+	D	D	+

Tabla 6. Continuación

CEPA	PB	AML	TE	TOB	CN	S	E	NA	AMP	KF	P	RD
M1-193-I	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M1-193-II	+	+	+	+	+	D	-	+	+	+	+	-
M1-194	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	D	+
M1-196	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
M1-198	-	+	+	+	D	+	+	-	+	+	D	+
M1-199	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
M1-200	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
M1-201	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
M1-202	+	+	+	-	D	-	-	+	D	+	D	+
M1-21-X	+	+	D	+	+	+	-	+	+	-	-	+
M1-5-X	-	+	+	-	-	D	-	-	+	+	-	D
M1-X	+	+	+	-	D	-	-	+	D	+	D	+
M1-XX	+	+	+	+	+	+	D	+	+	-	D	+
M2-10	+	+	+	+	+	-	-	+	+	D	-	+
M2-11	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
M2-12	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
M2-13	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M2-139	+	+	D	+	+	-	-	+	+	+	+	-
M2-14	+	+	D	+	+	-	+	+	+	+	+	+
M2-140-II	+	+	D	+	+	-	-	+	+	+	+	-
M2-146	-	+	+	+	D	+	+	+	+	+	+	+
M2-147	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	D	+
M2-148	+	+	+	D	D	-	-	+	+	-	D	D
M2-149	-	+	+	+	D	+	+	+	+	+	+	+
M2-15	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+	+	+
M2-150	-	+	+	+	D	+	+	+	+	+	+	+
M2-151	-	+	+	+	D	+	+	+	+	+	+	+
M2-153	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
M2-154	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
M2-155	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M2-156	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-157	+	-	D	-	-	+	-	+	+	+	+	+
M2-158	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-160	-	+	+	+	+	+	D	-	+	+	+	+
M2-162	-	+	+	+	D	+	+	+	+	+	+	+
M2-163	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+	+	+
M2-164	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-165	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Tabla 6. Continuación

CEPA	PB	AML	TE	TOB	CN	S	E	NA	AMP	KF	P	RD
M2-41	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	D	+
M2-42	+	+	+	+	+	+	D	+	+	D	+	+
M2-43	+	+	-	+	+	+	-	+	+	D	D	+
M2-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-56	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
M2-57	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
M2-58	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	D	+
M2-59	+	+	+	+	D	+	+	+	+	+	+	+
M2-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-61	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-62	+	+	+	+	+	+	-	+	+	D	D	+
M2-63	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M2-66-B	+	+	D	+	+	+	-	+	+	+	D	+
M2-66-M	+	+	D	+	+	+	-	+	+	+	D	+
M2-69	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M2-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-71	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
M2-72	+	+	D	+	+	-	-	+	+	+	+	-
M2-76	+	+	+	-	-	-	-	+	+	D	D	+
M2-77	-	+	+	D	D	+	+	+	+	+	+	+
M2-78	+	+	+	-	D	-	+	+	+	D	D	+
M2-79	+	+	+	+	+	-	D	+	+	+	+	+
M2-81	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M2-82	-	-	-	D	D	D	-	-	D	D	-	+
M2-83	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	D	+
M2-85	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
M2-87-II	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M2-88	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M2-89	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M2-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-X	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
M2-XX	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	D	+
M2-XXX	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
M2-4X	+	+	+	+	+	+	D	+	+	-	D	+
M3-1	+	+	+	+	+	+	D	+	+	-	D	+
M3-100	-	+	-	+	+	D	+	D	+	+	+	+
M3-110	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M3-112	-	+	+	D	D	+	+	D	+	+	D	+

Tabla 6. Continuación

CEPA	PB	AML	TE	TOB	CN	S	E	NA	AMP	KF	P	RD
M3-12	+	+	+	+	+	-	D	+	-	+	+	+
M3-120	-	+	+	+	+	-	+	D	+	+	+	+
M3-121	-	+	-	+	+	+	+	D	+	+	+	+
M3-125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M3-127	+	+	D	-	+	+	-	+	+	+	D	+
M3-128	+	+	D	-	+	+	-	+	+	+	D	+
M3-129	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M3-13	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
M3-130	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M3-131	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M3-15	+	+	D	-	+	+	-	+	+	+	D	+
M3-18	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	D	+
M3-2	+	+	+	+	+	D	-	+	+	+	+	-
M3-22	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	D	+
M3-23	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M3-24	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+	+	+
M3-25	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	D	+
M3-26	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	D	+
M3-27	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	D	+
M3-28	-	+	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M3-3	-	+	+	D	+	+	-	+	+	+	+	+
M3-32	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M3-33	+	+	D	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M3-34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M3-35	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	D	+
M3-36	-	+	-	-	+	D	+	D	+	+	+	+
M3-37	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
M3-38	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M3-39	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
M3-4	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	D	+
M3-40	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M3-41	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
M3-42	+	+	+	+	+	D	-	+	+	-	D	+
M3-43	-	+	-	-	+	D	+	D	+	+	+	+
M3-44	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M3-45	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
M3-46	+	+	-	D	+	-	+	+	+	+	+	+
M3-47	+	+	D	+	+	+	-	+	+	+	+	+

Tabla 6. Continuación

CEPA	PB	AML	TE	TOB	CN	S	E	NA	AMP	KF	P	RD
M3-48	-	+	D	+	+	-	-	-	+	+	+	+
M3-49	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
M3-5	+	+	+	+	+	D	-	+	+	+	+	-
M3-50	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
M3-52	+	+	+	+	+	D	-	+	+	-	D	+
M3-55	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
M3-56	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	D	+
M3-57	+	+	+	D	+	+	-	+	+	+	-	+
M3-59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M3-6	+	+	-	+	+	+	D	+	+	-	D	D
M3-60	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
M3-61	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+
M3-62	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M3-63	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M3-64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M3-7	+	+	+	+	+	D	-	+	+	+	+	-
M3-70	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
M3-73	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
M3-74	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
M3-78	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
M3-79	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
M3-8	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M3-80	-	+	-	+	+	+	+	D	+	+	+	+
M3-81	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M3-84	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M3-85	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M3-86	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
M3-87	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
M3-88	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+
M3-89	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M3-9	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M3-90	+	+	D	+	+	+	-	+	+	-	-	+
M3-91	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M3-93	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M3-94	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
M3-95	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M3-97	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
M3-XX	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+

Tabla 6. Continuación

CEPA	PB	AML	TE	TOB	CN	S	E	NA	AMP	KF	P	RD
M3-4X	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M4-1	+	+	-	+	+	+	-	+	D	+	D	+
M4-101	+	D	-	-	+	+	D	+	D	-	-	+
M4-102	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M4-104	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
M4-107	+	-	-	D	D	+	-	+	D	-	-	D
M4-11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M4-12	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
M4-13	-	+	+	+	D	+	+	D	+	+	+	+
M4-15	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M4-16	+	D	+	+	+	+	-	+	D	+	D	D
M4-17	+	+	+	+	+	+	-	+	-	D	-	+
M4-19	+	D	-	D	D	+	D	+	-	-	-	D
M4-2	+	-	-	+	+	+	D	+	+	+	D	+
M4-20	+	D	-	-	D	+	D	+	-	-	-	+
M4-22	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
M4-23	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M4-24	+	D	-	-	-	D	-	+	-	-	-	D
M4-26	+	-	-	-	D	-	-	+	D	-	-	D
M4-28	+	-	-	-	D	-	-	+	-	-	-	D
M4-29	+	+	D	+	+	+	-	+	+	+	D	+
M4-3	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	D	+
M4-30	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
M4-31	-	+	+	+	+	D	+	+	+	+	D	+
M4-33	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	D	+
M4-35	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M4-36	+	D	D	+	+	+	-	+	-	D	-	+
M4-37	+	-	-	D	D	+	-	+	D	-	-	D
M4-38	+	+	+	+	+	-	D	+	+	+	+	+
M4-39	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	D	+
M4-3B	+	-	-	D	D	+	-	+	D	-	-	D
M4-3M	+	-	-	D	D	+	-	+	D	-	-	D
M4-4	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	D	+
M4-40	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+	+	+
M4-43	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
M4-44	+	-	-	D	D	+	-	+	D	-	-	D
M4-45	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M4-46	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+	+	+

Tabla 6. Continuación

CEPA	PB	AML	TE	TOB	CN	S	E	NA	AMP	KF	P	RD
M4-47	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
M4-48	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M4-49	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
M4-5	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
M4-50	+	+	D	+	+	+	+	-	+	+	+	+
M4-51	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
M4-52	+	+	+	+	+	-	D	+	+	+	+	+
M4-53	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M4-55	+	D	-	+	+	+	+	D	+	+	+	+
M4-56	+	+	+	D	+	D	+	+	+	+	+	+
M4-57	-	+	+	-	D	+	+	+	+	+	+	+
M4-58	+	D	+	+	+	+	-	+	D	+	-	+
M4-59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M4-5a	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
M4-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M4-60	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
M4-62	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M4-63	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
M4-64	+	+	D	+	+	+	+	+	+	-	-	+
M4-65	+	+	+	-	D	+	+	+	+	D	D	+
M4-66	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D	+
M4-67	+	+	-	-	D	+	+	+	+	-	+	+
M4-68	+	-	-	-	D	+	-	+	D	-	-	D
M4-69	+	+	+	-	+	D	D	+	+	+	+	+
M4-7	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
M4-70	+	+	+	D	D	D	D	+	D	D	+	+
M4-71	+	+	+	D	D	+	-	+	-	+	D	D
M4-72	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M4-73	+	+	+	D	D	-	D	+	+	+	-	+
M4-74	+	D	-	D	D	+	-	+	+	-	-	+
M4-76	+	D	-	D	+	+	-	+	D	+	-	+
M4-79	+	+	+	+	+	-	D	+	+	+	+	+
M4-80	+	+	+	+	+	-	D	+	+	+	+	+
M4-81	+	+	-	+	+	-	+	+	+	D	D	+
M4-82	+	+	+	+	+	-	D	+	+	+	+	+
M4-83	+	D	-	+	+	-	-	+	-	-	D	+
M4-84	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
M4-85	+	+	-	+	+	+	D	+	+	+	+	+

Tabla 6. Continuación

CEPA	PB	AML	TE	TOB	CN	S	E	NA	AMP	KF	P	RD
M4-86	-	D	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+
M4-87	+	-	-	D	D	+	-	+	D	-	-	D
M4-88	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
M4-89	+	-	-	D	D	+	-	+	D	-	-	D
M4-9	+	+	+	-	-	+	D	+	+	+	+	+
M4-90	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
M4-91	+	+	-	-	+	+	D	+	+	+	+	+
M4-92	+	+	-	-	D	-	-	+	D	-	-	+
M4-93	+	+	-	+	+	D	+	+	+	+	D	+
R1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R2	+	+	+	-	+	D	-	+	+	+	+	+
R3	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	D	+
R4	+	+	D	+	D	+	-	+	+	D	D	+
R5	+	+	D	+	D	+	+	+	+	D	D	+
R6	+	+	D	+	D	+	+	+	+	D	D	+
R7	+	+	D	-	D	+	-	+	+	D	D	+
R8	-	+	D	-	D	+	D	-	+	D	D	+
R9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
R10	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	D	+
R11	-	+	D	+	D	+	-	+	D	D	D	+
R12	+	+	D	-	D	+	-	+	+	D	D	+
R13	+	+	D	+	D	+	+	+	+	D	D	+
R14	+	+	D	-	D	+	-	+	+	D	D	+
R15	D	D	+	D	+	D	D	D	D	+	D	D
R16	+	+	D	-	D	+	D	+	+	D	D	+
R17	+	-	+	+	D	+	-	+	-	+	D	+
R18	+	+	+	-	+	+	D	+	+	+	+	+
R19	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	D	+
R20	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
R21	+	-	D	+	D	-	+	-	+	D	D	+
R22	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
R23	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
R24	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
R25	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
R26	-	+	+	+	D	-	+	-	+	+	D	+
R27	+	+	+	+	+	-	D	-	+	+	-	+
R28	+	+	+	+	+	+	+	D	+	+	D	+

Tabla 6. Continuación

CEPA	PB	AML	TE	TOB	CN	S	E	NA	AMP	KF	P	RD
R29	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R30	D	D	+	D	+	D	D	D	D	+	D	D
R31	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
R32	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
R33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R34	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS FENOTÍPICAS REALIZADOS EN LAS BACTERIAS AISLADAS GRAM POSITIVAS

Tabla 7. Características morfológicas y coloniales

Gram: Tinción de Gram

Morf: Morfología

Pig: Pigmentación de las colonias. C: crema; A: amarillo;

Muc: Mucosidad de las colonias. 0: no mucosas; 1: mucosas; 2: muy mucosas

CEPAS UTILIZADAS COMO DE REFERENCIA

R35	<i>Bacillus atrophaeus</i>
R36	<i>Bacillus badius</i>
R37	<i>Bacillus licheniformes</i>
R38	<i>Bacillus megaterium</i>
R39	<i>Bacillus micoydes</i>
R40	<i>Bacillus mojavenis</i>
R41	<i>Bacillus pumilus</i>
R42	<i>Bacillus subtilis</i>
R43	<i>Bacillus thuringiensis</i>
R44	<i>Bacillus vallismortis</i>
R45	<i>Bacillus velezensis</i>
R46	<i>Brevibacterium marinum</i>
R47	<i>Marinococcus halotolerans</i>
R48	<i>Oceanobacillus profundus</i>
R49	<i>Planococcus mariticolumbae</i>
R50	<i>Staphylococcus fleoretii</i>
R51	<i>Staphylococcus nepalensis</i>
R52	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
R53	<i>Virgibacillus halophilus</i>
R54	<i>Virgibacillus salarius</i>

Tabla 7. Características morfológicas y coloniales

CEPA	GRAM	Morf	Pig	Muc	Mov	CEPA	GRAM	Morf	Pig	Muc	Mov
M1-101	+	C	C	1	+	M3-14	+	B	C	0	-
M1-102	+	C	C	1	+	M3-17	+	B	C	0	-
M1-104	+	C	C	1	-	M3-19	+	B	C	1	+
M1-106	+	C	C	1	+	M3-20	+	B	C	0	-
M1-108	+	B	C	0	-	M3-21	+	C	C	1	+
M1-109	+	B	C	1	-	M3-29	+	C	C	1	+
M1-113	+	B	C	0	+	M3-31	+	B	C	0	-
M1-123	+	B	C	0	+	M3-51	+	B	C	1	+
M1-123-X	+	B	C	0	+	M3-53	+	B	C	1	+
M1-128	+	B	C	0	+	M3-54	+	B	C	0	+
M1-133-I	+	B	C	0	+	M3-58	+	B	C	0	+
M1-133-II	+	B	C	1	+	M3-65	+	B	C	0	-
M1-134	+	B	C	0	-	M3-66	+	B	C	0	+
M1-136	+	B	C	0	+	M3-67	+	B	C	0	+
M1-143	+	B	C	0	-	M3-68	+	C	C	1	+
M1-159	+	C	C	1	+	M3-69	+	C	C	1	+
M1-184	+	B	C	1	+	M3-70-X	+	C	C	1	+
M1-185	+	B	C	0	+	M3-72	+	C	C	1	+
M1-186	+	B	C	0	+	M3-75	+	B	C	1	+
M1-188	+	B	C	0	+	M3-76	+	C	C	1	+
M1-195	+	B	C	0	-	M3-77	+	C	C	1	+
M1-94	+	B	C	1	-	M3-82	+	B	C	0	+
M1-97	+	B	C	0	+	M3-83	1	B	C	1	+
M2-1	+	B	C	0	+	M3-92	1	C	C	1	+
M2-140-I	+	B	C	0	-	M3-96	1	C	C	1	+
M2-159	+	C	C	1	+	M3-X	1	B	C	1	+
M2-16	+	B	C	0	-	M3-XXX	1	B	C	1	+
M2-179	+	C	A	1	-	M4-10	1	C	C	1	+
M2-181	+	C	C	1	+	M4-100	1	B	C	0	+
M2-2	+	B	C	1	-	M4-103	1	B	C	1	+
M2-24	+	C	A	1	-	M4-105	1	C	C	1	+
M2-3	+	B	C	0	-	M4-106	1	C	C	1	+
M2-39	+	B	C	1	9	M4-14	1	C	A	1	-
M2-40	+	B	C	0	9	M4-18	1	B	C	1	-
M2-44	+	B	C	1	-	M4-21	1	C	C	1	+

Tabla 7. Cotinuación

CEPA	GRAM	Morf	Pig	Muc	Mov	CEPA	GRAM	Morf	Pig	Muc	Mov
M2-45	+	B	C	0	+	M4-32	1	B	C	0	-
M2-46	+	B	C	0	+	M4-34	1	C	C	1	-
M2-47	+	B	C	0	+	M4-42	1	C	C	1	-
M2-49	+	B	C	0	+	M4-54	1	B	C	0	-
M2-50	+	B	C	1	-	M4-61	1	C	C	1	+
M2-52	+	B	C	1	+	M4-75	1	B	C	0	+
M2-53	+	B	C	0	9	M4-77	1	B	C	0	+
M2-55	+	B	C	0	9	M4-8	1	B	C	1	-
M2-64	+	B	C	1	-	M4-94	1	B	C	1	+
M2-65	+	B	C	0	+	M4-95	1	B	C	0	+
M2-67	+	B	C	1	+	M4-98	1	B	C	0	+
M2-68	+	B	C	0	ND	M4-99	1	B	C	1	+
M2-70	+	B	C	1	ND	R35	1	B	C	0	+
M2-74	+	C	C	1	-	R36	1	B	C	0	+
M2-86	+	B	C	1	-	R37	1	B	C	0	+
M2-90	+	B	C	0	-	R38	1	B	C	0	+
M2-91	+	B	C	1	-	R39	1	B	C	0	+
M2-93	+	B	C	0	+	R40	1	B	C	0	+
M3-10	+	C	C	1	+	R41	1	B	C	0	+
M3-101	+	C	C	1	+	R42	1	B	C	0	+
M3-102	+	C	C	1	+	R43	1	B	C	0	+
M3-103	+	B	C	1	+	R44	1	B	C	0	+
M3-104	+	C	C	1	+	R45	1	B	C	0	+
M3-105	+	C	C	1	+	R46	1	B	Y	0	D
M3-106	+	C	C	1	+	R47	1	C	Y	0	+
M3-107	+	C	C	1	+	R48	1	B	C	0	+
M3-108	+	C	C	1	+	R49	1	C	Y	0	+
M3-109	+	B	C	1	+	R50	1	C	C	0	-
M3-11	+	C	C	1	+	R51	1	C	C	0	-
M3-111	+	B	C	1	+	R52	1	C	C	0	-
M3-122	+	B	C	1	+	R53	1	B	Y	0	+
M3-123	+	B	C	1	+	R54	1	B	C	0	+
M3-126	+	B	C	1	+						

Tabla 8. Características fisiológicas

Crecimiento distintas concentraciones de sal (% p/v)

Crecimiento a distintas temperaturas (°C)

Crecimiento a distintos valores de pH

Tabla 8. Continuación

CEPA	Sales (%)								pH						T (°C)				
	1	3	5	7.50	10	15	20	30	5	6	7	8	9	10	22	32	37	45	55
M2-47	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-49	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-50	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M2-52	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M2-53	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-55	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-64	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-67	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M2-68	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-70	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-74	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M2-86	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-90	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-91	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-93	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-10	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-101	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
M3-102	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-103	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-104	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-105	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M3-106	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
M3-107	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
M3-108	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-109	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M3-11	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-111	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
M3-122	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-123	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-126	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-14	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-17	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-19	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M3-20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-21	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-29	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-

Tabla 8. Continuación

CEPA	Sales (%)							pH						T (°C)					
	1	3	5	7.50	10	15	20	30	5	6	7	8	9	10	22	32	37	45	55
M3-31	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-51	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-53	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-54	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M3-58	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-66	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-67	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-68	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-69	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M3-70-X	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
M3-72	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
M3-75	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M3-76	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M3-77	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
M3-82	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-92	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M3-96	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
M3-X	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-XXX	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-10	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-100	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M4-103	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-105	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-106	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-14	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-18	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-21	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-32	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-34	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-42	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M4-54	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-61	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-75	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-77	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-8	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-

Tabla 8. Continuación

CEPA	Sales (%)							pH						T (°C)					
	1	3	5	7.50	10	15	20	30	5	6	7	8	9	10	22	32	37	45	55
M4-94	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-95	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M4-98	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-99	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
R35	+	+	+	+	+	D	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R36	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R37	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R38	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R39	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
R40	+	+	+	+	+	D	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R41	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R42	+	+	+	+	+	D	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R43	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R44	+	+	+	+	+	D	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R45	+	+	+	+	+	D	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R46	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
R47	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
R48	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
R49	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
R50	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
R51	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
R52	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
R53	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R54	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-

Tabla 9. Pruebas bioquímicas (I).

Cat: catalasa

Ox: oxidasa

NR: presencia de nitrato reductasa

nr: presencia de nitrito reductasa

Esp: producción de esporas

CA: crecimiento en anaerobiosis

O/F: oxido-fermentación

Resp. NO_3^- : respiración sobre nitrato

Prod. gas: producción de gas por
respiración sobre nitrato

McC: crecimiento en agar McConkey

Alm: hidrólisis del almidón

Lec: producción de lecitinasa

Fosf: producción de fosfatasa

Esc: hidrólisis de la esculina

DNA: producción de DNAsa

TW20 y 80: hidrólisis del Tween20 y 80

AS: hemolisis

Cas: hidrólisis de la caseína

Tir: hidrólisis de la tirosina

P.Tir: pigmento de la tirosina

Cet: crecimiento en agar cetrimida

Tabla 9. Pruebas bioquímicas (I).

	Cat	Ox	NR	nr	Esp	CA	O/F	Resp. NO ₃	Prod. gas	McC	Alm	Lec	Fosf	Esc	DNA	TW20	TW80	AS	Cas	Tir	P.Tir	Cet
CEPA	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
M1-101	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
M1-102	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
M1-104	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
M1-106	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
M1-108	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M1-109	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M1-113	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M1-123	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-
M1-123-X	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M1-128	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
M1-133-I	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
M1-133-II	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
M1-134	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
M1-136	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
M1-143	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
M1-159	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
M1-184	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
M1-185	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
M1-186	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
M1-188	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+
M1-195	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
M1-94	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M1-97	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
M2-1	+	+	+	-	+	D	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
M2-140-I	+	+	-	-	-	D	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M2-159	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
M2-16	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
M2-179	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+

Tabla 9. Continuación

	Cat	Ox	NR	nr	Esp	CA	O/F	Resp. NO ₃	Prod. gas	McC	Alm	Lec	Fosf	Esc	DNA	TW20	TW80	AS	Cas	Tir	P.Tir	Cet	
M2-181	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
M2-2	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
M2-24	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
M2-3	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	
M2-39	+	+	-	-	+	D	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
M2-40	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	
M2-44	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	
M2-45	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	
M2-46	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	
M2-47	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	
M2-49	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
M2-50	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	
M2-52	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
M2-53	+	-	+	-	+	D	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
M2-55	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
M2-64	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	
M2-65	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
M2-67	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	
M2-68	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	
M2-70	+	-	+	-	-	D	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	
M2-74	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	
M2-86	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
M2-90	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	
M2-91	+	+	+	-	+	D	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	
M2-93	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	
M3-10	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	
M3-101	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	
M3-102	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	
M3-103	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	
M3-104	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	
M3-105	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	

Tabla 9. Continuación

	Cat	Ox	NR	nr	Esp	CA	O/F	Resp. NO ₃	Prod. gas	McC	Alm	Lec	Fosf	Esc	DNA	TW20	TW80	AS	Cas	Tir	P.Tir	Cet
M3-106	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
M3-107	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
M3-108	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
M3-109	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
M3-111	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
M3-111	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
M3-122	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
M3-123	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
M3-126	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
M3-14	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
M3-17	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
M3-19	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
M3-20	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
M3-21	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
M3-29	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
M3-31	+	+	+	-	+	D	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
M3-51	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
M3-53	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
M3-54	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
M3-58	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
M3-65	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
M3-66	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
M3-67	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
M3-68	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
M3-69	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
M3-70-X	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
M3-72	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
M3-75	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
M3-76	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
M3-77	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-

Tabla 9. Continuación

	Cat	Ox	NR	nr	Esp	CA	O/F	Resp. NO ₃	Prod. gas	McC	Alm	Lec	Fosf	Esc	DNA	TW20	TW80	AS	Cas	Tir	P.Tir	Cet
M3-82	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
M3-83	+	-	+	-	+	D	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
M3-92	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
M3-96	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
M3-X	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
M3-XXX	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
M4-10	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
M4-100	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
M4-103	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
M4-105	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-
M4-106	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
M4-14	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
M4-18	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M4-21	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
M4-32	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
M4-34	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M4-42	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
M4-54	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+
M4-61	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
M4-75	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
M4-77	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
M4-8	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
M4-94	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+
M4-95	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
M4-98	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
M4-99	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	D	+	+	+	+	+	+	-	-	D
R35	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	D	-	+	+	-	+	+	-	-	D
R36	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	D	-	+	+	-	+	+	-	-	D
R37	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	D	-	+	-	-	-	+	-	-	D
R38	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	D	-	+	-	-	+	+	-	-	D
R39	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	D	+	+	+	+	+	+	-	-	D

Tabla 9. Continuación

	Cat	Ox	NR	nr	Esp	CA	O/F	Resp. NO ₃	Prod. gas	McC	Alm	Lec	Fosf	Esc	DNA	TW20	TW80	AS	Cas	Tir	P.Tir	Cet
R40	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	D	-	+	+	-	+	+	-	+	D
R41	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	D	+	-	-	-	+	+	-	-	D
R42	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	D	+	+	+	-	+	+	-	-	D
R43	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	D	-	+	+	+	+	+	-	-	D
R44	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	D	-	+	+	+	+	+	-	-	D
R45	+	-	+	-	-	-	-	ND	ND	ND	-	D	-	-	-	-	-	ND	+	-	-	D
R46	+	-	+	-	-	-	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND
R47	-	+	+	-	+	-	ND	ND	ND	ND	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
R48	+	-	ND	ND	-	-	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
R49	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
R50	+	-	+	-	-	+	ND	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	ND	ND	-
R51	+	-	+	-	-	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	+	+	-	-	-
R52	+	+	+	-	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R53	+	+	+	-	+	-	ND	ND	ND	ND	-	-	-	+	-	+	+	-	+	ND	ND	ND
R54	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	D	-	+	+	-	+	+	-	-	D

Tabla 10. Pruebas bioquímicas (II). Utilización de diferentes sustratos como única fuente de carbono y energía o como única fuente de carbono, nitrógeno y energía.

Glu: D-glucosa

Gal: D-galactosa

Fruc: D-fructosa

Lac: lactosa

Suc: succinato

Ac: acetato

Cit: citrato

Glic: glicerol

His: L-histidina

Alan: DL-alanina

Tabla 10. Pruebas bioquímicas (II). Utilización de diferentes sustratos como única fuente de carbono y energía o como única fuente de carbono, nitrógeno y energía.

	Glu	Gal	Frac	Lac	Suc	Ac	Cit	Glic	His	Alan		CEPA	Glu	Gal	Frac	Lac	Suc	Ac	Cit	Glic	His	Alan	
CEPA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		M3-123	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
M1-101	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		M3-126	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-102	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+		M3-14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-104	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+		M3-17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-106	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+		M3-19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-108	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+		M3-20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-109	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		M3-21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-113	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+		M3-29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-123	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+		M3-31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-123-X	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		M3-51	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
M1-128	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+		M3-53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-133-I	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+		M3-54	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M1-133-II	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		M3-58	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
M1-134	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		M3-65	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
M1-136	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+		M3-66	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
M1-143	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		M3-67	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
M1-159	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-		M3-68	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-184	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+		M3-69	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-185	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		M3-70-X	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-186	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		M3-72	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-188	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		M3-75	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1-195	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		M3-76	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 10. Continuación

	Glu	Gal	Frac	Lac	Suc	Ac	Cit	Glic	His	Alan		CEPA	Glu	Gal	Frac	Lac	Suc	Ac	Cit	Glic	His	Alan		
M2-67	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+		M4-95	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
M2-68	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		M4-98	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
M2-70	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-		M4-99	+	-	+	D	D	D	D	D	D	D	D	D
M2-74	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		R35	-	-	-	D	D	D	D	D	D	D	D	D
M2-86	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		R36	+	-	+	D	D	D	D	D	D	D	D	D
M2-90	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+		R37	+	-	+	D	D	D	D	D	D	D	D	D
M2-91	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+		R38	-	-	-	D	D	D	D	D	D	D	D	D
M2-93	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+		R39	+	-	+	D	D	D	D	D	D	D	D	D
M3-10	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		R40	-	-	-	D	D	D	D	D	D	D	D	D
M3-101	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		R41	-	-	+	D	D	D	D	D	D	D	D	D
M3-102	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+		R42	-	-	+	D	D	D	D	D	D	D	D	D
M3-103	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		R43	+	+	+	D	D	D	D	D	D	D	D	D
M3-104	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		R44	-	-	+	D	D	D	D	D	D	D	D	D
M3-105	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		R45	ND	ND	ND	-	+	-	+	-	+	-	-	-
M3-106	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		R46	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-107	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		R47	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
M3-108	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		R48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
M3-109	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		R49	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
M3-11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		R50	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
M3-111	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		R51	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
M3-122	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		R52	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
												R53	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	
												R54	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	

Anexo III

Tabla 11. Pruebas bioquímicas (III). Galerías API

ONPG: ortho-Nitrophenyl- β -galactoside

ADH: arginina dehidrolasa

LCD: lactate descarboxilasa

ODC: ornitina descarboxilasa

Cit: utilización del citrato

H₂S: producción de sulfídrico

Ure: producción de ureasa

TDA: triptofano desaminasa

Ind: indol

VP: Voges-Proskawer

Gel: producción de gelatinasa

Producción de ácidos de:

Glu: glucosa

Man: anitol

Ino: inositol

Sor: sorbitol

Rha: ramnosa

Mec: melobiosa

Amy: amigdalina

Ara: arabinosa

Tabla 11. Pruebas bioquímicas (III). Galerías API

	ONPG	ADH	LCD	ODC	Cit	H ₂ S	Ure	TDA	Ind	VP	Gel	Glu	Man	Ino	Sor	Rha	Sac	Mec	Amy	Ara
CEPA	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-101	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-102	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-104	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-106	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-108	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-109	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-113	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
M1-123	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
M1-123-X	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-128	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-133-I	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-133-II	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
M1-134	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
M1-136	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-143	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-159	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-184	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-185	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-186	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-188	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+
M1-195	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
M1-94	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 11. Continuación

	ONPG	ADH	LCD	ODC	Cit	H ₂ S	Ure	TDA	Ind	VP	Gel	Glu	Man	Ino	Sor	Rha	Sac	Mec	Amy	Ara
M2-68	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-70	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
M2-74	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-86	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-90	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
M2-91	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-93	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-10	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-101	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-102	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-103	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-104	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-105	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-106	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-107	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-108	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-109	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-11	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-111	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
M3-122	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
M3-123	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-126	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	D	-	-
M3-14	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 11. Continuación

	ONPG	ADH	LCD	ODC	Cit	H ₂ S	Ure	TDA	Ind	VP	Gel	Glu	Man	Ino	Sor	Rha	Sac	Mec	Amy	Ara
M3-X	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3-XXX	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
M4-10	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
M4-100	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
M4-103	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
M4-105	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
M4-106	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
M4-14	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
M4-18	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
M4-21	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
M4-32	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
M4-34	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
M4-42	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4-54	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4-61	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
M4-75	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4-77	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
M4-8	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
M4-94	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
M4-95	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
M4-98	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
M4-99	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
R35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Tabla 11. Continuación

	ONPG	ADH	LCD	ODC	Cit	H ₂ S	Ure	TDA	Ind	VP	Gel	Glu	Man	Ino	Sor	Rha	Sac	Mec	Amy	Ara
R36	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
R37	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
R38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
R39	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
R40	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
R41	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
R42	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
R43	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
R44	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
R45	+	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	-	-	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND
R46	ND	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
R47	+	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
R48	ND	-	ND	ND	ND	-	-	ND	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R49	-	-	-	-	+	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
R50	+	-	-	-	+	+	+	-	+	ND	ND	+	+	+	-	-	+	+	-	+
R51	-	-	-	-	ND	ND	+	-	ND	ND	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
R52	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
R53	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
R54	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+

Tabla 12. Sensibilidad a agentes antimicrobianos

CN: Gentamicina (10µg)

TOB: Tobramicina (10µg)

AML: Amoxicilina (25µg)

AMP: Ampicilina (10µg)

P: Penicilina G (10UI)

KF: Cefalotina (30µg)

TE: Tetraciclina (30 UI)

E: Eritromicina (15µg)

PB: Polimixina B (300UI)

NA: Ácido nalidíxico (30µg)

RD: Rifampicina (5µg)

S: Sulfamida (300UI)

Tabla 12. Continuación

CEPA	PB	AML	TE	TOB	CN	S	E	NA	AMP	KF	P	RD
M2-50	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	D	+
M2-52	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M2-53	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D	+
M2-55	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D	+
M2-64	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	D	+
M2-65	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	D	+
M2-67	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	D	+
M2-68	-	+	+	+	+	+	D	-	+	+	+	+
M2-70	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	D	+
M2-74	-	+	+	+	D	+	+	+	+	+	+	+
M2-86	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	D	+
M2-90	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	D	+
M2-91	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	D	+
M2-93	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M3-10	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
M3-101	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
M3-102	-	+	-	+	+	+	+	D	+	+	+	+
M3-103	-	+	+	D	D	+	+	D	+	+	D	+
M3-104	-	+	-	+	+	+	+	D	+	+	+	+
M3-105	-	+	-	+	+	+	+	D	+	+	+	+
M3-106	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M3-107	-	+	-	+	+	+	+	D	+	+	+	+
M3-108	-	+	-	+	+	D	+	D	+	+	+	+
M3-109	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M3-11	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
M3-111	-	+	-	+	+	+	+	D	+	+	+	+
M3-122	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
M3-123	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
M3-126	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M3-14	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	D	+
M3-17	-	+	+	D	+	+	+	-	+	+	+	+
M3-19	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	D	+
M3-20	-	+	+	+	+	+	-	D	+	+	D	+
M3-21	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
M3-29	+	+	+	+	+	+	+	D	+	+	D	+
M3-31	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	D	+
M3-51	+	+	+	+	+	D	-	+	+	-	D	+
M3-53	-	+	+	+	+	-	D	D	+	+	D	+

Tabla 12. Continuación

CEPA	PB	AML	TE	TOB	CN	S	E	NA	AMP	KF	P	RD
M3-54	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	D	+
M3-58	-	+	+	D	D	+	+	-	+	+	+	+
M3-65	+	+	+	D	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-66	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
M3-67	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M3-68	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
M3-69	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
M3-70-X	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
M3-72	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
M3-75	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
M3-76	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
M3-77	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M3-82	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M3-83	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D	+
M3-92	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
M3-96	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M3-X	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	D	+
M3-XXX	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
M4-10	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
M4-100	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	D	+
M4-103	-	+	+	-	D	+	+	-	+	+	+	D
M4-105	+	-	+	+	+	+	-	-	D	-	D	+
M4-106	+	-	-	+	D	+	-	+	-	-	-	D
M4-14	+	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+	+
M4-18	-	+	-	+	D	+	-	D	+	-	D	+
M4-21	-	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+	+
M4-32	-	+	+	+	+	+	D	D	+	+	D	+
M4-34	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
M4-42	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
M4-54	-	D	+	+	+	+	+	-	+	+	D	+
M4-61	+	+	+	+	+	-	D	+	+	+	+	+
M4-75	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
M4-77	+	+	-	+	+	-	+	+	D	-	D	+
M4-8	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	D
M4-94	-	+	+	+	+	+	D	-	+	+	D	+
M4-95	+	+	-	-	D	+	-	+	D	-	-	+
M4-98	-	+	D	+	+	+	D	-	+	+	D	+
M4-99	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+	D	+

Tabla 12. Continuación

CEPA	PB	AML	TE	TOB	CN	S	E	NA	AMP	KF	P	RD
R35	D	+	D	D	D	+	+	+	D	+	D	+
R36	D	+	D	D	D	+	+	+	D	+	D	+
R37	D	+	D	D	D	+	+	+	D	+	D	+
R38	D	+	D	D	D	+	+	+	D	+	D	+
R39	D	-	D	D	D	-	+	+	D	+	D	+
R40	D	+	D	D	D	+	+	+	D	+	D	+
R41	D	+	D	D	D	+	+	+	D	+	D	+
R42	D	+	D	D	D	+	+	+	D	+	D	+
R43	D	-	D	D	D	-	+	+	D	+	D	+
R44	D	+	D	D	D	D	+	+	D	+	D	+
R45	D	+	D	D	D	+	+	+	D	+	D	+
R46	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R47	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R48	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R49	ND	ND	ND	-	+	ND	ND	ND	ND	-	-	ND
R50	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
R51	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
R52	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R53	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R54	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tabla 1. Asignación taxonómica de las cepas bacterianas mediante la comparación de la secuencia parcial del gen del ARNr 16s mediante el programa EzTazon server 2.1.

CEPA	ASIGNACIÓN TAXONÓMICA (%)	CEPA	ASIGNACIÓN TAXONÓMICA (%)
M1-100	<i>Halomonas elongata</i> ATCC 33173 ^T 98,05	M1-145	<i>Halomonas campisalis</i> ATCC 700597 ^T 99,18
M1-101	<i>Staphylococcus warneri</i> ATCC 27836 ^T 99,50	M1-14-X	<i>Halomonas caseinilytica</i> AJ261 ^T 98,10
M1-102	<i>Staphylococcus pasteurii</i> ATCC 51129 ^T 99,30	M1-16-X	<i>Halomonas caseinilytica</i> AJ261 ^T 98,10
M1-103	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,49	M2-163	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T 97,69
M1-103-X	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,49	M1-185	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> BGSC 3A28 ^T 98,00
M1-104	<i>Staphylococcus warneri</i> ATCC 27836 ^T 97,83	M1-186	<i>Bacillus tequilensis</i> NRRL B-41771 ^T 99,18
M1-107	<i>Halomonas elongata</i> ATCC 33173 ^T 98,20	M1-187-I	<i>Halomonas lutea</i> YIM91125 ^T 97,85
M1-108	<i>Bacillus tequilensis</i> NRRL B-41771 ^T 99,20	M1-187-II	<i>Halomonas lutea</i> YIM91125 ^T 97,85
M1-110	<i>Halomonas hydrothermalis</i> Slthf2 ^T 98,03	M1-188	<i>Bacillus vallismortis</i> DSM 11031 ^T 99,50
M1-111	<i>Halomonas hydrothermalis</i> Slthf2 ^T 99,32	M1-190	<i>Halomonas campaniensis</i> 5AG ^T 97,35
M1-112	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T 98,27	M1-191-I	<i>Halomonas subterranea</i> ZG16 ^T 99,65
M1-113	<i>Bacillus endophyticus</i> 2DT ^T 99,18	M1-192	<i>Halomonas subterranea</i> ZG16 ^T 99,65
M1-114	<i>Halomonas neptunia</i> Eplume1 ^T 98,68	M1-193-I	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004 ^T 97,82
M1-115-I	<i>Halomonas hydrothermalis</i> Slthf2 ^T 99,33	M1-194	<i>Halomonas lutea</i> YIM91125 ^T 98,22
M1-116	<i>Halomonas zhanjiangensis</i> JSM 078169 ^T 99,17	M1-195	<i>Bacillus tequilensis</i> NRRL B-41771 ^T 99,37
M1-117	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,83	M1-196	<i>Halomonas lutea</i> YIM91125 ^T 97,61
M1-118	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,17	M1-21-X	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004 ^T 98,44
M1-120	<i>Pseudoalteromonas undina</i> NCIMB 2128 ^T 97,41	M1-5-X	<i>Pseudoalteromonas undina</i> NCIMB 2128 ^T 98,41
M1-122	<i>Halomonas subterranea</i> ZG16 ^T 99,83	M1-97	<i>Bacillus vallismortis</i> DSM 11031 ^T 99,34
M1-123-X	<i>Bacillus vallismortis</i> DSM 11031 ^T 99,50	M2-10	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,49
M1-124	<i>Halomonas caseinilytica</i> AJ261 ^T 98,00	M2-11	<i>Marinobacter salsuginis</i> SD-14B ^T 98,66
M1-125	<i>Halomonas caseinilytica</i> AJ261 ^T 98,10	M2-12	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T 97,33
M1-126	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 98,73	M2-13	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,83
M1-127	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,83	M2-139	<i>Marinobacter salsuginis</i> SD-14B ^T 98,35
M1-130	<i>Halomonas hydrothermalis</i> Slthf2 ^T 98,81	M2-14	<i>Marinobacter pelagius</i> HS225 ^T 98,66
M1-131	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T 98,51	M2-140-I	<i>Bacillus butanolivorans</i> K9 ^T 98,34
M1-134	<i>Bacillus tequilensis</i> NRRL B-41771 ^V 99,20	M2-146	<i>Nesiotobacter exalbescens</i> LA33B ^T 99,66
M1-135	<i>Halomonas caseinilytica</i> AJ261 ^T 97,71	M2-148	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004 ^T 97,98
M1-136	<i>Bacillus tequilensis</i> NRRL B-41771 ^T 99,20	M2-15	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,32

Tabla 1. Continuación

CEPA	ASIGNACIÓN TAXONÓMICA (%)	CEPA	ASIGNACIÓN TAXONÓMICA (%)
M1-138	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004 ^T 98,92	M2-150	<i>Marinobacter segnicrescens</i> SS011B1-4 ^T 97,88
M1-141	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 98,99	M2-151	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T 97,69
M1-142	<i>Kushneria indalinina</i> CG2.1 ^T 98,35	M2-153	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,83
M1-144	<i>Halomonas elongata</i> ATCC 33173V 99,34	M2-154	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T 97,36
M2-155	<i>Marinobacter segnicrescens</i> SS011B14 ^T 99,13	M2-31	<i>Halomonas gomseomensis</i> M12 ^T 98,83
M2-156	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,33	M2-32	<i>Halomonas hydrothermalis</i> Slthf2 ^T 98,12
M2-157	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004 ^T 97,13	M2-33	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,49
M2-158	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T 99,34	M2-35	<i>Halomonas shengliensis</i> SL014B-85 ^T 98,33
M2-16	<i>Bacillus vallismortis</i> DSM 11031 ^T 99,33	M2-36	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T 97,16
M2-160	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,16	M2-37	<i>Halomonas hydrothermalis</i> Slthf2 ^T 99,31
M2-162	<i>Halomonas elongata</i> ATCC 33173 ^T 99,67	M2-38	<i>Halomonas hydrothermalis</i> Slthf2 ^T 98,97
M2-164	<i>Vibrio azureus</i> LC2-005 ^T 98,53	M2-39	<i>Virgibacillus olivae</i> E308 ^T 99,33
M2-165	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T 97,53	M2-4	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,49
M2-166	<i>Halomonas taeanensis</i> BH539 ^T 99,15	M2-40	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 ^T 99,33
M2-167	<i>Salinicola halophilus</i> CG 4.1 ^T 98,45	M2-42	<i>Halomonas subterranea</i> ZG16 ^T 99,48
M2-168	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,50	M2-43	<i>Halomonas hydrothermalis</i> Slthf2 ^T 98,63
M2-169	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T 99,17	M2-46	<i>Bacillus oceanisediminis</i> H2 ^T 98,83
M2-17	<i>Halomonas gudaonensis</i> SL014B-69 ^T 98,50	M2-47	<i>Bacillus vallismortis</i> DSM 11031 ^T 99,33
M2-173	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T 98,78	M2-49	<i>Bacillus tequilensis</i> NRRL B-41771 ^T 99,19
M2-176	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T 98,08	M2-5	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,32
M2-177	<i>Vibrio azureus</i> LC2-005 ^T 98,53	M2-50	<i>Virgibacillus salarius</i> SA-Vb1 ^T 99,33
M2-18	<i>Marinobacter algicola</i> DG893 ^T 98,00	M2-52	<i>Virgibacillus salarius</i> SA-Vb1 ^T 99,33
M2-181	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> GTC 1228 ^T 99,18	M2-57	<i>Halomonas zhanjiangensis</i> JSM 078169 ^T 99,50
M2-182	<i>Luteimonas terricola</i> BZ92r ^T 98,23	M2-58	<i>Halomonas pacifica</i> DSM 4742 ^T 99,66
M2-183	<i>Halomonas taeanensis</i> BH539 ^T 99,99	M2-59	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T 97,00
M2-183-X	<i>Halomonas taeanensis</i> BH539 ^T 97,99	M2-6	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,32
M2-19	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T 97,66	M2-61	<i>Halomonas campisalis</i> ATCC 700597 ^T 99,19
M2-21	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359 ^T 98,83	M2-62	<i>Halomonas sulfidaeris</i> ATCC BAA-803 ^T 98,98
M2-22	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004 ^T 97,89	M2-63	<i>Halomonas subterranea</i> ZG16T 97,89
M2-23	<i>Kushneria indalinina</i> CG2.1 ^T 98,50	M2-64	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> DSM 8801 ^T 99,50

Tabla 1. Continuación

CEPA	ASIGNACIÓN TAXONÓMICA (%)	CEPA	ASIGNACIÓN TAXONÓMICA (%)
M2-25	<i>Halomonas zhanjiangensis</i> JSM 078169 ^T 98,50	M2-65	<i>Bacillus tequilensis</i> NRRL B-41771 ^T 99,19
M2-26	<i>Halomonas hydrothermalis</i> Slthf2 ^T 98,97	M2-66-M	<i>Halomonas pacifica</i> DSM 4742 ^T 99,50
M2-27	<i>Halomonas saccharevitans</i> AJ275 ^T 99,82	M2-69	<i>Halomonas hydrothermalis</i> Slthf2 ^T 99,31
M2-28	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004 ^T 98,50	M2-7	<i>Marinobacter segnicrescens</i> SS011B1-4 ^T 97,87
M2-29	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,15	M2-71	<i>Halomonas campisalis</i> ATCC 700597 ^T 97,82
M2-2-X	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004 ^T 98,13	M2-72	<i>Marinobacter salsuginis</i> SD-14B ^T 97,16
M2-30	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,49	M2-76	<i>Halomonas hydrothermalis</i> Slthf2 ^T 97,61
M2-77	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004 ^T 99,83	M3-27	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,23
M2-78	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004 ^T 98,66	M3-29	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990 ^T 98,21
M2-79	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> DSM 16359 ^T 97,70	M3-31	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 ^T 98,70
M2-81	<i>Idiomarina seosinensis</i> CL-SP19 ^T 99,33	M3-51	<i>Riemerella anatipestifer</i> ATCC 11845 ^T 98,02
M2-82	<i>Vibrio owensii</i> DY05 ^T 97,93	M3-53	<i>Swaminathaniania salitolerans</i> PA51 ^T 99,29
M2-83	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T 98,33	M3-54	<i>Bacillus safensis</i> FO-036b ^T 98,56
M2-85	<i>Microbulbifer donghaiensis</i> CN85 ^T 97,11	M3-65	<i>Bacillus safensis</i> FO-036b ^T 98,48
M2-87-I	<i>Achromobacter spanius</i> LMG 5911T ^T 99,33	M3-66	<i>Bacillus safensis</i> FO-036b ^T 97,25
M2-88	<i>Halomonas koreensis</i> SS20 ^T 99,82	M3-68	<i>Planococcus rifietoensis</i> M8 ^T 97,83
M2-89	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,83	M3-69	<i>Staphylococcus warneri</i> ATCC 27836 ^T 98,50
M2-9	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T 97,33	M3-92	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>hominis</i> DSM 20328 ^T 97,83
M2-90	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578 ^T 98,08	M4-100	<i>Bacillus muralis</i> LMG 20238 ^T 99,34
M2-91	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> DSM 8801 ^T 98,53	M4-105	<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i> ATCC 27840 ^T 98,36
M2-93	<i>Bacillus vallismortis</i> DSM 11031 ^T 93,75	M4-106	<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i> ATCC 27840 ^T 99,18
M3-1	<i>Aurantimonas altamirensis</i> S21B ^T 98,01	M4-18	<i>Acinetobacter baumannii</i> DSM 30007 ^T 99,38
M3-100	<i>Halomonas subterranea</i> ZG16 ^T 99,48	M4-32	<i>Bacillus endophyticus</i> 2DT ^T 97,87
M3-102	<i>Staphylococcus pasteurii</i> ATCC 51129 ^T 98,87	M4-34	<i>Planococcus rifietoensis</i> M8 ^T 99,17
M3-108	<i>Staphylococcus pasteurii</i> ATCC 51129 ^T 98,31	M4-54	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 ^T 99,39
M3-110	<i>Halomonas hydrothermalis</i> Slthf2 ^T 97,63	M4-75	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 ^T 98,35
M3-111	<i>Oceanobacillus manasiensis</i> YD3-56 ^T 98,49	M4-95	<i>Bacillus safensis</i> FO-036b ^T 98,73
M3-112	<i>Halomonas fontilapidosi</i> 5CR ^T 99,65	M1-106	<i>Staphylococcus warneri</i> ATCC 27836 ^T 99,16
M3-12	<i>Halomonas halmophila</i> ATCC 19717 ^T 97,83	M1-109	<i>Oceanobacillus manasiensis</i> YD3-56 ^T 98,66

Tabla 1. Continuación

CEPA	ASIGNACIÓN TAXONÓMICA (%)	CEPA	ASIGNACIÓN TAXONÓMICA (%)
M3-13	<i>Kushneria indalinina</i> CG2.1 ^T 99,21	M1-123	<i>Bacillus vallismortis</i> DSM 11031 ^T 99,50
M3-14	<i>Bacillus butanolivorans</i> K9 ^T 97,37	M1-128	<i>Bacillus tequilensis</i> NRRL B-41771 ^T 99,60
M3-15	<i>Pseudomonas xanthomarina</i> KMM 1447 ^T 97,57	M1-133-I	<i>Bacillus safensis</i> FO-036b ^T 99,83
M3-18	<i>Bartonella vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i> OK94-513 ^T 97,32	M1-143	<i>Bacillus muralis</i> LMG 20238 ^T 99,01
M3-2	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T 99,19	M1-159	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> ATCC 15305 ^T 98,69
M3-22	<i>Halomonas sulfidaeris</i> ATCC BAA-803 ^T 98,68	M2-1	<i>Bacillus safensis</i> FO-036b ^T 99,82
M3-23	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,83	M2-159	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> ATCC 15305 ^T 98,69
M3-24	<i>Halomonas lutea</i> YIM91125 ^T 97,69	M2-179	<i>Marinococcus luteus</i> YIM 91094 ^T 99,82
M3-25	<i>Marinobacter segnicrescens</i> SS011B1-4 ^T 99,43	M2-2	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> DSM 8801 ^T 99,16
M3-26	<i>Idiomarina loihiensis</i> L2TR ^T 97,74	M2-24	<i>Marinococcus luteus</i> YIM 91094 ^T 99,82
M1-123	<i>Bacillus vallismortis</i> DSM 11031 ^T 99,50	M3-35	<i>Brevundimonas bacteroides</i> LMG15096 ^T 99,66
M1-128	<i>Bacillus tequilensis</i> NRRL B-41771 ^T 99,60	M3-36	<i>Halomonas sulfidaeris</i> ATCC BAA-803 ^T 97,27
M1-133-I	<i>Bacillus safensis</i> FO-036b ^T 99,83	M3-37	<i>Marinobacter pelagius</i> HS225 ^T 99,95
M1-143	<i>Bacillus muralis</i> LMG 20238 ^T 99,01	M3-38	<i>Halomonas hydrothermalis</i> Slthf2 ^T 97,77
M1-159	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> ATCC 15305 ^T 98,69	M3-39	<i>Halomonas subterranea</i> ZG16 ^T 99,65
M2-179	<i>Marinococcus luteus</i> YIM 91094 ^T 99,82	M3-4	<i>Halomonas koreensis</i> SS20 ^T 99,94
M2-2	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> DSM 8801 ^T 99,16	M3-40	<i>Idiomarina zobellii</i> KMM 231 ^T 98,16
M2-24	<i>Marinococcus luteus</i> YIM 91094 ^T 99,82	M3-41	<i>Halomonas gomseomensis</i> M12 ^T 97,66
M2-3	<i>Bacillus safensis</i> FO-036b ^T 99,82	M3-42	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T 97,33
M2-44	<i>Virgibacillus salarius</i> SA-Vb1 ^T 99,00	M3-43	<i>Halomonas daqingensis</i> DQD2-30 ^T 98,43
M2-53	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578 ^T 99,82	M3-44	<i>Idiomarina loihiensis</i> L2-TR ^T 99,49
M2-55	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578 ^T 99,82	M3-42	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T 97,33
M2-67	<i>Virgibacillus salarius</i> SA-Vb1 ^T 98,83	M3-45	<i>Halomonas saccharevitans</i> AJ275 ^T 98,71
M2-68	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 ^T 98,83	M3-46	<i>Halomonas koreensis</i> SS20 ^T 99,82
M2-70	<i>Virgibacillus salarius</i> SA-Vb1 ^T 99,00	M3-47	<i>Halomonas almeriensis</i> M8 ^T 97,32
M2-74	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> ATCC 15305 ^T 99,51	M3-45	<i>Halomonas saccharevitans</i> AJ275 ^T 98,71
M2-86	<i>Virgibacillus olivae</i> E308 ^T 98,82	M3-46	<i>Halomonas koreensis</i> SS20 ^T 99,82
		M3-47	<i>Halomonas almeriensis</i> M8 ^T 97,32

Tabla 1. Continuación

CEPA	ASIGNACIÓN TAXONÓMICA (%)	CEPA	ASIGNACIÓN TAXONÓMICA (%)
M3-10	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990 ^T 99,09	M3-48	<i>Idiomarina seosinensis</i> CL-SP19 ^T 98,92
M3-101	<i>Staphylococcus pasteurii</i> ATCC 51129 ^T 98,98	M3-49	<i>Idiomarina zobellii</i> KMM 231 ^T 98,16
M3-104	<i>Staphylococcus pasteurii</i> ATCC 51129 ^T 98,98	M3-5	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T 97,83
M3-105	<i>Staphylococcus pasteurii</i> ATCC 51129 ^T 98,98	M3-50	<i>Salinivibrio costicola</i> DSM 16359 ^T 97,33
M3-106	<i>Staphylococcus warneri</i> ATCC 27836 ^T 98,85	M3-52	<i>Halomonas koreensis</i> SS20 ^T 97,57
M3-107	<i>Staphylococcus pasteurii</i> ATCC 51129 ^T 98,98	M3-55	<i>Halomonas hydrothermalis</i> Slthf2 ^T 97,94
M3-109	<i>Oceanobacillus manasiensis</i> YD3-56 ^T 99,01	M3-56	<i>Halomonas zhanjiangensis</i> JSM 078169 ^T 97,53
M3-11	<i>Staphylococcus pasteurii</i> ATCC 51129 ^T 99,00	M3-57	<i>Halomonas hydrothermalis</i> Slthf2 ^T 98,28
M3-17	<i>Bacillus safensis</i> FO-036b ^T 99,68	M3-58	<i>Bacillus safensis</i> FO-036b ^T 99,78
M3-20	<i>Bacillus endophyticus</i> 2DT ^T 99,66	M3-59	<i>Aurantimonas coralicida</i> WP1 ^T 99,16
M3-21	<i>Staphylococcus pasteurii</i> ATCC 51129 ^T 98,97	M3-6	<i>Halomonas fontilapidosi</i> 5CR ^T 99,66
M3-28	<i>Halomonas saccharevitans</i> AJ275 ^T 99,83	M3-60	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,81
M3-3	<i>Halomonas koreensis</i> SS20 ^T 99,96	M3-61	<i>Marinobacter segnicrescens</i> SS011B1-4 ^T 97,02
M3-32	<i>Halomonas variabilis</i> DSM 3051 ^T 97,69	M3-62	<i>Halomonas fontilapidosi</i> 5CR ^T 98,31
M3-33	<i>Marinobacter salsuginis</i> SD-14B ^T 98,71	M3-63	<i>Idiomarina loihiensis</i> L2-TR ^T 99,70
M3-34	<i>Marinobacter salsuginis</i> SD-14B ^T 98,32	M3-67	<i>Bacillus safensis</i> FO-036b ^T 98,61
M3-7	<i>Marinobacter gudaonensis</i> SL014B61A ^T 98,50	M4-11	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,83
M3-70-X	<i>Staphylococcus pasteurii</i> ATCC 51129 ^T 98,96	M4-12	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,50
M3-72	<i>Staphylococcus pasteurii</i> ATCC 51129 ^T 98,96	M4-13	<i>Halomonas hydrothermalis</i> Slthf2 ^T 99,49
M3-73	<i>Brevundimonas mediterranea</i> V4.BO.10 ^T 99,33	M4-14	<i>Marinococcus luteus</i> YIM 91094 ^T 99,82
M3-74	<i>Halomonas daqingensis</i> DQD2-30 ^T 98,62	M4-15	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,66
M3-76	<i>Staphylococcus warneri</i> ATCC 27836 ^T 99,16	M4-16	<i>Pantoea eucrina</i> LMG 2781 ^T 98,17
M3-77	<i>Staphylococcus pasteurii</i> ATCC 51129 ^T 98,98	M4-17	<i>Pseudoalteromonas byunsanensis</i> FR1199 ^T 97,37
M3-78	<i>Brevundimonas vesicularis</i> LMG 2350 ^T 99,08	M4-19	<i>Halomonas elongata</i> ATCC 33173 ^T 97,51
M3-79	<i>Brevundimonas aurantiaca</i> DSM 4731 ^T 98,15	M4-2	<i>Halomonas hydrothermalis</i> Slthf2 ^T 99,49
M3-8	<i>Halomonas saccharevitans</i> AJ275 ^T 98,45	M4-20	<i>Pseudoalteromonas byunsanensis</i> FR1199 ^T 97,53
M3-81	<i>Brevundimonas vesicularis</i> LMG 2350 ^T 99,98	M4-21	<i>Planococcus rifietoensis</i> M8 ^T 99,67
M3-82	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 ^T 98,66	M4-22	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,67
M3-84	<i>Brevundimonas vesicularis</i> LMG 2350 ^T 98,16	M4-23	<i>Halomonas cerina</i> SP4 ^T 99,69

Tabla 1. Continuación

CEPA	ASIGNACIÓN TAXONÓMICA (%)	CEPA	ASIGNACIÓN TAXONÓMICA (%)
M3-85	<i>Halomonas saccharevitans</i> AJ275 ^T 98,86	M4-24	<i>Yersinia intermedia</i> ATCC29909 ^T 97,52
M3-86	<i>Cronobacter dublinensis</i> subsp. <i>dublinensis</i> DES187 ^T 98,42	M4-26	<i>Vibrio rumoiensis</i> S-1 ^T 98,02
M3-87	<i>Halomonas koreensis</i> SS20 ^T 99,82	M4-28	<i>Vibrio rumoiensis</i> S-1 ^T 97,20
M3-88	<i>Labrenzia aggregata</i> IAM 12614 ^T 99,00	M4-29	<i>Halomonas boliviensis</i> LC1 ^T 98,35
M3-89	<i>Palleronia marisminoris</i> B33 ^T 97,12	M4-3	<i>Halomonas hydrothermalis</i> Slthf2 ^T 99,49
M3-9	<i>Halomonas caseinilytica</i> AJ261 ^T 98,33	M4-30	<i>Halomonas elongata</i> ATCC 33173 ^T 99,50
M3-90	<i>Halomonas sulfidaeris</i> ATCC BAA-803 ^T 97,96	M4-31	<i>Halomonas koreensis</i> SS20 ^T 97,39
M3-91	<i>Labrenzia marina</i> mano18 ^T 97,25	M4-33	<i>Halomonas koreensis</i> SS20 ^T 98,79
M3-93	<i>Halomonas daqiaonensis</i> YCSA28 ^T 97,16	M4-35	<i>Halomonas cerina</i> SP4 ^T 97,19
M3-94	<i>Halomonas koreensis</i> SS20 ^T 99,79	M4-36	<i>Halomonas elongata</i> ATCC 33173 ^T 99,32
M3-95	<i>Halomonas daqiaonensis</i> YCSA28 ^T 99,60	M4-37	<i>Yersinia intermedia</i> ATCC 29909 ^T 99,05
M3-96	<i>Staphylococcus pasteurii</i> ATCC 51129 ^T 98,96	M4-38	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,17
M3-97	<i>Halomonas caseinilytica</i> AJ261 ^T 97,33	M4-39	<i>Idiomarina homiensis</i> PO-M2 ^T 97,37
M4-1	<i>Halomonas hydrothermalis</i> Slthf2 ^T 99,32	M4-3M	<i>Marinobacter segnicrescens</i> SS011B1-4 ^T 97,33
M4-10	<i>Planococcus rifietoensis</i> M8 ^T 98,68	M4-4	<i>Halomonas hydrothermalis</i> Slthf2 ^T 99,49
M4-101	<i>Yersinia intermedia</i> ATCC 29909 ^T 97,36	M4-40	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T 98,85
M4-102	<i>Halomonas boliviensis</i> LC1 ^T 98,68	M4-42	<i>Paracoccus marcusii</i> DSM 11574 ^T 99,01
M4-104	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> LMG 2715 ^T 99,39	M4-43	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T 97,05
M4-107	<i>Yersinia intermedia</i> ATCC 29909 ^T 97,36	M4-44	<i>Yersinia intermedia</i> ATCC 29909 ^T 97,53
M4-45	<i>Marinobacter salsuginis</i> SD-14B ^T 98,19	M4-70	<i>Halomonas fontilapidosi</i> 5CR ^T 99,83
M4-46	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T 98,68	M4-71	<i>Halomonas fontilapidosi</i> 5CR ^T 99,17
M4-47	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T 99,17	M4-72	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T 99,01
M4-48	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T 98,35	M4-73	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T 99,67
M4-49	<i>Marinobacter salsuginis</i> SD-14B ^T 98,02	M4-74	<i>Halomonas fontilapidosi</i> 5CR ^T 97,18
M4-5	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T 98,02	M4-76	<i>Yersinia intermedia</i> ATCC 29909 ^T 97,69
M4-50	<i>Marinobacter pelagius</i> HS225 ^T 98,68	M4-77	<i>Bacillus oceanisediminis</i> H2 ^T 98,94
M4-51	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T 98,84	M4-79	<i>Halomonas fontilapidosi</i> 5CR ^T 99,50
M4-53	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T 99,50	M4-80	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T 99,50
M4-55	<i>Pseudomonas vancouverensis</i> ATCC 700688 ^T 97,87	M4-82	<i>Halomonas gomseomensis</i> M12 ^T 99,67
M4-56	<i>Marinobacter santoriniensis</i> NKSG1 ^T 97,27	M4-83	<i>Marinobacter algicola</i> DG893 ^T 98,35

Tabla 1. Continuación

CEPA	ASIGNACIÓN TAXONÓMICA (%)	CEPA	ASIGNACIÓN TAXONÓMICA (%)
M4-58	<i>Halomonas elongata</i> ATCC 33173 ^T 99,34	M4-84	<i>Marinobacter segnicrescens</i> SS011B1-4 ^T 98,88
M4-59	<i>Halomonas alimentaria</i> YKJ-16 ^T 99,33	M4-85	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T 98,52
M4-5a	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T 98,02	M4-86	<i>Idiomarina ramblicola</i> R22 ^T 99,50
M4-6	<i>Marinobacter pelagius</i> HS225 ^T 99,50	M4-87	<i>Halomonas caseinilytica</i> AJ261 ^T 99,34
M4-60	<i>Marinobacter salsuginis</i> SD-14B ^T 98,84	M4-88	<i>Halomonas xinjiangensis</i> TRM 0175 ^T 98,84
M4-61	<i>Planococcus rifietoensis</i> M8 ^T 99,01	M4-89	<i>Halomonas elongata</i> ATCC 33173 ^T 100,0
M4-62	<i>Halomonas fontilapidosi</i> 5CR ^T 99,33	M4-9	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T 98,02
M4-63	<i>Halomonas gomseomensis</i> M12 ^T 99,50	M4-90	<i>Halomonas subterranea</i> ZG16 ^T 99,01
M4-64	<i>Halomonas salifodinae</i> BC7 ^T 99,33	M4-92	<i>Idiomarina abyssalis</i> KMM 227 ^T 98,52
M4-65	<i>Salinimonas chungwhensis</i> BH030046 ^T 99,18	M4-93	<i>Halomonas arcis</i> AJ282 ^T 98,45
M4-66	<i>Halomonas elongata</i> ATCC 33173 ^T 98,50	M4-94	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> DSM 8801 ^T 99,50
M4-67	<i>Salinimonas chungwhensis</i> BH030046 ^T 99,34	M4-98	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 ^T 99,67
M4-68	<i>Salinimonas chungwhensis</i> BH030046 ^T 99,34	M4-99	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> DSM 8801 ^T 99,50
M4-69	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T 99,83		
M4-7	<i>Halomonas fontilapidosi</i> 5CR ^T 99,83		

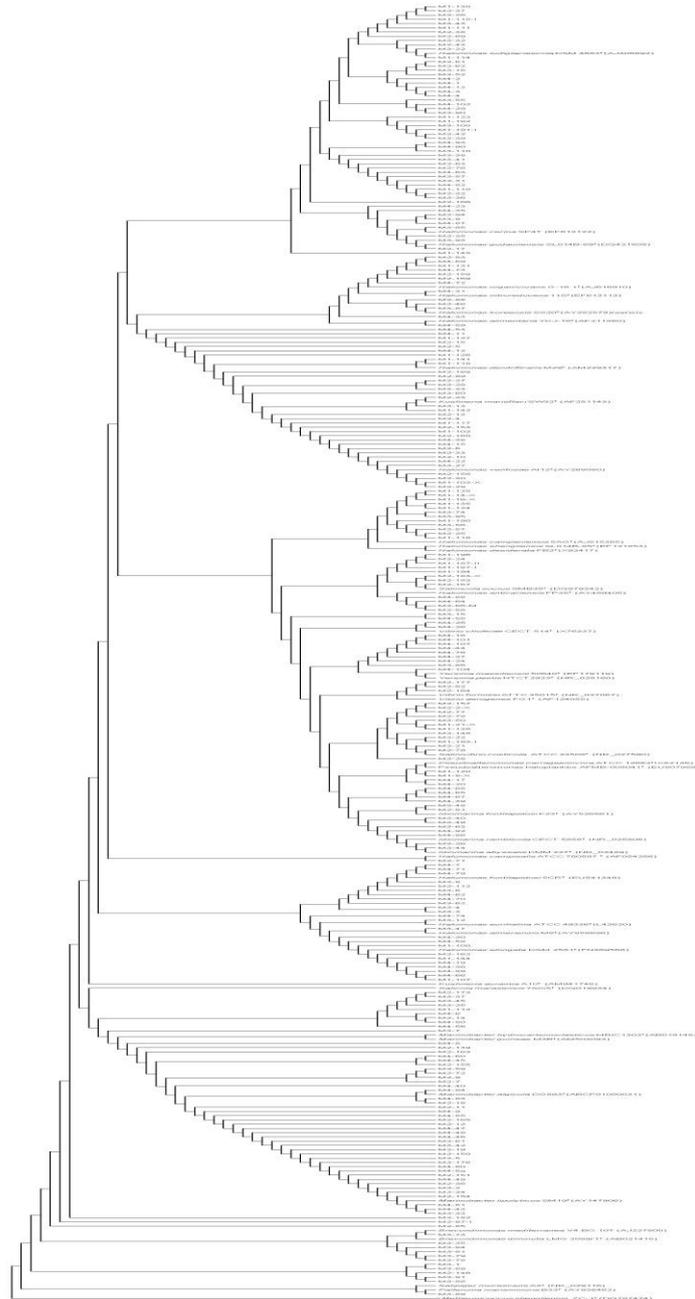


Figura 1. Árbol filogenético obtenido a partir de la secuencia parcial del gen del ARNr 16S de las cepas Gram negativas mediante el método Máxima Parsimonia. Se indican los valores de “bootstrap” para 1.000 réplicas. Los números de acceso al GenBank se muestran entre paréntesis.

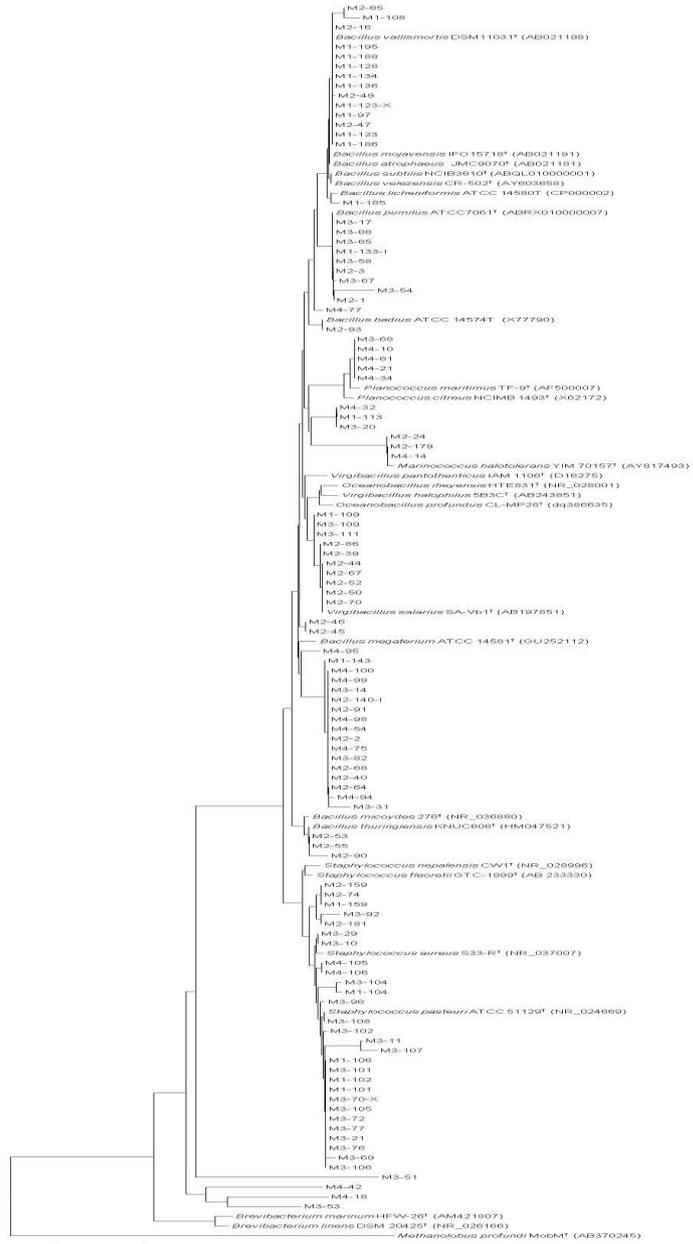


Figura 2. Árbol filogenético obtenido a partir de la secuencia parcial del gen del ARNr 16S de las cepas Gram positivas mediante el método Máxima Parsimonia. Se indican los valores de “bootstrap” para 1.000 réplicas. Los números de acceso al GenBank se muestran entre paréntesis.

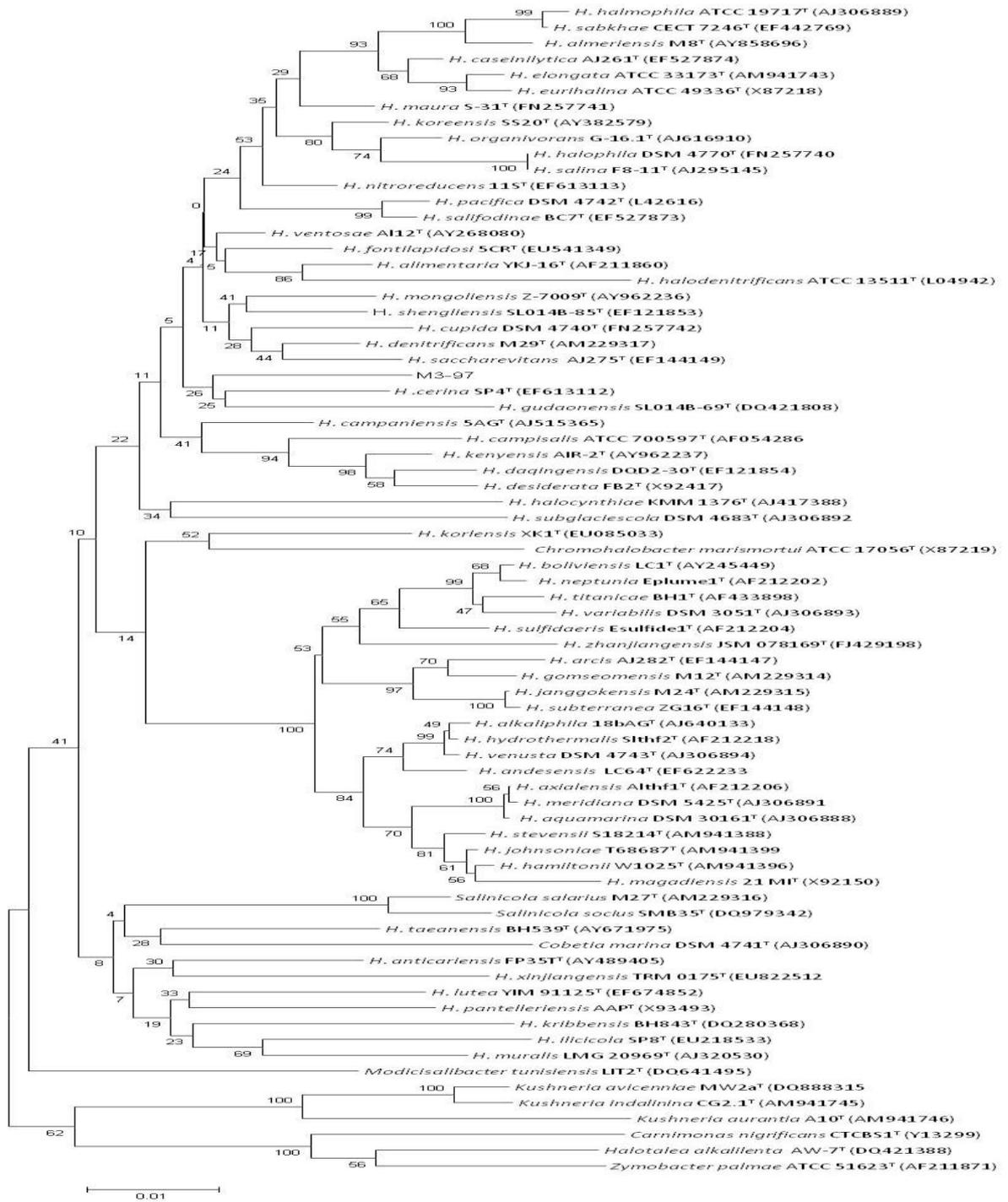


Figura 1. Árbol filogenético obtenido a partir de la secuencia completa del gen del ARNr 16S mediante el método Neighbour Joining. Se indican los valores de “bootstrap” para 1.000 réplicas. Los números de acceso al GenBank se muestran entre paréntesis.

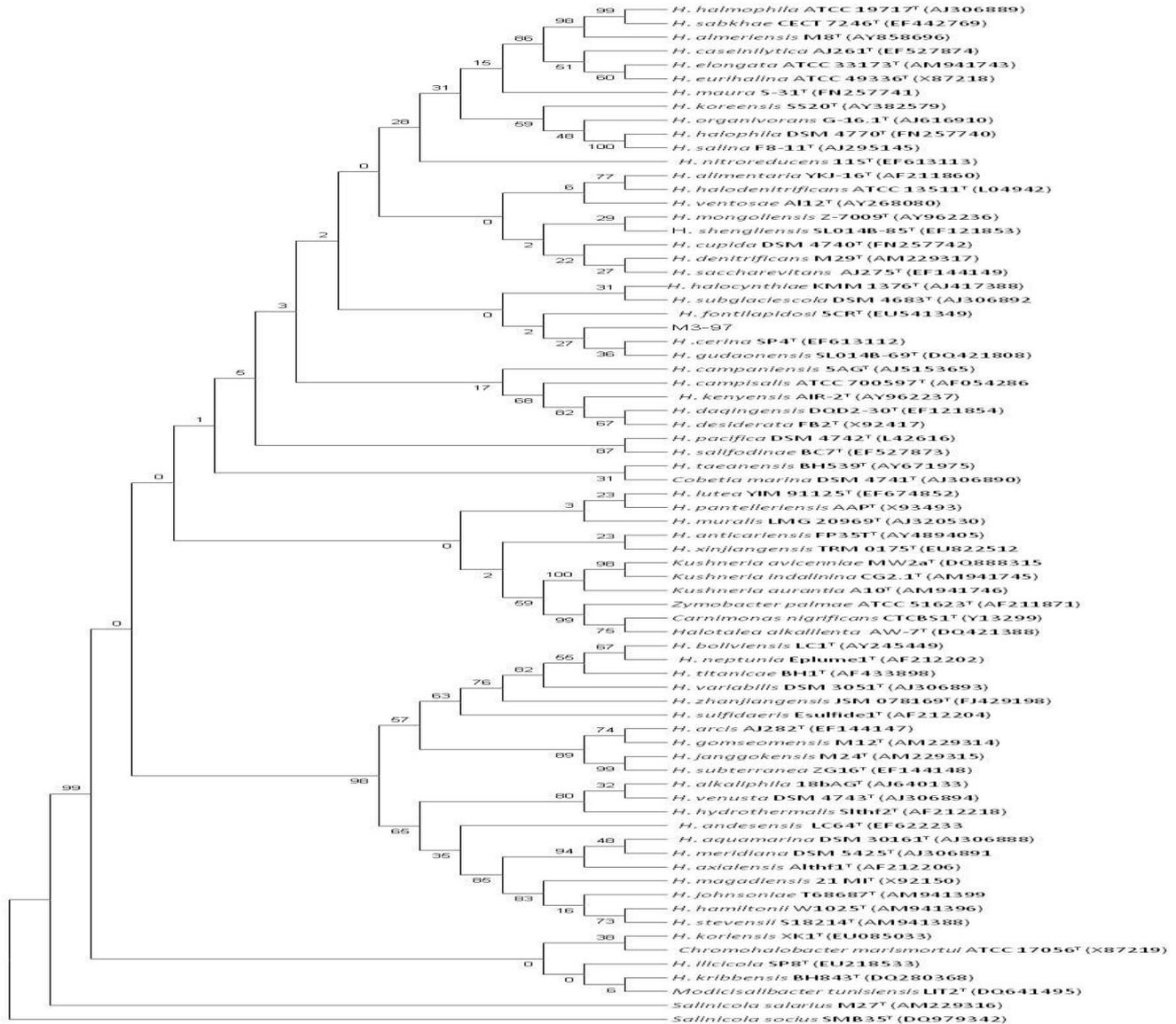


Figura 2. Árbol filogenético obtenido a partir de la secuencia completa del gen del ARNr 16S mediante el método Máxima Parsimonia. Se indican los valores de “bootstrap” para 1.000 réplicas. Los números de acceso al GenBank se muestran entre paréntesis.

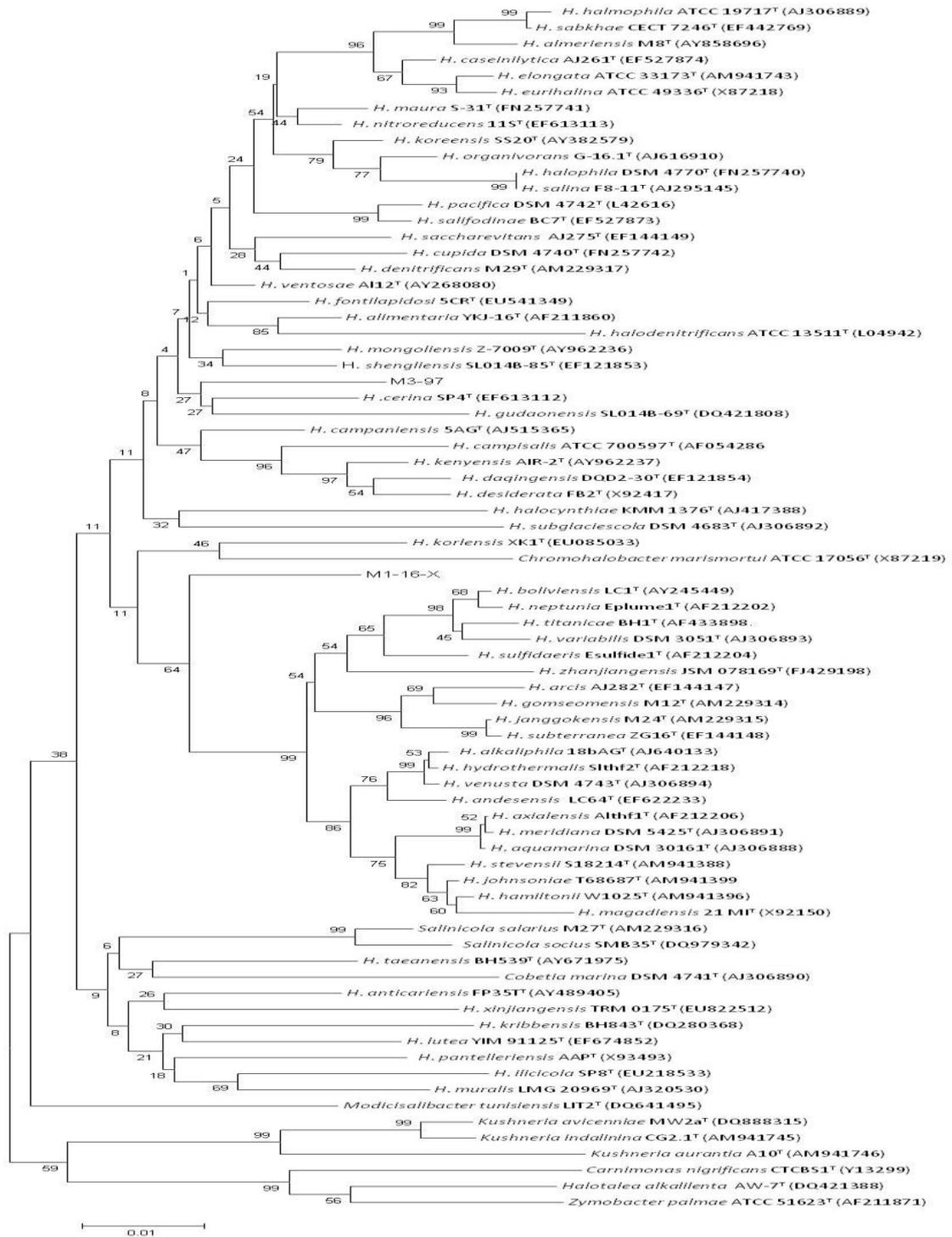


Figura 3. Árbol filogenético obtenido a partir de la secuencia completa del gen del ARNr 16S mediante el método Neighbour Joining. Se indican los valores de “bootstrap” para 1.000 réplicas. Los números de acceso al GenBank se muestran entre paréntesis.

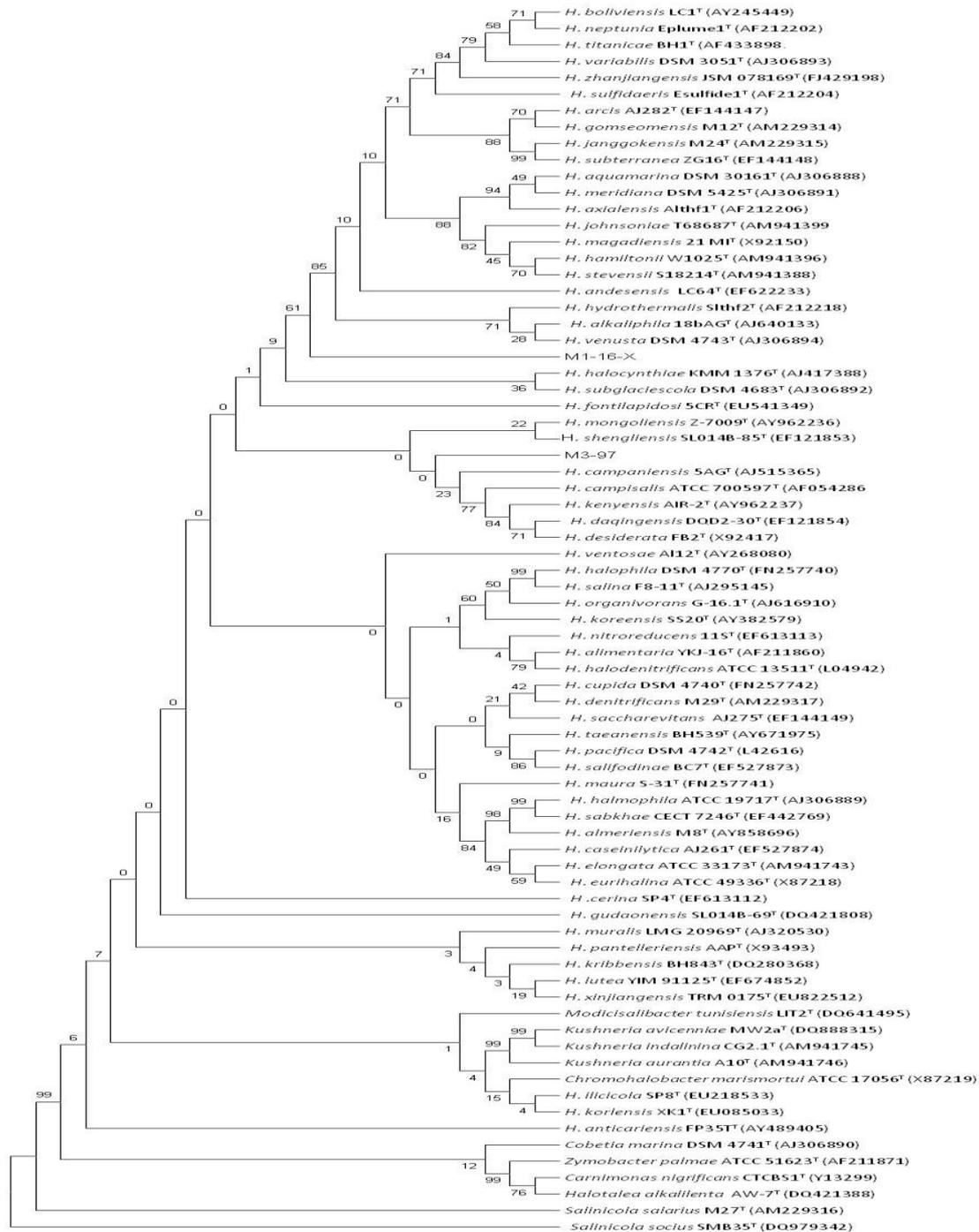


Figura 4. Árbol filogenético obtenido a partir de la secuencia completa del gen del ARNr 16S obtenido mediante el método Máxima Parsimonia. Se indican los valores de “bootstrap” para 1.000 réplicas. Los números de acceso al GenBank se muestran entre paréntesis.

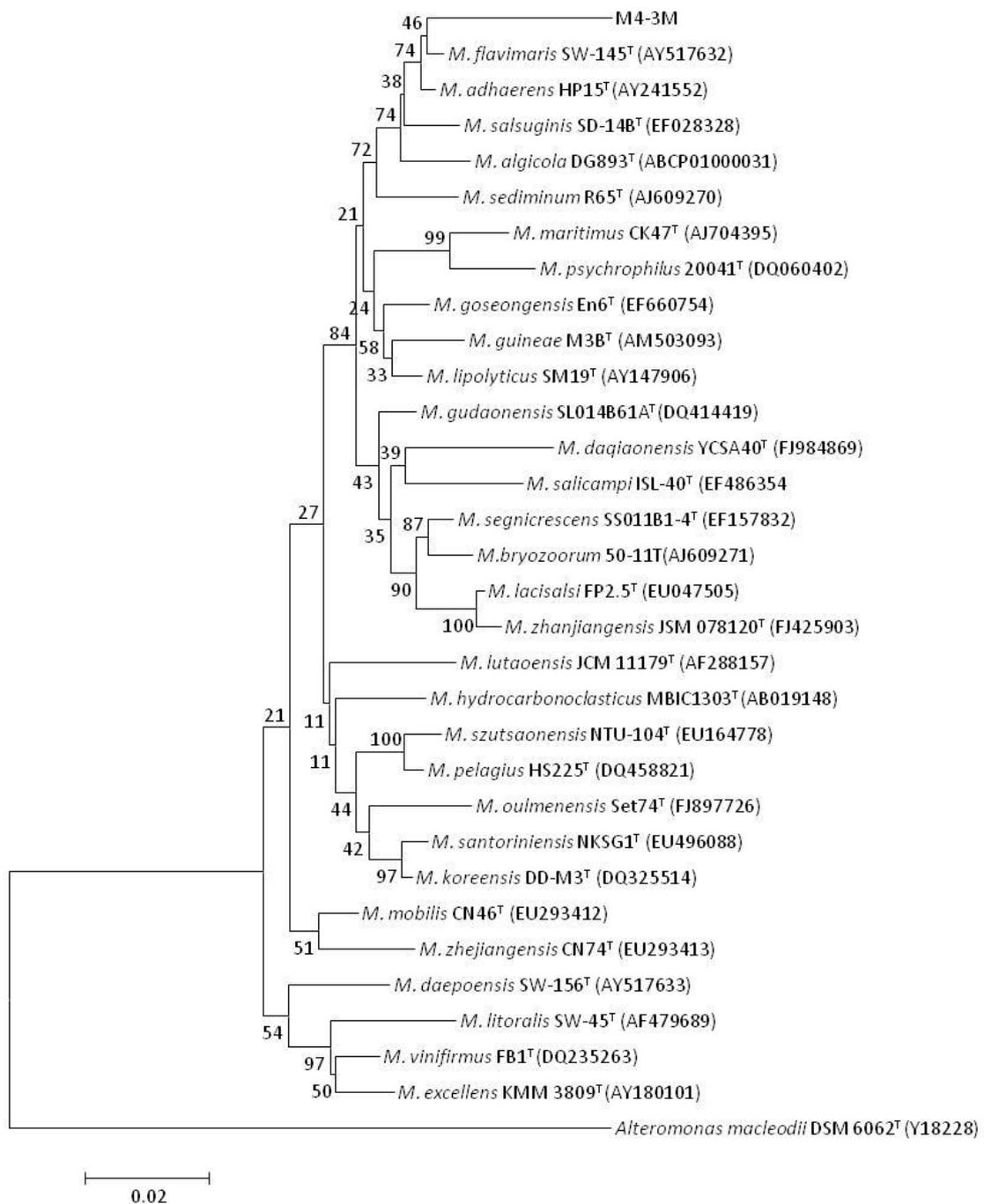


Figura 5. Árbol filogenético obtenido a partir de la secuencia completa del gen del ARNr 16S mediante el método Neighbour Joining. Se indican los valores de “bootstrap” para 1.000 réplicas. Los números de acceso al GenBank se muestran entre paréntesis.

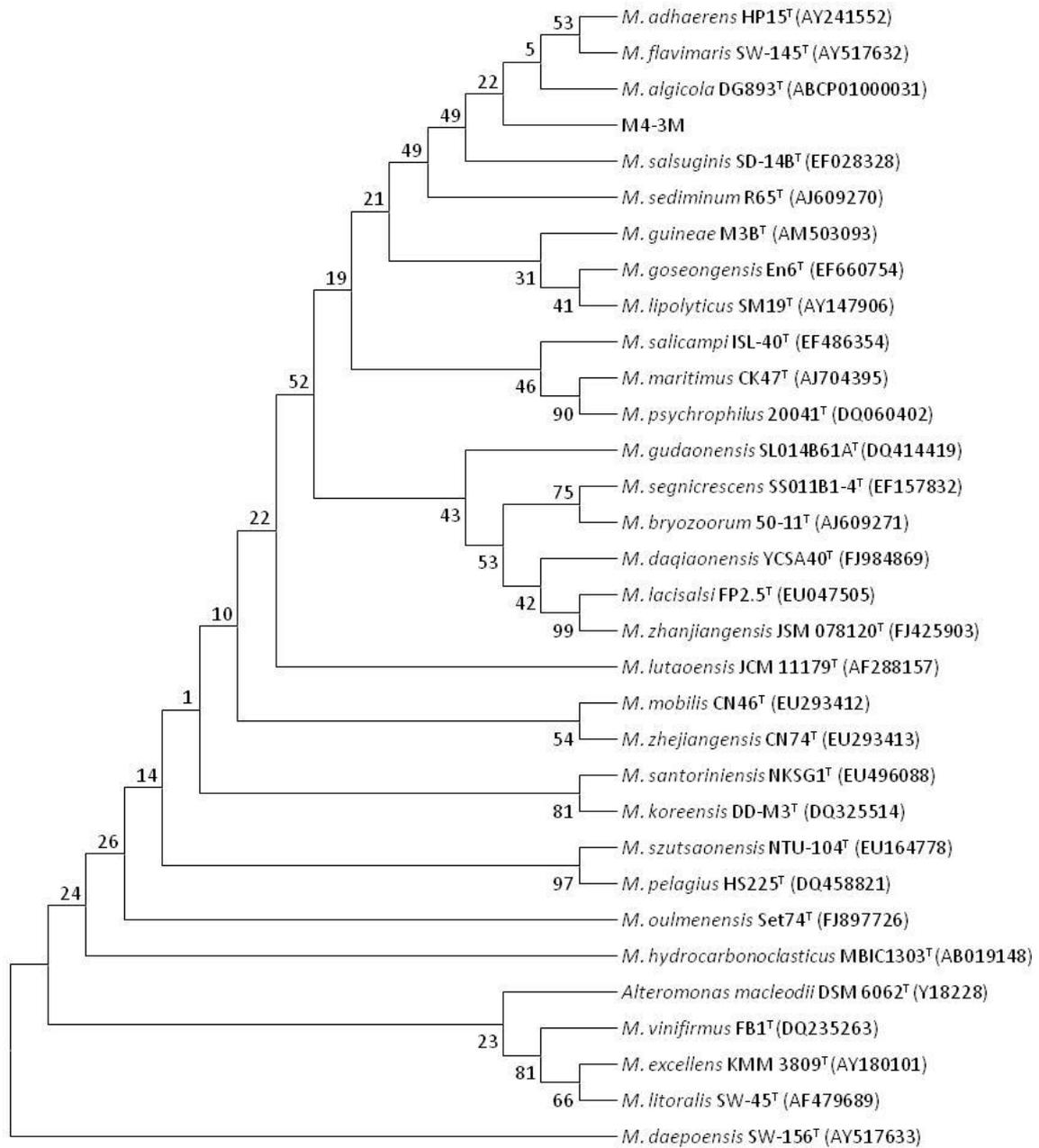


Figura6. Árbol filogenético obtenido a partir de la secuencia completa del gen del ARNr 16S mediante el método Máxima Parsimonia. Se indican los valores de “bootstrap” para 1.000 réplicas. Los números de acceso al GenBank se muestran entre paréntesis.

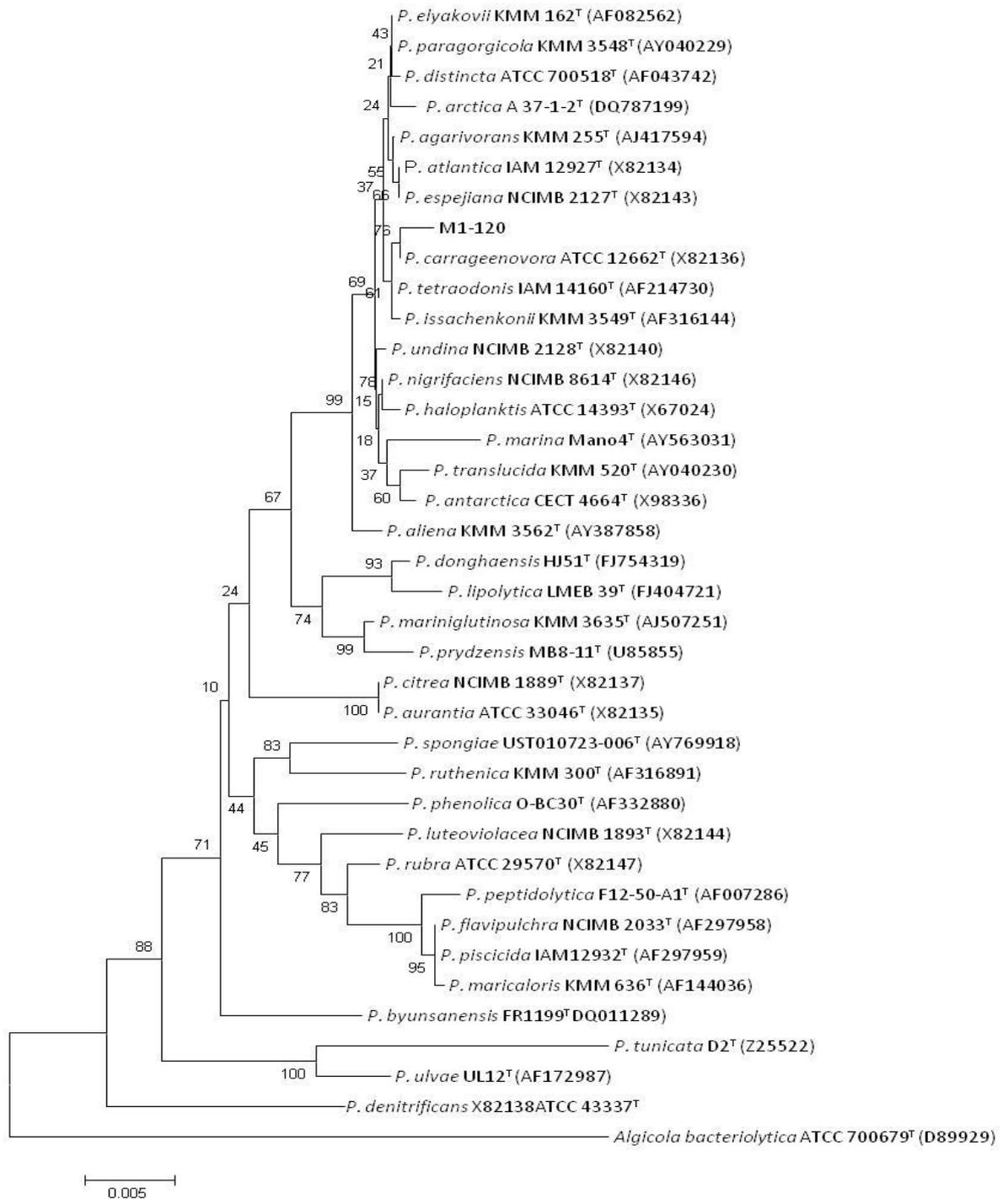


Figura 7. Árbol filogenético obtenido a partir de la secuencia completa del gen del ARNr 16S mediante el método Neighbour Joining. Se indican los valores de “bootstrap” para 1.000 réplicas. Los números de acceso al GenBank se muestran entre paréntesis.

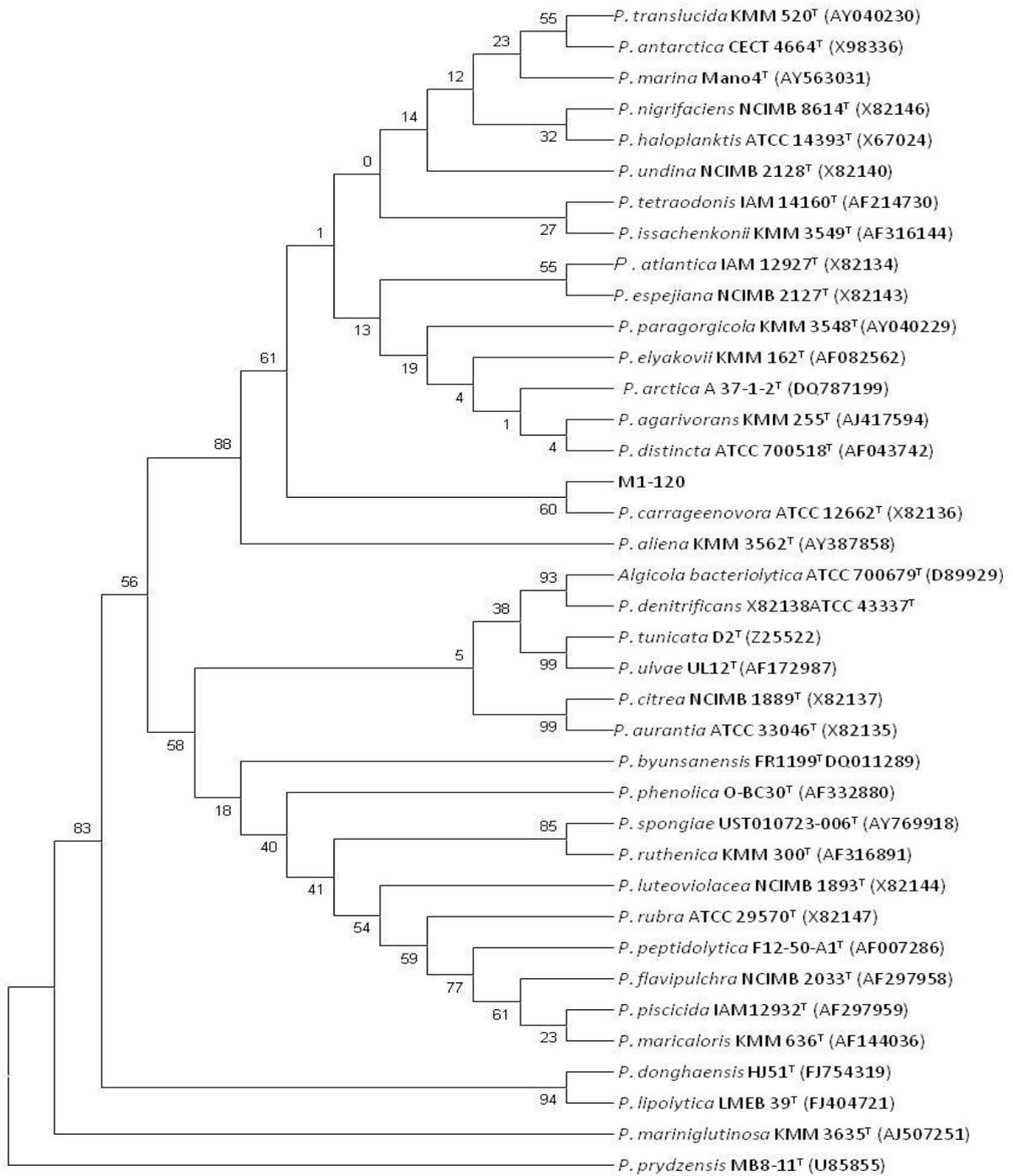


Figura 8. Árbol filogenético obtenido a partir de la secuencia completa del gen del ARNr 16S mediante el método Máxima Parsimonia. Se indican los valores de “bootstrap” para 1.000 réplicas. Los números de acceso al GenBank se muestran entre paréntesis

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS FENOTÍPICAS REALIZADOS EN LAS CEPAS DE ARQUEAS

Tabla 1. Características morfológicas y coloniales

Gram: Tinción de Gram

Morf: Morfología

Pig: Pigmentación de las colonias. C: crema; A: amarillo;

Muc: Mucosidad de las colonias. 0: no mucosas; 1: mucosas; 2: muy mucosas

CEPAS UTILIZADAS COMO DE REFERENCIA

R1 , <i>Haladaptatus paucihalophilus</i>	R11 , <i>Halorubrum aidingense</i>
R2 , <i>Haloarcula argentinensis</i>	R12 , <i>Halostagnicola kamekurae</i>
R3 , <i>Haloarcula quadrata</i>	R13 , <i>Halostagnicola larsenii</i>
R4 , <i>Halococcus hamelinensis</i>	R14 , <i>Haloterrigena jeotgali</i>
R5 , <i>Haloferax mediterranei</i>	R15 , <i>Haloterrigena thermotolerans</i>
R6 , <i>Haloferax mucosum</i>	R16 , <i>Natrialba aegyptiaca</i>
R7 , <i>Haloferax prahovense</i>	R17 , <i>Natrinema altunense</i>
R8 , <i>Halogeometricum borinquense</i>	R18 , <i>Natrinema gari</i>
R9 , <i>Halomicrobium mukohataei</i>	R19 , <i>Natrinema pallidum</i>
R10 , <i>Halorhabdus tiamatea</i>	

Tabla 1. Características morfológicas y coloniales

CEPA	Gram	Morf	Muc	Pig	Mov	CEPA	Gram	Morf	Muc	Pig	Mov
1-7	-	CB	1	R	+	3-8a	-	CB	2	R	+
1-9	-	B	1	R	+	3-8b	-	CB	2	R	+
1-10	-	B	1	R	+	3-8c	-	CB	1	R	+
1-13	-	CB	1	R	+	3-8d	-	CB	1	R	+
1-17	-	B	1	R	+	3-9b	-	CB	1	R	+
1-18	-	B	1	R	+	3-2b	-	B	2	R	+
1-19	-	CB	1	R	+	3-2d	-	B	1	R	+
1-20	-	B	1	R	+	4-1a	-	CB	1	R	+
1-23	-	CB	1	R	+	4-4b	-	CB	1	R	+
2-1C	-	CB	1	R	+	4-4a	-	CB	1	R	+
2-1D	-	CB	1	Rj	+	4-4d	-	CB	2	R	+
2-2A	-	P	1	R	+	4-4c	-	CB	2	R	+
2-2B	-	P	2	Rj	+	4-1b	-	CB	1	R	+
2-2D	-	CB	2	R	+	4-1c	-	CB	1	R	+
2-4A	-	CB	1	R	+	4-6c	-	CB	1	R	+
2-4B	-	CB	1	R	+	4-6a	-	B	2	R	+
2-4C	-	CB	2	R	+	4-6b	-	B	1	R	+
2-4D	-	CB	1	R	+	R1	-	B	ND	Rj	+
2-7A	-	P	1	R	+	R2	-	C	ND	R	+
2-7B	-	CB	2	R	+	R3	-	B	ND	R	+
2-7C	-	CB	1	R	+	R4	-	P	ND	Rj	-
2-8	-	CB	1	R	+	R5	-	B	ND	Rk	-
2-9A	-	CB	1	Rj	+	R6	-	P	ND	Rj	+
2-9B	-	CB	1	R	+	R7	-	B	ND	R	+
2-11A	-	CB	1	R	+	R8	-	B	ND	Rj	-
2-11D	-	CB	1	R	+	R9	-	P	ND	Rj	-
3-1a	-	CB	1	R	+	R10	-	B	ND	Rj	+
3-1c	-	CB	1	R	+	R11	-	C	ND	R	-
3-1d	-	CB	2	R	+	R12	-	B	ND	R	-
3-2a	-	CB	1	R	+	R13	-	P	ND	R	+
3-4a	-	CB	1	R	+	R14	-	B	ND	Rj	+
3-7b	-	CB	1	R	+	R15	-	C	ND	Rk	-
						R16	-	B	ND	Rj	-
						R17	-	P	ND	R	+
						R18	-	B	ND	Rj	-
						R19	-	C	ND	Rj	-

Tabla 2. Características fisiológicas (I)

Crecimiento a distintas concentraciones de sal (% p/v)

Crecimiento a distintas concentraciones de magnesio (% p/v)

Tabla 3. Características fisiológicas (II)

Crecimiento a distintas temperaturas (°C)

Crecimiento a distintos valores de pH

Tabla 2. Características fisiológicas (I)

CEPA	Sales (% p/v)									Magnesio (% p/v)							
	0	1	3	5	10	15	20	25	30	0	0.5	1	2	5	10	20	30
M1-7	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
M1-9	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
M1-10	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
M1-13	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
M1-17	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
M1-18	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
M1-19	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
M1-20	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
M1-23	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
M2-11a	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M2-11d	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M2-1c	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M2-1d	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M2-2a	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M2-2b	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M2-2d	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M2-4a	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-4b	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-4c	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M2-4d	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-7a	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-7b	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M2-7c	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M2-8	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M2-9a	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M2-9b	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M3-1a	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M3-1c	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M3-1d	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M3-2a	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M3-2b	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M3-2d	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M3-4a	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M3-7b	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M3-8a	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M3-8b	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M3-8c	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 2. Continuación

CEPA	Sales (% p/v)									Magnesio (% p/v)							
	0	1	3	5	10	15	20	25	30	0	0.5	1	2	5	10	20	30
M3-8d	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M3-9b	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
M4-1a	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-1b	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-1c	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-4a	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-4b	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M4-4c	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M4-4d	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-6a	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-6b	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M4-6c	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
R2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
R3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R4	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
R6	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
R7	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R8	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R9	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R10	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
R11	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
R12	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
R13	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
R14	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
R15	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
R16	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R17	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
R18	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
R19	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 3. Características fisiológicas (II)

CEPA	Temperatura (°C)					pH					
	25	32	37	41	51	5	6	7	8	9	10
M1-7	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
M1-9	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
M1-10	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
M1-13	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
M1-17	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
M1-18	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M1-19	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M1-20	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M1-23	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
M2-11a	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
M2-11d	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M2-1c	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
M2-1d	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M2-2a	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
M2-2b	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M2-4b	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M2-2d	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
M2-4a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M2-4c	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
M2-4d	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
M2-7a	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
M2-7b	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
M2-7c	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
M2-8	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
M2-9a	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
M2-9b	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
M3-1a	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
M3-1c	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
M3-1d	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
M3-2a	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
M3-2b	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
M3-2d	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
M3-8b	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
M3-4a	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
M3-7b	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
M3-8a	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
M3-8c	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-

Tabla 3. Continuación

CEPA	Temperatura (°C)					pH					
	25	32	37	41	51	5	6	7	8	9	10
M3-8d	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
M3-9b	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
M4-1a	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
M4-1b	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M4-1c	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M4-4a	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M4-4b	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M4-4c	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M4-4d	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
M4-6a	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M4-6b	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
M4-6c	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
R1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
R2	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
R3	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
R4	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
R5	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
R6	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
R7	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
R8	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
R9	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
R10	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
R11	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
R12	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
R13	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
R14	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
R15	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
R16	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
R17	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
R18	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
R19	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-

Tabla 4. Pruebas bioquímicas (I)

Cat: catalasa

Ox: oxidasa

NR: presencia de nitrato reductasa

nr: presencia de nitrito reductasa

DNA: producción de DNAsa

Gel: producción de gelatinasa

Alm: hidrólisis del almidón

TW80: hidrólisis del Tween 8-

Ind: indol

RM: rojo de metilo

VP: Voges-Proskauer

Resp. NO_3^- : respiración sobre nitrato

Prod. gas: producción de gas por respiración sobre nitrato

Arg: crecimiento anaerobio sobre L-arginina

KNO_3 : crecimiento anaerobio sobre KNO_3

Tabla 4. Pruebas bioquímicas (I)

CEPA	Ox	Cat	NR	nr	DNA	Gel	Alm	TW80	Ind	RM	VP	Resp. NO ₃ ⁻	Prod. gas	Arg	KNO ₃
M1-7	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
M1-9	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
M1-10	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	ND
M1-13	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
M1-17	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
M1-18	+	+	+	+	-	ND	ND	ND	ND	-	-	+	+	-	ND
M1-19	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-
M1-20	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
M1-23	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	ND
M2-11a	-	+	+	+	-	-	+	ND	+	-	-	+	-	-	-
M2-11d	-	+	+	+	-	-	+	ND	-	-	-	+	-	-	-
M2-1c	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
M2-1d	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
M2-2a	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
M2-2b	-	+	+	-	-	-	-	ND	-	-	-	-	ND	-	-
M2-2d	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
M2-4a	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-4b	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
M2-4c	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
M2-4d	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
M2-7a	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
M2-7b	+	ND	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+

Tabla 4. Continuación

CEPA	Ox	Cat	NR	nr	DNA	Gel	Alm	TW80	Ind	RM	VP	Resp. NO ₃ ⁻	Prod. gas	Arg	KNO ₃
M2-7c	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
M2-8	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
M2-9a	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	ND	-	-
M2-9b	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
M3-1a	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
M3-1c	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+
M3-1d	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+
M3-2a	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
M3-2b	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
M3-2d	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
M3-4a	+	+	+	+	+	+	-	-	ND	-	-	ND	ND	-	+
M3-7b	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+
M3-8a	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
M3-8b	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
M3-8c	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-
M3-8d	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
M3-9b	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-
M4-1a	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
M4-1b	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
M4-1c	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
M4-4a	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
M4-4b	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
M4-4c	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
M4-4d	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
M4-6a	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-

Tabla 4. Continuación

CEPA	Ox	Cat	NR	nr	DNA	Gel	Alm	TW80	Ind	RM	VP	Resp. NO ₃ ⁻	Prod. gas	Arg	KNO ₃
M4-6b	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
M4-6c	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
R1	+	+	ND	ND	ND	+	+	-	-	ND	ND	-	-	-	-
R2	+	+	ND	ND	ND	+	+	+	-	ND	ND	-	-	-	-
R3	+	+	ND	ND	ND	+	-	+	-	ND	ND	+	-	-	-
R4	+	+	ND	ND	ND	+	-	+	-	ND	ND	+	-	-	-
R5	+	+	ND	ND	ND	+	+	-	-	ND	ND	+	-	-	-
R6	+	+	ND	ND	ND	+	-	+	-	ND	ND	+	-	-	-
R7	+	+	ND	ND	ND	+	+	+	-	ND	ND	+	-	-	-
R8	+	+	ND	ND	ND	-	-	-	-	ND	ND	+	+	-	-
R9	+	+	ND	ND	ND	-	+	+	-	ND	ND	+	-	-	-
R10	-	+	ND	ND	ND	+	-	+	-	ND	ND	+	-	-	-
R11	+	+	ND	ND	ND	+	+	+	D	ND	ND	+	-	-	+
R12	+	+	ND	ND	ND	+	-	+	-	ND	ND	+	+	-	-
R13	+	+	ND	ND	ND	+	-	-	-	ND	ND	-	-	-	-
R14	+	+	ND	ND	ND	+	+	+	-	ND	ND	+	-	-	-
R15	+	+	ND	ND	ND	+	+	+	-	ND	ND	+	-	-	+
R16	+	+	ND	ND	ND	+	+	+	-	ND	ND	-	-	-	-
R17	+	+	ND	ND	ND	+	+	+	-	ND	ND	-	-	-	-
R18	+	+	ND	ND	ND	+	+	-	-	ND	ND	+	-	-	-
R19	+	+	ND	ND	ND	+	+	-	-	ND	ND	+	-	-	-

Tabla 5. Pruebas bioquímicas (II). Utilización de distintos sustratos como única fuente de carbono, y energía o como fuente de carbono, nitrógeno y energía

Cit: utilización del citrato

Glu: D-glucosa

Gal: D-galactosa

Lac: lactosa

Fruc: D-fructosa

Glic: DL-glicerol

Man: D-manitol

Trea: D-trehalosa

Xil: D-xilosa

Ara: L-arabinosa

Sor: D-sorbitol

Ser: L-serina

Alan: DL-alanina

Cist: L-cisteina

Val:L-valina

Tabla 5. Pruebas bioquímicas (II). Utilización de distintos sustratos como única fuente de carbono, y energía o como fuente de carbono, nitrógeno y energía

CEPA	Cit	Glu	Gal	Lac	Fruc	Glic	Man	Trea	Sor	Xil	Arab	Ser	Alan	Val	Cis
M1-7	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
M1-9	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
M1-10	ND	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
M1-13	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-
M1-17	-	+	2	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
M1-18	-	+	+	-	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M1-19	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
M1-20	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
M1-23	ND	+	+	-	+	+	-	ND	-	+	+	ND	ND	ND	ND
M2-11a	ND	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
M2-11d	ND	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
M2-1c	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
M2-1d	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
M2-2a	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
M2-2b	ND	ND	ND	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
M2-2d	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
M2-4a	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
M2-4b	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
M2-4c	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
M2-4d	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
M2-7a	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-
M2-7b	ND	+	ND	ND	ND	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
M2-7c	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-
M2-8	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
M2-9a	+	+	+	-	+	+	ND	-	+	+	+	+	-	+	-
M2-9b	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
M3-1a	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
M3-1c	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
M3-1d	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
M3-2a	ND	+	+	ND	ND	+	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M3-2b	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
M3-2d	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
M3-4a	ND	+	-	-	+	-	-	-	ND	+	-	-	ND	ND	ND
M3-7b	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
M3-8a	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
M3-8b	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
M3-8c	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 5. Continuación

CEPA	Cit	Glu	Gal	Lac	Fruc	Glic	Man	Trea	Sor	Xil	Arab	Ser	Alan	Val	Cis
M3-8d	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
M3-9b	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
M4-1a	-	+	+	+	-	+	+	+	D	-	+	D	D	D	D
M4-1b	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
M4-1c	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
M4-4a	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
M4-4b	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
M4-4c	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
M4-4d	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
M4-6a	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
M4-6b	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
M4-6c	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
R1	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
R2	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
R3	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
R4	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
R5	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
R6	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
R7	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
R8	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
R9	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
R10	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
R11	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
R12	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R13	D	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
R14	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
R15	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
R16	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R17	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
R18	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
R19	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-

Tabla 6. Pruebas bioquímicas (III). Producción de ácidos

Glu: D-glucosa

Gal: D-galactosa

Lac: lactosa

Fruc: D-fructosa

Glic: DL-glicerol

Man: D-manitol

Trea: D-trehalosa

Xil: D-xilosa

Ara: L-arabinosa

Sac: sacarosa

Tabla 6. Pruebas bioquímicas (III). Producción de ácidos

CEPA	Glu	Gal	Lac	Fruc	Gli	Man	Trea	Xil	Ara	Sac
M1-7	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
M1-9	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
M1-10	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
M1-13	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
M1-17	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
M1-18	+	+	ND	+	+	+	ND	ND	ND	ND
M1-19	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
M1-20	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
M1-23	+	+	-	+	+	+	ND	+	-	+
M2-11a	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+
M2-11d	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+
M2-1c	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+
M2-1d	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+
M2-2a	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
M2-2b	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
M2-2d	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-4a	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
M2-4b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M2-4c	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
M2-4d	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
M2-7a	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
M2-7b	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
M2-7c	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
M2-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2-9a	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	-
M2-9b	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
M3-1a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-1c	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
M3-1d	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
M3-2a	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
M3-2b	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
M3-2d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M3-4a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
M3-7b	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
M3-8a	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
M3-8b	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
M3-8c	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
M3-8d	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+

Tabla 6. Continuación

CEPA	Glu	Gal	Lac	Fruc	Gli	Man	Trea	Xil	Ara	Sac
M3-9b	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
M4-1a	D	+	-	-	-	+	-	-	+	-
M4-1b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-1c	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
M4-4a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4-4b	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
M4-4c	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
M4-4d	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
M4-6a	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
M4-6b	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
M4-6c	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
R1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R2	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
R3	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
R4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R5	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
R6	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
R7	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
R8	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
R9	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
R10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R11	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
R12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R14	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-
R15	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
R16	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
R17	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+
R18	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
R19	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-

Tabla 7. Sensibilidad a agentes antimicrobianos

AMP: Ampicilina (10µg)

SXT: Trimetropin (1,25µg) + Sulfametoxazol (23,75µg)

S: Estreptomicina (10µg)

CIP: Ciprofloxacino (5µg)

B: Bacitracina (10UI)

TE: Tetraciclina (30 µg)

C: Cloranfenicol (30µg)

RD: Rifampicina (5µg)

NA: Ácido nalidíxico (30µg)

P: Penicilina G (10UI)

E: Eritromicina (15µg)

RF: Cefalotina (30µg)

Tabla 7. Sensibilidad a agentes antimicrobianos

CEPA	AMP	SXT	S	CIP	B	TE	C	RD	NA	P	E	RF
M1-7	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
M1-9	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
M1-10	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
M1-13	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
M1-17	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
M1-18	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	+	ND	-	ND	ND
M1-19	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
M1-20	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
M1-23	-	ND	ND	-	+	ND	ND	ND	ND	-	-	-
M2-11a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-11d	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
M2-1c	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
M2-1d	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
M2-2a	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
M2-2b	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
M2-2d	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
M2-4a	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
M2-4b	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
M2-4c	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
M2-4d	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
M2-7a	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
M2-7b	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
M2-7c	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
M2-8	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
M2-9a	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-9b	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
M3-1a	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
M3-1c	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
M3-1d	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
M3-2a	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
M3-2b	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
M3-2d	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
M3-4a	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
M3-7b	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
M3-8a	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
M3-8b	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
M3-8c	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
M3-8d	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 7. Continuación

CEPA	AMP	SXT	S	CIP	B	TE	C	RD	NA	P	E	RF
M3-9b	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
M4-1a	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
M4-1b	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
M4-1c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4-4a	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
M4-4b	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
M4-4c	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
M4-4d	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
M4-6a	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
M4-6b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4-6c	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
R1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R3	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
R4	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
R5	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
R6	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
R7	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
R8	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
R9	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R10	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
R11	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
R12	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
R13	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
R14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R15	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
R16	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
R17	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
R18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R19	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Tabla 1. Asignación taxonómica de las cepas de arqueas mediante la comparación de la secuencia parcial del gen del ARNr 16s mediante el programa *EzTazon server 2.1*.

CEPA	ASIGNACIÓN TAXONÓMICA (%)	CEPA	ASIGNACIÓN TAXONÓMICA (%)
M1-10	<i>Halorubrum aidingense</i> 31-hong ^T 100	M2-9b	<i>Haloterrigena thermotolerans</i> PR5 ^T 99.3
M1-13	<i>Halostagnicola larsenii</i> XH-48 ^T 98.1	M3-1a	<i>Natrialba aegyptia</i> 40 ^T 99.2
M1-17	<i>Halorubrum aidingense</i> 31-hong ^T 99.8	M3-1c	<i>Halomicrobium mukohataei</i> arg-2 ^T 96.6
M1-18	<i>Natrinema pallidum</i> CIP 106292 ^T 98.7	M3-1d	<i>Halomicrobium mukohataei</i> arg-2 ^T 97.7
M1-19	<i>Halorubrum aidingense</i> 31-hong ^T 100	M3-2a	<i>Haloferax mediterranei</i> R-4 ^T 98.7
M1-20	<i>Halorubrum aidingense</i> 31-hong ^T 100	M3-2b	<i>Haloferax mucosum</i> PA12 ^T 98.3
M1-23	<i>Haloterrigena jeotgali</i> A29 ^T 99.3	M3-2d	<i>Halococcus hamelinensis</i> 100A6 ^T 98.6
M1-7	<i>Natrialba aegyptia</i> 40 ^T 98.8	M3-4a	<i>Haloferax mediterranei</i> R-4 ^T 98.6
M1-9	<i>Halostagnicola kamekurae</i> 194-10 ^T 98.3	M3-7b	<i>Haloterrigena thermotolerans</i> PR5 ^T 98.6
M2-11a	<i>Halostagnicola larsenii</i> XH-48 ^T 97.8	M3-8a	<i>Haloferax prahovense</i> TL6 ^T 99.5
M2-11d	<i>Halostagnicola kamekurae</i> 194-10 ^T 97.7	M3-8b	<i>Haloferax prahovense</i> TL6 ^T 99.1
M2-1c	<i>Natrinema pallidum</i> CIP 106292 ^T 97.5	M3-8c	<i>Halococcus hamelinensis</i> 100A6 ^T 99.2
M2-1d	<i>Natrinema altunense</i> AJ2 ^T 98	M3-8d	<i>Halococcus hamelinensis</i> 100A6 ^T 98.4
M2-2a	<i>Haloferax mediterranei</i> R-4 ^T 98.3	M3-9b	<i>Haloterrigena jeotgali</i> A29 ^T 99.1
M2-2b	<i>Halostagnicola kamekurae</i> 194-10 ^T 99	M4-1a	<i>Haloferax mucosum</i> PA12 ^T 97.9
M2-2d	<i>Halorhabdus tiamatea</i> SARL4B ^T 89.4	M4-1b	<i>Natrinema gari</i> HIS40-3 ^T 98.6
M2-4a	<i>Halogeometricum borinquense</i> PR3 ^T 99.2	M4-1c	<i>Natrinema pallidum</i> CIP 106292 ^T 99.3
M2-4b	<i>Haloarcula argentinensis</i> arg-1 ^T 98.4	M4-4a	<i>Natrinema pallidum</i> CIP 106292 ^T 98.7
M2-4c	<i>Haloarcula quadrata</i> 801030/1 ^T 99.1	M4-4b	<i>Haloferax mediterranei</i> R-4 ^T 98
M2-4d	<i>Haloarcula quadrata</i> 801030/1 ^T 98.3	M4-4c	<i>Haloferax mediterranei</i> R-4 ^T 98.8
M2-7a	<i>Haloarcula argentinensis</i> arg-1 ^T 98	M4-4d	<i>Haloferax mediterranei</i> R-4 ^T 98.4
M2-7b	<i>Natrinema pallidum</i> CIP 106292 ^T 96.3	M4-6a	<i>Haladaptatus paucihalophilus</i> DX253 ^T 93.3
M2-7c	<i>Natrinema altunense</i> AJ2 ^T 98.6	M4-6b	<i>Haladaptatus paucihalophilus</i> DX253 ^T 94.1
M2-8	<i>Natrinema pallidum</i> CIP 106292 ^T 98.1	M4-6c	<i>Halostagnicola larsenii</i> XH-48 ^T 98.3
M2-9a	<i>Natrinema altunense</i> AJ2 ^T 98.5		

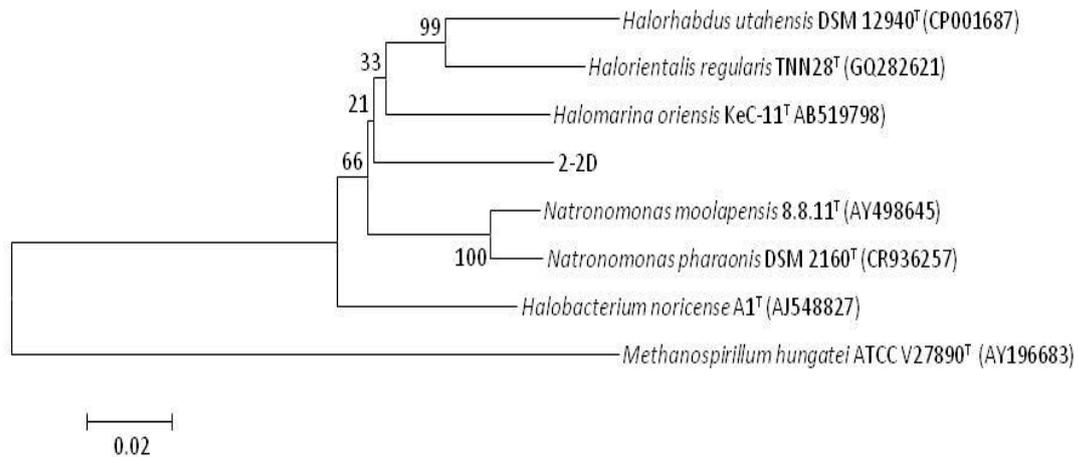


Figura 1. Árbol filogenético obtenido a partir de la secuencia completa del gen del ARNr 16S mediante el método Neighbour Joining. Se indican los valores de “bootstrap” para 1.000 réplicas. Los números de acceso al GenBank se muestran entre paréntesis.

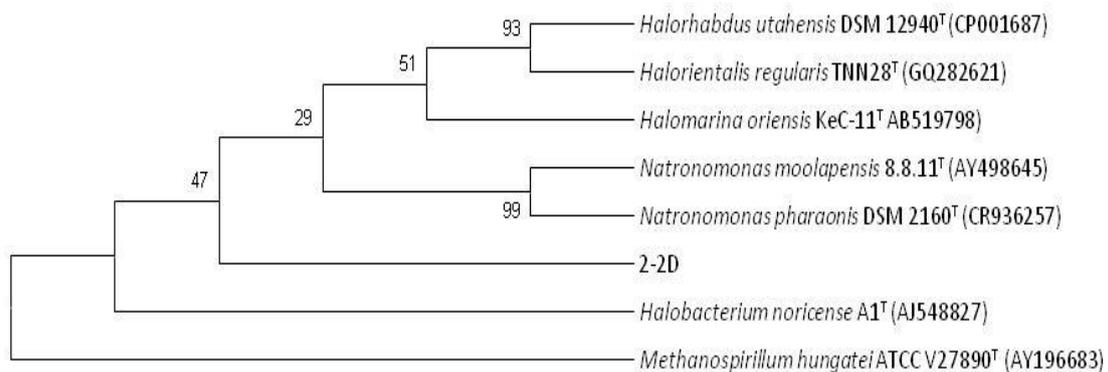


Figura 2. Árbol filogenético obtenido a partir de la secuencia completa del gen del ARNr 16S mediante el método Máxima Parsimonia. Se indican los valores de “bootstrap” para 1.000 réplicas. Los números de acceso al GenBank se muestran entre paréntesis.

MEDIOS DE CULTIVO PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**AnRS**

(Bitzer y col., 2006)

Triptona (Difco®)	10g
Extracto de levadura (Difco®)	5g
Glicina (Sigma®)	0,5g
Acido Antranílico (Sigma®)	0,5g
Solución artificial seawater	1.000ml

Solución artificial seawater

(Bitzer y col., 2006)

NaCl (Panreac®)	18,16g
MgCl ₂ x 6H ₂ O (Merck®)	11,4g
KCl (Merck®)	0,66g
CaCl ₂ (Merck®)	1,47g
KBr (Merck®)	0,09g
KH ₂ PO ₄ (Difco®)	0,3g
NH ₄ Cl (Difco®)	0,38g
NaHCO ₃ (Sigma®)	0,29g
Holdang solution (Sigma®)	1ml
Seawater (Sigma®)	10ml
Agua destilada c.s.p	1.000ml

GINR

(Van-Thouoc y col., 2010)

Glucosa (Panreac®)	20g
NaCl (Panreac®)	45g
NH ₄ Cl (Difco®)	4g
MgSO ₄ x 7H ₂ O (Merck®)	6,94g
K ₂ HPO ₄ (Difco®)	3,54g
FeSO ₄ x 7H ₂ O (Merck®)	0,01g
Glutamato monosódico (Sigma®)	20g
Agua destilada c.s.p	1.000ml

GSS medium

(Zheng y col., 2007)

Almidón soluble (Difco®)	1g
Glucosa (Panreac®)	2g
Harina de soja (Difco®)	2,5g
Extracto de carne (Difco®)	0,1g
Extracto de levadura (Difco®)	0,4g
NaCl (Panreac®)	5g
K ₂ HPO ₄ (Difco®)	0,025g
CaCO ₃ (Merck®)	0,2g
Agua destilada c.s.p	100ml

ASG-Fe

(Homman y col., 2009)

NH ₄ Cl (Difco®)	1g
Casaminoácidos (Sigma®)	10g
MgSO ₄ x 7H ₂ O (Merck®)	12,35g
Glicerolfosfato sódico (Merck®)	1g
CaCl ₂ x 2H ₂ O (Merck®)	1,45g
NaCl (Panreac®)	45g
KCl (Merck®)	0,75g
Glicerol (Panreac®)	3ml
Agua destilada c.s.p	1.000ml

Añadir antes de inocular

Buffer HEPES 1,0M (pH7,4)	20ml
NaHCO ₃ x 1,0M (filtrado)	4ml
sol. stock de vitaminas (mg/200ml)	20ml
Biotina	40g
Niacina	4g
Tiamina	2g
Acido p-aminobenzoico	4g
Acido calcico pantotenico	2g
Piridoxina hidrocloreide	20g
Cianocobalamina	2g
Riboflavina	4g
Acido folico	4g
Agua bidestilada esteril	200ml

Landy medium

(Landy y col., 1948; Akpa y col., 2001)

Glucosa (Panreac®)	20g
L-Treonina (Sigma®)	5g
MgSO ₄ (Merck®)	0,5g
KCl (Merck®)	0,5g
KH ₂ PO ₄ (Difco®)	1g
Fe ₂ SO ₃ (Merck®)	0,0012g
MnSO ₄ (Merck®)	0,0014g
CuSO ₄ (Merck®)	0,0016g
Solución de sales al 5% c.s.p.	166,6ml
Agua destilada c.s.p	1.000ml

ASW

(Rontani y col., 1997)

Extracto de levadura (Difco®)	5g
Bacto peptona (Difco®)	5g
NaCl (Panreac®)	0,2M
Fe(SO ₄) ₃ (Sigma®)	0,1mM
K ₂ HPO ₄ (Difco®)	0,33mM
NaHCO ₃ (Merck®)	20mM
6,10,14-Trimetilpentodecan-2-one	3mM
Agua destilada c.s.p	1.000ml

Anexo X

Jacques medium

(Akpa y col., 2001)

Sucrosa (Sigma®)	20g
Peptona (Sigma®)	30g
Extracto de levadura (Difco®)	7g
KH ₂ PO ₄ (Difco®)	1,9g
MgSO ₄ (Merck®)	0,45g
Solución de elementos traza	9ml
Solución de sales al 5% c.s.p.	166,6ml
Agua destilada c.s.p	1.000ml

HS

Hickford y col., 2004

NaCl (Panreac®)	50g
MgSO ₄ x7H ₂ O (Merck®)	0,4g
NH ₄ Cl (Difco®)	1g
K ₂ HPO ₄ (Difco®)	3g
CaCl ₂ x 2H ₂ O (Merck®)	0,15g
Succinato sódico (Sigma®)	5g
Agua destilada c.s.p	1.000ml

2X-YT

(Crupper, S. y Landolo, J., 1996)

Triptona (Difco®)	16g
Extracto de levadura (Difco®)	10g
NaCl (Panreac®)	5g
Agua destilada c.s.p	1.000ml

M9 modificado

(Strauch y col., 2001)

M9 medium	
Glucosa (Panreac®)	10
Mitomycina C	1.000µg/
Agua destilada c.s.p	1.000ml

NM

(Ogata y col., 1971)

Peptona (Sigma®)	15g
Glucosa (Panreac®)	10g
K ₂ HPO ₄ (Difco®)	3g
MgSO ₄ x 7H ₂ O (Merck®)	0,2g
NaCl (Panreac®)	50g
Agua destilada c.s.p	1.000ml

Solución de elementos traza

(Akpa y col., 2001)

CuSO ₄ (Merck®)	0,001g
FeCl ₃ (Merck®)	0,005g
NaMnO ₄ (Sigma®)	0,004g
KI (Panreac®)	0,002g
ZnSO ₄ (Sigma®)	0,014g
H ₃ BO ₃ (Panreac®)	0,01g
MnSO ₄ (Merck®)	0,0036g
Agua destilada c.s.p	1.000ml

MM

(Argandoña y col., 2001)

Extracto de levadura (Difco®)	0,4g
Proteosa-peptona nº3 (Difco®)	0,2g
Solución de sales al 5% c.s.p.	16,6ml
Agua destilada c.s.p	100ml

NBD

(Pelludat y col., 1998=)

Nutrient Broth (Difco®)	8g
α-α' bipiridil (Sigma®)	200µl
NaCl (Panreac®)	5g
Agua destilada c.s.p	1.000ml

M9

(Mokracka y col., 2004)

K ₂ HPO ₄ (Difco®)	0,3g
NaCl (Panreac®)	50g
NH ₄ Cl (Difco®)	1g
CaCl ₂ (Merck®)	0,0015g
MgSO ₄ x 7H ₂ O (Merck®)	0,024g
Casaminoácidos (Sigma®)	2g
Ácido succínico (Sigma®)	2g
Agua destilada c.s.p	1.000ml

Mm

(Nys y col., 2001)

L-Asparragina (Sigma®)	0,5g
K ₂ HPO ₄ (Difco®)	0,5g
MgSO ₄ x 7H ₂ O (Merck®)	0,2g
FeSO ₄ x 7H ₂ O (Merck®)	0,01g
Glucosa (Panreac®)	10g
NaCl (Panreac®)	50g
Agua destilada c.s.p	1.000ml

C1 modificado

(Al-Zereini y col., 2010)

Extracto de levadura (Difco®)	0,5g
Triptona (Difco®)	0,5g
NaCl (Panreac®)	1g
Solución artificial seawater	50ml
Tropic marine (Sigma®)	16,7g
Agua destilada c.s.p	1.000ml

B1

(Al-Zereini y col., 2010)

Extracto de maíz (Difco®)	0,5g
A-Z amino (Sigma®)	0,25g
Extracto de carne (Difco®)	3,8g
Extracto de soja (Difco®)	0,1g
Extracto de levadura (Difco®)	0,25g
Seaweed extract (Sigma®)	0,25g
Solución artificial seawater	33,3ml
Agua destilada c.s.p	100ml

Zobell 2216E

(Isnansetyo, A., y Kamei, Y., 2003)

Peptona (Sigma®)	5g
Extracto de levadura (Difco®)	1g
FePO ₄ (Sigma®)	0,1g
Seawater (Sigma®)	1.000ml

HM

(Ventosa y col., 1998)

Extracto de Levadura	0,1g
Peptona	0,05g
Glucosa	0,01g
KCl (Merck®)	0,02g
MgSO ₄ 7H ₂ O (Panreac®)	0,01g
CaCl ₂ x 2H ₂ O (Merck®)	3,6mg
BrNa (Sigma®)	2,3mg
NaCl (Panreac®)	1,78g
NaHCO ₃ . (Panreac®)	0,6mg
FeCl x H ₂ O (Panreac®)	0,01g
Agua destilada c.s.p	1.000ml

BHI

Extracto de cerebro de ternera (Panreac®)	12,50g
Extracto de corazón de buey (Panreac®)	5g
Triptosa (Panreac®)	10g
NaCl (Panreac®)	5g
Na ₂ HPO ₄ (Panreac®)	2,50g
Agua destilada c.s.p	1.000ml

Solución artificial seawater

(Bitzer y col., 2006)

NaCl (Panreac®)	18,16g
MgCl ₂ x 6H ₂ O (Merck®)	11,4g
KCl (Merck®)	0,66g
CaCl ₂ (Merck®)	1,47g
KBr (Merck®)	0,09g
KH ₂ PO ₄ (Difco®)	0,3g
NH ₄ Cl (Difco®)	0,38g
NaHCO ₃ (Sigma®)	0,29g
Holdang solution (Sigma®)	1ml
Seawater (Sigma®)	10ml
Agua destilada c.s.p	1.000ml

Penassay Broth

(Foulds, J., y Shemin, D., 1969)

Gelatina Peptona (Difco®)	5g
Extracto de levadura (Difco®)	1,5g
Extracto de carne (Difco®)	1,5g
Dextrosa (Panreac®)	1g
NaCl (Panreac®)	50g
Fosfato potásico dibásico (Sigma®)	3,68g
Fosfato potásico monobásico Sigma®)	1,32g
Agua destilada c.s.p	1.000ml

Nutrient Broth

Peptona (Sigma®)	5g
Extracto de carne (Difco®)	1g
Extracto de levadura (Difco®)	2g
NaCl (Panreac®)	5g
Agua destilada c.s.p	1.000ml

Marine Broth

Peptona (Sigma®)	5g
Extracto de levadura (Difco®)	1g
Citrato Férrico (Sigma®)	0,1g
NaCl (Panreac®)	19,45g
MgCl ₂ (Merck®)	5,0g
MgSO ₄ (Merck®)	3,24g
CaCl ₂ (Merck®)	1,8g
KCl (Merck®)	0,55g
NaHCO ₃ (Panreac®)	0,16g
KBr (Sigma®)	0,08g
SrCl ₂ (Sigma®)	34,0mg
H ₃ BO ₃ (Sigma®)	22mg
Na ₂ SiO ₃ (Sigma®)	4mg
Fluoruro Sódico	2,4g
NH ₄ NO ₃ (Sigma®)	1,6mg
Na ₂ HPO ₄ (Panreac®)	8mg
Agua destilada c.s.p	1.000ml

Anexo X

TSB

Bacto triptona	17g
Bacto soja	3g
Glucosa	2,5g
Cloruro sódico	5g
Na ₂ HPO ₄	2,5g
Agua destilada c.s.p	1.000ml

M1

LB Agar (Difco®)	
Cloranfenicol (Sigma®)	15 g/ml

RPMI modificado (Moore, 1966)

RPMI c.s.p.	1000ml
Glucosa 50%	36ml
HEPES 1M	4ML
Resazurina	0,002%
Extracto de nitrógeno base	6,7g

Sabouraud Dextrose Agar (Difco®)

Digerido pancreático de caseína	5g
Digerido péptico de tejido animal	5g
Dextrosa	40g
Agua destilada c.s.p	1.000ml

YNB-G

Medio completo	
Extracto de nitrógeno base	67 g
Glucosa	10 g
Agua bidestilada c.s.p	1.000ml
Agar	1 % (p/v)
Preparación: se filtró el medio completo y se añadieron 100 ml de éste a 900 ml de agar estéril	

LB modificado

Triptona (Panreac®)	10g
Extracto de levadura (Panreac®)	5g
NaCl (Panreac®)	35g
Agar (Panreac®)	20g
Agua bidestilada c.s.p	1.000ml

Potato Dextrose Agar (Difco®)

Almidón de patata	4g
Dextrosa	20g
Agar	15g
Agua destilada c.s.p	1.000ml

M2

LB Broth (Difco®)	
Cloranfenicol (Sigma®)	34g/ml

LB Broth

Triptona (Panreac®)	1g
Extracto de levadura (Panreac®)	0,5g
NaCl (Panreac®)	1g
Agua bidestilada c.s.p	100ml

Solución de tween 80 salino

Tween 80	0,25g
NaCl	8g
Agua destilada c.s.p	1.000ml