

**TAXONOMÍA NUMÉRICA Y MOLECULAR DE
BACTERIAS HALOTOLERANTES AISLADAS DEL
LÍQUIDO RESIDUAL DE LAS ACEITUNAS DE MESA**



**Teresa Quesada Martínez
Tesis Doctoral
Granada, 2006**

ÍNDICE.

I. INTRODUCCIÓN.	1
I.1. ACEITUNAS DE MESA.	2
I.1.1. Generalidades de las aceitunas de mesa.	6
I.1.1.1. Comercialización.	6
I.1.1.2. Clasificación de las aceitunas de mesa.	9
<i>I.1.1.2.1. Tipos de aceitunas de mesa.</i>	10
<i>I.1.1.2.2. Variedades de aceitunas de mesa utilizadas.</i>	10
I.1.2. Procesado de las aceitunas de mesa	12
I.1.2.1. Maduración de las aceitunas.	12
I.1.2.2. Aderezo de las aceitunas de mesa	13
<i>I.1.2.2.1. Recolección, transporte y valoración del fruto.</i>	13
<i>I.1.2.2.2. Cocido, lavado y colocación en salmuera.</i>	14
<i>I.1.2.2.3. Fermentación. Alteraciones.</i>	17
<i>I.1.2.2.4. Proceso rápido de elaboración de aceitunas de mesa.</i>	20
<i>I.1.2.2.5. Operaciones complementarias.</i>	21
<i>I.1.2.2.6. Preparación del producto envasado.</i> <i>Condiciones de conservación. Valoración organoléptica.</i>	22
I.1.3. Las aguas residuales de las aceitunas de mesa	26
I.1.3.1. Características físico-químicas y biológicas de las aguas residuales de las aceitunas de mesa.	26
I.1.3.2. Contenido en polifenoles de las aguas residuales de las aceitunas de mesa.	28
I.1.1.3. Sistemas de tratamiento del líquido residual de las aceitunas de mesa	30
I.1.3.4. El problema de los vertidos de las aguas residuales de las aceitunas de mesa	33
<i>I.1.3.4.1. Situación actual.</i>	33
<i>I.1.3.4.2. Influencia de las técnicas de minimización y reutilización de las aguas residuales de las aceitunas de mesa.</i>	34
<i>I.1.3.4.3. Valorización/Biorremediación de las aguas residuales de las aceitunas de mesa.</i>	38
I.2. TAXONOMÍA MICROBIANA.	40
I.2.1. Generalidades.	40
I.2.2. Taxonomía numérica.	52
I.2.3. Taxonomía molecular.	53
I.2.3.1. Macromolécula RNA ribosómico 16S.	55
I.2.3.2. Implicaciones taxonómicas de la composición del DNA.	59
I.2.3.3. Análisis RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA).	64

I.3. GÉNERO <i>BACILLUS</i>	66
I.3.1. Generalidades del género <i>Bacillus</i>	66
I.3.2. Ecología del género <i>Bacillus</i>	71
I.3.3. Importancia del género <i>Bacillus</i> en procesos biotecnológicos.....	74
II. OBJETIVOS	87
III. MATERIAL Y MÉTODOS	89
III.1. MUESTREO Y AISLAMIENTO DE LAS CEPAS	90
III.1.1. Medio y condiciones de cultivo.....	91
III.1.2. Selección de cepas.....	93
III.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS SELECCIONADAS	93
III.2.1. Pruebas morfológicas.....	93
III.2.1.1. Morfología colonial.....	93
III.2.1.2. Estudio microscópico.....	94
III.2.2 Pruebas fisiológicas.....	96
III.2.2.1. Crecimiento a diferentes temperaturas.....	96
III.2.2.2. Crecimiento a diferentes pH.....	96
III.2.2.3. Crecimiento a diferentes concentraciones de sal.....	96
III.2.3. Pruebas nutricionales.....	97
III.2.3.1. Utilización de carbohidratos como única fuente de carbono y energía.....	97
III.2.3.2. Utilización de aminoácidos como única fuente de carbono y energía.....	98
III.2.3.3. Utilización de ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía.....	98
III.2.4. Pruebas bioquímicas.....	98
III.2.4.1. Catalasa.....	99
III.2.4.2. Oxidasa.....	99
III.2.4.3. Prueba de óxido-fermentación. O/F.....	99
III.2.4.4. Producción de indol.....	100
III.2.4.5. Rojo de Metilo.....	101
III.2.4.6. Vogues-Proskauer.....	102
III.2.4.7. Reducción de nitratos y nitritos.....	102
III.2.4.8. Crecimiento en agar Cetrimida.....	103
III.2.4.9. Producción de ácidos a partir de alcoholes y carbohidratos.....	103
III.2.4.10. Pruebas de hidrólisis.....	104

III.2.5. Pruebas susceptibilidad a antibióticos. Prueba de difusión en agar.....	106
III.2.6. Análisis de ácidos grasos.....	108
III.3. TAXONOMÍA POLIFÁSICA.....	109
III.3.1. Taxonomía numérica.....	109
III.3.2. Taxonomía molecular.....	110
III.3.2.1. Extracción, cuantificación y cálculo de la pureza del DNA.....	111
III.3.2.2. Determinación del contenido de las bases guanina-citosina (G+C). Método de la temperatura de fusión.	113
III.3.2.3. Secuenciación y análisis filogenético del gen RNA ribosómico 16S.....	116
III.3.2.4. Hibridación DNA-DNA.....	120
III.3.2.5. Análisis RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA).....	127
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	129
IV.1. RECUENTO DE BACTERIAS TOTALES.....	130
IV.2. SELECCIÓN DE LAS CEPAS Y PROCEDENCIA DE LAS CEPAS SELECCIONADAS.....	133
IV.3. TAXONOMÍA POLIFÁSICA.....	141
IV.3.1. Taxonomía numérica.....	141
IV.3.1.1. Caracterización fenotípica de las cepas seleccionadas.....	141
IV.3.1.1.1. Pruebas morfológicas, movilidad, esporas, oxidasa, catalasa, Gram y O/F.....	142
IV.3.1.1.2. Pruebas de crecimiento a diferentes temperaturas.....	144
IV.3.1.1.3. Pruebas de crecimiento a diferentes pH.....	146
IV.3.1.1.4. Pruebas de crecimiento a diferentes concentraciones de sal.....	148
IV.3.1.1.5. Pruebas de utilización de carbohidratos como única fuente de carbono y energía.....	150
IV.3.1.1.6. Pruebas de utilización de aminoácidos como única fuente de carbono y energía.....	153
IV.3.1.1.7. Pruebas de utilización de ácidos como única fuente de carbono y energía.....	155
IV.3.1.1.8. Pruebas de producción de ácidos a partir de alcoholes.....	158
IV.3.1.1.9. Pruebas de producción de ácidos a partir de carbohidratos.....	160
IV.3.1.1.10. Otras pruebas bioquímicas.....	162
IV.3.1.1.11. Pruebas de producción de hidrólisis.....	164
IV.3.1.1.12. Pruebas de susceptibilidad a antibióticos.....	166
IV.3.1.2. Análisis numérico.....	169
IV.3.2. Taxonomía molecular.....	178
IV.3.2.1. Extracción, cuantificación y purificación del DNA. Cálculo de la temperatura de fusión (T _m) y del contenido guanina-citosina (G+C).....	178
IV.3.2.2. Secuenciación parcial de las cepas seleccionadas.....	180

<i>IV.3.2.2.1. Secuenciación parcial.....</i>	<i>180</i>
<i>IV.3.2.2.2. Árbol filogenético basado en las secuencias parciales del gen del RNAr 16S.....</i>	<i>183</i>
IV.3.2.3. Hibridación DNA-DNA.....	185
IV.4. DESCRIPCIÓN POLIFÁSICA DE NUEVAS ESPECIES BACTERIANAS.....	212
IV.4.1. Secuenciación total del gen del RNAr 16S de las cepas que serán descritas como especies nuevas.....	212
IV.4.2. Análisis filogenético basado en las secuencias totales del gen del RNAr 16S.....	214
IV.4.3. Análisis de ácidos grasos de las nuevas especies.....	216
IV.4.4. Descripción fenotípica, morfológica y genotípica de las nuevas especies.....	219
V. CONCLUSIONES.....	229
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	231
VII. ANEXOS.....	266
VII.1. Matriz de semejanza generada con el programa de taxonomía numérica.....	267
VII.2. Secuencias parciales del gen del RNAr 16S de las cepas seleccionadas como representantes de los fenones.....	269
VII.3. Páginas webs consultadas en el trabajo.....	272
VII.4. Abreviaturas utilizadas.....	272

ÍNDICE DE TABLAS.

- Tabla 1. Superficie y producción mundial de aceitunas.....	7
- Tabla 2. Superficie y producción de olivos y aceitunas en España (según MAPA) Política Agraria Común. Junio 2002.....	8
- Tabla 3. Evolución de la aceituna en el mercado en los años 90/01 años.....	8
- Tabla 4. Sustancias aditivas permitidas para las aceitunas de mesa.....	23-24
- Tabla 5. Sustancias contaminantes.....	24
- Tabla 6. Volumen de litros de aguas residuales por Kg. de fruto.....	33
- Tabla 7. Características de los líquidos de desecho.....	34
- Tabla 8. Valores en mm de los diámetros de los antibióticos (CMI).....	108
- Tabla 9. Oligonucleótidos de amplificación y secuenciación del RNAr 16S de eubacterias...	118
- Tabla 10. N° de acceso a los RNAr 16S de las especies de colección comparadas.....	119
- Tabla 11. Recuento de microorganismos a las 48h. Expresado como ufc/ml.....	130
- Tabla 12. Recuento de microorganismos a los 7 días. Expresado como ufc/ml.....	130
- Tabla 13. Relación de las 172 cepas seleccionadas, procedencia y nombre asignado...	134/138
- Tabla 14. Morfología, movilidad, esporas, oxidasa, catalasa, gram y O/F.....	142/143
- Tabla 15. Crecimiento a diferentes temperaturas.....	144/145
- Tabla 16. Crecimiento a diferentes pH.....	146/147
- Tabla 17. Crecimiento a diferentes concentraciones de sal.....	148-149
- Tabla 18. Utilización de carbohidratos como única fuente de carbono y energía.....	150-152
- Tabla 19. Utilización de aminoácidos como única fuente de carbono y energía.....	153-154
- Tabla 20. Utilización de ácidos como única fuente de carbono y energía.....	155-157
- Tabla 21. Producción de ácidos a partir de alcoholes.....	158-159
- Tabla 22. Producción de ácidos a partir de carbohidratos.....	160-161
- Tabla 23. Otras pruebas bioquímicas.....	162-163
- Tabla 24. Pruebas de producción de hidrólisis.....	164-165
- Tabla 25. Pruebas de susceptibilidad a antibióticos.....	166-169
- Tabla 26. Concentración, pureza de las cepas seleccionadas, composición de bases, G+C (mol%) y Tm (°C).	179
- Tabla 27. Resultados de alineamiento global mediante BLAST de las secuencias parciales del gen del RNAr 16S las cepas seleccionadas.....	181-182
- Tabla 28. Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada E₃₀₈* , las cepas seleccionadas y la cepa de referencia.	187

-Tabla 29. Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada E ₃₀ 18*, la cepa de referencia.....	190
-Tabla 30. Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada E ₅₅ 36*, las cepas seleccionadas y la cepa de referencia.....	191
-Tabla 31. Valores de hibridación de DNA-DNA entre la cepa marcada, <i>B. licheniformis</i> PMC 1847* y las cepas de estudio.....	193
-Tabla 32. Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada I ₃₀ 67* las cepas seleccionadas y las cepas de referencia.....	195
-Tabla 33. Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada I ₃₀ 73, las cepas seleccionadas y la cepa de referencia.....	197
-Tabla 34. Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada N ₃₀ 138*, las cepas seleccionadas y la cepa de referencia.....	199
-Tabla 35. Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada I ₃₀ 74*, las cepas seleccionadas y las cepas de referencia.....	202
-Tabla 36. Características fenotípicas cepas integrantes grupo I ₃₀ 74.....	207
-Tabla 37. Valores de hibridación de DNA-DNA entre <i>V.marismortui</i> ATCC 700626 ^{T*} , cepa marcada, y las cepas N ₃₀ 120, V ₃₀ 166, N ₃₀ 135 y E ₅₅ 49.....	208
-Tabla 38. Resultados de alineamiento global mediante BLAST de las secuencias totales del gen del RNAr 16S de las cepas descritas como nuevas especies.....	208
-Tabla 39. Análisis del contenido de ácidos grasos de las posibles cepas nuevas.....	217
-Tabla 40. Tabla resumen de características fenotípicas de las posibles cepas nuevas.....	220

ÍNDICE DE FIGURAS.

-Figura 1. Hidrólisis enzimática de oleuropeína.....	29
-Figura 2. Curva de desnaturalización de DNA de <i>E. coli</i>	115
-Figura 3. Dendrograma de las cepas bacterianas aisladas de las aguas residuales de aceitunas de mesa.....	170
-Figura 4. Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen del RNAr 16S de las cepas bacterianas en estudio y las diferentes especies de colección validamente descritas..	184
-Figura 5. Resultados de la hibridación DNA-DNA E ₃₀ 8*	188
-Figura 6. Resultados de la hibridación DNA-DNA E ₃₀ 18*	190
-Figura 7. Resultados de la hibridación DNA-DNA E ₅₅ 36*	192
-Figura 8. Resultados de la hibridación DNA-DNA <i>B.licheniformis</i> PMC 1847*	194
-Figura 9. Resultados de la hibridación DNA-DNA I ₃₀ 67*	196
-Figura 10. Resultados de la hibridación DNA-DNA I ₃₀ 73*	198
-Figura 11. Resultados de la hibridación DNA-DNA N ₃₀ 138*	199
-Figura 12. Resultados de la hibridación DNA-DNA I ₃₀ 74*	203
-Figura 13. Gel de electroforesis al 1% p/v de agarosa de las cepas I ₃₀ 74, E ₅₅ 38, V ₃₀ 166 y V ₃₀ 172 M: Marcador 2000-50 pb) y dendrograma RAPD (Coeficiente Pearson y agrupación UPGMA).....	206
-Figura 14. Resultados de la hibridación DNA-DNA <i>V.marismortui</i> ATCC 700626 ^T	209
-Figura 15. Árbol filogenético de las secuencias totales del gen RNAr 16S de las cepas bacterianas propuestas como nuevas especies y las especies de colección.....	215
Figura 16. Perfil de ácidos grasos cepa E ₃₀ 8.....	217
Figura 17. Perfil de ácidos grasos cepa I ₃₀ 74.....	218
Figura 18. Perfil de ácidos grasos cepa N ₃₀ 135.....	218
Figura 19. Perfil de ácidos grasos cepa N ₃₀ 138.....	218

-Figura 20. Tinción negativa cepa E ₃₀ 8-TEM.....	226
-Figura 21. Corte fino cepa E ₃₀ 8-TEM.....	226
-Figura 22. Tinción negativa cepa I ₃₀ 74-TEM.....	226
-Figura 23. Corte fino cepa I ₃₀ 74-TEM.....	226
-Figura 24. Tinción negativa N ₃₀ 135-TEM.	227
-Figura 25. Corte fino cepa N ₃₀ 135-TEM.....	227
-Figura 26. Tinción negativa N ₃₀ 138-TEM.....	227
-Figura 27. Corte fino cepa N ₃₀ 138-TEM.....	227
-Figura 28. Corte fino espora cepa N ₃₀ 138-TEM.....	228
-Figura 29. Cuerpo piramidal I ₃₀ 74-TEM.....	228

ÍNDICE DE ESQUEMAS.

-Esquema 1. hibridación cepa E ₃₀ 8*	187
-Esquema 2. hibridación cepa E ₃₀ 18*	190
-Esquema 3. hibridación cepa E ₅₅ 36*	191
-Esquema 4. Hibridación cepa <i>B. licheniformis</i> PMC 1847*	193
-Esquema 5. Hibridación cepa I ₃₀ 67*	195
-Esquema 6. Hibridación cepa I ₃₀ 73*	197
-Esquema 7. Hibridación cepa N ₃₀ 138*	198
-Esquema 8. Hibridación cepa I ₃₀ 74*	202
-Esquema 9. Hibridación cepa <i>V.marismortui</i> ATCC 700626 ^T	208
-Esquema 10. Resumen de las hibridaciones realizadas.....	211

I. INTRODUCCIÓN.

I.1. ACEITUNAS DE MESA.

Las aplicaciones de los microorganismos datan de tiempo inmemorial. El hombre hizo uso de ellos sin saber que éstos existían desde que descubrió, al azar, la manera de hacer cerveza, vinagre, vino o pan. Antes del año 6000 a.C. ya era conocida la cerveza por sumerios y babilonios y en el antiguo Egipto ya existía una verdadera producción en año 1.700 a.C., el vinagre se producía desde antes de esa fecha y existe evidencia de la producción del vino desde el año 2.000 a.C. en Egipto y China. El pan se conoce desde el año 4000 a.C. aproximadamente.

En microbiología industrial se utilizan los términos fermentación y fermentaciones industriales para caracterizar a los procesos o tecnologías basados en el uso de microorganismos. El término "fermentación", que deriva del latín fermentar (hervir), inicialmente se reservó a la actividad microbiana anaerobia. En tiempos pasados ha tenido diferentes matices de significado. Según la definición del diccionario es *"un proceso de cambio químico con efervescencia ...un estado de agitación o de inquietud...cualquiera de las diversas transformaciones de sustancias orgánicas"*. El término se empezó a utilizar antes de los estudios de Pasteur en los vinos. Prescott y Dunn (1957) indicaron que en sentido amplio *"la fermentación es un proceso en el que se producen cambios químicos en un sustrato orgánico por medio de la actividad de enzimas producidas por microorganismos"*.

Muchos productos alimenticios deben su producción y características a la actividad de los microorganismos. Las fermentaciones de forma natural se han aprovechado por el hombre para su benéfico y para el consumo de alimentos.

Ejemplos de procesos industriales en los que el hombre, utiliza a los microorganismos para realizar transformaciones en materias primas vegetales y obtener productos elaborados para su consumo son:

La **chucruta** es un alimento que se obtiene por fermentación de la col fresca, los microorganismos que forman parte de la col de manera natural, son los responsables de esta fermentación. La adición de sal en porcentajes de 2-2,5% restringe la actividad de las bacterias Gram-negativas, mientras que resultan favorecidos tanto los cocos como los bacilos que producen ácido láctico. En la producción de chucruta, *Leuconostor mesenteroides* y *Lactobacillus plantarum* son las dos bacterias más deseables. Las fases finales de la fermentación de la col son llevadas a cabo por *L. plantarum* y *L. brevis*, también pueden cooperar *Pedicoccus cerevisiae* y *Enterococcus faecalis*.

Las **aceitunas** se fermentan mediante los microorganismos presentes en la pulpa de las aceitunas verdes (bacterias acidolácticas, *L. plantarum*, *L. brevis*, levaduras y mohos). La fermentación es similar a la de la chucruta, pero más lenta, además, las aceitunas son sometidas a un tratamiento previo con lejía cuya concentración depende del tipo de aceituna, con el fin de eliminar algo de su constituyente amargo. A continuación se lavan y se introducen en barriles de roble donde son puestas en salmuera durante 6 ó 10 meses. El producto final tiene un pH de 3,8 a 4 unidades debido a la producción de ácido.

Los **encurtidos** son alimentos que se obtienen por fermentación de pepinos frescos u otros productos con los microorganismos naturales de su piel, entre los que encontramos *L. mesenteroides*, *L. faecalis*, *P. cerevisiae*, *L. brevis* y *L. plantarum* (Etchells y col., 1975). Los productos se colocan en tinas con salmueras al 5% p/v de sal. Esta concentración aumenta poco a poco durante la fermentación hasta alcanzar porcentajes del 16% p/v de sal. La concentración de sal tiene efecto inhibitor de los microorganismos Gram-negativos y permite

Introducción

que el agua salga de los productos junto con azúcares, que son utilizados por las bacterias acidolácticas para formar ácido láctico. El producto resultante tiene carácter ácido. La conservación controlada de encurtidos a granel en salmueras reduce las pérdidas económicas y se obtiene un producto más uniforme (Etchells y col., 1975).

La **salsa de soja** se prepara en dos fases. En la primera, el **koji**, las semillas de soja o una mezcla de ellas y harina de trigo son inoculadas con *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus soyae*, estos microorganismos actúan durante tres meses durante los que se producen grandes cantidades de azúcares fermentiscibles, péptidos y aminoácidos. La segunda fase, **moromi**, consiste en incorporar el producto cubierto de hongos a una solución de NaCl del 18% p/v e incubarlo durante un año, como mínimo, a temperatura ambiente. En el periodo de incubación del moromi, las bacterias acidolácticas, en particular *L. delbrueckii* y la levadura, *Zygosaccharomyces rouxii*, realizan la fermentación anaerobia del hidrolizado de koji (Yoon y Wood, 1974).

El **miso** es un alimento fermentado derivado de la soja habitual en Japón. Se prepara mezclando o moliendo semillas de soja, tratadas con vapor o cocidas, con koji y con sal y dejando que fermenten durante un tiempo de 4 a 12 meses. El miso blanco o dulce puede ser fermentado durante sólo una semana, mientras que el miso de color pardo (*mame*), que es de mayor calidad, puede fermentar durante dos años.

El **ogi** es un cereal de consumo habitual en la región de Yorubas en Nigeria. Es el primer alimento que se da a los niños tras el destete, se elabora poniendo en remojo granos de maíz en agua caliente durante 2-3 días, a continuación se muelen húmedos y se criban a través de una malla separadora. El material cribado se deja que sedimente y fermente y se vende como tortas húmedas envueltas en hojas. Durante la maceración del maíz, predominan especies de *Corynebacterium* y parece que son necesarias para la actividad diastásica,

fundamental para que crezca la levadura, *Saccharomyces cerevisiae* y la bacteria acidoláctica, *Lactobacillus plantarum*. Además se encuentran especies de los géneros *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* (Akinrele, 1970).

El **gari** es un alimento de África Occidental que se prepara con la raíz de la planta de mandioca. Las raíces de mandioca contienen glucósido cianogénico que las hace venenosas si se comen frescas. Las raíces se convierten en inocuas mediante una fermentación durante la que el glucósido tóxico se descompone liberando ácido cianhídrico gaseoso. En la elaboración se separa de la corteza de la raíz la capa externa y la parte gruesa se tritura, se prensa, para eliminar el jugo que queda y fermente. El producto de la fermentación se cuece friéndolo. La fermentación ocurre en dos etapas, en la primera, *Corynebacterium manihot* fermenta el almidón con la producción de ácidos y la consiguiente disminución del pH. En la segunda etapa, en medio ácido, el glucósido cianogénico se hidroliza espontáneamente y libera ácido cianhídrico gaseoso (Collaard y Levi, 1959). La acidez favorece el crecimiento de especies de *Geotrichum*, siendo estos microorganismos responsables del sabor y el aroma del gari.

El **bongkrek** es un ejemplo de producto alimenticio fermentado, que en tiempos pasados ocasionó un gran número de muertes. El bongkrek es una torta de coco prensado de la zona central de Indonesia. Este tipo de alimento elaborado en casa puede llegar a ser tóxico. Los bongkreks inócuos están fermentados por *Rhizopus oligosporus*. Son tortas perfectamente revestidas con el hongo blanco y penetradas por este hongo. Para obtener el crecimiento óptimo del hongo es necesario que se den unas condiciones determinadas favorables durante los primeros días de incubación. Durante este periodo se produce crecimiento bacteriano y si se encuentra *Pseudomonas cocovenenasn*, crece produciendo dos sustancias tóxicas, toxoflavina y ácido bongkrékico (van Veen y Merten, 1934). Ambos compuestos muestran actividad antifúngica y antibacteriana, son tóxicos tanto para los humanos como para los animales y ambas son termoestables. El crecimiento de *Pseudomonas cocovenenasn*, no

resulta favorecido si la acidez de los ingredientes iniciales se mantiene en un pH de 5,5 unidades o valores inferiores (van Veen, 1967).

I.1.1. Generalidades de las aceitunas de mesa.

Los orígenes históricos se remontan muy atrás en la historia, los estudiosos, sitúan el origen de este cultivo al borde del mediterráneo, en las costas del Líbano y Palestina dominadas por los fenicios, hacia el año 6.000-5.000 a.C. Desde aquí se extendió hacia Egipto, Creta, Sicilia, península Itálica, Túnez, península Ibérica etc. Los documentos más antiguos, que han llegado hasta la actualidad, en los que se habla de éste cultivo son las *Tablillas Minoicas*, de la corte del rey Minos, datadas 2.500 años a.C. La primera referencia escrita sobre esta planta se encuentra recogida en el libro del Génesis. Los egipcios hace más de 5.000 años utilizaron el aceite de oliva para iluminar templos, además de utilizarlo como grasa para cosméticos y para el mantenimiento de momias, mientras que las hojas servían de adorno para los faraones. Los romanos lo utilizaron como tributo y establecieron una clasificación de las aceitunas en función de su grado de maduración. En la mitología griega, además de consumir el fruto para comer, se utilizó para aliviar las heridas, dar fuerza al organismo y su líquido podría “*dar llama para iluminar las noches*”. Los españoles llevaron el olivo a América en los siglos XVI y XVII, expandiendo su cultivo por el nuevo continente. (Congreso Internacional sobre aceite de oliva y Salud, 2004).

I.1.1.1. Comercialización.

La superficie mundial ocupada con olivos es alrededor de 10 millones de hectáreas, con un rendimiento promedio de 1,2T/Ha anuales, es decir, que la producción mundial de aceitunas está en algo más de 10 millones de toneladas. Alrededor del 10% se destina al

consumo en fresco y el resto a la producción de aceite de oliva (información general del sector a nivel mundial). Los datos se pueden observar en la tabla 1.

Tabla 1. Superficie y producción mundial de aceitunas.

Superficie total	10 Millones de Ha.
Número de árboles	800 Millones.
Área Mediterránea	99% Producción mundial. 98% Superficie mundial.
Producción de UE	80% Producción Mundial.
Consumo mundial	1.7-1.8 Millones de toneladas.
Distribución del consumo	78% En la UE. 17% Mediterráneo no europeo. 5% Resto del mundo.

La Unión Europea es el mayor productor mundial de aceite de oliva y de aceitunas de mesa y produce cada año, en superficie aproximadamente 500.000 Hectáreas, 1.450.000 de aceite de oliva anualmente, lo que constituye el 80% de la producción mundial. Lo mismo ocurre con la producción de aceitunas de mesa aunque en comparación con el aceite de oliva el mercado en este caso es relativamente pequeño.

Hoy en día, España es el principal país productor y exportador de aceitunas de mesa, con un 25% y un 50% respectivamente del total mundial. En España hay un total de 2.278.018 Has., con densidad de 95 árboles por Ha., lo que hace un total de 216,4 millón/árbol, un 21% del total mundial. El 52,6% del olivar español tiene una producción media de aceituna de 1.227 kg/Ha, estos datos se observan en la tabla 2. Actualmente la producción de aceituna para la extracción de aceite y como aceituna de mesa tiene una distribución desigual, siendo muy superior la cantidad destinada a la obtención de aceite de oliva y otros, que la usada para el aderezo. La evolución en el mercado en los años 90/01 la podemos ver en la tabla 3.

Tabla 2. Superficie y producción de olivos y aceitunas en España (según MAPA) Política Agraria Común. Junio 2002.

C.C.A.A	SUPERFICIE	PRODUC.TOTAL(Tm)	PRODUC.MEDIA(Kg/Ha)
ANDALUCIA	1.335.525	2.063.200	1.557
ARAGÓN	57.908	50.951	880
BALEARES	14.205	912	64
CASTILLA-LA MAANCHA	314.000	223.881	703
CASTILLA-LEÓN	5.017	6.198	1.235
CATALUÑA	141.617	112.394	797
EXTREMADURA	272.323	222.670	821
LA RIOJA	3.766	1.363	362
MADRID	22.604	24.364	1.078
MURCIA	15.664	14.615	933
NAVARRA	4.601	3.931	854
PAÍS VASCO	82	111	1.354
COMUNIDAD VALENCIANA	97.393	69.147	710
TOTAL	2.278.018	2.794.277	1.227

Tabla 3. Evolución de la aceituna en el mercado en los años 90/01 años.

Años	Producción total de aceituna (miles de Tm)	Aceituna para aderezo (miles de Tm)	Aceitunas para almazara (miles de Tm)
1990	3.369,3	216,7	3.152,6
1991	2.983,0	242,2	2740,8
1992	3.177,8	223,7	2.954,1
1993	2.809,9	207,9	2.602,0
1994	2.798,7	192,2	2.606,5
1995	1.694,2	189,9	1.504,3
1996	4.517,2	201,1	4.316,1
1997	5.879,6	308,4	5.571,2
1998	3.831,7	278,3	3.553,4
1999	3.394,7	298,9	3.095,8
2000	3.700,0	300,2	3.399,8
2001	3.500,7	333,5	3.167,2

Estados Unidos sigue siendo el principal mercado para la aceituna de mesa española, seguido de Arabia Saudita, Canadá, y Rusia. Nuestras exportaciones de aceituna de mesa han experimentado en los últimos años importantes transformaciones. Junto a las tradicionales

aceitunas aliñadas estilo sevillano, han surgido, por exigencia del mercado, nuevas variantes que amplían considerablemente la diversidad de la oferta, además, se han producido una serie de avances tecnológicos que obligatoriamente han de ser tenidos en cuenta.

El proceso de elaboración de la aceituna de mesa en España es el resultado de la combinación de tradición y de la moderna tecnología. La calidad, selección y elaboración esmerada, está perfectamente controlada durante todo este proceso. Sólo las elaboraciones impecables saldrán al mercado.

I.1.1.2. Clasificación de las aceitunas de mesa.

Según la Norma de Calidad emitida por el Consejo Oleícola Internacional (1981), se denomina **aceituna de mesa** al fruto de variedades adecuadas de olivo cultivado (*Olea europea sativa*) sano, cogido en un estado de madurez adecuado y de calidad tal que, sometido a las preparaciones adecuadas, de como resultado un producto de consumo y de buena conservación, que eventualmente puede incluir la adición de ingredientes facultativos.

La aceituna de mesa, constituye un alimento de alto valor nutritivo y muy equilibrado, posee todos los aminoácidos esenciales en una proporción ideal, aunque su contenido en proteína es bajo, su nivel de fibra hace que sea muy digestiva. Destaca su contenido en minerales, especialmente calcio e hierro, también está presente la provitamina A, vitamina C y tiamina.

1.1.1.2.1. Tipos de aceituna de mesa.

La Norma de Calidad emitida por el Consejo Oleícola Internacional, 1980, clasifica a las aceitunas de mesa en los siguientes tipos:

-Verdes: Cuando los frutos son recogidos durante el proceso de maduración, antes del envero y cuando han alcanzado el tamaño normal.

-De color cambiante: Obtenidas de frutos con color rosado, rosa vinoso o castaño, recogidos antes de su completa madurez, sometidos o no a tratamientos alcalinos y listas para su consumo.

-Negras: Cuando el fruto es recogido en plena madurez o poco antes de ella.

-Ennegrecidas por oxidación: Son las obtenidas de frutos que no estando totalmente maduros han sido oscurecidos mediante oxidación y han perdido el amargor mediante tratamiento con lejía alcalina, debiendo ser envasadas en salmuera y preservadas mediante esterilización con calor.

1.1.1.2.2. Variedades de aceitunas de mesa utilizadas.

El cultivo del olivo ha avanzado en los últimos siglos, consiguiendo mejorar el fruto y ofreciendo numerosas variedades. En España, se cultivan un gran número de variedades que son destinadas a la industria del aceite de oliva y la industria de las aceitunas de mesa. Ejemplos de estas variedades son: manzanilla de Sevilla, gordal sevillana, azofairón, morona, hojiblanca, cacereña, verdial, cañivara, picolimón, gordalilla, aloreña, rapazalla, picuda, cordobí y cuquillo.

Las variedades empleadas en la industria de las aceitunas de mesa son: **manzanilla de Sevilla, gordal sevillana, hojiblanca, cacereña y aloreña.**

Las variedades de aceituna de mesa se deben caracterizar por: ser de buen tamaño, tener excelente sabor, tener una buena relación pulpa/hueso y que su deshuesado sea fácil. Las preparaciones de las aceitunas de mesa son también variadas, podemos encontrar:

- Aceitunas verdes aderezadas en salmuera:** Son las que se han sometido a un tratamiento con lejía alcalina, acondicionándolas posteriormente en salmuera. Se conservan por fermentación láctica natural (estilo sevillano) o por otros procedimientos varios.
- Aceitunas verdes sin aderezar en salmuera:** Son las tratadas directamente con salmuera y conservadas por fermentación natural.
- Aceitunas de color cambiante aderezadas con salmuera:** Son las obtenidas tras un tratamiento alcalino y conservadas en salmuera.
- Aceitunas de color cambiante al natural en salmuera:** Conservadas en salmuera y listas para el consumo.
- Aceitunas negras en salmuera:** Estas aceitunas son firmes, lisas y de piel brillante, pudiendo presentar, debido a su preparación, ligeras concavidades en su superficie.
- Aceitunas partidas:** Obtenidas de frutos enteros, frescos o previamente tratados con salmuera, sometidos a un procesamiento destinado a abrir la pulpa sin fracturar el hueso, que permanece entero en el fruto. Pueden tratarse con una lejía ligera y se conservan en una salmuera eventualmente aromatizada, con o sin adición de vinagre.
- Aceitunas seccionadas:** Aceitunas verdes, de color cambiante o negras, seccionadas en sentido longitudinal mediante incisiones practicadas en la piel y parte de la pulpa y puestas en salmuera, con vinagre o sin él. Se les puede incorporar aceite de oliva y agentes aromatizantes.

Las categorías comerciales son:

-Extra- Calidad superior. Cumplen en grado máximo las características propias de su variedad. Se admite un 5% de frutos, que no correspondiendo a las características propias de esta categoría reúnan las de categoría primera.

-Primera- Incluyen aceitunas de buena calidad con un grado de madurez adecuado y que presentan las características propias de la variedad. Podrán presentar hasta un 10% de aceitunas que no correspondan a las características de esta categoría, pero que reúnan las de segunda.

-Segunda- Comprende las aceitunas que no se pueden clasificar en las dos categorías anteriores.

I.1.2. Procesado de las aceitunas de mesa.

I.1.2.1. Maduración de las aceitunas.

Durante los meses de mayo y junio aparecen en el olivo pequeñas flores blancas y verdes agrupadas en forma de racimo. En los meses de verano se forman los primeros frutos verdes, de final de septiembre en adelante, según la variedad, los frutos maduran y se transforman en las clásicas drupas de color negro-morado. Los frutos de la aceituna no pueden ser consumidos tal cuál aparecen en el árbol, las destinadas a la preparación como aceitunas de mesa son sometidas después de la recolección, a tratos particulares que les permitirá que sean convertidas en comestibles.

I.1.2.2. Aderezo de las aceitunas de mesa.

El conjunto de procesos que se inician en el momento en que el que el fruto del olivo adquiere un color que varía de verde a verde-amarillento, hasta que llega a la planta de aderezo, donde sufre las transformaciones entre las que se incluye una fermentación láctica y es preparada para llegar al consumidor, es lo que se conoce como **aderezo** de las aceitunas (Fernández Díez y col., 1985).

I.1.2.2.1. Recolección, transporte y valoración del fruto.

El momento óptimo de la recolección de las aceitunas verdes es cuando adquieren su mayor tamaño y antes del envero, es decir, cuando la coloración externa es verde amarillo-paja y aún no ha comenzado a tomar color rosado. Si se recolectan antes, la fermentación se desarrolla con dificultad, las aceitunas resultan duras y su sabor es poco agradable, pero si son tardías, el producto resulta blando y se conserva mal. Para evitar que los frutos resulten dañados, la recolección se realiza manualmente por el sistema denominado **ordeño**, depositándose sobre recipientes acolchados que llevan los operarios colgados al cuello. Una vez llenos los recipientes, las aceitunas son depositadas en cajas perforadas de aproximadamente 22 kg o en contenedores especiales para que permanezcan bien aireadas y no resulten dañadas. Teniendo en cuenta el elevado coste que representa la recolección manual, se han establecido unas condiciones de recolección mecánica y transporte que reduzcan, en lo posible, el elevado porcentaje de daños que experimentan los frutos recolectados de esta forma. El transporte en lejías diluidas (0,3% p/v de NaOH) evita el pardeamiento de las zonas golpeadas hasta el momento de su tratamiento con la lejía de cocido. Se observa también, como efecto favorable de este tratamiento, que la variedad manzanilla, no precisa los días de reposo, previos al cocido, para evitar el despellejado. No

obstante, este sistema tiene como limitaciones, que no se puede superar el tiempo en lejía diluida, que oscila entre 3 y 8 horas y que una vez separadas del líquido, tampoco se dispone de mucho tiempo para su manipulación en la planta de aderezo.

El transporte es mejor realizarlo en los contenedores específicos anteriormente citados, ya que a granel se pueden dañar los frutos. Normalmente se separan los pequeños tamaños, no comerciales, junto a las hojas y ramillas, en el propio campo, antes de ser enviadas a la planta de aderezo y antes del tratamiento alcalino.

Una vez que los frutos llegan a la planta de aderezo se toman todos los datos necesarios para identificar la partida durante todo el proceso de elaboración y se selecciona una muestra representativa de la que se realiza una valoración, para fijar la calidad de la misma, a esta identificación se le llama **calibrado**. Las aceitunas se calibran según el número de frutos que entran en un kilo. El calibrado es obligatorio para las aceitunas que se presentan enteras, deshuesadas, rellenas y en mitades. Dentro de cada calibre, la diferencia de diámetros no sobrepasa los 3 mm. Los datos que definen la partida son: el porcentaje de los tamaños que no se aprovechan, el calibre y el porcentaje de defectos, distinguiendo el tipo e intensidad de los mismos.

1.1.2.2. Cocido, lavado y colocación en salmuera.

El tratamiento con una solución diluida de hidróxido sódico, **cocido**, es fundamental en el proceso de aderezo, su principal objetivo es la hidrólisis del glucósido amargo, **oleuropeína**, que es responsable del característico amargor de este fruto. Además, ejerce una acción muy compleja cuya consecuencia más importante es que, al colocar las aceitunas enteras en salmuera, ésta se convierte en un adecuado medio de cultivo, donde se desarrolla la

fermentación láctica (Borbolla y Rejano, 1979). Algunas variedades necesitan de uno a dos días de reposo antes del cocido y así, se evita que el tratamiento con sosa provoque la ruptura y desprendimiento de la piel, aunque como ya se ha indicado anteriormente, el tratamiento con lejías diluidas para el transporte líquido, evita el despellejado de los frutos. Si el cocido no se aplica correctamente, pueden aparecer manchas pardas en la superficie de los frutos. Cada variedad necesita un tratamiento de cocido y un tiempo de duración en función de sus características, por lo que la concentración de lejía de cocido se ajusta considerando la temperatura ambiente. Cuando la concentración de lejía y temperatura son elevadas, la acción es más enérgica y provoca mayor permeabilidad de la piel, pero permanece más cantidad de sosa en el interior de la pulpa, lo que dificulta un buen valor de pH al final de la fermentación. La penetración de la lejía en la pulpa termina, cuando el frente ha alcanzado dos terceras o tres cuartas partes de la distancia de la piel al hueso. Si la penetración es insuficiente, las aceitunas resultan amargas y fermentan mal, quedando una zona próxima al hueso que con el tiempo vira a un color violeta y la piel adquiere un color pardo. Si es excesiva, resulta difícil obtener unas buenas características químicas para su conservación a largo plazo, la textura es deficiente y si van a ser deshuesadas dan un porcentaje elevado de unidades rotas durante dicha operación. Esta es la razón por lo que las partidas de aceitunas deben ser lo más homogéneas en tamaño medio y madurez, porque así, se facilita que todos los frutos alcancen una penetración adecuada en el mismo tiempo.

Al finalizar el cocido, se retira la lejía y las aceitunas se cubren con agua, a esta operación se la llama **lavado** y su objetivo es la eliminación de la mayor cantidad posible de sosa que cubre las aceitunas y de la que penetró en la pulpa. El lavado no debe ser excesivo, para evitar la pérdida de aquellos componentes hidrosolubles que son necesarios para la fermentación. Las soluciones que se generan en el lavado contienen azúcares y componentes fenólicos, particularmente hidroxitirosol (3-4 dihidroxifenil etanol), que son contaminantes

Introducción

cuando se vierten al medio (Sánchez y col., 1995; de Castro y col., 2001). El número y duración de lavados es variable, considerando la escasez de agua y la contaminación que producen estos vertidos, la tendencia actual es a dar un sólo lavado de unas 12 a 15 horas.

Terminado el lavado, las aceitunas se suelen pasar a unos recipientes, distintos a los de cocido y se colocan en salmuera. Las **salmueras** son disoluciones de sal comestibles en agua microbiológicamente potable, que pueden estar adicionadas o no, de aliños que son productos aromáticos vegetales y especias que no se consideran materia extraña. Eventualmente, se puede añadir vinagre, azúcar o ácido láctico, aceite y otros aditivos de conservación siempre que estén autorizados. Estas sustancias deben estar limpias de olores, sabores anormales o materias extrañas no autorizadas, la salmuera madre filtrada se puede utilizar en los envases a granel. La concentración salina de las salmueras oscila del 4% al 10% p/v dependiendo del tipo y de la preparación de la aceituna. El límite de pH es de 4 a 4,5 unidades. En las aceitunas pasteurizadas, sea cual sea su tipo y preparación, se puede reducir el contenido de cloruro sódico de la salmuera al 2% p/v, teniendo como límite máximo de pH 4,3 unidades. Las aceitunas esterilizadas no tienen límite de contenido en cloruro sódico de la salmuera ni un máximo de pH (Fernández-Díez y col., 1985). En esta disolución se mantienen durante toda la fase de fermentación.

A los pocos días del inicio de la fermentación la sal se equilibra en valores comprendidos entre 5% y 6% p/v. Si la concentración de sal inicial es más elevada, provoca una salida excesiva de jugo, debido a la mayor presión osmótica exterior, que tiene como consecuencia el arrugado permanente de los frutos y, además, la velocidad de fermentación se ve alterada. La concentración de las salmueras no puede ser inferior al 5% p/v de ClNa, ya que si disminuye, se favorece la aparición de alteraciones.

1.1.2.2.3. Fermentación. Alteraciones.

Durante los primeros días de colocación de las aceitunas en salmuera, el valor de pH resulta superior a 10 unidades, por la lejía residual que va saliendo de la pulpa. A lo largo de las diversas etapas de la fermentación, los distintos microorganismos hacen que el pH descienda a valores de 4 unidades o menos, facilitándose la conservación a largo plazo.

Hay estudios que describen los cambios en las características físico-químicas y microbiológicas a lo largo de todo el proceso fermentativo (de la Torre y *col.*, 1993). El uso de una mezcla de bacterias ácido lácticas y levaduras durante la fermentación, parece ser un método prometedor para la estandarización de la producción de aceitunas de mesa, a la vez que los riesgos de contaminaciones externas se minimizan (Deiana y *col.*, 1992). Se han llevado a cabo experimentos en los se modifican las técnicas utilizadas durante el proceso fermentativo. Los nuevos tratamientos alteran los parámetros físico-químicos y microbiológicos, pudiendo optimizar todo el proceso de fermentación y obtener un producto final más acorde con las necesidades buscadas (de la Torre y *col.*, 1993; Durán-Quintana y *col.*, 1999).

En la **primera fase** (Fernández-Díez y *col.*, 1985) las aceitunas están colocadas en salmuera. A los 5 ó 7 días, el valor de pH es próximo a 6 unidades. En esta fase se detectan bacilos Gram-negativos, esporulados Gram-positivos y bacterias cocáceas del ácido láctico de los géneros *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Enterococcus*. Los bacilos Gram-negativos son los responsables del descenso del pH, no obstante, se debe evitar un desarrollo abundante de estas bacterias porque pueden provocar alteraciones. Para ello, se recomienda el descenso de pH pasando una corriente de CO₂ a las 24 horas o añadiendo ácido acético o láctico. Una vez que comienza el desarrollo de los lactobacilos, se inicia la **segunda fase**, que dura hasta que el valor de pH es de 4,5 unidades. Desciende la población de cocos lácticos y desaparecen los bacilos Gram-negativos. Normalmente transcurren unos 15 ó 20 días. La **tercera fase** se

Introducción

caracteriza por el predominio de los lactobacilos, de los que se han aislado, además del típico *L. plantarum*, otras especies como *L. brevis* y *L. delbrueckii*. Esta fase dura hasta que cesa la producción de ácido por consumo de la materia fermentable. El valor de pH resulta igual o inferior a 4 unidades. Junto a los microorganismos citados anteriormente en las tres fases de la fermentación, se encuentran, habitualmente, un desarrollo variable de levaduras (Fernández-Díez y col., 1985). Cuando termina la fermentación láctica se inicia la conservación de las aceitunas. Se debe tener un cuidado especial en el control de la fermentación en esta fase ya que si no se cuida, puede darse una **cuarta fase** por el desarrollo de bacterias del género *Propionibacterium* (González-Cancho y Durán-Quintana, 1980). Las bacterias propiónicas consumen el ácido láctico formado, dando lugar a una mezcla de ácido acético y propiónico. Son ácidos más débiles que incrementarían el pH, para evitar esto, se debe aumentar la concentración de sal hasta niveles de 8,5% a 9,5% p/v al final de la fermentación láctica, evitando así, el desarrollo de bacterias propiónicas y se garantiza un valor de pH bajo, permitiendo una adecuada conservación. La adición de sal se debe realizar en dos etapas para evitar el arrugado de los frutos y otros problemas que influyan en una disminución de la calidad del producto final (El-Makhzangy y Abdel-Rhman, 1999).

-Control de la fermentación-

Para dirigir y controlar todo el proceso de fermentación, se recomienda el descenso inicial de pH, ya indicado, unido al mantenimiento de una temperatura adecuada, que debe estar entre 22 °C y 25 °C, durante al menos 30 días, utilizando, si fuera necesario, un intercambiador de calor. Así mismo, es conveniente, añadir un cultivo puro de bacterias lácticas (Roig y Hernández, 1991), o en todo caso, utilizar salmuera madre de otros fermentadores que se encuentren en fermentación láctica activa y cuyo valor de pH sea inferior a 4,5 unidades, esto implica la ausencia de los bacilos Gram-negativos (de la Borbolla-Alcalá y col., 1964; Pelagatti y Brighigna, 1981; Baltsouras y col., 1983; Sciancalepore, 1984, Montañó y col., 1993;

Sánchez y col., 1995), también se puede añadir materia fermentable para completar la fermentación y conseguir un buen pH final. Durante la fermentación, la sosa residual reacciona con los ácidos producidos durante el proceso y dan lugar a sales sódicas de ácidos orgánicos, cuyo contenido tiene que ser rebajado con los equivalentes necesarios de un ácido fuerte, normalmente se usa clorhídrico que está admitido por las Normas establecidas por el Consejo Oleícola Internacional (Rejano-Navarro y col., 1986).

-Alteraciones-

Cuando la secuencia de los microorganismos no es la adecuada y se desarrollan otros géneros ajenos a los del proceso normal, se producen distintos tipos de alteraciones (Fernández-Díez y col., 1985; Garrido-Fernández y col., 1997). Las alteraciones principales según el origen y fases de fermentación en que se suceden son:

a-Alambrado- Formación de hendiduras en el exterior de las aceitunas y huecos internos en la pulpa. La formación de gas produce vejigas o ampollas bajo la piel. Se evita ajustando el pH inicial.

b-Butírica- Debida al desarrollo de distintas especies de *Clostridium* en las primeras fases de la fermentación. El ácido butírico que se produce altera el sabor. Su formación se evita, manteniendo un nivel de sal (nunca menor del 5% p/v) y siguiendo buenas prácticas higiénicas de elaboración.

c-Zapatería- Producida por el desarrollo de bacterias propiónicas y clostridios. Ocurre durante la conservación, cuando el valor de pH no se mantiene por debajo de 4,2 unidades. Se identifican en la salmuera por una serie de compuestos volátiles diferentes a los de las aceitunas normales (Montaño y col., 1992). Se evita subiendo la sal para inhibir el desarrollo de los microorganismos responsables, y de esta forma, estabilizar el valor de pH durante la conservación.

d-Ablandamiento- El desarrollo excesivo de bacilos, levaduras y mohos da lugar a este problema especialmente durante fase de conservación. Su desarrollo se evita manteniendo un buen cierre anaeróbico.

e-Sedimento y gas- Se produce en el producto envasado, cuando bien por el desarrollo de diversos tipos de bacterias o levaduras si quedan restos de materia fermentable, o por el desarrollo de bacterias propiónicas que consumen el ácido láctico y el producto final no se mantiene estable. Esta alteración se evita, asegurando un producto bien fermentado, es decir, sin que queden restos de materia fermentable y ajustando el valor de pH en el envasado, menor de 3,3 unidades o bien pasteurizando.

1.1.2.2.4. Proceso rápido de elaboración de aceitunas verdes.

Montaño y col. (1988) estudiaron y establecieron un sistema de elaboración rápido de aceitunas verdes de mesa, con el fin de disponer del producto en periodo de tiempo breve y que se parezca en lo posible al tradicional. El principal objetivo planteado fue la **eliminación de la fase de fermentación**. Se establece un proceso en el que el cocido es más enérgico, así se facilita la eliminación del amargor. El número de lavados aumenta, para eliminar la mayor parte de la lejía residual. La **salmuera** adicionada es de menor concentración, **7%-8%** p/v y está acidificada, entre 0,05-0,10 eq/L. Se mantienen durante una semana a una temperatura de 30 a 35 °C, de esta manera es más fácil alcanzar un color uniforme. Por último, el producto ha de ser pasteurizado para garantizar su conservación. El producto obtenido se parece bastante al tradicional en cuanto a color y textura, aunque sabor es algo diferente. Este tipo de elaboración se emplea para aquellas formas de presentación en las que se añaden otros sabores como pueden ser aceitunas con sabor a anchoa o aliñadas. En este caso, el producto resultante no se distingue, del tradicional.

1.1.2.2.5. Operaciones complementarias.

Terminada la fermentación, las aceitunas deben reunir las características adecuadas para ser destinadas a su envasado y consumo por lo que antes de su comercialización se han de realizar una serie de operaciones complementarias. En primer lugar se deben agrupar los diferentes tamaños dado que la Reglamentación Técnico Sanitaria (1983), que regula el comercio, exige envasar las aceitunas por **tamaños homogéneos**, separar todas aquellas unidades que presenten defectos pues, la Norma establecida por el Comité Oleícola Internacional en la Reglamentación Técnico Sanitaria (1983) limita el porcentaje de defectos en el producto final. Estas operaciones se realizan en la industria pasando las aceitunas por cintas donde se escogen las que presentan las características adecuadas y se separan las defectuosas. Hoy día existen máquinas electrónicas que realizan esta operación automáticamente. La agrupación de tamaños se realiza pasando por máquinas de cables divergentes con tolvas que separan los tamaños que se ajustan para cada variedad. Los grupos de igual calibre se conservan en recipientes donde se mantienen hasta el momento de ser destinados a su envasado. Durante estas operaciones, en las que se separan los frutos de su salmuera madre, se aprovecha para **reducir la variabilidad de las características químicas** que, normalmente, presentan los fermentadores, debida a las operaciones de cocido y lavado y a las diferencias que hay en la propia fermentación. Las salmueras, una vez mezcladas, se corrigen, si es necesario, antes de añadirse de nuevo a las aceitunas escogidas y clasificadas. El simple hecho de **ajustar las diferentes salmueras a los mismos valores de acidez y sal** reduce la variabilidad inicial a la mitad. El resultado de estas operaciones conduce a la obtención de recipientes con aceitunas del mismo tamaño, con calidad organoléptica uniforme y con niveles de acidez y sal homogéneos y suficientemente elevados para garantizar su conservación. Todo ello facilita, apreciablemente, su posterior envasado.

Hasta hace unos años los frutos que se comercializaban deshuesados o rellenos se preparaban una vez clasificados y así se conservaban hasta el momento del envasado. Actualmente, como las máquinas que realizan estas operaciones tienen una gran producción, se suelen elaborar en continuo, es decir, las aceitunas enteras se deshuesan o rellenan en máquinas apropiadas inmediatamente antes de su envasado en los pequeños recipientes destinados al consumidor.

1.1.2.2.6. Preparación del producto envasado. Condiciones de conservación. Valoración organoléptica.

Las aceitunas elaboradas por el sistema tradicional, una vez envasadas, hasta ahora se han conservado ajustando sus características químicas entre los niveles de acidez y sal. La **adición de los antifermentos** permitidos (tabla 4) ácidos sórbico y benzoico y sus sales de sodio y potasio pueden emplearse, también, para conseguir una buena conservación junto con esencias, que evitan la contaminación. La aplicación de **lavados** previos, que reducen la materia fermentable y la **acidificación** que baja el pH de equilibrio permiten una mayor estabilidad al producto. También se han ensayado antisépticos permitidos, sin embargo, aunque el efecto de estas aplicaciones es apreciable, en muchos casos no llega a ser suficiente para lograr la estabilización total del producto envasado. Se permite la presencia de plomo y estaño en concentraciones que no afectan a la calidad del producto final (tabla 5). En los últimos años se ha estudiado la aplicación de un **tratamiento térmico de pasteurización** para conseguir la estabilidad del producto final sin que su calidad organoléptica resulte afectada. En primer lugar, se ha estudiado que los microorganismos que pueden estar presentes en aceitunas envasadas son las bacterias propiónicas, responsables de la cuarta fase y al estar siempre presentes, se toman como microorganismos de referencia. Por todo ello, González-Pellissó (1984) estableció que se debía aplicar la correspondiente ecuación del Tiempo de Destrucción Térmica de las bacterias propiónicas basado en un modelo matemático

para reproducir teóricamente la penetración de calor, en la que influye el tamaño del fruto y del envase, el tipo de envase y la relación peso de fruto/volumen de salmuera (Sánchez y col., 1991). En la actualidad, la aplicación de la pasteurización en el envasado de las aceitunas verdes de mesa es una práctica común en todo el sector de la aceituna de mesa. La pasteurización se muestra como el sistema de conservación más seguro para las aceitunas aliñadas, se modifican muy ligeramente sus características organolépticas, pero ajustando adecuadamente los parámetros es el mejor método para tener un producto seguro y de mejor calidad (Sánchez y col., 1991).

Tabla 4. Sustancias aditivas permitidas para las aceitunas de mesa.

Sustancias de conservación.	Dosis máxima (peso m/m del total)
Acido benzoico y sus sales de sodio o potasio	1 g/Kg (expresado como ácido benzoico)
Ácido ascórbico y sus sales de sodio o potasio	0,5 g/Kg(expresado como ácido ascórbico)
Sustancias acidificantes	
Acido láctico	15g/Kg
Acido cítrico	15g/Kg
Acido L (+) tartárico	15g/Kg
Acido acético	5g/Kg
Dióxido de carbono	Limitada por las BPF
Sustancias antioxidantes	
Acido L-ascórbico	0.2g/Kg
Estabilizantes	
Gluconato ferroso (fijar el color de las aceitunas ennegrecidas por oxidación)	0,15g/Kg (calculado Fe total en el fruto)
Lactato ferroso	0,15g/Kg (calculado Fe total en el fruto)
Sustancias aromatizantes	
Aromas naturales definidos por el CODEX	Limitada por las BPF
Potenciador del sabor (aceitunas rellenas con anchoas)	
Glutamato monosódico	5g/Kg
Espesantes y aglutinantes (para las pastas destinadas a relleno)	
Alginato sódico	5g/Kg
Carragenina	Limitada por las BPF
Goma garrofín	Limitada por las BPF
Goma guar	Limitada por las BPF
Goma xantano	3g/Kg

Tabla 4. Sustancias aditivas permitidas para las aceitunas de mesa (continuación).

Endurecedores (para las aceitunas rellenas con pastas)	
Cloruro cálcico	En el producto final relleno 1.5g/Kg, expresado como ión calcio
Lactato cálcico	En el producto final relleno 1.5g/Kg, expresado como ión calcio
Citrato cálcico	En el producto final relleno 1.5g/Kg, expresado como ión calcio
Cloruro potásico	En el producto final relleno 1.5g/Kg, expresado como ión potasio
Otros aditivos	
Hidróxido sódico o potásico	Limitada por las BPF
Ácido clorhídrico	Limitada por las BPF
Auxiliares tecnológicos	
Cultivos de microorganismos lácticos	Limitada por las BPF
Nitrógeno	Limitada por las BPF
Dióxido de carbono	Limitada por las BPF

*BPF: Buenas Prácticas de Fermentación.

Tabla 5. Sustancias contaminantes.

Sustancia	Dosis máxima
Plomo(Pb)	1mg/Kg
Estaño(Sn)	250mg/Kg, calculado como Sn

Valoración de las características químicas y organolépticas - Según las Normas de Calidad establecidas por el Comité Oleícola Internacional se dispone de una serie de **análisis químicos que permiten el ajuste de los niveles de acidez y sal** dentro de los valores numéricos exigidos que deben cumplir las aceitunas de mesa. Estas Normas fijan también **valores para el tipo y cantidad de los defectos**, sin embargo, no contienen determinaciones objetivas para el color, textura y sabor, para los que, indican que deben ser adecuados.

-Color de los frutos. Para la obtención de un procedimiento objetivo que permita la medida del color de las aceitunas verdes de mesa estilo español o sevillano se parte de una serie de

muestras de aceitunas de la variedad “manzanilla”, suministradas por la industria. Se numeran del 1 al 5, que corresponden a cada uno de los criterios subjetivos fijados previamente, en los que se refleja la relación que existe entre la valoración subjetiva y un índice de color objetivo, basado en las medidas de reflectancia a las longitudes de onda de 560, 590 y 635 nm. Este método resulta rápido y sencillo para controlar el color de las aceitunas verdes aderezadas, ya fermentadas, de la variedad “manzanilla” (Sánchez y col., 1985).

-Color de las salmueras. El color de la salmuera puede representar una información de interés durante la fermentación y conservación, pues da idea de la rapidez con que se forma el equilibrio, de la evolución del pH, y de las condiciones anaeróbicas durante la conservación. El color de la salmuera es muy importante en el envasado, porque la mayoría de los envases utilizados son transparentes, y el producto puede ser rechazado por el consumidor si el líquido de gobierno, es decir, la salmuera, es muy oscuro. Para la reutilización de las salmueras es imprescindible disponer de una medida que indique el grado de decoloración obtenida. Montañó y col., (1988) establecieron una escala objetiva en la que a partir de una serie de muestras clasificadas con criterios subjetivos (como el color a simple vista: amarillo muy claro, amarillo claro, amarillo oscuro, etc), se determinaba la curva de absorbancia. La mejor correlación con la diferencia de absorbancia $A_{440} - A_{700}$ del estudio, se deduce que el valor de 0,23 unidades de absorbancia es el límite superior del parámetro $A_{440} - A_{700}$, por encima del cual el color de una salmuera de envasado no se considera aceptable. No obstante los buenos resultados obtenidos en la medida objetiva del color de las aceitunas manzanillas y de las salmueras, hasta ahora no han sido implantados por la industria.

-La textura. Se dispone de un método objetivo, aunque aún no se ha estudiado la correlación con la valoración subjetiva. Sánchez y col., (1995) constituyeron un “*Panel Analítico de Catadores*”. Una vez seleccionados los jueces y superada la fase de entrenamiento, han elaborado una hoja de valoración que permite establecer, con carácter objetivo, la calidad global de las aceitunas verdes.

I.1.3. Las aguas residuales de las aceitunas de mesa.

Los vertidos del aderezo, son muy contaminantes debido a la elevada carga en **sólidos disueltos** (CE 8-22 dS/M) y en **materia orgánica** (entre el 4 y el 16%) que produce una disminución drástica del oxígeno disuelto (Castro y col., 2001). Estas soluciones de lavado tienen un alto contenido en **azúcares** y componentes fenólicos, concretamente **hidroxitirosol** (3,4-dihidroxifenil etanol). Estas soluciones no se pueden eliminar en los vertederos municipales por lo que se deben buscar soluciones que eviten la contaminación del lugar donde son eliminadas (Castro y col., 2001).

I.1.3.1. Características físico-químicas y biológicas de las aguas residuales de las aceitunas de mesa.

Existen antecedentes procedentes del Instituto de la grasa, relacionados con los coeficientes de evacuación para cada una de las operaciones. Así, el tratamiento del proceso de elaboración de las aceitunas de mesa con **lejía**, evacua aproximadamente 0,5 litros de agua por kilogramos de aceituna. Las **aguas de lavado** duplican el tratamiento anterior, siendo el coeficiente de evacuación de 1 litro por kilo de aceituna. Los vertidos de estos procesos son producidos durante el periodo de cosecha de las aceitunas que dura aproximadamente 60 días. Las lejías presentan pH y sólidos disueltos elevados y alta carga orgánica, DBO-DQO, con una buena biodegradabilidad (DBO/DQO= 0,65). A diferencia de lo que podía estimarse en un primer análisis, las aguas de lavado contienen una importante carga contaminante ocasionada por su alcalinidad y materia orgánica presentes, que se incrementan entre el primero y el segundo lavado. El aumento en carga contaminante reduce la biodegradabilidad a 0,52 con relación a las lejías. Por otro lado, se encuentran los efluentes ácidos producidos por la

fermentación con alto contenido en sales disueltas y carga orgánica. Los sólidos disueltos producidos por el CINA son muy elevados, mientras que los sólidos sedimentables tienen un reducido aporte en las aguas.

La fermentación se realiza después de las operaciones de lejía y lavado y se conservan en la **salmuera madre**, que evacua aproximadamente 0,5 litros de agua por kilogramo de aceituna, igual que el tratamiento con lejía, pero los efluentes producidos por esta salmuera se extienden durante todo el año. Los volúmenes de aguas de lavado constituyen una importante fuente de contaminación, ya que se trata de aguas con unas elevadas concentraciones de impurezas.

Las aguas residuales anuales provenientes del tratamiento con lejía tienen un menor aporte contaminante, en cuanto a la carga orgánica (DBO-DQO) y sólidos disueltos, en relación con las de otras operaciones, lavados y fermentación con salmuera. Considerando los tiempos de duración de cada una de las operaciones, la carga orgánica y sólidos, aportados por los lavados, pasa a tener la mayor importancia.

Desde el punto de vista del tratamiento de aguas residuales, los aportes producidos por los lavados y por el tratamiento con lejía, prevalecen sobre los de la salmuera. El tipo y cantidad de contaminación producida por este sector industrial tiene gran importancia porque que son aguas difíciles de tratar, por lo que se buscan soluciones alternativas previas al tratamiento final con el objetivo de reducir la magnitud del problema (Fernández-Llano y *col.*, 2001).

I.1.3.2. Contenido en polifenoles de las aguas residuales de las aceitunas de mesa.

Los polifenoles son los metabolitos secundarios mayoritarios en las aceitunas y se encuentran aproximadamente en una proporción del 1-2% del fruto fresco (Pazzini y *col.*, 1960; Shasha y Leibowitz, 1961; Limiroli y *col.*, 1995). El polifenol mayoritario es la **oleuropeína**, es un éster glucósido de 3,4-hidroxifenil etanol (**hidroxitirosol**) y **ácido oleanólico** (Amiot y *col.*, 1986). El hidroxitirosol es el componente responsable del sabor amargo de las aceitunas no procesadas, cuando la oleuropeína aún no se ha roto. Una vez que se inicia el tratamiento de las aceitunas de mesa ocurre la ruptura de la oleuropeína. Se establecen dos hipótesis para este proceso:

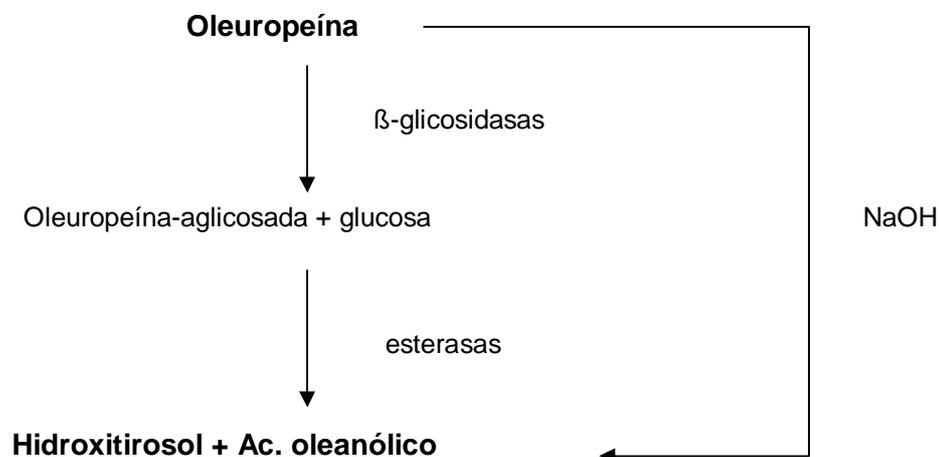
a) Condiciones alcalinas. En el tratamiento de las aceitunas de mesa antes de la salmuera, cuando se producen los lavados con lejía, la alcalinidad del medio en el que se encuentran las aceitunas da lugar a la división de la oleuropeína.

b) Hidrólisis enzimática. La actuación de enzimas capaces de hidrolizar este compuesto, ha sido estudiada por Marsilio y *col.*, (1996) proponiendo para la degradación la siguiente secuencia enzimática. Se observa en la figura 1:

*hidrólisis por enzimas **β -glicosidasas**, con la formación de oleuropeína aglicosada y glucosa.

*Oleuropeína aglicosada se hidroliza mediante enzimas **esterasas** obteniendo ácido oleanólico e hidroxitirosol.

Figura 1. Hidrólisis enzimática de oleuropeína.



La concentración de oleuropeína disminuye con la maduración de los frutos (Amiot y *col.*, 1986) y el regadío de los olivos (Patumi y *col.*, 1999). Paralelamente a la disminución de la oleuropeína aumenta el hidroxitirosil glucosado, que se hace mayoritario en las aceitunas negras maduras (Romero y *col.*, 2002a; 2002b).

En la pulpa se han identificado otros polifenoles como **verbascósido**, **lignustrósido**, **rutina**, **luteolina**, **7-glucósido** (Ryan y *col.*, 2002; Bastón y *col.*, 2001) y **antocianinas** (cianidín 3-glucosido y cianidín 3-rutosido) (Romero y *col.*, 2002a). Los ácidos que se encuentran a niveles considerables, son **ácido cafeíco** y **ácido p-cumárico** (Blekas y *col.*, 2002). A pesar de la presencia de estos componentes en muchos de los cultivos de aceitunas, cada uno de los cultivos tiene su propio perfil polifenólico (Esti y *col.*, 1998). Durante el procesado de las aceitunas de mesa, los polifenoles sufren transformaciones químicas y en general, disminuye su concentración en la pulpa de las aceitunas, transfiriendo la concentración de polifenoles al líquido donde se encuentran las aceitunas. Los mayores cambios en la composición fenólica se

producen con las hidrólisis ácidas y las polimerizaciones de las antocianinas que contribuyen a la estabilización del color (Vlahov y Solinas, 1993; Romero y *col.*, 2004).

Uno de los pasos más importantes en las aceitunas procesadas según el estilo español, es la eliminación del amargor de los frutos bajo condiciones alcalinas. En tales condiciones la oleuropeína es hidrolizada en hidroxitirosol (Amiot y *col.*, 1990) y ácido oleanólico (Brenes y Castro, 1998). La fermentación láctica que se produce a continuación no modifica la composición fenólica (Brenes y *col.*, 1995), pero sí se producen transformaciones en los polifenoles durante el procesado que afectan a las propiedades químicas y organolépticas de los productos (Romero y *col.*, 2004).

La oleuropeína y el hidroxitirosol son conocidos por poseer propiedades biológicas importantes, muchas de las cuales son atribuidas a sus capacidades antioxidantes y radicales libres. Esta capacidad antioxidante incrementa la resistencia de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) a la oxidación (Auroma y *col.*, 1998). El hidroxitirosol inhibe la perodoxinitrita dependiente del DNA para proteger a los eritrocitos humanos y reduce la excrección urinaria de F₂-isoprostano 8-isoPGF_{2a}, un biomarcador del estrés oxidativo. La oleuropeína también posee propiedades funcionales, usándose en la medicina popular las hojas de las aceitunas para la cura de enfermedades (Blekas y *col.*, 2002). Una de las posibles de las aplicaciones de este residuo que se encuentra actualmente en estudio, es la obtención de antioxidantes, a partir de estas aguas, donde son abundantes.

I.1.3.3. Sistemas de tratamiento del líquido residual de las aceitunas de mesa.

Dada la complejidad que presentan estos efluentes industriales para su tratamiento final, por la elevada carga orgánica y salina, se trata de encontrar soluciones alternativas que minimicen esta problemática. Las salmueras almacenadas, el tratamiento con lejía y los

lavados generan un gran volumen de aguas residuales con una considerable carga contaminante. Los componentes mayoritarios, como se ha visto en el apartado anterior, son componentes fenólicos y aromáticos que ejercen un efecto contaminante cuando son vertidos al medio (Brenes, y col, 1999). Tradicionalmente estas aguas residuales eran descargadas en el alcantarillado de las ciudades o eliminadas a través del curso público del agua. Actualmente, el depósito en balsas de evaporación provoca problemas de filtración y, por tanto, de contaminación de aguas subterráneas. Estas balsas contienen componentes inorgánicos procedentes de las salmueras cuya evaporación no es posible (Brenes y col., 2004). Se requieren otros tratamientos de purificación entre los que se encuentran los tratamientos biológicos (Brenes, y col., 1993). En muchos casos estas aguas son vertidas al medio directamente sin tratar, causando malos olores, contaminación de superficies y aguas subterráneas, debido a las propiedades fitotóxicas y antimicrobianas de los compuestos fenólicos (González y col., 1990).

Entre las medidas planteadas se encuentran la **dilución y posterior tratamiento en las plantas de aguas cloacales urbanas**. Los líquidos se vierten a la red cloacal para ser tratadas en las plantas de tratamiento. El inconveniente de éste método es que requiere el cumplimiento de las normas establecidas por el Ministerio de Medio Ambiente, representado por la Confederación Hidrográfica que controle el área de la Comunidad Autónoma a la que pertenezca. La presencia de polifenoles con efecto inhibidor para los microorganismos, la alta concentración de sal y de hidróxido sódico perjudica el tratamiento de la planta municipal. La ventaja del método es que se trata de una forma simple de evacuación y de mínima inversión inicial. Los valores de DQO y DBO de los residuos generados en las ciudades son comparables con las cargas orgánicas producidas por las aceitunas y las plantas depuradoras de aguas residuales domiciliarias tienen una capacidad significativamente mayor que los caudales generados por el procesamiento de las aceitunas verdes. Se ofrece una posibilidad de tratamiento integral, mezclando un 7% de las aguas residuales de la industria aceitunera con

respecto a las cloacales, esta proporción es adecuada ya que reduce en un 90% la carga de DBO.

En general, se puede decir que la alta concentración de los efluentes, su elevado contenido en sales y el pH dificultan el empleo de métodos clásicos de tratamiento de aguas residuales como los biológicos y físico-químicos convencionales, exigiendo procesos delicados y costosos que parecen de difícil adopción por estas industrias semiartesanales.

Investigaciones realizadas por Masten, *y col.* (1994) para examinar las diferentes tecnologías y reducir su carácter contaminante por degradación de la materia orgánica tóxica, proponen los **procesos de oxidación química**, que han demostrado por sí mismos ser efectivos para la destrucción de la materia orgánica en general y la contaminación refractaria en particular. Propusieron oxidantes simples como el ozono, radiaciones ultravioleta y peróxido de hidrógeno. El ozono tiene propiedades antioxidantes adecuadas para el tratamiento de las aguas residuales (Rice, 1981). La aplicación de ozono para la purificación de las aguas residuales que son producidas en las diferentes fases del procesado de las aceitunas de mesa, elimina de forma moderada la DQO y de forma elevada los componentes aromáticos. La radiación UV, presenta bajo poder de degradación de la materia orgánica y se mejora débilmente con la presencia de peróxido de hidrógeno. El tratamiento más efectivo para la purificación fue la combinación de ozono, peróxido de hidrógeno y radiación ultravioleta, en algunos casos la degradación fotoquímica por radiación ultravioleta revela eficiencias significativas en los tratamientos de aguas residuales (Legrini, *y col.*, 1991). Los tratamientos químicos en general y el proceso de ozonización en particular proporcionan buenos resultados para la degradación de materia orgánica, especialmente componentes aromáticos. Estos procesos se pueden usar como pre-tratamiento para las siguientes degradaciones aeróbicas de acuerdo con las normas de descarga establecidas por el Ministerio de Medio ambiente, representado por las Confederaciones Hidrográficas de cada comunidad y la eficiencia de purificación requerida por la regulación nacional (Benítez, *y col.*, 2003).

Los **procesos de oxidación avanzada**, son sistemas basados en la generación de radicales libres muy radiactivos especialmente radicales hidroxil. Estos sistemas experimentaron un interés creciente debido a su alto poder destructivo (Glance y col., 1987; Hoigne, 1998). Están constituidos por combinación simultánea de peróxido de hidrógeno más iones ferrosos (Reactivo Fenton).

I.1.3.4. El problema de los vertidos de aguas residuales de las aceitunas de mesa.

I.1.3.4.1. Situación actual.

En la preparación comercial de aceitunas verdes aderezadas se produce un gran volumen de vertidos líquidos, reflejado en la tabla 6. El volumen de los mismos depende de la elaboración, pudiéndose hacer una estimación según el tipo de aceituna y procesado.

Tabla 6. Volumen de litros de aguas residuales por Kg de fruto.

	Lejías	Aguasdelavado	Salmueras	Total
Proceso tradicional de aceitunas verdes.	0.5	1.25	0.75	2.5
Proceso anterior con reuso de lejías ahorro.	0.1	0.9	0.75	1.75
Proceso de aceitunas negras por oxidación.	1.5	2.0	0.75	4.25

Por kilo de fruto se generan lejías de cocido, aguas de lavado, salmuera madre de fermentación, siendo los primeros producidos en los meses de campaña y la salmuera durante el resto del año (Instituto de Desarrollo rural, 1998).

Introducción

Para la producción actual de aceituna de mesa en nuestro país, que asciende a 333.500Tm. se podría estimar un vertido de más de 1.000.000 m³ anuales localizados en zonas muy concretas.

Las principales características de los líquidos de desecho de la elaboración de aceitunas verdes aderezadas en salmuera estilo español se resumen en la tabla 7.

Tabla 7. Características de los líquidos de desecho.

Características (g/l)	Lejía	Lavados	Salmuera
pH	12,2	10	4-3,9
NaOH libre	11,0	1,5	-
NaCl	-	-	78,8
Acidez libre	-	-	-
Polifenoles	4,1	4,0	6,3
DQO	23,0	24,6	10,7
DBO₅	15,0	12,3	9,5
Sólidos volátiles	30,2	35,1	17,8
Sólidos totales	48,2	46,5	118,5

La determinación de la carga contaminante de cada vertido varía, según la variedad de aceituna utilizada en el proceso productivo, la concentración de sal empleada, riqueza de las aceitunas etc., de manera que cada vertido puede ser distinto en la composición de sólidos disueltos, sólidos en suspensión y demás elementos contaminantes (Rauek, 1998).

1.1.3.4.2. Influencia de las técnicas de minimización y reutilización de las aguas residuales de las aceitunas de mesa.

Existen técnicas de **reutilización de lejías** y salmueras que tienen como objetivo disminuir el consumo de estas corrientes y por lo tanto, reducir la generación de aguas residuales. La lejía del tratamiento puede utilizarse varias veces y existen países en los que se utiliza hasta 14 veces. La solución de hidróxido sódico pierde su concentración inicial en cada lavado, por lo que necesita ser re-titulada. Estudios realizados por Instituto de la Grasa dan

como resultado un aumento de la DQO de la lejía en las primeras reutilizaciones y un moderado incremento, hasta alcanzar un valor casi constante, en el número 9 ó 10, lo que reduce la materia orgánica de las aguas residuales, al final de la temporada. Algunos productores sostienen que, más de cuatro veces no se puede realizar por problemas en el manejo de la lejía, ya que se enriquece en sedimentos difíciles de remover y se producen espumas que interfieren en el bombeo del fluido. Sin embargo, se puede emplear la decantación y el filtrado de sedimentos para obtener resultados satisfactorios. Por otro lado, se propone el uso de compuestos tensoactivos de tipo alimentario para evitar las espumas.

Una vez concluido el proceso fermentativo, en las piletas con la salmuera madre, la práctica común es separar las aceitunas, clasificarlas por tamaño y almacenarlas en envases con la misma salmuera madre de fermentación, que contiene sustancias solubilizadas por el contacto con el fruto, como por los procesos metabólicos durante la fase fermentativa. Su aspecto es un líquido coloreado en la gama del amarillo, pardo y rojo, de acuerdo con la edad de la salmuera. Contiene, además, sólidos en suspensión (principalmente bacterias lácticas) que le confieren turbidez. Para mejorar las características organolépticas del producto antes de su venta, la salmuera madre es reemplazada por fresca, con una concentración semejante o superior a la inicial. El consumo de salmuera se duplica y la cantidad de efluente a descargar o tratar se concentra en las fraccionadoras. La problemática de disponer o tratar este efluente de características tan complejas, ha llevado a la investigación de la **reutilización de la salmuera** en una nueva fermentación. Sin embargo, no se obtuvieron buenos resultados por su alta capacidad tamponadora y por su alto contenido en ácido láctico y polifenoles que interfieren seriamente en el desarrollo de bacterias lácticas (Ruíz-Barba y *col.*, 1991).

En lo que respecta a la reutilización como líquido final del envasado, es necesario realizar un tratamiento para decolorar y eliminar los sólidos en suspensión, mejorando de esta manera sus características organolépticas. Para ello, se han ensayado métodos como

adsorción en carbón activado, utilización de tierras decolorantes, ultrafiltración, intercambio iónico y coagulación-filtración. Las experiencias realizadas presentan los mejores resultados para el uso del carbón activado-filtración y ultrafiltración. Con respecto a la utilización del carbón activado, debido a que la efectividad varía notablemente con el tipo de carbón utilizado y los componentes de la salmuera, los cuales dependen a su vez de la variedad de aceitunas y el proceso fermentativo, se considera necesario realizar ensayos de tratamiento.

Los líquidos de lavado presentan un elevado pH y una gran cantidad de azúcares fermentables, pero baja proporción de NaOH por lo que su reutilización con el fin de recuperar la sosa no resulta atractivo. No obstante se puede utilizar para preparar nuevas lejías, con el fin de reducir los volúmenes de aguas residuales. Para ello, basta con agregar la cantidad de sosa necesaria para llegar a la concentración deseada.

De los diferentes estudios realizados los sistemas que han tenido mayor aplicación industrial en la reducción del volumen de vertidos son los siguientes:

Reutilización de lejías de cocido.

Como primera medida de control para reducir el volumen de vertidos se estudió la reutilización de las lejías de cocido (Garrido-Fernández y *col.*, 1977). Es una operación sencilla y requiere pocas instalaciones complementarias, pues basta una bomba y un depósito auxiliar. Es una modificación que resulta muy rentable pues se aprovecha gran parte del hidróxido sódico que se perdería. La concentración de compuestos contaminantes, después de diez o doce reutilizaciones, no llega a ser tres veces la carga de las de un sólo uso. Con ello, se reduce el volumen de los vertidos, se evita una gran cantidad de materia contaminante, y también se ahorra agua, lo que en algunas zonas tiene una gran importancia. Se ha comprobado, repetidamente que la fermentación y las características organolépticas de los

frutos elaborados con lejías reutilizadas son normales y no se diferencian de los obtenidos por el proceso tradicional.

Eliminación de lavados.

Las modificaciones ensayadas por Castro y *col.* en 1983 abarcaron la supresión de una o las dos aguas de lavado. En el primer caso, los resultados demuestran que se obtiene una fermentación y un producto final que no se diferencian de los obtenidos por el proceso tradicional. De hecho, hoy ya se considera normal la aplicación de un sólo lavado. En el caso de suprimir todo el lavado los frutos presentan un sabor más concentrado de lo normal que, en general, se considera excesivo. Por otro lado, aunque permanecen más azúcares y se puede desarrollar más acidez libre, el hecho de quedar mayor contenido de lejía residual hace que sea más difícil obtener bajos valores de pH. En este caso se debe corregir añadiendo ácido clorhídrico, que se recomienda aportar en dos fases, al principio y al final de la fermentación láctica, sin embargo, un exceso de este ácido puede afectar de forma desfavorable al sabor. Esto nos indica que es recomendable rebajar la acidez combinada sustituyendo parte de las salmuera madre por blanca, aunque esta operación implica un nuevo aporte de vertido. Se aconseja la eliminación del segundo lavado y alargar el primero a 12-15 horas, lo que no representa ningún inconveniente para las características químicas, microbiológicas y organolépticas.

Depuración y reutilización de salmueras.

Considerando, por un lado, el alto poder contaminante de las salmueras de fermentación y, por otro, la elevada cantidad de ácido láctico que contienen, se ha estudiado la regeneración de las mismas, para su posterior empleo como parte del líquido de gobierno utilizado en el envasado final. Se han desarrollado dos sistemas de purificación basados en:

-adsorción de carbón activo y filtración tangencial.

-ultrafiltración a través de una membrana de determinado tamaño de poro (Brenes y col., 1990).

A nivel industrial, el segundo sistema se ha mostrado más favorable y la salmuera regenerada obtenida se ha llegado a reutilizar en el envasado de latas de aceitunas verdes pasteurizadas, hasta una proporción del 70% respecto del volumen del líquido de gobierno total (salmuera), que representa, además de una reducción de la contaminación, un importante ahorro en la cantidad de ácido láctico y sal que se precisa para el envasado final, pero no se ha generalizado la práctica.

1.1.3.4.3. Valorización/Biorremediación microbiológica de las aguas residuales de las aceitunas de mesa.

En los últimos años y como consecuencia del desarrollo industrial, la amenaza que suponen los residuos de las industrias para el hombre y para el medio se ha hecho muy patente. Los vertidos del petróleo, los vertidos químicos, los residuos agroindustriales, los plaguicidas, herbicidas y metales pesados sólo son algunos de los peligros a los que nos enfrentamos.

La **biotecnología** constituye en la realidad una herramienta tecnológica de la que el hombre está haciendo uso como alternativa para la solución de los problemas ambientales.

En las aguas residuales generadas en el aderezo de aceitunas, particularmente en las aguas de lavado del proceso de elaboración de aceitunas, se encuentra una alta concentración de hidroxitirosol (4-6 g/L), que puede ser extraído para su utilización. Estos líquidos, como se ha mencionado anteriormente, se generan sólo durante 1-2 meses al año y por ello es necesaria una etapa previa de conservación antes del proceso de extracción. Además, estas

soluciones poseen una elevada concentración de ácido oleanólico que interfiere en el proceso de extracción del antioxidante.

La junta de Andalucía en colaboración con el CSIC y la empresa GENOSA I+D ha desarrollado un nuevo **método para obtener concentraciones altas del antioxidante fenólico hidroxitirosol** (Fernández-Bolaos y *col.*, 2004). Mediante una serie de etapas físicas, es posible conseguir un extracto fenólico rico en dicho antioxidante en una concentración superior al 60%-80%. El método permite la obtención en un sólo extracto de hidroxitirosol y el antimicrobiano glucósido de ácido oleanólico.

La primera etapa consiste en la conservación/fermentación de estas soluciones a lo largo de varios meses en un medio ácido con lo que se consigue mantener la concentración de hidroxitirosol y disminuye la del glucósido de ácido oleanólico. A continuación, se procede a la ultrafiltración de estas soluciones mediante equipos tubulares de ultrafiltración con membranas de corte molecular entre 1.000 y 10.000 daltons. El permeado de la ultrafiltración se hace pasar por columnas rellenas de resinas no-iónicas para la completa adsorción de los compuestos polifenólicos. Estos son recuperados de las resinas mediante el empleo de alcohol etílico. A continuación, se evapora el etanol y queda un residuo acuoso al que se le somete a un tratamiento con carbón activo. Se congela el líquido acuoso resultante y se liofiliza. El sólido pulvurulento obtenido contiene una concentración en hidroxitirosol superior al **60%-80%**. También, se puede partir de soluciones frescas, no conservadas, con lo cual el sólido obtenido contiene un alto contenido tanto en hidroxitirosol como en el glucósido del ácido oleanólico.

Destacamos como aspecto innovador que el procedimiento para la **obtención de antioxidantes y antimicrobianos**, a partir de las aguas residuales generadas en el aderezo de aceitunas es novedoso y no se conoce ningún otro anterior.

Existe un numeroso grupo de métodos patentados para el aprovechamiento de antioxidantes a partir de residuos sólidos y líquidos generados en el proceso de extracción del aceite de oliva y también de hojas de olivo. La ventaja de obtener antioxidantes (hidroxitirosol) a partir de las aguas residuales del proceso de elaboración de aceitunas de mesa reside, de un lado, en la alta proporción en que se encuentra dicho componente en estas soluciones y, por otra parte, en la simplicidad del método utilizado. Esta técnica aun no está en funcionamiento, pero promete ser una forma de beneficiar tanto a la comunidad como a los ecosistemas, evitando que estos residuos se depositen en suelo.

I.2. TAXONOMÍA MICROBIANA.

I.2.1. Generalidades.

La **taxonomía** es el estudio teórico de la clasificación de los organismos, incluyendo sus bases, principios, procedimientos y reglas. El sistema que se genera tras la aplicación de sus fundamentos teóricos es el esquema de clasificación o simplemente, 'la clasificación', que será artificial, a pesar de que existe la tendencia de reflejar de una manera lo más fiel posible las relaciones de parentesco entre organismos (Rosselló-Mora, 1999).

La taxonomía comprende la **clasificación**, **identificación** y **nomenclatura** de los organismos, incluyendo las actividades implicadas en la construcción de sistemas clasificatorios que agrupan a los seres vivos de acuerdo con los criterios preestablecidos (Ramos-Cormenzana, 1979).

Por **clasificación** entendemos la agrupación de los organismos de acuerdo con los caracteres y atributos que poseen. Las clasificaciones biológicas son de tipo jerárquico y se pueden representar en un árbol filogenético. La **identificación** es el proceso por el que los

organismos con determinadas y desconocidas afinidades taxonómicas se sitúan dentro de un grupo taxonómico preexistente. La **sistemática** es la agrupación de organismos vivos de los que se puede facilitar el conocimiento de los mismos y de sus relaciones.

La base de la taxonomía bacteriana es el “taxón” o taxa en el que debe contenerse la mayor información posible. El establecimiento de un taxón determinado, debe implicar la existencia de unos caracteres afines entre las especies que se agrupan en él, en el que puede existir un rasgo fundamental. Se deben establecer unas afinidades, porque de otro modo podría darse el caso de que una bacteria que careciera del rasgo fundamental quedara excluida, aunque todos los demás rasgos si fueran afines con el taxón.

Las clasificaciones bacterianas se basan en una serie de caracteres morfológicos, fisiológicos, antigénicos, ecológicos y genéticos. Deben basarse en caracteres no adaptacionales y a ser posible filogenéticos, es decir, los miembros deben estar relacionados de acuerdo con la procedencia de un ancestro común, pudiendo considerarse como mayor inconveniente, el que se desconozcan las vías de descendencia genética. Actualmente esta cuestión se resuelve con las relaciones filogenéticas establecidas por la secuenciación del RNA ribosómico 16S, introducida por Woese en 1970.

Frecuentemente se confunde clasificación con identificación, sin embargo, es necesario describir y caracterizar primero la unidad taxonómica básica (clasificación) antes de que un aislamiento pueda ser identificado como perteneciente a ese taxón. Un aislamiento que no pueda ser identificado como miembro de un taxón conocido, tiene que ser descrito y clasificado como una nueva especie o género (Staley y Krieg, 1989). No hay una clasificación oficial para procariotas, el sistema de clasificación representado en Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology está ampliamente aceptado por la comunidad de microbiología y actualmente se

considera la mejor aproximación para una clasificación oficial (Brenner y *col.*, 2000). Esta clasificación se basa en los análisis filogenéticos de los genes de la subunidad pequeña del RNAr 16S, además de, en la microscopía clásica y los resultados bioquímicos basados en las relaciones de los microorganismos (G+C e hibridación DNA-DNA) (Brenner y *col.*, 2000; Krieg y Garrity, 2000; Ludwig y Klenk, 2001).

La taxonomía de procariotas está cíclicamente enfrentada debido a los avances en las metodologías y las innovaciones conceptuales, pero tiende a consolidarse por sí misma dentro de una **estructura taxonómica**. Se trata de una disciplina esencial de las ciencias biológicas y proporciona una estructura a la comunidad científica para facilitar el entendimiento e intercambios de conocimiento (Rosselló-Mora, 2005). La jerarquía de la taxonomía mantiene en la base a la **especie**, considerada como la única y real identidad de todo el esquema de clasificación, donde las categorías más altas son consideradas abstractas (Hul, 1976; Hul, 1997). Los niveles que se establecen por encima de la especie son: **Género**: Grupo taxonómico y especies relacionadas. **Familia**: Es el nivel intermedio de la jerarquía taxonómica. Contiene varios géneros, cada uno con una o más especies. Es el taxón superior que se emplea de manera rutinaria en estudios taxonómicos de procariotas. **Dominio**: Es el nivel más elevado de clasificación biológica. Según la propuesta de Carl Woese, los tres dominios de los seres vivos son Bacteria, Arquea y Eukarya (Woese y *col.*, 1990).

Actualmente la taxonomía procariota representa, inevitablemente, un sistema artificial, un mecanismo intuitivo, en el que a partir de observaciones de repeticiones de patrones en la naturaleza, se establecen relaciones, que con frecuencia dependen más de las intuiciones individuales de los investigadores que de los patrones definidos o del conocimiento de la historia del organismo. Sin embargo, es de gran valor comparativo tener un sistema taxonómico predictivo de relaciones fenotípicas y genéticas de los agrupamientos de los organismos y los

rasgos taxonómicos que son comparables en términos de diferencias y similitudes absolutas entre las distintas líneas (Konstantinidis y Tiedje, 2005a).

Debido a la simple naturaleza de los procariotas, los taxónomos entendieron que, en el **desarrollo tecnológico** de otras disciplinas, ellos encontrarían parámetros rentables que podrían **ayudar a establecer las verdaderas relaciones entre los microorganismos**. La búsqueda y el establecimiento de nuevos criterios, ha sido un tema que ha aparecido a lo largo de la historia de la taxonomía procariota (Rosselló-Mora y Amann, 2001).

Una importante ruptura se produce en la taxonomía cuando de una taxonomía rígida, monotética, se pasa a una politética más flexible y teórica, basada en el desarrollo informático de la taxonomía numérica (Sneath, 1995; Rosselló-Mora y Amann, 2001).

La **taxonomía politética** o polifásica, se refiere al concepto fenético de especie y ayuda a los microbiólogos a llegar a un consenso de clasificación, integrando todos los datos que nos dan información acerca de los microorganismos. Esta información permite la clasificación de entidades biológicas que contienen un mínimo de contradicciones (Vandamme y col., 1996a). Incluye los **datos fenotípicos, genotípicos** y la **información filogenética**, permitiendo la clasificación de entidades biológicas (Vandamme y col., 1996b; Coenye y col., 2005).

Las especies, sin embargo, son entidades prácticas y los requisitos para su circunscripción dependen del tipo de concepto adoptado en cada uno de los esquemas de clasificación (biológico, fenético, evolutivo...). La taxonomía se debate entre los fundamentos teóricos filosóficos y el pragmatismo. Y aquí es, donde encontramos la mayoría de los problemas, al querer definir..... **qué es una especie**.

Los microbiólogos se encuentran relativamente alejados de la polémica filosófica que gira en torno al concepto de especie. La razón principal hay que buscarla en las características intrínsecas de los microorganismos. La simplicidad morfológica, la ausencia de ciclos ontogénicos, la ausencia de un registro fósil útil, entre otros aspectos, han hecho que, el estudio de las relaciones de parentesco entre microorganismos sea una tarea ardua, subordinada al desarrollo de técnicas de análisis. Tal es así, que durante el presente siglo el concepto de especie para procariotas, y, por tanto, el esquema de clasificación, se ha ido modificando a medida que han ido evolucionando los métodos de obtención de información. Hoy en día, la microbiología es una de las disciplinas técnicamente más avanzada, y que por ello podemos obtener un volumen enorme de información sobre nuestros microorganismos, tanto de su fenotipo como de su genotipo. El establecimiento de relaciones de parentesco entre microorganismos se realiza tras el análisis de todos los datos obtenidos en un estudio que todos conocemos como taxonomía numérica, y que permite el manejo de grandes cantidades de información. Es muy importante entender el significado de los tipos de relaciones que se generan tras los análisis de taxonomía numérica (Rosselló-Mora, 1999). Tenemos básicamente dos posibilidades para el establecimiento de relaciones:

A-Relaciones fenéticas:

Es muy frecuente la errónea confusión entre fenético y fenotípico. Las relaciones fenéticas están basadas en la comparación del mayor número posible de caracteres independientes (tanto fenotípicos como genotípicos), a los que en general se les atribuye el mismo peso. La unidad de medida es el porcentaje de similitud o disimilitud y tras el análisis se produce una agrupación de los individuos en función de sus semejanzas. Los resultados se suelen expresar en forma de dendrogramas. De la topología de estos árboles no se puede deducir ningún tipo de relación evolutiva ni filogenética. No se puede, por ejemplo, hablar de líneas de descendencia, ya que los nodos en el dendrograma no indican ningún tipo de evento en la historia de la evolución, sino tan sólo puntos de **agrupación por similitud**.

B-Relaciones cladísticas.

Se trata básicamente de inferir relaciones de ascendencia-descendencia entre organismos. Este tipo de análisis se basa en la existencia previa de un modelo de evolución de caracteres homólogos. En microbiología las relaciones cladísticas se basan generalmente en la **comparación de secuencias genómicas** y el gen que codifica el RNA ribosómico 16S es el más utilizado. Sería ideal poder expresar estas relaciones en unidades de tiempo. Sin embargo, la falta de un registro fósil útil no permite dar una dimensión temporal a los resultados de los análisis cladísticos en procariotas. Los resultados se expresan en porcentaje de similitud o identidad de secuencias, y nunca en porcentajes de homología. Dos genes o caracteres son homólogos o no, pero no existe ninguna gradación. De los resultados de un análisis cladístico de secuencias de genes homólogos se obtiene un árbol o cladograma que es fundamentalmente la reconstrucción de las relaciones genealógicas o filogenéticas entre éstos y los nodos representan puntos de diversificación. Se supone que el análisis del gen del RNAr 16S refleja la filogenia de los microorganismos, al asumir que su tasa de mutación es muy baja, ya que se encuentra bajo una fuerte presión conservadora. Con los resultados de este tipo de análisis no podemos hablar de evolución de microorganismos, ya que nada nos indica la trayectoria evolutiva de un organismo, sino tan sólo la **afiliación filogenética** de un organismo o una secuencia con respecto a otras (Rosselló-Mora, 1999).

Existen básicamente tres conceptos que se consideran, entre los filósofos-microbiólogos, como los más adecuados que sirven como conceptos universales y aplicados en microbiología:

-Concepto evolutivo de especie: Es el concepto con más carga teórica. Se basa en la definición de especie como una línea de desarrollo, donde se puede reconocer una trayectoria evolutiva.

-Concepto fenético de especie: Es el concepto más pragmático y con menos carga teórica. Se concibe la especie como una unidad basada en el grado de semejanza entre los organismos que lo conforman.

-Concepto filogenético de especie: Algo cargado de teoría. Se basa en el reconocimiento de grupos monofiléticos que se pueden definir por un número determinado de caracteres, en principio autapomorfos (únicos y exclusivos del taxón) (Woese y col., 1990).

El concepto de especie, que en este momento, está aceptado para procariontes es puramente fenético. La especie procarionte está circunscrita por la **combinación** de un buen número de **caracteres independientes**, tanto fenotípicos como genotípicos, basado en las recomendaciones publicadas en 1987 por el comité de expertos (Wayne y col., 1987) y confirmado y extendido por un nuevo comité ad hoc (Stackebrandt y col., 2002). Es lo que entre los microbiólogos se conoce como **especie polifásica** que no es más que un sinónimo inadecuado de **concepto fenético o politético** de especie.

Los ensayos actuales de especie procarionte fueron publicados por Dykhuizen y Green (1991), Istock y col. (1996), Palys y col. (1997), Stackebrandt y col. (2001) y Rosello-Mora y Amann (2001). Una especie procarionte *“es una categoría que se circunscribe a un grupo de organismos aislados que muestran un elevado grado de similitud global y que se diferencian considerablemente de otros grupos relacionados con respecto a muchos caracteres fenotípicos y genotípicos independientes”*. Las fronteras de especie se están enmarcando básicamente en función del grado de similitud genómica que se obtiene por hibridaciones DNA-DNA y contenido en guanina-citosina (G+C%mol), pero se requieren los caracteres fenotípicos y genotípicos para generar un sistema de clasificación útil para los procariontes (Vandamme y col., 1996a). Individualmente, muchos de los caracteres fenotípicos y quimiotaxonómicos usados son

insuficientes como parámetros para delimitar la especie, proporcionan información descriptiva, permitiéndonos reconocer un taxa.

El agrupamiento genotípico ha reemplazado al agrupamiento fenotípico para la demarcación de la especie bacteriana (Wayne y col., 1987). Probablemente **la definición más aceptada de una especie procariota** define a la especie como *“un grupo de cepas, incluyendo la cepa tipo, que comparten un 70% ó más del total del genoma hibridado DNA-DNA y tiene menos de 5 °C de ΔT_m ”*. El 70% de similaridad DNA-DNA y 5 °C de Δ de T_m se ha comprobado que es satisfactorio en muchos casos, pero hay algunos, en los que el 70% es demasiado conservativo para procariotas (Oren, 2004), por tanto, es muy importante tener en cuenta que estos límites numéricos no son absolutos y que pueden oscilar entre el 50% RBR (± 9 °C ΔT_m) y el 80% RBR (± 3 °C ΔT_m). Es por tanto un error intentar forzar la clasificación de especies nuevas utilizando el 70% de RBR (o 5 °C ΔT_m). Este valor de similitud DNA-DNA determinado arbitrariamente para delimitar la especie, significa una amplia definición para la especie procariota. Muchas de las propiedades importantes de los procariotas varían a nivel de subespecie. Características tales como la producción de antibióticos y virulencia de patógenos son dependientes de la cepa y varían mucho entre los miembros de la misma especie. Así, la especie procariota incluye organismos que son funcionalmente y genéticamente diferentes (Roselló-Mora, 1999).

Aunque el valor de la **hibridación DNA-DNA es el parámetro llave** en esta delimitación de especie, el valor de reasociación del DNA es una expresión indirecta de la identidad de la secuencia del genoma. El concepto de especie se basa en todas las similitudes genómicas. Los estudios de hibridación DNA-DNA son largos y dependen de una acertada comparación, así los experimentos son normalmente realizados con un número relativamente

pequeño de organismos. El método no da indicación de que genes contribuyen a detectar la similitud entre las secuencias.

Otra característica que es extensamente usada en la taxonomía de procariotas, es la secuencia de nucleótidos del **gen del RNAr 16S**. Generalmente, existe una buena relación entre la reasociación DNA-DNA y la secuencia del gen RNAr 16S. El 50% de apareamiento DNA-DNA corresponde al 99% de similitud del gen del RNAr 16S. Estudios comparativos revelaron claramente la limitación del gen RNAr 16S en la determinación de la relación a nivel de especie, para el que los experimentos de reasociación DNA-DNA constituyen un método superior (Stackebrandt y Goebel, 1994), por lo tanto la secuencia del gen RNAr 16S por si sola, no debe usarse para delimitar una nueva especie, se trata de un parámetro adicional que aporta información importante, pero puede llevar fácilmente a conclusiones erróneas.

El desarrollo de un nuevo enfoque metodológico y el incremento del conocimiento de la estructura de la población microbiana fue el incentivo para formar un comité para reanalizar el concepto de especie bacteriana (Stackebrandt y *col.*, 2002). Este comité concluyó, que a pesar de ciertos inconvenientes con respecto a la reproducibilidad, trabajabilidad y rigidez en la aplicación de los valores de hibridación DNA-DNA para la delimitación de especie, el sistema usado actualmente es sólido. La actual definición de especie es pragmática, operacional y universalmente aplicable (Oren, 2004).

En la práctica la **caracterización taxonómica** de una colección de microorganismos aislados se inicia con una búsqueda que permita relacionar a los distintos microorganismos aislados más estrechamente, para que se puedan agrupar y sean distinguidos de los no relacionados. Los criterios utilizados para el **agrupamiento de los microorganismos** son diversos. El análisis de ácidos grasos, que incluye a toda la célula, es un método

quimiotaxonómico en el que los lípidos que están presentes en las células bacterianas son analizados para delimitar el agrupamiento (Welch, 1991), los métodos de tipado, que incluyen la amplificación de largos fragmentos polimórficos, fingerprinting (de Vos y *col.*, 1995) y otros métodos, basados en varias PCR usando oligonucleótidos al azar (van Belkum, 1994). La ventaja de estos métodos con respecto a los tradicionales, es que son rápidos, fáciles de realizar y se pueden automatizar haciendo que sean particularmente usados para la búsqueda estandarizada de un gran número de microorganismos (Gevers y *col.*, 2005)

El **análisis del gen del RNAr 16S** se realiza a los microorganismos representantes de los diferentes agrupamientos y se comparan las secuencias del gen del RNAr 16S obtenidas con las de especies conocidas, así se determina la posición filogenética. Los análisis filogenéticos son la base para seleccionar los microorganismos y realizar los experimentos de **hibridación DNA-DNA** que sean necesarios (Gevers y *col.*, 2005). La introducción de métodos nuevos está proporcionando nuevas oportunidades para la sistemática procariota. Uno de los más interesantes desarrollos es la introducción del análisis de la secuencia completa del genoma. El incremento regular de las secuencias completas de genomas se debe a los avances en la tecnología de secuenciación y al desarrollo bioinformático (Overbeek, 2000; Jansen y *col.*, 2003). El interés en el uso de las secuencias completas del genoma se ha incrementado para analizar las relaciones evolutivas entre las especies procariotas, aunque el gen del RNAr 16S y la hibridación DNA-DNA siguen siendo considerados los criterios moleculares para la delimitación de especie, se anticipa, que mucha más información taxonómica se puede extraer de las **secuencias completas de los genomas**, ya que la disponibilidad de estas secuencias completas presenta la oportunidad de **reconstruir los eventos en la evolución de los genomas**. Las fuerzas genéticas que contribuyen a la evolución de los genomas incluyen la duplicación de genes, la transferencia horizontal de genes, pérdida de genes y los reordenamientos de los cromosomas. Estos mecanismos deben permitir la descripción exacta de la historia evolutiva y deben explicar las relaciones

Introducción

filogenéticas entre los microorganismos, permitiendo así, el desarrollo de una clasificación natural que represente verdaderamente la historia evolutiva (Gevers *y col.*, 2005). La variabilidad de los genomas, como consecuencia de la acción de los elementos antes citados, tiene consecuencias fenotípicas (Arber, 2000). La duplicación de genes en las características fenotípicas y quimiotaxonómicas dependerá de si los genes duplicados son neofuncionales, con lo cual se podrán adquirir nuevas características o, si son, no funcionales tendrá el efecto contrario (Lynch *y col.*, 2001). De la misma manera, la transferencia horizontal de genes o alelos puede resultar la adquisición de genes que codifiquen funciones no presentes en el receptor, mientras que la pérdida de genes iría acompañada de la pérdida de una característica específica (Parkhill *y col.*, 2003). Hasta ahora esto es especular sobre como los diferentes datos se usarán en el desarrollo de la taxonomía genómica cuyo camino está en construcción (Gevers *y col.*, 2005).

Las **nuevas aplicaciones** para valorar las relaciones taxonómicas entre los procariotas se basan en los análisis de las secuencias completas del genoma y en el futuro serán parámetros sobre los que se construya la taxonomía procariota (Rosselló-Mora, 2005). Gevers *y col.* (2005) explican un método para la caracterización genotípica a nivel intraespecífico, usando alelos desemparejados (mismatches) de un pequeño grupo de genes conservados (housekeeping). La técnica se llama **MLST (Multilocus Sequence typing)** podría ser una herramienta diseñada para la epidemiología molecular y para definir cepas dentro de especies ya nombradas (Cooper y Feil, 2004). Una propuesta más general, **MLSA (Multilocus sequence analysis)** podría usar un conjunto universal de genes que permitiría una clasificación jerárquica de todos los procariotas (Zeigler, 2003; Santos y Ochman, 2004). Otra técnica muy reciente propuesta por Konstantinidis y Tiedje (2005b), introduce un nuevo parámetro basado en todo el genoma, que debido a la simplicidad de su formulación y la posible informatización, podría servir como un criterio primario para la delimitación del taxón más alto a medio plazo. La media de aminoácidos, **AAI (Average Amino acid Identity)** y la media

de nucleótidos, **ANI** (Average Nucleotic Identity) (Konstatinidis y Tiedje, 2005b) son dos parámetros claros que resultan de la comparación de genomas y del promedio de la secuencia de identidad de parte de los genes ortólogos (aminoácidos o nucleótidos respectivamente). Estas comparaciones tienen dos ventajas sobre la hibridación DNA-DNA: la primera es que permiten un análisis informático y la construcción de bases de datos acumulativas (Stackebrandt y col., 2002) y la segunda es que debido a naturaleza limitante de las macromoléculas, la comparación AAI y ANI proporcionan dos niveles de relaciones, una más estrecha y otra más distante. La comparación ANI, más directamente podría reflejar los experimentos de hibridación DNA-DNA y tiene una correlación buena con los resultados acumulados durante muchos años (Rossello-Mora, 2005).

Las propuestas más interesantes realizadas para la estandarización de los datos fenotípicos y genotípicos en el comité de reevaluación para la definición de especies, en bacteriología, son las que se citan a continuación:

- Alta calidad del análisis de secuencia del gen del RNAr 16S frente a la determinación directa del RNAr 16S.
- Rápida determinación de las relaciones existentes *interespecie* o *intraespecie* por métodos de tipado de DNA (Vanechoutte, 1996; Rademaker y col., 2000; Van Belkum y col., 2001).
- El tipado de secuencias multilocus, (MLST) (Maiden y col., 1998) provee a los microbiólogos con herramientas para la búsqueda de marcadores independientes de los genes RNA ribosómicos (Palys y col., 1997; 2000).
- La secuenciación de los genomas completos ha provisto a los científicos de una cantidad de información importante.
- La caracterización y/o identificación directa de aislados se han mejorado mediante la aplicación de métodos físicos (Oberreuter y col., 2002).

Sneath (1977) sugirió que un mínimo de 10 ó preferiblemente 25 aislamientos deberían ser estudiados para definir una nueva especie. El panorama que aparece en el *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* en 2002, mostró que más de la mitad de las especies descritas estaban basadas en un sólo aislamiento. Una propuesta de Christensen y col., (2001) fue el estudio obligatorio de más de una cepa, pero no fue llevado a cabo por *Systematic of Procariotas* por la razón, de que no siempre es posible obtener más aislamientos y, sin embargo, nuevas cepas pueden ser añadidas más tarde y que una descripción sea enmendada.

I.2.2. Taxonomía numérica.

La idea de taxonomía numérica surge por la necesidad de darle igual valor a los caracteres. La realidad es que no todos los caracteres son homólogos. Se desarrolló a finales de los años 50 como parte de un análisis multivariable y en paralelo con el desarrollo de los ordenadores. Una amplia descripción de los métodos de Taxonomía Numérica fue realizada por Sneath y Sokal (1973). La taxonomía numérica es la evaluación numérica de la afinidad o semejanza entre las unidades taxonómicas, así como la ordenación de estas unidades en taxa, bajo la base de su afinidad.

Se necesita:

- Disponer de los microorganismos que queremos comparar, que constituirán lo que denominamos **OTU** (Operational Taxonomic Units).
- Estudio de la presencia o ausencia en los distintos OTU de un determinado número de caracteres, se conoce como **Cálculo de Semejanza**.
- Análisis de los grupos, disponiéndose cada OTU en grupos de similitud con la correspondiente construcción de tablas y **Dendrogramas**.

- Construcción de claves donde se ordenan los caracteres de las categorías reconocidas para preparar las descripciones y encontrar los caracteres que deban ser más usados en la realización de claves diagnósticas. Trabajar en taxonomía puede implicar la existencia de caracteres o rasgos no comparables (NC).

La aplicación de la taxonomía numérica es especialmente útil cuando el número de bacterias con el que se trabaja es elevado, se quieren comparar todas y establecer relaciones entre ellas. Se realiza con programas informáticos en los que se implementan algoritmos específicos, de los que se obtiene la matriz de semejanza y se realiza posteriormente el análisis de grupos. Se selecciona arbitrariamente un nivel en la escala de los coeficientes de semejanza y de esta manera se puede construir el **Dendrograma**.

I.2.3. Taxonomía molecular.

Con el mismo objetivo de identificar, clasificar y nombrar microorganismos se han ideado técnicas que permiten el análisis a nivel molecular. Estos análisis actúan sobre un material resistente, invariable, de fácil manipulación y en el que reside toda la información necesaria para el desarrollo de un ser vivo. Estas técnicas evolucionan continuamente, permitiendo ampliar la información sobre los microorganismos y de esta manera llegar a conocer casi todo lo que a él se refiere, teniendo en cuenta los múltiples fenómenos a los que están expuestos pudiendo variar su genoma, con lo que también variaría la información sobre dicho microorganismo.

Los registros fósiles moleculares abarcan un buen número de constituyentes celulares, casi todos los marcadores quimiotaxonómicos pueden ser utilizados en este sentido. La química de la membrana o pared celular y la composición de los sistemas de transporte electrónico son sólo los ejemplos más sobresalientes. Sin embargo, la evaluación cronológica

Introducción

de las relaciones filogenéticas requiere la utilización de moléculas con contenido informativo codificado que ha de ser necesariamente un ácido nucleico o una proteína. El número de cambios en las secuencias de estas moléculas es, *a grosso modo*, equivalente al tiempo transcurrido desde la divergencia de dos líneas evolutivas que comparten las moléculas. Tanto proteínas como ácidos nucleicos han sido ampliamente utilizados en la resolución de filogenias de muy distintos grupos de seres vivos, pero son los ácidos nucleicos los que han tenido una especial incidencia en la elaboración del árbol evolutivo de los procariotas. Además, presentan la ventaja de que los cambios mutacionales quedan en su totalidad reflejados en la secuencia, evento que no ocurre en las proteínas, debido al carácter degenerado del código genético.

La **secuenciación de ácidos nucleicos**, ha demostrado ser uno de los métodos más útiles para inferir la historia filogenética de los organismos. El mayor atractivo de esta técnica se basa en que los caracteres analizados (nucleótidos) son las unidades básicas de información y que el banco de datos que se puede obtener en estos análisis es inmenso. El número y tamaño de las secuencias que deben ser alineadas depende del nivel de comparación elegido. Las secuencias nucleotídicas analizadas por los distintos laboratorios son recopiladas regularmente en los bancos de datos informáticos, siendo el GenBank (contratado por el U.S. National Institute of Health) y el European Molecular Biology Laboratory (EMBL) los más conocidos e importantes. Todos estos datos están disponibles para que los autores puedan realizar estudios de sistemática.

La **descripción de una especie**, hasta ahora, **requiere la secuenciación de la molécula del gen del RNAr 16S**, la determinación de la **composición de bases del DNA** y la **hibridación DNA-DNA**.

I.2.3.1. Macromolécula RNA ribosómico 16S.

En teoría, debido a la cantidad y calidad de información contenida, el cronómetro molecular por excelencia debería ser el DNA, sin embargo, su tasa de cambio es demasiado rápida como para que pueda utilizarse como indicador de procesos de especiación. Por ello, son los RNA ribosómicos los que se han constituido como principales *cronómetros moleculares*. Los RNA ribosómicos forman parte integral de la maquinaria de síntesis proteica básica de toda célula viva. Sus tipos están universalmente distribuidos en todos los seres vivos, con alguna diferencia menor entre los reinos. Su función es constante en toda la escala biológica y los tipos existentes presentan una variación en la longitud de la molécula adecuada para medir cualquier distancia filogenética.

El RNA ribosómico se ha convertido en una molécula para **establecer relaciones filogenéticas de los procariotas**. Es una molécula primitiva, funcionalmente constante, distribuida universalmente y relativamente bien conservada a través de un largo trayecto filogenético. Considerando el elevado número de secuencias genéticas diferentes, en moléculas de gran tamaño como el RNAr 16S, la semejanza entre dos secuencias indica siempre algún tipo de relación filogenética. El análisis comparativo de secuencias permite determinar la genealogía y en última instancia construir el árbol filogenético que muestra la posición evolutiva de los organismos.

De esta forma, el RNA ribosómico es un marcador molecular para la reconstrucción de la mayoría de las relaciones filogenéticas. Mediante la secuenciación se obtiene la secuencia del RNAr 16S. Esta secuencia es polinucleotídica de aproximadamente 1500 pares bases. Funciona como parte de la subunidad pequeña del ribosoma de procariotas, contiene

Introducción

secuencias signatura, que son oligonucleótidos cortos de secuencia definida en los RNAr 16S, característicos de organismos concretos o de grupos de organismos relacionados filogenéticamente. La secuenciación puede ser directa o indirecta. En un análisis directo de la secuencia del RNAr 16S, los extractos crudos celulares se someten a una reacción con transcriptasa inversa y posteriormente se secuencian por el método de los dideoxinucleótidos (Sanger y *col.*, 1977). La **amplificación indirecta de los genes del RNAr 16S** se realiza mediante una PCR, utilizando oligonucleótidos complementarios a las **secuencias conservadas** y obtenidos sintéticamente. Esta forma requiere menos material celular, es más rápida y adecuada cuando se realizan estudios a gran escala. El DNA amplificado es una cadena monohebra, por lo que se puede secuenciar directamente usando el método de secuenciación del dideoxido o método de Sanger (Sanger y *col.*, 1977).

Desde su introducción la molécula del RNAr 16S ha sido usada para la clasificación de procariotas, su uso es, actualmente, un parámetro que proporciona información sobre las relaciones filogenéticas que se establecen entre los microorganismos (Stackebrandt y *col.*, 2002).

Las moléculas de RNAr bacteriano de gran tamaño son el 16S y 23S, contienen varias regiones con secuencias muy bien conservadas. Estas regiones son útiles para conseguir el adecuado alineamiento de secuencias, pero al mismo tiempo presentan, la suficiente variabilidad en otras regiones, que sirven de excelentes cronómetros filogenéticos. Estas regiones variables, que están ausentes en más del 75% de las especies, se deben a genes *rrs* localizados en el cromosoma de procariotas. El número de estas regiones en el RNAr es diferente y no existe una relación entre el número de copias de genes *rrs* y el tamaño del genoma, aunque se ha observado que bacterias de crecimiento lento presentan un número de copias más bajo que las de crecimiento rápido (Kraviec y Riley, 1990). Estas regiones son las seleccionadas para analizar la diversidad microbiana de una comunidad, concretamente la

región **V3** o la combinación de dos o tres regiones (**V3,V1,V5,V6 o V8**). La calidad de la información obtenida a partir de estas secuencias es muy importante, ya que aporta datos sobre el perfil de una comunidad incluyendo microorganismos cultivables y no cultivables. La técnica de elección para este análisis es la **DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)** (Kocherginskaya y col., 2001; Donskey y col., 2003; Konstantinov y col., 2003; Plant y col., 2003). La región de elección influirá en el perfil de la DGGE. La región con la que aparece un número de perfiles más alto, de manera que incluye a la mayoría de los microorganismos de una comunidad es la **V3** utilizada para análisis rutinarios (Yu y Morrison, 2004). Otras regiones V1,V5,V6,V8, son regiones que se utilizan en función de la muestra de la que se vaya a analizar la diversidad microbiana (Yu y Morrison, 2004).

El progresivo y revolucionario desarrollo del RNAr y sus genes como verdaderos marcadores moleculares aseguran las relaciones entre los microorganismos cultivados y no cultivados, combinados con las mejoras en la tecnología de PCR y la secuenciación. La nueva disciplina de **ecología microbiana** ofrece el potencial para determinar todo el amplio rango de los taxa procariontes sin tener los problemas de microorganismos no cultivables. Los análisis de genética molecular de rDNA obtenido del extracto de DNA del hábitat natural es usado rutinariamente en muchos laboratorios y una amplia gama de estrategias similares son aplicadas sin necesidad de aislamiento y cultivo de microorganismos (Wintzingerode y col., 1997). En un principio, el éxito fue de los patrones de los RNAs de especies ambientales que fueron analizadas por filtros de hibridación de extractos de RNA (Stahl y col., 1998) o por secuenciación directa del RNAr 16S (Seewaldt y Stackebrandt, 1982; Pace y col., 1986). Hasta llegar a métodos que han sido desarrollados para asegurar la diversidad genética que incluyen el análisis de secuencias de insertos de clones elegidos al azar, hibridación con sondas taxon-específicas (Liesack y Stakebrandt, 1992), **RFLP** (restriction fragment length polymorphism), **ARDRA** (Amplified ribosomal DNA restriction análisis) (Köhler y col., 1991; Weidner y col.,

1996) y **TGGE** o **DGGE** (temperature or denaturing gradient gel electrophoresis) ya comentada, para el análisis de comunidades microbianas (Muyzer y *col.*, 1993; Nübel y *col.*, 1996).

La diversidad microbiana difiere cuantitativamente y cualitativamente en cuanto a la composición. La proporción relativa de miembros de una comunidad está sujeta a los cambios físico-químicos del ambiente y a las modificaciones producidas por los cambios fisiológicos y metabólicos de los microorganismos. El poder de detección de microorganismos independientemente de las condiciones en las que se encuentre se debe al poder de amplificación de la PCR de pequeñas cantidades de DNA junto al volumen requerido para analizar una muestra que es significativamente pequeño. La amplificación por PCR es el método de elección para obtener las secuencias del RNAr 16S de comunidades microbianas y de cultivos puros (Stakebrandt y *col.*, 1993).

El RNAr 16S puede ser amplificado de un cultivo puro utilizando un conjunto de oligonucleótidos que se unen a regiones conservadas del gen del RNAr 16S (Lane y *col.*, 1986; Weinsburg y *col.*, 1991). Las secuencias son procesadas en las bases de datos donde están depositadas las secuencias de los genes del RNAr 16S de especies conocidas y mediante análisis informáticos obtenemos la relación filogenética entre distintos microorganismos.

El alineamiento de dos o más secuencias de RNAr 16S se realiza calculando una distancia evolutiva (E_D) y registrando en un ordenador el número de posiciones en la que la secuencia que ambos difieren, se introduce un factor de corrección estadístico para compensar la posibilidad de que, a través de los diferentes cambios que puedan haberse producido, se obtenga de nuevo la secuencia inicial. La matriz de distancias evolutivas, generada a partir de la comparación de secuencias, se analiza mediante un programa informático diseñado para producir **árboles filogenéticos** a partir de las medidas de E_D . Esto equivale a examinar todas las posibilidades de ramificaciones para el conjunto de distancias comparadas, y disponer de las longitudes de las ramificaciones para ajustar los datos de forma adecuada. La E_D que

separa dos organismos es directamente proporcional a la longitud total de las ramas que los separan (Schleifer y Ludwig, 1994).

La topología de los dendrogramas depende del número de secuencias. El orden en el que aparecen los microorganismos en el dendrograma, puede variar significativamente entre estudios, mostrando uniones más o menos precisas. La reconstrucción filogenética requiere la realización de diversos cálculos con distintos algoritmos, así como variaciones en el tipo y número de secuencias. Los análisis más detallados se basan en el método neighbour-joining. Este método usa valores de disimilitud para corregir el rango de variación. La afiliación filogenética de un organismo nos aclara datos, sobre el parentesco de éste con otros organismos que ya han sido secuenciados, así como la naturaleza monofilética de los taxones que uno analiza. Sin embargo, la información que contiene este gen es limitada y se encuentra en el umbral de resolución en la circunscripción de una especie procariota. Los patrones muestran, que las parejas más cercanas en las topologías de los dendrogramas generados con cualquiera de los algoritmos, probablemente reflejan profunda evidencia filogenética, pero en otros casos esta reconstrucción no es tan sencilla y requiere un trabajo minucioso y preciso, ya que puede llevar fácilmente a conclusiones erróneas (Rosselló-Mora, 1999).

I.2.3.2. Implicaciones taxonómicas de la composición del DNA.

-Composición de bases del DNA-

La composición de bases del DNA determinada por métodos físicos es sencilla, mediante la **determinación del contenido guanina+citosina** (G+C mol%). Se basa en la "temperatura de fusión" del DNA (Torsvik y *col.*, 1998), es decir, es la temperatura a que se desnaturaliza, por ruptura de los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las dos cadenas y está directamente relacionada con el contenido en G+C, porque los puentes de hidrógeno entre pares G-C son más fuertes debido a que están unidos por tres puentes de hidrógeno,

Introducción

mientras que los pares A-T están unidos por dos. La separación de las cadenas va acompañada de un marcado incremento en la medida de absorbancia a 260 nm (Torsvik y *col.*, 1998) que es el máximo de absorción del DNA y esta absorbancia puede medirse con facilidad en un espectrofotómetro. Cuando una muestra de DNA se va calentando gradualmente, la absorbancia se incrementa a medida que se rompen los puentes de hidrógeno que unen las bases nitrogenadas, alcanzándose, un máximo de absorbancia a la temperatura a la que todo el DNA ha pasado a ser unicatenario. El punto medio de subida, es la temperatura de fusión (T_m), es una medida del contenido en G+C. Dicho contenido puede calcularse también por centrifugación en un gradiente de densidad ya que ésta depende del cociente $(G+C)/(A+T)$ (Owen y *col.*, 1985; Johnson, 1985).

La pendiente de la curva en la transición térmica está directamente relacionada, con la homogeneidad del contenido G+C de la molécula de DNA (Britten y Kohne, 1968).

El DNA, como consecuencia inevitable de la manipulación por el cizallamiento se puede fragmentar, a pesar de ello, las preparaciones de genoma bacteriano permanecen relativamente homogéneas de acuerdo con estos criterios, lo cual indica que el contenido medio en G+C varía poco en las diferentes partes del genoma. Las únicas excepciones importantes son las preparaciones obtenidas de organismos que contienen dos elementos genéticos de diferente contenido en G+C.

Ninguna preparación de DNA muestra una homogeneidad molecular absoluta, así el contenido en G+C será siempre un valor medio y representa el valor máximo de una curva de distribución normal.

El promedio de composición de bases característico del DNA nuclear de los principales grupos de seres vivos es más variable en los microorganismos (25-80 % molar de G+C) que en animales y plantas que se centran alrededor del 35 al 40 % molar de G+C.

Cada especie bacteriana posee un contenido medio en G+C característico, que se puede considerar una de sus propiedades más importantes. Las diferencias sustanciales en la composición de bases del DNA de dos organismos son reflejo de un número elevado de diferencias individuales en las respectivas secuencias de bases de sus DNAs. El margen tan amplio de valores característico de los procariotas viene a indicar la enorme diversidad evolutiva de este grupo particular de seres vivos, sugiriendo, asimismo, su antigüedad en la escala de la evolución.

La determinación del contenido G+C pierde resolución para determinar las relaciones taxonómicas entre taxa, por lo que la tendencia ha sido usar este parámetro para **determinar las relaciones de los genomas** (Karlin y *col.*, 1997). Las divergencias evolutivas no tienen por qué ser reflejo necesariamente de distintas composiciones de bases. Si dos organismos tienen una gran semejanza en la composición de bases de su DNA, ésta sólo podrá tomarse como base firme que indique su afinidad genética y evolutiva. En bacterias el promedio en bases que integran el DNA es una característica de gran importancia taxonómica, dado el margen tan amplio de valores que se dan en este grupo.

El margen dentro de cada género es en general bastante pequeño (raramente, la variación es mayor de un 10 ó 15 %), aunque existe el caso contrario, que a pesar de una gran semejanza fenotípica, no muestran semejanza genética.

-Hibridación DNA-DNA-

Es el método considerado superior ya que determina la similitud a nivel de especie entre dos cepas bacterianas (Stackebrandt y col., 1994). **Compara dos especies a nivel de genoma completo**, por lo que es decisivo a la hora de definir una especie.

La estructura y las propiedades fisicoquímicas del DNA han permitido el desarrollo de técnicas genéticas de gran utilidad en bacteriología. El DNA nativo es de doble hélice y se puede desnaturalizar térmicamente. Si una disolución de DNA desnaturalizado se enfría rápidamente, las cadenas permanecen separadas. En las disoluciones que se mantienen a una temperatura de 10 °C a 30 °C por debajo de la T_m , tiene lugar una reasociación específica de cadenas complementarias, formándose moléculas de doble cadena. Siempre hay algo de apareamiento al azar, pero como un dúplex emparejado al azar contiene numerosos pares de bases que no forman doble cadena, la estabilidad térmica resulta baja y las cadenas se separan muy rápidamente a temperaturas próximas a la T_m , sólo permanecen aquellos dúplex entre cadenas con un elevado grado de complementariedad.

Al mezclar preparaciones de DNA, procedentes de dos cepas bacterianas relacionadas, se forman moléculas híbridas de DNA, lo que significa la base de un planteamiento totalmente nuevo para el estudio de la semejanza genética en las bacterias.

Los experimentos de reasociación DNA-DNA *in vitro* permiten evaluar el grado total de homología genética entre dos bacterias. También es posible la asociación entre DNA unicitenario y cadenas de RNA complementario, por lo que también se puede estudiar la reasociación análoga DNA-RNA. Si las moléculas de RNA contienen RNAt o RNAr, se puede evaluar la homología genética de dos bacterias con respecto a fragmentos específicos y relativamente pequeños del genóforo: aquellos que codifican las secuencias de bases de los RNA de transferencia o de los RNA ribosómicos.

El fundamento de los métodos para medir el grado de reasociación de ácidos nucleicos es la formación de dúplex entre dos muestras de DNA desnaturalizado, una de ellas marcada, con marcaje radiactivo o inmunoenzimático, que será detectado midiendo la radiactividad o por un lector de ELISA, en caso de que el marcaje sea inmunoenzimático. Se necesita una cepa de referencia, que será la cepa marcada para que la reasociación sea máxima asignándole arbitrariamente el valor de 100, la reasociación del DNA de referencia y otros DNAs heterólogos se expresa como porcentaje del valor correspondiente a la reasociación del DNA homólogo.

Los factores que influyen en la formación de moléculas bicatenarias son la temperatura, la fuerza iónica del diluyente y el tamaño medio de los fragmentos de DNA. Hay que ajustar y/o estandarizar estos factores y después, la reasociación únicamente está influenciada por la concentración de DNA y el tiempo de incubación.

La temperatura es el factor de mayor importancia, debe de estar siempre por debajo de la T_m del DNA de referencia. Existen temperaturas restrictivas, 10 °C ó 15 °C por debajo de la T_m , en las que, sólo las cadenas complementarias con un grado muy elevado de homología pueden formar dúplex estables.

Las técnicas genéticas descritas (Contenido en G+C; secuenciación del gen del RNAr 16S y reasociación DNA-DNA) son las que prevalecen como estándares para la descripción de una nueva especie bacteriana.

I.2.3.3. Análisis RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA).

La técnica de RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA) aparece hace una década en los estudios de las relaciones genéticas (Xena, 2000). Ha sido considerada una técnica de importante valor para **determinar la diversidad genética** y las **relaciones entre diversos microorganismos aislados** y son ampliamente aceptadas como herramientas taxonómicas incluyendo la identificación de cepas. Basada en los análisis de Welsh y McClelland (1990) y Willian y col. (1990) se generan patrones de bandas polimórficas producidas mediante la utilización de las secuencias arbitrarias de oligonucleótidos de secuencias cortas (8-10 pares de bases), que son amplificadas por PCR bajo condiciones de temperatura usualmente bajas, potenciando la unión a múltiples sitios dispersos a lo largo del genoma (Navajas y Fenton, 2000). Los oligonucleótidos al azar se alinean con las hebras de DNA desemparejadas para producir los perfiles polimórficos que son analizados y comparados para distinguir microorganismos a nivel de especie o subespecie. Esta técnica no requiere información de la secuencia genómica. El conjunto universal de oligonucleótidos de secuencia arbitraria y una amplificación de protocolo sencillo usando una pequeña cantidad de DNA, permite la rápida detección de varios marcadores de DNA polimórficos en unas pocas reacciones de amplificación (Zhang y col., 2002; Peerbooms y col., 2002). El resultado del perfil de DNA puede diferenciar entre microorganismos dependiendo de la presencia o ausencia de las bandas patrón. La intensidad de estas bandas se puede interpretar por inspección visual o usando un programa informático (Harris, 1999). Las diferencias en la intensidad sugieren diferencias en el número de copias de los productos de PCR, competición de los productos de PCR, heterocigosis, co-migración o desemparejamiento parcial de los sitios de unión de los oligonucleótidos (de Wolf y col., 2004).

El **atractivo principal** de esta técnica es que desconocemos la secuencia del genoma requerida, por lo que se deben probar una amplia gama de secuencias de oligonucleótidos para **identificar** aquellas **secuencias arbitrarias** que son adecuadas para una aplicación particular (Lin y *col.*, 1996).

La utilización de todo el genoma para el análisis aportará un volumen amplio de información que puede ser usada en diferentes estudios genéticos, detección de hibridaciones, variaciones genéticas intra e interespecíficas y establecimiento de identidad genética. Cuando se combina con otros métodos ayuda a la elaboración de mapas genéticos. Sin embargo, para su correcta aplicación es necesario controlar estrictamente las condiciones de trabajo, estandarizar la técnica de amplificación para asegurar la reproducibilidad del proceso y homogeneidad de los patrones de bandas (Xena, 2000). La identificación de oligonucleótidos útiles mediante pruebas que sean capaces de reconocer los polimorfismos de DNA junto con una caracterización adecuada de los organismos con los que se va a trabajar permitirá garantizar que los oligonucleótidos que han sido elegidos sean útiles para la determinación de los DNA polimórficos que se quieren detectar (Lin y *col.*, 1996). Mediante clonación y secuenciación de los productos de PCR es posible el diseño de oligonucleótidos más específicos y reales (Yli-Mattila y *col.*, 2000).

Las **limitaciones** que presenta la técnica RAPD están influenciadas por las condiciones de la PCR, por la naturaleza de los cambios genómicos que son muy marcados y no se sabe cuando se producen. Esta técnica no es una pantalla que refleje un dibujo del genoma como se esperaba, dado que los oligonucleótidos utilizados tienen un alto contenido en G+C, necesario para que el emparejamiento sea exitoso a temperaturas bajas, de manera que existe una tendencia hacia el diseño de oligonucleótidos con regiones enriquecidas en G+C que no se distribuyen homogéneamente a lo largo del genoma (Harris, 1999).

La **superación de los problemas** que puedan surgir se realiza mediante la utilización de controles en la PCR, PCR-competitiva, utilizando técnicas de Southern-blot y análisis de secuenciación de los productos amplificados o mejorando los procedimientos de separación de bandas de la electroforesis y los procedimientos de tinción (Backeljau y col., 1995).

I.3. GÉNERO BACILLUS.

I.3.1. Generalidades del género *Bacillus*.

El género *Bacillus* fue descrito por **Cohn en 1872**, desde entonces el número de especies de *Bacillus* han variado profundamente en las ocho ediciones del Manual de Bergey (Berkeleke, 2002). Los microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* son **Gram-positivos formadores de endosporas** (Smith y col., 1952). Las bacterias formadoras de endosporas, se reproducen todas por fisión binaria transversal y con escasas excepciones, tienen forma bacilar. La reacción de Gram es positiva, si se determina sobre células en crecimiento exponencial, sin embargo, muchos formadores de esporas se convierten en Gram-negativos rápidamente después de entrar en la fase estacionaria. La movilidad está extendida y se efectúa por **flagelos peritricos**. Son aerobios o anaerobios facultativos. La morfología colonial es muy variable, pudiendo ser pigmentados en determinados medios. Presentan una amplia diversidad de capacidades fisiológicas existen especies psicrófilas y termófilas, aunque la mayoría son mesófilos. También se han encontrado especies del género *Bacillus* acidófilos, alcalófilos, algunas cepas son halotolerantes y otras presentan requerimientos de sales.

Las bacterias formadoras de endosporas son quimioheterotróficas, el catabolismo de compuestos orgánicos tiene lugar por respiración aerobia, respiración anaerobia con nitrato o fermentación. Algunas, pero no todas, requieren factores de crecimiento. La mayoría de las

especies están ampliamente distribuidas en la naturaleza y no necesariamente relacionadas con su hábitat natural, por la distribución pasiva y la persistencia de las endosporas.

El **contenido de G+C** del DNA del género *Bacillus* varía en un intervalo comprendido entre el **32mol%**, que corresponde a la especie *Bacillus cereus* y el **69mol%** que presenta *Bacillus thermocatenulatus*. Además, de las diferencias genotípicas, existen grandes diferencias fenotípicas (Claus y Berkeley, 1986) por lo que el género es **heterogéneo genéticamente y fisiológicamente**, surgiendo la necesidad de un estudio profundo para mejorar la clasificación e identificación. La introducción de métodos moleculares, especialmente la secuenciación del gen del RNAr 16S y los experimentos de hibridación de las especies de *Bacillus* conocidos también revelan la heterogeneidad del grupo y ha sido el mayor impacto en la taxonomía de este género (Vargas y col., 2005).

Desde una perspectiva histórica, en la taxonomía del género *Bacillus* se describe una **primera clasificación**, basándose en criterios morfológicos, de movilidad y esporulación (Cohn, 1876). En la **segunda clasificación**, a través del Manual Bergey, Winslow y col., en 1920 definieron la familia *Bacillaceae* como bacilos productores de endosporas, Gram positivos con flagelos peritricos y que poseían un sistema enzimático proteolítico, aerobios, la mayoría saprófitos, hidrolizaban la gelatina y formaban colonias rizoides.

Los trabajos de Smith y Gordon y Clark (Clark, 1937; Smith y Clark, 1937; Gordon, 1940; Smith y col., 1946; Smith y col., 1952), establecieron nuevas técnicas y pruebas para la identificación del género *Bacillus*, en los que se discutían las diferencias entre mesófilos y termófilos, según exigencias nutricionales. Estos datos se encuentran recogidos en la 7ª edición del Manual Bergey (Breed y col., 1957).

Introducción

Posteriormente, Gibson y Gordon (1974), realizaron distintas recopilaciones entre las que se describen los *Bacillus* psicrófilos (Larkin y Stockes, 1967), además se incluye un método numérico en la 8ª edición del Manual Bergey (Gibson y Gordon, 1974). En 1980, se aprueba la lista oficial de nomenclatura bacteriana, que incluye el género *Bacillus* y está publicada en el *International Journal of Systematic Bacteriology* (Skerman y col., 1980).

La taxonomía numérica supuso un avance en la separación de especies del género *Bacillus*. En los años ochenta se realizó una reclasificación radical incluyendo la descripción de 32 especies nuevas. Los progresos en técnicas genéticas han permitido un reagrupamiento de las 146 especies consideradas diferentes desde 1939 (descritas en las ediciones anteriores del manual Bergey), en 22 especies en 1974, permitiendo, además la descripción de especies nuevas.

En 1986, Claus y Berkeley describieron el género *Bacillus*, como aquel que incluía una variedad de especies fenotípicamente heterogéneas que mostraban un amplio rango de requerimientos nutricionales, fisiológicos y una diversidad metabólica y de composición de bases del DNA. La clasificación numérica basada en una serie de características fenotípicas fue utilizada para la clasificación de 368 cepas de *Bacillus* en 79 agrupaciones (Priest y col., 1988). La secuenciación del gen del RNAr 16S, considerado como el más útil de los marcadores moleculares para inferir relaciones filogenéticas (Woese, 1987), permitió que varias especies de *Bacillus* fueran reclasificadas basándose en los alineamientos de las secuencias del sus RNAr 16S. Los estudios del gen del RNAr 16S (Fox y col., 1977, 1980; Stackebrandt y col., 1987), confirmaron la heterogeneidad del género *Bacillus*. Rössler y col. (1991) reagruparon nueve especies de *Bacillus* en cuatro agrupaciones. La subdivisión del género se hizo necesaria y se realizó atendiendo a los criterios basados en el RNAr 16S (Fox y col., 1992; Stackebrandt y Goebel, 1994). No obstante, no se pueden considerar como datos conclusivos los estudios del RNA ribosomal, por sí solos (Clayton y col., 1995). Ash y col. (1991) separaron

51 especies de *Bacillus* en cinco agrupaciones diferentes. Caracterizaciones posteriores a nivel genotípico y fenotípico de especies de *Bacillus* seleccionadas han conducido a la creación de nuevos géneros que cada día se incrementan y que hasta el día de hoy son: ***Amphibacillus*** (Niimura y col.,1990), ***Alicyclobacillus*** (Wisotzkey y col.,1992), ***Paenibacillus*** (Ash y col.,1993), ***Aneurinibacillus*** y ***Brevibacillus*** (Shida y col.,1996), ***Sulfobacillus*** (Dufresne y col.,1996), ***Virgibacillus*** (Heyndrickx y col.,1998), ***Gracilibacillus*** y ***Salibacillus*** (Wainø y col.,1999), ***Anoxybacillus*** (Pikuta y col., 2000) ***Coprobacillus*** (Kageyama y Benno, 2000), ***Filobacillus*** (Schlesner y col., 2001), ***Geobacillus*** (Nazina y col.,2001), ***Ureibacillus*** (Fortina y col., 2001), ***Jeotgalibacillus*** y ***Marinibacillus*** (Yoon y col., 2001), ***Oceanobacillus*** (Lu y col., 2001), ***Paraliobacillus*** (Ishikawa y col., 2002), ***Lentibacillus*** (Yoon y col., 2002), ***Cerasibacillus*** (Nakamura y col., 2004), ***Tenuibacillus*** (Ren y Zhou, 2005a), ***Pontibacillus*** (Lim y col., 2005), ***Salinibacillus*** (Ren y Zhou, 2005b), ***Alkalibacillus*** (Jeon y col., 2005) y ***Halolactibacillus*** (Ishikawa y col., 2005), ***Thalassobacillus*** (García y col., 2005).

La secuencia parcial del gen del RNAr 16S (Goto y col., 2000) y los patrones de restricción de RNAr 16S (Joung y Côté, 2002a) han sido utilizados para una rápida identificación o clasificación de especies del género *Bacillus* y géneros relacionados, respectivamente. Hasta el día de hoy se incluyen 182 especies y 4 subespecies, pero su número se incrementa constantemente debido a la incesante búsqueda de microorganismos que actualmente se lleva a cabo por los diferentes grupos de investigación, con el objetivo de conocer los distintos ecosistemas y los procesos que en ellos se desarrollan y en los que, los microorganismos tienen un papel fundamental. Muchas de las especies de éste género son **aplicables en procesos biotecnológicos**, ya que encontramos numerosas especies de *Bacillus* productoras de sustancias aplicables en procesos y en disciplinas muy diversas.

La especie tipo del género *Bacillus* es *Bacillus subtilis* (Cohn, 1872). El desarrollo de la genética de *Bacillus* ha demostrado capacidad de transformación de la especie *Bacillus subtilis*

Introducción

(Spizizen, 1958). Los estudios genéticos han centrados la atención en esta bacteria y en el amplio conocimiento de sus características. Esto ha conducido a la manipulación genética de la bacteria, implicando el uso de este microorganismo en numerosas actuaciones en el campo de la biotecnología, llegando a ser un organismo modelo para estudios de laboratorio y durante muchos años se ha considerado como un posible organismo experimental en el campo de la biología molecular (Todar, 2005). Rápidos avances permitieron secuenciar el genoma completo de *Bacillus subtilis* con la participación de numerosos autores (Kunst y col., 1997).

La reciente posibilidad de analizar toda la secuencia del genoma, permite un análisis más completo que contribuye a que la identificación de las especies sea más precisa.

Los procariotas fueron la primera forma de vida primitiva de la tierra (Schopf, 1975), un paso fundamental de estos microorganismos fue la formación de membranas en las que los ácidos grasos como componentes lipídicos juegan un papel fundamental (Ponnamperuma y Gabel, 1974). El sistema lipídico basado en las cadenas de ácidos grasos ramificados y la ausencia de ácidos grasos saturados es una característica de procariotas. Dentro de los procariotas existe una gran diversidad en cuanto a la composición de ácidos grasos, mirístico, palmítico y esteárico, pudiendo o no estar acompañados de ácidos grasos monoinsaturados, ácidos en posición iso, en posición anteiso, ácidos con anillo ciclopropano e hidroxiácidos (Kates, 1964; Shaw, 1974). Las condiciones ambientales influyen en los cambios en la composición de lípidos en las membranas, así como los diferentes géneros también presenta patrones de ácidos grasos característicos (Kaneda, 1977).

El análisis de ácidos grasos considerado como **criterio quimiotaxonómico**, forma parte de la identificación bacteriana y, por tanto, de la identificación del género *Bacillus*. El conjunto de lípidos celulares tiene un patrón en el que el predominio de ácidos grasos terminalmente metil ramificados en posición iso y anteiso que tienen de **12 a 17 átomos de**

carbonos, es el perfil observado en todas las especies del género *Bacillus*. Los ácidos grasos bacterianos más comunes mirístico y palmítico, son en *Bacillus* constituyentes menores. Con la excepción de dos grupos, el de *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. anthracis* y el grupo *B. insolitus*, *B. psychrophilus* y *B. globisporus*, las especies de *Bacillus* producen una pequeña cantidad de ácidos grasos insaturados (Kaneda, 1967; 1968; 1969). Una interesante aparición es la presencia de ácidos grasos ciclohexil con series iso y anteiso en especies acidófilas y termófilas de *Bacillus* (De Rosa y col., 1972; Oshima y Ariga, 1975). La proporción de ácidos grasos varía en función de las características genéticas, fisiológicas y las condiciones de cultivo, así como la fase de crecimiento en la que los microorganismos se encuentren (Kaneda, 1977).

I.3.2. Ecología del género *Bacillus*.

Las bacterias del género *Bacillus* son habitantes de ambientes terrestres y acuáticos y son capaces de crecer en condiciones ambientales drásticas incluyendo altas y bajas temperaturas, bajo contenido en nutrientes y/o ambientes hipersalinos. Son las bacterias más activas del suelo (Felske y col., 2003). Las endosporas de estas especies son muy resistentes a las distintas hostilidades ambientales donde puedan ser depositadas (Nicholson y col., 2000). Como consecuencia de las condiciones hostiles de estos ecosistemas altamente selectivos, se encuentra un bajo número de microorganismos y una alta especialización de los microorganismos que se están adaptados a tales condiciones. Los ecosistemas que presentan condiciones extremas no tienen porque ser poco productivos. Brock (1979) definió, un ambiente extremo como aquel cuya diversidad de especies es baja y algunos grupos taxonómicos no están representados.

Introducción

Los ambientes hipersalinos tienen baja disponibilidad de agua y otros factores limitantes como son la luz, el CO₂ y las altas temperaturas. Las sales se encuentran en una concentración mayor que la del agua del mar, concentraciones de sales superiores a 35 g/L, aunque el término hipersalino varía según los autores y normalmente se aplica desde el 3% al 12% p/v de salinidad (Por, 1980; Post y col., 1983).

Los microorganismos halófilos, que toleran amplios rangos de salinidad, han sido aislados mayoritariamente de ambientes salinos de acuerdo a los protocolos tradicionales (Ventosa y Nieto, 1995). Constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos incluyendo especies pertenecientes a géneros diferentes que han sido estudiados eco-fisiológicamente y genéticamente (Ventosa y col., 1998).

Las bacterias halófilas moderadas tienen un gran potencial biotecnológico. La mayoría de los aislamientos pertenecen a los géneros Gram-negativos *Salinivibrio* y *Halomonas* y Gram-positivos *Bacillus* y *Salibacillus* (Sánchez-Porro y col., 2000). Aunque los ambientes acuáticos y terrestres de elevada salinidad y altamente selectivos son los hábitats comúnmente estudiados y a partir de los que se han aislado la mayoría de los microorganismos halófilos también se han hallado bacterias halófilas moderadas y halotolerantes procedentes de alimentos, plantas, animales, ríos, pantanos, eflorescencias de la piedra y pintadas de murales (Rolleke y col., 1996), de donde se aislado especies halófilas y halotolerantes del género *Bacillus* (Sánchez-Porro y col., 2000).

Siguiendo el criterio de Kushner y Kamekura (1988) los microorganismos halófilos se clasifican:

Microorganismos no halófilos, se desarrollan en medios que contienen menos de 0,2M de NaCl (1% p/v). Algunos.

Microorganismos halófilos débiles (bacterias marinas), crecen óptimamente en medios con una concentración comprendida entre 0,2 y 0,5M de NaCl (1-3% p/v).

Microorganismos halófilos moderados, presentan un mejor crecimiento entre 0,5 y 2,5M de NaCl (3-15% p/v). En esta categoría se incluyen a la mayoría de las bacterias.

Microorganismos halófilos extremos, muestran un crecimiento óptimo en medios que contienen de 2,5 a 5,2M de NaCl (15-32% p/v). En este grupo se incluyen a la mayoría de las arqueas halófilas extremas o haloarqueas.

La mayoría de las especies del **género *Bacillus*** no son dependientes de ClNa, por eso se consideran de **origen terrestre** (Ivanova y col., 2004). El interés de estas bacterias crece por su importancia biotecnológica como fuente de enzimas termoestables y de productos usados en la industria, tales como exopolisacáridos o solutos compatibles (Harwood, 1989; Sharp y col., 1992).

Los ***Bacillus* termófilos** están ampliamente extendidos por todo el mundo, empezando a ser aislados de todos los continentes donde aparecen por ejemplo en áreas geotermales (Sharp y col., 1989; Maugeri y col., 2002). Las bacterias termófilas pertenecientes al género *Bacillus* son capaces de crecer a temperaturas de 60 °C o por encima, mostrando óptimas temperaturas de crecimiento en el rango de 45 °C y 70 °C. La mayoría de los bacilos que crecen a altas temperaturas han sido aislados de ambientes cálidos o sistemas termales hechos por el hombre, mientras que los bacilos termotolerantes podrían ser aislados de ambientes termofílicos o mesofílicos, incluyendo muestras de suelos, compostado vegetal, digestores residuales, ríos, lagos, agua del mar (Maugeri y col., 2001). Actualmente se clasifican en siete géneros. Los datos moleculares demuestran que los bacilos termófilos pertenecen al grupo 1 RNAr 16S o grupo 5 RNAr 16S (Ash y col., 1991; Rayner y col., 1994).

Los ***Bacillus alcalófilos*** han sido estudiados por su adaptación a los altos pH. Estudios de la composición lipídica (Clejan y col., 1986) y de la pared celular (Aono y Horikoshi, 1983) mostraron que los *Bacillus* alcalófilos son diferentes dependiendo de la cepa estudiada. Estas diferencias sugieren diferentes tipos de adaptación al ambiente. La presencia de iones sodio en el medio ha sido considerado muy importante en la adaptación al ambiente con un pH alto (Krulwich y col., 2001). Cada cepa de *Bacillus* muestra unos requerimientos de Na⁺ específicos, que han sido demostrados (Krulwich y col., 1982; García y col., 1983). Se han descrito pocas cepas de *Bacillus* que crecen a altas concentraciones de sal y son además alcalófilas (Arahal y Ventosa, 2002). La trascendencia de los haloalcalófilos ha provocado el aislamiento y caracterización de cepas haloalcalófilas de todos los ambientes.

Las especies del género ***Bacillus* con capacidad de crecer a pH ácido** y que poseen un ácido graso ω -alicíclico se agrupan dentro del género *Alicyclobacillus*. El rango de pH varía dependiendo de la especie desde 2-6 a 3-5,5 unidades (Wisotzkey y col., 1992). Las especies de *Bacillus* que crecen a valores ácidos de pH son *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* y *B. subtilis* (Hanlin, 1998).

I.3.3. Importancia del género *Bacillus* en procesos biotecnológicos.

Se está produciendo constantemente una búsqueda de microorganismos, con el objetivo de encontrar **nuevas cepas capaces de secretar productos con interés industrial**, que puedan ser utilizadas y aplicadas para un beneficio de la comunidad. En determinados casos los microorganismos tienen condiciones de producción específica, difíciles de reproducir, de manera que dificulta la obtención del producto deseado. Este inconveniente, hace necesario la elección de microorganismos hospedadores que produzcan estas sustancias en condiciones y en cantidades adaptadas a las industrias. *Escherichia coli*, como Gram-negativo y *Bacillus*

subtilis, como Gram-positivo, son los organismos seleccionados. *E.coli* contiene endotoxinas, que complican los procesos, porque que el producto final ha de ser purificado (Petsch, 2000; Bredmose y col., 2001), sin embargo, ***Bacillus subtilis*** es considerado como un organismo **GRAS** (Generally Recognized As Safe), por lo que es preferido en la industria y concretamente en la industria alimentaria (Westers y col., 2004).

La secuencia del genoma de ***Bacillus subtilis*** y su manipulación, permite el desarrollo de procesos industriales (Tosato y Bruschi, 2004), siendo un elemento **útil en biotecnología**, no sólo por ser un microorganismo GRAS, sino también porque tiene una alta y natural capacidad para secretar y exportar directamente proteínas al medio (Simonen y Palva, 1993). El uso de estos microorganismos como hospedadores eficientes, ha eliminado el límite del volumen de producción industrial de enzimas (Reicher y Paquete, 2003). Los microorganismos se especializan para la producción de diferentes proteínas industriales, en un primer momento, sobre la producción de enzimas derivadas de la propia bacteria o especies relacionadas. Hoy día, se conoce completamente la secuencia del genoma de *Bacillus subtilis* y se han estudiado genes desconocidos. Con el uso de las nuevas técnicas usadas para la proteómica y la genómica, se abre un nuevo camino para la optimización de la producción de *Bacillus subtilis*, mejorando algunas proteínas recombinantes que necesiten adaptación en el sistema de producción (Karlin y col., 2001; McHardy y col., 2004). El conocimiento sobre promotores, plásmidos, fermentaciones, péptidos señal y una amplia colección de cepas mutantes, posibilita la elección de óptimos sistemas de producción (Westers y col., 2004). La capacidad de seleccionar cepas de *Bacillus subtilis* y otras cepas del género para producir y segregar grandes cantidades de enzimas extracelulares (20-25g/L) los ha llevado a ocupar un papel muy importante como los mayores productores de enzimas industriales. La capacidad de desarrollarse en diferentes rangos de pH, junto a las propiedades termofílicas, les permite desarrollar una nueva enzima comercial en las condiciones de pH, temperatura, actividad y estabilidad deseadas para su aplicación específica (Schallmey y col., 2004).

Uno de los objetivos del microbiólogo es comprender cómo funcionan los microorganismos y, a través, de ese conocimiento, diseñar estrategias para incrementar los beneficios de la acción microbiana y disminuir sus riesgos. Los microbiólogos han tenido mucho éxito en la realización de estas metas y la microbiología ha desempeñado un papel destacado en la mejora de la salud y el bienestar humano. Actualmente, los productos que se encuentran secretados por los microorganismos tienen una aplicación de alto interés industrial, aunque a veces, existen obstáculos que impiden desarrollar el proyecto y hacer que éste llegue a tener un uso popular. A continuación describimos algunas de las aplicaciones de *Bacillus* con interés industrial.

-Bacillus productores de antimicrobianos-

La palabra antimicrobiano proviene del griego, *anti*, 'contra'; *bios*, 'vida', y los **antibióticos** son sustancias de origen biológico utilizados para eliminar o inhibir el crecimiento de organismos infecciosos. Una propiedad común a todos los antibióticos es la toxicidad selectiva. Las bacterias del suelo se encuentran entre los mayores productores de antimicrobianos, entre ellos encontramos diferentes especies de *Bacillus* cuyas aplicaciones son diversas, se han encontrado cepas de *Bacillus subtilis* productoras de antibióticos (Maeda y col., 2000; Çon y Gökalp, 2000; Mascher y col., 2004; Kurt y col., 2005), así como los recientes péptidos de la cepa *Bacillus subtilis* JM4 que produce dos péptidos con actividad antimicrobiana, **Subpeptina JM4-A** y **Subpeptina JM4-B**, con alto espectro de inhibición y ejercen su actividad antimicrobiana en un amplio rango de pH y temperatura (Wu y col., 2005). Distintas cepas de *Bacillus thuringiensis* producen antimicrobianos, **Entomocina 9** (Cherif y col., 2003), **Turicina 7** (Cherif y col., 2001), que tienen un interés biotecnológico por su aplicación en la industria alimentaria y agrícola, por su amplio espectro de actuación, su estabilidad y resistencia al calor y por la ausencia de toxicidad. Se han encontrado otras cepas de *Bacillus* en diversos estudios productoras de antimicrobianos cuyas propiedades aun no han sido probadas (Batrakov y col., 2003; Anand y col., 2005). Los avances en ingeniería genética

han permitido la incorporación de genes de *Bacillus thuringiensis* en plantas. Estos genes codifican para la producción de **sustancias insecticidas**, reduciendo los problemas asociados al uso de pesticidas químicos, así como las toxinas producidas continuamente dentro de estas plantas (Deepak y Guenther, 2001). Por otro lado, los estudios de Popov y col. (2005) demostraron que la secreción de **enzimas proteolíticas por *Bacillus anthracis***, que son factores patogénicos, pueden ser consideradas como objetivos para una terapia efectiva en el desarrollo del **tratamiento del ántrax**, que se considera una enfermedad mortal caracterizada por ser una septicemia generalizada, y además, pueden ser aplicados como protectores complementarios antiletales en la terapia contra la toxina.

-*Bacillus* productores de proteasas y aplicaciones industriales-

Muchos de los microorganismos del género *Bacillus* son considerados como organismos GRAS, lo que permite la utilización de las enzimas producidas por estos microorganismos en la industria, por la capacidad que tienen los organismos de producir enzimas sin límite de cantidad, la efectividad de su función y que la mayoría son termoestables, soportando condiciones de alcalinidad y altas temperaturas, todo esto hace que sean una herramienta útil de ingeniería genética (Shallmeyer y col., 2004). La mayoría de las enzimas producidas son **proteasas** que tienen un alto interés debido al reconocimiento que tiene las proteasas intracelulares en los procesos metabólicos celulares y por la atención considerable que han ido ganando en la comunidad industrial para la hidrólisis de proteínas (Gupta y col., 2002). Encuentran múltiples aplicaciones en los distintos sectores industriales, para ayudar a la degradación de los residuos producidos en cada una de ellas (Kumar y Takagi, 1999). El coste global de la producción de enzimas y el procesamiento son el mayor obstáculo para la aplicación exitosa de cualquier tecnología en la industria enzimática. Las diversas investigaciones y los procesos de ingeniería genética se han usado para incrementar la producción de proteasas por los microorganismos. Estas enzimas son secretadas durante las fases post-exponencial y estacionaria. Son inducibles por determinadas sustancias a la vez que están influenciadas por

Introducción

los componentes del medio y las condiciones físico-químicas (Varela y col., 1997; Hamed y col., 1999; Puri y col., 2002; Beg y col., 2002). Se ha encontrado que *Bacillus subtilis* es capaz de superproducir **Riboflavina** (vitamina B₁₂) (Gershanovich y col., 2005) y utilizando medios de cultivos con sustratos específicos producir proteasas al máximo nivel (Soares y col., 2005).

Las cepas mejoradas por mutagénesis o tecnología de DNA recombinante para generar selectivamente mutantes con una alta producción de proteasas, se usa para mejorar la producción de los microorganismos. La ingeniería proteica es el arte de alterar las propiedades de una proteína mediante cambios deliberados en su estructura primaria, permitiendo la introducción de cambios prediseñados en los genes para la síntesis de proteínas con una función alterada que es la deseada para su aplicación (Gupta y col., 2002). Las enzimas dirigidas han aparecido como llave en la tecnología para generar nuevas enzimas con propiedades mejoradas que son de gran importancia para su aplicación industrial (Jaeger y col., 2001).

Las **proteasas alcalinas** son las enzimas mayoritarias en el mercado mundial (Kalisz, 1988; Godfrey y West, 1996) y las especies de *Bacillus* son productores activos (Gerze y col., 2005). Estas proteasas alcalinas encuentran numerosas aplicaciones en los diferentes sectores industriales. Hasta hoy, la mayor parte del mercado de las enzimas se sostiene por la actividad de las proteasas alcalinas empleadas en la **industria de los detergentes** (Gupta y col., 2002; Denizci y col., 2004). El éxito de estas enzimas ha conducido al descubrimiento de una serie de proteasas detergentes con un uso específico. Se han usado en la **industria alimentaria** porque la función básica de estas proteasas es la hidrólisis de proteínas. Sus propiedades han sido empleadas en la preparación de hidrolizados de proteínas con alto valor nutritivo. Estos hidrolizados juegan un papel fundamental en la regulación de la presión sanguínea y son usados en las formulaciones de alimentación infantil, en productos dietéticos específicos y en el fortalecimiento nutricional de zumos de frutas y de bebidas ligeras (Ward,

1985; Neklyudov y col., 2000). En la alimentación animal, se aplican en procesos de degradación de determinadas sustancias que se añaden a los preparados alimenticios, mejorando la digestibilidad del producto para los animales (Mullaney y col., 2000).

Con frecuencia son usadas en la síntesis de péptidos (Isono y Nakajima, 2000). Okazaki y col. (2000) descubrieron el uso de un complejo surfactante-proteasa como un nuevo biocatalizador para la síntesis de péptidos en disolventes orgánicos hidrofílicos.

En el procesado de la **industria de la piel**, los métodos convencionales implican el uso de sulfuro de hidrógeno y otros compuestos químicos, creando contaminación ambiental y riesgos para la salud, por lo que, por razones ambientales el uso de proteasas en el biotratamiento de la piel, usando una aplicación enzimática ofrece numerosas ventajas por su fácil control, velocidad y reducción de residuos, de manera que es satisfactorio para el ambiente (Anderson y col., 1998). Las proteasas alcalinas con actividad elastolítica y queratolítica pueden usarse en la industria de la piel. El tratamiento enzimático destruye los pigmentos indeseables con el consiguiente incremento del área de utilización de la piel (Varela y col., 1997).

El uso de estas proteasas se ha extendido en el **tratamiento de residuos** de varias industrias alimenticias y en los residuos de las tareas domésticas (Dalev, 1994).

Representan un papel fundamental en el **procesado de las películas fotográficas** para la eliminación de la plata. El residuo que se genera contiene un 1,5-2,0% de plata incluida en una capa de gelatina, que se piensa, puede ser una fuente de recuperación de plata para una variedad de propuestas. *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* PB-77 descomponen la capa de gelatina y liberan la plata, pudiéndose utilizar ésta en una nueva aplicación (Fujiwara y col., 1989; Gajju y col., 1996).

Introducción

Para el desarrollo de **productos de importancia médica**, Kudrya y Simonenko (1994) emplearon la actividad elastolítica de *Bacillus subtilis* 316M para la preparación de elastoterasa, empleada en quemaduras, heridas, carbuncos y abscesos. La cepa de *Bacillus* CK11-4 es usada como agente trombolítico, ya que produce una proteasa con actividad fibrinolítica (Kim y col., 1996).

Un área menos explotada para el uso de proteasas es la **industria de la seda**, donde se usan para el despegado de la seda (Kanehisa, 2000).

Hay muchas investigaciones dirigidas a la búsqueda de enzimas y su aplicación a nivel industrial (Smirnov y col., 2004; Gershanovich y col., 2005). Se han encontrado cepas de *Bacillus thuringiensis* capaces de producir **enzimas de restricción** (Puchkova y col., 2002), *Paenibacillus polymyxa* capaz de convertir lactosacarosa en sacarosa y lactosa debido a su **actividad levanosacarasa** (Choi y col., 2006), *Bacillus thermolevorans* un termófilo aeróbico que secreta altos niveles de **lipasas** y utiliza sustratos lipídicos como única fuente de carbono y energía (Markossian y col., 2000). Estudios realizados aislando bacterias del suelo, demuestran que *Bacillus subtilis* es capaz de **asimilar nitrógeno** por un conjunto de enzimas (glutamato sintasa, glutamina sintasa y glutamato deshidrogenasa) (Gershanovich y col., 2005).

-Esporas de *Bacillus* aplicadas a la investigación-

Los géneros *Bacillus* y *Clostridium* pueden llevar a cabo complejos procesos de diferenciación celular, que les permitirá adaptarse a los cambios ambientales que se puedan producir mediante el proceso de transformación en esporas altamente resistentes, que se conoce como **esporulación**, proceso que ocurre en diferentes fases que son muy complejas. La esporulación bacteriana es un modelo muy interesante en el ámbito del estudio molecular, primero, por la complejidad de los pasos que lleva consigo este proceso, que no están totalmente claros y sólo hay descritos modelos polémicos y segundo, por el intenso estudio

realizado en el proceso de esporulación de *Bacillus subtilis*, que conduce a muy diversos mecanismos de esporulación. La complejidad se incrementa si incluimos a microorganismos Gram-negativos (Imrich y col., 2005). En *Bacillus subtilis* se centran los primeros estudios de investigación y los aspectos fundamentales estudiados son el uso de las esporas de *Bacillus subtilis* como **vehículos de vacunas**, debido a los antígenos heterólogos que muestran en la superficie (Isticato y col., 2001) y las pruebas de esporas recombinantes como vacunas orales, de muy reciente desarrollo (Duc y col., 2003; Ciabattini y col., 2004; Mauriello y col., 2004). Existen ventajas potenciales relacionadas con la utilización de esporas como un sistema desarrollado de vacunas por varias razones: Son estables al calor, mantienen grabada la seguridad (safety record), estableciendo a través del uso común de esporas de varias especies como probióticos y su producción es sencilla y económica pudiendo producirse grandes cantidades de esporas, basándose en los procedimientos comúnmente usados en la producción a escala industrial y la comercialización de los productos (Rica y Cutting 2003). Además, la difusión de las esporas de *Bacillus* como probióticos para humanos y animales (Senesi, 2004), podría facilitar su licencia final como vacunas orales, aunque este campo, aún está en expansión, por su reciente inicio (Cutting, 2004). Este nuevo desarrollo, posibilita la obtención de esporas recombinantes porque presentan múltiples antígenos en su superficie y por lo tanto, las capacita para actuar como vacunas multivalentes estables al calor (Barák y col., 2005). Estudios *in vitro* con macrófagos como línea celular, demostraron que las esporas podrían germinar eficientemente en macrófagos iniciando la expresión de genes y la inducción de proinflamación de citokinas. Los análisis de RNAm de tejido linfático asociado al gastro intestinal (GALT) y órganos linfoides mostraron una inducción del interferón γ y la citokina Th1 y la proinflamación de la citokina TNF- β (Duc y col., 2004). Estas esporas también tienen aplicación como agentes de exclusión para el control de patógenos zoonóticos en la producción animal (Monteiro y col., 2005).

Introducción

La utilización de las esporas de *Bacillus* como **probióticos**, ha empezado a estudiarse recientemente, como consecuencia, del nacimiento de esta nueva área que son los probióticos y que han surgido como una nueva ciencia, con aplicaciones en la agricultura y la ganadería, como alternativa a los antibióticos, además de cómo un sistema de protección en humanos. Los probióticos están siendo desarrollados comercialmente. Numerosos productos que contienen esporas de las especies de *Bacillus* son usados para prevenir desordenes gastrointestinales, entre ellos encontramos "**Bactosubtil**" que contiene esporas de *Bacillus cereus* (Mazza, 1994). "**Biosporina**" lleva esporas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* (Sorokulova, 1997; Smirnov y col., 1994). La cepa de *Bacillus subtilis* que se utiliza para este producto, es una cepa modificada que produce un antibiótico con actividad frente a *Helicobacter pylori* (Pinchuk y col., 2001).

Los probióticos son usados como complementos dietéticos para potenciar y restaurar la microflora natural del intestino (Sanders y col., 2003). La especie *Bacillus subtilis* variedad *natto*, fermenta la soja produciendo un marcado y demostrado efecto probiótico estimulando el sistema inmune, produciendo **vitamina K** y además tiene **propiedades anticancerígenas** (Inooka y col., 1986; Hosoi y col., 2000).

Como productos terapéuticos, encontramos, entre otros, a *Bacillus coagulans*, que secreta una **bacteriocina** que tiene un amplio espectro para los microbios entéricos (Hyronimus y col., 1998), se usa en tratamiento de infecciones gastrointestinales y para prevenir diarreas en niños asociadas al efecto de los antibióticos (La Rosa y col., 2003).

La estimulación del sistema inmune se considera un mecanismo importante para mantener estos productos, ya que hay estudios que han demostrado que la administración oral de esporas estimula el sistema inmune (Hong y col., 2005). La administración oral de esporas de *Bacillus subtilis* o *Bacillus pumilus* conduce a una rápida **inducción del interferón**

produciendo células mononucleares en la sangre periférica que estimulan la actividad de macrófagos y células NK (Kosak y col., 1998). Las células vegetativas de *Bacillus firmus* producen estimulación de la **proliferación de linfocitos** en la sangre periférica en humanos (Prosekova y col., 1994) y las esporas de *Bacillus clausii* administradas oralmente interactúan con las Placas de Peyer y con los nódulos linfáticos mesentéricos y estimulan a los linfocitos B para la **síntesis de Ig A** (Fiorini y col., 1985).

La producción de **antimicrobianos** mediante probióticos se considera un mecanismo principal para inhibir a los microorganismos patógenos del tracto gastrointestinal. Las especies de *Bacillus* producen una amplia variedad de antimicrobianos (Fuller, 1991), entre ellos encontramos a *Bacillus coagulans* que produce una coagulina con actividad sobre bacterias Gam-positivas (Hyromonimus y col., 1998), *Bacillus subtilis* variedad *natto* inhibe el crecimiento de *Candida albicans* (Ozawa y col., 1979) en el tracto intestinal. El **efecto antimicrobiano no está completamente determinado**.

Los **probióticos**, procedentes de las esporas de *Bacillus*, aun **no** han sido considerados como producto **GRAS** (Generally Regarded As Safe) por la "Food and Drug Administration of the United States of America", aunque los microorganismos de esta especie sí lo sean. A pesar de todo, el uso de las esporas de *Bacillus* como probióticos se extiende con un aumento del número de productos en el mercado, pero su seguridad aun no está suficientemente clara, por lo que hay que evaluar cada producto por separado (Hong y col., 2005) antes de que salga al mercado.

-Bacillus productores de biosurfactantes-

Los biosurfactantes desarrollan un papel beneficioso en la industria farmacéutica, textil, cosmética y también en procesos de recuperación de residuos, (Banat y col., 2000). Algunas especies del género *Bacillus* como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus pumilus*,

producen **biosurfactantes** que **reducen la tensión superficial y la interfacial** y tienen excelentes propiedades **detergentes, emulsificantes, antiespumantes y dispersantes** (Arima y col., 1968; Naruse y col., 1990; Yakimov y col., 1995). Dos nuevas cepas productoras de biosurfactantes fueron aisladas de sedimentos de ríos del sur de España, *Bacillus axarquiensis* y *Bacillus malacitensis* (Ruíz-García y col., 2005). Distintas cepas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus mojavensis* presentan actividad biosurfactante y esta actividad puede verse modificada según la composición de los ácidos grasos (Youssef y col., 2005). Recientemente, estudiando la cepa LB5 de *Bacillus subtilis* se ha comprobado que es capaz de crecer usando como sustrato el agua residual procedente de la extracción de almidón de yuca y sintetizar un biosurfactante que forma una emulsión estable con varios hidrocarburos y sus propiedades no cambian aunque se someta a condiciones ambientales extremas (100 °C y 20% ClNa). Una cepa de *Bacillus cereus* produce un biosurfactante muy efectivo en presencia de diferentes compuestos como n-alcanos, naftaleno, aceite de oliva crudo y aceites vegetales y además la cepa es capaz de degradar el naftaleno, lo que promete que pueda ser aplicada en tecnología ambiental (Tuleva y col., 2005). El hallazgo de una población microbiana, entre los que se han encontrado diversas especies del género *Bacillus* (*Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus fusiformis*), aisladas de suelos contaminados con petróleo y productores de biosurfactantes, ha mostrado que estos productos pueden ser utilizados en la recuperación de estos suelos contaminados, con una alta efectividad (Meneces-Bento y col., 2005).

-Implicación de *Bacillus* en biodegradación de aguas residuales y sedimentos contaminados-

Las aguas residuales son materiales derivados de residuos domésticos o de procesos industriales, que por razones de salud pública y por consideraciones de recreación económica y estética no pueden desecharse vertiéndolas sin tratamiento en lagos o corrientes convencionales. Los materiales inorgánicos como la arcilla, sedimentos y otros residuos procedentes en su mayoría de procesos industriales se pueden eliminar por métodos

mecánicos y químicos, sin embargo, los tratamientos de las aguas de desecho utilizando microorganismos, como agentes descontaminantes actualmente, están aumentando el interés de estudio y la escasez, cada vez mayor, de aguas dulces debido al crecimiento demográfico, la urbanización y los cambios climáticos, ha dado lugar al uso creciente de aguas residuales, en principio para la agricultura, pero hay otros frentes abiertos que permiten dar uso a las aguas residuales que se generan. De esta manera, encontramos estudios en los que se investiga el uso de **microorganismos capaces de degradar los compuestos tóxicos de las aguas residuales responsables de la contaminación ambiental**. Cepas del género *Bacillus* y géneros relacionados han sido encontradas en los residuos estudiados. En este sentido podemos citar a la cepa *Paenibacillus jamilae* aislada de las aguas residuales de la industria del aceite de oliva. Esta cepa que además de crecer en el residuo es capaz de producir un exopolisacárido con numerosas aplicaciones industriales (Aguilera y col., 2001), entre ellas destaca su capacidad de actuar como agente quelante de metales pesados, concretamente el plomo (Morillo y col., 2006). *Bacillus sphaericus* que tiene capacidad de degradar nonil-fenol y diversas especies de *Bacillus* degradan pentaclorofenol de sedimentos de aguas residuales bajo condiciones anaeróbicas (Chang y col., 2005; Lan y col., 2005). Otros estudios demuestran que aislamientos de cepas del género *Bacillus* presentan una eficiente capacidad para eliminar pesticidas (López y col., 2005) de aguas residuales. La revalorización de suelos contaminados con aceites y otros compuestos, está permitiendo recuperar su actividad, mediante el uso de un consorcio de microorganismos entre los que encontramos como principales fermentadores especies de *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* (Medina-Moreno y col., 2005), así mismo, los residuos producidos en las industria vinícola y los residuos de las granjas agrícolas que contienen restos de celulosa y la industria derivada del almidón son descontaminados, también, por un consorcio de microorganismos, entre los que han demostrado tener una actividad más importante y eficiente son especies de *Bacillus* (Petre y col., 2001; Ikran-ul-haq y col., 2005). En investigaciones realizadas se ha demostrado que las cepa de *Bacillus subtilis* LFE-1, *Bacillus firmus* HO-1 y la cepa de *Bacillus licheniformis* T6-4,

pertenecientes a reservorios de aceite, demuestran tener capacidad de inhibir a las bacterias sulfatorreductoras, por lo que se podría utilizar esta capacidad para ser usadas como **biocidas** en la industria del petróleo y así, controlar los problemas asociados con las bacterias sulfatorreductoras (Koremlum y col., 2005). El aislamiento de especies termófilas de *Bacillus* junto con especies de los géneros *Brevibacillus* y *Geobacillus* permite el conocimiento de la diversidad microbiana en la industria del petróleo y proporciona una base para desarrollar un programa de control que ayuda a identificar bacterias y a trazar las rutas de contaminación que actualmente contaminan esta industria, pudiendo resolver los problemas que se plantean (Suihko y col., 2004).

Las aguas residuales de la industria textil, se encuentran contaminadas con tintes y otros compuestos procedentes de las diferentes operaciones que tienen lugar a lo largo del proceso. No existe tratamiento establecido, pero la tendencia actual es utilizar tratamientos biológicos frente a los físico-químicos. Numerosas investigaciones ponen de manifiesto la existencia en la naturaleza de cepas pertenecientes al género *Bacillus*, aisladas o no del residuo, que tienen la capacidad de decolorar el residuo (Nakajima-Kambe y col., 1999; Maier y col., 2004; Li y col., 2004; Poubabae y col., 2006). Hay estudios que describen bacterias que por sí solas no son capaces de decolorar el residuo, pero en consorcio con otros microorganismos, si producen una decoloración efectiva (Sharma y col., 2004a; 2004b; Khehra y col., 2005).

Se puede decir que, actualmente, la utilización de **consorcios microbianos** está siendo utilizado, ya que demuestra ser más **efectivo** tanto en la **degradación de compuestos** de residuos líquidos como en suelos contaminados, que las bacterias solas (Supaphol y col., 2005).

II. OBJETIVOS.

De forma similar a como previamente se realizaron estudios sobre la biorremediación del alpechín y alpeorujo, con logros tan importantes como la utilización de estos residuos como sustrato para el crecimiento de *Paenibacillus jamilae*, especie bacteriana capaz de producir un exopolisacárido de utilidad industrial (Guerra y col., 1998; Guerra, 1999; Aguilera y col., 2001; Ruiz-Bravo y col., 2002; Morillo y col., 2006); y atendiendo a la carencia de investigaciones sobre la microbiota presente en las aguas residuales de las aceitunas de mesa, pareció oportuno por parte de nuestro grupo de investigación realizar un estudio sobre los microorganismos que crecen en dicho residuo, y de forma específica sobre la población microbiana halófila y halotolerante, en la consideración de que este trabajo podría ser de utilidad en la búsqueda e investigación de microorganismos, que aislados o en comunidad, sean útiles para la posible recuperación del residuo.

Para ello, los objetivos concretos planteados en este trabajo son los siguientes:

1- Aislamiento y selección de microorganismos halófilos y halotolerantes capaces de crecer en las aguas residuales de la industria de las aceitunas de mesa.

2- Estudio politético de taxonomía. Estudio de taxonomía numérica de los microorganismos aislados de las aguas residuales de la industria de las aceitunas de mesa y selección de cepas como representantes de los fenones obtenidos en el dendrograma para un estudio de taxonomía molecular.

3- Identificación y descripción de los microorganismos seleccionados.

III. MATERIAL Y MÉTODOS.

III.1. MUESTREO Y AISLAMIENTO DE CEPAS.

Las muestras de agua residual fueron tomadas en el año 2000, tras la propuesta de colaboración mantenida con la industria del procesado de las aceitunas de mesa **AGROSEVILLA S.A.** (La Roda, Sevilla) y nuestro grupo de investigación. Los puntos de muestreo recibieron el nombre de **1-Entrada**, **2-A Pie de Tubería**, **3-Balsa Nueva** y **4-Balsa Vieja**. Cada uno de ellos presenta condiciones que lo diferencian de los demás como a continuación se describe:

1-Entrada. “E”- Es el punto donde la concentración de sal, de compuestos fenólicos y otros componentes procedentes de la salmuera madre, aguas de lavado y lejías es mayor. Es un punto de toma interno, donde confluyen el conjunto de líquidos que conforman el vertido. Las condiciones de salinidad y pH de la entrada reproducen una mezcla de los distintos residuos del procesado de las aceitunas. Hay que destacar la alta temperatura de esta área, como factor a tener en cuenta, a la hora de buscar microorganismos capaces de crecer a valores de temperatura muy por encima de los normales. En este punto se pueden llegar a alcanzar hasta 60 °C. El pH se encuentra compensado por los ácidos producidos en la fermentación y la alcalinidad de las aguas de lavado que alcanzan valores de 10,5 a 13,5 unidades de pH, frente a las 3,9 unidades de las salmueras.

2-A pie de tubería. “I”- El agua residual sale al exterior para ser depositada en las balsas autorizadas por la tubería de donde se recoge la muestra. La temperatura del líquido residual aquí ya ha disminuido, igualándose a la temperatura ambiental.

3-Balsa Nueva. “N”- Primera balsa donde reposa el agua residual que sale por la tubería. Estas balsas están autorizadas por el Ministerio de Medio Ambiente, representado por la

Confederación Hidrográfica que controle el área. En dichas balsas reposa el líquido residual procedente de las industrias del procesado de las aceitunas de mesa. Cuando el líquido es muy abundante pasa a otra balsa. En los periodos de menor actividad y cuando las temperaturas son altas, se produce la evaporación del agua, quedando en la balsa un vertido con una concentración salina que puede ser muy similar a las de las salinas y una importante concentración de compuestos fenólicos.

4-Balsa Vieja. “V”- Último destino del agua procedente de esta industria. El contenido en agua en esta balsa es menor y la evaporación es mayor. Presenta características similares a la Balsa Nueva, pero con concentraciones más altas.

A veces pueden existir fugas del líquido residual tanto en la Balsa Nueva, como en la Vieja, dando lugar a la contaminación del suelo sobre el que se ubican las balsas y los alrededores, es por ello, la búsqueda de una alternativa para este residuo.

Para la recogida de muestras se utilizaron garrafas de plástico estériles con tapón de rosca de plástico. Las muestras de agua residual procedente de la industria de las aceitunas de mesa, se conservaron a 4 °C hasta su procesamiento.

III.1.1. Medio y condiciones de cultivo.

Cada muestra fue sembrada por triplicado directamente de la garrafa donde se almacenaba, además se realizaron diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} de cada muestra que también se sembraron por triplicado.

Los medios utilizados en la siembra y el recuento de las muestras fueron:

-Medio MH (Ventosa y *col.*, 1982)- Su composición en g/L es la siguiente: Proteosa de peptona- 5g; Extracto de levadura-10g; Glucosa-5g; Agar-20g. El medio fue suplementado con

Material y métodos

cantidades variables de solución Subov (1931) (Rodríguez-Valera y col., 1981), para obtener medios con las concentraciones salinas que oscilarían entre 0% p/v y el 25% p/v, y así, determinar la capacidad de estos microorganismos para tolerar la sal. El pH final del medio se ajustó a 7,0 +/- 0,2 a 25 °C con una solución de NaOH 2N.

-Medio TSA- Triptosa Soja Agar- (Panrerac): Peptona soja-5g/L; Peptona de caseína-15g/L; ClNa-5g/L; Agar-15g/L. El pH final 7,3+/-0,2. Para su preparación se suspenden 40 gramos en un litro de agua destilada, se calienta hasta ebullición manteniéndolo en este punto durante un minuto. Se esterilizó a 121 °C, 15 minutos y se distribuyó en placas Petri estériles.

-Sabouraud Chloranphenicol Agar- (Scharlau) Medio de cultivo para el aislamiento de hongos, su composición es: Peptona micológica-10g/L; D(+)Glucosa-40g/L; Cloranfenicol-0,5g/L; Agar-15g/L. El pH final del medio es de 5,6 +/- 0,2. Se suspenden 65,5 gramos en un litro de agua destilada, se esterilizó en el autoclave 121 °C durante 15 minutos.

El recuento de microorganismos procedente de las muestras y de cada una de las diluciones se realizó inoculando 0,1 ml en las placas de medio, MH a las concentraciones de sal de 0% p/v, 3% p/v, 5% p/v, 10% p/v, 15% p/v, 20% p/v y 25% p/v, TSA y Sabouraud-Chloranphenicol Agar, siguiendo la técnica de diseminación superficial (con asa de Drigalski).

Todas placas sembradas, fueron incubadas durante 48 horas a 30 °C, además, las muestras procedentes de la entrada, "E", fueron incubadas a 55 °C. La entrada, "E", como se ha explicado anteriormente, presenta una temperatura muy superior al resto de los puntos de muestreo, por lo que se investigó la presencia de **microorganismos termófilos** y se sembraron placas procedentes de la entrada que se expusieron a temperaturas de 55 °C.

El recuento se realizó a las 48 horas y a la semana de incubación con el objetivo de observar si se producían cambios durante ese tiempo, o si por el contrario permanecían estables.

III.1.2. Selección de cepas.

Se aislaron 185 cepas a partir de las placas inoculadas en los diferentes medios, una vez transcurrida los 7 días de incubación. Se eligieron aquellas colonias que presentaban características específicas en cuanto a la **morfología colonial**, **tamaño**, producción de **colonias mucosas**, crecimiento **a altas temperaturas** y **concentraciones de sal** y presencia de **pigmentación**.

Las colonias seleccionadas se obtuvieron en cultivos puros en el medio en que fueron seleccionadas. Posteriormente y tras realizar el espectro salino de crecimiento, las cepas se conservaron a lo largo de todo el estudio en medio **MH** al **5%** p/v de sal y a **30 °C** de temperatura.

III.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS SELECCIONADAS.

III.2.1. Pruebas morfológicas.

III.2.1.1. Morfología colonial.

Se observó el aspecto de la colonia de cada cepa, el borde, la forma, el tamaño y la coloración de la colonia. Las pruebas fueron realizadas a partir de un preinóculo de 48 horas de

crecimiento a 30 °C en medio MH al 5% p/v de sal líquido, a partir del que se sembraron en placas de medio MH al 5% p/v de sal sólido y tras 48 horas de incubación a 30 °C, se observaron las colonias.

III.2.1.2. Estudio microscópico.

Tinción de Gram- La tinción se realizó según la modificación de Hucker (1927) usando cristal violeta y safranina y de Dussault (1955) fijando la preparación con una solución acuosa de ácido acético al 2% v/v que elimina las sales del medio. Se utilizaron cultivos jóvenes en medio MH al 5% p/v de concentración salina

Los reactivos se prepararon como sigue:

*Cristal violeta-Cristal violeta -1g.-Alcohol etílico-5 ml.-Agua destilada-95ml.

*Lugol- Yodo metálico-1g.Yoduro potásico-2g.Agua destilada-300ml.

*Safranina-Safranina- 2,5g.-Alcohol etílico- 100ml.

Tinción de esporas.- Se siguió la metodología de Shaeffer y Fulton (1933), utilizando como primer colorante verde malaquita al 5% p/v en agua destilada, y como colorante de contraste, una solución acuosa y filtrada de safranina al 0,5% p/v. Los cultivos a los que se les hizo la tinción tenían una semana, para dar lugar a la aparición de las esporas y que se observasen claramente al ser coloreadas.

Los reactivos se prepararon como sigue:

*Verde malaquita-Verde malaquita-5g.-Agua destilada-100ml.

*Safranina-Safranina- 0,5g.-Agua destilada-100ml.

Movilidad- La movilidad de cada cepa se observó por el método de la gota pendiente, utilizando para ello, un cultivo joven del microorganismo en medio MH al 5% p/v de concentración de sal.

Microscopio Electrónico

A-Tinción negativa- Las muestras se prepararon a partir de un cultivo joven de 5 ml de medio MH al 5% p/v de sal. Se inoculó 1 ml en matraces de 500 ml con 200 ml del mismo medio, incubándose durante 48 horas a 30 °C. Esta técnica fue realizada en el Laboratorio de Preparación de Muestras Biológicas del **Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Instrumentación Científica (CIC)** de la **Universidad de Granada**. Se utilizaron los colorantes acetato de uranilo al 1- 2% p/v, que actúa a pH ácido.

B-Corte Fino- Se prepararon las muestras del mismo modo que para la tinción negativa. El proceso se realizó en el **Servicio de Microscopía del Centro de Instrumentación Científica (CIC)** de la **Universidad de Granada**, siguiendo el protocolo descrito por Megías y Renau (1998). La obtención de cortes ultrafinos, fue realizada con cuchilla de diamante, de 500-750 amstrongs de espesor montados sobre rejillas de cobre de malla 300, teñidos con acetato de uranilo al 1% p/v en solución alcohólica al 50% v/v durante 1 minuto y posteriormente con citrato de plomo según Reynolds (1963) en una atmósfera libre de CO₂, los cortes ultrafinos se observaron y fotografiaron en un Microscopio Electrónico de Transmisión (EM 902 de Zeiss) a 80 Kv. El registro fotográfico se realizó con película fotográfica KODAK EM film.

III.2.3. Pruebas fisiológicas.

III.2.3.1. Crecimiento a diferentes temperaturas.

Se observó el crecimiento de los microorganismos seleccionados a las siguientes temperaturas: **10 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 40 °C, 45 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C y 70 °C** en medio sólido MH al 5% p/v de concentración salina utilizando un inóculo de 24 horas. La lectura se realizó a la semana y a los 15 días, considerando positivo el desarrollo colonial en las placas.

III.2.3.2. Crecimiento a diferentes pH.

Se determinó el crecimiento de cada cepa en medio líquido MH al 5% p/v de concentración salina a los siguientes pH, **2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12**. Los tubos fueron incubados durante una semana a 30 °C y a los 15 días considerando positivos aquellos en los que existía turbidez cuando se comparaban con un blanco sin inóculo.

III.2.3. Crecimiento a diferentes concentraciones de sales.

Se estudió el crecimiento del microorganismo **al 0% p/v, 3% p/v, 5% p/v, 10% p/v, 15% p/v, 20% p/v, 25% p/v y 30% p/v** de concentración salina. Para ello se preparó el medio MH sólido a las diferentes concentraciones de sal, se inocularon las cepas seleccionadas en los medios preparados y se incubaron en estufa a 30° C. Un desarrollo de las colonias se consideró positivo. La lectura se realizó a la semana y a los 15 días sin que existiera variación en el resultado.

III.2.3. Pruebas nutricionales.

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

III.2.3.1. Utilización de carbohidratos como fuente de carbono y energía.

Los sustratos ensayados fueron: **celobiosa, fructosa, galactosa, glucosa, maltosa, manosa, ramnosa, sacarosa y xilosa**. El sustrato problema se adicionó al medio hasta conseguir una concentración final de 0,2% p/v. Como medio base se utilizó el siguiente en g/L: NaCl-100g; KCl-20g; MgSO₄·7H₂O-0.2g; KNO₃-1g; (NH₄)₂HPO₄-1g; K₂HPO₄-0.5g; Agua destilada-1000ml. El medio se distribuyó en tubos de hemólisis y fue esterilizado en el autoclave a 121 °C durante 30 minutos. Para el inóculo se utilizó un cultivo joven resuspendido previamente en solución salina estéril de NaCl al 5% p/v. Los tubos inoculados se dejaron incubar 15 días a 30 °C. La lectura se realizó a diario utilizando un control sin inóculo y por turbidez.

III.2.3.2. Utilización de aminoácidos como única fuente de carbono y energía.

Los sustratos ensayados fueron: **alanina, arginina, histidina, metionina, cisteína, lisina y asparragina** y como medio base se empleó el siguiente (Ventosa, 1980) en g/L: NaCl-100g; KCl-2g; MgSO₄·7H₂O-0,2g; KH₂PO₄-0,5g; Agua destilada-1000ml. Cada sustrato fue esterilizado por filtración, añadiéndose al medio estéril, hasta una concentración final de 0,1% p/v. El medio así preparado se distribuyó asépticamente en tubos de hemólisis estériles. Para el inóculo se utilizó un cultivo joven resuspendido previamente en solución salina estéril de

NaCl al 5% p/v. Tras la siembra de los tubos, se dejaron incubar durante 15 días a 30° C. La lectura se realizó diariamente utilizando un control sin inóculo y por turbidez.

III.2.3.3. Utilización de ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía.

Los sustratos ensayados fueron los ácidos: **oxálico, fumárico, málico, propiónico, malónico, benzoico, tartárico y glutámico**, que se añadieron hasta una concentración final de 0,1% p/v. Como medio base se utilizó el descrito por Ventosa (1980), cuya composición en g/L es la siguiente: NaCl-100g; KCl-2g; MgSO₄ ·7H₂O-0,2g; KNO₃-1g; (NH₄)₂HPO₄ -1g; K₂HPO₄-0,5g; Agua destilada-1000ml. El medio se distribuyó en tubos de hemólisis y fue esterilizado en autoclave a 112 °C durante 30 minutos. Para el inóculo se utilizó un cultivo joven resuspendido previamente en solución salina estéril de NaCl al 5% p/v. Los tubos inoculados, se dejaron incubar hasta 15 días a 30 °C. Se realizó lectura diaria utilizando un control sin inóculo y por turbidez.

III.2.4. Pruebas bioquímicas.

La identificación de un aislamiento bacteriano puede realizarse utilizando diferentes combinaciones de características. Las pruebas bioquímicas convencionales generalmente determinan la actividad de una vía metabólica, presencia o ausencia de una actividad enzimática, requerimientos de oxígeno, de la cepa objeto de estudio. Existe una gran variedad de estas pruebas, cuyo fin es acercarse a la clasificación de un microorganismo. Actualmente, las pruebas bioquímicas complementan a las técnicas moleculares, aunque en determinadas ocasiones son decisivas a la hora de definir una especie.

III.2.4.1. Catalasa.

Casi todos los microorganismos aerobios y anaerobios facultativos tienen la **enzima catalasa** que es capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en O_2 y H_2O . La presencia de este enzima se detectó adicionando una gota de H_2O_2 de 10 volúmenes sobre una extensión de un cultivo joven en un portaobjetos. La prueba es positiva cuando aparece un burbujeo de O_2 sobre la masa bacteriana.

III.2.4.2. Oxidasa.

Con esta prueba se determina la presencia del **citocromo C** en la cadena transportadora de electrones, para ello se utiliza el **reactivo de Kovacs** para la oxidasa (1956). Se realiza una extensión de la colonia de la cepa a estudiar procedente de un cultivo joven en un papel de filtro, se deposita sobre ella una gota de reactivo. La reacción es positiva si aparece un color violeta intenso sobre la masa bacteriana en un tiempo máximo de 10 minutos.

Reactivo de Kovacs: -NNN´N´tetrametil,1-4fenilendiamina-1g-Agua destilada-100ml.

III.2.4.3. Prueba óxido- fermentación O-F.

Con esta prueba sabremos si la bacteria posee un **metabolismo respiratorio** (O) o **fermentativo** (F). Para su realización se utilizó el medio base para oxidación-fermentación de Difco, a este medio se añadió una solución de glucosa al 10% p/v, que actuaría como sustrato y la producción de ácidos se observaría gracias a un indicador ácido-base, el **azul de bromotimol**. Se disolvió por calentamiento y fue distribuido en tubos de hemólisis para ser esterilizados en autoclave a una temperatura de 121-124 °C durante 15 minutos. El pH final es de 6,8+/-0,2. El medio se preparó según el protocolo establecido, con la salvedad de adicionar

Material y métodos

la cantidad necesaria de Solución Subov para alcanzar una concentración final del 5% p/v de concentración salina. Los microorganismos fueron incubados en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis utilizando simultáneamente, un tubo abierto y un tubo cerrado con parafina. Los microorganismos que realizan un metabolismo respiratorio crecen en la superficie del medio del tubo abierto transformando la glucosa en CO₂. La superficie del medio se verá ligeramente amarilla por la formación de ácido carbónico originado al reaccionar el CO₂ con el agua del medio, en el tubo cerrado del microorganismo con metabolismo respiratorio no se observará crecimiento, se mantendrá azul verdoso. Los microorganismos fermentadores producirán gran cantidad de ácidos a partir de la glucosa, virando el tubo cerrado de azul a amarillo por la disminución del pH, en el tubo abierto se iniciará el viraje en el fondo, pero transcurridas 24 horas los ácidos difundirán y se observará todo amarillo. Cuando el medio cambie de verde a color azul, significará que el microorganismo no es capaz de utilizar la glucosa y utiliza las peptonas del medio como fuente de carbono y energía, liberándose las aminas que contribuyen al aumento del pH y, por tanto, la aparición de este color. Las lecturas se realizaron diariamente, a partir de las 24 horas de incubación a 30 °C y hasta 15 días.

III.2.4.4. Producción de indol.

Mediante esta prueba se determina si el microorganismo posee la **enzima triptofanasa**, capaz de actuar sobre el triptófano, que está formando parte de las peptonas del medio, dando lugar a indol más alanina. El indol se detecta empleando un reactivo específico, el **reactivo de Kovacs**. Se utilizó el siguiente medio base en g/L: Proteosa peptona-5g; Extracto de levadura-10g; Glucosa-1g. Se adicionó la cantidad necesaria de Solución Subov para alcanzar una concentración final de sal del 5% p/v. El medio se distribuyó en tubos de hemólisis y fue esterilizado en el autoclave a 121 °C durante 30 minutos. Tras ser inoculados los tubos con un cultivo bacteriano joven, se incubaron 48 horas a 30 °C. Para la lectura, y

según Cowan y Steel (1974), se añadieron 0,5 ml del **reactivo de Kovacs** (1928) por tubo. La aparición de un anillo rojo en la superficie del medio indica la presencia de indol.

Reactivo de Kovacs: p-dimetilaminobenzaldeído-5g/L; HCl concentrado-75ml; Alcohol amílico-25ml. El aldehído se disuelve en el alcohol calentando suavemente al baño María, posteriormente y tras enfriar se le añade el ácido.

III.2.4.5. Rojo de Metilo.

Esta prueba es positiva para las bacterias que realizan la **fermentación ácido-mixta**, produciendo ácido acético, etanol, H₂, CO₂ y proporciones diferentes de ácido láctico o propiónico (fórmico) según las especies. En esta ruta de fermentación se produce ATP además de la reoxidación del NADH+H⁺. La producción de formiato o CO₂ + H₂ depende de la presencia en la bacteria de una enzima denominada **formiato-liasa** responsable de este paso. No todas las bacterias la presentan, su actividad es detectable por la producción de grandes cantidades de gas (el H₂ es insoluble) como consecuencia de la fermentación del azúcar, el pH del medio disminuye hasta aproximadamente 4-5 unidades, este cambio se detecta añadiendo como indicador el **rojo de metilo**. Para realizar la prueba se utilizó el siguiente medio, descrito por Quesada y *col.*, (1984) cuya composición en g/L es la siguiente: Proteosa de peptona-5g; Extracto de levadura-10g; Glucosa-5g; ClNa-98g; KCl-2g; MgSO₄·7H₂O-0,2g; CL₃Fe-trazas; K₂HPO₄-5g. Se distribuyó en tubos de hemólisis y se esterilizó en autoclave durante 30 minutos a 121 °C. Los tubos inoculados se incubaron a 30 °C durante 48 horas. La lectura se realizó añadiendo a cada tubo unas gotas de una solución hidroalcohólica de rojo de metilo. La prueba es positiva en caso de aparición de color rojo en su superficie, la coloración naranja, se consideró dudosa, y se repitió el test, una coloración amarilla es negativa.

Solución Rojo de Metilo: Rojo de Metilo-0.04g; Etanol-40 ml; Agua destilada-1000 ml. Se disuelve el rojo de metilo en etanol y se enrasa a 100 ml con agua.

III.2.4.6. Voges-Proskauer. (V-P)

Identifica las bacterias que realizan la **fermentación butanodiólica**, en este tipo de fermentación se desprende CO_2 y se logra como producto final el 2,3-butanodiol. Como paso intermedio de la ruta, se produce acetoina que puede servir para la identificación de las bacterias que presentan esta ruta. Mediante un reactivo específico, el α -**naftol** al 40% p/v, se detecta la presencia del intermediario de dicha ruta. El acetilmetil carbinol o acetoina, en presencia de O_2 se convierte en diacetilo, el cual origina una coloración roja al reaccionar con los restos guanidínicos de algunos aminoácidos presentes en las peptonas del medio. El medio utilizado es el descrito en la prueba del Rojo de Metilo. Los tubos inoculados se dejaron en incubación a 30 °C durante 48 horas. Para la lectura se añadieron los **reactivos de Barrit** (1936) en el siguiente orden:

Primero: 6 gotas del reactivo A (Solución de α -**naftol** al 5% v/v en etanol)

Segundo: 2 gotas del reactivo B (Solución acuosa de **KOH** al 40% p/v)

Posteriormente los tubos se agitaron para una mayor exposición del medio al oxígeno atmosférico, dejándose a temperatura ambiente durante 15 minutos. La aparición de un color rojo más o menos intenso indica que el test es positivo.

III.2.4.7. Reducción de nitratos y nitritos.

Se estudió la reducción de nitratos a nitritos y/o a gas. Para ello se utilizó el medio siguiente en g/L: Proteosa peptona-5g; Extracto de levadura-10g; Glucosa-1g; KNO_3 -2g; Solución salina al 5% p/v (Subov)-1000ml. El medio se distribuyó en tubos de hemólisis con campanas Durham y fue esterilizado en autoclave a 112 °C durante 30 minutos. Tras ser inoculados se dejaron incubar a 30 °C durante 5 días. Se procedió a una primera lectura observando la presencia o ausencia de gas en las campanas, después se añadieron 0,5ml de

los reactivos A y B respectivamente a cada tubo. Tras dejar un par de minutos los tubos a temperatura ambiente se pudo observar la aparición de color rojo escarlata que indicaría la presencia de nitritos en el medio, por tanto, la positividad del microorganismo en cuanto a la reducción de los nitratos, pero no de los nitritos. En los casos donde no apareció color se adicionaron al medio trazas de **granalla de Zinc** para detectar la existencia o no de nitratos en el medio de forma que una nueva ausencia de color indicaría que todo el nitrato habría sido reducido inicialmente a nitrito y después a gas. En este caso, la cepa será positiva respecto a la reducción de nitratos y nitritos. Por el contrario, la aparición de color rojo indicaría la existencia de nitratos en el medio y la prueba sería dada como negativa.

La composición de los reactivos es, según **Bachmann y Weaver** (1951):

- Reactivo A**: Solución al 0,5% p/v de α -**naftilamina** en ácido acético 5N.
 - Reactivo B**: Solución al 0,8% p/v de **ácido sulfanílico** en ácido acético 5N.
- Se facilita la disolución de ambos reactivos por calentamiento leve.

III.2.4.8. Crecimiento en agar Cetrimida.

El medio agar base con cetrimida, es un medio selectivo que se recomienda para el aislamiento e identificación de *Pseudomonas aeruginosa*. Para esta prueba utilizó el medio deshidratado de Difco preparado en placas Petri, donde se inocularon seis microorganismos por placa. Después de 72 horas de incubación a 30 °C, se observó el crecimiento o ausencia de crecimiento de los microorganismos inoculados.

III.2.4.9. Producción de ácidos a partir de alcoholes y carbohidratos.

Los alcoholes ensayados fueron: **adonitol, dulcitol, myo-inositol y manitol** y los carbohidratos ensayados fueron: **glucosa, celobiosa, galactosa, ramnosa, sacarosa, fructosa, xilosa y manosa**. Para este ensayo se utilizó el medio descrito por Quesada y *col.*

(1984), cuya composición en g/L es la siguiente: Proteosa peptona-5g; Extracto de levadura-10g; Rojo fenol 0,04% p/v-20g; Solución salina 5% p/v (Subov)-1000ml. El alcohol o el carbohidrato correspondiente se agregó al medio a una concentración del 1% p/v. Dicho medio se repartió en tubos de hemólisis y se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 112 °C durante 30 minutos. Los tubos inoculados se incubaron a 30 °C durante dos días. Las lecturas se efectuaron a diario, considerándose la producción de ácidos positiva cuando se observaba un viraje del indicador, rojo fenol, a color amarillo. En caso contrario se produce, generalmente un viraje a rosa, debido a la alcalinización del medio.

III.2.4.10. Pruebas de hidrólisis.

Mediante estas pruebas, se pone de manifiesto la presencia de determinadas enzimas que actuarán sobre los diferentes sustratos que se adicionan al medio. Cuando la prueba es positiva, la cepa en cuestión posee el enzima capaz de hidrolizar el sustrato probado.

-Hidrólisis del almidón- Se utilizó medio MH al 5% p/v de concentración salina al que se le añadió un 1% p/v de almidón soluble. Tras su esterilización en autoclave a 121 °C durante 15 minutos se repartió en placas Petri estériles. Las placas inoculadas con cuatro microorganismos cada una se incubaron a 30 °C durante dos días. La lectura se efectuó añadiendo una solución yódica al medio, de forma que, un halo claro entorno al crecimiento bacteriano indicaría la positividad de la reacción.

Solución Yódica de Gram (Branson, 1972): Yodo-1g; Yoduro potásico-2g; Agua destilada-300ml.

-Hidrólisis de la caseína- Se siguió el método de Hasting modificado (1903) según Ventosa (1980), para ello se esterilizó el medio SKIM MILK doblemente concentrado y medio MH al 5% p/v de concentración salina. Previo enfriamiento y a la temperatura de 55 °C aproximadamente, se mezclaron asépticamente ambos medios y se distribuyeron en placas Petri estériles. Se

inocularon cuatro microorganismos por placa y tras dos días de incubación a 30 °C, se realizó la lectura observándose si se producían o no halos de aclaramiento alrededor del microorganismo ensayado.

-Hidrólisis de la esculina.- Se realizó según Mac Faddin (1980), añadiendo al medio MH al 5% de concentración de sal, esculina al 0,1% p/v y citrato férrico al 0,05% p/v. Se inocularon seis microorganismos por placa y permanecieron a 30 °C durante dos días, transcurridos los cuales, si se observaba que se producía un ennegrecimiento alrededor o encima de su propio crecimiento indicaba que el microorganismo hidrolizaba la esculina.

-Hidrólisis de la gelatina.- Se siguió el método modificado de Frazier (1926). Para ello se utilizó el medio base MH al 5% p/v de concentración salina al que adicionamos un 1% p/v de gelatina. Las placas se inocularon con 4 microorganismos cada una y se incubaron durante dos días a 30 °C. La lectura se realizó bañando cada placa con la solución de Cl₂Hg (Cloruro mercurio II) descrita por Frazier (1926), la reacción será positiva en caso de que aparezca una zona clara alrededor del crecimiento bacteriano.

Reactivo de Frazier (1926): Cl₂Hg -12g; HCl concentrado-16 ml; Agua destilada -80 ml.
Se adiciona el HCl a aproximadamente 50 ml de agua destilada, posteriormente se añade el Cl₂Hg y el agua restante, agitando ligeramente para lograr una completa solución.

-Hidrólisis de la tirosina.- Al medio base MH al 5% p/v de concentración de sal se le añadió tirosina hasta una concentración final del 0,5% p/v. El medio se esterilizó en autoclave y se repartió en placas Petri estériles. Se obtuvo una suspensión opaca. Sembramos seis microorganismos por placa y fueron incubados dos días a 30 °C. La prueba, en caso de la aparición de halos transparentes alrededor y debajo del crecimiento bacteriano (Valderrama, 1985), se consideró como positiva. Además, se observó la formación o no de un pigmento negro sobre y alrededor del crecimiento bacteriano.

-Hidrólisis de Tween 20, Tween 40 y Tween 80- Se ensayaron en esta prueba el Tween 20, 40 y 80. Para ello se esterilizaron por separado y se añadieron cada uno hasta una concentración final del 1% v/v al medio base descrito como MH al 5% p/v de sal. Se inocularon seis microorganismos en cada una de las placas y se dejaron incubar a 30 °C durante dos días. A la lectura se procedió, siguiendo las indicaciones de Sierra (1957), que consideró como positiva la hidrólisis en caso de aparición de un precipitado, a modo de halo opaco alrededor del crecimiento bacteriano.

III.2.5. Susceptibilidad a antibióticos. Prueba de difusión en agar.

Se siguió la metodología de **Kirby-Bauer** (Bauer y col., 1966) empleando el medio base MH al 5 % p/v de concentración de sal, utilizándose la técnica de difusión de los discos impregnados con antibiótico, basada en medir la inhibición del crecimiento de un microorganismo en la superficie de una placa de agar. Dicho método se estandarizó al máximo cada uno de los factores que influyen en el diámetro de la zona de no crecimiento, tales como densidad del inóculo, pH del medio, difusión del antimicrobiano y concentración del disco. Se ensayaron los siguientes antibióticos, utilizando discos de 6 mm de diámetro (MAST DIAGNOSTIC) a la concentración que aparece expresada entre paréntesis:

Cloranfenicol(30µg), **Tetraciclina**(10µg), **Ampicilina**(30µg), **Kanamicina**(30µg),
Amikacina(30 µg), **Streptomycin**(10µg), **Cefalotina**(30µg), **Acido Nalidixico**(30µg),
Eritromicina(15µg), **Polimixina B**(300U/IE), **Clindamicina**(2µg), **Penicilina G**(10U/IE),
Rifampicina(30µg), **Sulfamidas**(200µg), **Gentamicina**(10µg).

La metodología seguida fue la siguiente:

-Preparación del inóculo- Se incubaron de 3 a 5 colonias del microorganismo en cultivo puro, en un tubo de concentración salina al 0,9% p/v, se hizo una suspensión hasta obtener una turbidez equivalente a 0,5 en la escala de McFarland.

-Siembra del inóculo- Se sembró el inóculo sobre la superficie de una placa de agar del medio MH al 5 % p/v de concentración de sal, con un escobillón estéril impregnado con el inóculo y escurrido en las paredes del tubo, para lograr un crecimiento homogéneo.

-Aplicación de los discos- Los discos fueron colocados con pinzas flameadas con alcohol sobre la superficie de la placa, previamente inoculada con el caldo de cultivo, procurando no tocar con las pinzas la placa y efectuando una ligera presión sobre el disco. Se dejaron las placas aproximadamente 30 minutos a 4 °C para la predifusión del antibiótico.

-Incubación de las placas- Las placas se introdujeron en bolsas de plástico cerradas, para evitar la excesiva desecación del medio y la posible precipitación de sales, incubándose a la temperatura de 30 °C durante 48 horas.

-Interpretación- Se realizó midiendo el halo de inhibición con una regla incluyendo el diámetro del disco. Se interpretó que el microorganismo es resistente, intermedio o sensible al antibiótico, según las tablas de referencia facilitadas por el servicio técnico de BioMeriux. En la tabla 8 podemos ver los valores de los antibióticos utilizados en este estudio.

Tabla 8. Valores en mm de los diámetros de los antibióticos (CMI).

Antibiótico	Resistente	Intermedio	Sensible
Cloranfenicol (C)	<19	19-22	>= 23
Tetraciclina (TE)	<17	17-18	>=19
Ampicilina (AM)	<11	11-16	>=17
Kanamicina (K)	<15	15-16	>=17
Amikacina (AN)	<15	15-16	>=17
Penicilina G (P)	<8	8-28	>=29
Cefalotina (CF)	<12	12-17	>=17
Estreptomicina (S)	<13	13-14	>=15
Gentamicina (GM)	<14	14-15	>=16
Eritromicina (E)	<17	17-21	>=22
Clindamicina (CC)	<15	-	>=15
Polimixina B (PB)	<15	-	>=15
Sulfamidas (G)	<12	12-16	>=17
Ácido Nalidíxico (NA)	<15	15-19	>=19
Rifampicina (RA)	<14	14-18	>=19

III.2.6. Análisis de ácidos grasos.

El contenido de todos los ácidos grasos es una expresión directa y estable del genoma. En efecto, el patrón de ácidos grasos es un **carácter quimiotaxonómico** que difícilmente está afectado por mutaciones, adquisición o pérdida de plásmidos (Bertone y *col.*, 1996). El análisis de ácidos grasos coincide con datos obtenidos por métodos de hibridación DNA-DNA (Yang y *col.*, 1993; Rayner y *col.*, 1994) y se usa ampliamente para la identificación de aislamientos ambientales (Guckert y *col.*, 1991; Henningson y Gudmestand, 1991; Osterhout y *col.*, 1991; Stead, 1992; Stead y *col.*, 1992; Bousfield y *col.*, 1983).

Esta técnica tiene ventajas prácticas, tales como la simplicidad del método analítico, rapidez del análisis y el bajo coste de los materiales. A los microorganismos, que después del

análisis fenotípico y molecular fueron considerados nuevas especies, se les aplicó la técnica mediante la que se determinaría su composición en ácidos grasos.

Los microorganismos se cultivaron en medio líquido, MH al 5% p/v de concentración de sal, se incubaron durante 36 horas a 30 °C, para obtener masa bacteriana de cultivos jóvenes, que fueron centrifugados a 8.000 rpm durante 20 minutos y lavados con solución salina al 2,5% p/v para obtener la un peso celular de 2g. El análisis de ácidos grasos fue determinado por la técnica **GLC high-resolution (Gas-liquid chromatography)** en los laboratorios de la colección de cultivos tipo alemana, **DSMZ** (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH).

III.3. TAXONOMÍA POLIFÁSICA.

En la taxonomía polifásica se aúnan criterios fenotípicos y moleculares de los organismos. Ayuda, a que la identificación a la que se quiere llegar sea más completa y real, ya que se dispone de mayor información acerca del microorganismo objeto de estudio y las relaciones que establece con otros microorganismos, permitiendo la clasificación de los mismos, según un rango de criterios más amplio y, por tanto, con menor error.

III.3.1. Taxonomía numérica.

Los datos para la aplicación del análisis numérico, se obtuvieron de **100 pruebas** realizadas a las cepas aisladas de las aguas residuales de las aceitunas de mesa objeto de este estudio. Los resultados se codificaron como positivos o negativos asignándoles respectivamente el valor de 1 ó 0 y en el caso de resultados variables se les dio el valor 9. El coeficiente de correlación utilizado fue el “simple matching” que elaboraron **Sokal y Michener**

(S_{SM}), que incluye tanto las concordancias positivas como las negativas (Sokal y Michener, 1958), debiendo compararse microorganismo con microorganismo.

Una comparación entre los OTUs A y B podríamos expresarla como sigue:

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

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

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

-Procesamiento de los datos

Los datos fueron analizados empleando, el coeficiente de agrupamiento simple S_{SM} (Sokal y Michener, 1958) como hemos indicado anteriormente.

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

Codificación de los datos

Aplicando un nivel de semejanza del **70%** se obtuvo el **dendrograma** simplificado de cepas Gram-positivas, en el que los **fenones** se presentan como bloques y en ellos se incluyen las cepas que presentan características comunes.

III.3.2. Taxonomía molecular.

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

III.3.2.1. Extracción, cuantificación y cálculo de la pureza del DNA.

El método que se utilizó fue una modificación al Método de Marmur modificado (1961), con lo cual el protocolo de extracción quedó como se describe:

Extracción del DNA- Se partió de 200 ml de cultivo en fase exponencial crecido en medio HM (Ventosa y *col.*,1982) al 5% p/v de sal. Se centrifugó para obtener el sedimento de células a 8.000 rpm/15 minutos en una centrífuga refrigerada (5-10 °C) Sorvall RC 5B utilizando frascos de 250 ml (Sorvall). Se lavó con 50ml de agua bidestilada agitando el frasco con vórtex hasta que se desprendió el pellet de las paredes, se añadió una punta de espátula de Lisozima y se incubó durante aproximadamente 1 hora, para que se produjera la lisis bacteriana. Se añadió SDS al 25% p/v para conseguir una concentración final de 1% v/v y se incubó a 60 °C durante

Material y métodos

5-10 minutos. Enfriamos en hielo y añadimos NaCl 5M hasta conseguir una concentración final 1M. Se añadió 1 volumen de cloroformo y se agitó manualmente hasta mezclar las dos fases y se centrifugó a 7.000 rpm durante 15 minutos. Se recogió la fase superior y se precipitó el DNA añadiendo 0,1 volumen de acetato sódico 3M (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol. Se recogió el DNA con varilla de cristal, eliminando en lo posible el etanol, y fue resuspendido en 4ml de SSC 0,1x (citrato sódico). Se añadió SSC 20x hasta conseguir una concentración de SSC 1x y se incubó con RNAsa (Ribonucleasa-A) 60µg/ml a 60 °C durante 2 horas, posteriormente se añadió Proteinasa K a una concentración de 10 mg/ml y fue incubado a 37 °C durante 1 hora. Se añadió 1 volumen de cloroformo y tras agitar manualmente se centrifugó a 3.200 rpm durante 10 minutos, la fase superior fue recogida y tras añadir 1/9 volúmenes de acetato sódico y 0,56 volúmenes de isopropanol se recogió el DNA con varilla de cristal (se agitó el tubo suavemente con vueltas de 180°) y se resuspendió en 0,5 ml de agua bidestilada estéril y se congeló a -20 °C.

-Cuantificación del DNA- La cuantificación de DNA y la determinación de la pureza del DNA genómico bacteriano extraído se calculó por espectroscopía de absorción.

La medida de D.O. a 260nm es una medida cuantitativa de la concentración relativa del DNA. Los cocientes D.O. 260nm/D.O. 280nm son indicativos de la pureza de los ácidos nucleicos. La D.O. a 325nm es indicativa de las partículas en suspensión y de la suciedad de la cubeta. La D.O. a 230 nm es indicativa de los contaminantes con enlaces peptídicos y grupos aromáticos como son el fenol y algunos residuos de las proteínas. El cociente D.O. 260nm/D.O. 280nm si es igual a 1,8-1,9 indica que se trata de DNA altamente purificado.

$\text{Concentración de DNA g/L} = \text{D.O. 260nm} \times 50\text{g/ml} \times \frac{\text{Volumen final de la mezcla en ml}}{\text{Volumen final de la disolución de DNA que se pone en la mezcla en L}}$
--

-Purificación del DNA - Para la determinación del contenido de guaninas y citosinas y para la técnica de hibridación se necesita un alto grado de pureza del DNA para lo cual aplicamos el siguiente protocolo:

Partimos de una disolución de DNA de 500 μ l. Añadimos 250 μ l de fenol y 250 μ l de la mezcla cloroformo:isoamílico en la proporción 24:1. Centrifugamos durante 5 minutos a 13.000 rpm. Se formaron dos fases separadas por una interfase, que dependiendo de su limpieza se repetirán los pasos anteriores hasta conseguir una interfase limpia. Añadimos RNAsa (Ribonucleasa A–Sigma) (60 μ l de una concentración de 10 mg/ml), e incubamos a la temperatura de 60 °C durante 2 horas. Añadimos Proteínasa K (Boeringer N^ocat.84437023-65) (65 μ l de una concentración de 10mg/ml), e incubamos a 37 °C durante una hora. Se adicionaron 500 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico en la proporción 24:1. Centrifugamos a 13.000 rpm durante 5 minutos y recogimos el sobrenadante donde estaba disuelto el DNA. El DNA fue precipitado con 0,1 volumen de acetato sódico 3M, pH 5,2 y 2 volúmenes de etanol absoluto purísimo. Se dejó toda la noche a -20 °C y al día siguiente se centrifugó durante 15 minutos a 13.000 rpm, el sobrenadante se desechó y el pellet se lavó con 500 μ l de etanol del 70% v/v, volviendo a centrifugar en las mismas condiciones anteriores. Descartamos el etanol y se dejaron secar los posibles restos de etanol durante 20 minutos a 55 °C. Según la cantidad de precipitado de DNA se resuspende en 500, 100 ó 50 μ l de agua bidestilada estéril. Por último, se cuantificó y se midió la pureza por espectrofotometría.

III.3.2.2. Determinación del contenido de las bases guanina-citosina (G+C).

Método de la temperatura de fusión.

Se determinó la cantidad de Citosinas y Guaninas (G+C) que hay en el DNA genómico por el método de **Marmur y Doty** (1962).

Material y métodos

La composición de bases del DNA, es un carácter de profunda significación taxonómica en microorganismos. La T_m es la temperatura de fusión del DNA, temperatura a la que, el 50% de las moléculas de DNA se encuentran desnaturalizadas, se corresponde con el punto medio de la curva de desnaturalización. La desnaturalización se produce por ruptura de los puentes de hidrógeno con el aumento progresivo de la temperatura. La separación de las cadenas se acompaña de un incremento marcado de la D.O 260nm. La pendiente de la curva en la transición térmica está directamente relacionada con la homogeneidad del contenido G+C de la población de moléculas de DNA. Cuanto mayor contenido de G+C, mayor es la T_m .

Se determinaron los valores de G+C experimentales de las cepas seleccionadas como representantes de cada fenón, incluyendo como cepa de referencia a *Escherichia coli*, en cada experimento para asegurar que todos los parámetros externos eran correctos. De cada cepa se realizaron 4 ensayos y después se obtuvo la media \pm desviación estándar. Para los análisis espectrofotométricos se utilizó el equipo Spectrophotometer Lambda 3B, Recorder R 100 A-Perkin-Elmer, USA las cubetas de cuarzo (Hellma 115F-QS) de 0,5 ml de volumen y con tapón hermético para evitar la evaporación de la muestra.

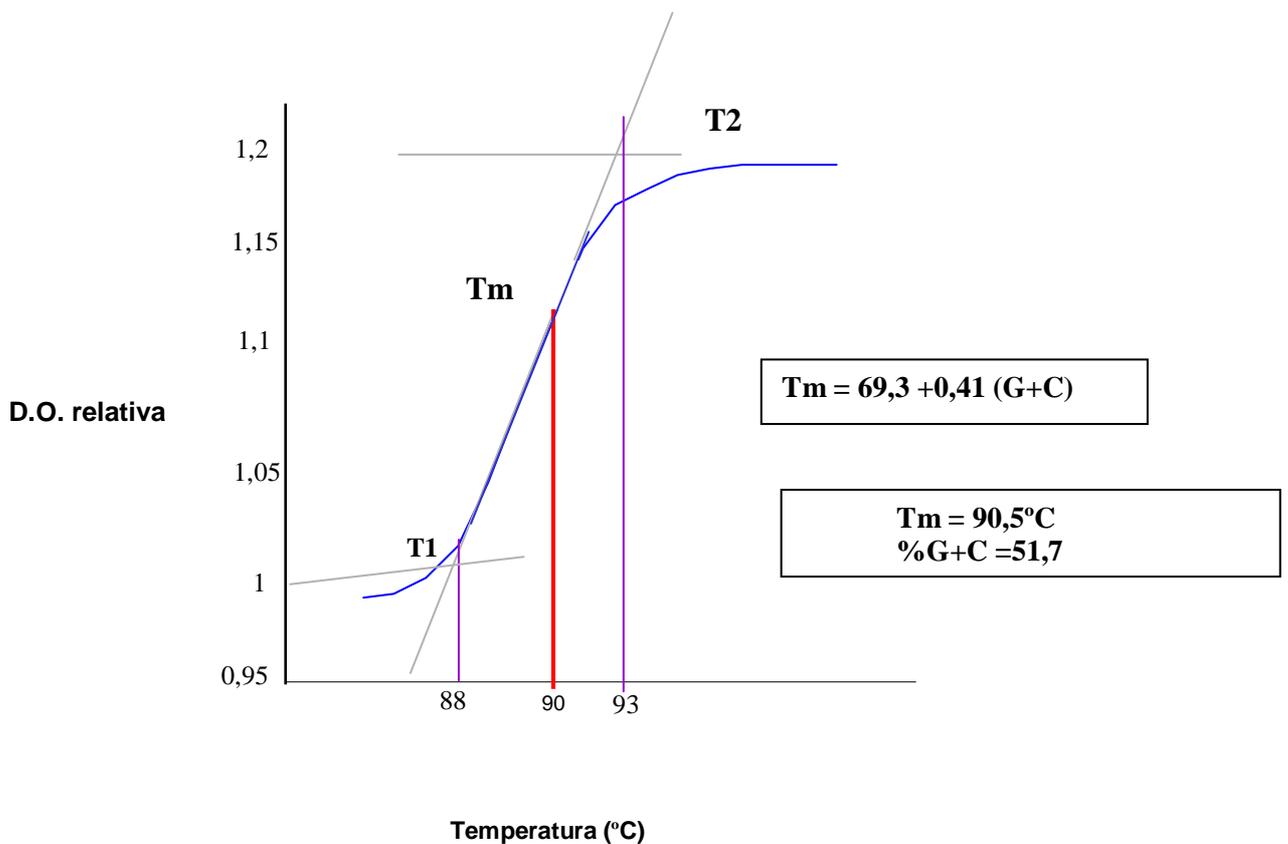
El DNA cuantificado, se disolvió en un volumen final de 500 μ l de SSC al 1x (el tampón utilizado es 0,15M de NaCl; 0,015M de citrato de sodio hasta obtener un valor de absorbancia de 1.000. Se ajustó el cero del espectrofotómetro con una disolución de SSC. La variación de temperatura se estableció en 1 °C/minuto. La velocidad con que registra los cambios de absorbancia se estableció en 5mm/minuto. El RANGO =1000 mV (milivoltios).

- Análisis de la curva para determinar la T_m .

A medida que la temperatura se incrementa, se desnaturaliza el DNA hasta los 100 °C, y el resultado aparece reflejado en forma de curva, a la que se le trazan tres tangentes, los

puntos de corte de las tangentes se llevan hasta el eje de abscisas (T °C), obteniéndose dos temperaturas. La media de ambas, coincide con el punto medio al que el 50% del DNA se encuentra desnaturalizado. A modo de ejemplo ponemos la curva de desnaturalización del DNA de *Escherichia coli* cepa de referencia.

Figura 2. Curva de desnaturalización de DNA de *E.coli*



El porcentaje de G+C se determinó a partir de la temperatura de fusión (T_m) de cada curva con la siguiente expresión:

$$T_m = 69,3 + 0,41 (G+C)$$

III.3.2.3. Secuenciación y análisis filogenético del gen del RNA ribosómico 16S.

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

-Purificación del DNA. Amplificación del gen del RNAr 16S

El DNA que se utiliza para la secuenciación del gen del RNAr 16S, debe tener un alto grado de pureza, para evitar cualquier tipo de error durante el proceso. Una vez obtenido y purificado el DNA de las cepas en estudio se realizó la **amplificación del fragmento** del gen del RNAr 16S por **PCR (Polimerization Chain Reaction)**, utilizando los oligonucleótidos específicos o cebadores específicos del gen del RNAr 16S de eubacterias, **16F27** y **16R1525** (Saiki y *col.*, 1988) sintetizados por Pharmacia Biotech. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación se muestran en la tabla 9. La reacción fue preparada como sigue:

DNA-**x** µl, donde **x** es la cantidad de DNA que debemos añadir a la reacción. Añadiremos los µl necesarios en función de la concentración y pureza obtenidas para que la concentración final de DNA sea de 500ng; **Tampón**-10µl(Perkin-Elmer); **CL₂Mg**-4µl(Perkin-Elmer); **AmpliTaq**-2µl (AmpliTaqDNApolymerasse,PerkinElmer); **dNTPs**-1µl (Ultrapure DNTPs set, Pharmacia Biotech, cat 27-2035-01); **Oligont F(16SF27)**-20pmoles (1µl de una dilución 1:5

Material y métodos

de la concentración inicial de 100pmoles/ μ l); **OligontR**(16SR1525)-20pmoles (1 μ l de una dilución 1:5 de la concentración inicial de 100pmoles/ μ l); **Agua bidestilada**-79 μ l.

La temperatura de la reacción de polimerización en cadena fue de 55 °C, se realizó en un termociclador DNA Thermal cycle, modelo 48^a de Perkin Elmer.

Los productos de PCR se cargaron en un gel de 1,7% p/v de agarosa con 10 μ l de muestra para observar el resultado, junto con una cantidad de marcador fija. De esta manera se determinó la presencia del producto de PCR, su pureza y la cantidad aproximada del producto según la intensidad de las bandas que se comparan con el marcador. En el caso de observar arrastre de DNA, hay que purificar la banda, bien mediante una columna (QIA PCR CLEAN), por el método clásico de agarosa LMP (Low Melting point) o pasando la mezcla a través de columnas de Microcon-100 de Amicon, siguiendo las instrucciones que recomienda el fabricante.

-Secuenciación del fragmento obtenido por PCR una vez purificado.

En general, los oligonucleótidos utilizados en la secuenciación del gen del RNAr 16S para eubacterias son **16F357**, **16R519** y **16F945** (Lane, 1991; Fox y *col.*, 1992), sintetizados por Pharmacia Biotech. La tabla 9 muestra las secuencias de los oligonucleótidos utilizados.

La preparación de las muestras es fundamental para obtener un buen resultado en la secuenciación, hay que evitar que el DNA que esté contaminado con otros oligonucleótidos, con EDTA u otras sales que puedan interferir en el desarrollo de la PCR previa a la secuenciación.

Material y métodos

La secuencia parcial del gen del RNAr 16S purificado fue secuenciado en el **Servicio de Secuenciación del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada**, utilizando un secuenciador de DNA modelo ABI PRISM 3100 Avant GENETIC Analyzer, de acuerdo al método de Sanger *y col.* (1977).

La secuenciación parcial del gen del RNAr 16S de las cepas objeto de estudio, en un primer experimento se realizó con el oligonucleótido **16SR5195'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3'**. La secuencia de 500 pares de bases se puede considerar suficiente, para ubicar taxonómicamente las cepas secuenciadas y conocer la posición filogenética que ocupan respecto a cepas ya descritas (Patel, 2001; Rogall *y col.*, 1990; Patel *y col.*, 2000). Posteriormente se realizarían las secuenciaciones completas del gen del RNAr 16S de las cepas, que por los experimentos de hibridación se consideraran necesarios.

Tabla 9. Oligonucleótidos de amplificación y secuenciación del RNAr 16S de eubacterias.

Cebador	Secuencia (Orientación 5'- 3')	Referencia
16SF27	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	Amplificación Saiki <i>y col.</i> 1988
16SR1525	5'-AAGGAGGTGWTCARCC-3'	
16SF357	5'-CTCCTACGGGAGGCAGCA-3'	Secuenciación Lane, 1991 Fox <i>y col.</i> , 1992
16SR519	5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3'	
16SF945	5'-GGGCCCGCACAAAGCGGTGG-3'	

-Análisis filogenético basado en las secuencias del gen del RNAr 16S.

Las secuencias parciales, en primer lugar y las totales, en un paso posterior, del gen del RNAr 16S se analizaron en la base de datos **NCBI (National Center for Biotechnology Information)**, donde el alineamiento global mediante **BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)** relaciona las secuencias del gen del RNAr 16S de un microorganismo problema con las secuencias del gen RNAr 16S ya depositadas e identificadas (Altschul *y col.*, 1990; 1998).

Para el análisis filogenético comparativo de todas las cepas objeto de estudio, se utilizaron las secuencias del gen del RNAr 16S de los diferentes *Bacillus* válidamente descritos y relacionados filogenéticamente con nuestras cepas (Forsyth y col., 1998; Jeon y col., 2005; Ventosa y col., 2005; Vargas y col., 2005; Yoon y Oh, 2005; Olivera y col., 2005; Romano y col., 2005; Yumoto y col., 2005). Los datos de las secuencias fueron obtenidas desde las bases de datos **NCBI** mediante su número de acceso y se pueden observar en la tabla 10.

Tabla 10. N° de acceso a las secuencias del gen del RNAr 16S de las especies de colección con las que se construye el árbol filogenético.

Especie bacteriana	N° Colección de cultivo	N°Acceso 16SRNA-Base de datos
<i>Bacillus subtilis</i>	NCDO 1769	X60646
<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580	X68416
<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 7061	X60637
<i>Bacillus flexus</i>	ATCC 49695	AB021185
<i>Bacillus fastidiosus</i>	ATCC29604	X60615
<i>Bacillus thuringiensis</i>	ATCC 10792	AF290545
<i>Bacillus mojavenis</i>	DSM 9205	AB022291
<i>Salibacillus halophila</i>	NCIMB 9251	X62174
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	ATCC 842	AJ320493
<i>Bacillus sonorensis</i>	NRRL B-23154	AF302118
<i>Bacillus cereus</i>	NCDO 1771	X55060
<i>Bacillus megaterium</i>	ATCC 14581	X60629
<i>Bacillus lentus</i>	ATCC10840	X60601
<i>Bacillus firmus</i>	ATCC14575	X60616
<i>Bacillus circulans</i>	ATCC 4513	Y13065
<i>Bacillus halmapalus</i>	DSM 8723 ¹	AB126575
<i>Virgibacillus marismortui</i>	ATCC 700626 ¹	AY505533
<i>Bacillus haloalkaliphilus</i>	DSM 5271	AJ238041
<i>Bacillus halophilus</i>	ATCC 49085	AJ243920
<i>Bacillus litoralis</i>	DSM 10405 ¹	X945581
<i>Bacillus oshimensis</i>	NCIMB 14023	AB188090
<i>Bacillus bogoriensis</i>	ATCC BAA-922 ¹	AY376312
<i>Bacillus patagoniensis</i>	ATCC BAA-965	AY258614
<i>Bacillus alcalophilus</i>	ATCC 27647	X76436
<i>Bacillus saliphilus</i>	ATCC BAA-957	AJ493660
<i>Bacillus halodurans</i>	ATCC 27557	AJ302709

Se realizó un alineamiento múltiple con las secuencias parciales del gen del RNAr 16S de las cepas seleccionadas utilizando el programa **MEGA 3.1** (Kumar y col., 2004), mediante

Material y métodos

ClustalW (1,6) (Chenna y *col.*, 2003; Thompson y *col.*, 1997). La reconstrucción filogenética se realizó utilizando el método **neighbour-joining** (Saito y Nei, 1987) y el modelo **Jukes-Cantor** (1969). Las distancias y el agrupamiento se determinaron con el método de máxima parsimonia usando el valor bootstrap basado en 1000 replicaciones.

Se obtuvo el árbol de secuencias parciales del gen del RNAr 16S de las cepas de este estudio relacionadas con las secuencias parciales RNAr 16S de los microorganismos de referencia con los que presentaban porcentajes de similitud de hasta el 95%, para tener información de la situación taxonómica de cada una de las cepas. Posteriormente, se secuenció el fragmento de 1.500 pares de bases de la secuencia del gen del RNAr 16S de cada una de las cepas que fueron consideradas nuevas especies por los resultados de los experimentos de hibridación realizados, que se explicarán en el siguiente apartado. Las secuencias completas del gen del RNAr 16S tanto de las de las cepas de colección y como de las nuevas especies propuestas también fueron alineadas, obteniendo el correspondiente árbol filogenético.

III.3.2.4. Hibridación DNA-DNA.

Mediante esta técnica se determina el grado de similitud de DNA-DNA entre las cepas estudiadas y las cepas de colección descritas más próximas, es la prueba definitiva y confirmativa, porque en ella se compara todo el genoma de las cepas. La técnica de hibridación utilizada en este trabajo fue la propuesta por Ziemke y *col.* (1998) que se describe a continuación.

A- Marcaje del DNA

Se utilizó el método enzimático de Nick Translation Kit (Boehringer cat. 976776). El objetivo es realizar un doble marcaje con digoxigenina y con biotina. La mezcla de nucleótidos

Material y métodos

se estructuró de acuerdo a la siguiente proporción: 3 vol. de dATP; 3 vol. de dGTP; 3 vol de dCTP; 1 vol de digUTP: 0,75 vol de digoxigenina y 0,25 vol de biotina.

El marcaje se realizó en tubos de 1,5 ml para microcentrífuga, el volumen final de la reacción es de 10 μ l. Se agregó a cada muestra: 0,5 μ g de DNA para marcar (cuantificado a 0,3 μ g/ μ l), 5 μ l de la mezcla de nucleótidos, 1 μ l de tampón, 1 μ l de enzima (mezcla enzimática contenida en el Nick Translation Kit) y se completó con agua bidestilada hasta 10 μ l. La reacción se incubó a 15 °C durante 90 minutos para que se produjera el marcaje del DNA.

-Precipitación del DNA- Para precipitar el DNA marcado se agregó a la reacción: 390 μ l de agua bidestilada; 45 μ l de acetato de sodio 3M pH 5,2; 890 μ l volúmenes de etanol a -20 °C. Se dejó durante 30 minutos a -70 °C, o toda la noche a -20 °C. Para concentrar el DNA, se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Después, se lavó con etanol 70% v/v, volviéndose a centrifugar 15 minutos a 13.000 rpm descartándose de nuevo el sobrenadante y los restos de etanol se dejaron secar a temperatura ambiente. Una vez eliminados, se resuspendió el DNA en 100 μ l de agua bidestilada.

-Comprobación del marcaje- La comprobación del marcaje se realizó en microplacas de estreptavidina (Streptavidin-Coated Microtiter plates, Boehringer cat. 1645692). A cada pocillo se agregaron 200 μ l de tampón fosfato 0,14M y 0,2% SDS pH 6,8; 5 μ l de albúmina al 4% p/v y 1 μ l de DNA marcado y previamente desnaturalizado (10 minutos a 100 °C, y colocado en hielo inmediatamente para evitar la renaturalización). Se incubó a temperatura ambiente y con agitación constante durante 1 hora.

-Detección del marcaje- Transcurrida la hora de incubación, se eliminó la muestra de los pocillos de la microplaca y se lavó tres veces con tampón 1. La última vez, los pocillos, han de secarse muy bien, dejándolos volteados sobre un papel de filtro. Una vez secos se adicionaron

Material y métodos

200µl por pocillo de solución de detección. Se volvió a incubar 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante.

Solución de detección: 5ml de **Tampón 1**; 0,5 % p/v de albúmina; 1µl de Anti-Digoxigenin-AP, fragments (Boehringer, cat 1093274).

Tampón 1: (0,15M NaCl y 0,1M de Ac. maleico): NaCl-4,3g; Ac. Maleico-5.8g; NaOH-4,015g; Agua desionizada 500ml.pH 7,5; autoclavar y guardar a 4 °C. Es una solución extemporánea, se preparó la cantidad necesaria en cada caso.

-Revelado- Después de eliminar la solución de detección de los pocillos, se lavaron tres veces con **tampón 1** y se secaron del modo anteriormente descrito. Se agregaron 250µl de solución de revelado y se procedió a la lectura de la absorbancia a 405nm en un lector de ELISA. Inmediatamente, se incubó la microplaca a 37 °C durante 30 minutos, pasado este tiempo se volvió a leer la densidad óptica. Aproximadamente a las 3 horas de incubación, se obtienen los valores óptimos de lectura.

Para el revelado se utilizó una solución que se preparó en el momento de ser utilizada. Se debe calcular la cantidad que se necesita, de acuerdo al número de pocillos para preparar esta cantidad exacta.

Solución de revelado: 5ml de **Tampón 2**; 5ml de agua desionizada; 3,5µl de MgCl₂ 3M (0,1mg/ml); 10mg de p-nitrofenil fosfato (Sigma, cat 9389).

Tampón 2: NaCO₂-1,59 g; NaHCO₃-2,93 g; cps agua desionizada para 1000ml, pH 9,6. Guardar un máximo de 15 días a 4 °C.

B-Hibridación.

Se realizó en tubos para PCR de 0,5 ml, a 30 °C menos que la T_m de las cepas en estudio. Se mezclaron 15µg de DNA (purificado y cuantificado a una concentración aproximada de 0,3 µg/µl); 8µl de DNA marcado (se pueden utilizar entre 4 y 12µl de DNA) y agua bidestilada suficiente para completar 72µl de muestra. Las muestras se desnaturalizaron durante 10 minutos a 100 °C, luego se depositaron en un baño de agua-hielo para impedir la renaturalización y se agregaron 28µl de tampón fosfato 1M. Para evitar la evaporación, las muestras se sellaron con unas gotas de aceite mineral (Sigma cat M-3516). Se dejaron

Material y métodos

hibridando durante **16 horas** en baño de agua a 30 °C menos que la T_m. Las muestras hibridadas se traspasaron a tubos de 1,5 ml para microcentrífuga, eliminando previamente el aceite mineral. Para esto se extrajo cuidadosamente la capa de aceite con micropipeta y la muestra se deslizó sobre un trozo de parafilm para eliminar los restos de aceite. Posteriormente, se recogió con micropipeta y se depositó en un eppendorf limpio.

-Purificación de las cadenas- La separación de las cadenas simples y cadenas dobles de DNA se realizó utilizando como soporte **hidroxiapatito** (Hidroxyapatite, Bio-Rad Cat 130-0520). Los ácidos nucleicos se unen a la hidroxiapatito por interacción de los grupos fosfato, de las bases del polinucleótido y los residuos de calcio en la resina. Los ácidos nucleicos pueden ser eluidos en tampón fosfato a temperaturas elevadas (60 °C). Las cadenas dobles de ácidos nucleicos se unen más fuerte al hidroxiapatito que las cadenas simples y son eluidas a concentraciones de fosfato más altas. Normalmente, las **cadenas simples** de DNA eluyen a concentraciones de fosfato sódico (pH 6,8) ente **0,14M y 0,16M** y el DNA de **doble cadena** es liberado a concentraciones de fosfato superiores a **0,36 M**.

Para **equilibrar el hidroxiapatito**, se preparó la cantidad necesaria a una concentración de 1g/10ml de agua bidestilada, se homogenizó, moviéndolo cuidadosamente para evitar la desestabilización del hidroxiapatito, se repartió en alícuotas de 1 ml en tubos de 1,5 ml para microcentrífuga. Se centrifugaron durante 1 minuto a 13.000 rpm, se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml de tampón fosfato 0,14M y 0,2% p/v SDS, se agitó cuidadosamente con la pipeta y se centrifugó de nuevo manteniendo las condiciones anteriores, nuevamente se descartó el sobrenadante y este proceso se repitió dos veces más. Finalmente, el hidroxiapatito se resuspendió en 1ml de tampón fosfato 0,14M y 2% p/v SDS, se volvió a resuspender con la pipeta y se repartió en alícuotas de 200µl (en tubos de 1,5ml). Cada alícuota se centrifugó en condiciones similares descartando el sobrenadante. Se

Material y métodos

recomienda equilibrar la cantidad necesaria de hidroxiapatito en el momento en que vaya a ser utilizado.

a)Cadenas simples- Se midieron los microlitros de muestra hibridada, incluida en tampón fosfato 0,28M y se agregó igual cantidad de agua bidestilada, para obtener una concentración de tampón fosfato de 0,14M.

De cada muestra se tomaron dos alícuotas de 50 μ l y se depositaron en dos tubos de 1,5ml con hidroxiapatito equilibrado. Los 50 μ l de muestra se mezclaron cuidadosamente con hidroxiapatito y se incubaron durante 15 minutos a una temperatura 35 °C menor que la T_m, de esta manera el DNA se unió al hidroxiapatito. Posteriormente, los tubos se centrifugaron durante 1 minuto a 13.000 rpm y se recuperaron los los 50 μ l de sobrenadante, que contiene las cadenas simples.

El hidroxiapatito se volvió a lavar dos veces con tampón fosfato 0,14M y 0,2% p/v SDS primero con 450 μ l y luego con 500 μ l. En ambos casos se repitió el mismo procedimiento, de agitación y mezcla de hidroxiapatito con el tampón para liberar las cadenas simples. Se incubó durante 5 minutos a una temperatura 35 °C menor que T_m y recuperación del sobrenadante, que contendrá las cadenas simples. De este modo se obtienen dos tubos eppendorf con 1000 μ l (50+450+500) de tampón fosfato 0,14M y 0,2% p/v SDS con las cadenas libres no hibridadas. El hidroxiapatito queda con las cadenas dobles hibridadas adheridas.

b)Cadenas dobles- Para liberar las cadenas dobles, el hidroxiapatito fue lavado con 200 μ l de tampón fosfato 0,4M. La muestra se agitó cuidadosamente y se centrifugó 1 minuto a 13.000 rpm. El sobrenadante fue recuperado en un nuevo tubo eppendorf, este procedimiento se repitió dos veces de manera que al final se obtuvieron dos tubos cada uno con 400 μ l de tampón que contenía las cadenas dobles hibridadas.

-Preparación del patrón de DNA- El patrón se preparó con 4 μ l de DNA marcado en 800 μ l de tampón fosfato 0,14M y 0,2% p/v SDS. A partir de ahí, se realizaron 7 diluciones seriadas tomando cada vez 400 μ l de muestra y depositándola en otro tubo con 400 μ l de tampón fosfato 0,14M y 0,2% p/v SDS.

-Determinación de la concentración de DNA marcado utilizado como patrón- Para obtener la recta patrón del DNA marcado, que nos permitirá saber la concentración en pg de las cadenas simples y dobles de cada muestra, es necesario determinar los pg de DNA de la muestra patrón. El DNA marcado, que está a una concentración de 0,5 μ g/ μ l, se resuspendió en 100 μ l de agua bidestilada, por lo tanto, por cada μ l había 5x10⁻³ μ g/ μ l de DNA marcado, de esta dilución, se tomaron 4 μ l y se volvieron a diluir en 800 μ l de tampón fosfato 0,14M 0,2% p/v SDS para la preparación de la muestra patrón. De esta manera tenemos 0,02 μ g (20ng) de DNA marcado en 800 μ l de tampón. La primera dilución de la muestra patrón que contiene el DNA marcado, contenía una concentración de 0,025ng/ μ l. Finalmente, de ésta dilución, se tomaron 200 μ l para depositar en los pocillos de la microplaca, por lo que la concentración real era de 5ng/ μ l, que expresado en pg correspondería a 5000pg. A partir de esta muestra se fueron diluyendo a la mitad, obteniéndose los demás valores.

-Lectura de ELISA- Se utilizó un lector de ELISA (Microplate Reader de Behring El 311), la lectura fue realizada a una longitud de onda de 405nm. Las muestras se colocaron por duplicado en los pocillos, 200 μ l de cadena simple y 200 μ l de cadena doble. Se distribuyeron varios blancos en distintas posiciones de la placa, que contenían 200 μ l de tampón fosfato 0,14M y 0,2% p/v SDS. A cada pocillo de la microplaca se agregó, además, 5 μ l de una solución de albúmina al 4% p/v (quedando, ésta al 1% v/v). La solución de albúmina se utilizó como bloqueante.

Material y métodos

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

-Cálculo de la concentración de DNA hibridado- Los valores de densidad óptica obtenidos en la microplaca fueron convertidos en concentración de DNA expresada en pg. Para esto, se realizó una recta patrón de regresión con los valores del patrón que contenía sólo el DNA marcado. Con los valores de la recta se determina la concentración de DNA para cada muestra.

-Tratamiento de los datos de hibridación- Los datos de las reasociaciones homólogas y heterólogas obtenidas a 405nm en el lector de ELISA, se procesaron simultáneamente. El cálculo del porcentaje de las cadenas apareadas o **grado de reasociación BR** (Binding Ratio), se expresó como el porcentaje del DNA marcado liberado con 0,4M de tampón fosfato (cadenas dobles), comparado con el total de DNA marcado liberado (suma de cadenas simples y cadenas dobles). La **tasa de unión relativa de DNA heterólogo (RBR)** se expresó como el porcentaje de los heterólogos, relativo al 100% BR que se debe al homólogo.

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

RBR= $100 \times \text{BR heterólogo} / \text{BR Homólogo}$.

-Tratamiento estadístico de los resultados- Los valores de cada muestra se obtuvieron por duplicado, calculando la desviación estándar de la unión relativa, valor que nos indica si la técnica se ha realizado correctamente.

III.3.2.5. Análisis RAPD (Random amplification of polymorphic DNA).

El análisis RAPD (Random amplification of polymorphic DNA) es una poderosa técnica de huella molecular que se usa para producir perfiles genómicos de las cepas microbianas objeto de estudio, superando las dificultades encontradas como consecuencia del uso de los métodos fenotípicos clásicos aislados. Esta técnica puede constituir un elemento complementario para la distinción entre especies estrechamente relacionadas. Se utiliza la PCR para la amplificación de fragmentos de DNA con un oligonucleótido de secuencia arbitraria y de baja temperatura de anillamiento, que genera fragmentos de diferentes tamaños mediante hibridación con las regiones compatibles del genoma (Seppola y *col.*, 2006).

Los perfiles de RAPD (Random amplification of polymorphic DNA) se obtuvieron de acuerdo al protocolo descrito por Tailliez y *col.* (1998) con el oligonucleótido seleccionado **OIB08** (5-GTCCACACGG-3). La amplificación fue realizada en un GeneAmp PCR system 2400 (Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, Conn.), usando de 20 a 100nmol de DNA cromosómico de las bacterias objeto de estudio como diana. La mezcla de la reacción contenía, además, 1,5nmol de MgCl₂/l; 2μmol de oligonucleótido/L; 7,5U de DNA polimerasa (AmpliTaq; Appligène, Strasbourg, France); 200μmol de cada dNTP/L; y 10mmol de Tris-HCl (pH 9,0)/L en un volumen final de 100μl. Las condiciones usadas para la reacción de amplificación (30 ciclos) fueron: la desnaturalización, se llevó a cabo durante un minuto a 94 °C; 36 °C para el anillamiento durante 2 minutos; 72 °C para la polimerización durante 2 minutos.

El análisis y la comparación de los perfiles de RAPD se llevaron a cabo a partir de una fracción de 20μl de producto de PCR, separados por electroforesis en gel de agarosa del 1% en Tris-Borato-EDTA junto a un marcador de peso molecular (2000-50 pb-Amplisize de Biorad). Cada gel, contenía los productos de PCR de las muestras objeto de estudio y un marcador. El gel teñido con bromuro de etidio se visualizó con luz ultravioleta. El análisis bioinformático de

Material y métodos

los perfiles se realizó mediante el programa GelCompare II versión 4,0 (Window 98, Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Este programa permite la normalización de los patrones de electroforesis compensando las mínimas diferencias de migración. Calcula mediante el **coeficiente Pearson** la semejanza entre los perfiles de cada cepa y agrupa dichos perfiles utilizando el método aritmético **UPGMA** generando un dendrograma (Vauterin y Vauterin, 1992).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

IV.1. RECUENTO DE BACTERIAS TOTALES.

Los resultados de los recuentos realizados a cada muestra a las 48 horas y a la semana, se expresan como unidades formadoras de colonias por ml (ufc/ml) y se recogen en las tablas 11 y 12, respectivamente.

Los medios utilizados para el recuento de los microorganismos son los descritos en material y métodos, medio **MH** a concentraciones de sal entre 0% y 30% p/v, un medio general **TSA** (Tryptosa Soja Agar) y **Sabouraud-Chloranphenicol**, medio específico para hongos.

Tabla 11. Recuento de microorganismos a las 48h. Expresado como ufc/ml.

Punto Toma	TSA	MH 0%*	MH 3%*	MH 5%*	MH 10%*	MH 15%*	MH 20%*	MH 25%*	MH 30%*	SAB
E ₃₀	4,9·10 ²	>300	8,8·10 ³	2,1·10 ²	2,2·10 ²	1,6·10 ²	1,8·10 ²	nc**	nc**	56
E ₅₅	1,3·10 ²	nc**	7·10 ⁵	2,6·10 ²	2,1·10 ²	2·10 ²	1,3·10 ²	nc**	nc**	13
I ₃₀	6,9·10 ⁷	1,4·10 ⁵	2,9·10 ⁷	2·10 ⁷	1,1·10 ⁷	1·10 ⁶	2,4·10 ⁹	1	nc**	6,3·10 ⁴
N ₃₀	8,9·10 ⁸	2,1·10 ⁶	1,7·10 ⁸	7,8·10 ⁸	2,3·10 ⁷	1,2·10 ⁷	6,3·10 ⁹	1	nc**	56
V ₃₀	2,3·10 ⁸	8,9·10 ³	2,2·10 ⁹	9,2·10 ⁸	2,7·10 ⁹	1,5·10 ⁹	3,3·10 ⁹	2	nc**	13

*(%-p/v). **nc.no crecimiento.

Tabla 12. Recuento de microorganismos a los 7 días semana. Expresado como ufc/ml.

Punto Toma	TSA	MH 0%*	MH 3%*	MH 5%*	MH 10%	MH 15%*	MH 20%	MH 25%*	MH 30%*	SAB
E ₃₀	5,9·10 ²	>300	9,2·10 ³	1·10 ³	2,8·10 ²	1,8·10 ²	1,8·10 ²	nc**	nc**	70
E ₅₅	1,6·10 ²	6,6·10 ⁷	6,3·10 ⁶	5,6·10 ³	1,6·10 ³	2,1·10 ²	1,3·10 ²	nc**	nc**	16
I ₃₀	7,3·10 ⁷	1,8·10 ⁸	3,9·10 ⁷	2,8·10 ⁷	3,1·10 ⁷	9,4·10 ⁶	2,4·10 ⁹	1	nc**	7·10 ⁴
N ₃₀	>300	2,8·10 ⁶	4,2·10 ⁸	7,8·10 ⁸	2,3·10 ⁷	2,6·10 ⁷	6,3·10 ⁹	1	nc**	56
V ₃₀	3,3·10 ⁸	1,3·10 ⁷	2,2·10 ⁹	1,1·10 ⁹	3,3·10 ⁹	1,8·10 ⁹	3,3·10 ⁹	2	nc**	16

*(%-p/v). **nc.no crecimiento

El trabajo iniciado con el muestreo de cuatro zonas, dos de ellas son áreas por las que circula el residuo antes de pasar a las dos siguientes, donde es acumulado. Las características de los puntos de muestreo se explicaron en el apartado III.1. Muestreo y aislamiento de las

Resultados y discusión

cepas de Material y métodos: 1-**Entrada (E)**, 2-**A pie de tubería (I)**, 3-**Balsa Nueva (N)**, 4-**Balsa Vieja (V)**. Las muestras se procesaron siguiendo la técnica descrita en material y métodos y en los medios indicados en este apartado. La elección de los medios se realizó teniendo en cuenta las condiciones descritas en la bibliografía sobre el líquido, pero sin tener referencias de los microorganismos cultivables que existen en el residuo. Teniendo en cuenta la salinidad de la salmuera, que se encuentra entre 10% p/v-11% p/v de ClNa, al inicio de la fermentación (Fernández-Díez y col., 1985) y durante la fase de conservación, que es de 8,5% p/v-9,5% p/v de ClNa (González-Cancho y Durán-Quintana, 1980; El-Makhzangy y Abdel-Rhman, 1999) realizamos una búsqueda utilizando medios de diferentes concentraciones de sal. La temperatura de elección fue de 30 °C. Las muestras procedentes de la Entrada, al ser éste un punto en el que la temperatura, puede alcanzar valores de hasta 60 °C, se incubaron, además, a 55 °C.

Los resultados preliminares obtenidos están de acuerdo con los de Romero y col. (2001), porque encontraron una alta concentración de microorganismos en este residuo, pero en el estudio mencionado no fueron caracterizados taxonómicamente. En función de la zona de muestreo (Tablas 11 y 12), no se observan diferencias apreciables entre el recuento a las 48 horas y a los 7 días. Sólo cabe destacar la ausencia de microorganismos en las placas de la Entrada incubadas a 55 °C y con una concentración de sal del 0% p/v, a las 48 horas y, sin embargo, a los 7 días, el número de microorganismos es similar a las demás áreas. Se podría considerar que los microorganismos que crecen necesitan un periodo de adaptación a las nuevas condiciones de cultivo.

El mayor recuento de microorganismos se produce en la Entrada a 30 °C y al 0% p/v de sal y en la Balsa Nueva en medio TSA. En general los mayores recuentos de microorganismos se encontraron en la Balsa Nueva y Balsa Vieja y entre las concentraciones de sal del 3% p/v y 20% p/v, seguido del recuento A pie de tubería, donde se incrementa el número de microorganismos recontados a medida que aumenta la concentración de sal. Ocurre

Resultados y discusión

lo contrario en la entrada que disminuye el recuento con el incremento en la concentración de sal.

La concentración de sal máxima de la que se aíslan microorganismos es del 25% p/v, aunque el número es bajo encontrando una colonia A pie de tubería y en la Balsa Nueva y dos en la Balsa Vieja. Fue nulo el crecimiento de microorganismos al 30% en las cuatro áreas de muestreo. Algunas de las bacterias incubadas a 30 °C y crecidas en medios con un 20% p/v de concentración salina tienen dificultades para crecer y tras sucesivas resiembras no consiguieron mantenerse y se perdieron. Se podría decir que son bacterias que resisten condiciones extremas de sal, pero no es su hábitat natural y probablemente ante estas condiciones extremas pasan a una forma de latencia esperando a que estas condiciones desaparezcan. Las colonias pertenecientes a la Entrada cultivadas a 55 °C presentan crecimiento al 20% de concentración salina sin dificultad, tolerando las condiciones de salinidad impuestas.

La cantidad de mohos y levaduras no fue significativa sólo A pie de tubería el número de microorganismos que se recuentan es considerable.

La presencia de microorganismos del género *Lactobacillus* no fue investigada por la composición altamente contaminante de los vertidos (González y col., 1994; Rejano-Navarro y col., 1986; Brenes y Castro, 2001), la alta concentración de materia orgánica, la presencia de amonio, que es letal para los microorganismos, el pH alto, inhibe el crecimiento de estos microorganismos (Castro y col, 2001) y los polifenoles presentes en las aguas residuales también tienen efecto inhibitorio de los microorganismos (Pazzini y col., 1960; Shasha y Leibowitz, 1961; Limiroli y col., 1995). Teniendo en cuenta que los lactobacilos necesitan requerimientos específicos para vivir procedentes de las salmueras que les son proporcionados por las levaduras, el déficit existente de estos factores en los residuos de las aceitunas vertidos por la industria, junto con los contaminantes y el alto pH, hacen que el crecimiento y la supervivencia de estas cepas se encuentre profundamente afectada (Ruíz-Barba y Jiménez-

Díaz, 1995). Por estas razones, no nos planteamos la búsqueda de microorganismos pertenecientes al género *Lactobacillus*. Los microorganismos anaerobios no fueron nuestro objetivo, porque la recogida de muestras se realizó en zonas aéreas expuestas al oxígeno. Pretendíamos encontrar cepas que fueran capaces de sobrevivir en dichos ambientes hostiles, sin requerimientos específicos y sin exigencias ambientales.

IV.2. SELECCIÓN DE CEPAS Y PROCEDENCIA DE LAS CEPAS SELECCIONADAS.

Nuestro equipo planteó la posible utilización de este residuo como un medio de búsqueda de microorganismos capaces de desarrollarse en el mismo, junto con el estudio de sus características y propiedades como microorganismos capaces de producir sustancias de interés industrial, puesto que ya existen estudios en los que se utilizan residuos de la industria del aceite de oliva (Aguilera y col., 2001), residuos de la industria del vino (Petre y col., 2001), residuos agrícolas (Ikran-ul-haq y col., 2005) y de la industria textil (Poubabae y col., 2006) en los que crecen microorganismos con aplicación biorremediadora a los problemas de contaminación causados por los residuos de las distintas industrias.

En nuestro conocimiento no se ha realizado ningún estudio de taxonomía sobre la microbiología del líquido residual de las aceitunas de mesa elaboradas según el estilo español. Hasta el momento sólo existe el estudio realizado por Ntougias y Russell (2001), en el que se describen tres nuevas especies propuestas en un nuevo género, *Alkalibacterium*, procedentes de las aguas de lavado de las aceitunas de mesa según el procesado griego. Otro estudio relacionado es el de Baltsouras (1985), quien estudió la taxonomía y fisiología de las bacterias del ácido láctico que estaban presentes en la salmuera durante la fermentación. Las muestras de nuestro estudio contienen una mezcla del conjunto de residuos generados en cada uno de los pasos del proceso de elaboración de las aceitunas de mesa según el estilo español y no tenemos conocimiento de que exista ningún estudio previo de taxonomía de este vertido. De

Resultados y discusión

esta manera, en un futuro se contribuirá a la resolución de parte del problema, proponiendo la revalorización del residuo.

La elección de las cepas objeto de este estudio taxonómico polifásico, se realizó teniendo en cuenta que las colonias presentasen características específicas en cuanto a la **morfología** colonial, **tamaño**, producción de **colonias mucosas**, crecimiento a **altas temperaturas** y concentraciones de **sal** y si presentaban o no, **pigmentación**.

Se seleccionaron un total de 185 cepas para el estudio taxonómico de las que **172** fueron Gram-positivas, frente a otras 13 Gram-negativas. Descartamos las cepas Gram-negativas por considerar que el número no era representativo, quedándonos, para realizar el trabajo con las Gram-positivas. Las cepas seleccionadas se describen en la tabla 13. En dicha tabla, se indica el lugar y el medio del que han sido aisladas cada uno de los microorganismos que serán posteriormente estudiados en el estudio de taxonomía polifásica, así como el nombre asignado a cada una de ellas.

Tabla 13. Relación de las 172 cepas seleccionadas, procedencia y nombre asignado.

Colonia	Procedencia	Medio aislamiento	Nombre de cepa
1	Entrada ₃₀	TSA	E₃₀-1
2	Entrada ₃₀	MH 15 %	E₃₀-2
3	Entrada ₃₀	MH 15%	E₃₀-3
4	Entrada ₃₀	MH 15%	E₃₀-4
5	Entrada ₃₀	MH 15%	E₃₀-5
6	Entrada ₃₀	MH 15%	E₃₀-6
7	Entrada ₃₀	MH 15%	E₃₀-7
8	Entrada ₃₀	MH 15%	E₃₀-8
9	Entrada ₃₀	MH 10%	E₃₀-9
10	Entrada ₃₀	MH 10%	E₃₀-10
11	Entrada ₃₀	MH 5%	E₃₀-11
12	Entrada ₃₀	MH 5%	E₃₀-12

Tabla 13. Relación 172 cepas seleccionadas, procedencia y nombre asignado (continuación).

Colonia	Procedencia	Medio aislamiento	Nombre de cepa
13	Entrada ₃₀	MH 5%	E ₃₀ -13
14	Entrada ₃₀	MH 5%	E ₃₀ -14
15	Entrada ₃₀	MH 5%	E ₃₀ -15
16	Entrada ₃₀	MH 5%	E ₃₀ -16
17	Entrada ₃₀	MH 5%	E ₃₀ -17
18	Entrada ₃₀	MH 5%	E ₃₀ -18
19	Entrada ₃₀	MH 5%	E ₃₀ -19
20	Entrada ₃₀	MH 5%	E ₃₀ -20
21	Entrada ₃₀	MH 5%	E ₃₀ -21
22	Entrada ₃₀	MH 5%	E ₃₀ -22
23	Entrada ₃₀	MH 5%	E ₃₀ -23
24	Entrada ₃₀	MH 3%	E ₃₀ -24
25	Entrada ₃₀	MH 3%	E ₃₀ -25
26	Entrada ₃₀	MH 3%	E ₃₀ -26
27	Entrada ₃₀	MH 3%	E ₃₀ -27
28	Entrada ₃₀	MH 0%	E ₃₀ -28
29	Entrada ₃₀	MH 0%	E ₃₀ -29
30	Entrada ₃₀	MH 5%	E ₃₀ -30
31	Entrada ₅₅	TSA	E ₅₅ -31
32	Entrada ₅₅	TSA	E ₅₅ -32
33	Entrada ₅₅	TSA	E ₅₅ -33
34	Entrada ₅₅	TSA	E ₅₅ -34
35	Entrada ₅₅	TSA	E ₅₅ -35
36	Entrada ₅₅	MH 15%	E ₅₅ -36
37	Entrada ₅₅	MH 15%	E ₅₅ -37
38	Entrada ₅₅	MH 15%	E ₅₅ -38
39	Entrada ₅₅	MH 10%	E ₅₅ -39
40	Entrada ₅₅	MH 10%	E ₅₅ -40
41	Entrada ₅₅	MH 10%	E ₅₅ -41
42	Entrada ₅₅	MH 10%	E ₅₅ -42
43	Entrada ₅₅	MH 10%	E ₅₅ -43
44	Entrada ₅₅	MH 10%	E ₅₅ -44
45	Entrada ₅₅	MH 10%	E ₅₅ -45
46	Entrada ₅₅	MH 10%	E ₅₅ -46
47	Entrada ₅₅	MH 5%	E ₅₅ -47
48	Entrada ₅₅	MH 5%	E ₅₅ -48
49	Entrada ₅₅	MH 5%	E ₅₅ -49
50	Entrada ₅₅	MH 5%	E ₅₅ -50
51	Entrada ₅₅	MH 5%	E ₅₅ -51
52	Entrada ₅₅	MH 5%	E ₅₅ -52
53	Entrada ₅₅	MH 3%	E ₅₅ -53
54	Entrada ₅₅	MH 3%	E ₅₅ -54

Tabla 13. Relación 172 cepas seleccionadas, procedencia y nombre asignado (continuación).

Colonia	Procedencia	Medio aislamiento	Nombre de cepa
55	Entrada ₅₅	MH 3%	E ₅₅₋₅₅
56	Entrada ₅₅	MH 3%	E ₅₅₋₅₆
57	Entrada ₅₅	MH 3%	E ₅₅₋₅₇
58	Entrada ₅₅	MH 0%	E ₅₅₋₅₈
59	Entrada ₅₅	MH 0%	E ₅₅₋₅₉
60	Entrada ₅₅	MH 0%	E ₅₅₋₆₀
61	Entrada ₅₅	MH 0%	E ₅₅₋₆₁
62	Entrada ₅₅	MH 0%	E ₅₅₋₆₂
63	Entrada ₅₅	MH 20%	E ₅₅₋₆₃
64	Entrada ₅₅	MH 20%	E ₅₅₋₆₄
65	Entrada ₅₅	MH 20%	E ₅₅₋₆₅
66	Entrada ₅₅	MH 20%	E ₅₅₋₆₆
67	A pie de Tubería	TSA	I ₃₀₋₆₇
68	A pie de Tubería	TSA	I ₃₀₋₆₈
69	A pie de Tubería	TSA	I ₃₀₋₆₉
70	A pie de Tubería	TSA	I ₃₀₋₇₀
71	A pie de Tubería	TSA	I ₃₀₋₇₁
72	A pie de Tubería	TSA	I ₃₀₋₇₂
73	A pie de Tubería	TSA	I ₃₀₋₇₃
74	A pie de Tubería	TSA	I ₃₀₋₇₄
75	A pie de Tubería	TSA	I ₃₀₋₇₅
76	A pie de Tubería	TSA	I ₃₀₋₇₆
77	A pie de Tubería	TSA	I ₃₀₋₇₇
78	A pie de Tubería	TSA	I ₃₀₋₇₈
79	A pie de Tubería	TSA	I ₃₀₋₇₉
80	A pie de Tubería	TSA	I ₃₀₋₈₀
81	A pie de Tubería	TSA	I ₃₀₋₈₁
82	A pie de Tubería	TSA	I ₃₀₋₈₂
83	A pie de Tubería	MH 15%	I ₃₀₋₈₃
84	A pie de Tubería	MH 15%	I ₃₀₋₈₄
85	A pie de Tubería	MH 15%	I ₃₀₋₈₅
86	A pie de Tubería	MH 5%	I ₃₀₋₈₆
87	A pie de Tubería	MH 5%	I ₃₀₋₈₇
88	A pie de Tubería	MH 5%	I ₃₀₋₈₈
89	A pie de Tubería	MH 5%	I ₃₀₋₈₉
90	A pie de Tubería	MH 3%	I ₃₀₋₉₀
91	A pie de Tubería	MH 3%	I ₃₀₋₉₁
92	A pie de Tubería	MH 3%	I ₃₀₋₉₂
93	A pie de Tubería	MH 3%	I ₃₀₋₉₃
94	A pie de Tubería	MH 3%	I ₃₀₋₉₄
95	A pie de Tubería	MH 3%	I ₃₀₋₉₅
96	A pie de Tubería	MH 0%	I ₃₀₋₉₆

Tabla13. Relación 172 cepas seleccionadas, procedencia y nombre asignado (continuación).

Colonia	Procedencia	Medio aislamiento	Nombre de cepa
97	A pie de Tubería	MH 0%	I ₃₀ -97
98	A pie de Tubería	MH 0%	I ₃₀ -98
99	A pie de Tubería	MH 0%	I ₃₀ -99
100	A pie de Tubería	MH 0%	I ₃₀ -100
101	A pie de Tubería	MH 20%	I ₃₀ -101
102	A pie de Tubería	MH 20%	I ₃₀ -102
103	Balsa Nueva	TSA	N ₃₀ -103
104	Balsa Nueva	TSA	N ₃₀ -104
105	Balsa Nueva	TSA	N ₃₀ -105
106	Balsa Nueva	TSA	N ₃₀ -106
107	Balsa Nueva	TSA	N ₃₀ -107
108	Balsa Nueva	TSA	N ₃₀ -108
109	Balsa Nueva	TSA	N ₃₀ -109
110	Balsa Nueva	TSA	N ₃₀ -110
111	Balsa Nueva	TSA	N ₃₀ -111
112	Balsa Nueva	TSA	N ₃₀ -112
113	Balsa Nueva	TSA	N ₃₀ -113
114	Balsa Nueva	TSA	N ₃₀ -114
115	Balsa Nueva	MH 15%	N ₃₀ -115
116	Balsa Nueva	MH 15%	N ₃₀ -116
117	Balsa Nueva	MH 15%	N ₃₀ -117
118	Balsa Nueva	MH 15%	N ₃₀ -118
119	Balsa Nueva	MH 15%	N ₃₀ -119
120	Balsa Nueva	MH 15%	N ₃₀ -120
121	Balsa Nueva	MH 10%	N ₃₀ -121
122	Balsa Nueva	MH 10%	N ₃₀ -122
123	Balsa Nueva	MH 10%	N ₃₀ -123
124	Balsa Nueva	MH 10%	N ₃₀ -124
125	Balsa Nueva	MH 10%	N ₃₀ -125
126	Balsa Nueva	MH 10%	N ₃₀ -126
127	Balsa Nueva	MH 10%	N ₃₀ -127
128	Balsa Nueva	MH 5%	N ₃₀ -128
129	Balsa Nueva	MH 5%	N ₃₀ -129
130	Balsa Nueva	MH 3%	N ₃₀ -130
131	Balsa Nueva	MH 3%	N ₃₀ -131
132	Balsa Nueva	MH 3%	N ₃₀ -132
133	Balsa Nueva	MH 3%	N ₃₀ -133
134	Balsa Nueva	MH 0%	N ₃₀ -134
135	Balsa Nueva	MH 0%	N ₃₀ -135
136	Balsa Nueva	MH 0%	N ₃₀ -136

Tabla13. Relación 172 cepas seleccionadas, procedencia y nombre asignado (continuación).

Colonia	Procedencia	Medio aislamiento	Nombre de cepa
137	Balsa Nueva	MH 0%	N ₃₀ -137
138	Balsa Nueva	MH 0%	N ₃₀ -138
139	Balsa Nueva	MH 0%	N ₃₀ -139
140	Balsa Nueva	MH 0%	N ₃₀ -140
141	Balsa Nueva	MH 0%	N ₃₀ -141
142	Balsa Nueva	MH 0%	N ₃₀ -142
143	Balsa Nueva	MH 20%	N ₃₀ -143
144	Balsa Nueva	MH 20%	N ₃₀ -144
145	Balsa Vieja	TSA	V ₃₀ -145
146	Balsa Vieja	TSA	V ₃₀ -146
147	Balsa Vieja	TSA	V ₃₀ -147
148	Balsa Vieja	TSA	V ₃₀ -148
149	Balsa Vieja	TSA	V ₃₀ -149
150	Balsa Vieja	MH 15%	V ₃₀ -150
151	Balsa Vieja	MH 15%	V ₃₀ -151
152	Balsa Vieja	MH 10%	V ₃₀ -152
153	Balsa Vieja	MH 10%	V ₃₀ -153
154	Balsa Vieja	MH 10%	V ₃₀ -154
155	Balsa Vieja	MH 5%	V ₃₀ -155
156	Balsa Vieja	MH 5%	V ₃₀ -156
157	Balsa Vieja	MH 5%	V ₃₀ -157
158	Balsa Vieja	MH 5%	V ₃₀ -158
159	Balsa Vieja	MH 5%	V ₃₀ -159
160	Balsa Vieja	MH 5%	V ₃₀ -160
161	Balsa Vieja	MH 3%	V ₃₀ -161
162	Balsa Vieja	MH 3%	V ₃₀ -162
163	Balsa Vieja	MH 3%	V ₃₀ -163
164	Balsa Vieja	MH 3%	V ₃₀ -164
165	Balsa Vieja	MH 3%	V ₃₀ -165
166	Balsa Vieja	MH 3%	V ₃₀ -166
167	Balsa Vieja	MH 0%	V ₃₀ -167
168	Balsa Vieja	MH 0%	V ₃₀ -168
169	Balsa Vieja	MH 0%	V ₃₀ -169
170	Balsa Vieja	MH 0%	V ₃₀ -170
171	Balsa Vieja	MH 0%	V ₃₀ -171
172	Balsa Vieja	MH 0%	V ₃₀ -172

Los organismos que han evolucionado en ambientes salinos y son capaces de superar el efecto negativo de la sal a concentraciones saturadas, se han considerado como útiles objetos de estudio ecológicos y evolutivos. Además, sus mecanismos de adaptación son un

Resultados y discusión

aspecto bastante interesante desde el punto de vista microbiológico. Uno de los aportes fundamentales para la ciencia básica es la búsqueda de nuevas especies microbianas y su aplicación biotecnológica (Incerti, 1995).

Este residuo tiene una concentración de sal alta, entre 8,5% p/v-9,5% p/v (González-Cancho y Durán-Quintana, 1980; El-Makhzangy y Abdel-Rhman, 1999), por lo que pensamos que en él podrían crecer microorganismos halófilos. Las zonas de muestreo presentan condiciones saturadas de sal y están expuestas al sol. La salinidad, afecta a la actividad enzimática presente en los suelos, ya sea debida a plantas, animales o a la propia microbiota. La presencia de sales en exceso, generalmente impide la descomposición de materia orgánica, limitando los nutrientes necesarios para un suelo fértil, además de inhibir numerosos procesos microbianos como la mineralización de materia orgánica y la nitrificación. Estudios de la dinámica del crecimiento de bacterias halófilas aisladas a partir de suelos áridos y salinos permite un mejor conocimiento de los hábitats extremófilos (Zvyagintseva y col., 1991), ya sea por la distribución de especies o por el papel que desempeñan o potencialmente podrían desempeñar los microorganismos en estos suelos. Según Rodríguez-Valera (1986), los grupos taxonómicos predominantes en los suelos hipersalinos, suelen ser los comúnmente hallados en suelos, es decir, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes* y cocos Gram-positivos. La presencia de colonias pigmentadas, nos hacía pensar en la posibilidad de encontrar arqueas que poseen pigmentos carotenoides que están relacionados con la protección de las células frente a la radiación solar (Larsen, 1962), pero también podían ser especies de *Bacillus* que han sido capaces de generar pigmentos endógenos con la evolución para adaptarse a las condiciones extremas (Moeller y col., 2005).

Las colonias seleccionadas se sembraron en medio MH 5% p/v de sal porque fue el medio de crecimiento óptimo, después de realizar el espectro de crecimiento en distintas concentraciones de sal. En este medio se conservaron todos los aislados.

Resultados y discusión

Las **172** cepas **Gram-positivas** seleccionadas para realizar el estudio de taxonomía polifásica, atendiendo a los criterios expuestos anteriormente y en el apartado de material y métodos (III.1.2- Selección de cepas) fueron las siguientes: procedentes de la **Entrada a 30 °C** se seleccionaron 28 colonias de los distintos medios utilizados. Del medio TSA seleccionamos 1 colonia; 7 colonias del medio al 15% p/v de sal; 2 colonias del medio al 10% p/v de sal; 14 colonias del medio al 5% p/v de sal; 4 colonias del medio 3% p/v de sal; 2 colonias del medio al 0% p/v de sal; de la **Entrada a 55°C**, fueron elegidas 36 cepas de las que 5 colonias pertenecían al medio TSA; 4 colonias del medio al 20% p/v de sal; 3 colonias del medio al 15% p/v de sal; 8 colonias del medio al 10% p/v de sal; 6 colonias del medio al 5% p/v de sal; 5 colonias del medio al 3% p/v de sal y 5 colonias del medio al 0% p/v de sal. 36 cepas seleccionadas **A pie de Tubería** de las que 16 colonias se eligieron del medio TSA; 2 colonias del medio al 20% p/v de sal; 3 colonias del medio al 15% p/v de sal; 4 colonias del medio al 5% p/v de sal; 6 colonias del medio al 3% p/v de sal y 5 colonias del medio al 0% p/v de sal. 42 cepas pertenecientes a la **Balsa Nueva** de las que 12 colonias se seleccionaron del medio TSA; 2 colonias del medio al 20% p/v de sal; 6 colonias del medio al 15% p/v de sal; 7 colonias del medio al 10% p/v de sal; 2 colonias del medio al 5% p/v de sal; 4 colonias del medio al 3% p/v de sal y 9 colonias del medio al 0% p/v de sal. 28 cepas aisladas de la **Balsa Vieja** de las que 5 colonias fueron elegidas del medio TSA; 2 colonias del medio al 15% p/v de sal; 3 colonias del medio al 10% p/v de sal; 6 colonias del medio al 5% p/v de sal; 6 colonias del medio al 3% p/v de sal; 6 colonias del medio al 0% p/v de sal.

IV.3. TAXONOMÍA POLIFÁSICA.

IV.3.1. Taxonomía numérica.

La taxonomía numérica compara el mayor número posible de caracteres, a los que en general se les atribuye el mismo peso. La unidad de medida es el porcentaje de similitud o disimilitud, y tras el análisis de los datos, se produce una agrupación de los microorganismos en función de sus semejanzas. Los resultados se expresan en dendrogramas. De la topología de estos dendrogramas no se puede deducir ningún tipo de relaciones evolutivas ni filogenéticas, las relaciones son de similitud de caracteres.

Para éste estudio taxonómico, basado en el “Manual de Sistemática de Bergey” (Sneath y *col.*, 1986), que está aceptado mundialmente y que se ha compendiado en publicaciones, la más reciente publicada por Ludwig y Klenk (2001), se realizaron **100 pruebas** de identificación fenotípica. Pruebas morfológicas, espectros de crecimiento, pruebas bioquímicas, nutricionales y de susceptibilidad a antibióticos. Los resultados obtenidos se procesarán en un programa de taxonomía numérica, **TAXAN 2.0**, generando la matriz de semejanza y a partir de ella se construirá el correspondiente dendrograma.

IV.3.1.1. Caracterización fenotípica de las cepas seleccionadas.

Los resultados de las pruebas realizadas a cada uno de los microorganismos aislados de las aguas residuales de las aceitunas de mesa aparecen resumidos desde la tabla 14 hasta la tabla 25. En ellas, se agrupan las cepas que tienen el mismo resultado en las distintas pruebas realizadas. Las claves para descifrar los resultados son: (+)-resultado positivo; (-)-resultado negativo.

IV.3.1.1.1. Pruebas morfológicas, movilidad, esporas, oxidasa, catalasa, Gram y O/F.

Los resultados de la tabla 14, corresponden a las pruebas de morfología, movilidad, esporas, oxidasa, catalasa, Gram y oxido/fermentación (O/F) que presentan cada uno de los microorganismos analizados. Los microorganismos fueron cultivados en medio MH 5% p/v de concentración salina para realizar cada una de las pruebas como se ha explicado en el apartado de material y métodos. Las abreviaturas de las pruebas, que aparecen en esta tabla, corresponden a: morfología:**FORMA**; movilidad:**MOVIL**; esporas:**ESP** oxidasa:**OXI**; catalasa:**CAT**; oxidación/fermentación; **O/F**.

Tabla 14. Morfología, movilidad, esporas, oxidasa, catalasa, gram y O/F.

CEPAS ENTRADA 30 °C	FORMA	MOVIL	ESP	OXI	CAT	GRAM	O/F
E ₃₀ -1	Bacilos	+	+	+	+	+	-/-
E ₃₀ -2, E ₃₀ -3, E ₃₀ -4, E ₃₀ -5, E ₃₀ -6, E ₃₀ -8, E ₃₀ -9, E ₃₀ -10, E ₃₀ -11, E ₃₀ -14, E ₃₀ -15, E ₃₀ -19, E ₃₀ -20, E ₃₀ -1, E ₃₀ -22, E ₃₀ -23, E ₃₀ -25, E ₃₀ -26, E ₃₀ -28, E ₃₀ -30.	Bacilos	+	+	+	+	+	-/-
E ₃₀ -12, E ₃₀ -16, E ₃₀ -18, E ₃₀ -24, E ₃₀ -27, E ₃₀ -29.	Bacilos	+	+	-	+	+	-/-
E ₃₀ -7.	Bacilos	+	+	+	+	+	O
E ₃₀ -13.	Bacilos	+	+	+	+	+	-/-
E ₃₀ -17.	Cocos	+	+	-	+	+	F/O
CEPAS BALSA ENTRADA 55 °C	FORMA	MOVIL	ESP	OXI	CAT	GRAM	O/F
E ₅₅ -31, E ₅₅ -33, E ₅₅ -41, E ₅₅ -42, E ₅₅ -48, E ₅₅ -49, E ₅₅ -53, E ₅₅ -54, E ₅₅ -58, E ₅₅ -60, E ₅₅ -63, E ₅₅ -65.	Bacilos	+	+	+	+	+	O
E ₅₅ -32, E ₅₅ -35, E ₅₅ -44, E ₅₅ -55.	Bacilos	+	+	+	+	+	F
E ₅₅ -34, E ₅₅ -39.	Bacilos	+	+	+	+	+	F
E ₅₅ -36, E ₅₅ -37, E ₅₅ -45, E ₅₅ -47, E ₅₅ -56, E ₅₅ -62.	Bacilos	+	+	+	+	+	F
E ₅₅ -38.	Bacilos	+	+	+	-	+	O
E ₅₅ -40, E ₅₅ -43, E ₅₅ -46.	Bacilos	+	+	+	+	+	O
E ₅₅ -50, E ₅₅ -51, E ₅₅ -52, E ₅₅ -61, E ₅₅ -66.	Bacilos	+	+	+	+	+	-/-
E ₅₅ -57.	Bacilos	+	+	+	+	+	-/-
E ₅₅ -59, E ₅₅ -64.	Bacilos	+	+	+	+	+	O
CEPAS A PIE DE TUBERÍA 30 °C	FORMA	MOVIL	ESP	OXI	CAT	GRAM	O/F
I ₃₀ -67, I ₃₀ -77, I ₃₀ -89, I ₃₀ -91, I ₃₀ -92.	Bacilos	+	+	+	+	+	O
I ₃₀ -68, I ₃₀ -70, I ₃₀ -71, I ₃₀ -72, I ₃₀ -73, I ₃₀ -74, I ₃₀ -75, I ₃₀ -76, I ₃₀ -79, I ₃₀ -80, I ₃₀ -81, I ₃₀ -82, I ₃₀ -84, I ₃₀ -8, I ₃₀ -99, I ₃₀ -101.	Bacilos	+	+	+	+	+	-/-

Tabla 14. Morfología, movilidad, esporas oxidasa, catalasa, gram y O/F (continuación).

CEPAS A PIE DE TUBERÍA 30 °C	FORMA	MOVIL	ESP	OXI	CAT	GRAM	O/F
I ₃₀ -67, I ₃₀ -77, I ₃₀ -89, I ₃₀ -91, I ₃₀ -92.	Bacilos	+	+	+	+	+	O
I ₃₀ -68, I ₃₀ -70, I ₃₀ -71, I ₃₀ -72, I ₃₀ -73, I ₃₀ -74, I ₃₀ -75, I ₃₀ -76, I ₃₀ -79, I ₃₀ -80, I ₃₀ -81, I ₃₀ -82, I ₃₀ -84, I ₃₀ -8, I ₃₀ -99, I ₃₀ -101.	Bacilos	+	+	+	+	+	-/-
I ₃₀ -69.	Bacilos	+	+	-	+	+	-/-
I ₃₀ -78.	Bacilos	+	+	-	+	+	-/-
I ₃₀ -83, I ₃₀ -87, I ₃₀ -93.	Bacilos	+	+	-	+	+	F
I ₃₀ -85.	Coco bacilos	+	+	-	+	+	F
I ₃₀ -86.	Coco bacilos	+	+	-	+	+	O
I ₃₀ -90, I ₃₀ -96.	Cocos	+	+	-	+	+	-/-
I ₃₀ -94.	Bacilos	+	+	-	+	+	O
I ₃₀ -95, I ₃₀ -97, I ₃₀ -98, I ₃₀ -100, I ₃₀ -102.	Bacilos	+	+	-	+	+	-/-
CEPAS Balsa Nueva 30 °C	FORMA	MOVIL	ESP	OXI	CAT	GRAM	O/F
N ₃₀ -103, N ₃₀ -104, N ₃₀ -106, N ₃₀ -137.	Bacilos	+	+	-	+	+	-/-
N ₃₀ -105.	Bacilos	+	+	-	+	+	-/-
N ₃₀ -107, N ₃₀ -108, N ₃₀ -111, N ₃₀ -112, N ₃₀ -15, N ₃₀ -120, N ₃₀ -122, N ₃₀ -124, N ₃₀ -126, N ₃₀ -28, N ₃₀ -132, N ₃₀ -133, N ₃₀ -134, N ₃₀ -135, N ₃₀ -38, N ₃₀ -139, N ₃₀ -140, N ₃₀ -141, N ₃₀ -142, N ₃₀ -143.	Bacilos	+	+	+	+	+	-/-
N ₃₀ -109.	Coco bacilos	+	+	-	+	+	-/-
N ₃₀ -110, N ₃₀ -113.	Coco bacilos	+	+	-	+	+	-/-
N ₃₀ -114.	Bacilos	+	+	-	+	+	-/-
N ₃₀ -116.	Bacilos	+	+	-	+	+	-/-
N ₃₀ -117.	Bacilos	+	+	+	+	+	-/-
N ₃₀ -118.	Bacilos	+	+	+	-	+	-/-
N ₃₀ -119, N ₃₀ -123.	Bacilos	+	+	-	+	+	F
N ₃₀ -121, N ₃₀ -129, N ₃₀ -130, N ₃₀ -136.	Bacilos	+	+	+	+	+	F
N ₃₀ -125, N ₃₀ -127, N ₃₀ -131.	Bacilos	+	+	-	+	+	-/-
N ₃₀ -144.	Bacilos	+	+	-	+	+	O
CEPAS Balsa Vieja 30 °C	FORMA	MOVIL	ESP	OXI	CAT	GRAM	O/F
V ₃₀ -145, V ₃₀ -147, V ₃₀ -148, V ₃₀ -149, V ₃₀ -150, V ₃₀ -151, V ₃₀ -154, V ₃₀ -155, V ₃₀ -159, V ₃₀ -160, V ₃₀ -161, V ₃₀ -162, V ₃₀ -167, V ₃₀ -168, V ₃₀ -170, V ₃₀ -171, V ₃₀ -172.	Bacilos	+	+	+	+	+	-/-
V ₃₀ -146.	Bacilos	+	+	+	+	+	F
V ₃₀ -152, V ₃₀ -153, V ₃₀ -157, V ₃₀ -158, V ₃₀ -164, V ₃₀ -165, V ₃₀ -166, V ₃₀ -169.	Bacilos	+	+	-	+	+	-/-
V ₃₀ -156.	Coco bacilos	+	+	-	+	+	-/-
V ₃₀ -163.	Bacilos	+	+	-	+	+	-/-

IV.3.1.1.2. Pruebas de crecimiento a diferentes temperaturas.

Los microorganismos cultivados en medio MH al 5% p/v de concentración salina fueron sometidos al crecimiento a temperaturas que oscilaron entre los 10 °C y los 70°C. Los resultados se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Crecimiento a diferentes temperaturas.

CEPAS ENTRADA 30 °C	10°	20°	25°	30°	40°	45°	55°	60°	65°	70°
E ₃₀ -1,E ₃₀ -7,E ₃₀ -8,E ₃₀ -9,E ₃₀ -10,E ₃₀ -12,E ₃₀ -17, E ₃₀ -18,E ₃₀ -21,E ₃₀ -24,E ₃₀ -25,E ₃₀ -27,E ₃₀ -29.	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
E ₃₀ -2,E ₃₀ -3,E ₃₀ -11,E ₃₀ -14,E ₃₀ -23,E ₃₀ -28.	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
E ₃₀ -4,E ₃₀ -5,E ₃₀ -6,E ₃₀ -13,E ₃₀ -15,E ₃₀ -16,E ₃₀ -20, E ₃₀ -26,E ₃₀ -30.	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
E ₃₀ -19.	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
E ₃₀ -22.	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
CEPAS ENTRADA 55 °C	10°	20°	25°	30°	40°	45°	55°	60°	65°	70°
E ₅₅ -31,E ₅₅ -33,E ₅₅ -34,E ₅₅ -35,E ₅₅ -36,E ₅₅ -37, E ₅₅ -38,E ₅₅ -40,E ₅₅ -42,E ₅₅ -41,E ₅₅ -43,E ₅₅ -44, E ₅₅ -45,E ₅₅ -47,E ₅₅ -49,E ₅₅ -51,E ₅₅ -52,E ₅₅ -53, E ₅₅ -54,E ₅₅ -57,E ₅₅ -58,E ₅₅ -59,E ₅₅ -60,E ₅₅ -61, E ₅₅ -63,E ₅₅ -64,E ₅₅ -65,E ₅₅ -66.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
E ₅₅ -32,E ₅₅ -39,E ₅₅ -46,E ₅₅ -48,E ₅₅ -50,E ₅₅ -55, E ₅₅ -56. E ₅₅ -62.	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
CEPAS A PIE DE TUBERÍA 30 °C	10°	20°	25°	30°	40°	45°	55°	60°	65°	70°
I ₃₀ -67,I ₃₀ -72,I ₃₀ -79,I ₃₀ -80,I ₃₀ -83.	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
I ₃₀ -68,I ₃₀ -69,I ₃₀ -70,I ₃₀ -85,I ₃₀ -87,I ₃₀ -89,I ₃₀ -92, I ₃₀ -96.	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
I ₃₀ -71.	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
I ₃₀ -73,I ₃₀ -78,I ₃₀ -82,I ₃₀ -95,I ₃₀ -97.	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
I ₃₀ -74,I ₃₀ -75,I ₃₀ -76,I ₃₀ -81,I ₃₀ -84,I ₃₀ -88,I ₃₀ -99.	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
I ₃₀ -77.	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
I ₃₀ -86.	-	+	+	++	+	-	-	-	-	-
I ₃₀ -90,I ₃₀ -101.	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
I ₃₀ -91,I ₃₀ -93,I ₃₀ -94,I ₃₀ -98,I ₃₀ -100,I ₃₀ -102.	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
CEPAS BALSA NUEVA 30 °C	10°	20°	25°	30°	40°	45°	55°	60°	65°	70°
N ₃₀ -103,N ₃₀ -104,N ₃₀ -105,N ₃₀ -106,N ₃₀ -138.	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
N ₃₀ -107,N ₃₀ -112,N ₃₀ -113,N ₃₀ -114,N ₃₀ -116, N ₃₀ -117,N ₃₀ -118,N ₃₀ -119,N ₃₀ -12,0N ₃₀ -122, N ₃₀ -124,N ₃₀ -125,N ₃₀ -134,N ₃₀ -140.	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
N ₃₀ -108,N ₃₀ -111,N ₃₀ -123,N ₃₀ -133,N ₃₀ -141, N ₃₀ -142.	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
N ₃₀ -109,N ₃₀ -110.	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
N ₃₀ -115,N ₃₀ -128,N ₃₀ -136,N ₃₀ -137,N ₃₀ -139.	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Tabla 15. Crecimiento a diferentes temperaturas (continuación).

CEPAS Balsa Nueva 30 °C	10°	20°	25°	30°	40°	45°	55°	60°	65°	70°
N ₃₀ -121,N ₃₀ -129,N ₃₀ -131,N ₃₀ -132,N ₃₀ -144.	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
N ₃₀ -126,N ₃₀ -135.	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
N ₃₀ -127.	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
N ₃₀ -130.	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
N ₃₀ -143.	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
CEPAS Balsa Vieja 30 °C	10°	20°	25°	30°	40°	45°	55°	60°	65°	70°
V ₃₀ -145,V ₃₀ -148,V ₃₀ -153,V ₃₀ -154,V ₃₀ -163, V ₃₀ -168,V ₃₀ -169.	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
V ₃₀ -146,V ₃₀ -147,V ₃₀ -150,V ₃₀ -164,V ₃₀ -166, V ₃₀ -170.	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
V ₃₀ -149,V ₃₀ -151,V ₃₀ -156,V ₃₀ -157,V ₃₀ -160, V ₃₀ -165,V ₃₀ -167,V ₃₀ -171	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
V ₃₀ -152.	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
V ₃₀ -155.	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
V ₃₀ -158.	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
V ₃₀ -159.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
V ₃₀ -161,V ₃₀ -172	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
V ₃₀ -162.	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

IV.3.1.1.3. Pruebas de crecimiento a diferentes pH.

Las cepas fueron cultivadas en medio MH al 5% p/v de concentración de sal. Los medios fueron preparados a determinados pH para comprobar el crecimiento de cada microorganismo en el pH a estudiar, variando éste desde **pH 1** a **pH 12**. Los resultados se observan en la tabla 16.

Tabla 16. Crecimiento a diferentes pH.

CEPAS ENTRADA 30 °C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E ₃₀ -1.	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
E ₃₀ -2, E ₃₀ -3, E ₃₀ -5, E ₃₀ -11.	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
E ₃₀ -4, E ₃₀ -28.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E ₃₀ -6, E ₃₀ -13.	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
E ₃₀ -7, E ₃₀ -8.	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
E ₃₀ -9.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
E ₃₀ -10.	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
E ₃₀ -12, E ₃₀ -16, E ₃₀ -18, E ₃₀ -19, E ₃₀ -20, E ₃₀ -21.	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
E ₃₀ -14.	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E ₃₀ -15.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
E ₃₀ -17, E ₃₀ -22.	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
E ₃₀ -23, E ₃₀ -25, E ₃₀ -29.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
E ₃₀ -24.	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
E ₃₀ -26.	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
E ₃₀ -27.	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
CEPAS ENTRADA 55 °C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E ₅₅ -31.	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
E ₅₅ -32.	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
E ₅₅ -33, E ₅₅ -35, E ₅₅ -46, E ₅₅ -49, E ₅₅ -50, E ₅₅ -52, E ₅₅ -54, E ₅₅ -57, E ₅₅ -58.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
E ₅₅ -34, E ₅₅ -36, E ₅₅ -37, E ₅₅ -61.	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
E ₅₅ -38, E ₅₅ -39, E ₅₅ -40, E ₅₅ -41, E ₅₅ -42, E ₅₅ -43, E ₅₅ -44, E ₅₅ -45, E ₅₅ -47, E ₅₅ -48, E ₅₅ -51, E ₅₅ -53, E ₅₅ -56, E ₅₅ -60, E ₅₅ -62, E ₅₅ -63, E ₅₅ -64, E ₅₅ -65, E ₅₅ -66.	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
E ₅₅ -55.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
E ₅₅ -59.	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
CEPAS A PIE DE TUBERÍA 30 °C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
I ₃₀ -67, I ₃₀ -72, I ₃₀ -74, I ₃₀ -76, I ₃₀ -77, I ₃₀ -78, I ₃₀ -86, I ₃₀ -8, I ₃₀ -97, I ₃₀ -99, I ₃₀ -102,	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
I ₃₀ -68.	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
I ₃₀ -69, I ₃₀ -70.	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Tabla 16. Crecimiento a diferentes pH (continuación).

CEPAS A PIE DE TUBERIA 30 °C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
I ₃₀ -71.	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
I ₃₀ -73,I ₃₀ -79,I ₃₀ -80,I ₃₀ -81.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
I ₃₀ -75.	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
I ₃₀ -82,I ₃₀ -84,I ₃₀ -100.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I ₃₀ -83.	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
I ₃₀ -85.	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
I ₃₀ -87,I ₃₀ -89,I ₃₀ -91,I ₃₀ -93,I ₃₀ -94,I ₃₀ -101.	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I ₃₀ -90.	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
I ₃₀ -92.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
I ₃₀ -95.	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
I ₃₀ -96.	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
I ₃₀ -98.	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CEPAS Balsa Nueva 30 °C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
N ₃₀ -103,N ₃₀ -104,N ₃₀ -106,N ₃₀ -107.	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
N ₃₀ -105,N ₃₀ -132,N ₃₀ -112,N ₃₀ -114,N ₃₀ -116,N ₃₀ -121, N ₃₀ -126,N ₃₀ -130,N ₃₀ -133,N ₃₀ -138.	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
N ₃₀ -108,N ₃₀ -111.	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N ₃₀ -109.	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
N ₃₀ -110,N ₃₀ -128,N ₃₀ -140,N ₃₀ -142.	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
N ₃₀ -113,N ₃₀ -124,N ₃₀ -131,N ₃₀ -144.	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
N ₃₀ -115,N ₃₀ -117,N ₃₀ -123,N ₃₀ -135,N ₃₀ -141,N ₃₀ -143.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N ₃₀ -118.	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
N ₃₀ -119,N ₃₀ -137.	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
N ₃₀ -120.	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
N ₃₀ -122,N ₃₀ -125,N ₃₀ -134.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
N ₃₀ -127.	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
N ₃₀ -129,N ₃₀ -136,N ₃₀ -139.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CEPAS Balsa Vieja 30 °C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
V ₃₀ -145.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V ₃₀ -146,V ₃₀ -147,V ₃₀ -148,V ₃₀ -149,V ₃₀ -151,V ₃₀ -154, V ₃₀ -155,V ₃₀ -165,V ₃₀ -168.	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V ₃₀ -150,V ₃₀ -153.	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
V ₃₀ -152,V ₃₀ -172.	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
V ₃₀ -156,V ₃₀ -166.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V ₃₀ -157.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
V ₃₀ -158.	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
V ₃₀ -159.	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
V ₃₀ -160.	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
V ₃₀ -161.	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
V ₃₀ -162.	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
V ₃₀ -163,V ₃₀ -169.	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
V ₃₀ -164.	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
V ₃₀ -167,V ₃₀ -171.	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
V ₃₀ -170.	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-

IV.3.1.1.4. Pruebas de crecimiento a diferentes concentraciones de sal.

Se preparó medio de cultivo MH con porcentajes de sal que oscilaban entre el **0% p/v** hasta el **30% p/v**, con objeto, de probar la tolerancia de cada microorganismo a las distintas concentraciones de sal. Los resultados se recogen en la tabla 17.

Tabla 17. Crecimiento a diferentes concentraciones de sal.

CEPAS ENTRADA 30 °C	0%	3%	5%	10%	15%	20%	25%	30%
E ₃₀ -1,E ₃₀ -2,E ₃₀ -4,E ₃₀ -6,E ₃₀ -7,E ₃₀ -8,E ₃₀ -9,E ₃₀ -11, E ₃₀ -12,E ₃₀ -13,E ₃₀ -14,E ₃₀ -15,E ₃₀ -16,E ₃₀ -18,E ₃₀ -19, E ₃₀ -20,E ₃₀ -21,E ₃₀ -22,E ₃₀ -24,E ₃₀ -25,E ₃₀ -26,E ₃₀ -30.	+	+	+	+	+	+	-	-
E ₃₀ -3,E ₃₀ -17.	+	+	+	+	+	+	+	+
E ₃₀ -5.	+	+	+	+	+	+	+	-
E ₃₀ -10,E ₃₀ -23.	+	+	+	+	+	-	-	-
E ₃₀ -27,E ₃₀ -28,E ₃₀ -29.	+	+	+	+	-	-	-	-
CEPAS ENTRADA 55 °C	0%	3%	5%	10%	15%	20%	25%	30%
E ₅₅ -31,E ₅₅ -33,E ₅₅ -34,E ₅₅ -35,E ₅₅ -36,E ₅₅ -37,E ₅₅ -38, E ₅₅ -39,E ₅₅ -40,E ₅₅ -41,E ₅₅ -42,E ₅₅ -43,E ₅₅ -44,E ₅₅ -45, E ₅₅ -46,E ₅₅ -48,E ₅₅ -49,E ₅₅ -50,E ₅₅ -51,E ₅₅ -52,E ₅₅ -53, E ₅₅ -57,E ₅₅ -60,E ₅₅ -61,E ₅₅ -62,E ₅₅ -63, E ₅₅ -64, E ₅₅ -65.	+	+	+	+	+	-	-	-
E ₅₅ -32,E ₅₅ -47,E ₅₅ -54,E ₅₅ -55,E ₅₅ -56,E ₅₅ -58,E ₅₅ -66.	+	+	+	+	-	-	-	-
E ₅₅ -59.	+	+	+	-	-	-	-	-
CEPAS A PIE DE TUBERIA 30 °C	0%	3%	5%	10%	15%	20%	25%	30%
I ₃₀ -67,I ₃₀ -71,I ₃₀ -72,I ₃₀ -74,I ₃₀ -75,I ₃₀ -76,I ₃₀ -78,I ₃₀ -79, I ₃₀ -80,I ₃₀ -81,I ₃₀ -83,I ₃₀ -84,I ₃₀ -88,I ₃₀ -89, I ₃₀ -90,I ₃₀ -92.	+	+	+	+	+	-	-	-
I ₃₀ -68,I ₃₀ -69,I ₃₀ -70,I ₃₀ -73,I ₃₀ -77,I ₃₀ -82,I ₃₀ -86,I ₃₀ -93, I ₃₀ -95,I ₃₀ -96,I ₃₀ -97,I ₃₀ -98,I ₃₀ -99,I ₃₀ -100.	+	+	+	+	-	-	-	-
I ₃₀ -85,I ₃₀ -91.	+	+	+	+	+	+	+	-
I ₃₀ -87,I ₃₀ -94,I ₃₀ -101,I ₃₀ -102.	+	+	+	+	+	+	-	-
CEPAS BALSA NUEVA 30 °C	0%	3%	5%	10%	15%	20%	25%	30%
N ₃₀ -103,N ₃₀ -104,N ₃₀ -106,N ₃₀ -109,N ₃₀ -134,N ₃₀ -140, N ₃₀ -141,N ₃₀ -142.	+	+	+	-	-	-	-	-
N ₃₀ -105,N ₃₀ -107,N ₃₀ -110,N ₃₀ -113,N ₃₀ -114,N ₃₀ -115, N ₃₀ -116,N ₃₀ -119,N ₃₀ -122,N ₃₀ -124,N ₃₀ -126,N ₃₀ -127, N ₃₀ -132,N ₃₀ -135,N ₃₀ -136,N ₃₀ -137,N ₃₀ -139.	+	+	+	+	+	-	-	-
N ₃₀ -108,N ₃₀ -111,N ₃₀ -112,N ₃₀ -117,N ₃₀ -125,N ₃₀ -129, N ₃₀ -131,N ₃₀ -138.	+	+	+	+	-	-	-	-
N ₃₀ -118,N ₃₀ -120,N ₃₀ -121,N ₃₀ -123,N ₃₀ -130,N ₃₀ -133, N ₃₀ -143,N ₃₀ -144.	+	+	+	+	+	+	-	-
N ₃₀ -128.	+	+	+	+	+	+	+	-

Tabla 17. Crecimiento a diferentes concentraciones de sal (continuación).

CEPAS BALSA VIEJA 30 °C	0%	3%	5%	10%	15%	20%	25%	30%
V ₃₀ -145, V ₃₀ -146, V ₃₀ -154, V ₃₀ -156, V ₃₀ -158, V ₃₀ -164, V ₃₀ -166, V ₃₀ -168; V ₃₀ -149.	+	+	+	+	+	+	-	-
V ₃₀ -147, V ₃₀ -150, V ₃₀ -151, V ₃₀ -155, V ₃₀ -159, V ₃₀ -161, V ₃₀ -172; V ₃₀ -148.	+	+	+	+	+	-	-	-
V ₃₀ -152.	+	+	+	+	+	-	-	-
V ₃₀ -153, V ₃₀ -157, V ₃₀ -163, V ₃₀ -165, V ₃₀ -167, V ₃₀ -170, V ₃₀ -171.	+	+	+	+	-	-	-	-
V ₃₀ -160, V ₃₀ -162.	+	+	+	+	+	+	+	-
V ₃₀ -169.	+	+	+	-	-	-	-	-

IV.3.1.1.5. Pruebas de utilización de carbohidratos como única fuente de carbono y energía.

Según el método explicado en el apartado de material y métodos (III.2.3.1-Utilización de carbohidratos como fuente de carbono y energía), los microorganismos fueron cultivados para determinar la capacidad de utilización de los distintos carbohidratos como única fuente de carbono y energía. Los resultados se presentan en la tabla 18 y los carbohidratos probados aparecen en la tabla con una nomenclatura que se lee de acuerdo a la siguiente clave: **CEL**:celobiosa; **FRU**: fructosa; **GAL**:galactosa; **MAL**:maltosa; **MAN**:manosa; **RAM**:ramnosa; **SAC**:sacarosa; **XIL**:xilosa; **GLU**:glucosa.

Tabla 18. Utilización de carbohidratos como única fuente de carbono y energía.

CEPAS ENTRADA 30 °C	CEL	FRU	GAL	MAL	MAN	RAM	SAC	XIL	GLU
E ₃₀ -1,E ₃₀ -2,E ₃₀ -7,E ₃₀ -11.	+	+	-	-	+	+	-	+	+
E ₃₀ -3.	-	-	-	-	+	+	+	+	+
E ₃₀ -4.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E ₃₀ -5.	+	-	+	+	+	+	-	-	+
E ₃₀ -6.	-	+	+	-	+	+	-	-	+
E ₃₀ -8.	+	-	-	-	+	+	-	-	+
E ₃₀ -9,E ₃₀ -24.	+	+	-	-	+	+	+	+	+
E ₃₀ -10,E ₃₀ -23.	-	+	-	-	+	+	+	+	+
E ₃₀ -12.	+	+	+	+	+	+	-	+	+
E ₃₀ -13.	+	+	-	+	+	+	+	+	+
E ₃₀ -14.	+	+	-	+	+	+	-	-	+
E ₃₀ -15.	+	+	-	-	+	+	+	+	+
E ₃₀ -16,E ₃₀ -19,E ₃₀ -22,E ₃₀ -26.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E ₃₀ -17,E ₃₀ -25.	+	-	-	-	+	+	+	+	+
E ₃₀ -18.	+	-	+	-	+	+	+	+	+
E ₃₀ -20.	+	+	+	+	+	+	+	-	+
E ₃₀ -21.	+	+	+	-	+	+	+	+	+
E ₃₀ -27.	+	-	-	+	-	+	+	-	-
E ₃₀ -28.	+	+	-	-	-	+	-	-	+
E ₃₀ -29.	-	-	-	-	-	+	-	-	-
E ₃₀ -30.	+	+	-	+	+	+	+	+	+
CEPAS ENTRADA 55 °C	CEL	FRU	GAL	MAL	MAN	RAM	SAC	XIL	GLU
E ₅₅ -31.	-	+	-	-	+	+	+	+	+
E ₅₅ -32.	-	+	-	-	+	+	-	-	+

Tabla 18. Utilización de carbohidratos como única fuente de carbono y energía (continuación).

CEPAS ENTRADA 55 °C	CEL	FRU	GAL	MAL	MAN	RAM	SAC	XIL	GLU
E ₅₅ -33,E ₅₅ -44,E ₅₅ -66.	-	+	-	-	+	+	+	-	+
E ₅₅ -34,E ₅₅ -35,E ₅₅ -38,E ₅₅ -40,E ₅₅ -46, E ₅₅ -51,E ₅₅ -53.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E ₅₅ -36.	+	+	+	-	+	+	-	+	+
E ₅₅ -37.	+	+	+	-	+	+	+	+	+
E ₅₅ -39.	+	+	+	+	+	+	+	-	+
E ₅₅ -41,E ₅₅ -43,E ₅₅ -54.	+	+	-	-	+	+	-	+	+
E ₅₅ -42,E ₅₅ -48,E ₅₅ -56.	+	+	-	-	+	+	+	-	+
E ₅₅ -45,E ₅₅ -49,E ₅₅ -52,E ₅₅ -57,E ₅₅ -60, E ₅₅ -62, E ₅₅ -64,E ₅₅ -65.	+	+	-	-	+	+	+	+	+
E ₅₅ -47.	-	+	-	-	+	+	+	+	+
E ₅₅ -50.	+	+	-	+	+	+	+	+	+
E ₅₅ -55.	-	+	-	-	+	+	-	+	-
E ₅₅ -58.	-	+	+	+	+	+	+	+	+
E ₅₅ -59.	-	+	-	-	-	-	+	-	-
E ₅₅ -61.	-	+	+	-	+	+	+	-	+
E ₅₅ -63.	+	+	+	-	+	+	+	-	+
CEPAS A PIE DE TUBERÍA 30 °C	CEL	FRU	GAL	MAL	MAN	RAM	SAC	XIL	GLU
I ₃₀ -67.	+	+	+	+	+	+	+	-	+
I ₃₀ -68.	+	+	+	+	+	+	-	-	+
I ₃₀ -69,I ₃₀ -71,I ₃₀ -74,I ₃₀ -80,I ₃₀ -81,I ₃₀ -84, I ₃₀ -88,I ₃₀ -98,I ₃₀ -101.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I ₃₀ -70.	-	-	-	-	-	+	-	-	+
I ₃₀ -72,I ₃₀ -78,I ₃₀ -86.	+	+	-	+	+	+	+	+	+
I ₃₀ -73,I ₃₀ -102.	-	+	-	-	+	+	+	+	+
I ₃₀ -75,I ₃₀ -83.	+	+	-	+	+	+	+	-	+
I ₃₀ -76.	+	+	+	+	+	+	+	-	+
I ₃₀ -77.	+	+	-	-	+	+	+	+	+
I ₃₀ -79.	+	-	+	+	+	+	+	+	+
I ₃₀ -82.	-	+	-	-	+	+	-	-	+
I ₃₀ -85.	+	-	+	-	+	+	-	-	+
I ₃₀ -87,I ₃₀ -91.	+	-	+	+	+	+	+	-	+
I ₃₀ -89.	+	-	-	+	+	+	+	-	+
I ₃₀ -90.	+	+	+	-	+	+	+	+	+
I ₃₀ -92.	-	+	+	+	+	+	-	-	+
I ₃₀ -93.	-	+	-	-	+	+	-	+	+
I ₃₀ -94.	-	-	-	-	+	+	+	-	+
I ₃₀ -95.	+	+	+	+	+	+	-	-	+
I ₃₀ -96.	-	-	-	-	+	+	-	+	+
I ₃₀ -97,I ₃₀ -99.	+	+	-	-	+	+	+	+	+
I ₃₀ -100.	-	+	+	-	+	+	+	+	+

Resultados y discusión

Tabla 18. Utilización de carbohidratos como única fuente de carbono y energía (continuación).

CEPAS Balsa Nueva 30 °C	CEL	FRU	GAL	MAL	MAN	RAM	SAC	XIL	GLU
N ₃₀ -103,N ₃₀ -104.	-	-	+	-	+	+	-	+	+
N ₃₀ -105.	+	+	+	+	+	-	+	+	+
N ₃₀ -106,N ₃₀ -143.	-	-	-	-	+	+	-	+	+
N ₃₀ -107,N ₃₀ -133.	+	-	+	+	+	+	+	+	+
N ₃₀ -108.	-	-	-	-	+	+	+	-	+
N ₃₀ -109,N ₃₀ -122,N ₃₀ -123,N ₃₀ -127, N ₃₀ -137.	+	+	-	+	+	+	+	+	+
N ₃₀ -110.	+	+	+	-	+	+	+	-	+
N ₃₀ -111.	-	+	-	-	+	+	+	-	+
N ₃₀ -112,N ₃₀ -117,N ₃₀ -118,N ₃₀ -138, N ₃₀ -141.	-	+	-	-	+	+	+	+	+
N ₃₀ -113.	+	+	+	-	+	+	+	+	+
N ₃₀ -114,N ₃₀ -120,N ₃₀ -134,N ₃₀ -136, N ₃₀ -139.	+	+	-	-	+	+	+	+	+
N ₃₀ -115,N ₃₀ -126.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N ₃₀ -116,N ₃₀ -142.	-	+	+	-	+	+	+	-	+
N ₃₀ -119.	+	-	-	-	+	+	-	+	+
N ₃₀ -121,N ₃₀ -140.	-	+	+	-	+	+	-	-	+
N ₃₀ -124.	+	-	+	-	+	+	+	+	+
N ₃₀ -125.	+	+	-	-	+	+	+	-	+
N ₃₀ -128.	-	+	-	-	+	+	+	-	+
N ₃₀ -129.	+	-	+	+	+	+	-	-	+
N ₃₀ -130.	+	-	+	+	+	+	+	-	+
N ₃₀ -131.	-	-	+	-	+	+	+	+	+
N ₃₀ -132.	+	-	+	-	+	+	+	-	+
N ₃₀ -135.	-	+	-	-	+	+	-	+	+
N ₃₀ -144.	-	-	-	-	+	+	-	-	+
CEPAS Balsa Vieja 30 °C	CEL	FRU	GAL	MAL	MAN	RAM	SAC	XIL	GLU
V ₃₀ -145.	-	-	-	+	+	+	-	+	+
V ₃₀ -146.	+	-	+	+	+	+	+	-	+
V ₃₀ -147,V ₃₀ -152.	+	+	+	-	+	+	-	+	+
V ₃₀ -148.	+	+	+	-	+	+	+	-	+
V ₃₀ -149.	+	+	+	+	+	+	+	-	+
V ₃₀ -150,V ₃₀ -158.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V ₃₀ -151,V ₃₀ -161,V ₃₀ -170.	+	+	+	-	+	+	+	+	+
V ₃₀ -153,V ₃₀ -160,V ₃₀ -164,V ₃₀ -169.	+	-	+	-	+	+	-	+	+
V ₃₀ -154.	-	-	+	-	+	+	-	-	+
V ₃₀ -155,V ₃₀ -165.	+	+	-	-	+	+	+	+	+
V ₃₀ -156.	+	-	-	-	+	+	-	-	+
V ₃₀ -157.	-	+	+	+	+	+	-	-	+
V ₃₀ -159,V ₃₀ -163.	+	-	+	-	+	+	-	-	+
V ₃₀ -162,V ₃₀ -163,V ₃₀ -168.	+	-	+	-	+	+	+	+	+
V ₃₀ -166.	+	-	+	-	+	+	+	+	+
V ₃₀ -167,V ₃₀ -171.	-	-	+	-	+	+	+	+	+
V ₃₀ -172.	+	+	+	+	+	+	+	+	+

IV.3.1.1.6. Pruebas de utilización de aminoácidos como única fuente de carbono y energía.

Siguiendo el protocolo explicado en material y métodos, (III.2.3.2-Utilización de aminoácidos como única fuente de carbono y energía) las cepas fueron cultivadas para determinar si eran capaces de utilizar como única fuente de carbono y energía los aminoácidos probados. En la tabla 19 se presentan los resultados obtenidos para cada cepa. La siguiente clave indica el aminoácido probado: **ALA**:alanina.; **ARG**:arginina.; **HIS**:histidina.; **MET**:metionina.; **CIS**:cisteina.; **LIS**:lisina.; **ASP**:asparragina.

Tabla 19. Utilización de aminoácidos como única fuente de carbono y energía.

CEPAS ENTRADA 30 °C	ALA	ARG	HIS	MET	CIS	LIS	ASP
E ₃₀ -1, E ₃₀ -2, E ₃₀ -3, E ₃₀ -7, E ₃₀ -8, E ₃₀ -9, E ₃₀ -10, E ₃₀ -11, E ₃₀ -12, E ₃₀ -15, E ₃₀ -17, E ₃₀ -18, E ₃₀ -19, E ₃₀ -23, E ₃₀ -24, E ₃₀ -25, E ₃₀ -26, E ₃₀ -27, E ₃₀ -28, E ₃₀ -29, E ₃₀ -30.	-	-	-	-	-	-	-
E ₃₀ -4, E ₃₀ -20, E ₃₀ -21.	-	+	-	-	-	-	-
E ₃₀ -5.	+	+	+	+	-	+	-
E ₃₀ -6.	+	-	-	-	-	-	-
E ₃₀ -13.	-	-	-	+	-	+	-
E ₃₀ -14, E ₃₀ -16.	+	+	-	-	-	-	-
E ₃₀ -22.	-	-	-	-	-	-	+
CEPAS ENTRADA 55 °C	ALA	ARG	HIS	MET	CIS	LIS	ASP
E ₅₅ -31, E ₅₅ -38, E ₅₅ -46, E ₅₅ -47, E ₅₅ -48, E ₅₅ -53, E ₅₅ -56, E ₅₅ -66.	+	-	-	-	-	-	-
E ₅₅ -32.	-	-	-	+	-	+	-
E ₅₅ -33, E ₅₅ -35, E ₅₅ -36, E ₅₅ -37, E ₅₅ -39, E ₅₅ -40, E ₅₅ -42, E ₅₅ -43, E ₅₅ -44, E ₅₅ -45, E ₅₅ -51, E ₅₅ -52, E ₅₅ -54, E ₅₅ -55, E ₅₅ -57, E ₅₅ -59, E ₅₅ -60, E ₅₅ -61, E ₅₅ -62, E ₅₅ -63, E ₅₅ -63, E ₅₅ -64, E ₅₅ -65.	-	-	-	-	-	-	-
E ₅₅ -34.	-	-	-	-	+	-	-
E ₅₅ -41.	-	-	-	+	+	-	-
E ₅₅ -49, E ₅₅ -58.	-	-	-	-	-	+	-
E ₅₅ -50.	-	-	+	-	-	+	-
CEPAS A PIE DE TUBERIA 30 °C	ALA	ARG	HIS	MET	CIS	LIS	ASP
I ₃₀ -67, I ₃₀ -68, I ₃₀ -70, I ₃₀ -72, I ₃₀ -73, I ₃₀ -74, I ₃₀ -75, I ₃₀ -76, I ₃₀ -77, I ₃₀ -79, I ₃₀ -82, I ₃₀ -83, I ₃₀ -85, I ₃₀ -86, I ₃₀ -88, I ₃₀ -92, I ₃₀ -93, I ₃₀ -94, I ₃₀ -95, I ₃₀ -97, I ₃₀ -98, I ₃₀ -99, I ₃₀ -100, I ₃₀ -102.	-	-	-	-	-	-	-
I ₃₀ -69, I ₃₀ -78, I ₃₀ -90.	+	-	-	-	-	-	-
I ₃₀ -71, I ₃₀ -84.	-	+	-	-	-	-	-
I ₃₀ -80, I ₃₀ -96.	-	-	-	-	+	-	-

Tabla 19. Utilización de aminoácidos como única fuente de carbono y energía (continuación).

CEPAS A PIE DE TUBERÍA 30 °C	ALA	ARG	HIS	MET	CIS	LIS	ASP
I ₃₀ -81.	+	+	-	-	-	-	-
I ₃₀ -87.	+	+	-	-	-	+	-
I ₃₀ -89.	+	+	+	-	-	-	-
I ₃₀ -91.	+	+	+	+	+	+	-
I ₃₀ -101.	+	+	+	-	+	+	-
CEPAS Balsa Nueva 30 °C	ALA	ARG	HIS	MET	CIS	LIS	ASP
N ₃₀ -103,N ₃₀ -104,N ₃₀ -105,N ₃₀ -106,N ₃₀ -108,N ₃₀ -109, N ₃₀ -110,N ₃₀ -112,N ₃₀ -113,N ₃₀ -114,N ₃₀ -116,N ₃₀ -117, N ₃₀ -119,N ₃₀ -122,N ₃₀ -124,N ₃₀ -125,N ₃₀ -126,N ₃₀ -127, N ₃₀ -128,N ₃₀ -131,N ₃₀ -134,N ₃₀ -135,N ₃₀ -137,N ₃₀ -139, N ₃₀ -140,N ₃₀ -141,N ₃₀ -142,N ₃₀ -143.	-	-	-	-	-	-	-
N ₃₀ -107,N ₃₀ -132.	-	-	+	-	-	-	-
N ₃₀ -111,N ₃₀ -118,N ₃₀ -136,N ₃₀ -138,N ₃₀ -144.	+	-	-	-	-	-	-
N ₃₀ -115,N ₃₀ -129.	+	-	+	-	-	-	-
N ₃₀ -120.	-	-	-	+	-	+	+
N ₃₀ -121,N ₃₀ -123,N ₃₀ -133.	+	-	+	-	+	+	-
N ₃₀ -130.	+	-	+	+	+	+	-
CEPAS Balsa Vieja 30 °C	ALA	ARG	HIS	MET	CIS	LIS	ASP
V ₃₀ -145,V ₃₀ -150,V ₃₀ -151,V ₃₀ -155,V ₃₀ -157,V ₃₀ -158, V ₃₀ -159,V ₃₀ -160,V ₃₀ -163,V ₃₀ -164,V ₃₀ -165,V ₃₀ -167, V ₃₀ -169,V ₃₀ -170,V ₃₀ -171,V ₃₀ -172.	-	-	-	-	-	-	-
V ₃₀ -146.	+	+	+	+	+	+	-
V ₃₀ -147,V ₃₀ -149.	+	+	-	+	+	+	-
V ₃₀ -148.	+	+	-	+	+	-	-
V ₃₀ -152,V ₃₀ -153.	-	-	-	-	-	-	+
V ₃₀ -154.	+	+	-	-	+	-	+
V ₃₀ -156.	-	-	-	+	-	+	+
V ₃₀ -161.	-	-	-	+	-	-	+
V ₃₀ -162.	-	-	-	-	+	-	-
V ₃₀ -166.	-	+	-	-	-	+	-
V ₃₀ -168.	+	+	-	-	-	+	-

IV.3.1.1.7. Pruebas de utilización de ácidos como única fuente de carbono y energía.

Los resultados obtenidos sobre la capacidad de utilización de ácidos como única fuente de carbono y energía de cada microorganismo, se encuentran en la tabla 20 y las abreviaturas para referirnos a los ácidos son: **OX**:ac. oxálico; **FU**:ac. fumárico; **Mal**:ac. málico; **PRO**:ac. propiónico; **MAL**:ac. malónico; **BEN**:ac. benzoico; **TAR**:ac. tartárico; **GLU**:ac. glutámico.

Tabla 20. Utilización de ácidos como única fuente de carbono y energía.

CEPAS ENTRADA 30 °C	OX	FU	MÁL	PRO	MALO	BEN	TAR	GLU
E ₃₀ -1,E ₃₀ -7,E ₃₀ -8,E ₃₀ -28.	+	+	-	+	-	-	-	-
E ₃₀ -2.	-	-	-	-	-	-	-	-
E ₃₀ -3.	+	-	+	+	-	-	-	-
E ₃₀ -4,E ₃₀ -6,E ₃₀ -10,E ₃₀ -13,E ₃₀ -17,E ₃₀ -19, E ₃₀ -29,E ₃₀ -30.	+	+	+	+	-	-	-	-
E ₃₀ -5.	+	+	+	+	+	+	+	+
E ₃₀ -9, E ₃₀ -11.	-	+	-	+	-	-	-	-
E ₃₀ -12.	-	+	+	-	-	-	-	-
E ₃₀ -14.	+	+	+	+	+	-	+	+
E ₃₀ -15.	-	+	+	+	+	+	-	-
E ₃₀ -16.	-	-	+	-	-	-	-	-
E ₃₀ -18.	+	+	+	+	-	+	-	+
E ₃₀ -20,E ₃₀ -26.	-	+	+	+	-	-	-	-
E ₃₀ -21.	-	-	-	-	+	-	-	-
E ₃₀ -22.	-	+	-	-	-	-	-	-
E ₃₀ -23.	-	+	+	-	-	-	-	-
E ₃₀ -24,E ₃₀ -25,E ₃₀ -27.	-	+	+	+	+	-	-	-
CEPAS ENTRADA 55 °C	OX	FU	MÁL	PRO	MALÓ	BEN	TAR	GLU
E ₅₅ -31.	+	+	+	+	-	-	-	-
E ₅₅ -32,E ₅₅ -54,E ₅₅ -57.	-	-	-	-	-	-	-	-
E ₅₅ -33,E ₅₅ -40,E ₅₅ -44,E ₅₅ -51,E ₅₅ -55,E ₅₅ -64, E ₅₅ -66.	+	+	+	+	-	+	-	-
E ₅₅ -34,E ₅₅ -39,E ₅₅ -50.	-	+	-	+	-	-	-	-
E ₅₅ -35,E ₅₅ -63.	+	+	+	-	-	-	-	-
E ₅₅ -36.	-	+	+	+	-	-	-	+
E ₅₅ -37.	-	+	+	+	-	-	+	-
E ₅₅ -38.	+	-	+	+	+	+	-	-
E ₅₅ -41.	+	+	-	+	-	+	+	-
E ₅₅ -42.	+	+	-	+	+	-	-	-
E ₅₅ -43.	+	+	-	-	-	-	-	-
E ₅₅ -45,E ₅₅ -47,E ₅₅ -65.	-	+	+	-	-	-	-	-

Resultados y discusión

Tabla 20. Utilización de ácidos como única fuente de carbono y energía (continuación).

CEPAS ENTRADA 55 °C	OX	FU	MÁL	PRO	MALÓ	BEN	TAR	GLU
E ₅₅ -46.	+	+	-	+	-	-	-	-
E ₅₅ -48.	-	-	+	-	-	-	-	-
E ₅₅ -49.	+	-	+	-	-	-	+	+
E ₅₅ -52.	-	-	-	+	-	-	-	-
E ₅₅ -53.	-	-	+	+	-	-	-	-
E ₅₅ -56,E ₅₅ -58.	-	-	-	-	-	-	-	+
E ₅₅ -59.	-	-	+	-	-	-	-	+
E ₅₅ -60.	-	-	-	-	+	-	-	-
E ₅₅ -61.	-	+	+	+	-	-	-	-
E ₅₅ -62.	-	+	+	-	-	-	+	-
CEPAS A PIE DE TUBERIA 30 °C	OX	FU	MÁL	PRO	MALÓ	BEN	TAR	GLU
I ₃₀ -67,I ₃₀ -68,I ₃₀ -72,I ₃₀ -77,I ₃₀ -78,I ₃₀ -80,I ₃₀ -86, I ₃₀ -89,I ₃₀ -90,I ₃₀ -94,I ₃₀ -99.	+	+	+	+	-	-	-	-
I ₃₀ -69,I ₃₀ -84.	-	+	+	-	-	-	-	-
I ₃₀ -70.	-	-	+	-	-	-	-	-
I ₃₀ -71.	+	+	+	-	-	-	-	-
I ₃₀ -73.	+	+	+	+	-	-	-	+
I ₃₀ -74,I ₃₀ -88,I ₃₀ -95,I ₃₀ -98,I ₃₀ -102.	-	+	+	+	-	-	-	-
I ₃₀ -75.	+	+	+	+	-	+	-	-
I ₃₀ -76.	-	+	-	+	-	+	-	-
I ₃₀ -79.	-	-	-	+	-	+	-	-
I ₃₀ -81.	-	+	-	-	-	+	-	-
I ₃₀ -82.	+	+	+	-	+	-	+	-
I ₃₀ -83,I ₃₀ -96.	-	-	-	-	-	-	-	-
I ₃₀ -85.	-	+	-	-	-	-	-	-
I ₃₀ -87.	+	+	+	-	+	+	+	+
I ₃₀ -91.	+	+	+	+	+	+	+	+
I ₃₀ -92,I ₃₀ -93.	+	+	+	+	-	-	+	-
I ₃₀ -97.	-	+	+	+	+	-	-	+
I ₃₀ -100.	+	-	+	-	-	-	-	-
I ₃₀ -101.	-	+	-	+	-	-	+	-
CEPA BALSA NUEVA 30 °C	OX	FU	MÁL	PRO	MALÓ	BEN	TAR	GLU
N ₃₀ -103,N ₃₀ -105.	-	-	+	-	-	-	-	-
N ₃₀ -104,N ₃₀ -114.	-	+	+	+	+	-	-	-
N ₃₀ -106.	-	-	-	+	+	-	-	-
N ₃₀ -107,N ₃₀ -111,N ₃₀ -141.	-	+	+	+	-	-	-	-
N ₃₀ -108,N ₃₀ -113.	-	+	+	-	-	-	-	-
N ₃₀ -109.	+	+	+	+	-	-	+	-
N ₃₀ -110.	-	+	+	+	-	-	-	+
N ₃₀ -112.	+	+	+	+	-	-	-	+
N ₃₀ -115,N ₃₀ -143.	+	+	+	+	-	+	-	-
N ₃₀ -116.	+	+	+	+	+	-	-	-

Tabla 20. Utilización de ácidos como única fuente de carbono y energía (continuación).

CEPAS BALSA NUEVA 30 °C	OX	FU	MÁL	PRO	MALÓ	BEN	TAR	GLU
N ₃₀ -117,N ₃₀ -125,N ₃₀ -138,N ₃₀ -140,N ₃₀ -144.	+	+	+	+	-	-	-	-
N ₃₀ -118.	+	+	+	-	-	+	-	-
N ₃₀ -119.	-	-	+	+	-	+	-	-
N ₃₀ -120.	-	+	+	-	-	-	+	+
N ₃₀ -121.	+	+	+	+	-	+	-	+
N ₃₀ -122,N ₃₀ -129.	-	-	+	+	-	-	-	-
N ₃₀ -123.	+	+	+	+	+	+	+	-
N ₃₀ -124.	-	-	+	+	-	+	-	-
N ₃₀ -126	-	+	-	+	-	-	-	-
N ₃₀ -127.	-	+	+	-	-	+	-	+
N ₃₀ -128.	-	-	-	+	-	+	-	-
N ₃₀ -130.	-	+	+	+	+	+	+	-
N ₃₀ -131.	+	+	+	+	+	+	+	+
N ₃₀ -132.	-	-	+	+	+	+	-	-
N ₃₀ -133.	+	+	+	-	+	+	+	+
N ₃₀ -134.	+	+	+	+	-	-	+	-
N ₃₀ -135.	-	+	+	-	+	-	-	-
N ₃₀ -136.	-	+	+	-	+	-	-	-
N ₃₀ -137.	-	+	+	-	+	-	-	-
N ₃₀ -139.	-	+	+	+	-	-	+	-
N ₃₀ -142.	-	+	+	+	-	+	-	-
CEPAS BALSA VIEJA 30 °C	OX	FU	MÁL	PRO	MALÓ	BEN	TAR	GLU
V ₃₀ -145.	+	+	+	-	-	-	-	-
V ₃₀ -146,V ₃₀ -147,V ₃₀ -149,V ₃₀ -151,V ₃₀ -155, V ₃₀ -157,V ₃₀ -158,V ₃₀ -159,V ₃₀ -160,V ₃₀ -163, V ₃₀ -167,V ₃₀ -170,V ₃₀ -171,V ₃₀ -172.	+	+	+	+	-	-	-	-
V ₃₀ -148.	+	+	+	+	-	-	+	-
V ₃₀ -150.	-	+	+	-	+	-	-	-
V ₃₀ -152,V ₃₀ -162.	-	-	+	+	-	-	-	-
V ₃₀ -153,V ₃₀ -154,V ₃₀ -161.	-	-	+	-	-	-	-	-
V ₃₀ -156.	+	+	+	-	-	-	+	+
V ₃₀ -164.	-	-	-	-	-	+	-	-
V ₃₀ -165.	+	+	+	+	-	-	-	+
V ₃₀ -166.	-	+	+	+	-	-	-	-
V ₃₀ -168.	+	+	+	+	-	-	+	+
V ₃₀ -169.	+	+	+	+	+	+	+	+

IV.3.1.1.8. Pruebas de producción de ácidos a partir de alcoholes.

En la tabla 21, se indican los resultados de producción de ácidos a partir de alcoholes, por los microorganismos seleccionados del residuo de las aceitunas de mesa, y la clave utilizada para cada alcohol es: **ADO**: adonitol; **MAN**: manitol; **DUL**: dulcitol; **INO**: myo-inositol.

Tabla 21. Producción de ácidos a partir de alcoholes.

CEPAS ENTRADA 30 °C	ADO	MAN	DUL	INO
E ₃₀ -1, E ₃₀ -2, E ₃₀ -3, E ₃₀ -5, E ₃₀ -6, E ₃₀ -7, E ₃₀ -8, E ₃₀ -9, E ₃₀ -10, E ₃₀ -11, E ₃₀ -12, E ₃₀ -13, E ₃₀ -15, E ₃₀ -17, E ₃₀ -18, E ₃₀ -19, E ₃₀ -20, E ₃₀ -22, E ₃₀ -24, E ₃₀ -25, E ₃₀ -26, E ₃₀ -28, E ₃₀ -29.	-	-	-	-
E ₃₀ -4, E ₃₀ -21.	+	-	-	-
E ₃₀ -14, E ₃₀ -16, E ₃₀ -23, E ₃₀ -27, E ₃₀ -30.	-	+	-	-
CEPAS ENTRADA 55 °C	ADO	MAN	DUL	INO
E ₅₅ -31, E ₅₅ -52.	+	-	+	-
E ₅₅ -32, E ₅₅ -33, E ₅₅ -34, E ₅₅ -35, E ₅₅ -37, E ₅₅ -39, E ₅₅ -41, E ₅₅ -45, E ₅₅ -47, E ₅₅ -49, E ₅₅ -51, E ₅₅ -53, E ₅₅ -54, E ₅₅ -58, E ₅₅ -62, E ₅₅ -63, E ₅₅ -64, E ₅₅ -65.	-	-	-	-
E ₅₅ -36, E ₅₅ -42, E ₅₅ -59.	-	-	+	-
E ₅₅ -38, E ₅₅ -43, E ₅₅ -46.	-	-	-	+
E ₅₅ -40, E ₅₅ -60, E ₅₅ -61.	+	-	-	+
E ₅₅ -44, E ₅₅ -48, E ₅₅ -55, E ₅₅ -57, E ₅₅ -66.	+	-	-	-
E ₅₅ -50, E ₅₅ -56.	-	+	+	-
CEPAS A PIE DE TUBERIA 30 °C	ADO	MAN	DUL	INO
I ₃₀ -67.	-	-	-	+
I ₃₀ -68, I ₃₀ -70, I ₃₀ -71, I ₃₀ -72, I ₃₀ -73, I ₃₀ -76, I ₃₀ -77, I ₃₀ -78, I ₃₀ -80, I ₃₀ -82, I ₃₀ -85, I ₃₀ -87, I ₃₀ -88, I ₃₀ -90, I ₃₀ -91, I ₃₀ -92, I ₃₀ -93, I ₃₀ -94, I ₃₀ -95, I ₃₀ -97, I ₃₀ -98, I ₃₀ -100, I ₃₀ -102.	-	-	-	-
I ₃₀ -69, I ₃₀ -83.	-	+	-	-
I ₃₀ -74.	-	+	+	+
I ₃₀ -75, I ₃₀ -86, I ₃₀ -89.	-	+	-	+
I ₃₀ -79, I ₃₀ -81.	+	+	-	-
I ₃₀ -84, I ₃₀ -96.	+	+	-	+
I ₃₀ -99.	-	-	+	+
I ₃₀ -101.	-	-	+	-
CEPAS BALSA NUEVA 30 °C	ADO	MAN	DUL	INO
N ₃₀ -103, N ₃₀ -104, N ₃₀ -105, N ₃₀ -106, N ₃₀ -108, N ₃₀ -109, N ₃₀ -111, N ₃₀ -113, N ₃₀ -114, N ₃₀ -115, N ₃₀ -116, N ₃₀ -117, N ₃₀ -118, N ₃₀ -119, N ₃₀ -120, N ₃₀ -121, N ₃₀ -123, N ₃₀ -124, N ₃₀ -126, N ₃₀ -128, N ₃₀ -129, N ₃₀ -130, N ₃₀ -132, N ₃₀ -133, N ₃₀ -134, N ₃₀ -135, N ₃₀ -136, N ₃₀ -138, N ₃₀ -140, N ₃₀ -143.	-	-	-	-
N ₃₀ -107.	-	-	+	+

Tabla 21. Producción de ácidos a partir de alcoholes (continuación).

CEPAS BALSA NUEVA 30 °C	ADO	MAN	DUL	INO
N ₃₀ -110.	-	+	-	+
N ₃₀ -112,N ₃₀ -141,N ₃₀ -144.	+	-	-	-
N ₃₀ -122,N ₃₀ -125,N ₃₀ -137.	-	-	-	+
N ₃₀ -127.	-	-	-	-
N ₃₀ -131.	-	+	-	-
N ₃₀ -139.	+	-	-	+
N ₃₀ -142.	+	-	+	-
CEPAS BALSA VIEJA 30 °C	ADO	MAN	DUL	INO
V ₃₀ -145,V ₃₀ -146,V ₃₀ -147,V ₃₀ -148,V ₃₀ -149,V ₃₀ -150,V ₃₀ -151,V ₃₀ -152, V ₃₀ -153,V ₃₀ -154,V ₃₀ -155,V ₃₀ -156,V ₃₀ -157,V ₃₀ -158,V ₃₀ -159,V ₃₀ -160, V ₃₀ -161,V ₃₀ -162,V ₃₀ -163,V ₃₀ -164,V ₃₀ -165,V ₃₀ -166,V ₃₀ -167,V ₃₀ -168, V ₃₀ -169,V ₃₀ -170,V ₃₀ -171.	-	-	-	-
V ₃₀ -172.	-	+	+	+

IV.3.1.1.9. Pruebas de producción de ácidos a partir de carbohidratos.

Los resultados de producción de ácidos, por los microorganismos problema, a partir de carbohidratos, se muestran en la tabla 22 y se leen de acuerdo a la siguiente clave:

GLU:glucosa; **CEL:**celobiosa; **GAL:**galactosa; **RAM:**ramnosa; **FRU:**fructosa; **SAC:**sacarosa;

XIL:xilosa; **MAN:**manosa.

Tabla 22. Producción de ácidos a partir de carbohidratos.

CEPAS ENTRADA 30 °C	GLU	CEL	GAL	RAM	FRU	SAC	XIL	MAN
E ₃₀ -1,E ₃₀ -2,E ₃₀ -3,E ₃₀ -5,E ₃₀ -6,E ₃₀ -7,E ₃₀ -9, E ₃₀ -12,E ₃₀ -15,E ₃₀ -16,E ₃₀ -21,E ₃₀ -22,E ₃₀ -24, E ₃₀ -29,E ₃₀ -30.	-	-	-	-	-	-	-	-
E ₃₀ - 4.	-	+	-	-	-	-	-	-
E ₃₀ -8,E ₃₀ -10,E ₃₀ -13.	-	-	-	-	+	-	-	-
E ₃₀ -11.	-	-	-	-	-	-	+	-
E ₃₀ -14.	+	-	-	-	+	-	-	+
E ₃₀ -17,E ₃₀ -23,E ₃₀ -25.	-	-	-	-	+	+	-	-
E ₃₀ -18.	-	-	-	-	-	+	-	-
E ₃₀ -19.	-	-	-	-	-	+	-	-
E ₃₀ -20.	-	-	-	-	-	+	-	+
E ₃₀ -26.	-	-	-	-	+	-	-	+
E ₃₀ -27.	-	+	-	-	+	-	-	-
E ₃₀ -28.	-	-	-	-	-	-	-	+
CEPAS ENTRADA 55 °C	GLU	CEL	GAL	RAM	FRU	SAC	XIL	MAN
E ₅₅ -31,E ₅₅ -54.	-	-	-	-	-	+	-	+
E ₅₅ -32,E ₅₅ -34,E ₅₅ -35,E ₅₅ -40,E ₅₅ -43,E ₅₅ -44, E ₅₅ -48,E ₅₅ -50,E ₅₅ -51,E ₅₅ -55,E ₅₅ -58,E ₅₅ -59, E ₅₅ -66.	-	-	-	-	-	-	-	-
E ₅₅ -33,E ₅₅ -47,E ₅₅ -53.	-	+	-	-	-	-	-	-
E ₅₅ -36.	-	-	-	-	+	-	+	+
E ₅₅ -37.	-	-	-	-	+	+	-	+
E ₅₅ -38.	-	+	-	-	+	-	-	-
E ₅₅ -39,E ₅₅ -65.	-	-	-	-	+	+	-	-
E ₅₅ -41.	-	+	+	+	+	+	+	+
E ₅₅ -42.	-	+	+	+	+	+	-	+
E ₅₅ -45,E ₅₅ -60.	-	-	-	-	-	+	-	-
E ₅₅ -46,E ₅₅ -57,E ₅₅ -62.	-	-	-	-	-	-	-	+
E ₅₅ -49,E ₅₅ -52,E ₅₅ -56,E ₅₅ -61.	-	-	-	-	+	-	-	-
E ₅₅ -63.	-	+	-	-	+	-	-	+
E ₅₅ -64.	-	-	-	-	+	-	-	+

Tabla 22. Producción de ácidos a partir de carbohidratos (continuación).

CEPAS A PIE DE TUBERIA 30 °C	GLU	CEL	GAL	RAM	FRU	SAC	XIL	MAN
I ₃₀ -67, I ₃₀ -69, I ₃₀ -68, I ₃₀ -72, I ₃₀ -73, I ₃₀ -75, I ₃₀ -82, I ₃₀ -84, I ₃₀ -85, I ₃₀ -86, I ₃₀ -87, I ₃₀ -89, I ₃₀ -90, I ₃₀ -91, I ₃₀ -92, I ₃₀ -93, I ₃₀ -94, I ₃₀ -95, I ₃₀ -96, I ₃₀ -99, I ₃₀ -102.	-	-	-	-	-	-	-	-
I ₃₀ -70, I ₃₀ -76, I ₃₀ -81, I ₃₀ -97.	-	-	-	-	+	-	-	-
I ₃₀ -71, I ₃₀ -78, I ₃₀ -100.	-	-	-	-	+	-	-	+
I ₃₀ -74.	+	-	-	-	-	-	-	-
I ₃₀ -77, I ₃₀ -83, I ₃₀ -101.	-	-	-	-	-	-	-	+
I ₃₀ -79, I ₃₀ -80.	-	-	-	-	+	+	-	-
I ₃₀ -88, I ₃₀ -98.	+	-	-	-	-	+	+	-
CEPAS BALSA NUEVA 30 °C	GLU	CEL	GAL	RAM	FRU	SAC	XIL	MAN
N ₃₀ -103, N ₃₀ -104, N ₃₀ -106, N ₃₀ -108, N ₃₀ -109, N ₃₀ -110, N ₃₀ -111, N ₃₀ -112, N ₃₀ -113, N ₃₀ -114, N ₃₀ -115, N ₃₀ -119, N ₃₀ -122, N ₃₀ -123, N ₃₀ -125, N ₃₀ -127, N ₃₀ -128, N ₃₀ -129, N ₃₀ -130, N ₃₀ -132, N ₃₀ -133, N ₃₀ -134, N ₃₀ -135, N ₃₀ -136, N ₃₀ -137, N ₃₀ -138, N ₃₀ -140, N ₃₀ -143, N ₃₀ -144.	-	-	-	-	-	-	-	-
N ₃₀ -105, N ₃₀ -120, N ₃₀ -121, N ₃₀ -141.	+	-	-	-	-	-	-	-
N ₃₀ -107.	-	-	-	-	+	+	+	-
N ₃₀ -116.	-	-	-	-	-	-	+	+
N ₃₀ -117.	-	-	-	-	-	-	+	-
N ₃₀ -118, N ₃₀ -139, N ₃₀ -142.	-	-	-	-	-	-	-	+
N ₃₀ -124.	-	-	-	-	-	+	-	-
N ₃₀ -126.	-	-	-	+	-	-	-	-
N ₃₀ -131.	-	-	-	-	+	+	-	+
CEPAS BALSA VIEJA 30 °C	GLU	CEL	GAL	RAM	FRU	SAC	XIL	MAN
V ₃₀ -145, V ₃₀ -150, V ₃₀ -151, V ₃₀ -153, V ₃₀ -155, V ₃₀ -156, V ₃₀ -157, V ₃₀ -158, V ₃₀ -159, V ₃₀ -161, V ₃₀ -162, V ₃₀ -163, V ₃₀ -164, V ₃₀ -165, V ₃₀ -167, V ₃₀ -168, V ₃₀ -169, V ₃₀ -171.	-	-	-	-	-	-	-	-
V ₃₀ -146, V ₃₀ -166.	-	-	-	-	-	+	-	-
V ₃₀ -147.	-	-	+	-	-	+	-	-
V ₃₀ -148, V ₃₀ -149, V ₃₀ -154, V ₃₀ -170, V ₃₀ -172.	+	-	-	-	-	-	-	-
V ₃₀ -152.	-	-	+	-	-	-	-	-
V ₃₀ -160.	+	-	+	-	-	-	-	-

IV.3.1.1.10. Otras pruebas bioquímicas.

Los resultados de las pruebas bioquímicas se presentan en la tabla 23 y la siguiente clave permite conocer la correspondencia de cada prueba: **IND**:indol; **R-M**:rojo de metilo; **V- P**: Vogues-Proskauer; **CIT**:citrato; **NITRA**:reducción de nitratos; **NITRI**:reducción de nitritos; **CETR**:crecimiento en medio Cetrimida.

Tabla 23. Otras pruebas bioquímicas.

CEPAS ENTRADA 30 °C	IND	R-M	V-P	CIT	NITRA	NITRI	CETR
E ₃₀ -1,E ₃₀ -2,E ₃₀ -3,E ₃₀ -5,E ₃₀ -6,E ₃₀ -7,E ₃₀ -8,E ₃₀ -11, E ₃₀ -27.	-	-	-	-	+	+	-
E ₃₀ -9,E ₃₀ -12,E ₃₀ -19; E ₃₀ - 4.	-	-	+	-	+	+	-
E ₃₀ -10.	-	-	-	-	-	+	-
E ₃₀ -13,E ₃₀ -24.	-	-	+	-	+	-	-
E ₃₀ -14,E ₃₀ -23,E ₃₀ -26,E ₃₀ -30.	-	-	-	-	-	-	-
E ₃₀ -15,E ₃₀ -16,E ₃₀ -21,E ₃₀ -25,E ₃₀ -29.	-	-	-	-	+	-	-
E ₃₀ -17.	-	-	-	+	-	-	-
E ₃₀ -18,E ₃₀ -22.	-	-	-	+	+	+	-
E ₃₀ -20.	-	-	+	+	-	-	-
E ₃₀ -28.	-	-	-	-	+	-	-
CEPAS ENTRADA 55 °C	IND	R-M	V-P	CIT	NITRA	NITRI	CETR
E ₅₅ -31,E ₅₅ -33,E ₅₅ -35,E ₅₅ -36,E ₅₅ -37,E ₅₅ -40, E ₅₅ -42,E ₅₅ -43,E ₅₅ -44,E ₅₅ -45,E ₅₅ -47,E ₅₅ -49, E ₅₅ -53,E ₅₅ -54,E ₅₅ -55,E ₅₅ -56,E ₅₅ -57,E ₅₅ -58, E ₅₅ -59,E ₅₅ -61,E ₅₅ -63,E ₅₅ -64.	-	-	-	-	+	+	-
E ₅₅ -32,E ₅₅ -38,E ₅₅ -48,E ₅₅ -52.	-	-	-	+	+	+	-
E ₅₅ -34,E ₅₅ -39,E ₅₅ -41,E ₅₅ -50,E ₅₅ -51,E ₅₅ -60, E ₅₅ -62.	-	+	-	-	+	+	-
E ₅₅ -46.	-	+	-	+	+	+	-
E ₅₅ -65.	-	-	+	+	+	+	-
E ₅₅ -66.	-	-	-	+	+	-	-
CEPAS A PIE DE TUBERIA 30 °C	IND	R-M	V-P	CIT	NITRA	NITRI	CETR
I ₃₀ -67,I ₃₀ -76,I ₃₀ -83,I ₃₀ -86.	-	-	+	-	+	-	-
I ₃₀ -68,I ₃₀ -69,I ₃₀ -70,I ₃₀ -73,I ₃₀ -74,I ₃₀ -75,I ₃₀ -77, I ₃₀ -85,I ₃₀ -92,I ₃₀ -93,I ₃₀ -94,I ₃₀ -95,I ₃₀ -96,I ₃₀ -102.	-	-	-	-	+	+	-
I ₃₀ -71,I ₃₀ -72,I ₃₀ -78,I ₃₀ -82,I ₃₀ -90,I ₃₀ -97,I ₃₀ -98, I ₃₀ -99.	-	-	+	-	+	+	-
I ₃₀ -79.	-	+	-	+	+	+	-
I ₃₀ -80,I ₃₀ -81,I ₃₀ -88.	-	-	+	+			
I ₃₀ -84.	-	+	-	-	+	+	-

Tabla 23. Otras pruebas bioquímicas (continuación).

CEPAS A PIE DE TUBERIA 30 °C	IND	R-M	V-P	CIT	NITRA	NITRI	CETR
I ₃₀ -87.	-	-	-	-	-	-	-
I ₃₀ -89.	-	-	-	+	+	+	-
I ₃₀ -91, I ₃₀ -101.	-	-	+	+	+	+	-
I ₃₀ -100.	-	-	-	-	+	-	-
N ₃₀ -103, N ₃₀ -104, N ₃₀ -105, N ₃₀ -119, N ₃₀ -120.	-	-	-	-	+	-	-
N ₃₀ -106, N ₃₀ -109, N ₃₀ -111, N ₃₀ -112, N ₃₀ -114, N ₃₀ -115, N ₃₀ -116, N ₃₀ -117, N ₃₀ -125, N ₃₀ -126, N ₃₀ -128, N ₃₀ -129, N ₃₀ -131, N ₃₀ -134, N ₃₀ -136, N ₃₀ -137, N ₃₀ -138, N ₃₀ -140, N ₃₀ -141, N ₃₀ -142, N ₃₀ -143.	-	-	-	-	+	+	-
N ₃₀ -107.	-	+	-	-	+	+	-
N ₃₀ -108, N ₃₀ -124.	-	+	-	-	+	+	-
N ₃₀ -110, N ₃₀ -122, N ₃₀ -139.	-	+	-	+	+	+	-
N ₃₀ -113.	-	-	+	-	+	+	-
N ₃₀ -118.	-	+	-	-	-	-	-
N ₃₀ -121, N ₃₀ -123, N ₃₀ -130, N ₃₀ -133.	-	-	-	+	+	+	-
N ₃₀ -127, N ₃₀ -132, N ₃₀ -135.	-	-	-	-	-	-	-
N ₃₀ -144.	-	+	-	-	+	-	-
CEPAS Balsa Vieja 30 °C	IND	R-M	V-P	CIT	NITRA	NITRI	CETR
V ₃₀ -145, V ₃₀ -161, V ₃₀ -167, V ₃₀ -171.	-	+	-	-	+	-	-
V ₃₀ -146, V ₃₀ -147, V ₃₀ -149, V ₃₀ -150, V ₃₀ -154, V ₃₀ -162.	-	-	-	+	+	-	-
V ₃₀ -148.	-	-	-	-	+	-	-
V ₃₀ -151, V ₃₀ -153, V ₃₀ -155, V ₃₀ -156, V ₃₀ -157, V ₃₀ -158, V ₃₀ -159, V ₃₀ -166, V ₃₀ -169, V ₃₀ -170.	-	-	-	-	+	-	-
V ₃₀ -152, V ₃₀ -160, V ₃₀ -165.	-	-	-	-	-	-	-
V ₃₀ -163.	-	+	-	-	+	+	-
V ₃₀ -164, V ₃₀ -172.	-	-	-	-	+	+	-
V ₃₀ -168.	-	+	-	+	+	-	-

IV.3.1.1.11. Pruebas de producción de hidrólisis.

La capacidad de hidrolizar determinadas proteínas para poner de manifiesto la presencia de las enzimas en las bacterias a estudiar fue el objetivo de esta prueba. Los resultados se presentan en la tabla 24 y se leen de acuerdo a la siguiente clave: **ALM**:hidrólisis almidón; **CAS**:hidrólisis caseína; **ESC**:hidrólisis esculina; **GEL**:hidrólisis gelatina; **TIR**:hidrólisis tirosina; **T20**:hidrólisis Tween 20; **T40**:hidrólisis Tween 40; **T80**: hidrólisis Tween 80.

Tabla 24. Pruebas de producción de hidrólisis.

CEPAS ENTRADA 30 °C	ALM	CAS	ESC	GEL	TIR	T20	T40	T80
E ₃₀ -1,E ₃₀ -3,E ₃₀ -11,E ₃₀ -17,E ₃₀ -18.	-	+	+	+	-	-	-	-
E ₃₀ - 2,E ₃₀ -23.	-	+	-	+	-	-	-	-
E ₃₀ - 4,E ₃₀ -5,E ₃₀ -15,E ₃₀ -21,E ₃₀ -22,E ₃₀ -24,E ₃₀ -25, E ₃₀ -26,E ₃₀ -27,E ₃₀ -28,E ₃₀ -29.	-	-	+	+	-	-	-	-
E ₃₀ -6,E ₃₀ -7,E ₃₀ -8,E ₃₀ -9,E ₃₀ -12,E ₃₀ -13,E ₃₀ -16, E ₃₀ -19,E ₃₀ -30.	+	+	+	+	-	-	-	-
E ₃₀ -10.	+	+	-	+	-	-	-	-
E ₃₀ -14.	-	-	-	-	-	-	-	-
E ₃₀ -20.	-	-	+	-	-	-	-	-
CEPAS ENTRADA 55 °C	ALM	CAS	ESC	GEL	TIR	T20	T40	T80
E ₅₅ -31,E ₅₅ -32,E ₅₅ -38,E ₅₅ -42,E ₅₅ -45,E ₅₅ -47,E ₅₅ -48, E ₅₅ -51,E ₅₅ -54,E ₅₅ -56,E ₅₅ -58,E ₅₅ -62,E ₅₅ -66.	-	-	+	-	-	-	-	-
E ₅₅ -33,E ₅₅ -35,E ₅₅ -36,E ₅₅ -37,E ₅₅ -39,E ₅₅ -40, E ₅₅ -41,E ₅₅ -46,E ₅₅ -52,E ₅₅ -53,E ₅₅ -55,E ₅₅ -57, E ₅₅ -59,E ₅₅ -60,E ₅₅ -61.	-	-	+	+	-	-	-	-
E ₅₅ -34.	-	-	-	+	-	-	-	-
E ₅₅ -43,E ₅₅ -44,E ₅₅ -64,E ₅₅ -65.	+	+	+	+	-	-	-	-
E ₅₅ -49,E ₅₅ -50,E ₅₅ -63.	+	-	+	+	-	-	-	-
CEPAS A PIE DE TUBERIA 30 °C	ALM	CAS	ESC	GEL	TIR	T20	T40	T80
I ₃₀ -67,I ₃₀ -68,I ₃₀ -69,I ₃₀ -86,I ₃₀ -89,I ₃₀ -90,I ₃₀ -100.	-	-	-	-	-	-	-	-
I ₃₀ -70,I ₃₀ -73,I ₃₀ -77,I ₃₀ -78,I ₃₀ -79,I ₃₀ -80,I ₃₀ -83, I ₃₀ -87,I ₃₀ -94,I ₃₀ -99.	-	-	+	+	-	-	-	-
I ₃₀ -71,I ₃₀ -76.	+	-	+	+	-	-	-	-
I ₃₀ -72,I ₃₀ -74,I ₃₀ -75,I ₃₀ -82,I ₃₀ -85,I ₃₀ -88,I ₃₀ -92, I ₃₀ -93,I ₃₀ -95,I ₃₀ -96,I ₃₀ -97,I ₃₀ -98,I ₃₀ -101,I ₃₀ -102.	+	+	+	+	-	-	-	-
I ₃₀ -81.	+	+	-	+	-	-	-	-
I ₃₀ -84.	-	-	+	-	-	-	-	-
I ₃₀ -91.	+	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 24. Pruebas de hidrólisis (continuación).

CEPAS Balsa Nueva 30 °C	ALM	CAS	ESC	GEL	TIR	T20	T40	T80
N ₃₀ -103,N ₃₀ -104,N ₃₀ -106.	+	-	+	-	-	-	-	-
N ₃₀ -105,N ₃₀ -116,N ₃₀ -117,N ₃₀ -125,N ₃₀ -137, N ₃₀ -138,N ₃₀ -140,N ₃₀ -141,N ₃₀ -142.	+	+	+	+	-	-	-	-
N ₃₀ -107,N ₃₀ -110,N ₃₀ -113,N ₃₀ -114,N ₃₀ -115, N ₃₀ -118,N ₃₀ -119,N ₃₀ -120,N ₃₀ -122,N ₃₀ -124, N ₃₀ -126,N ₃₀ -127,N ₃₀ -128,N ₃₀ -136,N ₃₀ -139, N ₃₀ -144.	-	-	+	+	-	-	-	-
N ₃₀ -108.	-	+	-	+	-	-	-	-
N ₃₀ -109.	-	-	+	+	-	-	-	-
N ₃₀ -111,N ₃₀ -112,N ₃₀ -134.	+	-	+	+	-	-	-	-
N ₃₀ -121,N ₃₀ -123,N ₃₀ -129,N ₃₀ -130,N ₃₀ -133.	-	-	-	-	-	-	-	-
N ₃₀ -131.	-	-	+	-	-	-	-	-
N ₃₀ -132,N ₃₀ -135,N ₃₀ -143.	-	-	-	+	-	-	-	-
CEPAS Balsa Vieja 30 °C	ALM	CAS	ESC	GEL	TIR	T20	T40	T80
V ₃₀ -145,V ₃₀ -150,V ₃₀ -158,V ₃₀ -161,V ₃₀ -166, V ₃₀ -169,V ₃₀ -170,V ₃₀ -171.	-	-	+	+	-	-	-	-
V ₃₀ -146,V ₃₀ -156,V ₃₀ -159,V ₃₀ -167,V ₃₀ -168.	-	-	-	-	-	-	-	-
V ₃₀ -147,V ₃₀ -153.	-	-	+	-	-	-	-	-
V ₃₀ -148,V ₃₀ -149,V ₃₀ -151,V ₃₀ -155,V ₃₀ -157, V ₃₀ -164,V ₃₀ -172.	+	+	+	+	-	-	-	-
V ₃₀ -152,V ₃₀ -154,V ₃₀ -162.	+	-	+	+	-	-	-	-
V ₃₀ -160.	-	+	+	+	-	-	-	-
V ₃₀ -163.	-	-	+	-	-	-	-	-
V ₃₀ -165.	+	-	+	-	-	-	-	-

IV.3.1.1.12. Pruebas de susceptibilidad a antibióticos.

Los resultados de susceptibilidad a los antibióticos probados se presentan en la tabla 25. Cada antibiótico se denominó con la clave que a continuación se especifica: cloranfenicol-**1C**; tetraciclina-**2TE**; ampicilina-**3AM**; kanamicina-**4K**; amikacina-**5AN**; clindamicina-**6CC**; gentamicina-**7GM**; rifampicina-**8RA**; eritromicina-**9E**; polimixina B-**10PB**; estreptomina-**11S**; cefalotina-**12CF**; ac.nalidixico-**13NA**; penicilina G-**14P**; Sulfamida-**15G**.

Tabla 25. Pruebas de susceptibilidad a antibióticos.

CEPAS	1C	2TE	3AM	4K	5AN	6CC	7GM	8RA	9E	10PB	11S	12CF	13NA	14P	15G
E ₃₀ -1	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	S
E ₃₀ -2	S	I	S	R	I	R	R	S	S	R	R	S	I	I	I
E ₃₀ -3	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S
E ₃₀ -4	I	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R
E ₃₀ -5	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	I
E ₃₀ -6	S	I	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S	S	I	R
E ₃₀ -7	S	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S	R	S	R
E ₃₀ -8	R	I	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	I	R
E ₃₀ -9	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	I	S
E ₃₀ -10	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R
E ₃₀ -11	R	R	I	R	R	R	R	S	S	R	R	I	R	I	R
E ₃₀ -12	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R
E ₃₀ -13	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	I
E ₃₀ -14	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	R
E ₃₀ -15	R	R	I	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	I	I
E ₃₀ -16	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	S
E ₃₀ -17	I	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	S	R
E ₃₀ -18	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	I	I	S	R
E ₃₀ -19	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R
E ₃₀ -20	I	R	I	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	I	R
E ₃₀ -21	I	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	I	S
E ₃₀ -22	I	I	I	I	I	R	S	S	S	R	R	S	R	I	S
E ₃₀ -23	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
E ₃₀ -24	I	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	S	R
E ₃₀ -25	I	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	S	R
E ₃₀ -26	I	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	R
E ₃₀ -27	I	I	I	I	I	R	S	R	S	R	R	S	S	S	R
E ₃₀ -28	I	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	S
E ₃₀ -29	S	R	R	R	R	S	I	S	S	R	R	S	R	S	R
E ₃₀ -30	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R
E ₅₅ -31	R	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	R	I	I
E ₅₅ -32	S	R	S	R	R	R	I	S	R	R	R	S	R	I	R
E ₅₅ -33	S	R	S	R	R	R	R	S	I	R	R	S	R	I	R
E ₅₅ -34	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R	I	S
E ₅₅ -35	I	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	I	S
E ₅₅ -36	R	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	R	I	R
E ₅₅ -37	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	R

Tabla 25. Pruebas de susceptibilidad a antibióticos (continuación).

CEPAS	1C	2TE	3AM	4K	5AN	6CC	7GM	8RA	9E	10PB	11S	12CF	13NA	14P	15G
E ₅₅ -38	I	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	I	S
E ₅₅ -39	I	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	S	R
E ₅₅ -40	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	S
E ₅₅ -41	I	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R
E ₅₅ -42	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R	I	S
E ₅₅ -43	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	S
E ₅₅ -44	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	S
E ₅₅ -45	R	S	I	S	S	R	R	S	S	R	R	S	R	I	S
E ₅₅ -46	R	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	R	I	S
E ₅₅ -47	I	R	I	R	R	S	R	S	I	R	R	S	R	I	S
E ₅₅ -48	I	R	I	R	R	S	R	S	S	R	R	S	R	S	R
E ₅₅ -49	S	R	S	R	R	R	I	S	S	R	R	S	R	I	R
E ₅₅ -50	I	R	I	R	R	S	R	S	S	R	R	S	R	I	S
E ₅₅ -51	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	S
E ₅₅ -52	S	R	S	R	R	R	I	S	S	R	R	S	R	I	S
E ₅₅ -53	I	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	S
E ₅₅ -54	I	R	S	R	R	S	R	S	I	R	R	S	R	I	S
E ₅₅ -55	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	S
E ₅₅ -56	I	R	I	R	R	S	R	S	S	R	R	S	R	I	S
E ₅₅ -57	I	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	S
E ₅₅ -58	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S	R	S	S
E ₅₅ -59	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	R
E ₅₅ -60	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	R
E ₅₅ -61	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S
E ₅₅ -62	I	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	R	I	S
E ₅₅ -63	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	S
E ₅₅ -64	S	R	S	R	R	R	S	S	I	I	I	I	I	I	R
E ₅₅ -65	S	R	S	R	R	S	S	S	I	I	I	I	I	S	S
E ₅₅ -66	I	R	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R
I ₃₀ -67	S	R	S	R	R	S	I	S	S	R	R	S	S	I	R
I ₃₀ -68	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	I	R
I ₃₀ -69	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	R
I ₃₀ -70	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R
I ₃₀ -71	S	R	R	R	R	R	I	S	S	R	R	I	R	I	R
I ₃₀ -72	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R
I ₃₀ -73	I	R	R	R	R	S	I	S	S	R	R	R	I	R	R
I ₃₀ -74	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	S
I ₃₀ -75	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
I ₃₀ -76	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	I	S	R
I ₃₀ -77	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	I	R	I	R
I ₃₀ -78	R	R	S	I	I	S	S	S	S	R	R	I	R	S	R
I ₃₀ -79	R	R	I	R	R	R	I	S	R	R	R	S	R	I	S
I ₃₀ -80	I	I	S	R	R	R	I	S	R	R	R	S	R	I	S
I ₃₀ -81	R	I	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	I	I	S
I ₃₀ -82	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	I	R	R
I ₃₀ -83	I	R	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
I ₃₀ -84	I	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	R
I ₃₀ -85	R	I	I	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	R
I ₃₀ -86	S	S	S	R	R	S	I	S	S	R	R	S	S	I	I
I ₃₀ -87	S	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R	S
I ₃₀ -88	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	I	S

Tabla 25. Pruebas de susceptibilidad a antibióticos (continuación).

CEPAS	1C	2TE	3AM	4K	5AN	6CC	7GM	8RA	9E	10PB	11S	12CF	13NA	14P	15G
I ₃₀ -89	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	I	I	S
I ₃₀ -90	I	R	S	R	R	S	I	S	S	R	R	I	I	R	R
I ₃₀ -91	S	R	S	S	S	R	R	S	R	S	R	S	S	I	S
I ₃₀ -92	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R
I ₃₀ -93	S	R	I	R	I	S	R	S	S	R	R	I	R	R	R
I ₃₀ -94	S	R	I	R	R	R	R	S	S	R	R	I	R	I	R
I ₃₀ -95	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	R
I ₃₀ -96	S	R	R	R	R	S	I	S	S	R	R	S	I	I	R
I ₃₀ -97	I	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	I	I	R	R
I ₃₀ -98	S	R	S	R	R	R	I	S	S	R	R	I	I	I	S
I ₃₀ -99	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	R	I	R
I ₃₀ -100	S	R	R	R	R	I	I	S	R	R	R	S	R	I	R
I ₃₀ -101	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	R	I	R
I ₃₀ -102	I	R	R	R	I	S	I	S	S	R	R	I	I	R	R
N ₃₀ -103	S	R	S	R	I	S	I	S	S	R	R	S	S	S	R
N ₃₀ -104	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	I	R
N ₃₀ -105	S	R	S	R	I	S	R	S	S	R	R	S	S	S	R
N ₃₀ -106	S	R	S	R	I	R	S	S	S	R	R	R	R	I	S
N ₃₀ -107	R	R	S	R	R	S	R	S	I	R	R	S	R	S	R
N ₃₀ -108	S	I	S	R	S	R	I	S	S	R	R	I	S	R	R
N ₃₀ -109	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	S
N ₃₀ -110	R	R	I	R	R	S	R	S	I	R	R	S	R	S	S
N ₃₀ -111	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	I	R
N ₃₀ -112	S	R	I	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	I	R
N ₃₀ -113	S	R	S	R	R	R	I	S	S	R	R	S	S	S	R
N ₃₀ -114	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	R
N ₃₀ -115	S	R	I	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	I	S
N ₃₀ -116	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R
N ₃₀ -117	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	I	S	R	R
N ₃₀ -118	S	R	S	R	I	R	I	S	S	R	R	S	R	I	R
N ₃₀ -119	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	S	S
N ₃₀ -120	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	S	R
N ₃₀ -121	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	S	S	I	R
N ₃₀ -122	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	R
N ₃₀ -123	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	R	S	S	I	S
N ₃₀ -124	S	S	S	I	S	R	I	S	S	R	R	S	R	S	S
N ₃₀ -125	S	R	S	R	S	S	I	S	S	R	R	S	S	R	R
N ₃₀ -126	R	R	I	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R
N ₃₀ -127	I	R	S	R	I	R	R	S	S	R	R	S	R	S	R
N ₃₀ -128	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	R
N ₃₀ -129	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	S	R
N ₃₀ -130	S	R	S	R	I	R	R	S	R	S	R	S	S	I	R
N ₃₀ -131	S	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S	R
N ₃₀ -132	S	R	S	I	S	R	I	S	S	R	R	S	R	I	S
N ₃₀ -133	S	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S	R
N ₃₀ -134	S	R	S	R	S	R	I	S	S	R	R	I	S	S	R
N ₃₀ -135	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	I	S
N ₃₀ -136	R	R	S	R	R	R	I	S	S	R	R	S	R	S	R
N ₃₀ -137	S	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	R
N ₃₀ -138	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	R	I	I	R	R

Tabla 25. Pruebas de susceptibilidad a antibióticos (continuación).

CEPAS	1C	2TE	3AM	4K	5AN	6CC	7GM	8RA	9E	10PB	11S	12CF	13NA	14P	15G
N ₃₀ -139	R	R	I	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	S
N ₃₀ -140	S	R	R	R	S	S	I	S	S	R	R	I	I	R	R
N ₃₀ -141	S	R	R	R	S	S	I	S	S	R	R	I	S	R	R
N ₃₀ -142	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	I	S	I	R
N ₃₀ -143	S	R	S	R	S	I	I	I	S	R	R	S	S	I	I
N ₃₀ -144	R	R	S	R	S	R	R	S	S	R	R	S	R	S	R
V ₃₀ -145	R	R	I	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R
V ₃₀ -146	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R
V ₃₀ -147	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R
V ₃₀ -148	S	R	R	R	R	R	R	S	I	R	S	S	S	S	R
V ₃₀ -149	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R
V ₃₀ -150	R	R	I	R	R	S	R	S	S	R	R	S	R	I	R
V ₃₀ -151	S	I	S	I	I	S	I	S	S	R	R	S	R	I	I
V ₃₀ -152	S	R	S	R	R	I	I	I	S	R	R	S	R	I	I
V ₃₀ -153	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	R	I	R
V ₃₀ -154	I	R	R	R	R	S	I	I	S	R	R	S	R	I	R
V ₃₀ -155	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	S	I	R
V ₃₀ -156	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R
V ₃₀ -157	S	R	I	R	I	S	R	S	S	R	R	S	R	S	R
V ₃₀ -158	R	R	I	R	R	S	R	S	S	R	R	S	R	S	I
V ₃₀ -159	S	S	S	S	I	S	I	S	S	R	R	S	R	I	R
V ₃₀ -160	S	R	S	R	R	S	I	S	S	R	R	S	R	S	R
V ₃₀ -161	I	R	S	R	R	S	R	I	S	R	R	S	S	S	S
V ₃₀ -162	I	R	I	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	R
V ₃₀ -163	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	R
V ₃₀ -164	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	I	R
V ₃₀ -165	S	R	S	R	R	S	I	S	S	R	R	R	R	I	R
V ₃₀ -166	R	R	I	R	I	S	R	S	R	R	R	S	R	I	S
V ₃₀ -167	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	I	R	R
V ₃₀ -168	S	R	S	R	R	S	I	S	R	R	R	S	S	I	I
V ₃₀ -169	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	I	S
V ₃₀ -170	S	R	S	R	I	R	I	I	R	S	R	S	S	I	S
V ₃₀ -171	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	I	R	R
V ₃₀ -172	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	I	S

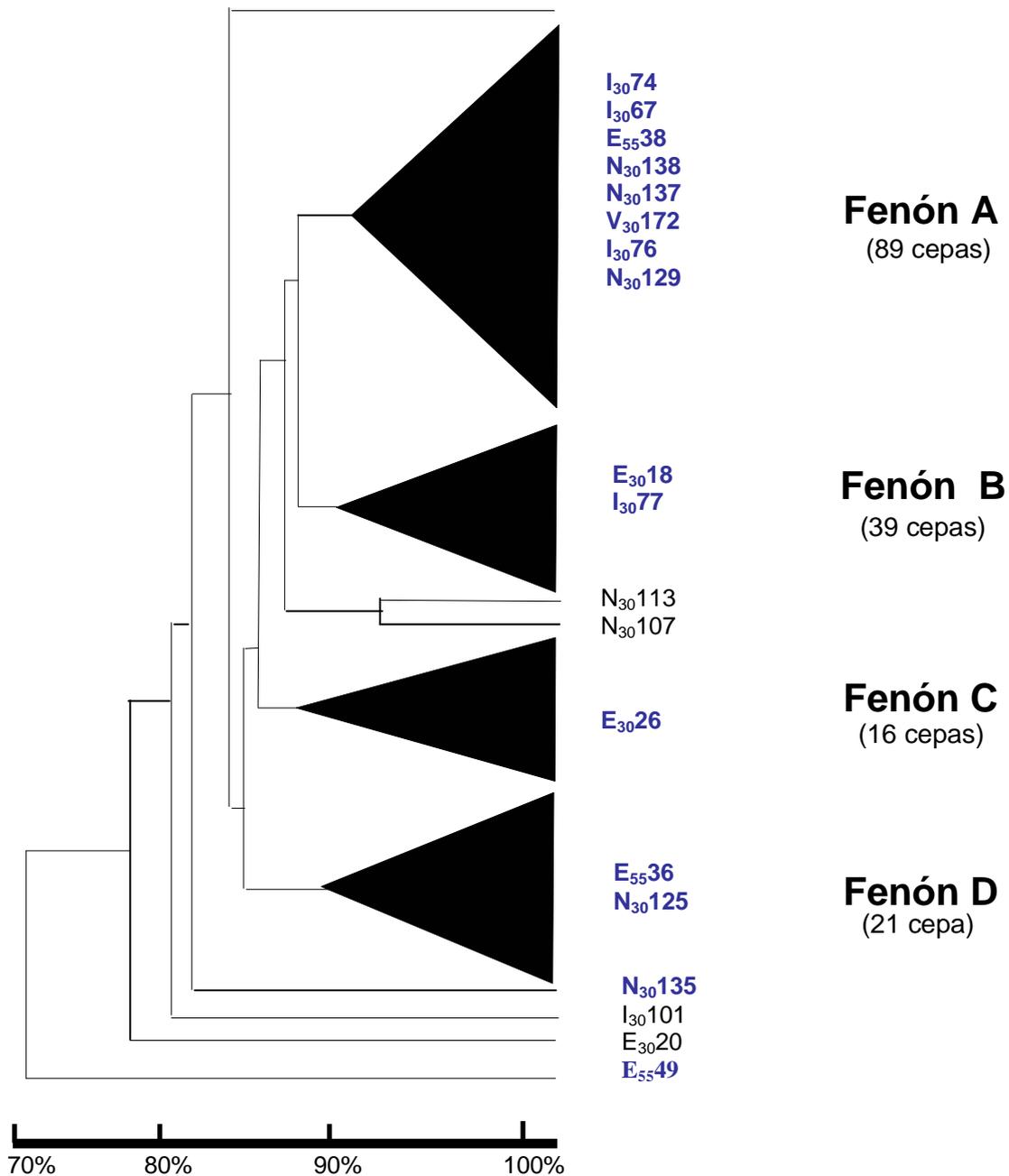
IV.3.1.2. Análisis numérico.

Los datos obtenidos en las distintas pruebas fueron analizados empleando uno de los coeficientes más comunes utilizados en taxonomía numérica de bacterias por utilizar las concordancias negativas como es el coeficiente de agrupamiento "simple matching" de **Sokal y Michener** (1958). Para el análisis de agrupación se utilizó la técnica de agrupamiento **UPGMA** (Unweighted Pair Group Average) (Sneath y Sokal, 1973).

Resultados y discusión

El programa informático fue **TAXAN 2.0**. Este programa generó la matriz de semejanza (se encuentra en el Anexo 1). Aplicando el **70%** de semejanza las cepas se agruparon en 4 fenones como se observa en la figura 3.

Figura 3. Dendrograma de las cepas bacterianas aisladas de las aguas residuales de aceitunas de mesa.



La información aportada por el dendrograma de taxonomía numérica es útil para establecer diferencias y semejanzas fenotípicas, pero no nos sirve para establecer relaciones entre las especies de tipo evolutivo.

Características generales de las cepas integrantes de los fenones.

Con los resultados obtenidos definimos las características que presentan las cepas objeto de estudio, de este modo podemos decir que todos los microorganismos seleccionados crecieron cuando el medio tenía un 0% p/v de sal, por lo que podemos definir a estos microorganismos como **halotolerantes** (Larse, 1962; Kushner y Kamekura, 1988), microorganismos no halófilos que se desarrollan en medios que contienen menos de 0,2M de NaCl (1% p/v), aunque pueden tolerar altas concentraciones de sal.

El pH en el se desarrollan la mayoría presenta amplios márgenes, oscilando entre 5 y 10 unidades de pH, algunas cepas pueden llegar a crecer en medios de pH 12, pudiéndose considerar alcalinotolerantes, por los valores tan altos de pH en los que son capaces de crecer. Existen cepas que crecen a pH ácidos por debajo de las 5 unidades de pH.

El rango de temperatura en el que los microorganismos se desarrollan de forma óptima está entre 20 °C y 40 °C, también encontramos cepas que resisten hasta 60 °C. Esto nos hace pensar que los microorganismos aislados presentan capacidad de adaptación a ambientes extremos ya que resisten condiciones de salinidad, pH y temperatura que están por encima de los valores que se alcanzan en ambientes no extremos. Para soportar estas condiciones extremas, proporcionadas artificialmente, deben desarrollar mecanismos de adaptación a tales condiciones y así, mantener su estructura celular y su función (Maravench y *col.*, 2000; Madern y *col.*, 2000; Oren, 2000; Tehei y *col.*, 2002). Los estudios de extremófilos son de primera importancia porque estos microorganismos podrían producir componentes de interés industrial (Aguilar, 1996; Kis-papo y Oren, 2000; Margesin y Shinner, 2001; Hacene y *col.*, 2004).

Resultados y discusión

El estudio detallado de los fenones y su comparación, nos permitió observar que entre los distintos fenones encontrábamos características comunes. Todos los microorganismos eran **móviles, Gram-positivos, catalasa positiva y esporulados**. La prueba de la oxidasa no fue tan homogénea y encontramos microorganismos que son negativos para esta prueba. Los microorganismos que se agruparon en los cuatro fenones son negativos en las pruebas del IMViC, salvando algunas excepciones en las que encontramos microorganismos que son positivos en las pruebas V-P, R-M y citrato, pero son una minoría poco representativa. En general son capaces de utilizar los azúcares **ramnosa, glucosa y manosa** como única fuente de carbono y energía. Los microorganismos de los fenones A, B y D utilizan el **ácido málico y ácido fumárico** como única fuente de carbono y energía. Los agrupados en el fenón C presentan diferencias en la utilización de estos ácidos. Las hidrólisis de esculina y gelatina son comunes en la mayoría de los microorganismos, las cepas agrupadas en el fenón D presentan excepciones. La resistencia y sensibilidad a los antibióticos es específica no sólo para cada fenón sino para cada microorganismo, en general la resistencia a estreptomicina y polimixina B presentan los porcentajes más altos.

El crecimiento de microorganismos en medios con diferentes concentraciones de sal es homogéneo en los fenones A, B y C, que presentan crecimiento entre el 0% p/v y el 15% p/v de sal, lo que confirma que no son cepas que dependen de la sal para crecer, pero que toleran medios con altas concentraciones de sal (Ivanova y col., 2004), son resistentes a ambientes extremos, encontrando cepas aisladas del medio con una concentración de sal del 25% p/v. Las cepas pertenecientes al fenón D tiene una tolerancia a la sal ligeramente inferior ya que el intervalo de crecimiento se encuentra entre el 0% p/v y el 10% p/v de concentración salina. En los cuatro fenones es posible encontrar cepas capaces de sobrevivir a 60 °C (Maugeri y col., 2001), pero el intervalo óptimo de temperatura está entre 20 °C y 40 °C en los cuatro fenones. Es considerable el número de cepas de los fenones B y C que crecen entre 10 °C y 55 °C. Presentan amplios rangos de pH de crecimiento. Existen microorganismos en todos los fenones que soportan pH de 12 unidades y pH ácidos de hasta 3 unidades. El crecimiento

óptimo se produce entre 6 y 8 unidades. Los fenones B, C y D incluyen microorganismos que tienen intervalos de crecimiento a pH entre 5 y 10 unidades.

Podemos destacar que, la capacidad de utilizar aminoácidos como única fuente de carbono está limitada en todos los microorganismos. El fenón D presenta limitaciones en el uso de la mayoría de los sustratos probados como única fuente de carbono y energía en comparación con el resto de fenones, además de una baja actividad metabólica.

Las características de cada uno de los fenones se resumen a continuación:

Fenón A

El fenón A comprende **89** cepas, es el fenón mayoritario, agrupa a las cepas a un 80% de semejanza. Las cepas que contienen son: E₃₀1; E₃₀4; E₃₀5; E₃₀6; E₃₀7; E₃₀12; E₃₀14; E₃₀15; E₃₀16; E₃₀19; E₃₀22; E₃₀23; E₃₀25; E₃₀29; E₅₅31; E₅₅32; E₅₅35; E₅₅37; E₅₅38; E₅₅39; E₅₅40 E₅₅41; E₅₅43; E₅₅45; E₅₅46; E₅₅47; E₅₅51; E₅₅55; E₅₅56; E₅₅58; E₅₅61; E₅₅62; E₅₅64; E₅₅65; E₅₅66; I₃₀67; I₃₀68; I₃₀72; I₃₀73; I₃₀74; I₃₀75; I₃₀76; I₃₀77; I₃₀78; I₃₀79 I₃₀81; I₃₀82; I₃₀85; I₃₀86; I₃₀87; I₃₀89; I₃₀91; I₃₀93; I₃₀95; I₃₀96; I₃₀97; I₃₀98; I₃₀99; I₃₀100; I₃₀102; N₃₀103; N₃₀108; N₃₀110; N₃₀111; N₃₀115; N₃₀116; N₃₀117; N₃₀118; N₃₀119; N₃₀120; N₃₀123; N₃₀124; N₃₀125; N₃₀126; N₃₀128; N₃₀130; N₃₀132; N₃₀134; N₃₀138; N₃₀142; N₃₀143; V₃₀145; V₃₀146; V₃₀155; V₃₀156; V₃₀164; V₃₀165; V₃₀167 y V₃₀172.

Son bacilos Gram-positivos, formadores de esporas. Son móviles, oxidasa positiva, catalasa positiva. Las pruebas del indol, rojo de metilo, Vogues-Proskauer y citrato son negativas. Reducen los nitratos y algunas de ellas reducen también los nitritos.

Crece en medios cuya concentración de sal oscila entre 0% p/v hasta el 15% p/v de ClNa, pero el crecimiento óptimo se produce a concentraciones de sal inferiores al 10% p/v de sal, aunque existen cepas, que pueden crecer hasta el 25% p/v de ClNa.

La temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 20 °C hasta 40 °C, pero también encontramos cepas que resisten los 60 °C.

Resultados y discusión

El pH en el que se desarrollan tiene un amplio rango, varía desde pH 3 hasta pH 12, pero el intervalo óptimo en el que crecen se encuentra entre 6 y 8.

Como fuente única de carbono y energía son capaces de utilizar los azúcares fructosa, ramnosa, manosa y glucosa, algunas de estas cepas también pueden utilizar celobiosa, sacarosa y xilosa. No utilizan, en general los aminoácidos probados como única fuente de carbono y energía, exceptuando algunas que pueden utilizar el aminoácido arginina. Los ácidos que utilizan como fuente de carbono y energía son el ácido fumárico, ácido málico y ácido propiónico, algunos microorganismos de este fenón también pueden utilizar el ácido oxálico.

Tienen capacidad de hidrolizar esculina y gelatina, algunas también hidrolizan almidón y caseína.

Muy pocas son capaces de producir ácidos a partir de los azúcares y los alcoholes probados.

Son bacterias sensibles a cloranfenicol, rifampicina, eritromicina y cefalotina y son resistentes a tetraciclina, kanamicina, polimixina B y estreptomina.

Fenón B

Formado por **39** cepas, agrupadas a un nivel de semejanza del 80%. Los microorganismos son: E₃₀8; E₃₀17; E₃₀18; E₃₀21; E₃₀27; E₅₅34; E₅₅48; E₅₅50; E₅₅52; E₅₅53; E₅₅57; E₅₅59; I₃₀69; I₃₀71; I₃₀80; I₃₀83; I₃₀84; I₃₀94; N₃₀105; N₃₀106; N₃₀109; N₃₀114; N₃₀121; N₃₀131; N₃₀133; N₃₀140; N₃₀144; V₃₀147; V₃₀150; V₃₀151; V₃₀153; V₃₀154; V₃₀158; V₃₀159; V₃₀161; V₃₀162; V₃₀166; V₃₀168 y V₃₀169.

La tinción de Gram es positiva, son bacilos formadores de esporas. Las bacterias que integran este fenón son móviles, oxidasa negativa y catalasa positiva. Las pruebas del IMViC son negativas. Reducen los nitratos.

Son capaces de soportar concentraciones de sal de hasta el 25% p/v de ClNa, pero el crecimiento óptimo se produce a concentraciones de ClNa de 0% p/v a 15% p/v.

Resultados y discusión

La mayoría de las bacterias pueden crecer desde los 10 °C hasta los 55 °C. Podemos encontrar cepas que llegan a crecer a 60 °C, pero el crecimiento óptimo lo tiene en el intervalo que varía de los 20 °C a los 40 °C.

El pH óptimo de crecimiento oscila de 5 a 10 unidades, aunque existen bacterias de este fenón que pueden desarrollarse a pH 3, pH 11 y pH 12.

Pueden utilizar los azúcares celobiosa, ramnosa, sacarosa, xilosa, glucosa y manosa, como fuente de carbono y energía, sin embargo, no utilizan ninguno de los aminoácidos probados. Los ácidos que utilizan como única fuente de carbono y energía son el ácido fumárico, ácido málico y ácido propiónico.

No producen ácidos a partir de los azúcares probados.

Hidrolizan gelatina y esculina.

Presentan resistencia a los antibióticos rifampicina, eritromicina, cefalotina, kanamicina y tetraciclina, y son sensibles a polimixina B, estreptomina y ácido nalidíxico.

Fenón C

En este fenón se reúnen **16** cepas, que presentan un 78% de similitud. Las cepas que se incluyen son: E₃₀2; E₃₀3; E₃₀9; E₃₀10; E₃₀11; E₃₀13; E₃₀26; E₃₀28; E₅₅60; I₃₀88; I₃₀90; N₃₀112; N₃₀129; V₃₀148; V₃₀152 y V₃₀170.

Las cepas de este fenón son Gram-positivas, formadoras de esporas.

Presentan movilidad. Catalasa positiva, oxidasa positiva, dentro de este fenón encontramos cepas oxidasa negativa. Son negativas en las pruebas del indol, rojo de metilo, Vogues-Proskauer y citrato. Reducen los nitratos.

Encontramos microorganismos que soportan concentraciones de sal del 20% p/v, pero no la mayoría, que tienen su crecimiento óptimo desde una concentración de 0% p/v hasta el 15% p/v de ClNa.

Se desarrollan en un intervalo de temperatura óptima de 20 °C a 40 °C, pero hay cepas que pueden crecer desde los 10 °C a los 55 °C.

Resultados y discusión

El pH óptimo de crecimiento se encuentra en un intervalo que varía de 5 a 10, siendo posible que algunas cepas que crezcan a pH 12 y una de ellas crece en medios que presentan pH de 2 unidades.

Como única fuente de carbono y energía utilizan los azúcares fructosa, ramnosa, xilosa, glucosa y manosa y los ácidos utilizados como única fuente de carbono y energía son ácido málico y ácido propiónico. Los aminoácidos probados no son utilizados como fuente de carbono y energía.

Hidrolizan la gelatina, pero ninguno de los demás sustratos probados.

No producen ácidos a partir de los azúcares y de los alcoholes probados.

Presentan resistencia a los antibióticos rifampicina, eritromicina y cefalotina, algunas también son resistentes a cloranfenicol y ácido nalidíxico y son sensibles a tetraciclina, kanamicina, amikacina, polimixina B y estreptomicina.

Fenón D

Pertenecen a este fenón **21** cepas, que se agrupan a un nivel de semejanza del 77%. Son las siguientes: E₃₀24; E₃₀30; E₅₅36; E₅₅42; E₅₅44; E₅₅54; E₅₅63; I₃₀70; I₃₀92; N₃₀104; N₃₀122; N₃₀127; N₃₀136; N₃₀137; N₃₀139; N₃₀141; V₃₀149; V₃₀163; V₃₀157; V₃₀160 y V₃₀171.

Son bacilos Gram-positivos, formadores de esporas.

Móviles, oxidasa positiva y catalasa positiva. Indol negativo, rojo de metilo negativo, Vogues-Proskauer negativo y citrato negativo. Reducen los nitratos.

Crece en un intervalo de sal óptimo de 0% p/v al 10% p/v, algunas llegan a crecer al 15% p/v de ClNa.

El intervalo de temperatura en el que pueden crecer todas las cepas de este fenón varía de 20 °C hasta los 45 °C, pero podemos encontrar bacterias que crecen a 60 °C.

El pH intervalo óptimo de crecimiento se encuentra entre 5 y 10, encontrando microorganismos que crecen a pH 4 y pH 12.

De los azúcares probados son capaces de utilizar como única fuente de carbono y energía: celobiosa, ramnosa, glucosa y manosa. Los aminoácidos probados no se utilizan como

fuentes de carbono y energía y de los ácidos probados utilizan como única fuente de carbono y energía ácido fumárico y ácido málico, algunas también pueden utilizar los ácidos propiónico y oxálico.

Sólo algunas de las bacterias pueden hidrolizar gelatina y esulina.

No producen ácidos a partir de los azúcares ni de los alcoholes probados.

Las bacterias de éste fenón son resistentes a rifampicina, cefalotina y cloranfenicol y sensibles a ampicilina, gentamicina, polimixina B y ácido nalidíxico.

Selección de microorganismos representantes de los fenones.

De cada fenón, se seleccionaron cepas que presentaban la mayoría de las características que definen al fenón correspondiente. El número de cepas seleccionadas está en función de los microorganismos agrupados en cada fenón.

Del **fenón A** se seleccionaron las cepas: **I₃₀73, I₃₀74, I₃₀67, E₅₅38, N₃₀138, N₃₀137, V₃₀172, I₃₀76, N₃₀129.**

Del **fenón B** fueron seleccionadas las cepas: **V₃₀166, E₃₀18, I₃₀77, E₃₀ 8.**

Del **fenón C**: **E₃₀26.**

Del **fenón D**: **E₅₅36 y N₃₀125**

Además se seleccionaron dos cepas no agrupadas en ningún fenón: **N₃₀135 y E₅₅49.**

La caracterización taxonómica se continuó con el análisis del gen del RNAr 16S a los microorganismos seleccionados como representantes de los fenones obtenidos en función de las similitudes que presentan las cepas, tal y como indica Gevers *y col.*, (2005) en su artículo de opinión, "*Re-evaluating prokaryotic species*".

IV.3.2. Taxonomía Molecular.

El análisis de taxonomía numérica realizado, clasificó a los microorganismos en función de la homología de sus caracteres y atributos, dándoles el mismo valor a cada uno de ellos, de acuerdo con el coeficiente utilizado. Los resultados obtenidos en estos análisis, a veces, son confusos por la arbitrariedad de sus criterios. Actualmente, con el mismo fin de identificar, clasificar, y nombrar a los microorganismos seleccionados, aplicamos las técnicas de biología molecular. Estas técnicas están basadas en el análisis de un material resistente, invariable y de relativamente fácil manipulación, permitiendo un análisis más fiable y preciso, que puede confirmar los datos de taxonomía numérica o modificarlos asegurando así, una clasificación más exacta y completa. Además, aportan un conocimiento más amplio de las relaciones filogenéticas que existen entre los microorganismos objeto de estudio pertenecientes a un ecosistema determinado.

IV.3.2.1. Extracción, cuantificación y purificación del DNA. Cálculo de la temperatura de fusión (T_m) y del contenido guanina-citosina (G+C).

Las cepas seleccionadas como representantes de cada fenón se sometieron al proceso de extracción, purificación y cuantificación del DNA mediante las técnicas explicadas en el apartado III.3.2.1. de material y métodos, así mismo, considerando que el grado pureza obtenida era adecuada, se calculó el contenido en guanina-citosina (G+C mol%) y la temperatura media de fusión (T_m °C) como se explica en el apartado III.3.2.2. de material y métodos. Los resultados se muestran en la tabla 26.

Tabla 26. Concentración, pureza, composición de bases, G+C (mol%) y T_m (°C) de las cepas seleccionadas.

Cepas	Concentración DNA (µg/ml)	Pureza λ 260/280	T ₁ (°C)	T ₂ (°C)	Valor medio T _m (°C)	Valor teórico G+C (%)
E₃₀8	1,6	1,91	79,7	85,4	82,6	32,43
E₃₀18	2,9	1,77	81,6	86,6	84,1	36,09
E₃₀26	3,4	1,70	82,8	88	85,4	39,2
E₅₅36	0,7	1,77	82,7	88,5	85,6	39,81
E₅₅38	1,2	1,74	83,6	89,55	86,6	42,19
E₅₅49	1,5	1,97	79,3	84,55	81,9	30,79
I₃₀67	1,0	1,76	81,8	87,85	84,8	37,86
I₃₀73	1,1	1,66	79,3	84	81,6	30,12
I₃₀74	1,0	1,71	81,2	87,65	84,4	36,95
I₃₀76	2,1	1,75	82,1	88,25	85,1	38,71
I₃₀77	0,99	1,66	79,4	84,4	81,9	30,79
N₃₀120	1,0	1,73	80,1	85,65	82,9	33,17
N₃₀125	1,61	1,76	82,7	88,3	85,5	39,5
N₃₀129	1,1	1,69	80,5	85,5	83	33,41
N₃₀135	1,1	1,77	79,9	84,85	82,4	31,95
N₃₀137	1,0	2,05	79,4	84,16	81,7	30,43
N₃₀138	1,1	1,68	80,6	84,6	82,6	32,5
V₃₀166	0,85	1,83	83	88,9	85,9	40,60
V₃₀172	0,82	1,93	82,9	89,5	86,2	41,28

La temperatura de fusión del DNA, temperatura a la que se desnaturaliza la molécula, está directamente relacionada con el contenido en G+C. El punto medio de fusión (T_m), es una medida del contenido en G+C.

El contenido medio en G+C, varía poco en las diferentes partes del genoma. Variaciones importantes de este valor, aparecen cuando los microorganismos son distintos.

Cada especie bacteriana tiene un contenido medio característico. Las diferencias sustanciales en la composición de bases del DNA de dos microorganismos son reflejo de un número elevado de diferencias individuales en las respectivas secuencias de las bases de su DNA. Dos organismos con gran semejanza en la composición de bases de su DNA, puede tomarse como base firme, que indica su afinidad genética y evolutiva, además, si comparten propiedades fenotípicas se confirma dicha afinidad.

Resultados y discusión

En los microorganismos estudiados los valores del contenido G+C oscilan entre el **30,12%** de la cepa **I₃₀73** y el **42,19%** de la cepa **E₅₅38** y la T_m entre 81,6 °C de la cepa I₃₀73 y 86,6 °C de la cepa E₅₅38. Esto indicaría que los microorganismos seleccionados probablemente estén relacionados genética y evolutivamente, ya que la diferencia en su contenido G+C es aproximadamente del 10% y su T_m no varía más de 5 °C, valores que se consideran para establecer que las especies pertenecen al mismo género. Otra razón que nos hace pensar que pertenecen al mismo género es, que el margen que existe entre los valores de G+C máximo y mínimo es de un 12%. Dentro de cada género el margen es, en general bastante pequeño, raramente la variación es mayor de un 10% ó 15%. Los valores de G+C obtenidos se consideran bajos ya que el promedio de composición de bases del DNA nuclear característico en los microorganismos está entre el 25% y el 80%.

Un estudio más detenido de sus características fenotípicas confirmaría dicha afinidad, además de otras pruebas moleculares.

IV.3.2.2. Secuenciación parcial de las cepas seleccionadas.

IV.3.2.2.1. Secuenciación Parcial.

Se realizó una primera secuenciación parcial del gen del RNAr 16S de las cepas seleccionadas con el oligonucleótido interno **16R519** (Fox y col., 1992; Lane, 1991), para posicionar los microorganismos y tener una estimación de las especies bacterianas que nos podíamos encontrar en este residuo, así como conocer, si se trataban de especies conocidas y descritas en la bibliografía o si por el contrario, hallábamos microorganismos no descritos hasta el momento. Las secuencias obtenidas con el oligonucleótido interno 16R519 (Lane, 1991; Fox y col., 1992) de todas las cepas seleccionadas, que se pueden ver en el Anexo VII.2 y fueron analizadas en las bases de datos del **NCBI** y se realizó el alineamiento global mediante **BLAST**

Resultados y discusión

(Altschul y col., 1998). La comparación de secuencias y el porcentaje de similitud con las secuencias contenidas en las bases de datos, se presentan en la tabla 27.

Tabla 27. Resultados de alineamiento global mediante **BLAST** de las secuencias parciales del gen del RNAr 16S de las cepas seleccionadas.

CEPA	Microorganismo	% Similitud
E₃₀8	<i>Virgibacillus marismortui</i>	99
	<i>Bacillus permians</i>	99
	<i>Virgibacillus halodenitrificans</i>	95
	<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	94
E₃₀18	<i>Bacillus pumilus</i>	98
E₃₀26	<i>Bacillus licheniformis</i>	94
	<i>Bacillus subtilis</i>	94
E₅₅36	<i>Bacillus licheniformis</i>	91
E₅₅38	<i>Bacillus licheniformis</i>	91
E₅₅49	<i>Virgibacillus marismortui</i>	96
	<i>Bacillus permians</i>	96
	<i>Virgibacillus halodenitrificans</i>	93
I₃₀67	<i>Bacillus subtilis</i>	98
	<i>Bacillus licheniformis</i>	98
	<i>Bacillus mojavensis</i>	98
I₃₀73	<i>Bacillus cereus</i>	99
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99
	<i>Bacillus anthracis</i>	99
I₃₀74	<i>Bacillus licheniformis</i>	99
	<i>Bacillus subtilis</i>	99
	<i>Bacillus mojavensis</i>	98
	<i>Bacillus sonorensis</i>	99
I₃₀76	<i>Bacillus subtilis</i>	96
	<i>Bacillus licheniformis</i>	96
	<i>Bacillus mojavensis</i>	96
I₃₀77	<i>Virgibacillus marismortui</i>	99
	<i>Bacillus permians</i>	99
	<i>Virgibacillus halodenitrificans</i>	95
N₃₀120	<i>Virgibacillus marismortui</i>	99
	<i>Bacillus permians</i>	99
	<i>Virgibacillus halodenitrificans</i>	95
N₃₀125	<i>Bacillus licheniformis</i>	94
	<i>Bacillus subtilis</i>	94
N₃₀129	<i>Virgibacillus marismortui</i>	99
	<i>Bacillus permians</i>	99
	<i>Virgibacillus halodenitrificans</i>	96
N₃₀135	<i>Virgibacillus marismortui</i>	99
	<i>Bacillus permians</i>	99
	<i>Virgibacillus halodenitrificans</i>	95
N₃₀137	<i>Bacillus cereus</i>	99
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99
	<i>Bacillus anthracis</i>	99

Tabla 27. Resultados de alineamiento global mediante **BLAST** de las secuencias parciales del gen del RNAr 16S de las cepas seleccionadas (continuación).

CEPA	Microorganismo	% Similitud
N₃₀138	<i>Bacillus cereus</i>	98
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	98
	<i>Bacillus anthracis</i>	98
V₃₀166	<i>Bacillus licheniformis</i>	97
	<i>Bacillus subtilis</i>	97
	<i>Bacillus lautus</i>	96
	<i>Bacillus sonorensis</i>	96
V₃₀172	<i>Bacillus licheniformis</i>	92
	<i>Bacillus subtilis</i>	92

La secuenciación parcial del gen del RNAr 16S de las cepas se realizó para determinar su posición taxonómica, basándonos en estudios que indican, que la ubicación filogenética de una bacteria a nivel de especie no requiere necesariamente la secuenciación de RNAr 16S completo. De hecho, aunque existen posiciones filogenéticamente informativas a lo largo de todo el gen, la mayor variabilidad se concentra en las primeras 500 pares bases, correspondientes al extremo 5'. Generalmente, esta secuencia de 500 pares bases será suficiente para la identificación de un aislado (Rogall y col., 1990; Patel y col., 2000; Patel, 2001). En estudios recientes Heyrman y col. utilizaron la secuencia parcial del gen del RNAr 16S con el oligonucleótido interno 519 (Heyrman y Swings, 2001) para obtener las primeras 400-500 pares de bases, que incluyen, de acuerdo con Goto y col., (2000), la región hipervariable de *Bacillus* para ubicar taxonómicamente cepas de este género aislados del suelo (Heyrman y col., 2005a). En otros estudios, se describen nuevas especies del género *Bacillus* aislados de muros pintados y del suelo en los que se utiliza también la secuencia parcial del gen del RNAr 16S para conocer la relación filogenética que establecen los microorganismos aislados con las especies válidamente descritas (Heyrman y col., 2005b).

El RNA ribosómico 16S se ha considerado una molécula para discernir entre las relaciones filogenéticas de los procariontes. Es una molécula primitiva, pero funcionalmente constante, distribuida universalmente y bien conservada a través de un largo trayecto

filogenético. Presenta regiones que están totalmente conservadas, sobre el 10% de las bases del RNAr 16S, otras regiones son altamente conservadas y encontramos otras regiones variables, que están ausentes en más del 75% de las especies. Las regiones más conservadas se encuentran entre las posiciones 778 y 798, pero existen otras muchas áreas altamente conservadas (Baker y col., 2003) que están presentes en todos los procariontes (Barns y col., 1994; McKinney y col., 1995; Hugenholtz y col., 1998; Nielsen, 1999) y que sirven para establecer las relaciones parentales entre los microorganismos. El uso de los fragmentos del RNAr 16S sirven para clasificar las afinidades taxonómicas entre un extenso rango de taxa (McKinney y col., 1995; Baker y col., 1999) y como una herramienta poderosa para asegurar la diversidad genética de muestras ambientales (Groflkopf y col., 1998; Whitehead y Cotta, 1999; van Waasbergen y col., 2000; Baker y col., 2001).

La secuencia parcial del gen RNAr 16S posicionó las cepas parcialmente secuenciadas dentro de los géneros *Bacillus* y *Virgibacillus* (Fig.4).

IV.3.2.2.2. Árbol filogenético con las secuencias parciales del gen del RNAr 16S.

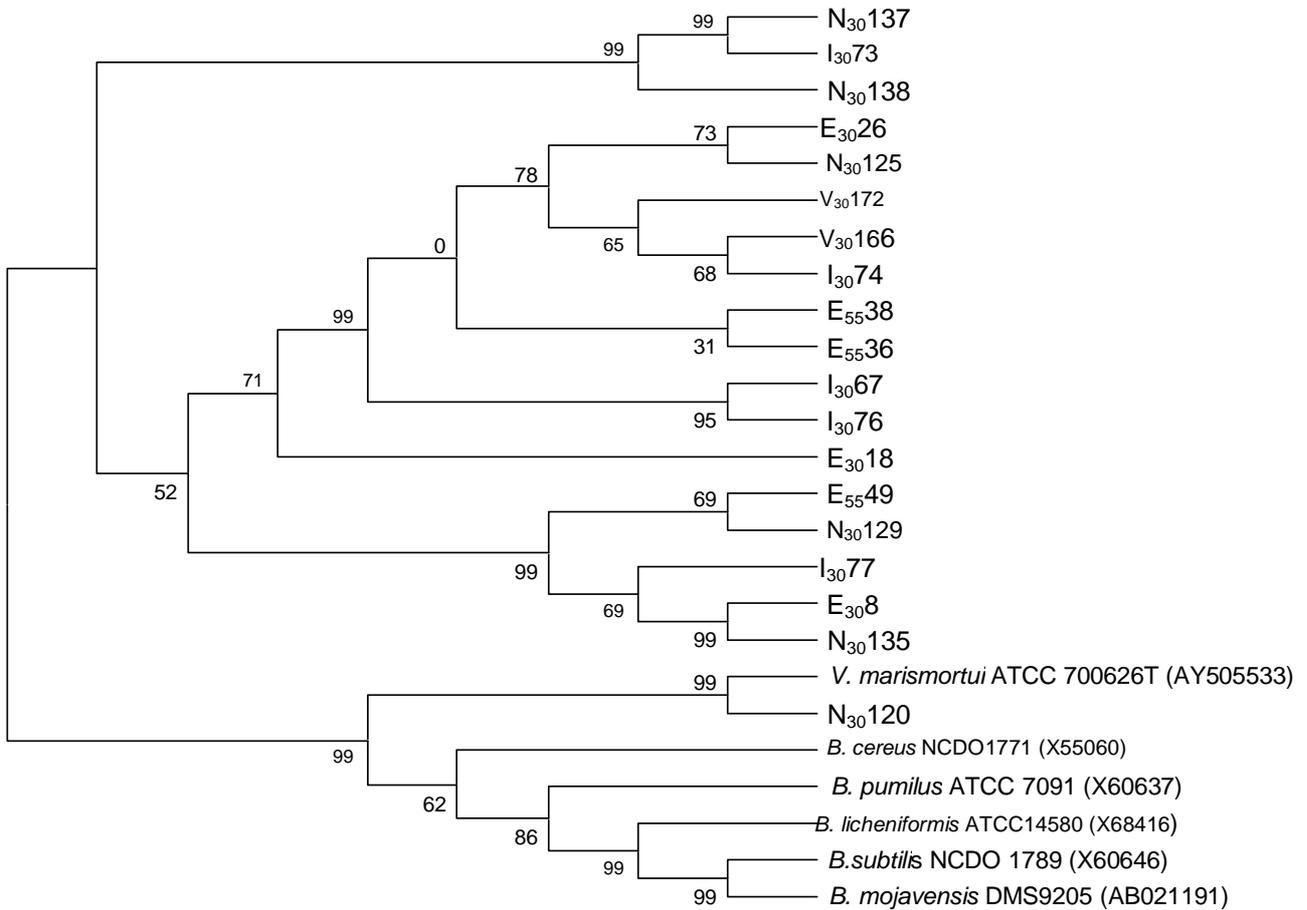
La utilización de programas informáticos nos permitió la construcción de árboles filogenéticos que reflejan gráficamente la genealogía molecular de las distintas bacterias, mostrando su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados.

En nuestro estudio realizamos el agrupamiento de las secuencias parciales del gen del RNAr 16S de los organismos objeto de estudio y de las cepas con quienes presentaban similitud según el alineamiento global mediante BLAST utilizando el programa **MEGA 3.1** (Kumar y col., 2004), mediante ClustalW (1,6) (Chenna y col., 2003; Thompson y col., 1997). La reconstrucción filogenética se realizó utilizando el método **neighbour-joining** (Saito y Nei, 1987) y el modelo **Jukes-Cantor** (1969). Las distancias y el agrupamiento se determinaron con el método de máxima parsimonia usando el valor bootstrap basado en 1000 replicaciones.

Resultados y discusión

El árbol filogenético se observa en la figura 4.

Figura 4. Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen del RNAr 16S de las cepas bacterianas en estudio y las diferentes especies de colección válidamente descritas.



El **RNAr 16S**, por sí sólo carece de resolución cuando tratamos de circunscribir una especie procariota. La secuencia del RNAr 16S es un parámetro adicional que **aporta información relevante**, con la que se confeccionan los árboles que expresan la afiliación filogenética de un grupo de secuencias. La reconstrucción filogenética es un trabajo complejo que requiere de la realización de diversos cálculos con distintos algoritmos y variaciones en el número y tipos de secuencias y a veces puede llevar a conclusiones erróneas si se utilizan como datos aislados.

A pesar de que la molécula del gen del **RNA 16S**, se considera un parámetro que aporta una información relevante, hay que tener en cuenta que existen estudios que demuestran, que **sola no puede ser utilizada para definir una especie** (Fox y col., 1992; Palys y col., 1997). Para un adecuado enfoque polifásico no podemos confiar sólo en los resultados de la macromolécula del RNAr 16S, pero sí, utilizarlos para posicionar nuestras cepas taxonómicamente, determinar su genealogía y con que organismos presentan relaciones estrechas para, finalmente realizar los experimentos de reasociación DNA-DNA, que sí confirman con exactitud la identificación de un organismo (Blackwood y col., 2004; Gevers y col., 2005).

IV.3.2.3. Hibridación DNA-DNA.

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

Estudios recientes de revisión, en los que se plantea la definición de especie procariota (Oren, 2004; Rosselló-Mora, 2005) y otros en los que se investigan nuevos métodos basados en todo el genoma (Konstatinidis y Tiedje, 2005; Gevers y col., 2005) reflejan que actualmente el **método definitivo de identificación** de una especie es la **hibridación DNA-DNA**, las demás técnicas moleculares que, también utilizan todo el genoma, aportan información que confirman los datos obtenidos con la reasociación DNA-DNA entre dos cepas, pero son demasiado nuevas para que hayan sido aceptadas universalmente e incluidas en el proceso de clasificación y delimitación de una especie. Las numerosas especies que actualmente están

Resultados y discusión

siendo descritas utilizan la hibridación DNA-DNA como parámetro llave a la hora de definir a una nueva especie.

La hibridación DNA-DNA es una medida indirecta de la semejanza de secuencias entre genomas. Para que dos DNAs muestren un mínimo grado de hibridación es necesario que ambas secuencias compartan al menos un 80% de identidad. Por tanto, entre 0% y 100% de similitud se distribuyen genomas que comparten entre el 80% y el 100% de identidad en las secuencias. De forma empírica se ha observado, que una especie procariota agrupa organismos con una similitud interna superior al **70%** de RBR o inferior a 5 °C de ΔT_m . Sin embargo, es muy importante tener en cuenta que estos límites numéricos no son absolutos, y que pueden oscilar entre el 50% y el 80% (± 9 °C ΔT_m y ± 3 °C ΔT_m) (Rosselló-Mora, 1999).

Los resultados de hibridación DNA-DNA, se obtuvieron mediante la técnica inmunoenzimática no radiactiva (ELISA) de Ziemke y col. (1998), marcando el DNA de las cepas E₃₀₈, E₅₅₃₆, I₃₀₆₇, I₃₀₇₃, I₃₀₇₄, N₃₀₁₃₈, *Bacillus licheniformis* PMC 1847 y *Virgibacillus marismortui* ATCC 700626^T, que nos sirvieron como valores de referencia (BR).

A partir del DNA marcado, se realizó la hibridación, de acuerdo a la posición de las cepas en el árbol filogenético parcial que aparece en la figura 4 y a los resultados obtenidos en el alineamiento global mediante BLAST que se han mostrado en la tabla 27. Las cepas de colección utilizadas fueron: *Bacillus subtilis* PCM 1903, *Virgibacillus marismortui* ATCC 700626^T, *Bacillus cereus* PCM 482, *Bacillus licheniformis* PMC 1847 y *Bacillus mojavensis* NRRLB 14698. Los ensayos de hibridación DNA-DNA se realizaron por duplicado y los resultados obtenidos se trataron estadísticamente para ver la viabilidad del método. Un uno por ciento de este valor (RBR) es equivalente a un 80% de homología entre cepas hibridadas, a nivel de la secuencia de su genoma. Estableciéndose el valor límite del 70% para delimitar la identidad de una especie (Oren, 2004). Los esquemas de hibridación realizados, los datos del Rango de Unión Relativa entre los DNAs de las cepas marcadas y el análisis de estos datos se describen a continuación:

Resultados de la hibridación de la Cepa E₃₀₈

Pertenece al fenón B, según los resultados de taxonomía numérica.

El resultado de la comparación de la secuencia parcial del gen del RNAr 16S en el alineamiento global mediante BLAST relaciona a la cepa con las siguientes:

- Virgibacillus marismortui*- 99%.
- Bacillus permians*- 99%.
- Virgibacillus halodenitrificans*- 95%.
- Virgibacillus pantothenicus*- 94%.

La cepa E₃₀₈ fue marcada e hibridada con la cepa de referencia *Virgibacillus marismortui* ATCC 700626^T y con las cepas seleccionadas de los fenones que, según los resultados del alineamiento global mediante **BLAST** de las secuencias parciales del gen del RNAr 16S, obtenidas con el oligonucleótido 16R519 (Lane, 1991; Fox y col., 1992) y el árbol filogenético correspondiente, presentaban homología con E₃₀₈. En el esquema 1 se resume la hibridación realizada y los resultados se observan en la tabla 28.

Esquema 1. Hibridación cepa E₃₀₈*.

Cepa marcada	Hibridación con:
E ₃₀₈ *	<i>Virgibacillus marismortui</i> ATCC 700626 ¹
	E ₅₅₄₉
	I ₃₀₇₇
	N ₃₀₁₂₉
	N ₃₀₁₂₀
	N ₃₀₁₃₅
	V ₃₀₁₆₆

Tabla 28. Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada E₃₀₈*, las cepas seleccionadas y la cepa de referencia.

Cepas	E ₃₀₈ *- E ₃₀₈	E ₃₀₈ *- E ₅₅₄₉	E ₃₀₈ *- I ₃₀₇₇	E ₃₀₈ *- N ₃₀₁₂₀	E ₃₀₈ *- N ₃₀₁₂₉	E ₃₀₈ *- N ₃₀₁₃₅	E ₃₀₈ *- V ₃₀₁₆₆	E ₃₀₈ *- <i>V.marismortui</i>
RB%	100%	73,47%	88,26%	45,32%	80,41%	28,85%	16,33%	45,40%
RB%	100%	70,32%	88,52%	38,24%	77,40%	38,34%	17,62%	48,65%
RBR%	100%	71,89%	88,39%	41,78%	78,90%	33,59%	16,97%	47,02%

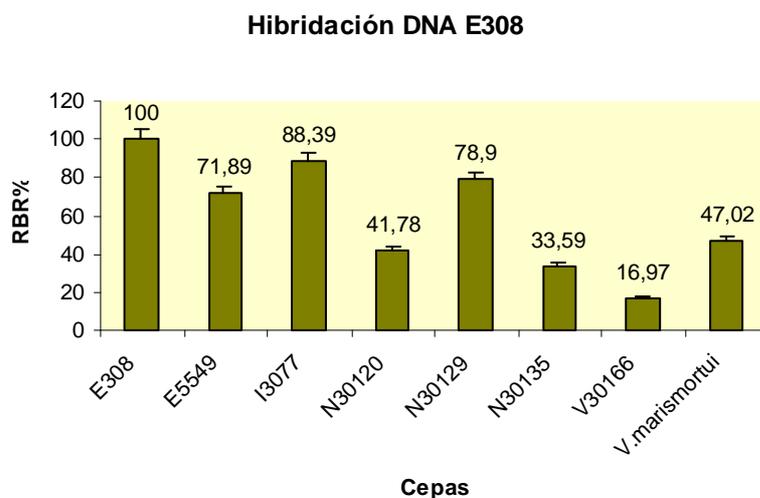


Figura 5. Resultados de la hibridación DNA-DNA E₃₀₈*.

La cepa E₃₀₈ en el alineamiento global de la secuencia parcial del gen del RNAr 16S mediante **BLAST** fue relacionada con las cepas de colección *Virgibacillus marismortui* en un 99% de semejanza, con *Bacillus permians* en un 99% de semejanza, con *Virgibacillus halodenitrificans* presentaba un porcentaje de similitud del 95% y con *Virgibacillus pantothenicus* un 94% de similitud. La hibridación se realizó con *Virgibacillus marismortui* ATCC 70062^T y con las cepas que en el árbol filogenético estaban en el mismo agrupamiento, que en este caso coincidían con las cepas que habían mostrado idénticos resultados en el alineamiento global mediante BLAST. La cepa de colección *Bacillus permians* con la que tenía un 99% de similitud, no se utilizó en el experimento basándonos en referencias bibliográficas. Vreeland y col. (2000) y Grau y Pupko (2001) se refieren a una bacteria aislada de un cristal de sal donde se encontraba atrapada desde hace 250 millones de años y de donde sobrevivió hasta su aislamiento, probablemente como spora. Se piensa que la bacteria ha perdido la viabilidad, pero no el DNA. Su secuencia fue depositada en el GenBank con el número de acceso AF166093, esta bacteria es *Bacillus permians*. La secuencia obtenida presenta sólo una transición y una transversión diferente a la secuencia de *Virgibacillus marismortui* (Heyrman y col., 2003). La diferencia entre ambas secuencias se podría deber a la evolución de *Bacillus permians* a *Virgibacillus marismortui*, por lo tanto, se hibridó con *Virgibacillus*

Resultados y discusión

marismortui ATTC70062^T, considerando a *Bacillus permians* un ancestro. No se realizó la hibridación DNA-DNA con las cepas *Virgibacillus halodenitrificans* y *Virgibacillus pantothenicus*, porque presentan valores de similitud en la secuencia parcial del gen del RNAr 16S del 95% y 94% de semejanza respectivamente. Los porcentajes inferiores al 97% en las secuencias del gen del RNAr 16S no necesitan ser hibridadas con las cepas de referencia ya que este valor es considerado determinante para establecer la identidad a nivel de especie y es considera una especie diferente (Albert y col., 2005).

Una vez realizados los experimentos de hibridación los resultados mostraron que nuestra cepa de estudio presenta un porcentaje de hibridación DNA-DNA con la cepa de referencia de un 47,02%, inferior al que se establece para considerar a una cepa dentro de la misma especie. Las diferencias en el contenido G+C, son también notables, *Virgibacillus marismortui* tiene valores entre el 39-40mol% mientras que la cepa E₃₀₈, presenta un valor de 32, 4mol%. Con las cepas E₅₅₄₉, I₃₀₇₇, N₃₀₁₂₉, forman un grupo independiente, con valores de hibridación que están siempre por encima del 70%. Estos valores de hibridación se encuentran dentro del límite establecido para delimitar la especie. Consideramos a estas 4 cepas, como pertenecientes a la misma especie, ya que la secuencia de sus genomas comparten más del 70% de identidad. Las cepas N₃₀₁₂₉, N₃₀₁₃₅ y V₃₀₁₆₆, tienen bajos porcentajes de hibridación DNA-DNA con la cepa marcada y no se consideran como perteneciente al mismo grupo, aunque las posiciones filogenéticas las sitúen próximas.

E₃₀₈, E₅₅₄₉, I₃₀₇₇ y N₃₀₁₂₉ son cepas que constituyen una nueva especie bacteriana descrita en este trabajo. La cepa tipo es **E₃₀₈^T**. La hemos denominado ***Virgibacillus hispanicus*** y la descripción fenotípica y genotípica de sus características está realizada en el apartado de IV.4.4. de resultados y discusión.

Resultados de la hibridación de la Cepa E₃₀₁₈

La cepa se agrupa en el fenón B según el programa de taxonomía numérica.

La secuencia parcial del gen del RNAr 16S relacionó a esta cepa en el alineamiento global mediante **BLAST** con la cepa *Bacillus pumilus* en un 98% de semejanza.

El experimento de hibridación se realizó marcando la cepa E₃₀₁₈, para hibridarla con *Bacillus pumilus* ATCC 7061. El esquema de hibridación y los resultados de la misma se muestran en el esquema 2 y la tabla 29.

Esquema 2. Hibridación cepa E₃₀₁₈*.

Cepa marcada	Hibridación con:
E ₃₀₁₈ *	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061 E ₃₀₁₈

Tabla 29. Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada E₃₀₁₈* y la cepa de referencia.

CEPAS	E ₃₀₁₈ *- E ₃₀₁₈ *	E ₃₀₁₈ *- <i>B. pumilus</i>
RB%	100%	87,3%
RB%	100%	85,7%
RBR%	100%	86,5%

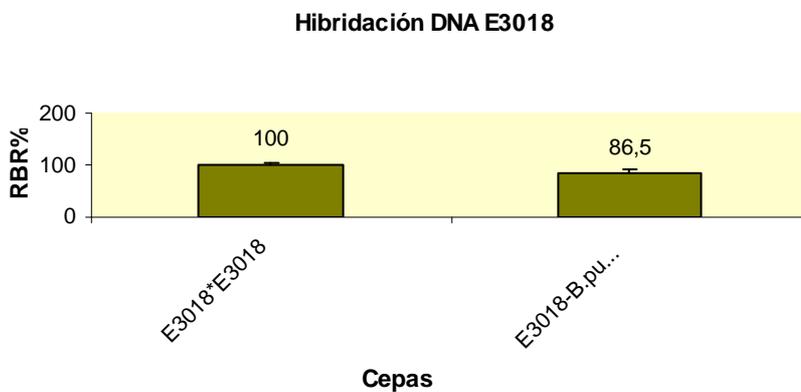


Figura 6. Resultados de la hibridación DNA-DNA E₃₀₁₈*.

La secuencia parcial del gen del RNAr 16S relacionó a esta cepa con *Bacillus pumilus* en un 98% de semejanza, según el alineamiento global mediante **BLAST**. Los resultados de hibridación DNA-DNA realizados confirmaron que la cepa de estudio que compartía un 86,5% de similitud con la cepa de referencia, por lo que se integra como miembro de la especie *Bacillus pumilus*.

Resultados de la hibridación de la Cepa E₅₅36

La cepa pertenece al fenón D.

El alineamiento global mediante **BLAST** de la secuencia parcial del gen del RNAr 16S con el oligonucleótido 16R519 (Lane, 1991; Fox y col., 1992) nos dio como resultado un porcentaje de semejanza con la secuencia del gen del RNAr 16S de *Bacillus licheniformis* del 91% de semejanza.

La cepa E₅₅36 se marcó para ser hibridada con la cepa de referencia, *Bacillus licheniformis* PMC 1847 y con las cepas seleccionadas que, según los resultados de las secuencias parciales del gen del RNAr 16S en el alineamiento global mediante BLAST y el árbol filogenético correspondiente, presentaba homología con esta cepa y la de referencia. En el esquema 3 se resume la hibridación realizada y los resultados aparecen reflejados en la tabla 30.

Esquema 3. Hibridación cepa E₅₅36*.

Cepa marcada	Hibridación con
E ₅₅ 36*	<i>B. licheniformis</i> PCM1847 E ₅₅ 26 N ₃₀ 125

Tabla 30. Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada E₅₅36*, las cepas seleccionadas y la cepa de referencia.

CEPAS	E ₅₅ 36*- E ₅₅ 36	E ₅₅ 36*- E ₃₀ 26	E ₅₅ 36*- N ₃₀ 125	E ₅₅ 36*- <i>B. licheniformis</i>
RB%	100%	75,29%	91,30%	96,5%
RB%	100%	86,63%	99,23%	98,91%
RBR%	100%	80,96%	95,26%	97,70%

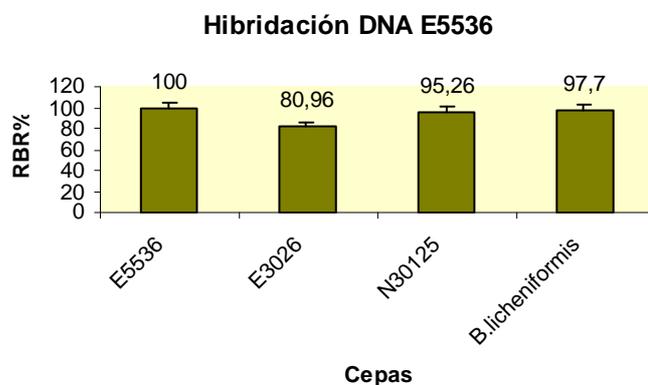


Figura 7. Resultados de la hibridación DNA-DNA **E₅₅36***.

La cepa **E₅₅36** presentó un porcentaje de similitud con *Bacillus licheniformis* del 91% en el alineamiento global en el **BLAST**. Con este valor una secuencia completa se consideraría como una nueva especie como las cepas, *Bacillus herbersteinensis* sp.nov. (Wieser y col., 2005), *Bacillus cibi* sp.nov. (Yoon y col., 2005), la reclasificación de *Alkalibacillus haloalkalophilus* (Jeon y col., 2005) y *Bacillus saliphilus* sp.nov. (Romano y col., 2005) que presentan porcentajes de similitud inferiores al 97% con las especies de colección más próximas. Estos microorganismos no necesitaron ser hibridados para que ser descritos como nuevas especies. Sin embargo, en nuestro estudio al tener la información de la secuencia parcial se consideró necesario hibridar con *Bacillus licheniformis* PMC 1847, como cepa de referencia por que la secuencia parcial del gen del RNAr 16S por sí sola no tiene suficiente valor para definir con exactitud una nueva especie. En el experimento se incluyeron las cepas que presentaban porcentajes de similitud con *Bacillus licheniformis* inferiores al 97%, estas cepas fueron E₃₀26 y N₃₀125, que presentaban valores del 94% de semejanza en el alineamiento global mediante BLAST.

Los resultados mostraron porcentajes de reasociación DNA-DNA claramente superiores al 70% en cada una de las cepas hibridadas con la cepa marcada.

B. licheniformis PMC 1847

Repetimos el experimento, pero marcando la cepa de referencia, *Bacillus licheniformis* PMC 1847, para comprobar que las cepas E₃₀36, E₃₀26 y N₃₀125 tenían valores de hibridación DNA-DNA que permiten incluirlas dentro de la especie *Bacillus licheniformis*. El esquema 4 muestra la hibridación realizada y los resultados se observan en la tabla 31.

Esquema 4. Hibridación cepa *B. licheniformis* PMC 1847 *.

Cepa marcada	Hibridación con:
<i>B. licheniformis</i> PMC 1847*	<i>B. licheniformis</i> PMC 1847 E ₃₀ 26 E ₃₀ 36 N ₃₀ 125

Tabla 31. Valores de hibridación de DNA-DNA entre la cepa marcada, *B. licheniformis* PMC 1847* y las cepas de estudio.

Cepas	<i>B. licheniformis</i> * - <i>B.licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i> *- E ₅₅ 36	<i>B.licheniformis</i> *- N ₃₀ 125	<i>B.licheniformis</i> *- E ₃₀ 26
RB%	100%	93,75%	74,98%	94,34%
RB%	100%	88,98%	66,80%	96,40%
RBR%	100%	91,36%	70,89%	95,37%

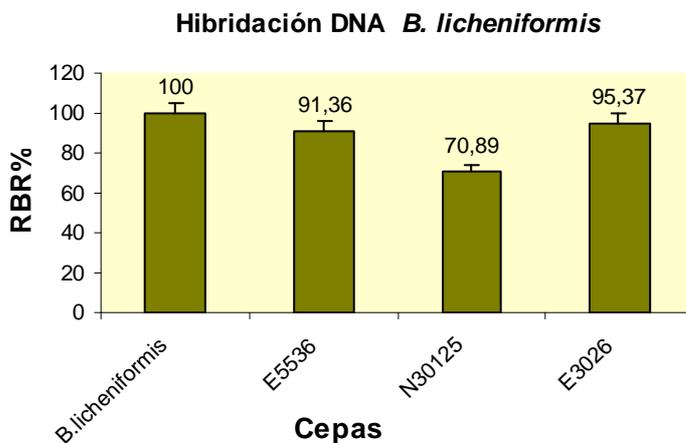


Figura 8. Resultados de la hibridación DNA-DNA *B.licheniformis* PMC 1847 *.

Los resultados confirman los obtenidos en el primer experimento, los porcentajes volvían a ser superiores al 70%. El contenido G+C de estas cepas es homogéneo 39,2%, 39,8% y 39,55% pertenecientes a las cepas E₃₀₂₆, E₅₅₃₆ y N₃₀₁₂₅ respectivamente.

Consideramos que las cepas **E₅₅₃₆**, **E₃₀₂₆** y **N₃₀₁₂₅** procedentes de las aguas residuales de las aceitunas de mesa, por los resultados de hibridación realizados, pertenecen al mismo grupo y se consideran incluidas en la especie *Bacillus licheniformis*.

Resultados de la hibridación de la Cepa I₃₀67

La cepa pertenece al fenón A.

Los resultados del alineamiento global mediante **BLAST** de la secuencia parcial del gen del RNAr 16S, obtenida con el oligonuclótido 16R519 (Lane, 1991; Fox y col., 1992), relacionaron a la cepa de estudio con las siguientes cepas:

- Bacillus subtilis*- 98%.
- Bacillus licheniformis*- 98%.
- Bacillus mojavensis* -98%.

La cepa I₃₀67 fue marcada e hibridada con las cepas de referencia *Bacillus subtilis* PCM 1903, *Bacillus licheniformis* PMC 1847 y con las cepas seleccionadas que, según los resultados de del alineamiento global mediante **BLAST** de las secuencias parciales del gen del RNAr 16S y el árbol filogenético correspondiente presentaban homología con esta cepa y las de referencia. El esquema 5 muestra el resumen de la hibridación realizada y la tabla 32 muestra los valores obtenidos.

Esquema 5. Hibridación cepa I₃₀67*.

Cepa marcada	Hibridación con:
I ₃₀ 67*	<i>B. subtilis</i> PCM 1903 <i>B. licheniformis</i> PMC1847 I ₃₀ 76 V ₃₀ 166 V ₃₀ 172

Tabla 32. Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada I₃₀67*, las cepas seleccionadas y las cepas de referencia.

Cepas	I ₃₀ 67*- I ₃₀ 67	I ₃₀ 67*- I ₃₀ 76	I ₃₀ 67*- V ₃₀ 166	I ₃₀ 67*- V ₃₀ 172	I ₃₀ 67*- <i>B. licheniformis</i>	I ₃₀ 67*- <i>B. subtilis</i>
RB%	100%	84,97%	16,97%	32%	36%	82,25%
RB%	100%	83,13%	25,30%	22,85%	34,36%	77,9%
RBR%	100%	84,05%	21,13%	27,42%	35,18%	80,07%

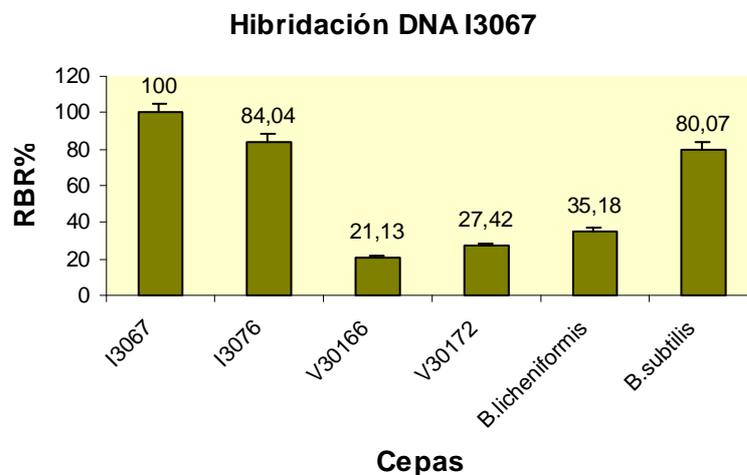


Figura 9. Resultados de la hibridación DNA-DNA I₃₀₆₇*.

La hibridación de I₃₀₆₇ marcada y realizada con las cepas de colección *Bacillus subtilis* PMC 1903 y *Bacillus licheniformis* PMC 1847 con las que presenta un porcentaje de 98% de similitud y las cepas I₃₀₇₆, V₃₀₁₆₆ y V₃₀₁₇₂, con porcentajes de similitud con las cepas de referencia eran del 96% y no habían sido incluidas en el grupo anterior como miembros de *Bacillus licheniformis*.

El experimento demostró que las cepas I₃₀₆₇, I₃₀₇₆ y *Bacillus subtilis* PMC 1903 presentaban más del 70% de reasociación DNA-DNA, mientras que V₃₀₁₆₆ y V₃₀₁₇₂ tenían valores de hibridación que las excluía de este grupo y, por tanto, no las relacionaba con *Bacillus subtilis* PMC 1903. El contenido G+C de las cepas procedentes del residuo, I₃₀₆₇ e I₃₀₇₆, era muy homogéneo, 37,8 mol% y 38 mol%, respectivamente, aunque inferior al de *Bacillus subtilis* PMC 1903, pero sin sobrepasar los 5 °C que están establecidos para delimitar una especie, este dato es informativo, pero no es considerado concluyente, porque el porcentaje de hibridación, que si es concluyente, entre las cepas fue suficientemente alto para agruparlas. Al obtener estos resultados no fue necesario hibridar con la cepa *Bacillus mojavensis* con la que también presenta un 98% de semejanza.

Las cepas I₃₀₆₇ e I₃₀₇₆, según la información obtenida del conjunto de pruebas moleculares y con los datos confirmatorios de la hibridación DNA-DNA, son incluidas como miembros de la especie *Bacillus subtilis*.

Resultados de las hibridaciones de las Cepas I₃₀73 y N₃₀138**Cepas I₃₀73**

La cepa I₃₀73 por sus características fenotípicas se incluye en el fenón A.

Los resultados del alineamiento global mediante **BLAST** de la secuencia parcial del gen del RNAr 16S con el oligonucleótido 16R519 (Lane, 1991; Fox y col., 1992) presentaron similitud con las cepas siguientes:

- Bacillus cereus*- 99%.
- Bacillus thuringiensis*- 99%.
- Bacillus anthracis*- 99%.

La cepa de nuestro estudio marcada, se hibridó con la cepa de referencia *Bacillus cereus* PCM 482 y con las cepas N₃₀138 y N₃₀137. El planteamiento y los valores de hibridación se pueden ver en el esquema 6 y en la tabla 33 respectivamente.

Esquema 6. Hibridación cepa I₃₀73*.

Cepa marcada	Hibridación con:
I ₃₀ 73*	<i>B. cereus</i> PCM 482 N ₃₀ 137 N ₃₀ 138

Tabla 33. Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada I₃₀73*, las cepas seleccionadas y la cepa de referencia.

Cepas	I ₃₀ 73*- I ₃₀ 73	I ₃₀ 73*- N ₃₀ 137	I ₃₀ 73*- N ₃₀ 138	I ₃₀ 73*- <i>B.cereus</i>
RB%	100%	87,01%	79,11%	57,73%
RB%	100%	88,38%	71,83%	62,42%
RBR%	100%	87,69%	75,47%	60,02%

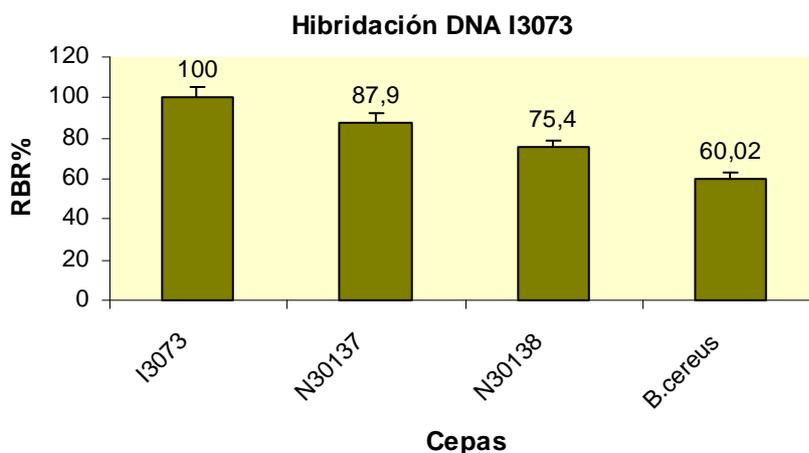


Figura 10. Resultados de la hibridación DNA-DNA I₃₀₇₃*.

Cepa N₃₀₁₃₈

Pertenece al fenón A por sus características fenotípicas.

Los resultados del alineamiento global mediante **BLAST** de la secuencia parcial del gen del RNAr 16S con el oligonucleótido 16R519 (Lane, 1991; Fox y col., 1992), relacionaban a esta cepa con las siguientes:

- Bacillus cereus*- 98%.
- Bacillus thuringiensis*- 98%.
- Bacillus anthracis*- 98%.

La cepa N₃₀₁₃₈ de nuestro estudio una vez marcada, fue hibridada con la cepa de referencia *Bacillus cereus* PMC 482 y con las cepas seleccionadas que, según los resultados del alineamiento global mediante **BLAST** de las secuencias parciales del gen del RNAr 16S y el árbol filogenético correspondiente, presentaban homología con *Bacillus cereus* PMC 482.

A continuación se puede ver, en el esquema 7, el resumen de la hibridación y los resultados de la misma que se muestran en la tabla 34.

Esquema 7. Hibridación cepa N₃₀₁₃₈*.

Cepa marcada	Hibridación con:
N ₃₀₁₃₈ *	<i>B. cereus</i> PMC 482 I ₃₀₇₃ N ₃₀₁₃₇

Tabla 34. Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada **N₃₀138***, las cepas seleccionadas y la cepa de referencia.

Cepas	N ₃₀ 138* - N ₃₀ 138	N ₃₀ 138* - I ₃₀ 73	N ₃₀ 138* - N ₃₀ 137	N ₃₀ 138* - <i>B.cereus</i>
RB%	100%	93,62%	75,57%	38,61%
RB%	100%	100%	92,9	44,84%
RBR%	100%	96,6%	84,24%	41,72%

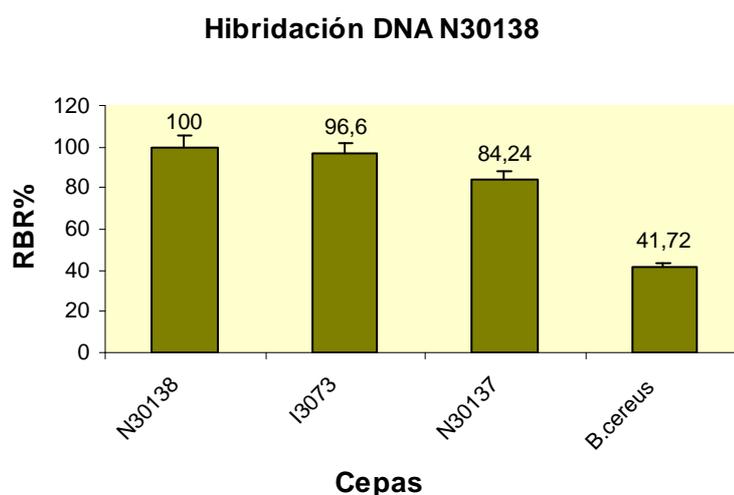


Figura 11. Resultados de la hibridación DNA-DNA **N₃₀138***.

Los experimentos de hibridación se realizaron para estudiar las cepas con una secuencia parcial del gen del RNAr 16S que, en el alineamiento global mediante BLAST se las relacionaban con el grupo de *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus anthracis*. Todas las especies pertenecientes al grupo de *Bacillus cereus* están estrechamente relacionadas. Los análisis de una variedad de pruebas bioquímicas indican que son similares en sus características fenotípicas (Gordon y col., 1973; Priest y col., 1988; Turnball y Kramer, 1991). Otros estudios demostraron el alto grado de similitud en las secuencias del gen del RNAr 16S (>99%) (Ash y col., 1991), del 23S rDNA (Ash y col., 1992) y la región espaciadora 16S-23S (Bourque y col., 1995; Harrell y col., 1995). Los datos de hibridación DNA-DNA de las cepas del grupo de *Bacillus cereus* realizados por Kaneko y col., (1978) les condujeron a afirmar que *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis* y *Bacillus mycoides* formaban una sola especie, sin embargo, Nakamura y Jackson (1995), mostraron mediante hibridación DNA-DNA

Resultados y discusión

que *Bacillus cereus* estaba estrechamente relacionado con *Bacillus thuringiensis* con porcentajes de hibridación entre el 65% y el 70% (Joung y Côté, 2002b), mientras que *Bacillus cereus* y *Bacillus mycoides* presentaban valores de reasociación DNA-DNA del 22% y 44%. La diferenciación entre estas especies está abierta a debate. La separación taxonómica debe basarse en otras características, la más importante, la formación de cuerpos parasporales por parte de *Bacillus thuringiensis* (Priest, 1993; Yamada y col., 1999). En características fisiológicas, también se pueden diferenciar los microorganismos pertenecientes a este grupo, la producción de toxinas insecticidas por *Bacillus thuringiensis*, enterotóxicas por *Bacillus cereus*, la producción de la toxina del ántrax por *Bacillus anthracis* y el crecimiento micoidal característico de *Bacillus mycoides* (Battisti y col., 1985), sin embargo estos caracteres podrían ser discutidos como marcadores de diferenciación por su transferencia en forma de plásmidos de unas especies a otras (González y col., 1982; Battisti y col., 1985; Henderson y col., 1994; Dietrich y Märtibauer, 1997).

Nuestras cepas de estudio, I₃₀73, N₃₀137 y N₃₀138, no presentan colonias con crecimiento en forma micoidal y lo más importante es que no presentaban cuerpos parasporales (Figuras 26, 27 y 28).

La hibridación se realizó con *Bacillus cereus* PCM 482, por ser la bacteria representante del grupo. Si los resultados relacionaban a nuestras cepas con la de referencia, se realizaría la hibridación con *Bacillus thuringiensis*. Marcamos dos cepas, una con un porcentaje de semejanza del 99%, la cepa I₃₀73, y otra con un porcentaje semejanza del 98% la cepa N₃₀138, según la secuencia del gen del RNAr 16S en el alineamiento global mediante BLAST. Las tres cepas en el árbol filogenético parcial realizado con las secuencias parciales del gen del RNAr 16S, están situadas en un agrupamiento independiente. Los resultados obtenidos en ambas experiencias mostraban que las tres cepas aisladas del residuo formaban un grupo independiente. Los valores de hibridación DNA-DNA con la cepa de referencia *Bacillus cereus* PCM 482 se encontraban muy por debajo del 70% de semejanza,

Resultados y discusión

concretamente cuando la cepa marcada fue N₃₀138, el resultado de la hibridación DNA-DNA fue de 41%, mientras que entre la cepa marcada y las dos cepas problema, presentaban valores superiores al 80%. De esta manera se descarta que pertenezcan al grupo de *Bacillus cereus*, así como a los otros miembros del grupo de *Bacillus cereus* con los que también estaban relacionadas. Los datos de G+C de las cepas problema son muy bajos, teniendo en cuenta que el promedio de composición de bases característico del DNA nuclear de los microorganismos se encuentra entre 25-80mol% de G+C, inferiores a los de *Bacillus cereus*, que tiene el valor más bajo de los microorganismos de este género. Las cepas I₃₀73, N₃₀137 y N₃₀138 tienen porcentajes de G+C de 30,1mol%, 30,4mol% y 32,5mol% respectivamente. Las diferencias en la temperatura de crecimiento, que es un factor que no se transfiere de una especie a otra permiten diferenciar las cepas objeto de estudio del grupo de *Bacillus cereus*. Las cepas aisladas en este estudio crecen hasta los 45 °C, sin embargo *Bacillus cereus* no es capaz de crecer a estas temperaturas y sí a temperaturas consideradas de psicrófilos (7 °C) (Lechner y col., 1998). Otro dato que permite que diferenciamos nuestras cepas del grupo de *Bacillus cereus* es la reducción de nitratos a nitritos, prueba en la que *Bacillus cereus* presenta un resultado negativo y la diferencia más importante es que no presentan cuerpos parasporales (figuras 27 y 28).

El conjunto de datos fenotípicos y moleculares agrupan a las cepas I₃₀73, N₃₀137 y N₃₀138 como integrantes de un grupo independiente, que constituye una nueva especie bacteriana descrita en este trabajo. La cepa tipo es **N₃₀138^T**. El nombre que ha sido elegido para esta nueva especie es ***Bacillus alkalitolerans***, por su capacidad de crecer a pH alcalinos, las demás características se encuentran recogidas en los resultados en el apartado IV.4.4.

Resultados de la hibridación de la Cepa I₃₀74

Esta cepa por sus características fenotípicas forma parte del fenón A.

El alineamiento global mediante **BLAST**, de la secuencia parcial del gen del RNAr 16S con el oligonucleótido 16R519 (Lane, 1991; Fox y col., 1992), dio máximas homologías con las siguientes cepas:

- Bacillus subtilis*- 99%.
- Bacillus licheniformis*- 99%.
- Bacillus mojavensis*- 98%.
- Bacillus sonorensis*- 99%.

La cepa I₃₀74 fue marcada y se realizó la hibridación con las cepas de referencia, *Bacillus subtilis* PMC 1903, *Bacillus licheniformis* PMC 1847 y *Bacillus mojavensis* NRRLB 14698, además de con las cepas que, según los resultados del alineamiento global mediante **BLAST** de las secuencias parciales del gen del RNAr 16S presentaban homología con las cepas de referencia y se agrupaban en el árbol filogenético correspondiente. El esquema 8 representa la hibridación realizada, los valores obtenidos en ella parecen en la tabla 35.

Esquema 8. Hibridación cepa I₃₀74*.

Cepa marcada	Hibridación con:
I ₃₀ 74*	<i>B. licheniformis</i> PMC 1947 <i>B. subtilis</i> PMC 1903 <i>B. mojavensis</i> NRRLB-14698 E ₅₅ 38 V ₃₀ 166 V ₃₀ 172

Tabla 35. Valores de hibridación DNA-DNA entre la cepa marcada I₃₀74*, las cepas seleccionadas y las cepas de referencia.

Cepas	I ₃₀ 74*- I ₃₀ 74	I ₃₀ 74*- E ₅₅ 38	I ₃₀ 74*- V ₃₀ 166	I ₃₀ 74*- V ₃₀ 172	I ₃₀ 74*- <i>B.licheniformis</i>	I ₃₀ 74*- <i>B.subtilis</i>	I ₃₀ 74*- <i>B.mojavensis</i>
RB%	100%	68,30%	61,63%	61,22%	32,83%	24,94%	20,70%
RB%	100 %	85,30%	67,83%	64,19%	43,02%	42,88%	25,69%
RBR%	100%	76,8%	64,73%	62,7%	37,92%	33,91%	23,19%

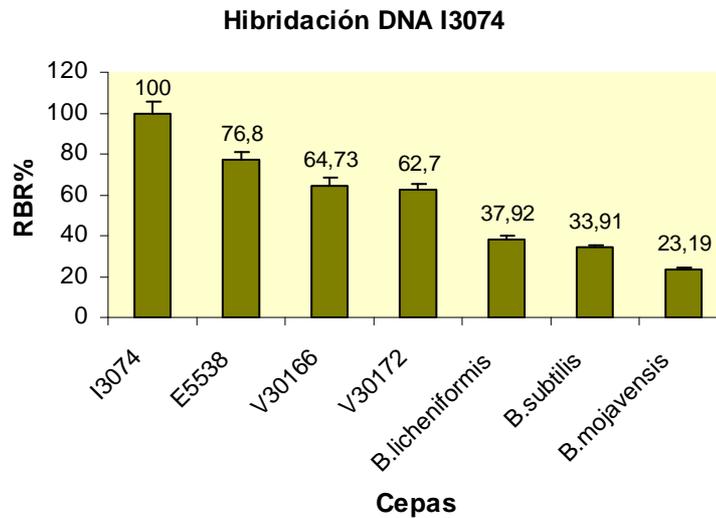


Figura 12. Resultados de la hibridación DNA-DNA I₃₀₇₄*.

La cepa I₃₀₇₄ fue relacionada por la secuencia parcial del gen del RNAr 16S con las cepas de referencia *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus sonorensis*, con las que presentaba un 99% de similitud en el alineamiento global mediante BLAST y con *Bacillus mojavensis* con quien presentaba un 98% de similitud.

Los experimentos de hibridación DNA-DNA se realizaron con *Bacillus licheniformis* PMC 1947, *Bacillus subtilis* PMC 1903 y *Bacillus mojavensis* NRRLB-14698. A pesar de que el porcentaje de semejanza con *Bacillus sonorensis* era del 99% y se debería incluir en la experiencia, no lo hicimos basamos referencias bibliográficas que nos permitieron distinguir nuestra cepa de estudio de *Bacillus sonorensis*. Duncan y col. (1994) estudiaron que algunas cepas de *Bacillus licheniformis* estaban incluidas dentro de la misma especie, pero pertenecían a especies no identificadas, aunque se hubieran clasificado como *Bacillus licheniformis*. Las pruebas fenotípicas agruparon en dos grupos a los microorganismos incluidos dentro de esta especie, Grupo 1, *Bacillus licheniformis sensu stricto* y Grupo 2 (Duncan y col., 1994). Los experimentos de hibridación DNA-DNA mostraron que el grupo 2 está en un taxón diferente a *Bacillus subtilis* y de todas las especies del grupo *Bacillus subtilis*-*Bacillus licheniformis*. El grupo 2 formó un grupo cohesivo con un porcentaje de hibridación del 80%-100% de

Resultados y discusión

reasociación DNA-DNA. En contraste, la reasociación DNA-DNA del grupo 2 con el grupo 1 dio valores de reasociación DNA-DNA entre 18% y el 46%, por lo que Wayne y col. (1987) lo consideraron como especies separadas, aunque la secuencia del gen RNAr 16S y su representación filogenética los consideraba monofilético. Palmisano y col. (2001) nombran la nueva especie como *Bacillus sonorensis*, filogenéticamente relacionado con *Bacillus licheniformis*, pero se trata de dos líneas diferentes como se ha demostrado por características fenotípicas (Palmisano y col., 2001). *Bacillus sonorensis* y *Bacillus licheniformis* son distinguibles por la tolerancia a la sal y los patrones de pigmentación. Según aportaron Palys y col. (1997) y Dykhuizen (1998) en las especies, las diferencias ecológicas y la distribución geográfica también se deben considerar, alegando que las esporas de *Bacillus licheniformis* pueden migrar agrupadas largas distancias con bastante frecuencia (Robert y Cohan, 1995) siendo posible encontrar cepas de *B. licheniformis* repartidas por toda la geografía, sin embargo, no se han encontrado cepas de *Bacillus sonorensis* fuera del lugar donde se aisló o en condiciones semejantes al desierto "Sonoran" donde fue aislado el microorganismo. Nuestra cepa presenta diferencias fenotípicas con *Bacillus sonorensis*. La primera y más importante es la capacidad de I₃₀74 de crecer a concentraciones de sal del **15% p/v**, mientras que *Bacillus sonorensis* sólo crece hasta el 3% p/v de ClNa. El contenido **en G+C difiere en 9 °C de ΔT_m** , cuando el límite establecido para considerar especies diferentes es de 5 °C de ΔT_m . La prueba de **V-P es negativa** en la cepa de estudio y positiva en *Bacillus sonorensis*, este microorganismo es además **oxidasa negativo** y **no crece a pH 10**, sin embargo nuestra cepa, I₃₀74, es positiva en la prueba de la oxidasa y crece a pH 10. No crece a temperaturas inferiores a **20 °C**, mientras que *Bacillus sonorensis* crece a 15°C.

Los datos diferenciales aportados, nos parecieron suficientemente importantes y de peso como para no hibridar con *Bacillus sonorensis* en un primer momento, hasta ver los resultados con las otras cepas de referencia. De este modo hibridamos con las cepas de referencia y con los microorganismos que presentaban similares resultados según el análisis de la secuencia parcial del gen del RNAr 16S en el alineamiento global mediante BLAST.

Resultados y discusión

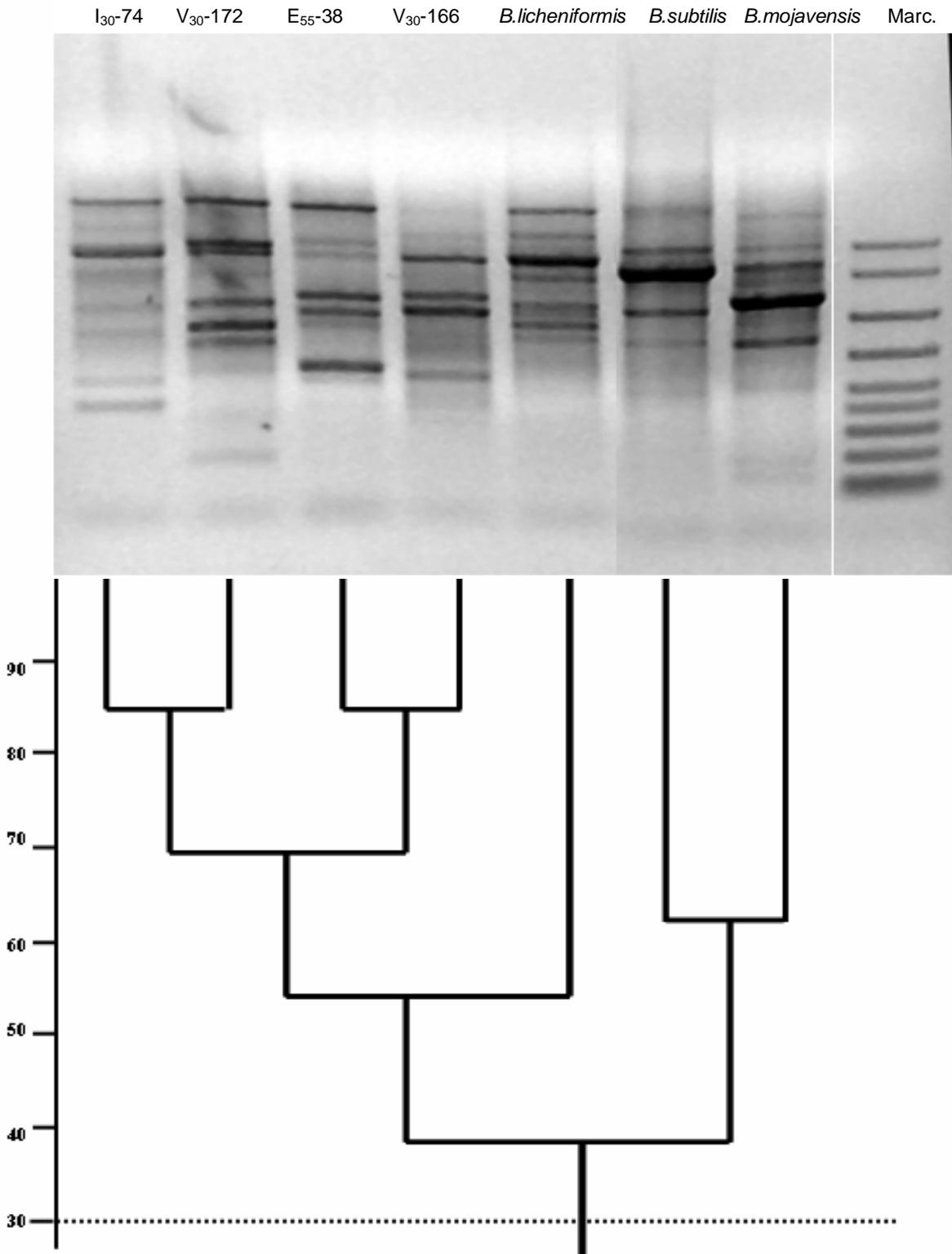
Los resultados del experimento de hibridación DNA-DNA descartaban que la cepa I₃₀74, perteneciera a alguna de las especies de referencia utilizadas que fueron *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus mojavensis*, ya que los valores de reasociación DNA-DNA obtenidos fueron de 37,9%, 33,9% y 23% respectivamente para cada cepa de referencia. Los valores de hibridación DNA-DNA entre las cepas I₃₀74 y E₅₅38, son superiores al 70% permitiendo que sean consideradas la misma especie. Los resultados de la hibridación DNA-DNA de la cepa I₃₀74 con las cepas V₃₀166 y V₃₀172 fueron de 64,7% y 62,7% respectivamente.

El estudio molecular de este grupo se completó con la **secuenciación total** del gen del rRNA 16S y el **análisis RAPD** para aclarar la ubicación de las cepas V₃₀166 y V₃₀172 que presentaron valores de reasociación DNA-DNA con la cepa I₃₀74 al límite del valor de hibridación que se considera para definir la especie. Se realizó la secuenciación completa de gen de rRNA 16S de ambas cepas, se analizaron y compararon exhaustivamente las características fenotípicas, las posiciones que ocuparon en el árbol filogenético (figura 15) y se realizó un **análisis RAPD** (figura 13). Este análisis permitió, mediante la analogía de los perfiles confirmar la hipótesis de partida. Considerando el perfil de la cepa V₃₀172 análogo al de la cepa I₃₀74 y el de la cepa V₃₀166 análogo al de la cepa E₅₅38. Estos datos se corresponden con las pruebas fenotípicas comparativas de dichas cepas (tabla 36). La evaluación conjunta de todos estos datos (RAPD, hibridación DNA-DNA, contenido G+C y características fenotípicas) permite incluir a estas dos cepas como integrantes del mismo grupo, que se propondrá para la descripción de una nueva especie bacteriana.

El conjunto de cepas I₃₀74, E₅₅38, V₃₀166 y V₃₀172 son consideradas una nueva especie bacteriana, descrita en este trabajo. La cepa tipo es I₃₀74^T. La hemos designado ***Bacillus olivae*** y las características que definen a la especie se encuentran el apartado IV.4.4 de resultados.

Resultados y discusión

Figura 13. Gel de electroforesis al 1% p/v de agarosa de las cepas I₃₀-74, E₅₅-38, V₃₀-166 y V₃₀-172 M: Marcador 2000-50 pb) y dendrograma RAPD (Coeficiente Pearson y agrupación UPGMA).



Resultados y discusión

Los productos mayoritarios de RAPD obtenidos tienen un peso molecular entre 3000 pb y 500pb. El análisis de los perfiles de RAPD muestra un agrupamiento de las cuatro cepas objeto de estudio, mostrando perfiles análogos de dos en dos, es decir **I₃₀74 se agrupa con V₃₀172, y E₅₅38 con V₃₀166. El grupo es independiente de las especies de colección *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. mojavensis* mostrando un porcentaje de semejanza inferior al 50%.**

Basándonos en los resultados de RAPD se realizó una comparación de las características fenotípicas más relevantes de las cuatro cepas y las especies de colección se muestran en la tabla 36.

Tabla 36. Características fenotípicas cepas integrantes grupo I₃₀74.

Características	E ₅₅ 38	I ₃₀ 74	V ₃₀ 166	V ₃₀ 172	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. mojavensis</i>
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	-	+	+	+	+
Catalasa	-	+	+	+	+	+	+
Esporas	+	+	+	+	+	+	+
Rango T. crecimiento (°C)	10-55	20-55	20-60	20-55	15-55	10-50	10-50
Crecimiento 10% p/v CINA	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a pH 10	+	+	+	+	-	+	-
Utilización de:							
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+
Xilosa	+	+	+	+	nd	nd	nd
Ac. Oxálico	+	-	-	-	nd	nd	nd
Ac. Fumárico	-	+	-	+	nd	nd	nd
Ac. Glutámico	-	-	-	-	nd	nd	nd
Producción ácidos							
Glucosa	-	+	-	+	+	+	+
Myo-Inositol	+	+	-	+	nd	nd	nd
Hidrólisis:							
Almidón	-	+	-	+	-	+	+
Caseína	-	+	-	+	+	+	+
Gelatina	-	+	+	+	nd	nd	nd
Indol	-	-	-	-	-	-	-
V-P	-	-	-	-	-	-	-
Reducción Nitratos	+	+	+	+	+	+	+
G+C (mol%)	42,1	36,95	40,6	41,28	46	43	43

Resultados de la hibridación de las cepas N₃₀135 y N₃₀120

Marcamos la cepa de referencia *Virgibacillus marismortui* ATCC 700626^T y la hibridamos con las cepas problema, N₃₀120 y N₃₀135 además de con E₅₅49 y V₃₀166 que sabíamos, por anteriores hibridaciones que no eran *Virgibacillus marismortui* ATCC 700626^T, utilizándolas como controles negativos. Las cepas N₃₀120 y N₃₀135 presentaban homología con *Virgibacillus marismortui* ATCC 700626^T en un 99% de semejanza en el alineamiento global mediante BLAST. En el árbol filogenético parcial (figura 4) ambas cepas tenían una posición que las relacionaba directamente con la cepa de referencia. El resultado en la hibridación con E₃₀8 fue de un 41,7% y un 33,5% para las cepas N₃₀120 y N₃₀135 respectivamente. El esquema 9 especifica la hibridación realizada y los resultados aparecen en la tabla 37.

Esquema 9. Hibridación cepa *V. marismortui* ATCC 700626^T.

Cepa marcada	Hibridación con:
<i>V. marismortui</i> ATCC 700626 ^T *	<i>V. marismortui</i> ATCC 700626 ^T E ₅₅ 49 N ₃₀ 120 N ₃₀ 135 V ₃₀ 166

Tabla 37. Valores de hibridación de DNA-DNA entre *V. marismortui* ATCC 700626^T*, cepa marcada, y las cepas N₃₀120, V₃₀166, N₃₀135 y E₅₅49.

Cepas	<i>V.marismortui</i> *- <i>V.marismortui</i>	<i>V.marismortui</i> *- N ₃₀ 120	<i>V.marismortui</i> *- V ₃₀ 166	<i>V.marismortui</i> *- N ₃₀ 135	<i>V.marismortui</i> *- E ₅₅ 49
RB%	100%	79,72%	51,28%	47,69%	38,04%
RB%	100%	85,64%	55,36%	49,75%	35,69%
RBR%	100%	82,68%	53,32%	48,72%	36,86%

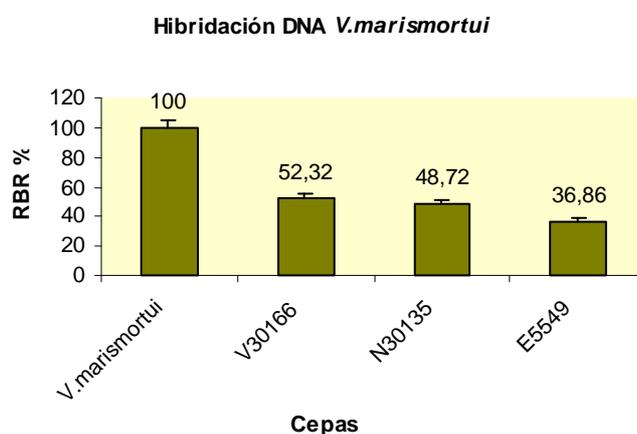


Figura 14. Resultados de la hibridación DNA-DNA *V. marismortui* ATCC 700626^T.

Cepa N₃₀120

Después de analizar los resultados de hibridación DNA-DNA llegamos a la conclusión de que la cepa **N₃₀120** con un porcentaje del 82,68%, se considera como miembro de la especie *Virgibacillus marismortui*.

Cepa N₃₀135

La cepa N₃₀135, con un valor de 48,7% no pertenece a esta especie. Se realizó la secuenciación total del gen del RNAr 16S que permitiría tener una posición más real de la cepa de estudio. El alineamiento global mediante BLAST relacionó a N₃₀135 con *Bacillus flexus* y *Bacillus firmus* en un porcentaje del 96%, por lo que no fue hibridada con ninguna de ellas, ya que el porcentaje a partir del que se debe hibridar es del 97%.

Resultados y discusión

La cepa N₃₀135, por el conjunto de resultados, se considera una nueva especie, con una sola cepa. Se ha tenido presente que Sneath (1977) sugirió, que para definir una especie se necesitaba al menos un mínimo de 10 aislamientos o preferiblemente 25, sin embargo, se observó que las nuevas especies que estaban siendo descritas en el *International Journal of Systematic and Evolutyony Microbiology* en 2002, más de la mitad de las especies se basaban en un sólo aislamiento. Una propuesta de Chystensen y col. (2001) fue, que no era obligatorio hacer un estudio de un número determinado de cepas para describir una nueva especie y no fue implantado por el "International Committe for Systematics of Prokariotes", alegando que no siempre es posible obtener más aislamientos de la misma cepa, y que se pueden añadir más tarde, enmendando la descripción, pero si no se realiza la descripción de la nueva especie, podría ser una pérdida para la ciencia (Oren, 2004).

Proponemos a la cepa N₃₀135^T como especie nueva, a la que se ha nombrado como ***Bacillus halotolerans*** y las características que definen a la especie se encuentran el apartado de resultados IV.4.4.

Los resultados todas las hibridaciones realizadas en el presente trabajo se resumen en el esquema 10, con el objetivo de definir las posibles especies nuevas.

Esquema 10. Resumen de las hibridaciones realizadas.

Cepas	Hibridación DNA-DNA	RBR%
E ₃₀ 8	<i>Virgibacillus marismortui</i>	47,02
	E ₅₅ 49	71,89
	I ₃₀ 77	88,39
	N ₃₀ 129	78,90
	N ₃₀ 135	33,59
	V ₃₀ 166	16,97
N ₃₀ 120	41,78	
E ₃₀ 18	<i>Bacillus pumilus</i>	86,5
E ₅₅ 36	<i>Bacillus licheniformis</i>	91,36
	E ₃₀ 26	80,96
	N ₃₀ 125	95,26
I ₃₀ 67	<i>Bacillus subtilis</i>	80,07
	<i>Bacillus licheniformis</i>	35,18
	V ₃₀ 166	21,23
	V ₃₀ 172	27,42
I ₃₀ 73	I ₃₀ 76	84,05
	<i>Bacillus cereus</i>	60,02
	N ₃₀ 138	75,47
I ₃₀ 74	N ₃₀ 137	87,69
	<i>Bacillus licheniformis</i>	37,92
	<i>Bacillus subtilis</i>	33,91
	<i>Bacillus mojavensis</i>	23,19
	E ₅₅ 38	76,8
	V ₃₀ 166	64,73
V ₃₀ 172	62,7	
N ₃₀ 138	<i>Bacillus cereus</i>	41,72
	I ₃₀ 73	96,6
	N ₃₀ 137	84,24
<i>Bacillus licheniformis</i> PCM 1847	E ₃₀ 26	95,37
	E ₅₅ 36	91,36
	N ₃₀ 125	70,89
<i>Virgibacillus marismortui</i> ATCC 700626T	E ₅₅ 49	36,86
	N ₃₀ 135	48,72
	V ₃₀ 166	53,32
	N ₃₀ 120	82,68

IV.4. DESCRIPCIÓN POLIFÁSICA DE LAS NUEVAS ESPECIES DEFINIDAS EN ESTE ESTUDIO.

IV.4.1. Secuenciación total del gen del RNAr 16S de las cepas que serán descritas como especies nuevas.

Secuencias del gen del RNA ribosómico 16S

Las secuencias completas del gen del RNAr 16S de las cepas consideradas como nuevas especies y las cepas de dudosa integración se muestran a continuación.

>E₃₀₈

TGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGCGGGAAGCAGGCAGATCCTCTTCAGGTGACGCCTGTGGAACGAGCGGCGGTACGGG
 TGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACCCCGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAAATACTTTTCGTTGCATAAC
 GAGAAGTTGAAAAGCGGGCTTTTAGCTGTCACTTACAGATGGGCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCG
 ACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
 TTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTACAGGGAAGAACA
 AGTCCGTTCAAATAGGGGGCCCTTGACGGTACTGACCAGAAAGCCCGGCTAATACTGTCAGCAGCCCGGGTAATACGTAGGGGCAAG
 CGTTTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCCGCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTTAACCGTGGAGGGCCATT
 GGAACCTGGAGGACTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGG
 CGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGT
 AAACGATGAGTGTAGGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA
 AGGCTGAAACTCAAAAAGAAATGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCGAAGGCCAGCATTAG
 TTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA
 CACGTGCTACAATGGATGGAACAAAGGGCAGCGAAGCCGTGAGGTCAAGCAAATCCCATAAAACCATTCAGTTTCGGATTGCAGGCT
 GCAACTCGCCTGCATGAAGCCGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC
 CGTACACACGAGAGTTGGTAAACACCCGAAGTCGGTGAAGTAACTTTTGGAGCCAGCCGCGGAAGGTGGGACCAATGATTTGGGGT
 AAGTCAACAAGGAGC

>I₃₀₇₄

ATCATGGCTCAGGAACGAAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTNAGCGG
 CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAAC
 CGCATGGTTCAATTATAAAAGGTGGCTTTTAGCTACCCTTACAGATGGACCCGCGGCCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTCA
 CCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
 AGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTGTTAGG
 GAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
 TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGCTCA
 ACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAAAGATGT
 GGAGGAACACCAGTGGCGAAGGGGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGANGCGGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTATATAACC
 TGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGTGTCAGCAAACGCATTAACACTCCGCCTG
 GGGAGTACGGTCCGAGACTGAAACTCAAAAAGAAATGACCGGGGCCACACAAGCCGGTGGACACTGTGTAAATGTTAATTCGAAG
 CAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTAGAGATAGGGCTTCCCTTCGGGGGCGAGGTGACAGGTGGTGC
 ATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGG
 GCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAG
 TGCTACAATGGGCAAGCAAAAGGGCAGCGAAGCCGAGGCTAAGCAATCCCAAAATCTGTTCTCAGTTTCGGATCGCAGTCTGCAA
 CTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT
 ACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAAGTAACTTTTGGAGCCAGCCGCGGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGT
 CGTAAACAGGTAGCCGATTTCGGAAGGTGCGGGTGGGATACCCCTCTTAA

>N₃₀138

GAGTTTGTACCTGGCTCAGGGATGAAACGCGAGCGGGGTGCTTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTTATAA
 GTTAGCGGCGCACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCATAAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACA
 TTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTNAAAGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA
 CGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGG
 CAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGTGAAGGCTTTCCGGTTCGTAATAACTCTGT
 TGTTAGGGAAGAACAGTGTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
 GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCA
 CGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTTGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGNGAAATGCGTA
 AAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTA
 GATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTAGAGGGTNTCCGCCCTTTAGTGTGAGGTTAACGATTAAGCAC
 TCCGCCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTTGAACCTCAAAGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGACATGTTGTTAATTCGA
 AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAACCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTACAGGTGGT
 GCATGGTGTGCTGAGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTT
 GGGCACTTAAGGTGACTGCCGGTGAACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCGCTAATGCGCTACACACCGCCG
 CGTGCTACAATGGACGGTACAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGC
 AACTCGCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAACTCGCGGATCAACATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCG
 TCACACCAGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCCGTGGGGTAACTTTTTTGGAGCCAGCCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGT
 GAAGTCGTAACAAGGGTAGCCGTATTTCGGAAGGTGCGGCTGGGACACCTCTTAA

>N₃₀135

GAGCTGGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATCTGAGGGAGCTTGCTCCCAAATTAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGT
 GGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATCTTTTTTATACATATAAAGATTGAAA
 GATGGTTCTGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCG
 AACGCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGTGAAGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTATCGGAGTAAC
 TGCCCGTACCTTGACGCTACCTAACCGAAGGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGCAAGCGTTTCCGG
 ATATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTCTTTAAGTTGATGTGAAAGCCCGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAACTGGGGAA
 CTTGAGTGCAGAAAGAGGAAAGTGGACTTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTT
 CTGGTCTGTAAGTACTGACTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGC
 TAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGTGCAGCAACGATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCA
 AAGGAATTGACGGGGGCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTC
 TGACAACTCTAGAGATAGGACGTTCCCTTCCGGGGACAGAGTGCAGGTTGATGGTGGTGCATGGTTGCTGCTGAGATGTTG
 GGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGCACAAACCGGA
 GGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGCTGTACAATGGATGGTACAAGGGCTGCAAGAC
 CGCGAGGTTTAGCCAATCCCATAAAACCATCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGAATCGCTAGTAACT
 GCGGATCAGCATGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCAGAGAGTTTGTAAACCCGGAAGTCCGT
 GGGTAACTTTTGGGCCAGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGAACAAGGAC

>V₃₀166

GACTGGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGTGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTG
 GGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTCAATATAAAAAG
 GTGGCTTTTAGCTACCCTTACAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCG
 ACCTGAGAGGGTGTACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACG
 AAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGTGAAGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAAT
 AGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTC
 CGGAATTTATGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATGGAAAC
 TGGGGAACCTTGAGTGCAGAAAGAGGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGG
 CGACTCTTTGCTGTAACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCGAAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGA
 TGAGTGTAAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGTGCAGCAACGCAATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTCCGAAGACTG
 AAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGCAAGAACCCTTACCAGGTCTTGA
 CATCCTCTGACAACCTTAGAGATAGGGCTTCCCTTCCGGGGCAGAGTGCAGGTTGGTGCATGGTTTCTGCTGAGTCTGTGCTGAGAT
 GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGCACAAAC
 CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGCTGTACAATGGGCGAACAAGGGCAGCG
 AAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCCGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTGGAAATCGCTAGT
 AATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCAGAGAGTTTGTAAACCCGGAAGT
 CGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGAACAAGGAGCCG

>V₃₀172

```
ACTGGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCGAGGGAGCTTGTCCCTTTGTCAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG
TAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATTATAAAAGGT
GGCTTTTACCACTTACAGATGGACCCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCACGATGCGTAGCCGACCTG
AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGT
CTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGC
GGTACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAA
TTATTGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGG
AACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAAAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACT
CTCTGGTCTGTAAGTACGCTGANGCGGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTATATACCCTGGTAGTCCACGGGTAACGATGAGT
GCTAAGTGTAGAGCCGTAACGATGAGTTAAGTTTTAGAGGTTTCCCCTTTAGTGTGCAGCAAACCATTAACATCCCCTTGGGG
AGTACGTGCAAGACTGAAATCAAAGGAATTGCGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAGCAACCGGAAGACCT
TACCAGTCTTGACATCTTCTGACAACCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTTCATGGTTGTCTCAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTGTTTAGTTGCCACATTGAGTTGGCACTTAAGGTGACTCCGGTG
ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACTGGGCTACCACGTGTCAATGGGCAGAACAAGGGCAG
CGAAGCCGCGAGTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTTCAGTTCGGATCCAGTCTGCAATGACTGCGTGAAGCTGGAATCGTAGTAATC
CGCGATCACATGCCGCGTGAATACGTTTCCCGGCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGTACACCCGAAGTCGGTGAGG
TAACCTTTGGAGCCAGCCCGCAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGAGCCG
```

En la tabla 38 aparecen los resultados del alineamiento global mediante BLAST de las secuencias totales del gen del rRNA 16S de las nuevas especies.

Tabla 38. Resultados de alineamiento global mediante **BLAST** de las secuencias totales del gen del rRNA 16S de las cepas descritas como nuevas especies.

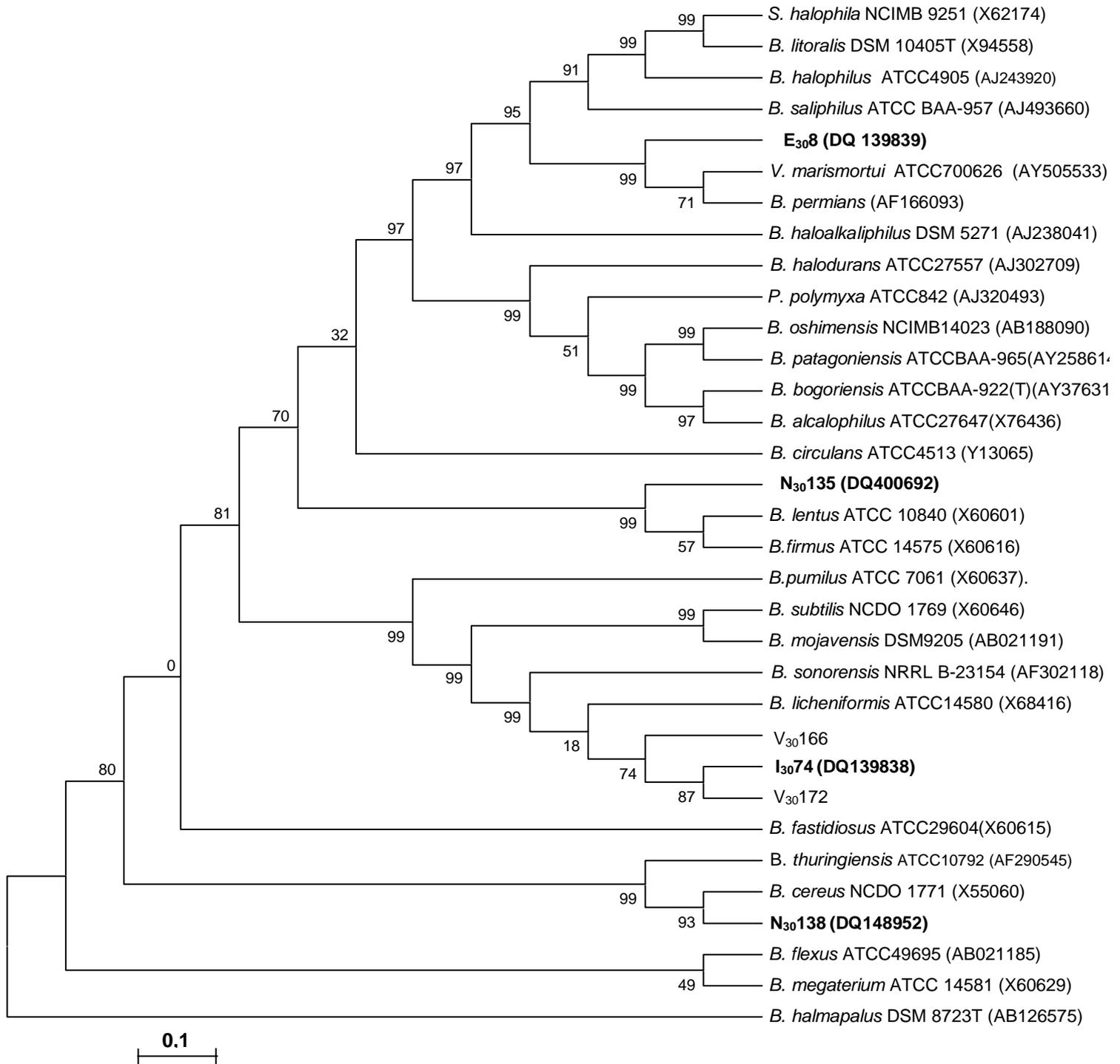
Cepa	Microorganismo relacionado	% Similitud
E₃₀8	<i>Virgibacillus marismortui</i>	98
	<i>Bacillus permians</i>	98
	<i>Virgibacillus halodenitrificans</i>	95
	<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	96
I₃₀74	<i>Bacillus licheniformis</i>	98
	<i>Bacillus subtilis</i>	98
	<i>Bacillus sonorensis</i>	98
N₃₀135	<i>Bacillus flexus</i>	96
	<i>Bacillus firmus</i>	96
N₃₀138	<i>Bacillus cereus</i>	98
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	98
	<i>Bacillus anthracis</i>	98

IV.4.2. Análisis filogenético basado en las secuencias totales del gen del rRNA 16S.

El árbol filogenético que contiene las secuencias totales del gen del rRNA 16S de las especies de colección y de las cepas E₃₀8, I₃₀74, N₃₀138, N₃₀135, V₃₀166, V₃₀172 se muestra en la figura 15.

Resultados y discusión

Figura 15. Árbol filogenético de las secuencias totales del gen RNAr 16S de las cepas bacterianas propuestas como nuevas especies y las especies de colección.



IV.4.3. Análisis de ácidos grasos de las nuevas especies.

El perfil de ácidos grasos es utilizado como un importante criterio taxonómico y nos proporciona información para completar los estudios y así, ayudar a la identificación de los microorganismos objeto de estudio. Saito en 1960 y Kaneda en 1963 fueron los primeros que identificaron la presencia de ácidos grasos metil ramificados iso- y anteiso- como los mayores constituyentes de las membranas celulares en el género *Bacillus*. Kämpfer en 1994, agrupó a las especies de *Bacillus* en siete grupos en función de su perfil de ácidos grasos, aunque se comprobó que dentro del mismo grupo, también existía heterogeneidad.

Las especies del género *Bacillus* en condiciones de crecimiento controladas muestran un perfil de ácidos grasos homogéneo que puede ser usado para diferenciar microorganismos estrechamente relacionados. Género y especie van a ser distinguidas por diferencias cualitativas y cuantitativas en la composición de ácidos grasos. Cepas dentro de la misma especie muestran muy pocas diferencias en los perfiles de ácidos grasos (Miller y Berger, 1985). Todo ello ha llevado a establecer que el contenido total de ácidos grasos es un importante criterio taxonómico y los análisis de datos del perfil de ácidos grasos proporcionan información taxonómica útil a nivel de especie y en algunos casos a nivel de subespecie (Mukwaya y Welsh, 1989).

En estudios recientes efectuados por López-da Silva y *col.* (2006), los microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* presentan un perfil de ácidos grasos en los que el ácido graso mayoritario es ácido iso-C_{15:0} y anteiso-C_{15:0} este hecho se confirma con anteriores estudios de Väisänen y Salkinoja-Salonen (1989) y Kämpfer (1994).

El perfil de ácidos grasos de las cepas de este estudio, se muestra en la tabla 39 y los cromatogramas en las figuras 16, 17, 18 y 19.

Tabla. 39. Análisis del contenido de ácidos grasos de las posibles cepas nuevas.

Acidos Grasos	I ₃₀ 74	E ₃₀ 8	N ₃₀ 135	N ₃₀ 138
12:0 ISO	ND	ND	ND	1,31
12:0	ND	ND	ND	0,34
13:0 ISO	0,07	0,45	0,14	10,48
13:0 ANTEISO	ND	0,12	0,27	2,46
14:0 ISO	0,77	3,05	5,40	6,66
14:0	0,31	0,40	3,03	1,83
15:0 ISO	27,10	33,71	25,58	16,10
15:0 ANTEISO	32,37	28,43	41,08	6,38
15:1 w5c	ND	ND	ND	0,12
15:0	0,21	0,21	0,15	0,45
16:1 w7c alcohol	0,21	0,85	1,18	1,03
16:0 ISO	4,54	4,92	7,34	8,63
16:1 w11c	0,36	0,76	0,83	2,30
16:1 w7c	0,59	0,43	0,98	12,64
16:0	4,66	4,07	3,16	6,98
15:0 ISO 3OH	ND	0,10	ND	ND
15:0 2OH	ND	0,10	ND	0,32
ISO 17:1 w10c	0,52	0,42	0,14	4,55
ISO 17:1 w5c	ND	ND	ND	2,09
17:1 ANTEISO	0,36	0,43	0,57	0,41
17:0 ISO	11,62	10,01	0,96	8,98
17:0 ANTEISO	15,78	9,20	8,42	1,65
17:0	ND	0,11	ND	0,53
18:0 ISO	0,09	0,15	0,12	0,43
18:1 w9c	0,38	0,51	0,55	1,60
18:1 w7c	ND	0,14	ND	ND
18:0	0,49	0,42	0,12	1,72
19:0 ISO	0,12	0,18	ND	ND
19:0 ANTEISO	0,13	0,09	ND	ND

Figura 16. Perfil ácidos grasos cepa E₃₀8.

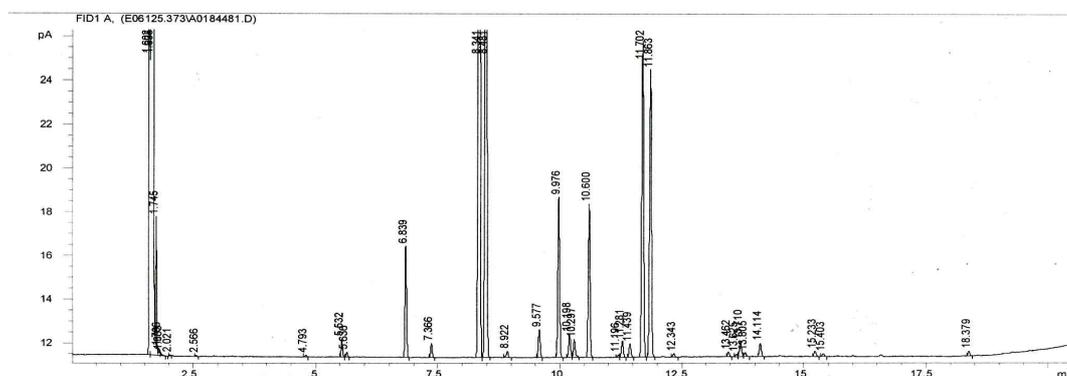


Figura 17. Perfil de ácidos grasos cepa I₃₀74.

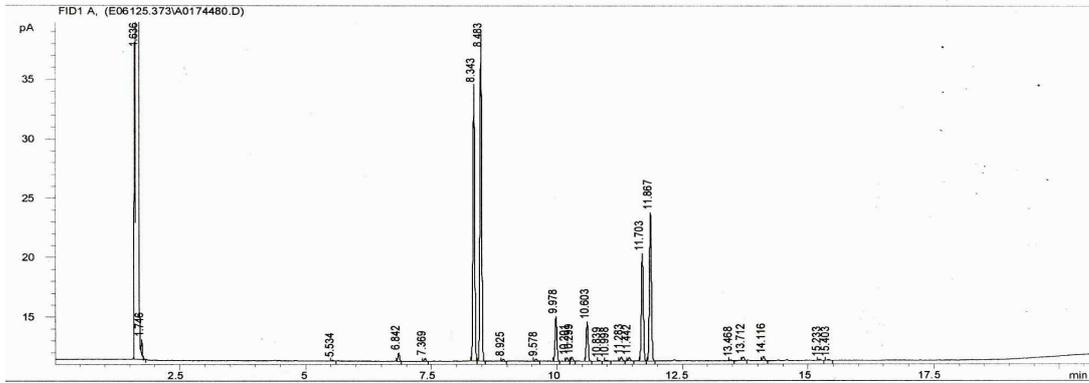


Figura 18. Perfil de ácidos grasos cepa N₃₀135.

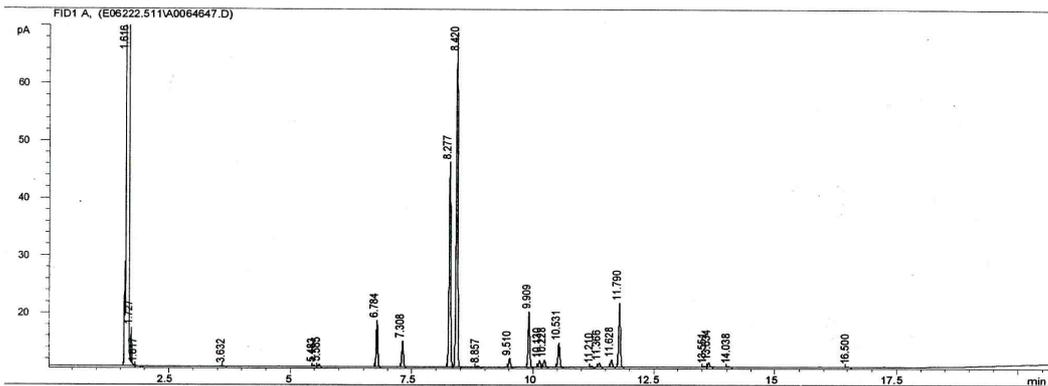
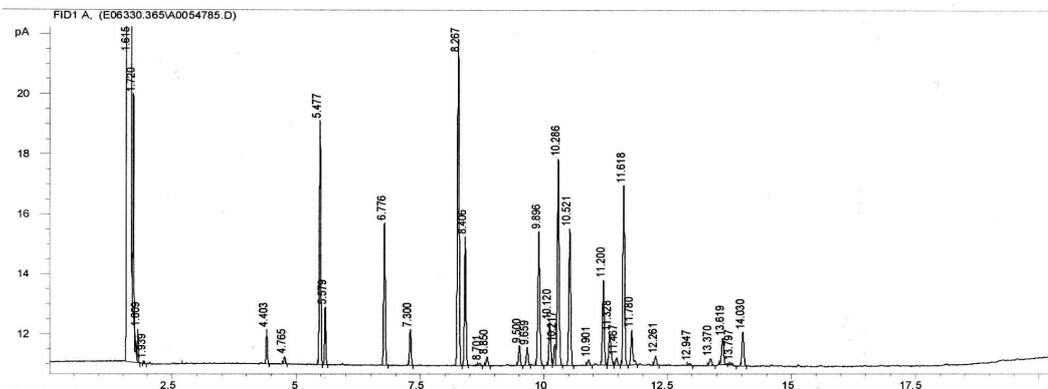


Figura 19. Perfil de ácidos grasos de la cepa N₃₀138.



Resultados y discusión

Los resultados del análisis de ácidos grasos de las cepas del estudio confirma la presencia de iso-C_{15:0} y anteiso-C_{15:0} como ácido graso mayoritario para las cepas I₃₀74, E₃₀8 y N₃₀135. En menor proporción los ácidos grasos iso-C_{17:0} en I₃₀74, y E₃₀8 y anteiso-C_{17:0} en I₃₀74, y E₃₀8 y N₃₀135. Los ácidos iso-C_{16:0} y C_{16:0} están representados en todas las cepas formando parte de las membranas celulares. La cepa N₃₀138, sin embargo, tiene un perfil heterogéneo, presentando mayor variedad en su composición. Esto confirma que dentro de un mismo género, a nivel de especie existe heterogeneidad (López- da Silva y col., 2006).

El perfil que presentan las cepas I₃₀74 y N₃₀135 coincide con los estudios realizados por López-da Silva (2006) con valores mayoritarios en especies de *Bacillus* para los ácidos grasos iso-C_{15:0} y anteiso-C_{15:0}.

La cepa E₃₀8, muestra un perfil similar a las anteriores ya que pertenece a un género muy relacionado con *Bacillus* como es *Virgibacillus*, pero también coincide el perfil de ácidos grasos de la cepa E₃₀8 con el de otras especies del género *Virgibacillus* (Heyndrickx y col.,1998; Heyrman y col.,2003).

IV.4.4. Descripción fenotípica, morfológica y genotípica de las nuevas especies.

El conjunto de datos fenotípicos, quimiotaxonómicos, filogenéticos, hibridación DNA-DNA y perfiles RAPD mostrados en los apartados anteriores, permite establecer cuatro posibles especies bacterianas nuevas aisladas de las aguas residuales de las aceitunas de mesa. Las características generales que definen a las cepas que han sido consideradas como nuevas especies por los análisis de taxonomía numérica y los datos moleculares se resumen en la tabla 40.

Tabla 40. Tabla resumen de características fenotípicas de las posibles cepas nuevas.

Características	E ₃₀₈	I ₃₀₇₄	N ₃₀₁₃₅	N ₃₀₁₃₈
Movilidad	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+
Esporas	+	+	+	+
Rango de temperatura crecimiento (°C)	20-40	20-55	10-45	20-45
Crecimiento 10% p/v CINA	+	+	+	+
Crecimiento a pH 10	-	+	+	+
Utilización de:				
Glucosa	+	+	+	+
Xilosa	-	+	-	+
Ac. Oxálico	-	-	+	+
Ac. Fumárico	-	+	+	+
Producción de ácidos a partir de:				
Glucosa	-	+	-	-
Myo-Inositol	-	+	-	-
Hidrólisis:				
Almidón	+	+	-	+
Caseína	+	+	-	+
Gelatina	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-
V-P	-	-	-	-
Reducción de Nitratos a Nitritos	+	+	-	+
G+C (mol%)	32,43	36,95	31,95	32,5

A continuación se describen pormenorizadamente cada una de las cepas que, por el conjunto de resultados obtenidos en las diferentes pruebas fenotípicas y moleculares hemos determinado como nuevas especies aisladas del líquido residual de las aguas de las aceitunas de mesa.

Descripción de la cepa Cepa E₃₀₈

La cepa E₃₀₈ se propone como nueva especie en este trabajo y se describe a continuación:

Descripción fenotípica de *Virgibacillus hispanicus* sp.nov.

Las células son rectas o ligeramente curvadas, los extremos son redondeados, son móviles por flagelos peritricos (figura 20), su tamaño es de 3,2µmx0,4µm (figura 20 y 21), aparecen solos o formando parejas. La tinción de Gram es positiva. Las endosporas son de formación lenta, son esféricas y aparecen en posición terminal con el esporangio no hinchado.

Resultados y discusión

Las colonias en medio MH al 5% p/v de concentración de sal, después de 48 h a 30 °C aparecen color amarillo-crema, con facilidad para extenderse a lo largo de la raya de siembra. La superficie es brillante, reluciente, sus diámetros se encuentran entre 0,5-2mm, los bordes de la colonia son regulares. Aerobios estrictos. Crecen en intervalos de temperatura entre 20 °C y 45 °C. Los valores de pH a los que crecen oscilan entre 4 y 8 unidades. Son halotolerantes, se desarrollan en concentraciones de sal entre el 0% p/v y el 20% p/v. Las condiciones óptimas de crecimiento se producen a 30 °C, pH 7 y 5% p/v de concentración de sal. Reducen nitratos y nitritos. Hidrolizan almidón, caseína, esculina y gelatina. Catalasa positiva, oxidasa positiva. Indol, Vogues-Proskauer y rojo de metilo negativos, no utiliza citrato como única fuente de carbono y energía. Los sustratos que es capaz de utilizar como fuente de carbono y energía son celobiosa, manosa, ramnosa y glucosa, producen ácidos a partir de fructosa, pero no a partir de glucosa, celobiosa, ramnosa, manosa, sacarosa, glucosa, galactosa, xilosa, manitol, dulcitol, adonitol ni myo-inositol. Presentan sensibilidad a cloranfenicol (30µg), kanamicina (30µg), amikacina (30µg), clindamicina (2µg), polimixina B (300U/IE), estreptomina (10µg) y ácido nalidixico (30µg). Son resistentes a tetraciclina (10µg), ampicilina (30µg), gentamicina (10µg), rifampicina (30µg), eritromicina (15µg), cefalotina (30µg) y penicilina G (10U/IE). La composición de ácidos grasos presenta como componente mayoritario iso-C_{15:0} y anteiso-C_{15:0} iso-C_{17:0} y menor proporción anteiso-C_{17:0} y en iso-C_{16:0} y C_{16:0}.

El contenido G+C es de 32,4 mol% para la cepa tipo E₃₀₈^T. Aisladas de las aguas residuales de las aceitunas de mesa.

Otras cepas relacionadas que se consideran como miembros de esta especie nueva son: **E₅₅₄₉**, **I₃₀₆₇** y **N₃₀₁₂₉**.

La secuencia completa del gen del RNA 16S se encuentra depositada en las bases de datos GenBank/EMBL con el número de acceso **DQ139839**.

La cepa está disponible en la colección de cultivo BCCM/LMG Bacteria Collection con el número de acceso: *Virgibacillus hispanicus* E₃₀₈=**LMG23503**^T, y en la DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) con el número *Virgibacillus hispanicus*=**DSM-18098**^T.

Descripción de la Cepa I₃₀74

La cepa I₃₀74 es propuesta como nueva especie bacteriana en este trabajo y se describe a continuación:

Descripción de *Bacillus olivae* sp. nov.

Las células son rectas, con los extremos redondeados, son móviles, su tamaño es de 2,4µm x 0,8µm (Figuras 22 y 23), aparecen solos o formando cadenas de dos o más microorganismos. La tinción de Gram es positiva. Las endosporas son de formación lenta, son esféricas y aparecen en posición terminal con el esporangio no hinchado, además presentan cristales piramidales en su interior (figura 29). Las colonias a las 48 h en medio MH al 5% p/v de concentración salina y a 30 °C, aparecen de color blanco-crema, mucosas. La superficie de la colonia es brillante, reluciente, los bordes son regulares, y su diámetro se encuentra comprendido entre 1-3 mm. A partir de los tres días de crecimiento pierde la mucosidad y la colonia aparece seca, con los bordes marcados. Aerobios estrictos, crecen a temperaturas entre 20 °C y 55 °C. Los valores de pH a los que se desarrolla están entre 5 y 10 unidades. Son halotolerantes, el crecimiento se produce en medios con una concentración de sal entre el 0% p/v y el 15% p/v. Las condiciones óptimas de crecimiento ocurren a los 30 °C, a pH 7 y en medios al 5% p/v de concentración de sal. Reducen los nitratos y nitritos. Hidrolizan almidón, caseína, esculina y gelatina. Catalasa y oxidasa positivas. No utilizan citrato como única fuente de carbono y energía, indol, Vogues-Proskauer, rojo de metilo negativos. Utiliza como única fuente de carbono y energía los sustratos celobiosa, fructosa, galactosa, maltosa, ramnosa, sacarosa, xilosa, glucosa, ácido fumárico, ácido málico, ácido propiónico. Producen ácidos a partir de glucosa, dulcitol, manitol y myo-inositol, pero no a partir de celobiosa, ramnosa, sacarosa, fructosa, manosa, maltosa y adonitol. Presentan resistencia a los antibióticos cloranfenicol (30µg), tetraciclina (10µg), ampicilina (30µg), kanamicina (30µg) clindamicina (2µg), gentamicina (10µg), polimixina B (300U/IE), estreptomina (10µg) y ácido nalidíxico (30µg). Son sensibles a rifampicina (30µg), cefalotina (30µg) y sulfamidas (200µg). La

composición de ácidos grasos presenta un perfil en el que predomina iso-C_{15:0} y anteiso- C_{15:0} y en menor proporción iso-C_{17:0} y anteiso-C_{17:0} y iso-C_{16:0} y C_{16:0}.

El contenido G+C es de 36,9 mol% para la cepa tipo I₃₀74^T. Aislada de las aguas residuales de las aceitunas de mesa.

Consideramos como miembro de esta especie a las cepas **E₅₅38**, **V₃₀166** y **V₃₀172**.

La secuencia completa del gen del RNA 16S se encuentra depositada en las bases de datos GenBank/EMBL con el número de acceso **DQ139838**.

La cepa está disponible en la colección de cultivo BCCM/LMG Bacteria Collection con el número de acceso: *Bacillus olivae* I₃₀74=**LMG23501^T**, y en la DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) con el número *Bacillus olivae*=**DSM-18058^T**.

Descripción de la Cepa N₃₀135

La cepa N₃₀135 se propone en este trabajo como nueva especie y se describe a continuación:

Descripción de *Bacillus halotolerans* sp. nov.

Las células son alargadas, anchas, los bordes son redondeados. Aparecen solos o en parejas unidos por la parte central. Su tamaño es de 1,5µm x 0,8µm (figuras 24 y 25). Móviles por flagelos peritricos (figura 24). Las esporas aparecen tras un periodo de incubación de 5 días a temperatura ambiente, son esféricas y su posición es terminal sin que el esporangio aparezca hinchado. En medio MH al 5% p/v de concentración de salina a las 48 h y a 30 °C, las colonias son amarillo-crema, los bordes son regulares, el diámetro está entre 0,25-1,5mm. Aerobios, crecen a temperaturas entre 10 °C y 40 °C, los valores de pH en los que crecen oscilan entre 4 y 12 unidades, son halotolerantes, crecen a concentraciones de sal de 0% al 15% p/v. El crecimiento óptimo se produce a 30° C, pH 7 y al 5% p/v de concentración de ClNa. No reducen nitratos, hidrolizan gelatina, pero no hidrolizan esculina, almidón ni caseína. Catalasa positiva, oxidasa positiva, no utilizan el citrato como fuente de carbono y energía, indol, Vogues-

Resultados y discusión

Proskauer y rojo de metilo negativos. Los sustratos que utilizan como única fuente de carbono y energía son fructosa, manosa, ramnosa, xilosa, glucosa, ácido fumárico, ácido málico, y ácido malónico. No produce ácidos a partir de glucosa, celobiosa, sacarosa, galactosa, fructosa, manosa, ramnosa, maltosa, adonitol, dulcitol, manitol y mio-inositol. Presentan resistencia a los antibióticos tetraciclina (10µg), kanamicina (30µg), amikacina (30µg), clindamicina (2µg) polimixina B (300U/IE), estreptomycin (10µg), cefalotina (30µg) y ácido nalidixico (30µg). Son sensibles a cloranfenicol (30µg), ampicilina (30µg), gentamicina (10µg) rifampicina (30µg) y eritromicina (15µg). Los ácidos grasos presentes son iso- C_{15:0} y anteiso-C_{15:0}, iso-C_{14:0}, isoC_{16:0} y anteiso-C_{17:0}.

El contenido G+C es de 31,9 mol% para la cepa tipo N₃₀135^T. Aisladas de las aguas residuales de las aceitunas de mesa.

La secuencia completa del gen del RNA 16S se encuentra depositada en las bases de datos GenBank/EMBL con el número de acceso **DQ400692**.

La cepa está disponible en la colección de cultivo BCCM/LMG Bacteria Collection con el número de acceso: *Bacillus halotolerans* N₃₀135 =**LMG23500^T**, y en la DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) con el número *Bacillus halotolerans*=**DSM-18057^T**.

Descripción de la Cepa N₃₀138

La cepa N₃₀138 se propone en este trabajo como nueva especie y es descrita a continuación:

Descripción de *Bacillus alkalitolerans* sp. nov.

Las células son gruesas, rectas, de bordes redondeados, a veces ligeramente curvadas, Gram-positivos, móviles por flagelos peritricos, su tamaño es de 1,9µm x 0,8µm (figura 26). Aparecen solos o en parejas. La formación de endosporas es lenta, se forman abundantemente a partir de los 5 días de incubación a temperatura ambiente. Las endosporas

Resultados y discusión

son en su mayoría redondas (figura 24), pueden aparecer en posición central y tienden a posición subterminal, en otras ocasiones las esporas aparecen en posición terminal, el esporangio se muestra hinchado. Después de 48h en medio MH al 5% p/v de concentración salina y a 30 °C las colonias son blanco mate, ligeramente abultadas, con bordes irregulares y en el interior aparece un halo más claro, su diámetro esta entre 0,25-2mm. Son aerobios, crecen en intervalos de temperaturas entre 20 °C y 45 °C y a valores de pH entre 3 y 12 unidades. Son halotolerantes, crecen a concentraciones de sal entre el 0% p/v y el 10% p/v. El crecimiento óptimo se produce a 30 °C, pH 7 y en medios al 5% p/v de concentración salina. Reducen nitratos y nitritos, hidrolizan almidón, gelatina, caseína y esculina. No utilizan el citrato como fuente de carbono y energía, indol, Vogues-Proskauer, rojo de metilo negativos. Como única fuente de carbono y energía utilizan los sustratos fructosa, manosa, ramnosa, xilosa, glucosa, ácido fumárico, ácido málico, ácido propiónico, ácido oxálico y alanina. No producen ácidos a partir de glucosa, sacarosa, galactosa, manosa, ramnosa, maltosa, xilosa, adonitol, dulcitol, manitol ni myo-inositol. Son resistentes a los antibióticos cloranfenicol (30µg), tetraciclina (10µg), amikacina (30µg), clindamicina (2µg), gentamicina (10µg), rifampicina (30µg) eritromicina (15µg), cefalotina (30µg) y ácido nalidíxico (30µg). Presentan sensibilidad a los antibióticos ampicilina (30µg), kanamicina (30µg), polimixina B (300 U/IE), estreptomycin (10µg), penicilina G (10U/IE) y sulfamidas (200µg). Los ácidos grasos son iso-C_{13:0}, anteiso-C_{13:0}, anteiso-C_{14:0}, iso-C_{15:0}, anteiso-C_{15:0}, iso-C_{16:0}, iso-C_{16:1w7c}, C_{16:0}, iso- C_{17:1w10c}, iso-C_{17:1w5c}, iso- C_{17:0}.

El contenido G+C es de 32,5 mol% para la cepa tipo N₃₀138^T. Aislada de las aguas residuales de las aceitunas de mesa.

Por los resultados de hibridación obtenidos, consideramos como miembros de esta especie a las cepas **N₃₀137** e **I₃₀73**.

La secuencia completa del gen del RNA 16S se encuentra depositada en las bases de datos GenBank/EMBL con el número de acceso **DQ148952**.

La cepa está disponible en la colección de cultivo BCCM/LMG Bacteria Collection con el número de acceso: *Bacillus alkalitolerans* N₃₀138=**LMG23502^T** y en la DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) con el número *Bacillus alkalitolerans*=**DSM-18046^T**.

Figuras de la morfología de las distintas cepas descritas como especies nuevas.

Figura 20. Tinción negativa cepa E₃₀₈-TEM



Figura 21. Corte fino cepa E₃₀₈-TEM.

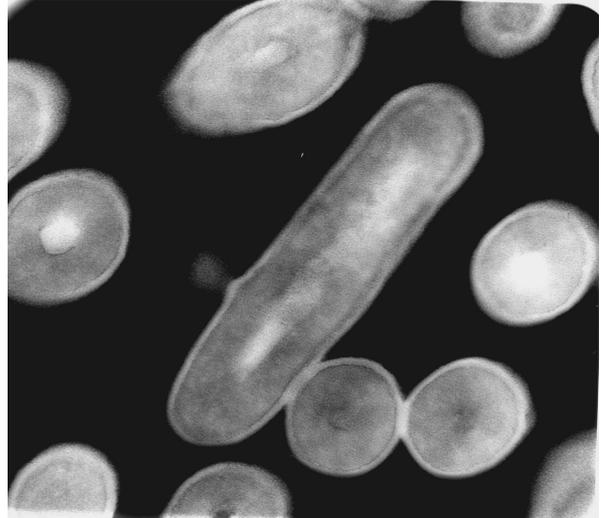


Figura 22. Tinción negativa cepa I₃₀₇₄-TEM.



Figura 23. Corte fino cepa I₃₀₇₄-TEM.

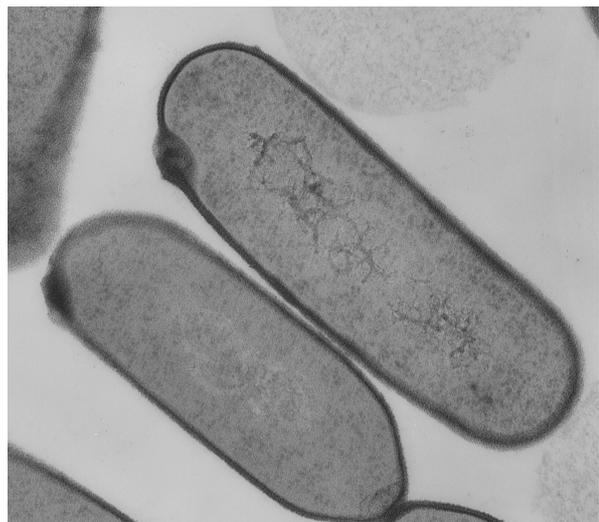


Figura 24. Tinción negativa cepa N₃₀135-TEM.

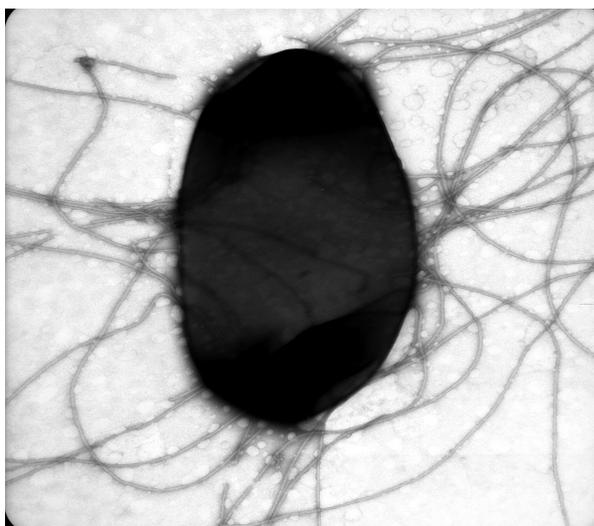


Figura 25. Corte fino cepa N₃₀135-TEM.

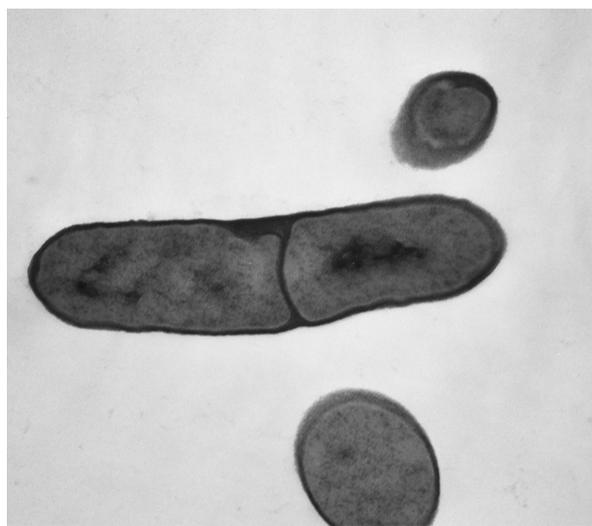


Figura 26. Tinción negativa cepa N₃₀138-TEM.

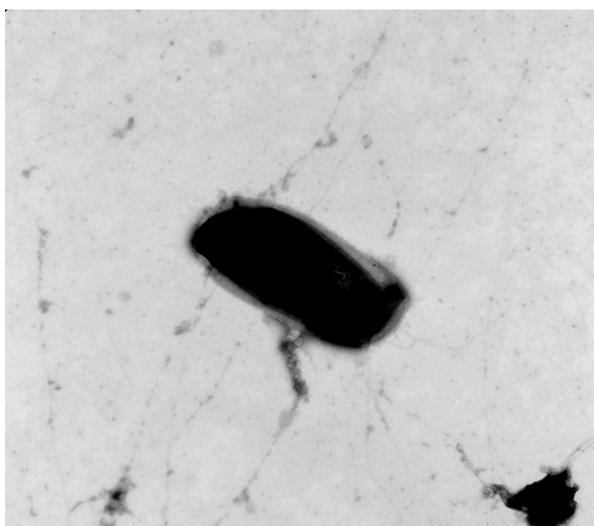


Figura 27. Corte fino cepa N₃₀138-TEM.

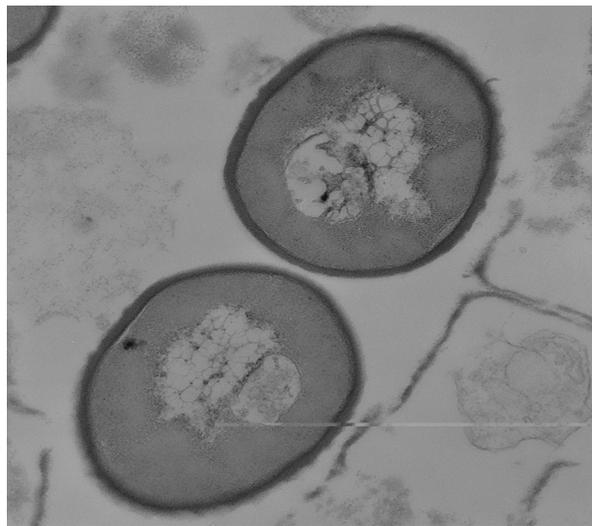


Figura 28. Corte fino espora cepa N₃₀138-TEM.

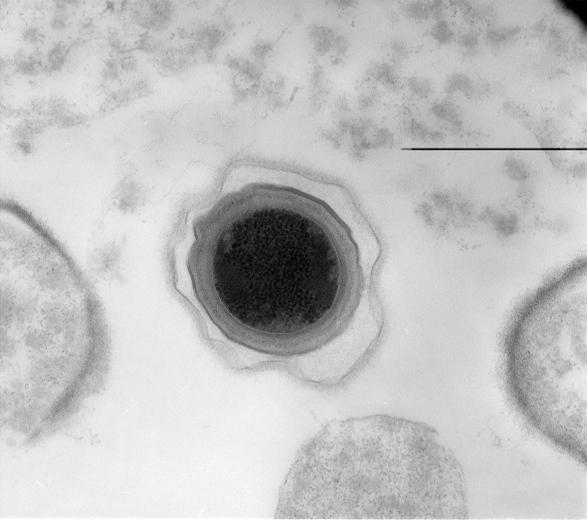
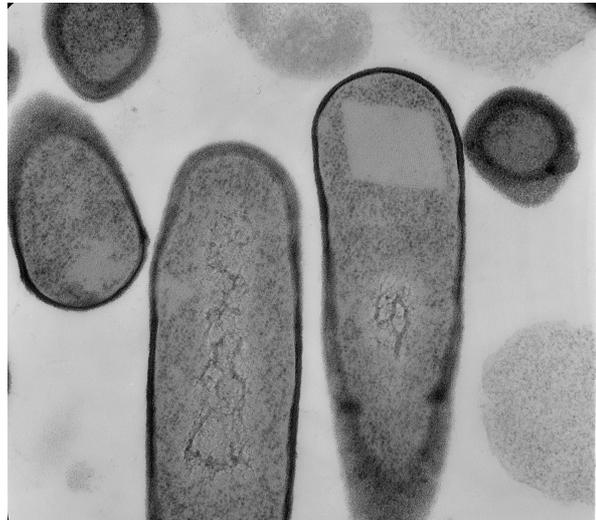


Figura 29. Cristal piramidal I₃₀74-TEM.



V. CONCLUSIONES.

Conclusiones

1- Se han aislado microorganismos capaces de crecer en el agua residual procedente de las aceitunas de mesa. Estos microorganismos presentan carácter halotolerante, crecimiento a temperaturas elevadas, en ocasiones superiores a 55 °C junto con una capacidad de desarrollo en su mayoría a valores de pH extremos.

2- Los microorganismos aislados del líquido residual de las aceitunas de mesa son mayoritariamente Gram-positivos, formadores de esporas, móviles y pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Virgibacillus*.

3- En el estudio de taxonomía numérica se establecen cuatro fenones agrupados a un 70% de semejanza. A partir de dichos fenones se seleccionaron los microorganismos representantes del posterior estudio de taxonomía molecular.

4- De los microorganismos seleccionados como representantes de los fenones siete se han identificado como miembros de especies ya descritas como *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Virgibacillus marismortui*.

5- Nuestro trabajo ha llevado a la descripción de cuatro nuevas especies, tres dentro del género *Bacillus*: *Bacillus olivae* sp. nov., *Bacillus halotolerans* sp. nov. y *Bacillus alkalitolerans* sp. nov., y una dentro del género *Virgibacillus*, *Virgibacillus hispanicus* sp. nov.

VI. BIBLIOGRAFÍA.

Bibliografía

- Aguilar, A.** (1996) "Extremophilic research in the European Union: from fundamental aspect to industrial expectation". *FEMSMicrobiol.Rev.* **18.** 89-92.
- Aguilera, M., Monteoliva-Sánchez, M., Suárez, A., Guerra, V., Lizama, K., Bennisar, A. y Ramos-Cormenzana, A.** (2001) "*Paenibacillus jamilae* sp.nov., an exopolysaccharide-producing bacterium able to grow in olive-mill wastewater". *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **51(5).**1687-1692.
- Akinrele, I.A.** (1970) "Fermentation studies on maize during the preparation of a traditional African starch-cake food". *J.Sci.FoodAgric.* **21.** 619-625.
- Albert, R.A., Archambault, J., Rosselló-Mora, R., Tindall, B.J. y Matheny, M.** (2005) "*Bacillus acidicola* sp.nov. a novel mesophilic, acidophilic species isolated from acidic Sphagnum peat bogs in Wisconsin". *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **55.** 2125-2130.
- Altschul, S., Thomas, F., Madden, L., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Webb, M. y Lipman, D.J.** (1998) "Grapped Blast and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic.Acids.Res.* **25.** 3389-3402.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J.** (1990) "Basic local alignment search tool". *J.Mol.Biol.* **215.** 403-410.
- Amiot, J.M., Fleuriet, A. y Macheix, J.J.** (1986) "Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation". *J.Agrid.Food.Chem.* **34.** 823-826.
- Amiot, J.M., Tachini, M., Fleuriet, A. y Macheix, J.J.** (1990) "The technological debittering process of olives: characterization of fruits before and during alkaline treatment". *Sci.Aliments.* **10.** 619-631.
- Anand, T.P., Bhat, A.W., Shouche, Y.S., Roy, U., Siddharth, J. y Sarma, S.P.** (2005) "Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India". *Microbial.Res.* (No impreso)
- Anderson, K., Maelandsmo, G.M., Hovig, E., Fedstad, O., Loennechen, T. y Winberg, J.O.** (1998) "Interleukin-1 alpha and basic fibroblast growth factor induction of matrix metalloproteinases and their inhibitors in osteosarcoma cells is modulated by the metastasis associated protein CAPL". *Anticancer.Res.* **18(5A).** 3299-30303.
- Aono, R y Horikoshi, K.** (1993) "Chemical composition of cell walls of alkalophilic strains of *Bacillus* spp". *J.Gen.Microbiol.* **129.** 1083-1087.
- Arahal, D. y Ventosa, A.** (2002) "Moderately halophilic and halotolerant species of *Bacillus* and related genera". Applications and Systematics of *Bacillus* and Relatives. Malden. EEUU. Blackwell. 83-99.
- Arber, W.** (2000) "Genetics variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution". *FEMSMicrobiol.Rev.* **24.**1-7.
- Arima, K., Kakimura, A. y Tamura, G.** (1968) "Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation". *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **31.** 488-494.

Bibliografía

- Ash, C., Farrow, A.E., Wallbanks, S. y Collins, M.D.** (1991) "Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit ribosomal RNA sequences". *Lett.Appl.Microbiol.* **13.** 202-206.
- Ash, C., Priest, F.G. y Collins, D.** (1993) "Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks y Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*". *Antonie Leeuwenhoek.* **64.** 253-260.
- Ash, C. y Collins, M.D.** (1992) "Comparative analysis of 23S ribosomal RNA gene sequences of *Bacillus anthracis* and emetic *Bacillus cereus* determined by PCR-direct sequencing". *FEMSMicrobiol.Lett.* **94.** 75-80.
- Auroma, O.I., Deiana, M., Jenner, A., Halliwell, B., Kaur, H., Banni, S., Corongiu, F., Dessi, M.A. y Aeschbach, R.** (1998) "Effect of hydroxytyrosol found in extra virgin olive oil on oxidative DNA damage and on low-density lipoprotein oxidation". *J.Agric.FoodChem.* **46.** 5181-5187.
- Bachmann, A. y Weaver, R.H.** (1951) "Rapid microtechnics for identification of cultures V. Reduction of nitrates to nitrites". *Am.J.Clin.Pathol.* **21.** 195-201.
- Backeljau, T., de Bruyn, L., de Wolf, K., Jordaens, S., Van Dongen, R., Verhagen, B. y Winnepeninckx, K.** (1995) "Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and parsimony methods". *Cladistics.* **11.** 119-130.
- Baker, G.C., Smith, J.J. y Cowan, D.A.** (2003) "Review and re-analysis of domain-specific 16S primers". *J.Microbiol.Methods.* **55.** 541-555.
- Baker, G.C., Beebee, T.J.C. y Ragan, M.A.** (1999) "*Prototheca richardsi*, a pathogen of anuran larvae, is related to a clade of partistan parasites near the animal-fungi divergence". *Microbiology.* **145.** 1777-1784.
- Baker, G.C., Gaffar, S., Cowan, D.A. y Suharto, A.R.** (2001) "Bacterial community analysis of Indonesian hot springs". *FEMSMicrobiol.Lett.* **200.** 103-109.
- Balch, W.E.** (1981) "The phylogeny of prokaryotes". *Science.* **209.** 547-463.
- Baltsouras, G., Tsibri, A., Dalles, T. y Doutsias, G.** (1983) "Effects of fermentation and its control on the sensory characteristics of conservolea variety green olives". *Appl.Environ.Microbiol.* **46.** 68-74.
- Baltsouras, G.** (1985) "Taxonomic and physiological characteristic of the facultative rod type lactic acid bacteria isolated from fermenting green and black olives". *Grasas y Aceites.* **36.** 239-249.
- Banat, I., Makkar, R.S. y Cameotra, S.S.** (2000) "Potential commercial applications of microbial surfactants". *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **53.** 495-508.
- Barák, I., Rica, E. y Cutting, S.M.** (2005) "From fundamental studies of sporulation to applied spore research". *MolecularMicrobiol.* **55(2).** 330-338.

Bibliografía

- Barns, S.M., Fundyga, R.E., Jeffries, M.W. y Pace, N.R.** (1994) "Remarkable archaeal diversity detected in Yellowstone national Park hot spring environment". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. **91**. 1609-1613.
- Barrit, M.M.** (1936) "The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of α -naphthol". *J.Pathol.Bacteriol.* **42**, 441-445.
- Baston, L., Bianco, A., Piccioni, F. y Uccella, N.** (2001) "Biophenolic profile in olives by nuclear magnetic resonance". *FoodChem.* **73**. 145-151.
- Batrákov, S.G., Rodionova, T.A., Esipov, S.E., Polyakov, N.B., Sheichenko, V.I., Shekhovsova, N.V., Lukin, S.M., Panikov, N.S. y Nikolaev, Y.A.** (2003) "A novel lipopeptide, an inhibitor of bacterial adhesion, from thermophilic and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* strain 603". *Biochem.Biophys.* **1634**. 107-115.
- Battisti, L., Green, B.D. y Thorne, C.B.** (1985) "Mating system for transfer of plasmids among *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*". *J.Bacteriol.* **162**. 543-550.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. y Turck, M.** (1966) "Antibiotic susceptibility by a standardised single disk method". *Am.J.Clin.Pathol.* **45**. 493-496.
- Beg, Q.K., Saxena, R.K. y Gupta, R.** (2002) "Kinetic constants determination for an alkaline protease from *Bacillus mojavensis* using response surface methodology". *Biotechnol.Bioeng.* **78(3)**. 289-295.
- Belkum van, A.** (1994) "DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR". *Clin.Microbiol.Rev.* **7**. 174-184.
- Belkum van, A., Struelens, M., De Visse, A., Verbrungh, H. y Tibayrene, M.** (2001) "Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics and microbial epidemiology". *Clin.Microbiol.Rev.* **14**. 547-560.
- Benitez, F.J., Acero, J.L. y Leal, A.I.** (2003) "Purification of storage brines from the preservation of table olives". *J.Hazard.Mat.* **B96**. 155-169.
- Berkeleke, R.C.W.** (2002) "Whither *Bacillus*? *En: Applications and Systematics of Bacillus and Relatives* (Eds). Berkeley, R., Heyndrickx, M., Logan, N y de Vos, P. Oxford. Blackwell. 1-7.
- Bertone, S., Giacomini, M., Ruggiero, C., Piccarolo, C. y Calegari, L.** (1996) "Automated systems for identification of heterotrophic marine bacteria on the basis of their fatty acid composition". *Appl.Environ.Microbiol.* **62**. 2122-2132.
- Blackwood, K.S., Turenne, C.Y., Harmsen, D. y Kabani, A.M.** (2004) "Reassessment of sequence-bases targets for identification of *Bacillus* species". *J.Clin.Microbiol.* **42(4)**. 1626-1630.
- Blekas, G., Vassilakis, C., Harizanis, C., Tsimidou, M. y Boskou, D.G.** (2002). "Biophenols in table olives". *J.Agric.FoodChem.* **50**. 3688-3692.
- Borbolla de la-Alcalá, J.M., Fernández-Díez, M.J. y González-Cancho, F.** (1964) "Empleo de cultivos puros de lactobacilos en la preparación de aceitunas verdes". *Grasas y Aceites*. **15**. 6-11.

- Borbolla, J.M. y Rejano, L.** (1979) "On the preparation of Sevillan style olives. The fermentation I". *Grasas y Aceites*. **30**. 175-185.
- Bourque, S.N., Valero, J.R., Lavoie, M.C. y Levesque, R.C.** (1995) "Comparative analysis of the 16S to 23S ribosomal intergenic spacer sequences of *Bacillus thuringiensis* strains and subspecies and of closely related species". *Appl. Environ. Microbiol.* **61**. 1623-1626.
- Bousfield, I.J., Smith, G.L., Dando, T.R. y Hobbs, G.** (1983) "Numerical analysis of total fatty acid profiles in the identification of coryneform, nocardioform and some other bacteria". *J. Gen. Microbiol.* **129**. 375-394.
- Branson, D.** (1972) "Evaluation of the Staph-Strip coagulase test". *Am. J. Clin. Pathol.* **57(4)**. 531-533.
- Bredmose, L., Madsen, S.M., Vrang, A., Ravn, P., Johnsen, M.G., Glenting, J., Arnau, J. y Israelsen, H.** (2001) "Development of a heterologous gene expression system for use in *Lactococcus lactis*". *En: Merten, O. W., Mattanovich, D., Lang, C., Larsson, G., Neubauer, P., Porro, D., Postma, P., Teixeirade Mattos, J. y Cole, J.A. (Eds). "Recombinant protein production with prokaryotic and eukaryotic cells". Kluwer Academic Publishing. Dordrecht. 269-275.*
- Breed, R.S., Murray, E.G.D. y Smith, N.R.** (1957) "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". 7th edn. 1094. The Willians y Wilkins Co. Baltimore.
- Brenes, M. y de Castro, A.** (1998) "Transformation of oleuropein and its hydrolysis products during spanish-style green olive processing". *J. Sci. Food Agric.* **77**. 353-358.
- Brenes, M. y Castro de, A.** (2001) "Fermentation of washing water of Spanish-style green olive processing". *Process Biochem.* **36(8-9)**. 797-802.
- Brenes, M., García, A., García, P., Rios, J.J. y Garrido, A.** (1999) "Phenolic compounds in Spanish olive oils". *J. Agric Food Chem.* **46**. 3535-3540.
- Brenes, M., García, P., Durán, M.C. y Garrido, A.** (1993) "Concentration of phenolic compounds change en storage brines of ripe olives". *J. Food Sci.* **58**. 347-350.
- Brenes, M., Montaña, A. y Garrido, A.** (1990) "Ultrafiltración of green table olive brines: Influence of some operating parameters acid effect on polyphenol composition". *J. Food Sci.* **55(1)**. 214-217.
- Brenes, M., Rejano, L., García, P. y Sánchez, A.H.** (1995) "Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish-style green olive processing". *J. Agric. Food Chem.* **43**. 2702-2706.
- Brenes, M., Romero, C., García, A., Hidalgo, F.J. y Ruíz-Méndez, F.** (2004) "Phenolic compounds in olive oils intended for refining: formation of 4-ethylphenol during olive paste storage". *J. Agric. Food Chem.* **52(26)**. 8177-8181.
- Brenner, D., Staley, J. y Krieg, N.** (2000) "Classification of prokaryotic organisms and the concept of bacterial speciation". *Nucleic. Acids Res.* **25**. 3389-3402.
- Britten, R.J. y Kohne, D.E.** (1968) "Repeated sequences in DNA". *Science*. **161**. 529-540.

Bibliografía

- Brock, T.D.** (1979) "Ecology of saline lakes". *En: Strategies of microbial life in extreme environments.* ed. Shilo, M..Berlin.Dahlem Konferenzen. 29-47.
- Castro de, A., Durán-Quintana, M.C., García García, P., Garrido-Fernández, A., González-Cancho, F., Rejano-Navarro, L., Sánchez-Roldán, F. y Sánchez-Tébar, J.C.** (1983) "Elaboración de aceitunas verdes estilo español de la variedad gordal con reutilización de lejías. Estudio de sus aguas residuales y algunos ensayos de purificación". *Grasas y aceites.* **34.** 162-167.
- Castro de, A., Sánchez, A.H., Montañó, A. y Rejano, L.** (2001) "Utilization at high pH of starter cultures of lactobacilli for Spanish-style green olive fermentation". *Int.J.FoodMicrobiol.* **67(1-2).** 115-122.
- Chang, B.V., Chiang, F. y Yuan, S.Y.** (2005) "Biodegradation of nonylphenol in sewage sludge". *Chemosphere.* **60(11).** 1652-1659.
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., López, R., Gibson, T.J., Higgins, D.G. y Thomson, J.D.** (2003) "Multiple sequence alignment with the clustal series of programs". *Nucleic.AcidsRes.* **31.** 3497-3500.
- Cherif, A., Ouzari, H., Daffonchio, D., Cherif, H., Ben Slama, K., Hassen, A., Jaoua, S. y Boudabous, A.** (2001) "Thuricin 7:a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil". *Lett.Appl.Microbiol.* **32(4).** 243-247.
- Cherif, A., Chemini, S., Limen, F., Hansen, B.M., Hendriksen, N.B. Daffonchio, D. y Boudabous, A.** (2003) "Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* spp. entomocidus HD9". *J.Appl.Microbiol.* **95(5).** 990-1000.
- Choi, D.H., Yi, H., Chun, J. y Cho, B.C.** (2006) "*Jannaschia seosinensis* sp.nov., isolated from hypersaline water of a solar saltern in Korea". *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **56(1).** 45-49.
- Christensen, H., Bisgaard, M., Fredricksen, W., Mutters, R., Kuhnert, P., y Olsen, J.E.** (2001) "Is characterization of a sinlgel isolation sufficient for valid publication of a new genus of species? Proposal to modify recommendation 30b of the Bacteriological Code (1990 revision). *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **51.** 2221-2225.
- Ciabattini, A., Parigi, R., Isticato, R., Oggioni, M.R. y Pozzi, G.** (2004) "Oral priming of mice by recombinant spores of *B. subtilis*". *Vaccine.* **22.** 4139-4143.
- Clark, F.E.** (1937) "The relationship of *Bacillus siamensis* and similar pathogenic spore-forming bacteria of to *Bacillus subtilis*". *J.Bacteriol.* **33.** 435-443.
- Claus, D. y Berkeley, R.C.W.** (1986) "Genus *Bacillus* Cohn 1872" *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* **2.** 1105-1139.
- Clayton, R.A., Sutton, G., Hinkle, P.S., Bult, C. y Fields, C.** (1995) "Intraespecific variation in small-subunit ribosomal RNA sequence in genebank-chy single sequence may not adequately represent prokaryotic taxa". *Int.J.Syst.Bacteriol.* **45.** 595-599.

Bibliografía

- Clejan, S., Krulwich, T.A. Mondrus, K.R. y Sero-Young, D.** (1986) "Membrane lipid composition of obligately and facultatively alkalophilic strains of *Bacillus* spp". *J Bacteriol.* **168**. 334-340.
- Codex Alimentarius.** (1993). Normas revisadas para los aceites de oliva. CL 1993/15 FO.
- Coenye, T., Gevers, D., Peer, Y.V., Vandamme, P. y Swings, J.** (2005) "Towards a prokaryotic genomic taxonomy". *FEMSMicrobiol.Rev.* **29**. 147-167.
- Cohn, F.** (1872) "Untersuchungen über bakterien". *Beirt.Biol.Pflanz.* **1**. 127-224.
- Cohn, F.** (1876) "Untersuchungen über Bakterien. Beiträge zur Biologie der Bacillien. Beiträge zur Biologie de Pflanzen 2." FET II. 249-276. *Milestrone in Microbiology* (Broock, T.D. ed) 49-56. Prentice hall Inc.Englewood Cliffs. N.Y. 1961.
- Collaard, P. y Levi, S.** (1959) "A two-stage fermentation of cassava". *Nature.* **183**. 620-621.
- Çon, A.H. y Gökalp, H.Y.** (2000) "Production of bacteriocin-like metabolites by lactic acid cultures isolated from sucuk samples". *Meat.Sci.* **55(1)**. 89-96.
- Cooper, J.E. y Feil, E.J.** (2004) "Multilocus sequence typing—What is resolved?". *Trends.Microbiol.* **12**. 373-377.
- Cowan, S.T. y Steel, K.J.** (1974) "Manual for the identification of Medical Bacteria". 22^a ed. Cambridge University Press. Cambridge. 173-180.
- Cutting, S.M.** (2004) "Spores as oral vaccines". *En: Bacterial spore formes: Probiotics and emerging application.* Ricca, E., Henriques, A.O. y Cutting, S.M. (eds). Norfolk, UK. Bioscience Press. 201-206.
- Dalev, P.G.** (1994) "Utilization of waste feathers from poultry slaughter for prodiction of a protein concentrated". *Bioresour.Technol.* **48**. 265-267.
- Deepak, S. y Guenther, S.** (2001) "Fate and effects of the Insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis*". Laboratory of Microbial Ecology. Department of Biology New York University. NY. ISB News.
- Deiana, S., Gessa, C., Manuzza, B., Marchetti, M. y Usai, M.** (1992) "Mechanism and stoichiometry of the redox reaction between iron (III) and caffeic acid". *Plant&soil.* **145**. 287-294.
- Denizci, A.A., Kazan, D., Abeln, E.C. y Erarslan, A.** (2004) "Newly isolated *Bacillus clausii* GMBAE 42: an alkaline protease producer capable to grow under higly alkaline conditions". *J.Appl.Microbiol.* **96(2)**. 320-327.
- Dietrich, R. y Mätibauer, E.** (1997) "Personal communication".
- Donskey, C.J., Hujer, A.M., Das, S.M., Pultz, N.J., Bonomo, R.A. y Rice, L.B.** (2003) "Use of denaturing gradien gel electrophoresis for analysis of the stool microbiota of hospitalized patients". *J.Microbiol.Methods.* **54**. 249-256.
- Duc, L.H., Hong, H.A., Uyen, N.Q. y Cutting, S.M.** (2004) "Intracellular fate and immunogenicity of *Bacillus subtilis* spores". *Vaccine.* **22**. 1873-1885.

Bibliografía

- Duc, L.H., Huynh, H.A., Fairweather, N., Ricca, E. y Cutting, S.M.** (2003) "Bacterial spores as vaccine vehicles". *Infect.Immun.* **71**. 2810-2818.
- Dufresne, S., Bousquet, J., Bousinot, M. y Guay, R.** (1996) "*Sulfobacillus disulfidooxidans* sp.nov., a new acidophilic, disulfide-oxidizing, gram-positive, spore-forming bacterium". *Int.J.Syst.Bacteriol.* **46(4)**. 1056-1064.
- Duncan, K.E., Ferguson, N., Kimura, K., Zhou, X. y Istock, C.A.** (1994) "Fine-scale genetic and phenotypic structures in natural population of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*: important implications for bacterial evolution and speciation". *Evolution.* **48**. 2002-2025.
- Durán-Quintana, M.C., García-García, P. y Garrido-Fernández, A.** (1999) "Establishment of conditions for green table olive fermentation at low temperature". *Int.J.FoodMicrobiol.* **51(2-3)**. 133-143.
- Dussault, H.P.** (1955) "An improved technique for staining red halophilic bacteria". *J.Bacteriol.* **70**. 484-486.
- Dykhuizen, D.E.** (1998) "Santa Rosalia revisited: why are there so many species of bacteria?". *Antonie Leeuwenhoek.* **73**. 25-33.
- Dykhuizen, D.E. y Green, L.** (1991) "Recombination in *Escherichia coli* and the definition of biological species". *J.Bacteriol.* **173(22)**. 7257-7268.
- El-Makhzangy, A. y Abdel-Rhman, A.** (1999) "Physico-chemical properties of Azizi' green pickled olives as affected by alkali process". *Nahrung.* **43(5)**. 320-324.
- Esti, M., Cinqunta, L. y La Notte, E.** (1998) "Phenolic compound in different olive cultivars". *J.Agric.FoodChem.* **46**.32-35.
- Etchells, J.L., Fleming, H.P. y Bell, T.A.** (1975) "Factors influencing the growth of lactic acid bacteria during the fermentation of brined cucumbers". *En: Lactic Acid Bacteria in Beverage and Food*, ed. Carr, J.G.y col.,. New York. Academy Press. 281-305.
- Felske, A., Heyrman, J., Balcaen, A. y De Vos, P.** (2003) "Multiples PCR screening of soils isolates for nivel *Bacillus*-related lineages". *J.Microbiol.Methods.* **55**, 447-458.
- Fernández-Balaos, J., Heredia, A. y Rodríguez, G.** (2004) "Mejoras introducidas en la patente principal Nº 200002422 relativa a un procedimiento de obtención de hidroxitirosol purificado a partir de productos y subproductos derivados del olivo". TDC olive. GENOSA I+D.
- Fernández-Díez, M.J., de Castro-Ramos, R., Garrido-Fernández, A., González-Cancho, F., González-Pellissó, F., Nosti-Vega, M., Heredia-Moreno, A., Mínguez-Mosquera, M.I., Rejano-Navarro, L., Durán-Quintana, M., Sánchez-Roldán, C.F., García-García, P. y de Castro, A.** (1985) "Biotecnología de las Aceitunas de Mesa". CSIC. Madrid. 51-123.
- Fernández-Llano, J., Arreghini, M., Ugarte, S., Herrero, C., Herrero, O. y Maya, S.** (2001) "Efluentes del procesamiento de las aceitunas verdes en fresco". *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente.* **5**. 119-125.

- Fiorini, G., Cimminiello, C., Chianese, R., Visconti, G.P., Cova, D., Uberti, T. y Gibelli, A. (1985) "*Bacillus subtilis* selectively stimulates the síntesis of membrane bound and secreted IgA". *Chemioterapy*. **4**. 310-312.
- Forsyth, G., Logan, N.A., De Vos, P. (1998) "Revue Taxonomique du Genre *Bacillus*". *Bull. Soc.Fr.Microbiol.* **13(2)**. 1259-1270.
- Fortina, M.G., Pukall, R., Schumann, P., Mora, D., Parini, C., Manachini, P.L. y Stackebrandt, E. (2001) "*Ureibacillus* gen.nov., a new genus to accommodate *Bacillus thermosphaericus* (Andersson y col., 1995), emedation of *Ureibacillus thermosphaericus* and description of *Ureibacillus terrenus* sp.nov.". *Int.Syst.Evol.Microbiol.* **51**. 447-455.
- Fox, G. E. Stakebrandt, E. Hespell, R.B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T.A., Wolfe, R.S., Balch, W., Tanner, R., Magrum, L., Zablén, L.B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B.J., Stahl, D.A., Luehrsen, K.R., Chen, K.N. y Woese C.R. (1980) "The phylogeny of prokaryotes". *Science*. **209**. 457-463
- Fox, G.E., Peckman, K.L. y Woese, C.R. (1977) "Comparative cataloguing of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematics". *Int.J.Syst.Bacteriol.* **27**. 44-57.
- Fox, G.E., Wisotzkey, J.D., y Jurtshuk, P.Jr. (1992) "How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity". *Int.J.Sis.Bacteriol.* **42**. 166-170.
- Frazier, W.C. (1926) "A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria". *J.Infect.Diss.* **39**. 302-309.
- Fujiwara, N., Tsumiya, T., Katada, T., Hosobuchi, T. y Yamamoto, K. (1989) "Continuous recovery of silver from used X-ray films using a proteolytic enzyme". *ProcessBiochem.* **24**. 155-156.
- Fuller, R. (1991) "Probiotic in human medicine". *Gut*. **32**. 439-442.
- Gajju, H., Bhalla, T.C. y Agarwal, H.O. (1996) "Thermostable alkaline protease from therophilic *Bacillus coagulans* PB-77". *IndianJ.Microbiol.* **36**. 153-155.
- García, M.T., Gallego, V., Ventosa, A. y Mellado, E. (2005) "*Thalassobacillus devorans* gen.nov, sp.nov., a moderately halophilic, phenol-degrading Gram-positive bacterium". *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **55(5)**. 1789-1795.
- García, M.L., Guffanti, A.A. y Krulwich, T.A. (1983) "Characterization of Na⁺/H⁺ antiporter of alkalophilic bacilli in vivo: Δψ-dependent Na⁺ efflux from whole cells". *J.Bacteriol.* **39**. 1151-1157.
- Garrido-Fernández, A. González-Pellissó, F., González-Cancho, F., Sánchez-Roldán, F., Rejano-Navarro, F., Cordon-Casanueva, J.L. y Fernández-Díez, M.J. (1977) "Modificaciones de los procesos de elaboración y envasado de aceitunas verdes de mesa en relación con la eliminación y el reuso de vertidos". *Grasas y aceites*. **28**. 267-285.
- Garrido-Fernández, A., Fernández-Díez, M.J. y Adams, M.R. (1997) "Green olive type". *Table olive. Production and Processing* Chapman y May. London. 134-197.

Bibliografía

- Gershanovich, V.N., Bol'shakova, T.N., Dobrynina, O.L., Galushkina, Z.M., Kukanova, A.L. y Stepanov, A.I.** (2005) "Nitrogen assimilation enzymes in *Bacillus subtilis* mutants with hyperproduction of riboflavin". *Mol.Gen.Mikrobiol.Virusol.* **3.** 29-34.
- Gerze, A., Omay, D. y Guvenilir, Y.** (2005) "Partial purification and characterization of protease enzyme from *Bacillus subtilis megatherium*". *Appl.Biochem.Biotechnol.* **121-124.** 335-345.
- Gevers, D., Cohan, F.M., Lawrence, J.G., Spratt, B.G., Coenye, T., Feil, E.J., Stackebrandt, E., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Thompson, F.L. y Swings, J.** (2005) "Re-evaluating prokaryotic species". *NatureRev.Perspectives.Opinion.* **3.** 733-739.
- Gibson, T. y Gordon, R.E.** (1974) "*Bacillus* Cohn 1872". Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th edn. (Buchanan, R.E. Gibbons, N.E., eds). The Willians y Wilkins Co. Baltimore. 529-550.
- Glaze, W.H., Kang, J.W. y Chapin, D.H.** (1987). "The Chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation". *Ozone Sci.Eng.* **9.** 335-352.
- Godfrey, T. y West, S.** (1996) "Instruction to industrial enzymology". MacMillan Press. London. 1-8.
- González, B., Mayo, B., Arca, P. y Suárez, J.E.** (1994) "Detection, purification, and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin". *Appl. Environ. Microbiol.* **60.** 2158-2163.
- González, J.M.Jr, Brown, B.J. y Carlton, B.C.** (1982) "Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding delta-endotoxin among strain of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **79(22).** 6951-6955.
- González, M.D., Moreno, E., Quevedo-Sarmiento, J. y Ramos-Cormenzana, A.** (1990) "Studies on antibacterial activity of waste-water from olive mills: inhibitory activity of phenolic and fatty acids". *Chemosphere.* **20.** 423-432.
- González-Pellissó, F.** (1984) "La pasterización de aceitunas estilo sevillano. II.". *Grasas y aceites.* **35.** 235-239.
- González-Cancho, F. y Durán-Quintana, M.C.** (1980) "Bacterias cocáceas del ácido láctico en el aderezo de aceitunas verdes". *Grasas y Aceites.* **32.** 373-379.
- Gordon, R.E.** (1940) "Dissociation and bacteriophage in the classification of the aerobic sporeformes". *J.Bacteriol.* **39.** 757.
- Gordon, R.E., Haynes, W.C. y Pang, C.H.N.** (1973) "The genus *Bacillus*". Washington D.C. USA. Department of Agriculture.
- Goto, K., Omura, T., Hara, Y. y Sadaie, Y.** (2000) "Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*". *J.Gen.Appl.Microbiol.* **46.** 1-8.
- Graur, D. y Pupko, T.** (2001) "The Permian Bacterium that Isn't". *Letter to the Editor. Mol.Biol.Evol.* **18(6).** 1143-1146.

Bibliografía

- Groflkopf, R., Janssen, P.H. y Liesack, W.** (1998) "Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval". *Appl. Environ. Microbiol.* **64.** 960-969.
- Guckert, J.B., Ringelberg, D.B., White, D.C., Hansonn, R.S. y Bratina, B.J.** (1991) "Membrane fatty acids as phenotypic markers in the polyphasic taxonomy of methylotrophs within the Proteobacteria". *J. Gen. Microbiol.* **137.** 2631-2641.
- Guerra, V.** (1999) "Producción y caracterización de un nuevo exopolisacárido obtenido a partir de alpechín". Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Guerra, V., Monteoliva-Sánchez, M. y Ramos-Cormenzana, A.** (1998) "Isolation and partial characterization of an extracellular polysaccharide produced by strain of *Bacillus* grown on olive mill waste waters". International Symposium to Link Basic Science. Biotechnology and Industry. Münster (Germany). 44.
- Gupta, R. Beg, Q.K. y Lorenz, P.** (2002) "Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59.** 15-32.
- Hacene, H., Rafa, F., Chebhouni, N., Boutaiba, S., Bhatnagar, T., Baratti, J.C. y Ollivier, B.** (2004) "Biodiversity of prokaryotic microflora in El Golea Salt lake, Algerian Sahara". *J. Arid. Environ.* **58.** 273-284.
- Hamed, R., Elawa, S.E., Fand, N.M. y Ataya, F.S.** (1999) "Evaluation of detoxification enzyme levels in Egyptian catfish, *Clarias lazera*, exposed to dimethoate". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **63(6).** 789-796.
- Hanlin, J.H.** (1998) "Sporilage of acidic products by *Bacillus* species". *Dayr. Food Environ. Sanit.* **18.** 655-659.
- Harrell, L.J., Andersen, G.L. y Wilson, K.H.** (1995) "Genetic variability of *Bacillus anthracis* and related species". *J. Clin. Microbiol.* **33.** 1847-1850.
- Harris, S.A.** (1999) "RAPDs in systematics—a useful methodology?". *En:* P.M. Hollingsworth, R.M. Bateman, R.J. Gornal (Eds.). *Molecular Systematics and Plant Evolution. The Systematics Association Special Volume Series 57.* Taylor y Francis. London. UK. 211–228.
- Harwood, C.R.** (1989) "*Bacillus.*" Biotechnology hand-book. London. Plenum Press. **2.**
- Hasting, E.G.** (1903) "Milchagar as medium zur demonstration der erzeugung proteolytischer enzyme". *Zentbl. Bakt. Parasitenkde. Abt. II.* **10.** 384-387.
- Henderson, I., Dongzheng, Y. y Turnbull, P.C.B.** (1994) "Differentiation of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus cereus* group with the PCR". *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44.** 99-105.
- Henningson, P.J. y Gudmestad, N.C.** (1991) "Fatty acid analysis of phytopathogenic coryneform bacteria". *J. Gen. Microbiol.* **137.** 427-440.
- Heyndrickx, M., Lebbe, L., Kersters, K., De Vos, P., Forsyth, G. y Logan, N.A.** (1998) "*Virgibacillus*: a new genus to accommodate *Bacillus pantothenicus* (Proom y Knight 1950). Emended description of *Virgibacillus pantothenicus*". *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48.** 99-106.

Bibliografía

- Heyrman, J., Logan, N.A., Busse, H.J., Balcaen, A., Lebbe, L., Rodríguez-Díaz, M., Swings, J. y DeVos, P.** (2003) “*Virgibacillus carmonensis* sp.nov., *Virgibacillus necropolis* sp.nov. and *Virgibacillus picturae* sp.nov., three novel species isolated from deteriorated mural paintings, transfer of the species of the genus *Salibacillus* to *Virgibacillus*, as *Virgibacillus marismortui* comb. nov. and *Virgibacillus salexigens* comb. nov., and emended description of the genus *Virgibacillus*”. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **52(2)**. 501-511.
- Heyrman, J., Logan, N.A., Rodríguez-Díaz, M., Scheldeman, P., Lebbe, L., Swings, J., Heyndrickx, M. y De Vos, P.** (2005a) “Study of mural painting isolates, leading to the transfer of *Bacillus maroccanus* and *Bacillus carotarum* to *Bacillus simplex*, emended description of *Bacillus simplex*, re-examination of the strains previously attributed to *Bacillus macroides* and description of *Bacillus muralis* sp.nov.”. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **55**. 119-131.
- Heyrman, J., Rodríguez-Díaz, M., Devos, J., Felske, A., Logan, N.A. y De Vos, P.** (2005b) “*Bacillus arenosi* sp.nov., *Bacillus arvi* sp.nov. and *Bacillus humi* sp.nov., isolated from soil”. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **55**. 111-117.
- Heyrman, J. y Swings, J.** (2001) “16S rDNA sequence analysis of bacterial isolated from biodeteriorated mural paintings in the Servilia tomb (necropolis of Carmona, Sevilla, Spain)”. *Syst.Appl.Microbiol.* **24**. 417-422.
- Hoigne, J.** (1998). “Chemistry of aquosozone and transformation of pollutant by ozonation and advance oxidation processes”. *J.Hrubec*. (Ed) The Handbook of environmental Chemistry 5 Part C Quality and treatment of drinking Water II. Springer-Verlag. Berlin. Germany.
- Hong, H.A., Duc, H.L. y Cutting, S.M.** (2005) “The use of bacterial spore formers as probiotics”. *FEMSMicrobiol.Rev.* **29**. 813-835.
- Hosoi, T., Ametani, A., Kiuchi, K. y Kaminogawa, S.** (2000) “Improved growth and viability of lactobacilli in the presence of *Bacillus subtilis* (*natto*), catalase, or subtilisin”. *Can.J.Microbiol.* **46**. 892-897.
- Hucker, P.** (1927) N.Y. *Agri.Exper.Sta.Tech.Bull.* 128. *En:* Kolmer, J.A., Spaulding, E.H. y Robinson, H.W. (1955) *Métodos de Laboratorio*. 5ª ed. Interamericana. S.A. México.
- Hugenholtz, P., Goebel, M.B. y Pace, N.R.** (1998) “Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity”. *J.Bacteriol.* **180(24)**. 6793.
- Hull, D.L.** (1976) “Are species really individuals?”. *Syst.Zoo.* **25**. 174-191.
- Hull, D.L.** (1997) “The ideal species concept-and why we can't get it”. *En:* claridge, M.F., Dawah, H.A. y Wilson, M.R. (ed). *Species: the units of biodiversity*. Chapman y Hall, London, United Kingdom. 357-380.
- Hyronimus, B., Le Marrec, C. y Urdaci, M.C.** (1998) “Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4”. *J.Appl.Microbiol.* **85**. 42-50.
- Ikram-ul, H., Hamad, A., Qadeer, M.A. y Iqbal, J.** (2005) “Pearl millet, a source of alpha amylase production by *Bacillus licheniformis*”. *Bioresour.Technol.* **96(10)**. 120-1204.

- Imrich, J., Vilková, M. y Cernak, J.** (2005) "2-(Acridin-9-ylimino)-3-dimethylamino-1,3-thiazolidin-4-one". *Acta Crystallogr.C.* **61(4)**. 231-233.
- Incerti, C.** (1995) "Estudio quimiotaxonómico de *Bacillus* Gram-negativos de ambientes salinos. Aplicaciones biotecnológicas". Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Inooka, S., Uehara, S. y Kimura, M.** (1986) "The effect of *Bacillus natto* on the T and B lymphocytes from spleens of feeding chickens". *Poult.Sci.* **65**. 1217-1219.
- Ishikawa, M., Ishizaki, S., Yamamoto, Y. y Yamasato, K.** (2002) "*Paraliobacillus ryukyuensis* gen. nov., sp.nov., a new Gram-positive, slightly halophilic, extremely halotolerant, facultative anaerobe isolated from a decomposing marine alga". *J.Gen.Appl.Microbiol.* **48(5)**. 269-279.
- Ishikawa, M., Nakajima, K., Itamiya, Y., Furukawa, S., Yamamoto, Y. y Yamasato, K.** (2005) "*Halolactibacillus halophilus* gen.nov., sp.nov. and *Halolactibacillus miurensis* sp.nov., halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacteria constituting a phylogenetic lineage in *Bacillus* rRNA group 1". *IntJ.Syst.Evol.Microbiol.* **55(6)**. 2427-2439.
- Isono, Y. y Nakajima, M.** (2000) "Membrane phase separation of aqueous/alcohol biphasic mixture and its application for enzyme bioreactor". *Prog.Biotechnol.* **2000**. 63-68.
- Isticato, R., Cangiano, G., Tran, T.H., Ciabattini, A., Medagliani, D., Oggioni, M.R., de Felice, M., Pozzi, G. y Ricca, E.** (2001) "Surface display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores". *J.Bacteriol.* **183**. 6294-6301.
- Istock, C.A., Bell, J.A., Ferguson, N. y Istock, N.L.** (1996). "Bacterial species and evolution: theoretical and practical perspectives". *J.Indus.Microbiol.* **17**. 137-150.
- Ivanova, E.P., Alexeeva, Y.A., Zhukova, N.V., Gorshkova, N.M., Buljan, V., Nicolau, D.V., Mikhailov, V.V. y Christen, R.** (2004) "*Bacillus algicola* sp.nov., a novel filamentous organism isolated from brown algae *focus evanescens*". *Syst.Appl.Microbiol.* **27**. 301-307.
- Jaeger, K.E., Eggert, T., Eipper, A. y Reetz, M.T.** (2001) "Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysis". *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **55**. 519-530.
- Jansen, T., Droste, S., Tinnefeld, K., y Wegener, I.** (2003). "A new framework for the valuation of algorithms for black-box optimization". *En: de Jong, K.A., Poli, R. y Rowe, J.E.* (Eds.). *Foundations of Genetic Algorithms 7 (FOGA)*. Morgan Kaufmann. San Francisco. 253-270.
- Jeon, C.O., Lim, J.M., Lee, J.M., Xu, L.H., Jiang, C.L. y Kim, C.J.** (2005) "Reclassification of *Bacillus haloalkaliphilus* Fritze 1996 as *Alkalibacillus haloalkaliphilus* gen.nov., comb. nov. and the description of *Alkalibacillus salilacus* sp.nov., a novel halophilic bacterium isolated from a salt lake in China". *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **55**. 1891-1896.
- Johnson, J.L.** (1985) "Determination of DNA base composition". *MethodsMicrobiol.* **18** (G. Gottschalk, Edd.). Academic Press. London. 1-31.
- Joung, K.B. y Côté, J.C.** (2002a) "Evaluation of ribosomal RNA gene restriction patterns for the classification of *Bacillus* species and related genera". *J.Appl.Microbiol.* **92**. 97-108.

Bibliografía

- Joung, K.B. y Côte, J.C.** (2002b) "A single phylogenetic analysis of *Bacillus thuringiensis* strain and bacilli species from 16S rRNA gene restriction fragment length polymorphism is congruent with two independent phylogenetic analyses". *J.Appl.Microbiol.* **93.** 1075-1082.
- Jukes, T.H. y Cantor, C.R.** (1969) "Evolution of protein molecules". *En: Mammalian protein metabolism.* (Ed) Munro, H.N. New York. Academy Press. **3.** 21-132.
- Kageyama, A. y Benno, Y.** (2000) "*Coprobacillus catenaformis* gen.nov., sp.nov. a new genus and species isolated from human faeces". *Microbiol.Immunol.* **44.** 23-28.
- Kalisz, H.M.** (1988) "Microbial proteinases". *Adv.Biochem.Eng.Biotechnol.* **36.** 1-65.
- Kämpfer, P.** (1994) "Limits and possibilities of total fatty acid analysis for classification and identification of *Bacillus* species". *Syst.Appl.Microbiol.* **17.** 86-98.
- Kaneda, T.** (1963) "Biosynthesis of branched chain fatty acids. I. Isolation and identification of fatty acids from *Bacillus subtilis* (ATCC 7059)". *J.Biol.Chem.* **238.** 1222-1228.
- Kaneda, T.** (1967) "Fatty acids in the genus *Bacillus* I. iso- and anteiso-fatty acids as characteristic constituents of lipids in 10 species". *J.Bacteriol.* **93.** 894-903.
- Kaneda, T.** (1968) "Fatty acids in the genus *Bacillus*. II. Similarity in the fatty acid compositions of *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus*". *J.Bacteriol.* **95.** 2210-2216.
- Kaneda, T.** (1969) "Fatty acids in *Bacillus larvae*, *Bacillus lentimorbus* and *Bacillus popilliae*". *J.Bacteriol.* **98.** 143-146.
- Kaneda, T.** (1977) "Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference". *Bacteriol.Rev.* **42(2).** 391-418.
- Kanehisa, M.** (2000) "Pathway databases and higher order function". *Adv.Protein.Chem.* **54.** 381-408.
- Kaneko, K., Nozaki, R. y Aizawa, K.** (1978) "Deoxyribonucleic acid relatedness between *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*". *Microbiol.Immunol.* **22(10).** 639-641.
- Karlin, S., Mrazek, J. y Campbell, A.M.** (1997) "Compositional biases of bacterial genomes and evolutionary implications". *J.Bacteriol.* **179.** 3899-3913.
- Karlin, S., Mrazek, J., Campbell, A. y Kaiser, D.** (2001) "Characterizations of highly expressed genes of four fast-growing bacteria". *J.Bacteriol.* **183.** 5025-5040.
- Kates, M.** (1964) "Bacterial lipid". *En: Paoletti, R. y Kritchevsky, D. (ed.). Advances in lipid research.* Academic Press Inc. New York y London. **2.** 17-90.
- Khehra, M.S., Saini, H.S., Sharma, D.K., Chadha, B.S. y Chimni, S.S.** (2005) "Comparative studies on potential of consortium and constituent pure bacterial isolates to decolorize azo dyes". *WaterRes.* **39(20).** 5135-5141.
- Kim, W, Choi, K., Kim, Y., Park, H., Chol, J., Lee, Y., Oh, H., Kwon, I. y Lee, S.** (1996) "Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from chungkook-jangs". *Appl. Environ. Microbiol.* **62.** 2482-2488.

Bibliografía

- Kis-Papo, T. y Oren, A.** (2000) "Halocins: are they involved in the competition *Halobacteria* between in the salters lays". *Extremophiles*. **4**. 35-41.
- Kocherginskaya, S.A., Aminov, R.I., Yamaguchi, N., Tani, K. y Nasu, M.** (2001) "Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches". *Anaerobe*. **7**. 119-134.
- Köhler, G., Ludwig, W. y Schleifer, K.L.** (1991) "Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes". *Appl. Environ. Microbiol.* **62**. 766-771.
- Konstantinidis, K. y Tiedje, J.M.** (2005a) "Genomic insights that advances the species definition for prokaryotes". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**. 2567-2572.
- Konstantinidis, K. y Tiedje, J.M.** (2005b) "Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes". *J. Bacteriol.* **187(18)**. 6258-6264.
- Konstantinov, S.R., Zhu, W.Y., Williams, B.A., Tamminga, S., de Vos, W.M. y Akkermans, A.D.I.** (2003) "Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S DNA". *FEMS Microbiol. Ecol.* **43**. 225-235.
- Koremlum, E., der Weid, I., Santos, A.L., Rosado, A.S., Sebastian, G.V., Countino, C.M., Magalhães, F.C., Paiva, M.M. y Seldin, L.** (2005) "Production of antimicrobial substances by *Bacillus subtilis* LFE-1, *Bacillus firmus* HO-1 and *Bacillus licheniformis* T6-5 isolated from an oil reservoir in Brazil". *J. Appl. Microbiol.* **98(3)**. 667-75.
- Kosak, T., Maeda, T., Nakada, Y., Yukawa, M. y Tanaka, S.** (1998) "Effect of *Bacillus subtilis* spore administration on activation of macrophages and natural killer cells in mice". *Vet. Microbiol.* **60**. 215-225.
- Kovacs, N.** (1928) "Eine vereinfachte methode zum nachweis der indolbindung durch bacterien". *Zbl. Bakt. Orig. Ser.* **55**. 311-314.
- Kovacs, N.** (1956) "Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction". *Nature*. **178**. 703-707.
- Krawiec, S. y Riley, M.** (1990) "Organization of the bacterial chromosome". *Microbiol. Rev.* **54**. 502-539.
- Krieg, N. y Garrity, G.** (2000) "On using the manual". *En: Boone, D.R., Castenholz, y Garrity, G.M. (ed). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed.* Springer-Verlag. New York. 1. 15-19.
- Krulwich, T.A., Guffanti, A.A., Bornstein, R.F. y Hoffstein, J.** (1982) "A sodium requirement for growth, solute transport and pH homeostasis in *Bacillus firmus* RAB". *J. Biol. Chem.* **257**. 1885-1889.

Bibliografía

- Krulwich, T.A., Ito, M. y Guffanti, A.A.** (2001) "The Na⁺ -dependence of alkaliphily in *Bacillus*". *Biochim.Biophys. Acta.* **1505**. 158-168.
- Krumar, G.C. y Takagi, H.** (1999) "Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint". *Biotechnol.Adv.* **75**. 561-594.
- Kudrya, V.A. y Simonenko, I.A.** (1994) "Alkaline serine protease gene of *Bacillus subtilis*". *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **41**. 505-509.
- Kumar, S., Tamura, K. y Nei, M.** (2004) "Mega 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment". *Brief.Bioinform.* **5**. 150-163.
- Kunst, F. y 170 col.** (1997) "The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*". *Nature.* **390**. 249-256.
- Kurt, A., Ozkan, M., Sezen, K., Demirbag, Z. y Ozcengiz, G.** (2005) "Cry3Aa11: a new Cry3Aa delta-endotoxin from a local isolate of *Bacillus thuringiensis*". *Biotechnol.Lett.* **27(15)**. 1117-1121.
- Kushner, D.J. y Kamekura, M.** (1988) "Physiology of halophilic eubacteria". *En: Vreeland, R.H. y Hochstein, L.I. (eds) Halophilic bacteria.* CRC Press Inc. Boca Raton.Florida. **1**. 109-140.
- Lan, H.X., Chen, Y.C., Chen, Z.H. y Chen, R.** (2005) "Cultivation and characters of aerobic granules for pentachlorophenol (PCP) degradation under microaerobic condition". *J. Environ. Sci. (China).* **17(3)**. 506-510.
- Lane, A.N.** (1991) "Solution conformation and dynamics of the octadeoxy-nucleotide d(CACTAGTG)₂: a multinuclear n.m.r. relaxation study". *Carbohydr.Res.* **16**. 123-144
- Lane, D., Feyter, F., Kennedy, M., Phua, S.H. y Semon, D.** (1986) "D protein of miniF plasmid acts as a repressor of transcription and as a site-specific resolvase. *Nucleic.AcidsRes.* **14(24)**. 9713-9728.
- Larkin, J.M. y Stokes, J.L.** (1967) "Taxonomy of psychrophilic strains of *Bacillus*". *J.Bacteriol.* **94**. 889-895.
- Larsen, H.** (1962) "Halophilism". *En: Gunsalus, I.C. y Stainer, R.Y. (eds.) The Bacteria.* Academic Press. New York. **4**. 297-342.
- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K.P., Prüß, M., Kaplan, T., Wießner-Gunkel, E., Stewrt, G.A.B. y Schere, S.** (1998) "*Bacillus weihenstephanensis* sp.nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group". *Int.J.Syst.Bacteriol.* **48**. 1373-1382.
- Legrini, O., Oliveros, E. y Braun, A.M.** (1991) "Photochemical processes for water treatment". *Chem.Rev.* **93**. 671-698.
- Li, R.F., Lou, J.X. y Zhang, T.Y.** (2004) "Expression of N domain of chromogranin A in *Bacillus subtilis* and its antifungal activity". *Sheng.Wu.Gong.Cheng.Xue.Bao.* **20(2)**. 274-278.
- Liesack, W. y Stackebrandt, E.** (1992) "Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material from an Australian terrestrial environment". *J.Bacteriol.* **1174**. 5072-5078.

Bibliografía

- Lim, J.M., Jeon, C.O., Song, S.M., y Kim, C.J.** (2005) "*Pontibacillus chungwhensis* gen.nov., sp.nov., a moderately halophilic Gram-positive bacterium from a solar saltern in Korea". *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **55(1)**. 165-170.
- Limiroli, R., Consonni, R., Ottolina, G., Marsilio, V., Bianchi, G. y Zetta, L.** (1995) "IR and CNMR characterization of new oleuropein aglycones". *J.Chem.Soc. Perkin. Trans. I.* **5**. 1519-1523.
- Lin, A.W., Usera, M.A., Barrett, T.J. y Goldsby, R.A.** (1996) "Application of Random Amplified Polymorphic DNA Analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*". *J.Clin.Microbiol.* **34(4)**. 870-876.
- López, L., Pozo, C., Rodelas, B., Calvo, C., Juárez, B., Martínez-Toledo, M.V. y González-López, J.** (2005) "Identification of bacteria isolated from an oligotrophic lake with pesticide removal capacities". *Ecotoxicology.* **14(3)**. 299-312.
- López-da Silva, M.T.C., Espirito-Santo, F., Tavares-Pereira, P. y Pereira-Roseiro, C.** (2006) "Phenotypic characterization of food waste degrading *Bacillus* strains isolated from aerobic bioreactors". *J.Basic.Microbiol.* **46**. 34-36.
- Lu, J., Nogi, Y. y Takami, H.** (2001) "*Oceanobacillus iheyensis* gen.nov., sp.nov., a deep-sea extremely halotolerant and alkaliphilic species isolated from a depth of 1050 m on the Iheya Ridge". *FEMSMicrobiol.Lett.* **205(2)**. 291-297.
- Ludwig, W. y Klenk, H.P.** (2001) "Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematic". En: Boone, D.R., Castenholz, P. y Garrity, G.M. (ed). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Springer-Verlag. New York. 1. 49-65.
- Lynch, M., O'Hely, M., Welsh, B. y Force, A.** (2001) "The probability of preservation of a newly arisen gene duplicate". *Genetics.* **159(4)**. 1789-1804.
- MacFaddin, J.F.** (1980) "Biochemical test for identification of medical bacteria". 2^a ed. Williams y Wilkins. Baltimore.
- Madern, D., Ebel, C. y Zaccai, G.** (2000) "Halophilic adaptation of enzymes". *Extremophiles.* **4(2)**. 91-98.
- Maeda, M., Mizuki, E., Nakamura, Y., Hatano, T. y Ohba, M.** (2000) "Recovery of *Bacillus thuringiensis* from marine sediments of Japan". *Curr.Microbiol.* **40**. 418-422.
- Maiden, M.C.J., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E. Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A. y Feavers, I.A.** (1998) "Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **95**. 3140-3145.
- Maier, J., Kandelbauer, A., Erlacher, A., Cavaco-Paulo, A. y Gubitz, G.M.** (2004) "A new alkali-thermostable azoreductase from *Bacillus* sp. strain SF". *Appli.Environ.Microbiol.* **70(2)**. 837-844.

Bibliografía

- Maravench, M.R., Frolow, F. y Gloss, L.M.** (2000) "Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt". *Biophys.Chem.* **86**. 155-164.
- Margensin, R. y Shinner, F.**(2001) "Mini-review: potencial of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology". *Extremophiles.* **4**. 73-83.
- Markossian, S., Becker, P., Markl, H. y Antranikian, G.** (2000) "Isolation and characterization of lipid-degrading *Bacillus thermoleovorans* IHI-91 from an icelandic hot spring". *Extremophiles.* **4(6)**. 365-371.
- Marmur, J.** (1961) "A procedure for the isolation of DNA from microorganism". *J.Mol.Biol.* **36**. 208-218.
- Marmur, J. y Doty, P.** (1962) "Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature". *J.Mol.Biol.* **5**. 109-118.
- Marsilio, V., Lanza, B. y Pozzi, N.** (1996) "Progress in table olive debittering: degradation in vitro of oleuropein and its derivatives by *Lactobacillus plantarum*". *J.AOCS.* **73**. 593-597.
- Mascher, T., Zimmer, S.L., Smith, T.A. y Helmann, J.D.** (2004) "Antibiotic-inducible promoter regulated by the cell envelope stress-sensing two-component system LiaRS of *Bacillus subtilis*". *Antimicrob.Agents.Chemother.* **48(8)**. 2888-2896.
- Masten, S.J. y Davies, S.H.** (1994). "The use of ozonation to degrade organic contaminants in wasterwater". *Environ.Sci.Technol.* **28**. 180-185.
- Maugeri, T.L., Gugliandolo, C., Caccamo, D. y Stackbrandt, E.** (2002) "Three novel halotolerant and termophilic *Geobacillus* strain from shallow marine vents". *Syst.Appl.Microbiol.* **25**. 450-455.
- Maugeri, T.L., Gugliandolo, C., Caccamo, D. y Stackbrandt, E.** (2001) "A poliphasic taxonomy study of termophilic bacilli from shallow, marine vent". *System.Appl.Microbiol.* **24**. 572-587.
- Mauriello, E.M.F., Duc, L.H., Istico, R., Cangiano, G., Hong, H.A., De Felice, M., Ricca, E. y Cutting, S.M.** (2004) "Display of heterologous antigens on the *Bacillus subtilis* spore coat using CotC as a fusion partner". *Vaccine.* **22**. 1177-1187.
- Mazza, P.** (1994) "The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrheal microorganism". *Boll.Chim.Farm.* **133**. 3-18.
- McHardy, A.C., Puhler, A., Kalinowski, J. y Meyer, F.** (2004) "Comparing expression level-dependent features in codon usage with protein abundance: an analysis of 'predictive proteomics'". *Proteomics.* **4**. 46-58.
- McKinney, E.C., Ali, N., Traut, A., Feldmann, K.A., Belostotsky, D.A., McDowel, J.M. y Meagher, R.B.** (1995) "Sequence-based identification of DNA insertion mutation in Arabidopsis: actin mutants act2-1 and act4-1". *Plant.J.* **8(4)**. 613-622

Bibliografía

- Medina-Moreno, S.A., Huerta-Ochoa, S. y Gutierrez-Rojas, M.** (2005) "Hydrocarbon biodegradation in oxygen-limited sequential batch reactors by consortium from weathered, oil-contaminated soil". *Can.J.Microbiol.* **51(3)**. 231-239.
- Megias, L. y Renau, J.** (1998) "Técnicas Generales". *En: Manual de Técnicas de Microscopía Electrónica (M.E.T.). Aplicaciones Biológicas.* Megías, L.O. y Renau, J. Editores. Editorial Universidad de Granada. ISBN84-338-2470-8.
- Menezes-Bento, F., de Olivera-Camargo, F.A., Okeke, B.C. y Frankenberger, W.T.Jr.** (2005) "Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil". *Microbiol.Res.* **160(3)**. 249-255.
- Miller, L. y Berger, T.** (1985) "Bacteria identification by gas chromatography of whole cell fatty acids". Hewlett-Packard Application Note. Hewlett-Packard Co. Avondale. Pa. 228-241.
- Moeller, R., Horneck, G., Facius, R. y Stackebrandt, E.** (2005) "Role of pigmentation in protecting *Bacillus* sp. endospores against environmental UV radiation". *FEMSMicrobiol.Ecol.* **51**. 231-236.
- Montaño, A., de Castro, L., Rejano-Navarro, L. y Sánchez, A.H.** (1992) "Analysis of zapatera olives by gas and high-performance liquid chromatography". *J.Chromat.A.* **594(1-2)**. 259-267.
- Montaño, A., Rejano-Navarro, L. y Sánchez-Gómez, A.H.** (1988) "Proceso rápido de elaboración de aceitunas verdes aderezadas. II". *Grasas y Aceites.* **39(3)**. 174-179.
- Montaño, A., Sánchez, A.H. y de Castro, A.** (1993) "Controlled fermentation of green table olives". *J.FoodSci.* **58**. 843-852.
- Monteiro, S.M., Clemente, J.J., Henriques, A.O., Gomes, R.J., Carrondo, M.J. y Cunha, A.E.** (2005) "A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*". *Biotechnol.Prog.* **21(4)**. 1026-1031.
- Morillo, J.A., Aguilera, M., Ramos-Cormenzana, A. y Monteoliva-Sánchez, M.** (2006) "Production of a metal binding of a metal binding exopolysaccharide by *Paenibacillus jamilae* using two-phases olive-mill waste as fermentation substrate". *Curr. Microbiol.* (En impresión).
- Mukwaya, G.M y Welch, D.F.** (1989) "Subgrouping of *Pseudomonas cepacia* by cellular fatty acid composition". *J.Clin.Microbiol.* **27**. 2640-2646.
- Mullaney, E.J., Daly, C.B. y Ullah, A.H.** (2000) "Advances in phytase research". *Adv.Appl.Microbiol.* **47**. 157-199.
- Muyzer, G., de-Waal, E.C. y Uitterlinden, A.G.** (1993) "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA". *Appl.Environ.Microbiol.* **59**. 695-700.
- Nakajima-Kambe, T., Shimomura, M., Nomura, N., Chanpornpong, T. y Nakahara, T.** (1999) "Decolorization of molasses wastewater by *Bacillus* sp. under thermophilic and anaerobic conditions". *J.Biosci.Bioeng.* **87(1)**.119-121.

Bibliografía

- Nakamura, K., Haruta, S., Ueno, S., Ishii, M., Yokota, A. y Igarashi, Y.** (2004) "*Cerasibacillus quisquiliarum* gen.nov., sp.nov., isolated from a semi-continuous decomposing system of kitchen refuse". *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **54(4)**. 1063-1069.
- Nakamura, L.K.T. y Jackson, M.A.** (1995) "Classification of the taxonomy of *Bacillus mycoides*". *Int.J.Syst.Bacteriol.* **45**. 46-49.
- Naruse, N., Tenmyo, O., Kobaru, S., Kamei, H., Miyaki, T., Konishi, M. y Oki, T.** (1990) "Pumilacidin, a complex of new antiviral antibiotics. Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity". *J.Antibiot.* **43**. 267-280.
- Navajas, M. y Fenton, B.** (2000) "The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review". *Experin.Appl.Acarol.* **24**. 751-774.
- Nazina, T.N., Tourova, T.P., Poltarau, A.B., Novikova, E.V., Grigoryan, A.A., Ivanova, A.E., Lysenko, A.M., Petrunyaka, V.V., Osipov, G.A., Belyaev, S.S. e Ivanov, M.V.** (2001) "Taxonomy study of aerobic thermophilic bacilli: description of *Geobacillus subterraneus* gen.nov., sp.nov. and *Geobacillus uzenensis* sp.nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocateculatus*, *Bacillus thermolevorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *Geobacillus Stearothermophilus*, *Geobacillus Thermocatenulatus*, *Geobacillus Thermolevorans*, *Geobacillus Kaustophilis*, *Geobacillus Thermoglucosidasius* and *Geobacillus thermodenitrificans*". *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **51**. 433-446.
- Neklyudov, A.D., Ivankin, A.N. y Berdutina, A.V.** (2000) "Properties and uses of protein hydrolysates (review)". *Appl.Biochem.Microbiol.* **36**. 452-459.
- Nicholson, W.L., Mumakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J. y Setlow, P.** (2000) "Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments". *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **64(4)**. 548-572.
- Nielsen, A.T., Liu, W.T., Filipe, C., Grady, L., Molin, S. y Stahl, D.A.** (1999) "Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorous removal reactor". *Appl.Environ.Microbiol.* **65**. 1251-1258.
- Niimura, Y., Koh, E., Yanagida, F., Suzuki, K.I., Komagata, K. y Kozaki, M.** (1990) "*Amphibacillus xylanus* gen.nov., sp.nov., a facultatively anaerobic spore-forming xyladigesting bacterium which lacks cytochrome, quinone and catalase". *Int.J.Syst.Bacteriol.* **40**. 297-301.
- Ntougias, S. y Russell, N.J.** (2001) "*Alkalibacterium olivoapovliticus* gen.nov., sp.nov., a new obligate alkaliphilic bacterium isolated from edible-olive wash-waters". *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **51**. 1161-1170.
- Nüble, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W. y Backhaus, H.** (1996) "Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNA in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gelelectrophoresis". *J.Bacteriol.* **178**. 5636-5643.

- Oberreuter, H., Charzinski, J. y Scherer, S.** (2002) "Intraespecific diversity of *Brevibacterium linens*, *Corynebacterium glutamicum* and *Rhodococcus erythropolis* based on the partial 16S rDNA sequence analysis and Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy". *Microbiology*. **148**. 1523-1532.
- Okazaki, K., Kikly, K., Michalovich, D., Young, P.R. y Leonard, W.J.** (2000) "Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor beta chain". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. **97(21)**. 11439-11444.
- Olivera, N., Siñeriz, F. y Breccia, J.D.** (2005) "*Bacillus patagoniensis* sp.nov., a novel alkalitolerant bacterium from the rhizosphere of *Atriplex lampa* in Patagonia, Argentina". *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **55**. 443-447.
- Oren, A.** (2000) "Biological processes in the Dead Sea are influenced by short-term and long term salinity changes". *Archives for Hydrobiology. Special Issue.Advan.Limnol.* **55**. 531-542.
- Oren, A.** (2004) "Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges". *Phil.Trans.R.Soc.Lond.B.* **359**. 623-638.
- Oshima, M. y Ariga, T.** (1975) "ω-cyclohexyl-fatty acids in acidophilic thermophilic bacteria. Studies on their presence, structure and biosynthesis using precursors labeled with stable isotopes and radioisotopes". *J.Biol.Chem.* **250**. 6963-6968.
- Osterhout, G.J., Shull, V.H. y Dick, J.D.** (1991) "Identification of clinical isolates of gram-negative nonfermentative bacteria by an automated cellular fatty acid identification system". *J.Clin.Microbiol.* **29**. 1822-1830.
- Overbeek, R.** (2000) "Genomics: What is realistically achievable". *GenomeBiol.* **1**. 2.
- Owen, R.J., Beck, A. y Borman, P.** (1985) "Restriction endonuclease digest patterns of chromosomal DNA from nitrate-negative *Campylobacter jejuni*-like organisms". *Eur.J.Epidemiol.* **1(4)**. 281-287.
- Ozawa, K., Yagu-Uchi, K., Yamanaka, K., Yamashita, Y., Ueba, K. y Miwatani, T.** (1979) "Antagonistic effects of *Bacillus natto* and *Streptococcus faecalis* on growth of *Candida albicans*". *Microbiol.Immunol.* **23(12)**. 1147-1156.
- Pace, N.R., Stahl, D.A., Lane, D.J. y Olsen, G.J.** (1986) "The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences". *Adv.Microb.Ecol.* **9**. 1-55.
- Palmisano, M.M., Nakamura, L.K., Duncan, K.E., Istock, C.A.A. y Cohan, F.M.** (2001) "*Bacillus sonorensis* sp.nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona". *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **51**. 1671-1679.
- Palys, T., Berger, E., Mitrica, I., Nakamura, L.K. y Cohan, F.M.** (2000) "Protein-coding genes as molecular markers for ecologically distinct populations: the case of two *Bacillus* species". *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **50**. 1021-1028.

Bibliografía

- Palys, T., Nakamura, L.K. y Cohan, F.M.** (1997) "Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data". *Int.J.Syst.Bacteriol.* **47**. 1145-1156.
- Parkhill, J., Sebaihia, M., Preston, A.L.D., Murphy, L.D., Thomson, N., Harris, D.E., Holden, M.T., Churcher, C.M., Bentley, S.D., Mungan, K.L., Cerdeno-Tarraga, A.M., Temple, L., James, K., Harris, B., Quail, M.A., Achman, M., Atkin, R., Baker, S., Basham, D., Bason, N., Cherevach, I., Chillingworth, T., Collins, M., Cronin, A., Davis, P., Doggett, J., Feltwell, T., Goble, A., Hamlin, N., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., Leather, S., Moule, S., Norberczak, H., O'Neil, S., Ormond, D., Price, C., Rabinowitsch, E., Rutter, S., Sanders, M., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Unwin, L., Whitehead, S., Borell, B.G. y Maskell, D.J.** (2003) "Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*". *Nat.Genet.* **35(1)**. 32-40.
- Patel, J.B.** (2001) "16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory". *Mol.Diagn.* **6**. 313-321.
- Patel, J.B., Leonard, D.G., Pan, X., Musser, J.M., Berman, R.E. y Nachamkin, I.** (2000) "Sequence-based identification of *Mycobacterium* species using the MicroSeq500 16S rDNA bacterial identification system". *J.Clin.Microbiol.* **38**. 246-251.
- Patumi, M., Dandria, R., Fontanazza, G., Morelli, G., Giorio, P. y Sorrentino, G.** (1999) "Yield and oil quality of intensively trained trees of three cultivars of olive (*Olea europaea*) under different irrigation regimes". *J.Hortic.Sci.Biotechnol.* **74**. 729-737.
- Pazzini, L.M., Scarpati, M.L. y Oriente, E.G.** (1960) "Costituzione della oleuropeina, glucoside amaro e ad azione ipotesiva dell'olivo". *Guzz.Chim.Ital.* **90**. 1449-1485.
- Peerbooms, P.G., Engelen, M.N., Stokman, D.A., van Bentham, B.H. y Bruisten, S.M.** (2002) "Nasopharyngeal carriage of potential bacterial pathogens related to day care attendance, with special reference to the molecular epidemiology of *Haemophilus influenzae*". *J.Clin.Microbiol.* **40**. 2832-2836.
- Pelagatti, O. y Brighigna, A.** (1981) "Rivitalizzazione e impiego di fermenti lattici essecati per la preparazione delle olive da tavola col sistema Sivigliano". *Industrie.Alimentari.* **38**. 182-184.
- Petre, M., Teodorescu, M.E., Zarnea, G., Adrian, P., Gheoghiu, E. y Gheordunescu, V.** (2001) "Microbial degradation of cellulose wastes in continuous bioreactors". *Meded.Rijk.Suniv.Gen.Fak.Landbouwk.D.Toegep.Biol.Wet.* **66(3a)**. 195-198.
- Petsch, F.B.** (2000) "Anspach, endotoxin removal from protein solutions". *J.Biotechnol.* **76**. 97-119.
- Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvil'skaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., Nikitin, D., Osipov, G. y Laurinavichius, K.** (2000) "*Anoxybacillus pushchinensis* gen.nov., sp.nov., a

Bibliografía

novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavitherms* comb. nov". *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **50(6)**. 2109-2117.

Pinchuk, I.V., Bressollier, P., Verneuil, B., Fenet, B., Sorokulova, I.B., Megraud, F. y Urdaci, M.C. (2001) "In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics". *Antimicrob.AgentsChemother.* **45**. 3156-3161.

Plant, L., Lam, C., Conway, P.L. y O'Riordan, K. (2003) "Gastrointestinal microbial community shifts observed following oral administration of a *Lactobacillus fermentum* strain to mice". *FEMSMicrobiol.Ecol.* **43**. 133-140.

Ponnamperuma, C. y Gabel, N.W. (1974) "The precelular evolution and organization of molecules". *En: Carlile, M.J. y Skehek, J.J* (ed.) *Evolution in the microbial world*. Cambridge University Press. London. 393-413.

Popov, S.G., Popova, T.G., Hopkins, S., Weinstein, R.S., MacAfee, R., Fryxell, K.J., Chandhoke, V., Bailey, C. y Alibek, K. (2005) "Effective antiprotease-antibiotic treatment of experimental anthrax". *BMCInfectiousDiseases.* **5(1)**. 25.

Por, F.D. (1980) "A classification of hypersaline waters based on trophic criteria". *Mar.Ecol.* **1**. 121-131.

Post, F.J., Borowitzka, L.J., Borowitzka, M.A., Mackay, B. y Moulton, T. (1983) "The protozoa of a Western Australian hypersaline lagoon". *Hydrobiol.* **105**. 95-113. *En: Rodríguez-Valera, F.* (1993) *The biology of Halophilic Bacteria*. CRC Press Inc. Boca Raton. Florida. 1-23.

Pourbabae, A.A., Malekzadeh, F. y Sarbolouki, M.N. (2006) "Aerobic decolorization and detoxification of a disperse dye in textile effluent by a new isolate of *Bacillus* sp.". *Biotechnol.Bioeng.* **93(4)**. 631-635.

Prescott, S.C. y Dunn, C.G. (1957) "Industrial Microbiology". New York. MacGraw-Hill.

Priest, F.G. (1993) "Systematics and ecology of *Bacillus*". *En: Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology and molecular genetics* ed. Sonenshein. A.L., Hoch, J.A. y Losick, R. Washington DC. *Amer.Soc.Microbiol.* 3-16.

Priest, F.G., Goodfenow, M. y Todd, C. (1988) "A numerical classification of the genus *Bacillus*". *J Gen.Microbiol.* **134**. 1847-1882.

Prosekova, L., Novakova, M., Julak, J. y Mara, M. (1994) "Effect of *Bacillus firmus* and other sporulating aerobic microorganisms on in vitro stimulation of human lymphocytes. A comparative study". *FoliaMicrobiol.* **39**. 501-504.

Puchkova, L.I., Kalmykova, G.V., Burtseva, L.I. y Repin, V.E. (2002) "Entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* as producers of restriction endonucleases". *Prikl.Biokhim.Mikrobiol.* **38(2)**. 140-144.

Puri, S., Beg, Q.K. y Gupta, R. (2002) "Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology". *Curr.Microbiol.* **44(4)**. 286-290.

Bibliografía

- Quesada, E., Ventosa, A., Rodríguez-Valera, F., Mejías, L. y Ramos-Cormenzana, A.** (1984) “*Deleya halophila*, a new species of moderately halophilic bacteria”. *System.Bacteriol.* **34**. 287-292.
- Rademaker, J.L., Hoste, B., Louwa, F.J., Kersters, K., Vauterin, L., Vauterin, P. y de Bruijn, F.J.** (2000) “Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xantomonas* as a model system”. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **50**. 665-667.
- Rainey, P.B., Thompson, I.P. y Palleroni, N.J.** (1994) “Genome and fatty acid analysis of *Pseudomonas stutzeri*”. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **44**. 54-61.
- Ramos-Cormenzana, A.** “Taxonomía Bacteriana”. Ed. 1979.
- Rauek, T.** (1998) Secretaría de Recursos Naturales y Desarrollo Sustentable- PRODIA “Programa de Desarrollo Institucional Ambiental-Control de Contaminación ambiental-Unidad de Control Pesca V.
- Reichert, J.M. y Paquette, C.** (2003) “Clinical development of therapeutic recombinant proteins”. *Biotechniques.* **35**. 176-185.
- Rejano-Navarro, L., Castro-Gómez-Millán, A., González-Cancho, F., Durán-Quintana, M.C., Sánchez-Gómez, A.H., Montaña-Asquerino, A., García-García, P., Sánchez-Roldán, F. y Garrido-Fernández, A.** (1986) “Repercusión de diversas formas de tratamiento con ácido clorhídrico en la elaboración de aceitunas verdes estilo sevillano”. *Grasas y aceites.* **37**. 19-22.
- Rejano-Navarro, L., Cordón-Casanueva, J.L. y Fernández-Díez, M.J.** (1977) “Modificaciones del proceso de elaboración y envasado de aceitunas verdes de mesa en relación con la eliminación y reuso de vertidos”. *Grasas y Aceites.* **28**. 267-285.
- Ren, P.G. y Zhou, P.J.** (2005a) “*Salinibacillus aidingensis* gen.nov., sp.nov. and *Salinibacillus kushneri* sp.nov., moderately halophilic bacteria isolated from a neutral saline lake in Xin-Jiang, China”. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **55(2)**. 949-953.
- Ren, P.G. y Zhou, P.J.** (2005b) “*Tenuibacillus multivorans* gen.nov., sp.nov., a moderately halophilic bacterium isolated from saline soil in Xin-Jiang, China”. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **55(1)**. 95-99.
- Reynolds, E.S.** (1963) “The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy”. *J.Cell.Biol.* **17**. 208.
- Ricca, E. y Cutting, S.M.** (2003) “Emerging applications of bacterial spores in nanobiotechnology”. *J.Nanobiotechnol.* **1**. 6.
- Rice, R.G.** (1981) “Ozone treatment of hazardous materials”. AIChE Symp. Series **77**. 79-107.
- Roberts, M.S. y Cohan, F.M.** (1995) “Recombination and migration rates in natural populations of *Bacillus subtilis* and *Bacillus mojavensis*”. *Evolution.* **49**. 1081-1094.
- Rodríguez-Valera, F., Ruíz-Berraquero, F. y Ramos-Cormenzana, A.** (1981) “Characteristic of the heterotrophic population in hypersaline environments of different SALT concentration”. *Microbiol.Ecol.* **7**. 235-243.

- Rodríguez-Valera, F.** (1986) "The ecology and taxonomy of aerobic chemoorganotrophic halophilic bacteria". *FEMSMicrobiol.Rev.* **39**. 17-22.
- Rogall, T., Flohr, T. y Bottger, E.C.** (1990) "Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA". *J.Clin.Microbiol.* **136**.1915-1920.
- Roig, J.M. y Hernández, J.M.** (1991) "El uso de microorganismos iniciadores (startes) en la fermentación de la aceituna". *Olivae.* **37**. 20-28.
- Rölleke, S., Muyzer, G., Wawer, C. y Lubitz, W.** (1996) "Identification of bacteria in the biodegraded wall painting by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA". *Appl.Environ.Microbiol.* **62**. 2059-2065.
- Romano, I., Lama, L., Nicolaus, B., Gambacorta, A. y Giordano, A.** (2005) "*Bacillus saliphilus* sp.nov., isolated from mineral pool in Campania, Italy". *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **55**. 159-163.
- Romero, C., Brenes-Balbuena, M., García-García, P. y Garrido-Fernández, A.** (2001) "Management of spent brines or osmotic solutions". *J.FoodEngin.* **49**. 2-3.
- Romero, C., Brenes, M., Yousfi, K., García, P., García, A. y Garrido, A.** (2004). "Efecto de cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives". *J.Agric.FoodChem.* **54**. 479-484.
- Romero, C., Brenes, M., García, P., García, A. y Garrido, A.** (2002a) "Polyphenol changes during storage of natural black olives". *J.Agric.FoodChem.* **52(7)**. 1973-1979.
- Romero, C., García, P., Brenes, M., García, A. y Garrido, A.** (2002b) "Phenolic compounds in natural black Spanish olive cultivars". *Eur.Food.Res.Technol.* **215**. 489-496.
- Rosa de, M., Gambacorta, A., Minale, L. y Bu'lock, J.D.** (1972) "The formation of ω -cyclohexyl-fatty acids from shikimate in an acidophilic thermophilic *Bacillus*. A new biosynthesis pathway". *Biochem.J.* **128**. 751-754.
- Rosa La, M., Bottaro, G., Gulino, N., Gambuzza, F., Di Forti, F., Ini., G. y Tornambe, E.** (2003) "Prevention of antibiotic-associated diarrhea with *Lactobacillus sporogenes* and fructooligosaccharides in children". *MinervaPediatr.* **55**. 447-452.
- Rossello-Mora, R.** (1999) "Sobre el concepto de especie en Microbiología". *Articulo de actualidad SEM.* **27**.18-22.
- Rosselló-Mora, R.** (2005) "Updating prokaryotic taxonomy". *J.Bacteriol.* **187(18)**. 6255-6257.
- Rossello-Mora, R. y Amann, R.** (2001) "The species concept for prokaryotes". *FEMSMicrobiol.Rev.* **25(1)**. 39-37.
- Rösser, S., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Lin, C., McGill, T.L., Wisotzkey, J.D., Jurtshuk, Jr. P. y Fox, G.E.** (1991) "Phylogenetic diversity in the genus *Bacillus* as seen by 16S rRNA sequencing studies". *Syst.Appl.Microbiol.* **14**. 266-269.
- Ruiz-Barba, J.L. y Jiménez-Díaz, R.** (1995) "Availability of essential B-group vitamins to *Lactobacillus plantarum* in green olive fermentation brines". *Appl.Environ.Microbiol.* **61**.1294-1297.

Bibliografía

- Ruíz-Barba, J.L., Garrido-Fernández, A. y Jiménez-Díaz, R.** (1991) "Bactericidal actino of oleuropein extracted from green olive against *Lactobacillus plantarum*". *Lett.Appl.Microbiol.* **12**. 65-68.
- Ruíz-Bravo, A., Jiménez-Valera, M., Moreno, E., Guerra, V. y Ramos-Cormenzana, A.** (2001) "Biological response modifier activity of an exopolysaccharide from *Paenibacillus jamilae* CP-7". *Clin.Diag.Lab.Immunol.* **8**. 706-710.
- Ruíz-García, C., Quesada, E., Martínez-Checa, F., Llamas, I., Urdaci, M.C. y Béjar, V.** (2005) "*Bacillus axarquiensis* sp.nov. and *Bacillus malacitensis* sp.nov., isolated from river-mouth sediments in Southern Spain". *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **55**. 1279-1285.
- Ryan, D., Antolovich, M., Herlt, T., Prenzler, P.D., Lavee, S. y Ropbards, K.** (2002) "Identification of phenolic compounds in tissues of novel olive cultivar Hardy's Mammoth". *J.Agric.FoodChem.* **50**. 6716-6724.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich, H.A.** (1988) "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermoestable DNA polymerase". *Science.* **239**. 487-491.
- Saito, K.** (1960) "Chromatographic studies on bacterial fatty acids". *J.Biochem.* **47**. 699-719.
- Saitou, N. y Nei, M.** (1987) "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees". *Mol.Biol.Evol.* **4**. 406-425.
- Sánchez, A.H., García, P., Rejano, L., Brenes, M. y Garrido, A.** (1995) "The effects of acidification and temperature during washing of Spanish-style green olives on the fermentation process". *J.Si.FoodAgric.* **68**. 197-202.
- Sánchez, A.H., Fernández, M.J. y González, F.** (1991) "Cambios en la composición de la aceituna durante su desarrollo". *Grasas y Aceites.* **42**. 414-419.
- Sánchez, A.H., García, P., Rejano, L., Brenes, M. y Garrido, A.** (1985) "The effects of acidification and temperature during washing of Spanish-style green olive fermentation". *Appl.Environ.Microb.* **60**. 2059-2064.
- Sánchez-Porro, C., Martín, S., Mellado, E. y Ventosa, A.** (2000) "Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes". *J.Appl.Microbiol.* **94**. 295-300.
- Sanders, M.E., Morelli, L. y Tompkins, T.A.** (2003) "Spore-formers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*". *Comprehensive Rev.Food Sci.Safety.* **2**. 101-110.
- Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A.R.** (1977) "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors". *Proc.Acad.Sci.USA.* **74**. 5463-5467.
- Santos, S.R. y Ochman, H.** (2004) "Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins". *Environ Microbiol.* **6**. 754-759.
- Schallmeyer, M., Singh, A. y Ward, O.P.** (2004) "Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production". *Can.J.Microbiol.* **50(1)**. 1-17.

- Schleifer, K.H. y Ludwig, W.** (1994) "Molecular taxonomy: Classification and identification". *En: Bacterial diversity and sistematics*. Eds. Priest, F.G., Ramos-Cormenzana, A. y Tindall, B.J. Plenum Press. New York. 1-15.
- Schlesner, H., Lawson, P.A., Collins, M.D., Weiss, N., Wehmeyer, U., Volker, H. y Thomm, M.** (2001) "*Filobacillus milensis* gen.nov., sp.nov., a new halophilic spore-forming bacterium with Orn-D-Glu-type peptidoglycan". *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **51(2)**. 425-431.
- Schopf, J.W.** (1975) "The age of microscopic life". *Endeavour.* **34**. 51-58.
- Sciancalepore, V.** (1984) "La temperatura di deamerizzazione nella preparazione delle olive verdicol Sistema Sivigliano". *Indust.Alimentari.* **23**. 941-944.
- Seewaldt, E. y Stackebrandt, E.** (1982) "Partial sequence of 16S ribosoma RNA and the phylogeny of Prochloron". *Nature.* **295**. 618-620.
- Senesi, S.** (2004) "*Bacillus* spores as probiotic products for human use". *En: Bacterial Spore Formers: Probiotics and Emerging Appliction*. Ricca, E., Henrques, A.O. y Cutting, S.M. (eds). Norfolk. UK. *Horizon Bioscience Press*. 131-141.
- Seppola, M., Olsen, E.R., Sandaker, E., Kanapathipillai, P., Holzapfel, W. y RingØ, E.** (2006) "Random amplification of polymorphic DNA (RADP) typing of *Carnobacteria* isolated from hindgut chamber and large intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)". *Syst.Appl.Microbiol.* **29**. 131-137.
- Shaeffer, A.B. y Fulton, M.D.** (1933) "A simplified method for staining endospores". *Science.* **77**. 194.
- Sharma, D.K., Saini, H.S., Singh, M., Chimni, S.S. y Chadha, B.S.** (2004b) "Isolation and characterization of microorganisms capable of decolorizing various triphenylmethane". *J.Basic.Microbiol.* **44(1)**. 59-65.
- Sharma, D.K., Saini, H.S., Singh, M., Chimni, S.S. y Chadha, B.S.** (2004a) "Biodegradation of acid blue-15, a textile dye, by an up-flow immobilized cell bioreactor". *Appl.Enviro.Microbiol.* **31(3)**.109-114.
- Sharp, P.M., Shields, D.C., Wolfe, K.H. y Li, W.H.** (1989) "Chromosomal location and evolutionary rate variation in enterobacterial genes". *Science.* **246(4931)**. 808-810.
- Sharp, R.J., Riley, P.W. y White, D.** (1992) "Heterotrophic thermophilic bacilli". *Thermophilic.bacteria.* (ed). Kristjansson, J.K. Boca Raton. CDC Press.
- Shasha, B. y Leibowitz, J.** (1961) "On the oleuropein, the bitter principle of olives". *J.Org.Chem.* **26**. 1948-1954.
- Shaw, N.** (1974) "Lipid composition as a guide to the classification of bacteria". *In: Perlman, D.* (ed) *Advances in applied microbiology* Academic Press Inc. New York y London. **17**. 63-108.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K. y Komagata, K.** (1996) "Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen.nov. and *Aneurinibacillus* gen.nov". *Int.J.Syst.Bacteriol.* **46**. 31-39.

Bibliografía

- Sierra, G.** (1957) "Studies on bacterial esterases. III. Influence of the composition of the culture media on the production of ali-esterase and lipase of *Pseudomonas aeruginosa*". *Antonie Van Leeuwenhoek*. **23(3-4)**. 278-288.
- Simonen, M. y Palva, I.** (1993) "Protein secretion in *Bacillus* species". *Microbiol.Rev.* **57**.109-137.
- Skerman, V.B.D., Mc Gowan, V. y Sneath, P.H.A.** (1980) "Approved lists of bacterial names". *Int.J.Syst.Bacteriol.* **30**. 225- 420.
- Smirnov, V.V., Rudenko, A.V., Samgorodskaja, N.V., Sorokulova, I.B., Reznik, S.R. y Sergeichuk, T.M.** (1994) "Susceptibility to antimicrobial drugs of strains of bacilli used as a basis for various probiotics". *Antibiot.Khimioter.* **39(4)**. 23-28.
- Smirnov, V.V., Kudriavtsev, V.A., Osadchaia, A.I. y Safronova, L.A.** (2004) "Lytic activity of aerobic sporulating bacteria". *Mikrobiol.Z.* **66(2)**. 35-46.
- Smith, N.R. y Clark, F.E.** (1937) "Aproposed grouping of the mesophilic, aerobic, spore-forming bacilli". *SoilSci.Soc.Am.Proc.* **2**. 225.
- Smith, N.R., Gordon, R.E. y Clark, F.E.** (1946) "Aerobic mesophilic spore-forming bacteria". Miscellaneous publication. 559. United States Department of Agriculture. Washington D.C.
- Smith, N.R., Gordon, R.E. y Clark, F.E.** (1952) "Aerobic sporeforming bacteria". *Udept.Agr.Monogr.* Wansington D.C. **16**.
- Sneath, B., Vary, C., Paulakis, G. y Vournakis, J.** (1986) "Secondary structure of *Tetrahymena thermophila* 5S ribosomal RNA as revealed by enzymatic digestion and microdensitometric analysis". *Nucleic.AcidsRes.* **14(3)**. 1365-1378.
- Sneath, P.H.** (1977) "Samuel Tertius Cowan1905-1976". *J.Gen.Microbiol.* **103(1)**. 1-7
- Sneath, P.H.** (1995) "Taxonomic note: the potential of dead bacterial specimens for systematic studies". *Int.J.Syst.Bacteriol.* **45(1)**. 188-189.
- Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R.** (1973). "Numerical taxonomy". W.H. Freeman y Company. San Francisco.
- Soares, V.F., Castilho, L.R., Bon, E.P. y Freire, D.M.** (2005) "High-yield *Bacillus subtilis* protease production by solid-state fermentation". *Appl.Biochem.Biotechnol.* **311**. 121-124.
- Sokal, R.R. y Michener, C.D.** (1958) "A statistical method for evaluating systematic relationships". University of Kansas *Sci.Bull.* **38**. 1409-1438.
- Sorokulova, I.B.** (1997) "A comparative study of the biological properties of Biosporin and other commercial *Bacillus*-based preparations". *Mikrobiol.Zh.* **59**. 43-49.
- Spizizen, J.** (1958) "Transformation of biochemically deficient strain of *Bacillus subtilis* by deoxyribonuclease". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **44**. 1072-1078.
- Stackebrandt, E. y Goebel, B.M.** (1994) "A place for DNA-DNA reassociation and 16S ribosomal RNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology". *Int.J.Syst.Bacteriol.* **44**. 846-849.

- Stackebrandt, E., Winks, J., Steiner, U. y Kroppenstedt, R.M.** (2001) "*Nonomuraea dietzii* sp.nov.". *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **51(4)**. 1437-1441.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A., Kampfner, P., Maiden, M.C., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Trüper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C. y Whitman, W.B.** (2002) "Report of the Ad Hoc Committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology". *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **52(3)**. 1043-1047.
- Stackebrandt, E., Kroppenstedt, R.M., Jahnke, K.D., Kemmerling, C. y Gütler, H.** (1994) "Transfer of *Streptosporangium viridogriseum*, *Streptosporangium viridogriseum* subsp. *kofuense*, and *Streptosporangium albidum* to *Kutzneria* gen.nov. as *Kutzneria viridogrisea* comb. nov., *Kutzneria kofuensis* comb. nov., and *Kutzneria albida* comb. nov., respectively, and emendation of the genus *Streptosporangium*". *Int.J.Syst.Bacteriol.* **44**. 265-269.
- Stackebrandt, E., Liesack, W. y Goebel, M.B.** (1993) "Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis". *FASEBJ.* **7(1)**. 232-236.
- Stackebrandt, E., Ludwig, W., Weizenegger, M., Dorn, S., McGill, T.J., Fox, G.E., Woese, C.R., Schbert, W. y Schleifer, K.H.** (1987) "Comparative 16S rRNA oligonucleotide analysis and murein types of round spore-forming bacilli and non-spore-forming relatives". *J.Gen.Microbiol.* **133**. 2523-2529.
- Stahl, D.A., Fisher, B., Mansfield, H.R. y Montgomery, L.** (1998) "Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology". *Appl.Environ.Microbiol.* **54**. 1079-1084.
- Stanley, J.T. y Krieg, N.R.** (1989) "Classification of prokaryotic organisms:an overview". *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Ed. Staley. M.J., Bryant, M.P., Pfennig, N. y Holt, J.G. (eds). Williams and Wilkins. Baltimore. **3**. 965-968.
- Stead, D.E.** (1992) "Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles". *Int.J.Syst.Bacteriol.* **42**. 281-295.
- Stead, D.E., Sellwood, J.E., Wilson, J. y Vieny, I.** (1992) "Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid, accurate identification of plant pathogenic bacteria". *J.Appl.Microbiol.* **72**. 315-321.
- Subov, N.N.** (1931) *Oceanographical Tables*. USSR Oceanographical Institute, Hydrometeorological communications. Moscow. *En:* Rodriguez-Valera, F., Ruíz-Berraquero, F. y Ramos-Cormenzana, A. (1981) "Characteristic of the heterotrophic bacterial population in hypersaline environments of different sal concentration". *Microbiol.Ecol.* **7**. 235-243.
- Suihko, M.L., Sinkko, H., Partanem, L., Mattila-Sandholm, T., Salkinoja-Salonem, M. y Raaska, L.** (2004) "Description of heterotrophic bacteria occurring in paper mills and paper products". *J.Appl.Microbiol.* **97(6)**. 1228-1235.

Bibliografía

- Supaphol, S., Panichsakpatana, S., Trakulnaleamsai, S., Tungkananuruk, N., Roughjanajirapa, P. y O'donnell, A.G.** (2005) "The selection of mixed microbial inocula in environmental biotechnology: Example using petroleum contaminated tropical soils". *J.Microbiol.Methods*. (Epub ahead of print).
- Tailliez, P., J. Tremblay, Ehrlich, S.D. y Chopin, A.** (1998). "Molecular diversity and relationship within *Lactococcus lactis*, as revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)". *Syst.Appl.Microbiol.* **21**. 530–538.
- Tehei, M., Franzetti, B., Maurel, M.C., Vergner, J., Hountondji, C. y Zaccai, G.** (2002) "The search for traces of life: the protective effect of salt on biological macromolecules". *Extremophiles*. **6**. 427-430.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, K., Jeanmougin, F. y Higgins, D.G.** (1997) "The CLUSTAL_X Window interface: flexible strategies for multiple sequence alignments aided by quality analysis tools". *Nucleic.AcidsRes.* **25**. 4876-4882.
- Todar, K.** (2005) "*Bacillus*". University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology.
- Torre de la, J.E., Moya, E.R., Bota, E. y Sancho, J.** (1993) "Estudio físico-químico y microbiológico de la fermentación de aceitunas verdes arbequinas". *Grasas y Aceites*. **44(45)**. 274-278.
- Torsvik, V., Daae, F.L., Sandaa, R.A. y Øvrea's, L.** (1998) "Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments". *J.Biotechnol.* **64**. 53–62.
- Tosato, V. y Brushi, C.V.** (2004) "Knowledge of the *Bacillus subtilis* genome: impacts on fundamental science and biotechnology". *Appl Microbiol.Biotechnol.* **64**. 1-6.
- Tuleva, B., Chistova, N., Jordanov, B., Nikilova-Damyanova, B. y Petrov, P.** (2005) "Naphthalene degradation and biosurfactant activity by *Bacillus cereus* 28BN". *Z.Naturforsch.* **60(7-8)**. 577-582.
- Turnball, P.C.B. y Kramer, J.M.** (1991) "*Bacillus*". *En: Manual of Clinical Microbiology*, 5th edn. Eds. Balows, A., Hausler, W.J.Jr., Herrmann, H., Isenberg, D. y Shadomy, H.J. Washington DC. *Am.Soc.Microbiol.* 296-303.
- Väisänen, O. y Salkinoja-Salonen, M.** (1989) "Use of phage typing and fatty acid analysis for the identification of bacilli from food packaging paper and board machines". *Syst.Appl.Microbiol.* **12**. 103-111.
- Valderrama, M.J.** (1985) "Aislamiento y caracterización de bacilos Gram-negativos inmóviles halófilos moderados". Tesina de Licenciatura, Departamento de Microbiología. Universidad de Granada. Granada.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., Devos, P., Kersters, K. y Swings, J.** (1996a) "Polyphasic taxonomic, a consensus approach to bacterial systematics". *Microbiol.Rev.* **60**. 407-438.
- Vandamme, P., Vancanneyt, M., van Belkum, A., Sergers, P., Quint, WG., Kersters, K., Paster, B.J. y Dewhirst, F.E.** (1996b) "Polyphasic analysis of strains of the genus

- Capnocytophaga* and Centers for Disease Control group DF-3". *Int.J.Syst.Bacteriol.* **46(3)**. 782-792.
- Vaneechoutte, M.** (1996) "DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature". *Mol.Biotechnol.* **6 (2)**. 115-142.
- Varela, H., Ferrari, M.D., Belobradjie, L., Vazquez, A. y Loperena, M.L.** (1997) "Skin unhairing proteases of *Bacillus subtilis*: production and partial characterization". *Biotechnol.* **12**. 643-645.
- Vargas, V.A., Delgado, O.D., Hatti-Kaul, R. y Mattiasson, B.** (2005) "*Bacillus bogoriensis* sp.nov., a novel alkaliphilic, halotolerant bacterium isolated from a Kenyan soda lake". *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **55**. 899-902.
- Vauterin, L. y Vauterin, P.** (1992) "Computer aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms". *Eur.Microbiol.* **1**. 37-41.
- Veen van, A.G.** (1967) "The bonfkrek toxins". *En: Biochemistry of Some Foodborne Microbial Toxins.* ed. Mateles, R.I. y Wogan, G.N. Cambridge. MIT Press. 43-50.
- Veen van, A.G. y Mertens, W.K.** (1934) "Die gifstoffe der sogenannten der bongkrek". *Rec.Trav.Chim.* **53**. 398-404.
- Ventosa, A.** (1980) "Taxonomía numérica de bacilos Gram-negativos halófilos moderados". Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología. Universidad de Granada. Granada.
- Ventosa, A., Quesada, E., Rodríguez-Valera, F., Ruíz-Berraquero, F. y Ramos-Cormenzana, A.** (1982) "Numerical taxonomy of moderately Gram negatives rods". *J.Gen.Microbiol.* **128**. 1959-1968.
- Ventosa, A. y Nieto, J.J.** (1995) "Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms". *W.J.Microbiol.Biotechnol.* **11**. 85-94.
- Ventosa, A., Nieto, J.J. y Oren, A.** (1998) "Biology of moderately halophilic aerobic bacteria". *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**. 504-544.
- Vlahov, G. y Solinas, M.** (1993) "Anthocyanin polymerization in black table olives". *Agric.Med.* **123**. 7-11.
- Vos de, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Adrie-Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. y Zabeau, M.** (1995) "AFLP:a new technique for DNA fingerprinting". *Nucleic.AcidsRes.* **23**. 4407-4414.
- Vreeland, R.H., Rosenzweig, W.D. y Powers, D.W.** (2000) "Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal". *Nature.* **407**.897-900.
- Waasbergen van, L.G., Balkwill, D.L., Croker, F.H., Bjoinstad, B.N. y Miller, R.V.** (2000) "Genetic diversity among *Arthrobacter* species collected across a heterogeneous series of terrestrial deep-subsurface sediments as determined on the basis of 16S rRNA and recA gene sequences". *Appl.Environ.Microbiol.* **66(8)**. 3454-3463.

Bibliografía

- Waino, M., Tindall, B.J., Shumann, P. y Ingvorse, K.** (1999) "*Gracibacillus* gen.nov., with description of *Gracibacillus halotolerant* gen.nov., sp.nov, transfer of *Bacillus dipsosauri* to *Gracibacillus dipsosaurius* comb. nov. and *Bacillus salexigens* to the genus *Salibacillus* gen.nov., as *Salibacillus salexigens* comb. nov.". *Int.J.Syst.Bacteriol.* **49**. 821-831.
- Ward, O.P.** (1985) "Proteolytic enzymes". *En: Moo-Young, M. (ed). Comprehensive biotechnology the practice of biotechnology: current commodity products.* Pergamon Press. Oxford. **3**. 789-818.
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P. y Trüper, H.G.** (1987) "Report of Ad Hoc Committee on Reconciliation of approaches to bacterial systematics". *Int.J.Syst.Bacteriol.* **37**. 463-464.
- Weidner, S., Arnold, W. y Puhler, A.** (1996) "Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes". *Appl.Environ.Microbiol.* **62(3)**. 766-771.
- Weinsburg, W., Barns, S.M., Pelletier, D.A. y Lane, D.J.** (1991) "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study". *J.Bacteriol.* **173**. 697-703.
- Welch, D.F.** (1991) "Applications of cellular fatty acid analysis". *Clin.Microbiol.Rev.* **4**. 422-438.
- Welsh, J. y McClelland, M.** (1990) "Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers". *Nucleic.AcidRes.* **18(4)**. 7213-7218.
- Westers, L., Westers, H. y Quax, J.** (2004) "*Bacillus subtilis* as cell factory pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism". *Biochimica et Biophysica.* **1694**. 299-310.
- Whitehead, T.R. y Cotta, M.A.** (1999) "Phylogenetic diversity of methanogenic archaea in swine waste storage pits". *FEMSMicrobiol.Lett.* **179(2)**. 223-226.
- Wieser, M., Worliczek, H., Kämpfer, P. y Busse, H.J.** (2005) "*Bacillus herbersteinensis* sp.nov.". *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **55**. 2119-2123.
- Willian, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. y Tingey, S.V.** (1990) "DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic marked". *Nucleic.AcidRes.* **18**. 6531-6535.
- Winslow, C.E., Broadhurst, J., Buchanan, R.E., Krumwiede, C., Roger, L.A. y Smith, G.H.** (1920) "The families and genera of the bacteria:Final report of the Committee of the Society of American Bacteriologist on ccharacterization and clasification bacterial types". *J.Bacteriol.* **5(3)**. 191-229.
- Wintzingerode, V.F., Göbel, U.B. y Stackebrandt, E.** (1997) "Determination of microbial diversity in environmental samples:pitfalls of PCR-based rRNA analysis". *FEMSMicrobiol.Rev.* **21**. 212-229.

- Wisotzkey, J.D., Jurtshuk, P.Jr., Fox, G.E., Deinhard, G. y Poralla, K.** (1992) "Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris* and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus *Alycyclobacillus* gen.nov.". *Int.J.Syst.Bacteriol.* **42**. 263-269.
- Woese, C.** (1970) "Molecular mechanics of translation: a reciprocating ratchet mechanism". *Nature.* **30**. 817-20.
- Woese, C. R.** (1987) "Bacterial evolution". *Microbiol.Rev.* **51**. 221-271.
- Woese, C.R., Kandler, O. y Wheelis, M.L.** (1990) "Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria* and *Eukarya*". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **87**. 4576-4579.
- Wolf de, H., Blust, R. y Backeljau, T.** (2004) "The use of RAPD in ecotoxicology". *Mutation Res.* **566**. 249–262.
- Wu, S., Jia, S., Sun, D., Chen, M., Chen, X., Zhong, J. y Huan, L.** (2005) "Purification and characterization of two novel antimicrobial peptides Subpeptin JM4-A and Subpeptin JM4-B produced by *Bacillus subtilis* JM4". *Curr.Microbiol.* **51(5)**. 292-296.
- Xena de, E.N.**(2000) "A decade of the RAPD method: possibilities and limitations for plant genetics relationship studies". *ActaCient.Venez.* **51(4)**. 197-206.
- Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Wray, V. y Fredrickson, H.L.** (1995) "Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS 50". *Appl.Environ.Microbiol.* **61**. 1706-1713.
- Yamada, S., Ohashi, E., Agata, N. y Venkateswaran, K.** (1999) "Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in the rice". *Appl.Environ.Microbiol.* **65**. 1483-1490.
- Yang, P., Vauterin, L., Vancanneyt, M., Swings, J. y Kersters, K.** (1993) "Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*". *Syst.Appl.Microbiol.* **16**. 47-71.
- Yli-Mattila, T., Paavanen-Huhtala, S., Fenton, B. y Tuovinen, T.** (2000) "Species and strain identification of the predatory mite *Euseius finlandicus* by RAPD-PCR and ITS sequences". *Exp.Appl.Acarol.* **24**. 863–880.
- Yong, F.M. y Wood, J.B.** (1974) "Microbiology and biochemistry of the soy sauce fermentation". *Adv.Appl.Microbiol.* **17**. 157-194.
- Yoon, J.H., Kang, K.H. y Park, Y.H.** (2002) "*Lentibacillus salicampi* gen.nov., sp.nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a salt field in Korea". *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **52(6)**. 2043-2048.
- Yoon, J.H., Lee, C.H. y Oh, T.K.** (2005) "*Bacillus cibi* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood". *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **55**. 733-736.

Bibliografía

- Yoon, J.H. y Oh, T.K.** (2005) "*Bacillus litoralis* sp.nov., isolated from a tidal flat of the Yellow Sea in Korea". *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **55**. 1945-1948.
- Yoon, J.H., Weiss, N., Lee, K.C., Lee, I.S., Kang, K.H. y Park, Y.H.** (2001) "*Jeotgalibacillus alimentarius* gen.nov., sp.nov., a novel bacterium isolated from jeotgal with L-lysine in the cell wall and reclassification of *Bacillus marinus* (Rüger 1983) as *Marinibacillus marinus* gen.nov., comb.nov." *Int.J.Syst.Microbiol.* **51**. 2087-2093.
- Youssef, N.H., Duncan, K.E. y McInerney, M.J.** (2005) "Importance of 3-hydroxy fatty acid composition of lipopeptides for biosurfactant activity". *Appl.Environ.Microbiol.* **71(12)**. 7690-7695.
- Yu, Z. y Morrison, M.** (2004) "Comparison of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis". *Appl.Environ.Microbiol.* **70(8)**. 4800-4806.
- Yumoto, I., Hirota, K., Goto, T., Nodasaka, Y.Y. y Nakajima, K.** (2005) "*Bacillus oshimensis* sp.nov, a moderately halophilic, non-motile alkaliphile". *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **55**. 907-911.
- Zeigler, D.R.** (2003) "Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria". *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **53**. 1893-1900.
- Zhang, G.W., Koti, W.M. y Daggard, G.** (2002) "A RAPD-PCR genotyping assay which correlates with serotypes of group B streptococci". *Lett.Appl.Microbiol.* **35**. 247-250.
- Ziemke, F., Höfle, M.G., Lalucat, J. y Rosselló-Mora, R.** (1998) "Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp.nov". *Int.J.Syst.Bacteriol.* **48**. 179-186.
- Zvyaginiceva, I.S., Kulichevskaya, I.S., Gerasimenko, L.M., Tarasov, A.L. y Panikov, N.S.** (1991) "Metabiotic interactions between aerobic microorganisms in halophytic community". Symp. "Environmental Microbiology in Ural and Northern Caspian Areas". Orenburg.

Bibliografía

VII. ANEXOS.

VII.1. Matriz de semejanza obtenida con el programa de taxonomía numérica TAXAN 2.0.

	0.96907	0.94055	0.91203	0.88350	0.85498	0.82646	0.79793	0.76941	0.74089	0.71236	0.68384
#1	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
#32I*****I										
#8I										
#2	I										
#5	I										
#128I										
#52I										
#101I										
#131I										
#103I										
#119I										
#7I										
#141I										
#148I										
#104I										
#51I										
#59I										
#57I										
#58I										
#106I										
#89I										
#137I										
#4I										
#144I										
#60I										
#62I										
#44I										
#121I										
#31I										
#94I										
#99I										
#48I										
#80I										
#77I										
#133I										
#40I										
#83I										
#70I										
#96I										
#50I										
#55I										
#53I										
#11I										
#23I										
#24I										
#27I										
#30I										
#75I										
#63I										
#12I										
#64I										
#25I										
#74I										
#15I										
#68I										
#65I										
#20I										
#28I										
#76I										
#21I										
#29I										
#26I										


```

#113 *****I      I      II      I      I I I
      I*****II*****I      I      I I I
#136 *****I      I      I      I      I I I
      I      I      I      I      I I I
#98 *****I      I      I**I      I      I I I
      I*****I      I      I      I      I I I
#122 *****I      I      I      I      I I I
      I      I      I      I      I I I
#109 *****I      I      I      I      I I I
      I      I      I      I      I I I
#132 *****I      I      I      I      I I I
      I      I      I      I      I I I
#35 *****I      I*****I      I      I I I
      I      I*****I      I      I I I
#102 *****I      I      I*****II      I I I
      I*****I      I      I      II      I I I
#130 *****I      I      I      I      I I I
      I      I      I      I      I I I
#91 *****I      I      I      II      I I I
      I      I      I      II      I I I
#82 *****I      I      I      II      I I I
      I      I      I      II      I I I
#156 *****I      I*****I      II      I I I
      I      I*****I      II      I I I
#134 *****I      I*****I      II      I I I
      I      I*****I      II      I I I
#110 *****I      I      I      I      I I I*****I
      I      I      I      I      I I I
#111 *****I      I*****I      I      I I I
      I*****I      I      I      I      I I I
#85 *****I      I      I      I      I I I
      I      I      I      I      I I I
#153 *****I      I      I      I      I I I
      I      I      I      I      I I I
#72 *****I      I      I      I      I I I
      I      I      I      I      I I I
#6 *****I      I*****I      I      I I I
      I*****I      I      I      I      I I I
#163 *****I      I      I      I      I I I
      I      I      I      I      I I I
#39 *****I      I*****I      I      I I I
      I*****I      I      I      I      I I I
#81 *****I      I      I      I      I I I
      I      I      I      I      I I I
#47 *****I      I**I      I*****I      I I I
      I      I      I      I      I I I
#49 *****I      I      I      I      I I I
      I      I      I      I      I I I
#135 *****I      I*****I      I      I I I
      I*****I      I      I      I      I I I
#147 *****I      I      I      I      I I I
      I      I      I      I      I I I
#142 *****I      I*****I      I      I I I
      I*****I      I      I      I      I I I
#152 *****I      I      I      I      I I I
      I      I      I      I      I I I
#139 *****I      I      I      I      I I I
      I      I      I      I      I I I
#45 *****I      I      I      I      I I I
      I      I      I      I      I I I

```

VII.2. Secuencias parciales del gen del RNAr 16S de las cepas seleccionadas como representantes de los fenones.

>E₃₀₈

```

GAACGTAGTTAGCCGGGGCTTTCTGGTACAGGTACCGTCAAGGTGCGGCCCTATTTGAACGGCACTTGTTCCTGACAACAGAGTT
TTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCATTGCGGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGT
AGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTA
CCAAC TAGCTAATGCGCCGCGGCCCATCTGTAAGTGACAGCTAAAAGCCGCTTTCACACTTCTCGTTATGCAACGAAAAGTATATC
CGGTATTAGCCCGGTTTCCCGGGTTATCCAGTCTTACAGGCAGGTTGCCACGTTACTACCCGTCGCGCGCTCGTTCCACAG
GCGTACCTCCGAAGAGGATCTGCCTGCTTCCCGCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCGCAGCGTTCGTCCTGAGCCATGATN
AACTTA

```

>E₃₀₁₈

```

GACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCGAGCAGTTACTCTGCACCTGTTCTTCCCTAACACAGAGCTTT
ACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCATTGCGGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAG
GAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGNCGGCTACGCATCGTNGCCTTGGTGAGCCATTACCCACC
AACTANCTAATGCGCCGCGGTCCATNTGTAAGTGACAGCCGAAACCGTCTTTCATCCTTGAACCATGCGGTTCAAGGAACTATCCGG
TATTAGCTCCGNTTCCCGGAGTTATCCANTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTTACTACCCGTCNGCCGTAACATCCGGGAGC
AAGTCCCTTCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCGCAGCGTTTCGTCCTGAGCCANGAT

```

>E₃₀₂₆

```

ANGNCGAATGCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTCGAACGGTACTTGTTCCTCCCTAACACAGAGTTT
CGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCATTGCGGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGG
AGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCA
ACTAGCTAATGCGCCGCGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCTAAAAGCCACNTTTTATAATTGAACNANGNGGTTCAATTAAGCNTCCGG
NATNAGCCCGGTTTCCCGNANTTATCCNAGTCTNACNGGNAGGTNACCCACGNTNANTCNCCGTCNGCNGNTAACNTAAGGAAGN
ANGNTCCNTCCGTCGNTNANTNGNANGNATAAGGNACNCCNCCGNGTTNGNCNNGAGCNGGGNATCAAANCTNAA

```

>E₅₅36

GACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTGAAACGGTACTTGTCTTCCCTAACAAACAGAGTTT
 TACGATCCGAAAACCTTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTGAGACTTTCGTCCATTGNGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTA
 NGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTNGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCAC
 CAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGNAAGTGGTANCTAAAAGCCACCTTTTATGATTGNANCNNNGCGTTAAANNAAGCTTC
 CGGNNTTAGCCCCGGTTNCCCGGNNTTNTCCNAGATTTACAGGCAGGTNACCANCTNGTNNNTCACCNCTCCGCGNGTTGACCTAAGGG
 AGCAANCTCCCGTCCGNCGGTTNANNTNGCTTGTATTAGGCACCCCGC

>E₅₅38

ACGTAGTTAGCCGNGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTGAAACGGTACTTGTCTTCCCTAACAAACAGAGTTT
 ACGATCCGAAAACCTTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTGAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAG
 GAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTNGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCAC
 AACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTANCTAAAAGCCACCTTTTATGATTGNANCNNNGCGTTNANNTNANGCNT
 CCGGNATTANCCCCGGTTNCCCGGNNTTNTCCAAGNTTACNNGCAGGTTACNNCTNGTNNNTCACCNCTCCGCGGTTGACNTAAGG
 AAGCAAGNTCCCGTCCGTTCAANTNGCANGTATNAGGCNCCCCGNCNGCTTTCNTNCT

>E₅₅49

GACGTAGTTAGCCGGGCTTTCTGGTCAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTGAAACGGCACTTGTCTTCCCTGACAACAGAGTTT
 ACGATCCGAAAACCTTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTGAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAG
 GAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGGTACGCATCGTNGCCTTGGNAAGCCGTTACCTTACC
 AACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCATCTGNNAGTGACANCTAAAAGCCGCCCTTCAACTTCTNGTATGCAACGAAAAGTATTATC
 CGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGGTATCCCAATNTTACAGGCAGGTTGCCACGTGTACTCACCCGNCGCCGCTCGTTCACAG
 GNGTCACTNCGAAGAGGATCTGCCTGCNTCCCGCGTGGACTTGCATGTATTANGCACGNCGCCACGGTTNGGCTGACCCANGAA

>I₃₀67

TTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTGAAACGGTACTTGTCTTCCCTAACAAACANAGCTTTACGATC
 CGAAAACCTTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTGAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCT
 GGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGGTACGCATCGTNGCCTTGGNGAGCCGTTACCTCACCAACAG
 CTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTGAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGGTATTAG
 CCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCANTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTACTCACCCGTGCGCCGTAACATCAGGGAGCAAGCTC
 CCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAAAGCACGCCGCGCAGCGTTCGTCCCTGAGCCA

>I₃₀73

GTAGTTAGCCGCGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTCTTCCCTAACAAACAGAGTTTAC
 GACCCGAAAGCCTTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTGAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGA
 GTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGGTACGCATCGTNGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAA
 CTAGCTAATGCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCTTTCAAATTTGAAACCATGCGGTTCAAATAAGTATTCCGGTA
 TTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTATGGGAGGTTACCCACGTGTACTCACCCGTGCGCCGCTAACTTTCATAAGAGCA
 AGCTCTTAATCCATTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCGCAGCGTTCATTCTCTG

>I₃₀74

GACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTGAAACGGTACTTGTCTTCCCTAACAAACAGAGTTT
 TACGATCCGAAAACCTTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTGAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTA
 GGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGGTACGCATCGTNGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCAC
 CAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCTAAAAGCCACCTTTTATAATTGAACCATGCGGTTCAATCAAGCAT
 CCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTACTCACCCGTGCGCCGCTNACATCAGG
 GAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCGCAGCGTTCGTCTGAGCCATGAT

>I₃₀76

CGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTGAAACGGTACTTGTCTTCCCTAACANANAGCTTTA
 CGATCCGAAAACCTTTCATCACTCACGCGGNGTTGCTCCGTGAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGG
 AGTCTGGGCCGTGTCTCANTCCAGTGTGGCCGATCACCTTTTTCAGGTCGGNTACGCATCGTNGCCTTGGTGAGCCNTTACCTCACCA
 ACTANCTAATGCGCCGNGGGTCCATNTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTGAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCG
 GTATTAGCCCCGNTTTCCCGGAGTTATCCANTCTTACAGGCANGTTACCCACGTGTACTCACCCGTGCGCCGNTAACATCAGGGAG
 CAAGCTCCCATCTGTCCGCTNGACTTGCATGTATTAGGNACGCCGCGCAGCGTTCGTCTGAGCCNAGATT

>I₃₀77

GACGTAGTTAGCCGGGCTTTCTGGTCAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTGAAACGGCACTTGTCTTCCCTGACAACAGAGTTT
 ACGATCCGAAAACCTTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTGAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAG
 GAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGGTACGCATCGTNGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACC
 AACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCTAAAAGCCGCTTTTCAACTTCTCGTTATGCAACGAAAAGTATTATCCG
 GTATTAGCCCCGGTTTCCCGGGTATCCAGTCTTACAGGCAGGTTGCCACGTGTACTCACCCGTGCGCCGCTCGTTCACAGGC
 GTCACCTCCGAAGAGGATCTGCCTGCTTCCCGCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCGCAGCGTTCGTCTGAGCCATGATCA

>N₃₀120

ATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGCGGGAAGCAGGCAGATCCTCTTCG
 GAGGTGACGCCTGTGGAACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACCC
 CGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAAATACTTTTCGTTGCATAACGAGAAGTTGAAAGGCGGCTTTAGCTGTCACT
 TACAGATGGGCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTAAGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAG
 AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT
 GGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTCAGGGAAGAA
 CAAGTGCCGTTTNAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCA

>N₃₀125

ANGNCGAATGCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCATTTCGAACGGTACTTGTCTTCCCTAACACAGAGTTT
 CGATCCGAAAACCTTCACTCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTGACACTTTCGTCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGG
 AGTCTGGGCGGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGCGCTACGCATCGTTCGCTTGGTGAAGCCGTTACCTTCA
 ACTAGCTAATGCGCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCTAAAAGCCACNTTTTATAATGAAACNANGNGTTCAATTAAGCNCCTCCG
 NATNAGCCCCGGTTTCCGNANTTATCCNAGTCTNACNGNAGGTNACCCACGNGTNANTCNCCTCNGCNGNTAACNTAAGGAAGN
 ANGNTCCNTCCGTCCGNTNANTNGNANGNATAAGGNACNCCNCCGGNGTTNGNCCNNGAGCNGGGNATCAAANCTNAA

>N₃₀129

GAACGTAGTTAGCCGGGCTTTCTGGTCAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCATTTCGAACGGCACTTGTCTTCCCTGACAACAGAGTT
 TTACGATCCGAAAACCTTCACTCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTGACACTTTCGTCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGT
 AGGAGTCTGGGCGGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGCGCTACGCATCGTTCGCTTGGTGAAGCCGTTACCTTCA
 CCAACTAGCTAATGCGCGCGGGCCATCTGTAAGTGAAGTAAAAGCCGCTTTCAACTTCTCGTTATGCAACGAAAAGTATTA
 TCCGGTATTAGCCCGGTTTCCCGGGTATCCAGTCTTACAGGCAGGTGGCCACGTTACTACCCGTCGCCCGCTCGTTCCAC
 AGGGTACCTCCGAAGAGGATCTGCCTGCTTCCCGCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCGCAGCGTTCTGCTGAGCCATGA
 TCAAACTCTA

>N₃₀135

GAACGTAGTTAGCCGGGCTTTCTGGTCAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCATTTCGAACGGCACTTGTCTTCCCTGACAACAGAGTT
 TTACGATCCGAAAACCTTCACTCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTGACACTTTCGTCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGT
 AGGAGTCTGGGCGGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGCGCTACGCATCGTTCGCTTGGTGAAGCCGTTACCTTCA
 CCAACTAGCTAATGCGCGCGGGCCATCTGTAAGTGAAGTAAAAGCCGCTTTCAACTTCTCGTTATGCAACGAAAAGTATTA
 TCCGGTATTAGCCCGGTTTCCCGGGTATCCAGTCTTACAGGCAGGTGGCCACGTTACTACCCGTCGCCCGCTCGTTCCAC
 AGGGTACCTCCGAAGAGGATCTGCCTGCTTCCCGCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCGCAGCGTTCTGCTGAGCCATGA
 TNAACTTA

>N₃₀137

GTAGTTAGCCGTTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTCTTCCCTAACACAGAGTTTAC
 GACCCGAAAGCCTTCACTCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTGACACTTTCGTCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGA
 GTCTGGGCGGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGCGCTACGCATCGTTCGCTTGGTGAAGCCGTTACCTCACCAA
 CTAGCTAATGCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCTTTCAATTTGAAACCATGCGGTTCAAATGTTATCCGGTA
 TTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTATGGGCAGGTTACCCACGTTACTACCCGTCGCCCGCTAACTTATAAGAGCA
 AGCTCTTAATCCATTGCTCGACTTGCATGTATTAAAGCACGCCGCCNCGGTTNATCCTGAGCCATG

>N₃₀138

TAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTCTTCCCTAACACAGAGTTTACGACCC
 GAAAGCCTTCACTCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTGACACTTTCGTCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTG
 GGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGCGCTACGCATCGTTCGCTTGGTGAAGCCGTTACCTCACCAACTAGC
 TAATGCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCTTTNAAATTTGAAACCATGCGGTTCAAATGTTATCCGGTATTAGC
 CCCGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTATGGGCAGGTTACCCACGTTACTACCCGTCGCCCGCTAACTTATAAGAGCAAGCTCT
 TAATCCATTGCTCGACTTGCATGTATTAAAGCACGCCGCCNCGGTTTCACTCCCTGAGCCAGGATCAAACCT

>V₃₀166

GGCTNTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGGCTATTTCGAACGGNACTTGTCTTCCCTAACACAGAGTTTACGATCCGAAAAC
 TTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTGACACTTTCGTCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTG
 TCTCAGTCCAGNGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGCGNTACGCATCGTNGCCTTGGTGAAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCG
 CCGCGGTTCACTGTAAGTGGTANCTAAAAGCCACCTTTTATAATTTGAAACCATGCGGNTCAATCAAGCATCCGGTATTAGCCCCG
 GTTCCCGGAGTTATCCAGNCTTACAGGCAGGTTACCCACGTTACTACCCGTCGCCCGCTNACATNAGGGAGCAAGCTCCCATC
 TGTCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACNCCGNCAGGTTCCGTT

>V₃₀172

TAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGNCTATTTCGAACGGTACTTGTCTTCCCTAACACAGAGTTTACGATCC
 GAAAACCTTCACTCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTGACACTTTCGTCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTG
 GGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGCGCTACGCATCGTTCGCTTGGTGAAGCCGTTACCTCACCAACTAGC
 TAATGCGCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCNAAAANCCNCTTTTNTANTNGAACNNGCGGTTNAAATNAAANCTCCGGTTTTAN
 CCCCCTTNCNNGNANTTNTCCANNNTTNCNGGCAGGTTACCCACGTTACTACCCGTCGCCCGCTNACATNAGGGAGCAAGCTCCCATC
 CCTTGGTCCGNTNANTTGNNTGNTNAGGCCNCCNCCNCCNCTTCCGTTCT

VII.3. Páginas web de las que se ha obtenido información para este trabajo.

[-http://www.cme.msu.edu/bergeys](http://www.cme.msu.edu/bergeys)
[-http://www.monografias.com/trabajos11/ferme/ferme.shtml](http://www.monografias.com/trabajos11/ferme/ferme.shtml)
[-www.bacterio.cict.fr/b/bacillus.html](http://www.bacterio.cict.fr/b/bacillus.html)
[-http://www.cme.msu.edu/bergeys](http://www.cme.msu.edu/bergeys)
[Agroinformación.Aceitunademesa.66/http://www.infoagro.com/olivo/aceitunasdemesa.asp](http://www.infoagro.com/olivo/aceitunasdemesa.asp)
[-http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/008/y7867s/y7867s00.htm](http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/008/y7867s/y7867s00.htm)
[-http://www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)
[-http://www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

VII.4 Abreviaturas utilizadas.

Δ Tm. Incremento de la temperatura de fusión.
 μ g. Microgramos.
 μ g/ml. Microgramos/mililitro.
 μ l. microlitros.
 μ m. Micrómetros.
A. Adenina.
a.C. Antes de Cristo.
A₄₄₀. Absorbancia.
AAI. Average aminoacid identity.
Ac. Ácido.
ADO. Adonitol.
ALA. Alanina.
ALM. Hidrólisis de Almidón.
AM. Ampicilina.
AN. Amikacina.
ANI. Average aminoacid identity.
ARDRA. Amplified ribosomal DNA restriction analysis.
ARG. Arginina.
ASP. Asparragina.
ATCC. American Type Culture Collection.
Atm. Atmósfera.
B.Bacillus.
BEN. Ac. Benzoico.
BLAST. Basic Local Alignment Search Tool.
BPF. Buenas Prácticas Fermentación.
C. Citosina.
C. Cloranfenicol.
C_{16:0}. átomos de carbono.
CAS. Hidrólisis de Caseína.
Cat. Catalasa.
Cat. Catálogo.
CC. Clindamicina.
CC.AA. Comunidades autónomas.
CE. Comunidad económica.
CEL. Celobiosa.
CETR. Cetrimida.

CF. Cefalotina.
CIC. Centro de Investigación Científica.
CIS. Cisteína.
CIT. Citrato
Cl₂Hg. Cloruro mercuríco.
Cl₃Fe. Cloruro férrico.
CINa. Cloruro sódico.
CMI. Concentración Mínima Inhibitoria.
CO₂. dióxido de carbono.
CODEX. Codex alimentarius.
CSIC. Centro Superior de Investigación Científica.
D.O. Densidad óptica.
dATP. Desoxiadenin trifosfato
DBO. Demanda biológica de oxígeno.
dCTP. Desoxicitosin trifosfato.
DGGE/TGGE. Denaturing/temperature gradient gel electrophoresis.
dGTP. Desoxiguanidin trifostato
digUTP. Digoxigenauridin trifosfato.
DNA. Ácido dexoxiribonucleico.
dNTP. Desoxinucleótido Trifosfato.
DQO. Demanda química de oxígeno.
dS/M. Sólidos disueltos/Materia orgánica.
DSM. Deuctche Sammlung von Mikroorganismen.
DSMZ. Deuctsche Sammlung von Midroorganismen und ZellkukreGmbH.
DUL. Dulcitol.
E. Eritromicina.
E₃₀. Entrada 30 °C.
E₅₅. Entrada 55 °C.
E_D. Distancia evolutiva.
EDTA. (Ethylenedinitrilo) tetraacetic acid.
EEUU. Estados Unidos.
ELISA.
EMBL. European Molecular Biology Laboratory.
ESC. Hidrólisis de Esculina.
FRU. Fructosa.
FU. Ac. Fumárico
G. guanina.
G. Sulfamidas.
g/Kg. Gramo/kilogramo.
g/L. gramos /litro.
G+C. guanina-citosina.
GAL. Galactosa
GALT. Gut-Associated Lymphoid Tissue.
GEL. Hidrólisis de Gelatina.
gen. género.
GLC. Gas-liquid chromatography.
GLU. Ac. Glutámico.
GLU. Glucosa.
GM. Gentamicina.
h. horas.
H₂. Hidrógeno.
HCl. Ácido clorhídrico.
HIS. Histidina.
I₃₀. A pie de tubería 30 °C.
Ig A. Inmunoglobulina A.
IMViC. Indol-rojo de metilo-Vogues-Proscauer y Citrato.

IND. Indol.
 INO. Myo-Inositol.
 K. Kanamicina.
 K_2HPO_4 . Fosfato potásico.
 KCl. Cloruro potásico.
 Kg/Ha. Kilogramo/hectárea.
 KOH. Hidróxido potásico.
 LDL. Lipoproteínas de baja densidad.
 LIS. Lisina.
 LMP. Low Melting point.
 M. molar.
 Mal. Ac. Málico.
 MAL. Ac. Malónico.
 MAL. Maltosa.
 MAN. Manitol.
 MAN: Manosa.
 Marc. Marcador.
 MET. Metionina.
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Sulfato magnésico heptahidratado.
 ml. mililitro.
 MLSA. Multilocus sequence analysis.
 MLST. Multilocus sequence typing.
 mm. milímetro.
 Móvil. Movilidad.
 N. Normalidad.
 N_{30} . Balsa nueva 30 °C.
 NA. Ácido nalidíxico.
 Na. Sodio.
 $NaCO_2$. Carbonato sódico.
 $NaHCO_3$. Bicarbonato sódico.
 NaOH. Hidróxido sódico.
 NC. No Comparables.
 Nc. no crecimiento.
 NCDO. National Collection of Dairy Organisms (United Kingdom).
 NCIB. National Center for Biotechnology Information.
 NCIMB. National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd. Aberdeen, Aberdeen, Scotland, (United Kingdom).
 ND. No detectado.
 nd. No determinado.
 NITRA. Reducción de Nitratos.
 NITRI. Reducción de Nitritos.
 NK. Natural killer.
 nm. Nanómetros.
 nmol. nanomoles.
 Nº. Número.
 nov. nueva.
 NRRLB. ARS Culture Collection Northern Regional Research Laboratory US Department of Agriculture. Peoria, Illinois, United States American.
 O/F. Oxido-Fermentación.
 °C. Grados centígrados.
 Oligont F. Oligonucleótido forward.
 Oligont R. Oligonucleótido reverse.
 OTU. Operational Taxonomy Units.
 OX. Ac. Oxálico.
 Oxi. Oxidasa.
 P. Penicilina.

p/v. peso/volumen.
pb. Pares de bases.
Pb. Plomo.
PB. Polimixina B.
PCR. Polymerization Chain Reaction.
PMC. Polish Collection of Microorganisms.
pmoles. Picomoles.
PRO. Ac. Propiónico.
PRODUC. Producción.
RA. Rifampicina.
RAM. Ramnosa.
RANGE. Rango.
RAPD. Randomly amplified polymorphic DNA.
RB. Binding Ratio.
RBR. Binding Ratio Range.
RFLP. Restriction fragment length polymorphism.
R-M. Rojo de Metilo
RNA. Ácido ribonucleico.
RNAm. Ácido ribonucleico mensajero.
RNAr. Ácido ribonucleico ribosómico.
RNAsa. Ribonucleasa A.
RNAt. Ácido ribonucleico de transferencia.
rpm. Revoluciones por Minuto.
S. Estreptomicina.
S.A. Sociedad Anónima.
SAC. Sacarosa
SAP. Sabouraud-Chloranphenicol.
SDS. Lauril Sulfato de Sodio.
Sn. Estaño.
sp. especie.
SSC. Solución Citrato Sódico.
S_{SM}. Coeficiente de similitud de Sokal y Michener.
T(°C). Temperatura
T. Timina.
T/Ha. Tonelada /hectárea.
T20. Hidrólisis de Tween 20.
T40. Hidrólisis de Tween 40.
T80. Hidrólisis de Tween 80.
TAR. Ac. Tartárico.
TE. Tetraciclina.
TEM. Microscopio Electrónico de Transmisión.
TIR. Hidrólisis de Tirosina.
T_m(°C). Temperatura media de fusión.
Tm. Tonelada métrica.
TSA. Triptosa soja agar.
U. Unidades.
UE. Unión Europea.
ufc. Unidades formadoras de colonias.
UPGM. Unweighted Pair Group Average.
V₃₀. Balsa vieja 30°C.
vol. Volumen.
V-P. Vogues-Proskauer.
XIL. Xilosa.
y col., y colaboradores

