

## **5. RESULTADOS**



### **5.1. CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DEL GRUPO DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS ANTÁRTICOS PERTENECIENTES AL GÉNERO *Shewanella*.**

Los aislamientos NF12, NF22 y NF24 proceden de muestras tomadas en distintos puntos de las Islas Shetland del Sur en la Antártida. El biotipo NF12 se obtuvo a partir de un lodo glaciar de Inlet Admiralty Bay (isla del Rey Jorge), mientras que NF22 y NF24 proceden respectivamente del filtrado de 25 L de agua y de sedimentos, tomados en la cala Johnson (isla de Livingston).

Los aislamientos bacterianos antárticos NF12, NF22 y NF24 corresponden a microorganismos de morfología bacilar, Gram negativos, no capsulados, no esporulados y móviles mediante flagelación polar.

Este grupo bacteriano crece bien en medios bacteriológicos nutritivos tales como el TSB y el TSA. Sobre TSA a 15 °C producen, a los 5 días de incubación, colonias circulares de contorno perfectamente definido y de 1-2 mm de diámetro, ligeramente mucosas y de color marrón-rosado. El aspecto mucoso de las colonias es debido a la producción de material extracelular no adherido a la pared.

Al hacer crecer estos microorganismos en medio de cultivo líquido (TSB) se observan bacilos móviles, predominantemente dispuestos en parejas y que presentan longitudes diversas, originando en algunos casos estructuras filamentosas.

En el transcurso del estudio de los biotipos bacterianos NF12, NF22 y NF24, nunca ha sido detectada la presencia de pigmentos difusibles o fenómenos de bioluminiscencia .

En la tabla 5.1.1. se resumen las características morfológicas de este grupo de bacterias.

**Tabla 5.1.1.** Características morfológicas de los aislamientos antárticos NF12, NF22 y NF24.

<b>CARACTERISTICAS</b>	<b>NF12</b>	<b>NF22</b>	<b>NF24</b>
Tinción Gram	-	-	-
Morfología celular	bacilar	bacilar	bacilar
Longitud celular (µm)	1-2.5	1-3	1-3.7
Diámetro celular (µm)	0.3-0.5	0.4	0.5
Movilidad	+	+	+
Flagelos	1 (polar)	1 (polar)	1 (polar)
Pigmentación colonias	+	+	+
Cápsula	-	-	-

Mediante microscopía electrónica de barrido se ha podido observar la morfología bacilar de los biotipos NF12, NF22 y NF24 desarrollados en TSB a 15 °C (Figuras 5.1.1. a 5.1.4), detectándose una variabilidad en cuanto a la longitud de los bacilos, así como la formación de filamentos que pueden alcanzar los 10 µm de longitud a partir de las 24 h de incubación.

La observación de tinciones negativas mediante microscopía electrónica de transmisión reveló que la movilidad de estos microorganismos se debe a un solo flagelo en situación polar. También pudo detectarse en estas preparaciones la presencia del material extracelular, tipo limo, excretado por estos biotipos bacterianos. (Figuras 5.1.5. y 5.1.6.).

NF12, NF22 y NF24 son bacterias psicrotrofas, que toleran un rango de temperaturas que oscila de 4 a 20 °C para NF22 y NF24 y hasta 30 °C en el caso de NF12. (Tabla 5.1.2.).

Ninguno de los aislamientos de este grupo bacteriano requiere Na<sup>+</sup> para su desarrollo. Respecto a la tolerancia al NaCl, NF24 puede soportar concentraciones de NaCl en el medio de cultivo del orden del 9 % (p/v), mientras que NF12 y NF22 sólo toleran niveles de un 5.5 y 5 % respectivamente.

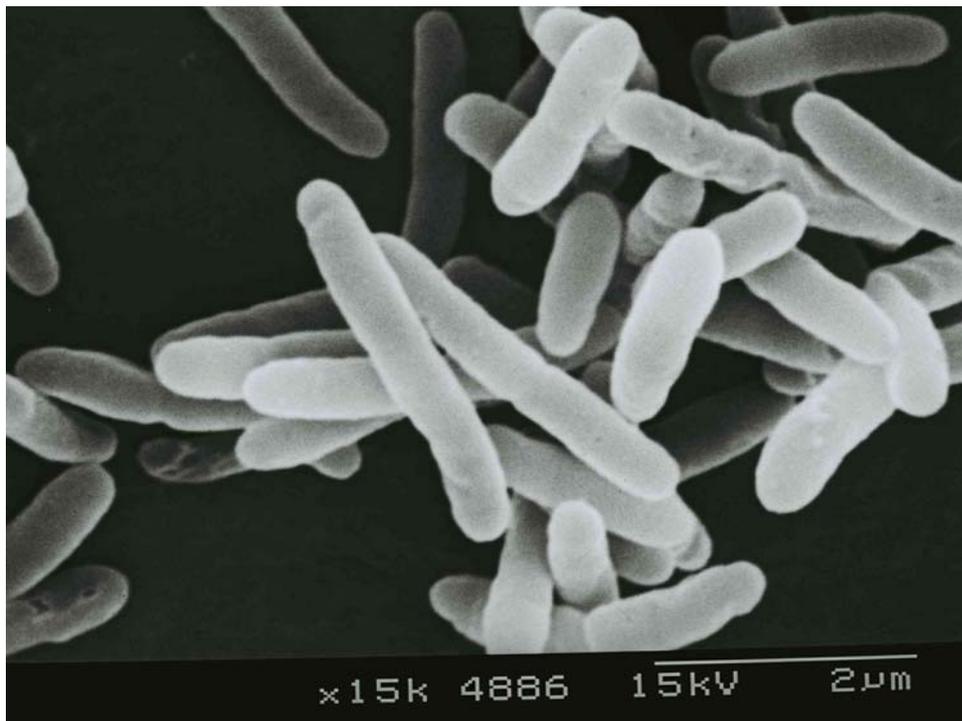
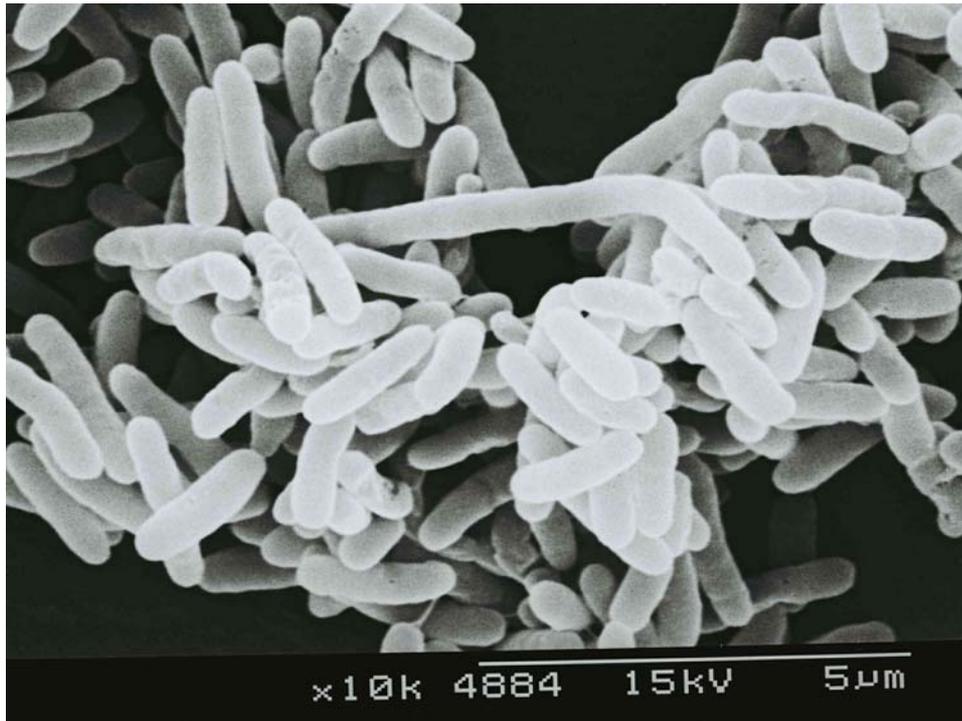
El rango de pH en el que se desarrollan los tres biotipos bacterianos está comprendido entre 6 y 9.5. En la tabla 5.1.2. se resumen las características de crecimiento de los aislamientos bacterianos NF12, NF22 y NF24.

**Tabla 5.1.2.** Características de crecimiento de los aislamientos bacterianos antárticos NF12, NF22 y NF24.

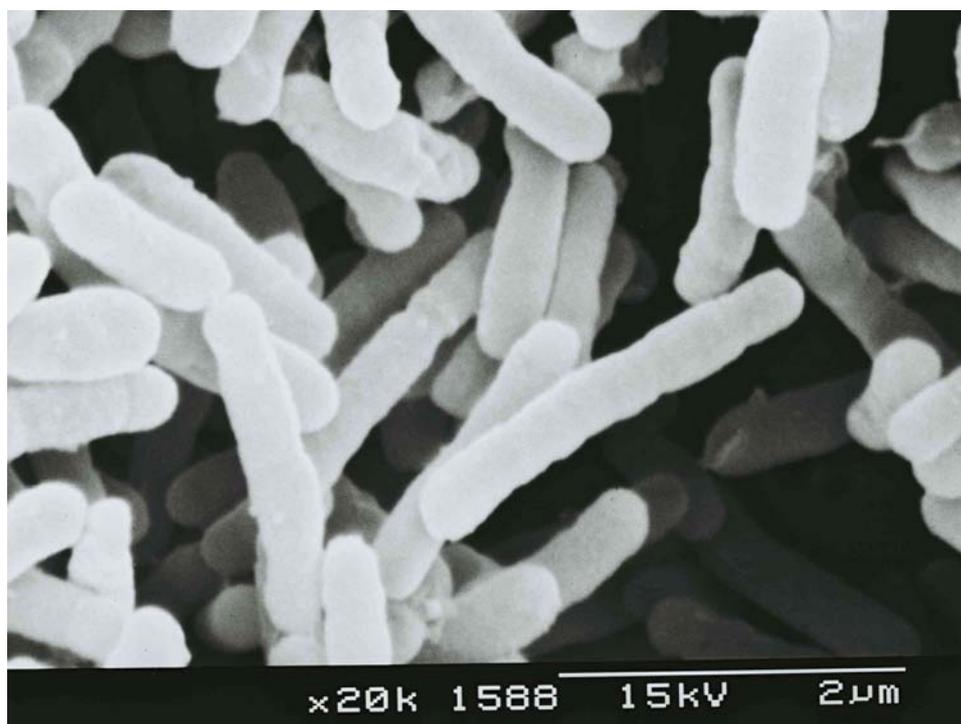
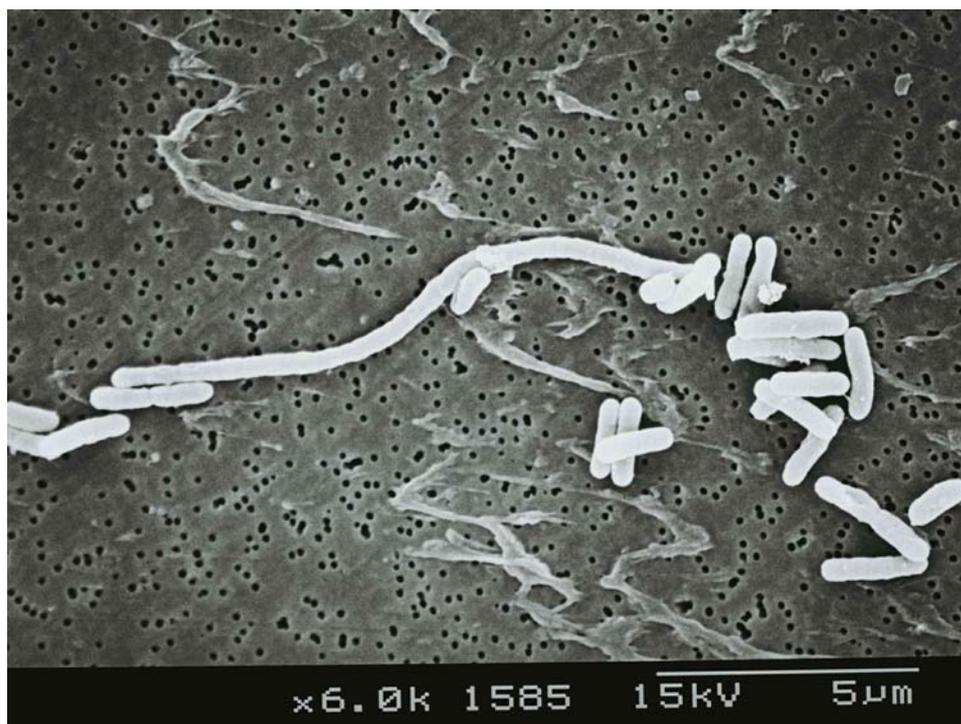
CARACTERÍSTICAS	NF12	NF22	NF24
Rango de T <sup>a</sup> de crecimiento (°C)	4-30	4-20	4-20
Tolerancia al NaCl % (p/v)	5.5	5	9
Requerimiento de Na <sup>+</sup>	-	-	-
Rango de tolerancia de pH	6-9.5	6-9.5	6-9.5



**Figura 5.1.1.** Morfología de la cepa NF22 observada mediante microscopía electrónica de barrido. Células desarrolladas en TSB a 15 °C durante 24 h.



**Figura 5.1.2.** Micrografías electrónicas de barrido del biotipo NF22 desarrollado en TSB a 15 °C durante 24 h.



**Figura 5.1.3.** Micrografías electrónicas de barrido del biotipo NF12 desarrollado en TSB a 15 °C durante 24 h.



**Figura 5.1.4.** Micrografías electrónicas de barrido del biotipo NF24 desarrollado en TSB a  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h.

a)

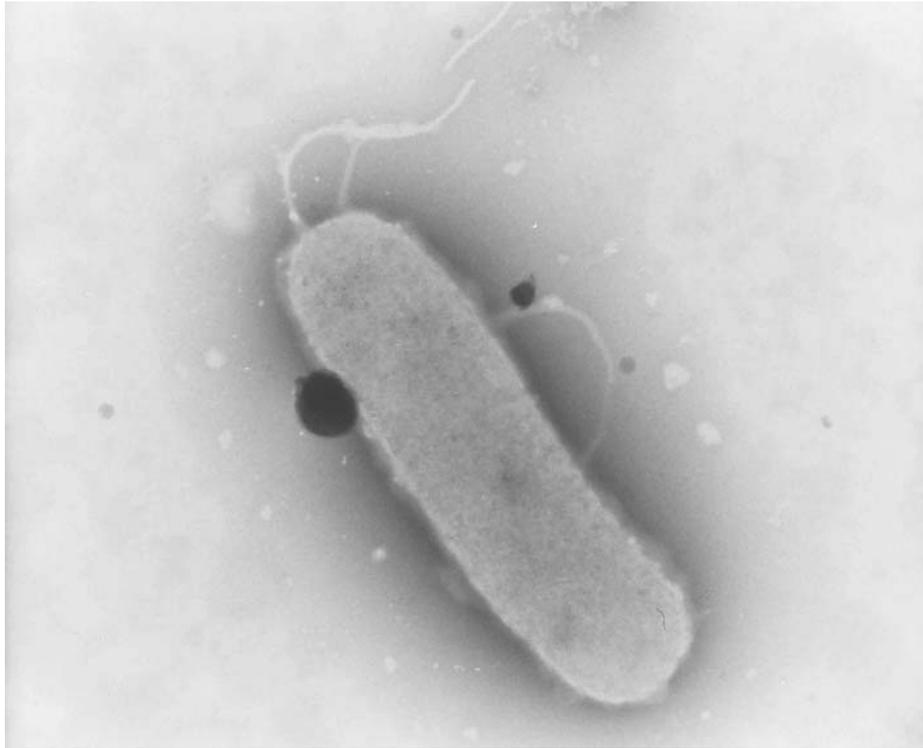


b)



**Figura 5.1.5.** Tinciones negativas observadas mediante microscopía electrónica de transmisión. a) biotipo NF24 (10.500 aumentos) y b) biotipo NF12 (5.100 aumentos).

a)



b)



**Figura 5.1.6.** Tinciones negativas observadas mediante microscopía electrónica de transmisión del biotipo NF12. a) 36.000 aumentos b) 18.000 aumentos.

Los biotipos NF12, NF22 y NF24 son microorganismos quimiorganotrofos que presentan un metabolismo oxidativo y fermentativo.

Las características fenotípicas de este grupo bacteriano se muestran en las tablas 5.1.3. Corresponden a microorganismos catalasa y oxidasa positivos, capaces de reducir los nitratos a nitritos pero sin capacidad de producción de gas a partir de nitritos.

NF12, NF22 y NF24 son capaces de crecer aneróticamente mediante la reducción de TAMAO (Trimetilamina N-óxido) y compuestos férricos, usando como donador de electrones el DL-lactato.

**Tabla 5.1.3.** Características bioquímicas de los biotipos bacterianos NF12, NF22 y NF24.

CARACTERÍSTICAS	NF12	NF22	NF24
Catalasa	+	+	+
Oxidasa	+	+	+
Reducción de nitratos	+	+	+
O/F	+/-	+/-	+/-
Indol	-	-	-
Producción de H <sub>2</sub> S	-	+	-
Voges-Proskauer	-	-	-
G+C (mol %)	42	41	42
<b>Hidrólisis de:</b>			
Esculina	+	+	+
Gelatina	+	+	-
Caseína	+	+	-
Tween 80	+	+	+
Almidón	-	-	-
Quitina	+	-	+

**Tabla 5.1.3.** Características bioquímicas de los biotipos bacterianos NF12, NF22 y NF24. (Continuación)

<b>Actividad enzimática:</b>	<b>NF12</b>	<b>NF22</b>	<b>NF24</b>
Arginina dihidrolasa	-	-	-
Ureasa	-	-	-
DNasa	-	-	-
Estearasa (C4)	+	+	+
Estearasa lipasa (C8)	+	+	+
Lipasa (C14)	+	-	+
Leucina arilamidasa	+	+	+
Cistina arilamidasa	+	+	+
Valina arilamidasa	+	+	+
Tripsina	-	-	-
$\alpha$ -Quimiotripsina	+	-	+
Fosfatasa ácida	+	+	+
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	+	+	+
$\beta$ -Glucoronidasa	-	-	-
$\alpha$ -Glucosidasa	+	+	+
$\beta$ -Glucosidasa	-	-	-
N-Acetil- $\beta$ -glucosaminidasa	-	-	-
$\alpha$ -Manosidasa	-	-	+
$\alpha$ -Fucosidasa	-	-	-
Lecitinasa	-	-	-
$\alpha$ -Galactosidasa	-	-	-
Ornitina descarboxilasa	-	-	-
Arginina descarboxilasa	-	-	-
Lisina descarboxilasa	-	-	-
Fosfatasa alcalina	+	+	+
$\beta$ -Galactosidasa	-	+	-

NF22 es el único biotipo capaz de producir sulfhídrico (SH<sub>2</sub>) a partir de tiosulfato. Todos los biotipos bacterianos hidrolizan la esculina y el tween 80, mientras que ninguno de ellos hidroliza el almidón. Respecto a la hidrólisis de otras macromoléculas hay variación según el biotipo como puede verse en la tabla 5.1.3. Ninguno de los aislamientos bacterianos antárticos estudiados presenta actividad hemolítica.

NF12, NF22 y NF24 presentan un O/F +/-, es decir, producen ácido a partir de la glucosa por la vía oxidativa, pero en este medio lo hacen de forma débil. La capacidad para utilizar la glucosa vía fermentativa se detectó en el medio MOF (Apartado 4.3.7.2). La fermentación de carbohidratos en este grupo bacteriano se manifiesta por una producción de ácido en el medio MOF sin observarse producción de gas. La tabla

5.1.4 muestra la producción de ácido vía oxidativa y vía fermentativa de los biotipos NF12, NF22 y NF24.

**Tabla 5.1.4.** Producción de ácido a partir de carbohidratos y utilización de fuentes de carbono por los aislamientos bacterianos NF12, NF22, NF24.

SUBSTRATOS	NF12	NF22	NF24
<b>Producción de ácido vía oxidativa:</b>			
D-Glucosa, maltosa, celobiosa	+	+	+
Sacarosa, D-manosa	-	-	+
Almidón	+	-	-
D-Manitol	+	-	+
D-Galactosa, D-xilosa	-	+	-
L-Arabinosa, fructosa, ramnosa, galactosa, sorbitol, glicerol, N-acetil-glucosamina, trealosa	-	-	-
<b>Producción de ácido vía fermentativa:</b>			
D-Glucosa, maltosa, celobiosa, sacarosa, D-manosa, D-manitol, D-galactosa, D-xilosa, N-acetil-glucosamina, trealosa	+	+	+
<b>Utilización de fuentes de carbono:</b>			
D-Glucosa, D-manosa, D-manitol, N-acetil-glucosamina, sacarosa, D-galactosa, maltosa, malonato, trealosa, succinato, celobiosa, D-xilosa	+	+	+
L-Arabinosa, D-arabinosa, gluconato, caprato, adipato, citrato, fenilacetato, salicina, D-melibiosa, L-fucosa, D-sorbitol, valerato, histidina, 2-ceto-gluconato, 4-hidroxibenzoato, $\alpha$ -L-ramnosa, itaconato, suberato, acetato, propionato, 5-ceto-gluconato, glucógeno, 3-hidroxibenzoato, DL-malato, $\alpha$ -lactosa, pimelato, D-fructosa, sebacetato, m-tartrato, DL-hidroxibutirato, L-fenilalanina	-	-	-
3-Hidroxibutirato, L-prolina, inositol, sacarosa, L-alanina, L-serina	-	-	+
D-Ribosa, DL-lactato	-	+	+
L-Glutamato	+	-	+

Las fuentes de carbono y energía utilizadas por los biotipos NF12, NF22 y NF24 se relacionan también en la tabla 5.1.4., siendo todos ellos capaces de utilizar los siguientes substratos: D-glucosa, maltosa, celobiosa, sacarosa, D-manosa, D-manitol, D-galactosa, D-xilosa, N-acetil-glucosamina, trealosa, malonato y succinato.

Los biotipos bacterianos NF12, NF22 y NF24 presentan una marcada sensibilidad frente a los antibióticos ensayados, como puede verse en la tabla 5.1.5.

**Tabla 5.1.5.** Sensibilidad frente a los antibióticos de los aislamientos antárticos NF12, NF22 y NF24.

ANTIBIÓTICO	NF12	NF22	NF24
Penicilina (10 U/disco)	+	+	+
Cloranfenicol (30 µg/disco)	+	+	+
Ácido Nalidíxico (30 µg/disco)	+	+	+
Tobramicina (10 µg/disco)	+	+	+
Tetraciclina (30 µg/disco)	+	+	+

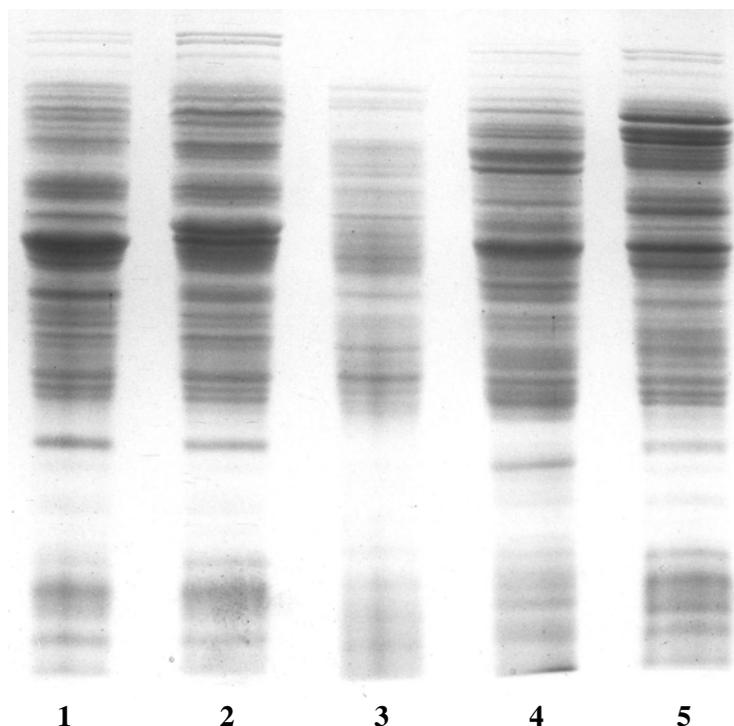
Los halos de sensibilidad correspondientes a cada antibiótico son los siguientes:

Penicilina  $\geq 22$  mm; Cloranfenicol  $\geq 18$  mm; Acido Nalidíxico  $\geq 19$  mm; Tobramicina  $\geq 15$  mm; Tetraciclina  $\geq 19$  mm. (+, sensible).

Este grupo bacteriano de bacilos psicrotrofos, Gram negativos, móviles mediante flagelación polar y catalasa positivos; capaces de crecer anaeróbicamente mediante reducción anaeróbica del hierro y del TAMAO o bien mediante la fermentación de carbohidratos y que presentan un contenido en G+C que oscila entre el 41 y 42 mol % (Tabla 5.1.3.), se sitúa a nivel del género *Shewanella*.

El perfil de proteínas totales de NF12, NF22 y NF24 ha sido comparado con dos especies de *Shewanella* (Figura 5.1.7). NF12 y NF24 son prácticamente idénticas y a su vez similares a *Shewanella algae* CECT 331 y *Shewanella baltica* CECT 323<sup>T</sup> respectivamente. El biotipo NF22, sin embargo, presenta marcadas diferencias respecto a los aislamientos NF12 y NF24 y también respecto a la especie tipo del género *Shewanella* utilizada.

**Fig. 5.1.7.** Perfil electroforético de las proteínas totales obtenido mediante SDS-PAGE, de NF24 (1), NF12 (2), NF22 (3), *Shewanella baltica* CECT 323<sup>T</sup> (4) y *Shewanella algae* CECT 331 (5).



La composición de los ácidos grasos de los aislamientos bacterianos antárticos NF12, NF22 y NF24, así como de *Shewanella algae* CECT 339 se muestran en la tabla 5.1.6.

En los tres biotipos el ácido graso más abundante es el palmitoleico (16:1  $\omega$ 7c). Los aislamientos NF12 y NF24 presentan un alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados (16:1  $\omega$ 7c, 17:1  $\omega$ 8c), seguido de ácidos grasos saturados de cadena ramificada (13:0 iso, 13:0 iso3OH, 15:0 iso) y en tercer lugar de ácidos grasos saturados no ramificados (16:0, 15:0 y 12:0). Sin embargo, NF22 presenta un alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados seguido de ácidos grasos saturados no ramificados y de ácidos grasos saturados ramificados.

La proporción de los ácidos grasos presentados por estos biotipos no varía sustancialmente según se desarrollen a 15 °C o a 8 °C (Tabla 5.1.6.). Cuando la temperatura es inferior aumenta la proporción del ácido graso mayoritario, el palmitoleico.

**Tabla 5.1.6.** Composición de ácidos grasos de los aislamientos bacterianos NF12, NF22, NF24 y de la cepa *Shewanella algae* CECT 331 <sup>a</sup>.

ÁCIDO GRASO	% de ácidos grasos						
	15°C			Temperatura ambiente	8°C		
	NF12 (n=5) <sup>b</sup>	NF22 <sup>T</sup> (n=4)	NF24 (n=6)	<i>S.algae</i> (n=6)	NF12 (n=2)	NF22 <sup>T</sup> (n=2)	NF24 (n=1)
12:0	3.5-7.7	3.5-5	3-4.4	1.5-1.9	4.8	4	3.16
11:0 3OH	tr <sup>c</sup>	tr	tr	tr-1.7	tr	tr	tr
13:0 iso	7.5-16.7	8.9-10.1	8.8-17	4.8-9	7.8-8.4	6.8-7.1	8.7
13:0	tr-4	1-1.8	tr-2.4	tr-2	1.7-2.6	1.6-2	tr
12:0 3OH	1.4-4.7	2.4-2.6	1.5-2.4	2.1-2.7	2-2.6	2.2	2.1
14:0 iso	tr-1.8	tr	tr-2	tr	tr	1	tr
14:0	2.3-4.6	2.4-3.6	3.8-4.9	tr	3.3	2.7	3.7
13:0 iso 3OH	4.5-12	3.6-4.2	5.2-7	4.9-6.7	4.8-6.1	3.4	5.7
15:0 iso	6.7-9.1	7.6-10.3	8.4-10.7	17.3-28.8	5.6-6.6	5.9-6.7	10.6
15:1 ω8c	tr-2.6	tr-1.1	tr-1.4	tr	1.5-2.1	1.3-1.7	tr
15:1 ω6c	tr-2.5	tr	tr-1.4	tr	1.6-2	1.7	1
15:0	2.2-8.8	5.3-5.7	2.4-7	2.2-3.5	4.9-7.2	5.8-7.1	2.6
16:1 ω9c	1.1-1.9	tr	1.1-1.4	tr	1.2	tr	1
16:1 ω7c	24.9-35.1	23.7-24.8	23.9-36.6	6.7-12.8	32.3	27.2-28.4	36.6
16:0	4-9.1	9.7-11.4	5.4-13.4	3.7-6.3	6.4	6.7-6.9	7.1
15:0 iso 3OH	tr	tr	tr	tr-1.2	tr	tr	tr
17:0 iso	tr	tr	tr	2.5-4.4	tr	tr	tr
17:1 ω8c	2.6-6.4	6.9-8.4	2.8-6.4	14.7-20.5	6.9-7.5	10.7-11.5	4.7
17:1 ω6c	tr-1.2	1-1.3	tr	tr-1	1.2	2-2.2	1
17:0	tr	1.8-2.3	tr	3.5-4.4	tr	1.7	tr
18:1 ω9c	tr-2	1.2-1.6	tr-1.8	2.3-4.6	tr	tr-1	1.5
18:0	tr-2.1	tr	tr-1.1	tr	tr	tr	tr
summed feature 1 <sup>d</sup>	tr	0-tr	tr				tr
summed feature 2 <sup>e</sup>	tr-1.3	1.3-1.4	tr-1	2.2-3.9	1.1	1.4	tr
summed feature 3 <sup>f</sup>	tr-2.4	1.3-1.5	tr-1	1-1.2	tr	tr	tr
summed feature 7 <sup>g</sup>	tr-4.7	3.7-4.7	tr-4.1	3.7-6	2.5-3.6	4-4.8	
summed feature 8 <sup>h</sup>				tr			
summed feature 9 <sup>i</sup>	tr	0-tr	tr				

<sup>a</sup> En las cepas estudiadas se han encontrado también pequeñas cantidades (menos de un 3 % de los ácidos grasos totales) de uno o más de los siguientes ácidos grasos: 9:0, 10:0 iso, 11:0, 10:0 3OH, unknown 11.798, 12:0 iso, 11:0 iso 3OH, unknown 12.487, 13:1 AT 12-13, 12:0 iso 3OH, 12:1 3OH, 15:1 iso, 15:0 anteiso, 14:0 iso 3OH, 16: iso, 16:1 ω5c, iso 17:1 ω9c, 15:0 3OH, 17:0 anteiso, 18:0 iso, 18:1 ω5c, 19:0 iso, 19:0 10 methyl y 20:0 iso.

<sup>b</sup> n, número de cepas examinadas.

<sup>c</sup> tr, trazas.

<sup>d</sup> Summed feature 1, los ácidos grasos 14:1 ω5c y 14:1 ω5t no pueden separarse mediante cromatografía de gases al utilizar el sistema MIS y juntos corresponden a summed feature 1.

<sup>e</sup> Summed feature 2, 13:0 3OH, 15:1 iso H y 15:1 iso I (no separados mediante el sistema MIS).

<sup>f</sup> Summed feature 3, unknown 10-928, 14:0 3OH y 16:1 iso I (no separados mediante el sistema MIS).

<sup>g</sup> Summed feature 7, 18:1 ω7c, 18:1 ω9t y 18:1 ω12t (no separados mediante el sistema MIS).

<sup>h</sup> Summed feature 8, 19:1 y unknown 18-756 (no separados mediante el sistema MIS).

<sup>i</sup> Summed feature 9, unknown 18-846 y 18-858 (no separados mediante el sistema MIS).

El perfil de ácidos grasos de este grupo bacteriano se sitúa a nivel del género *Shewanella*. En el caso de los biotipos bacterianos NF12 y NF24 la distribución de los ácidos grasos monoinsaturados y saturados (ramificados y no ramificados) se corresponde con la encontrada en las especies *Shewanella algae*, *Shewanella amazonensis*, *Shewanella gelidimarina* y *Shewanella oneidensis*. En cambio, la distribución presentada por el biotipo NF22 sería coincidente con la de las especies *Shewanella frigidimarina*, *Shewanella benthica*, *Shewanella hanedai* y *Shewanella putrefaciens* (Venkateswaran y col., 1999).

**Tabla 5.1.7.** Composición de quinonas isoprenoides de los aislamientos bacterianos antárticos NF12, NF22 y NF24 y otras especies de *Shewanella*.

CEPA	COMPOSICIÓN DE QUINONAS (%)						
	Q-6	Q-7	Q-8	Q-9	MK-7	MK-8	MMK-7
<i>Shewanella algae</i> CECT 331	tr <sup>a</sup>	9.4	36.6	tr	47.8	1.2	4
<i>Shewanella baltica</i> CECT 323 <sup>T</sup>	tr	63.8	11	-	tr	-	23.3
NF12	1	44.4	17	-	35.7	tr	1
NF22 <sup>T</sup>	tr	7.4	3.9	-	83.7	1	3.2
NF24	1.5	18	1.7	-	76.7	tr	1.7

tr<sup>a</sup>, trazas (< 1%) ; Q-6, Q-7, Q-8, y Q-9 corresponden a ubiquinonas con seis, siete, ocho y nueve unidades de isopreno respectivamente; MK-7 y MK-8, menaquinonas con siete y ocho unidades de isopreno; MMK-7, metilmenaquinona con siete unidades de isopreno.

El estudio de la composición de quinonas en los aislamientos bacterianos NF12, NF22 y NF24 mostró la presencia de ubiquinonas, menaquinonas y pequeñas cantidades de metil-menaquinonas (Tabla 5.1.7.). La coexistencia de ubiquinonas y menaquinonas confirmaría también la ubicación de estos aislamientos bacterianos en el género *Shewanella*.

Los niveles de homología DNA-DNA entre los aislamientos NF12, NF22, NF24 y diversas especies del género *Shewanella* se muestran en la tabla 5.1.8. Los biotipos NF12 y NF24 presentan entre ellos una homología del 88 %. El porcentaje de similitud más elevado encontrado para estos dos aislamientos bacterianos, respecto de una especie del género *Shewanella* conocida, fue con *S. frigidimarina* LMG19475<sup>T</sup>,

presentando valores del 70 y 74 %, valores que sitúan a NF12 y NF24 a nivel de la misma especie (Wayne y col., 1987; Stackebrand y Goebel, 1994). El porcentaje de homología DNA-DNA presentado por NF22 respecto NF12 y NF24 fue bastante bajo, del orden del 38 y 32 % respectivamente. Así mismo, NF12 presenta niveles de similitud bajos respecto *S. frigidimarina* LMG19475<sup>T</sup>, del orden del 24 %. Los niveles de similitud presentados entre NF12, NF22 y NF24 y otras especies tipo ensayadas oscilan entre el 6 y el 20 %.

**Tabla 5.1.8.** Niveles de homología DNA-DNA entre NF12, NF22 y NF24 y otras especies próximas.

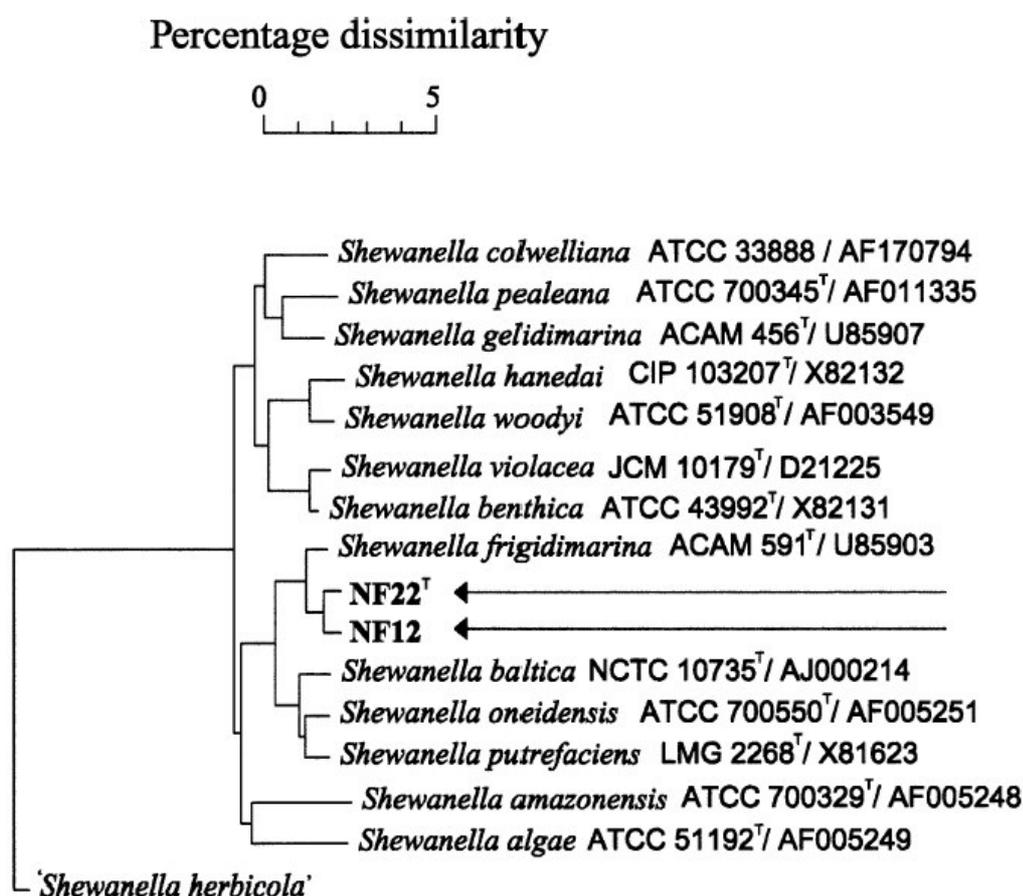
CEPAS	PORCENTAJE DE HOMOLOGÍA DNA-DNA					
	<i>Shewanella hanedai</i> CECT 5017 <sup>T</sup>	<i>Shewanella frigidimarina</i> LMG 19475 <sup>T</sup>	<i>Shewanella algae</i> CECT 331	NF12	NF22 <sup>T</sup>	NF24
<i>Shewanella putrefaciens</i> LMG 2268 <sup>T</sup>				11	7	12
<i>Shewanella putrefaciens</i> LMG 2369				14	15	
<i>Shewanella hanedai</i> CECT 5017 <sup>T</sup>	100					
<i>Shewanella frigidimarina</i> LMG 19475 <sup>T</sup>		100		74		70
<i>Shewanella baltica</i> LMG 2250 <sup>T</sup>				20	11	
<i>Shewanella algae</i> CECT 331			100			
<i>Shewanella algae</i> LMG 2265				8	14	
NF12	10		12	100		
NF22 <sup>T</sup>	13	24	6	38	100	32
NF24	14		13	88		100

Mediante los estudios filogenéticos del rRNA 16S se encontraron similitudes respecto a la especie tipo *S. frigidimarina* LMG19475<sup>T</sup> del 98.7 % para NF12 y del 98.9 % para NF22. A su vez, la similitud encontrada entre NF12 y NF22 a este nivel fue del 99.5 %. El árbol filogenético resultante de los análisis de las secuencias del rRNA 16S confirma que NF12 y NF22 pertenecen al género *Shewanella*.

Los análisis de hibridación DNA-DNA y los análisis filogenéticos del rRNA 16S muestran que NF12 y NF24 son una misma especie que se ubica a nivel de *S. frigidimarina*. En cambio, NF22 corresponde a una especie distinta que encuentra

su mayor similitud con *S. frigidimarina* atendiendo a los análisis de rRNA 16S, pero que presenta un nivel de homología DNA-DNA muy bajo respecto a esta especie bacteriana. El biotipo NF22 quedaría situado en el género *Shewanella* pero en una posición separada de las especies conocidas en el año 2000 cuando se realizaron los análisis filogenéticos.

**Fig. 5.1.8.** Árbol filogenético resultante de los análisis de las secuencias del rRNA 16S, donde se muestran las posiciones de los aislamientos antárticos NF12 y NF22 respecto a las especies relacionadas. Los números de acceso de la librería EMBL de las cepas NF12 y NF22 son respectivamente AJ300833 y AJ300834.



**Tabla 5.1.9.** Denominaciones de las cepas utilizadas en el estudio del grupo bacteriano NF12, NF22 y NF24.

<b>CEPAS</b>	<b>OTRAS DESIGNACIONES</b>	<b>PROCEDENCIA</b>
<i>Shewanella algae</i> CECT 331		CECT
<i>Shewanella algae</i> LMG 2265		LMG
<i>Shewanella baltica</i> CECT 323 <sup>T</sup>	LMG2250 <sup>T</sup> , NCTC 10735	CECT
<i>Shewanella frigidimarina</i> LMG 19475 <sup>T</sup>	ACAM 591 <sup>T</sup>	LMG
<i>Shewanella hanedai</i> CECT 5017 <sup>T</sup>	ATCC 33224 <sup>T</sup>	CECT
<i>Shewanella putrefaciens</i> LMG 2268 <sup>T</sup>	ATCC 8071 <sup>T</sup>	LMG
<i>Shewanella putrefaciens</i> LMG 2369		LMG
<b>NF12</b>	LMG 19867, CECT 5932	Lodo glaciar, Admiralty Bay, Antártida
<b>NF22<sup>T</sup></b>	LMG 19866 <sup>T</sup> , CECT 5933 <sup>T</sup>	Agua, Johnson's Dock, Antártida
<b>NF24</b>	LMG 19868, CECT 5934	Sedimentos, Johnson's Dock, Antártida

ACAM, Colección Australiana de Microorganismos de la Antártida.

ATCC, Colección Americana de Cultivos Tipo.

CECT, Colección Española de Cultivos Tipo.

LMG, BCCM/LMB, Colección de Bacterias del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Ghent, Bélgica.

NCTC, Colección Nacional de Cultivos Tipo. Reino Unido.

## **5.2. CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DEL GRUPO DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS ANTÁRTICOS PERTENECIENTES AL GÉNERO *Psychrobacter*.**

El grupo de aislamientos bacterianos NF1, NF7, NF8, NF11, NF18, NF19, NF20, NF23, EN1, EN2 y EN4 procede de muestras tomadas en distintos puntos de las islas Shetland del Sur. Concretamente los biotipos NF1, NF7, NF8 y NF11 fueron aislados de un lodo glaciar de Inlet Admiralty Bay (Isla del Rey Jorge). Los restantes biotipos, excepto NF23, proceden de sedimentos de Johnson's Dock (Isla de Livingston), mientras que NF23 procede de un filtrado de 25 L de agua de la misma cala.

Este grupo bacteriano corresponde a microorganismos de morfología cocobacilar, Gram negativos, capsulados, no esporulados e inmóviles. Se caracterizan por formar colonias circulares en TSA, no pigmentadas, que en el caso de NF1, NF7, NF8, NF23, EN1, EN2 y EN4 son brillantes, convexas, de contorno perfectamente definido y de 2-4 mm de diámetro aproximadamente, mientras que los aislamientos NF11, NF18, NF19 y NF20 forman colonias opacas que se extienden de forma irregular sobre el medio de cultivo, pero de dimensiones similares.

En general, cuando se desarrollan en medios líquidos como el TSB pueden observarse simultáneamente al microscopio de contraste de fases diplococos y diplobacilos. Con el tiempo de incubación aumentan las formas bacilares largas que incluso llegan a ser algo deformes. En cambio, cuando se desarrollan en medios sólidos puede observarse un predominio de formas cocáceas.

En la tabla 5.2.1. se resumen las características morfológicas de este grupo bacteriano.

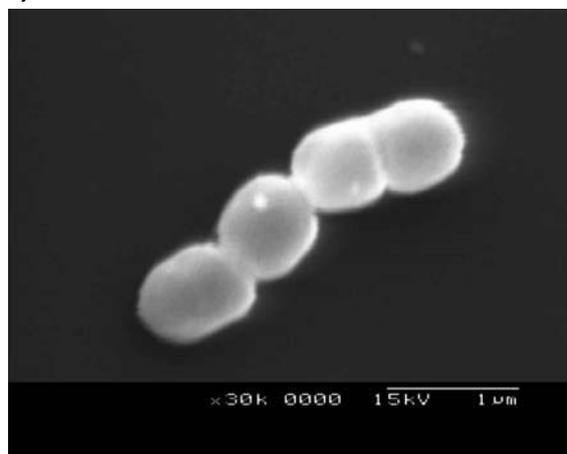
Mediante microscopía electrónica de barrido se han calculado las dimensiones celulares que oscilan entre 0.4-1.8  $\mu\text{m}$  de largo por 0.4-0.8  $\mu\text{m}$  de ancho. El aspecto cocobacilar que presentan algunos de los aislamientos a las 24 horas puede observarse en las micrografías electrónicas que se presentan a continuación (Figuras 5.2.1. a 5.2.4.).

**Tabla 5.2.1.** Características morfológicas de los aislamientos antárticos cocobacilares.

CARACTERÍSTICAS	NF1	NF7	NF8	NF11	NF18	NF19	NF20	EN1	EN2	EN4	NF23
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Morfología	cb <sup>a</sup>	cb	cb	cb	cb	cb	cb	cb	cb	cb	cb
Longitud celular (μm)	1	0.8- 1.2	0.7-1	0.4-1.8	0.8-1.2	0.8-1.1	0.8-2.7	1.2	1.0	1.5	0.9-1.6
Diámetro celular (μm)	0.6	0.6-0.7	0.6	0.4-0.6	0.5-0.6	0.5-0.6	0.8	0.8	0.5	1.2	0.7-0.9
Movilidad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coloración colonias	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Presencia cápsula	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

<sup>a</sup> cb, cocobacilar

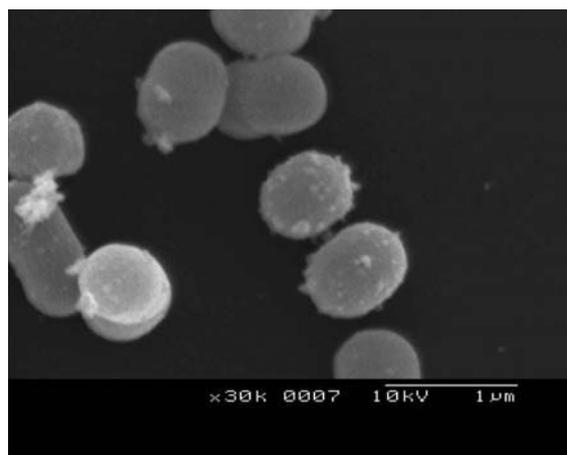
a)



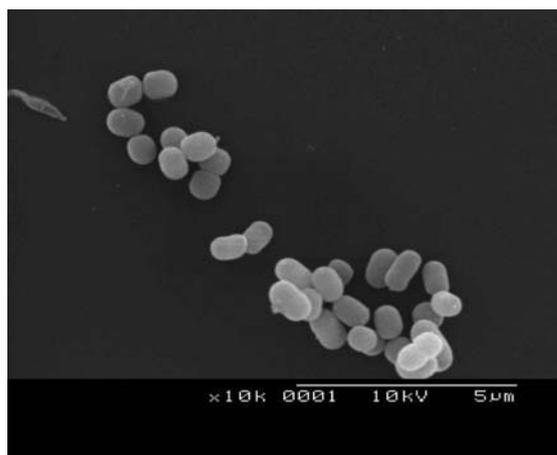
b)



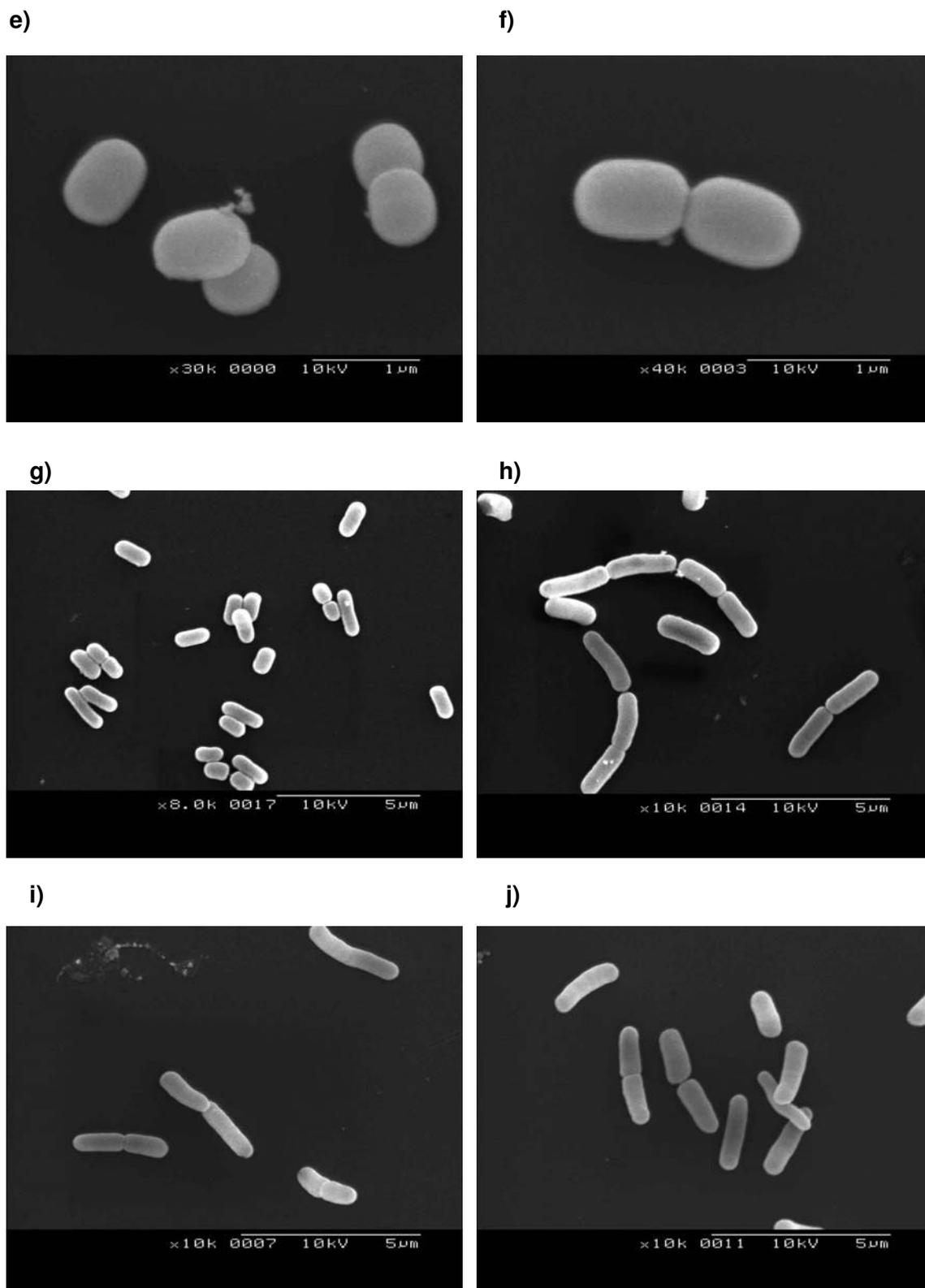
c)



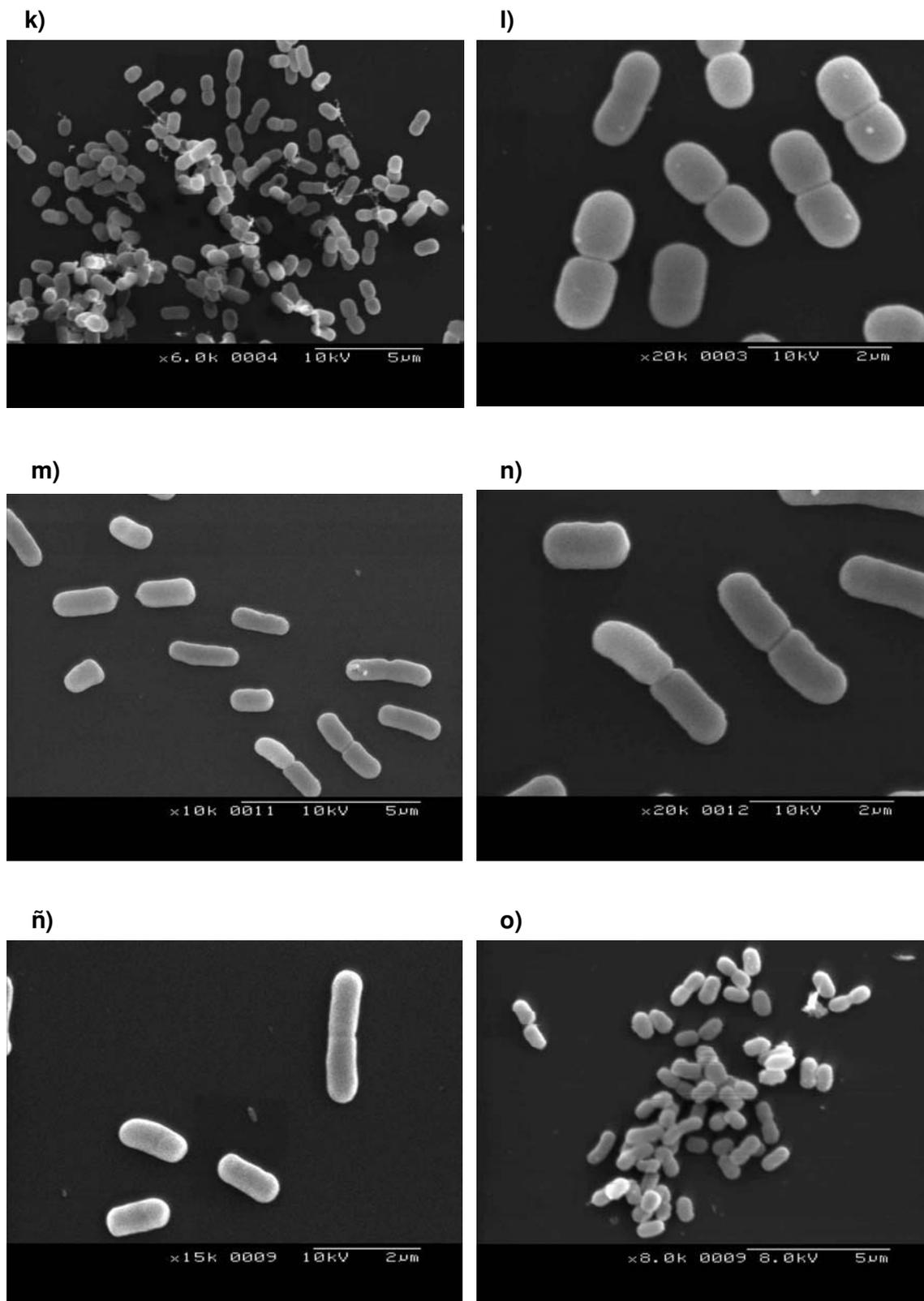
d)



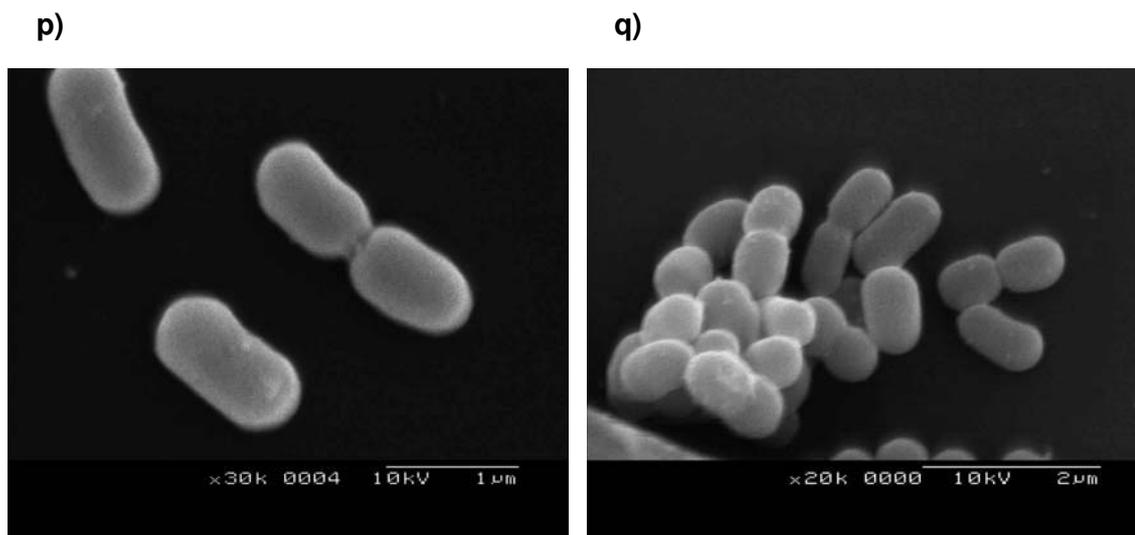
**Figura 5.2.1.** Micrografías electrónicas de barrido de los aislamientos bacterianos desarrollados en TSB durante 24 h a 15 °C y 150 rpm. a) NF1, b) y c) NF8, d) NF11.



**Figura 5.2.2.** Micrografías electrónicas de barrido de los aislamientos bacterianos desarrollados en TSB durante 24 h a 15 °C y 150 rpm. e) y f) NF11, g) NF18, h) NF19, i) y j) NF20.



**Figura 5.2.3.** Micrografías electrónicas de barrido de los aislamientos bacterianos desarrollados en TSB durante 24 h a 15 °C y 150 rpm. k) y l) NF23, m) EN1, n) y ñ) EN2, o) EN4.



**Figura 5.2.4.** Micrografías electrónicas de barrido del aislamiento bacteriano EN4 desarrollado en TSB durante 24 h a 15 °C y 150 rpm.

Todas las cepas son moderadamente halófilas y toleran una concentración de NaCl que oscila entre el 9.5 y 12.5 % según el aislamiento. Únicamente los biotipos bacterianos NF1 y EN4 requieren ión Na<sup>+</sup> para su desarrollo en una concentración del orden de 17 mM (0.1 % NaCl (p/v)). En la tabla 5.2.2. se indican las características de crecimiento de este grupo bacteriano.

**Tabla 5.2.2.** Características de crecimiento de los aislamientos bacterianos antárticos cocobacilares.

CARACTERÍSTICAS	NF1	NF7	NF8	NF11	NF18	NF19	NF20	EN1	EN2	EN4	NF23
Rango de T <sup>º</sup> de crecimiento (°C)	4-25	4-30	4-30	4-30	4-30	4-30	4-25	4-30	4-30	4-30	4-30
Tolerancia NaCl % (p/v)	12.5	12.5	12.5	9.5	12.5	12.5	12.5	10	10	10	12.5
Requerimiento de Na <sup>+</sup>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Rango de tolerancia pH	6-9.5	6-9.5	6-9.5	6-9.5	6-9.5	6-9.5	6-9.5	6-9.5	6-9.5	6-9.5	6-9.5
Tolerancia 5% sales biliares	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Todos los biotipos bacterianos toleran un rango de pH comprendido entre 6 y 9.5. El rango de temperatura de crecimiento es mayoritariamente de 4 a 30 °C, excepto para los aislamientos NF1 y NF20 que crecen únicamente hasta 25 °C. Ninguno de los aislamientos fue capaz de soportar un 5 % de sales biliares.

**Tabla 5.2.3.** Características bioquímicas y fisiológicas del grupo de aislamientos bacterianos antárticos cocobacilares.

CARACTERÍSTICAS	NF1	NF7	NF8	NF11	NF18	NF19	NF20	EN1	EN2	EN4	NF23
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reducción de nitratos	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
O/F	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ureasa	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Fenilalanina desaminasa	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Triptófano desaminasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Hidrólisis de:</b>											
Lecitina	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Caseína	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Tween 80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Almidón	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DNA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Caracteres quimiotaenómicos</b>											
L-Alanina aminopeptidasa	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
KDO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LPS	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND	+
G+C (mol %)	46	45	45	45	45	45	47	46	46	46	44

Entre las características fenotípicas comunes a todos los aislamientos de esta agrupación tenemos que son oxidasa y catalasa positivos, presentando un metabolismo estrictamente oxidativo. Excepto NF11, todos los biotipos son ureasa positivos y ninguno de ellos presenta la triptófano desaminasa. Las características fenotípicas de este grupo bacteriano se muestran en la tabla 5.2.3.

Todos los aislamientos bacterianos, excepto EN1 y EN2, presentan un O/F (-/-) cuando la glucosa es el sustrato carbonado. Concretamente EN1 y EN2 son capaces de producir ácido de forma oxidativa a partir de diversos azúcares en un medio mineral adecuado (Apartado 4.3.7.2), mientras que el resto de aislamientos bacterianos son incapaces de oxidar ningún carbohidrato (Tabla 5.2.4.).

Ninguno de los aislamientos de este grupo bacteriano de cocobacilos es capaz de hidrolizar la gelatina, el almidón, la esculina o el DNA (Tabla 5.2.3.). EN4 y NF23 no son capaces de hidrolizar ninguna de las macromoléculas ensayadas mientras que el resto de biotipos hidrolizan la caseína y el tween 80. En cuanto a la lecitina hay cierta variabilidad.

Solamente los biotipos bacterianos NF11, NF18, NF19 y NF20 son capaces de reducir los nitratos a nitritos. NF1, NF8, NF11, NF18 y NF19 presentan la fenilalanina desaminasa. Ninguna de las cepas bacterianas es productora de indol.

La actividad enzimática, la utilización de fuentes de carbono y la sensibilidad frente a agentes antimicrobianos en este grupo de aislamientos bacterianos antárticos se relaciona en las tablas 5.2.5, 5.2.6 y 5.2.7.

Debido a la resistencia que presenta este grupo de aislamientos bacterianos frente a la decoloración del cristal violeta en la tinción de Gram, se procedió al estudio de marcadores de membrana externa para confirmar o descartar el carácter Gram negativo de estas bacterias. En este sentido, se estudió la presencia de L-alanina aminopeptidasa, de ácido 2-ceto-3-deoxioctanoico (KDO) y de lipopolisacárido (LPS). Los resultados obtenidos se expresan en la tabla 5.2.3.



**Tabla 5.2.6.** Utilización de diferentes sustratos como única fuente de carbono y energía en el grupo de aislamientos antárticos cocobacilares.

FUENTE CARBONO	NF1	NF7	NF8	NF11	NF18	NF19	NF20	EN1	EN2	EN4	NF23
L-Histidina, tween 80, ácido L-málico, succinato sódico, L-hidroxiprolina, L-arginina, L-glutamina, DL-fenilalanina.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructosa, ácido D-glucónico, L-fenilalanina, ácido D-glucurónico, glicina, ácido fenilacético, ácido 5-aminovalérico, D-sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiosa, L-arabinosa, D-arabinosa, D-manosa, D-galactosa, D-glucosa, D-xilosa, D-trealosa, D-melibiose, sacarosa, <i>myo</i> -inositol, maltosa, tartrato sódico.	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
D-Rafinosa	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
$\alpha$ -L-Ramnosa, $\alpha$ -lactosa	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
D-Manitol	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
Levulosa	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Ác. adípico, glicerol	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
Etanol, L-alanina	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Putrescina	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Prolina	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Serina	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Ácido subérico	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetato sódico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
L-Ornitina	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
Citrato sódico	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
D-Alanina	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
1-Butanol	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
L-Asparagina	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Piruvato sódico	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Ácido propiónico	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+

Todas las bacterias presentaron KDO. La presencia de L-alanina aminopeptidasa se detectó en todos los aislamientos excepto en NF7 y NF8. La extracción de LPS y la correspondiente separación electroforética en los aislamientos denominados NF dio

como resultado la presencia de una membrana externa como ocurre en las bacterias Gram negativas, pero prácticamente desnuda de fracciones antigénicas.

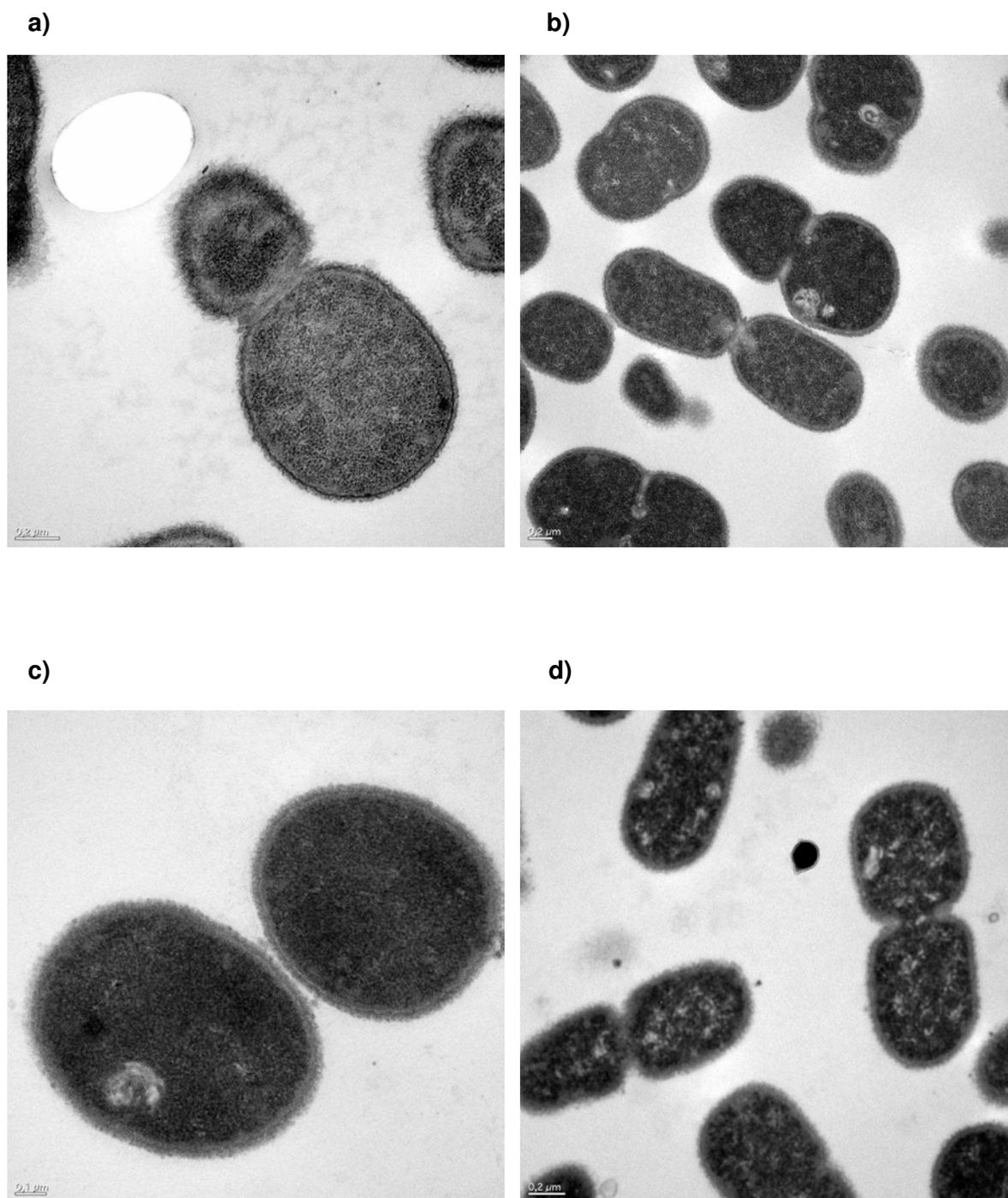
La presencia de una estructura de pared celular Gram negativa en este grupo bacteriano cocobacilar también se demostró mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 5.2.5. a 5.2.8.), pudiéndose detectar la presencia de una membrana externa.

**Tabla 5.2.7.** Susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos bacterianos antárticos cocobacilares.

ANTIBIÓTICO	NF1	NF7	NF8	NF11	NF18	NF19	NF20	EN1	EN2	EN4	NF23
Penicilina (10 U/disco)	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Gentamicina (10 µg/disco)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+	ND
Cloranfenicol (30 µg/disco)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Estreptomycin(10 µg/disco)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+	ND
Carbenicilina (100 µg/disco)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	-	ND
Cefamandol (30 µg/disco)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+	ND
Colistina (10 µg/disco)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+	ND
Polimixina B (300 U/disco)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+	ND
Tobramicina (10 µg/disco)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ác. Nalidíxico (30 µg/disco)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tetraciclina (30 µg/disco)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Furazolidona (50 µg/disco)	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-

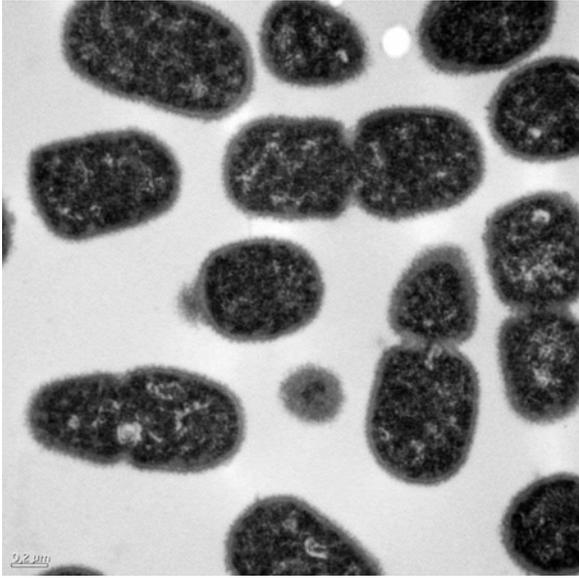
ND, no determinado; +, sensible.

Si se atiende a las características fundamentales de este grupo de aislamientos bacterianos de morfología cocobacilar, Gram negativos, oxidasa positivos, inmóviles, capaces de desarrollarse a 4 °C, con una halotolerancia elevada, de metabolismo estrictamente oxidativo y que presentan un contenido en G+C oscilando entre 44 y 47 mol % (Tabla 5.2.3.), podemos situarlos a nivel del género *Psychrobacter*.

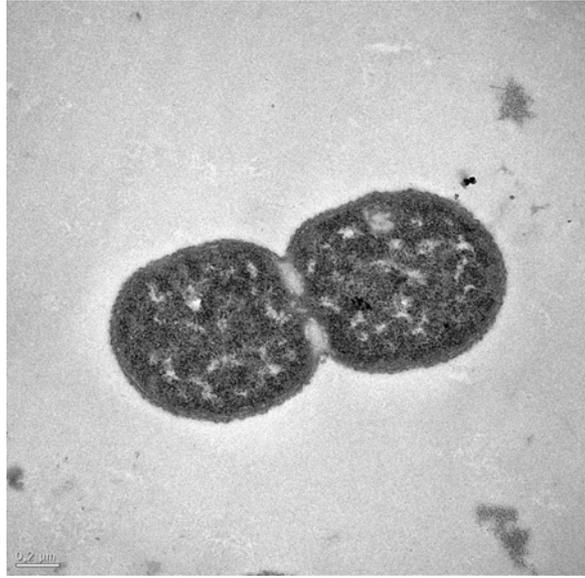


**Figura 5.2.5.** Micrografías electrónicas de transmisión de los aislamientos bacterianos desarrollados en TSB durante 24 h a 15 °C y 150 rpm. a) NF1, b) NF7, c) NF8, d) NF11

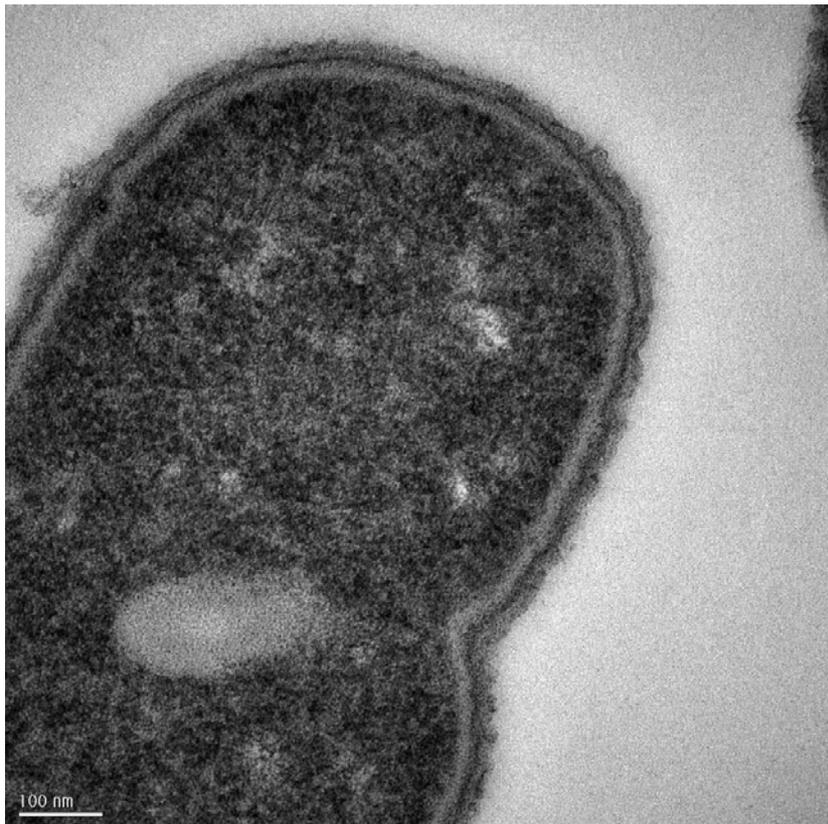
e)



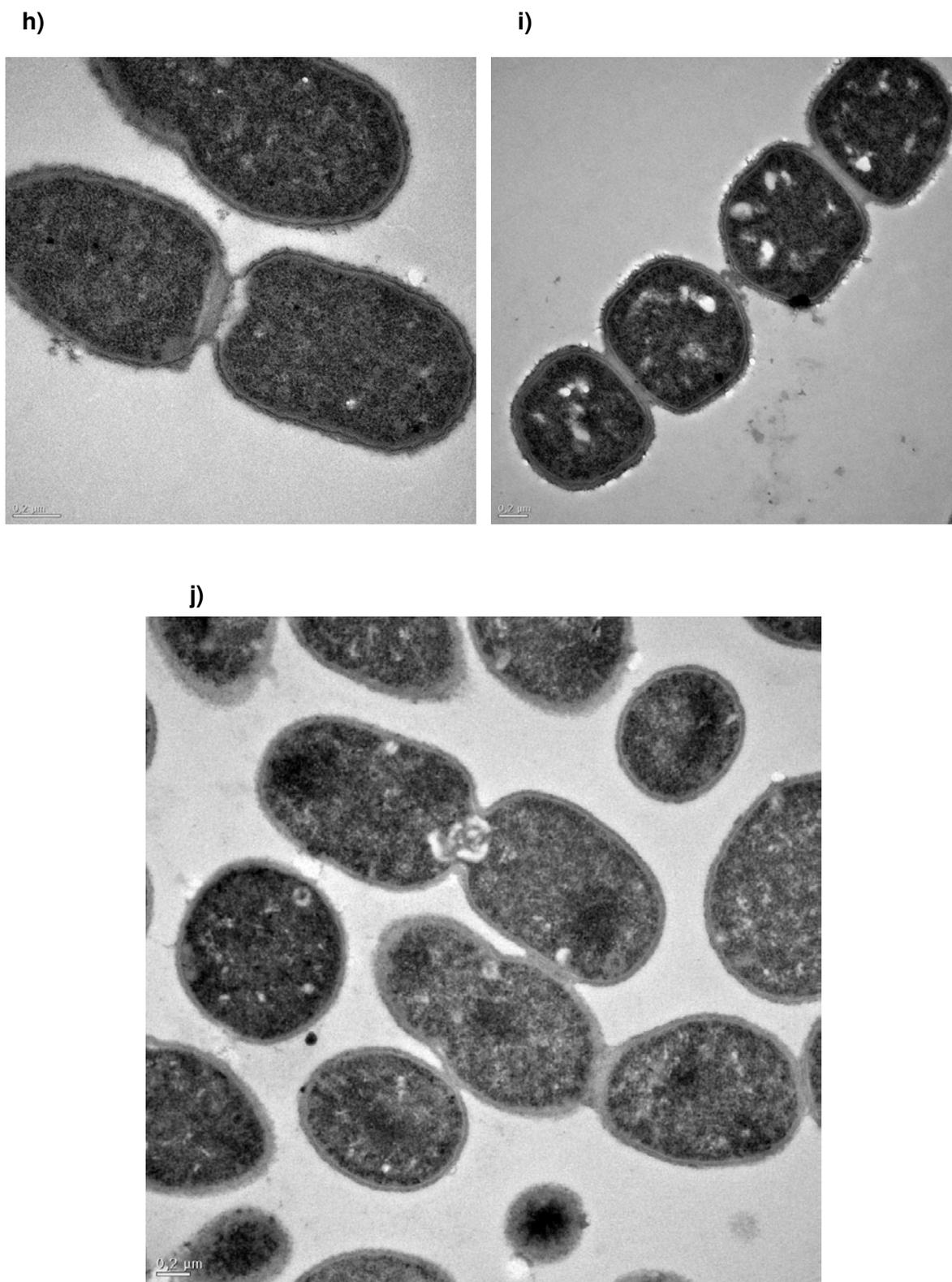
f)



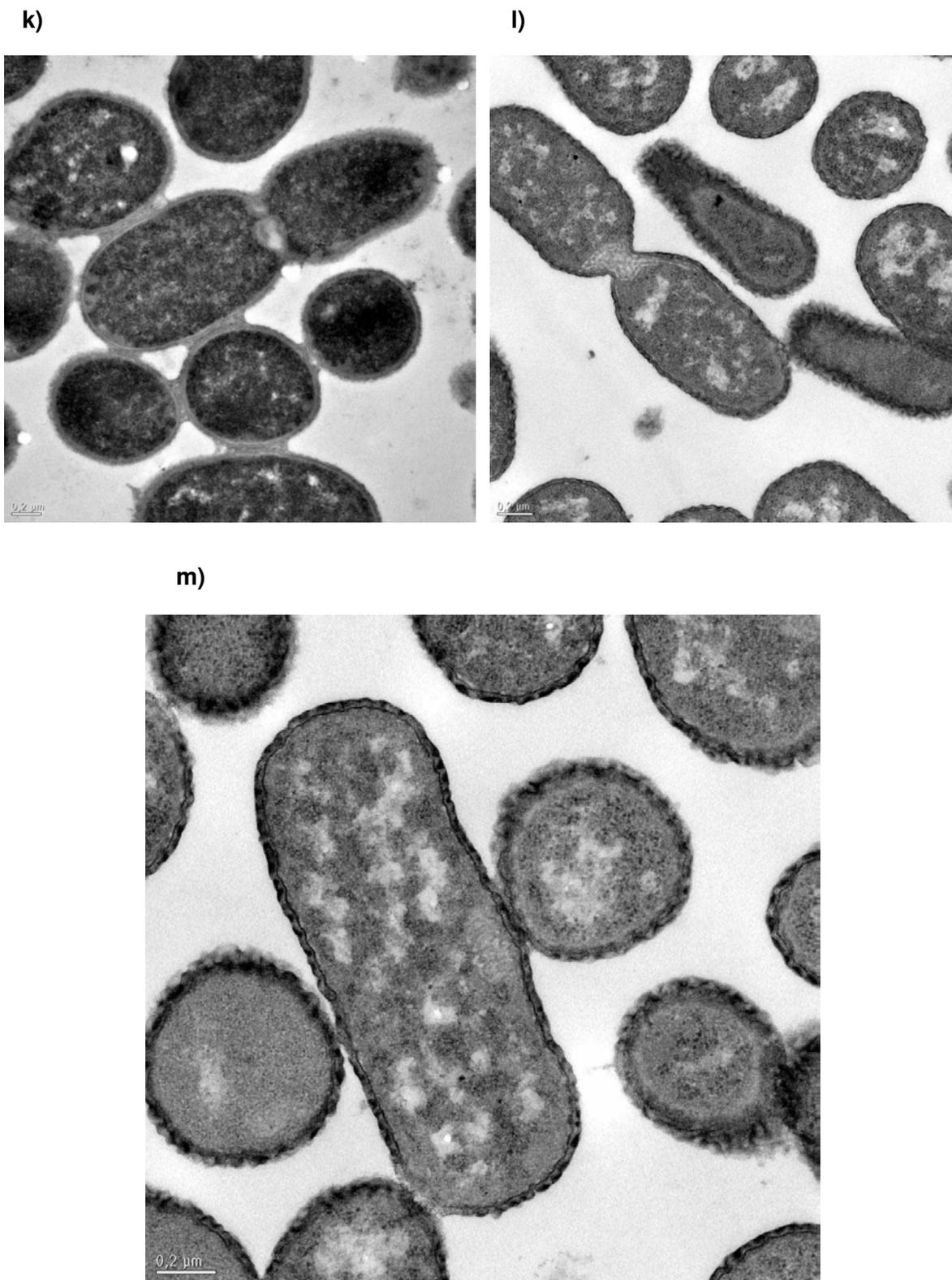
g)



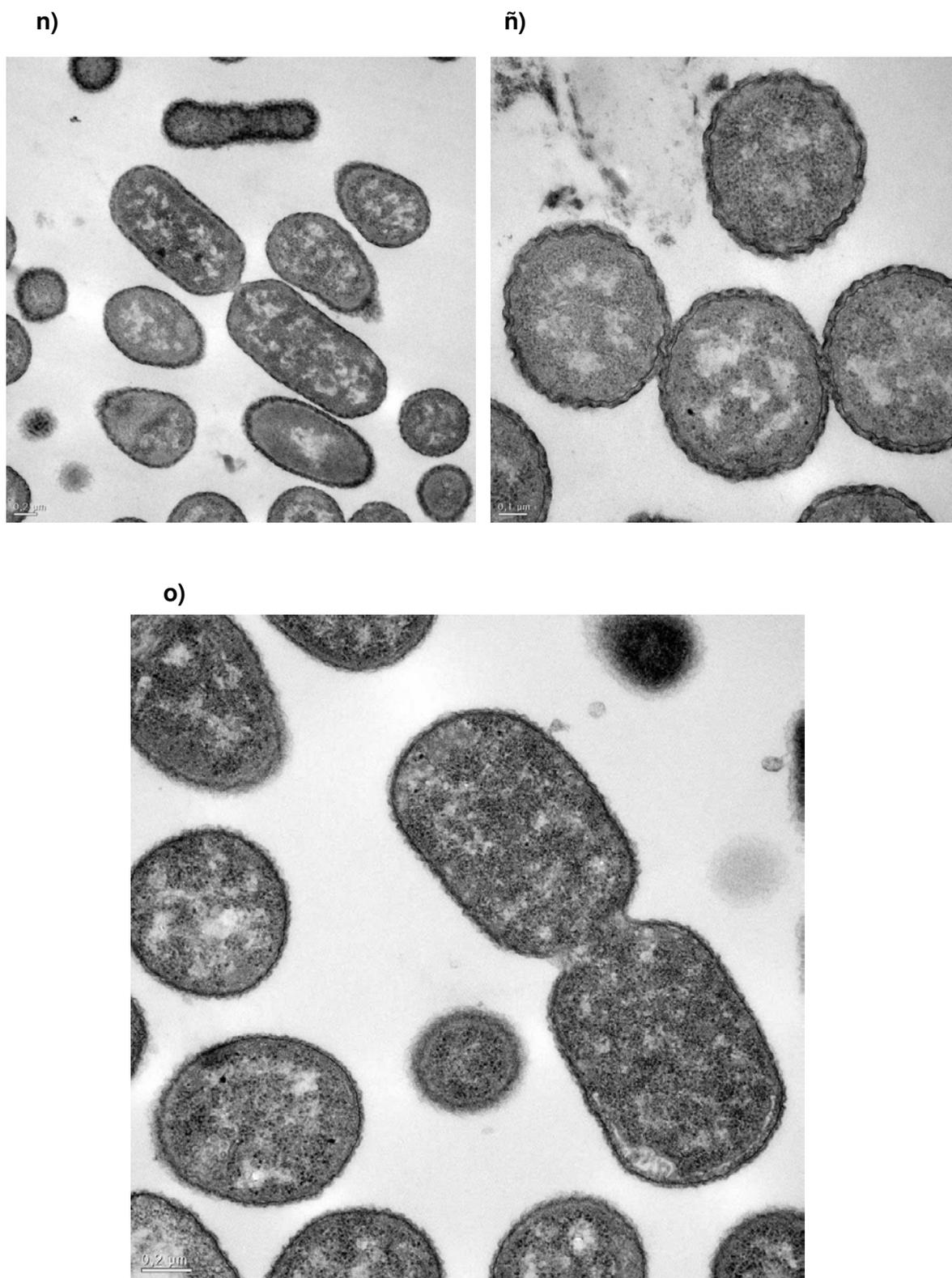
**Figura 5.2.6.** Micrografías electrónicas de transmisión de los aislamientos bacterianos desarrollados en TSB durante 24 h a 15 °C y 150 rpm. e) NF11, f) NF19, g) NF18.



**Figura 5.2.7.** Micrografías electrónicas de transmisión de los aislamientos bacterianos desarrollados en TSB durante 24 h y 150 rpm. h) NF18, i) NF20, j) NF23.

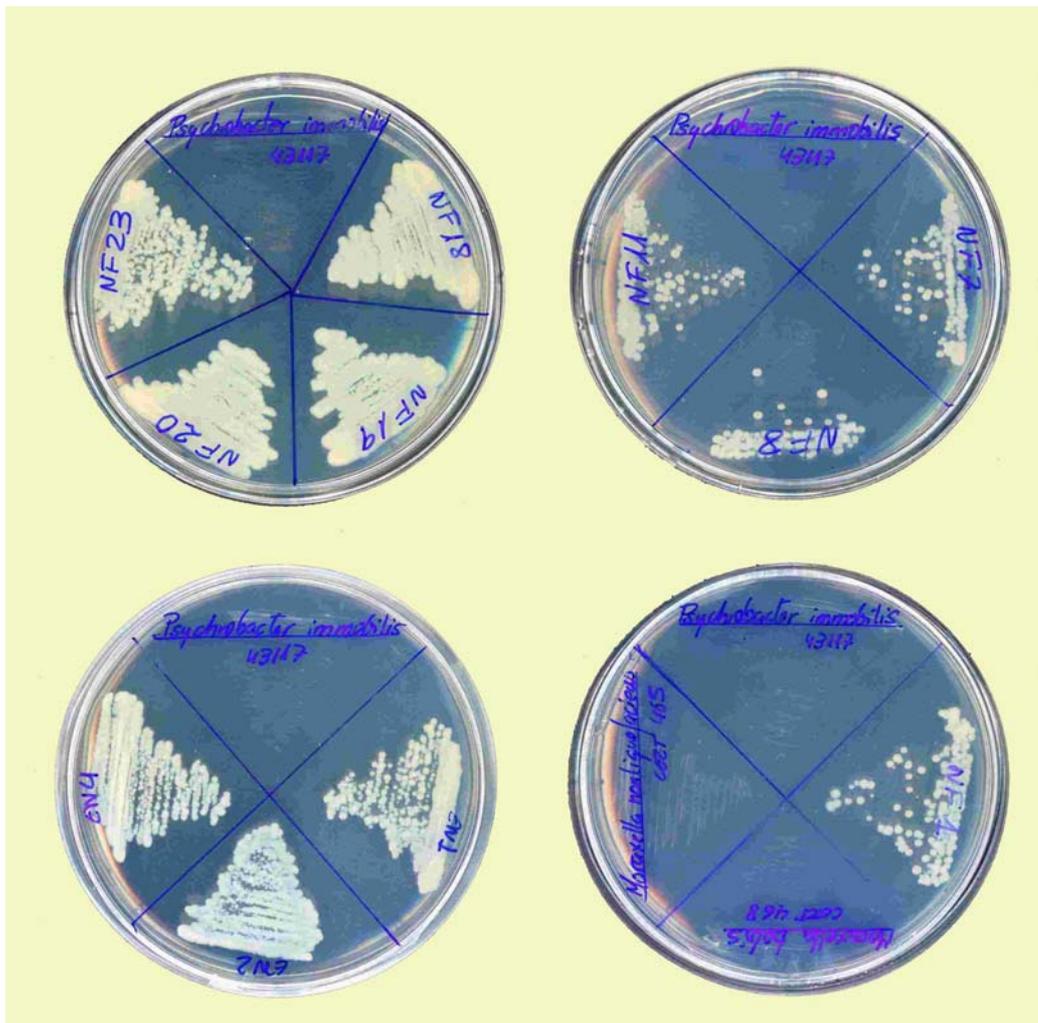


**Figura 5.2.8.** Micrografías electrónicas de transmisión de los aislamientos bacterianos desarrollados en TSB durante 24 h y 150 rpm. k) NF23, l) y m) EN1.



**Figura 5.2.8.** Micrografías electrónicas de transmisión de los aislamientos bacterianos desarrollados en TSB durante 24 h y 150 rpm. n) y ñ) EN2, o) EN4.

El ensayo de transformación realizado con este grupo de aislamientos bacterianos permitió poner de manifiesto la capacidad presentada por el DNA de todos los biotipos para transformar una cepa mutante, auxotrófica para la hipoxantina, *Psychrobacter immobilis* ATCC 43117 (CECT 4646), a la prototrofia. La aparición de colonias transformantes en el medio M9 (Apartado 4.7.) indica que estos biotipos cocobacilares están genéticamente relacionados con la mutante transformada, confirmando la ubicación de este grupo de aislamientos a nivel del género *Psychrobacter*. Los resultados del ensayo de transformación se muestran en la figura 5.2.9.



**Figura 5.2.9. Transformación de una cepa mutante auxotrófica, *Psychrobacter immobilis* ATCC 43117 a la prototrofia.** Las mezclas de DNA crudo-células auxotróficas (ATCC 43117) desarrolladas durante 16 h en agar BHI, fueron inoculadas mediante sectores en placas de medio M9 e incubadas durante 3 d a 20 °C. El sector denominado *P. immobilis* ATCC 4117 corresponde a un control de la mutante auxotrófica sin tratar. Los sectores NF1, NF7, NF8, NF11, NF18, NF19, NF20, NF23, EN1, EN2, EN4, *Moraxella nonliquefaciens* CECT 465<sup>T</sup> y *Moraxella bovis* CECT 468<sup>T</sup> contienen una mezcla de la mutante auxotrófica *P. immobilis* ATCC 43117 y el DNA del biotipo rotulado en la placa.

La composición de ácidos grasos del grupo de aislamientos bacterianos cocobacilares se muestra en la tabla 5.2.8.

**Tabla 5.2.8.** Composición de ácidos grasos de los aislamientos bacterianos antárticos cocobacilares.

ACIDO GRASO	% TOTAL DE ACIDOS GRASOS										
	NF1	NF7	NF8	NF11	NF18	NF19	NF20	EN1	EN2	EN4	NF23
9:0	0.7	1.6	1.4	0.5	2	1.4	1.9	1.2	0.7	0.9	1.7
10:0	3.2	3.7	3.5	2.2	4.1	4.2	4.3	4.6	4.3	5.9	5.8
11:0 iso					0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.1	0.2
11:0	0.2	0.4	0.4	0.2	0.6	0.4	0.6	0.5	0.4	0.4	0.3
11:0 iso 3OH		0.3	0.3		0.2	0.2	0.2	0.5		0.4	0.4
11:0 3OH	0.2	0.5	0.4		0.5	0.3	0.5	0.3	0.3	0.2	0.4
Unknown 12.486	0.4	0.5	0.5	0.3	0.5	0.4	0.5	0.4	0.4	0.6	0.7
12:0 2OH	0.1	0.1	0.1		0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2
12:0 3OH	3.5	4.2	3.8	2.4	3.9	3.5	3.6	3.8	3.6	6.5	7.1
13:0 iso 3OH					0.1	0.1	0.1				0.1
15:1 ω6c		0.1		0.3	0.5	0.2	0.2			0.2	0.3
15:0				0.1					0.2		
16:0 N alcohol										0.2	
16:1 ω9c	0.5		0.3	0.5				0.2	0.2	0.3	
16:1 ω7c	10.9	12.6	12.4	16	13.9	14.2	11.7	7.9	8.3	23.1	21
16:0	1.2	1	0.9	1.4	0.5	0.8	0.4	2.7	2.2	2.1	2.3
17:0 iso	0.3	0.2		1	0.4	0.5	0.4	0.7	0.5	0.8	1.1
17:1 ω8c	9.5	17.7	18.1	9.7	20.9	15	17.2	9	10.8	8.8	12.6
17:0	0.3	0.4	0.4	0.4	0.2	0.2	0.1	1.2	1.5	0.2	0.3
18:3 ω6c (6, 9, 12)										0.3	0.2
18:1 ω9c	63.4	50.8	52.3	60.1	48.2	54.2	53.4	57.6	58.1	45	41.3
18:0	2.1	1.6	1.4	1.6	0.4	0.5	0.3	5.3	4.6	1.5	1.3
TBSA 10 Me 18:0	0.2			0.2	0.1	0.2	0.2			0.1	0.1
19:0 iso								0.4	0.2		
19:0	0.2	0.2	0.2					0.3	0.3		
19:0 10 methyl	0.4	0.2	0.3	0.4							
Summed feature 1 <sup>a</sup>				0.2						0.2	
Summed feature 2 <sup>b</sup>	0.8	1.7	1.5	0.6	1.5	1.4	1.9	1.3	1.2	0.6	1.1
Summed feature 3 <sup>c</sup>	1.3	1.1	0.9	1	0.8	1	1	1	0.9	0.4	0.4
Summed feature 7 <sup>d</sup>	0.4	0.3	0.4	0.4		0.5	0.4	0.6	0.5	0.6	0.5
Summed feature 8 <sup>e</sup>	0.4	0.8	0.7	0.7	0.5	0.5	0.7	0.2	0.2	0.2	0.2
Summed feature 9 <sup>f</sup>								0.3	0.2	0.2	0.3

<sup>a</sup>Summed feature 1, los ácidos grasos 14:1 ω5c y 14:1 ω5t no pueden separarse mediante cromatografía de gases al utilizar el sistema MIS y juntos corresponden a summed feature 1.

<sup>b</sup>Summed feature 2, 13:0 3OH, 15:1 iso H y 15:1 iso I (no separados mediante el sistema MIS).

<sup>c</sup>Summed feature 3, unknown 10-928, 14:0 3OH y 16:1 iso I (no separados mediante el sistema MIS).

<sup>d</sup>Summed feature 7, 18:1 ω7c, 18:1 ω9t y 18:1 ω12t (no separados mediante el sistema MIS).

<sup>e</sup>Summed feature 8, 19:1 y unknown 18-756 (no separados mediante el sistema MIS).

<sup>f</sup>Summed feature 9, unknown 18-846 y 18-858 (no separados mediante el sistema MIS).

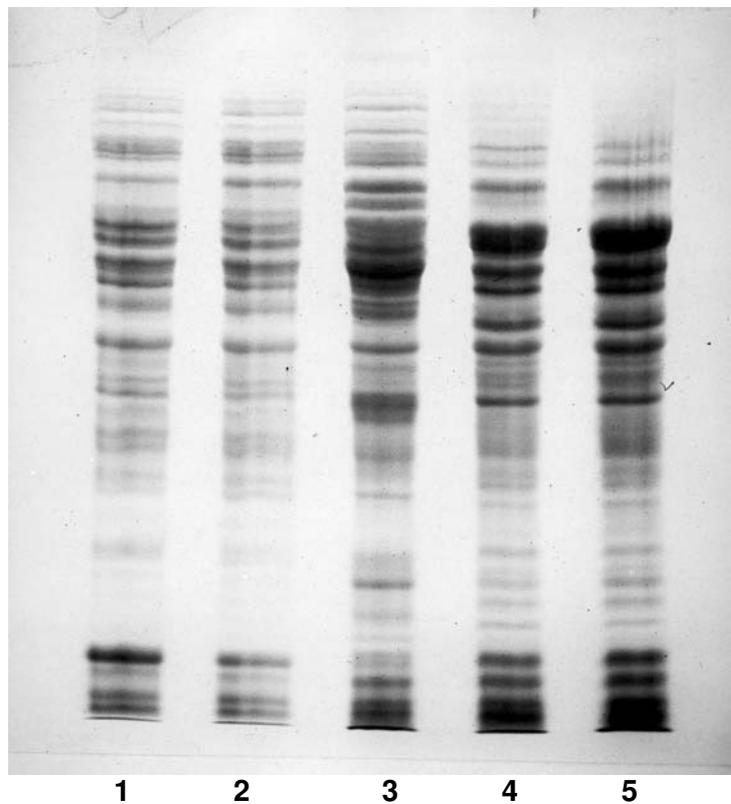
Los resultados obtenidos muestran que los ácidos grasos mayoritarios para todos los aislamientos son el 18:1 ω9c, 17:1 ω8c y 16:1 ω7c. De todos ellos, el ácido graso

insaturado 18:1  $\omega$ 9c (oleico) es el más abundante, oscilando entre el 41 % y el 63 % del contenido total de ácidos grasos según el biotipo.

El perfil de ácidos grasos de este grupo bacteriano, con una abundante presencia del ácido graso 18:1  $\omega$ 9c, sería similar al presentado por distintas especies del género *Psychrobacter*. Los perfiles de las cepas bacterianas NF23 y EN4 presentan algunas diferencias respecto al resto de aislamientos; estos aislamientos muestran niveles más altos de los ácidos grasos 12:0 3OH y 10:0 y un porcentaje inferior de ácido oleico (menos de la mitad del contenido total).

El estudio del perfil de las proteínas totales de algunos de los biotipos bacterianos respecto a *P.immobilis* ATCC 43116<sup>T</sup> y *P.immobilis* ATCC 43117, demostró una elevada relación.

**Figura 5.2.10.** Perfil electroforético de las proteínas totales obtenido mediante SDS-PAGE de *Psychrobacter immobilis* ATCC 43116T (1), *Psychrobacter immobilis* ATCC 43117 (2), NF1 (3), EN2 (4) y EN1 (5).



En la figura 5.2.10. puede observarse además que EN1 y EN2 presentan un perfil idéntico, algo diferente de NF1, pero los tres altamente relacionados con las especies de *Psychrobacter* utilizadas en el ensayo. Los resultados del estudio de los perfiles de las proteínas totales entre el resto de aislamientos que muestran su elevada relación quedan recogidos en las tesis de Bozal, 1993 y Tudela, 1996.

Los niveles de relación DNA-DNA entre las cepas bacterianas estudiadas y otras especies del género *Psychrobacter* pueden verse en la tabla 5.2.9. Si consideramos los valores de homología superiores al 80 %, claramente por encima del 70 %, límite generalmente aceptado para considerar una relación a nivel de especie (Wayne y col., 1987), podemos establecer cuatro grupos de homología entre los aislamientos bacterianos antárticos cocobacilares:

- Grupo NF7, NF8
- Grupo NF18, NF19, NF20
- Grupo EN1, EN2
- Grupo NF23, EN4

NF1 y NF11 no encontrarían relación alguna a este nivel con ninguno de los otros aislamientos bacterianos de este grupo.

Si se consideran los valores de homología entre el 63 y el 70 %, en el límite de la relación a nivel de especie, encontramos los grupos “NF18, NF19, NF20” y “EN1, EN2”, los cuales podrían considerarse pertenecientes a la misma especie. Valores de similitud inferiores, 57-59 %, se encuentran para NF1 respecto NF7 y NF8.

El aislamiento bacteriano NF11 es el único que no encuentra similitud alguna a nivel de especie con ninguno de los restantes biotipos bacterianos cocobacilares.

Como puede verse en la tabla 5.2.9. el grupo formado por NF18, NF19 y NF20 presentan niveles de similitud superiores al 83 % respecto a *Psychrobacter immobilis* LMG 7203<sup>T</sup>, lo que sitúa con claridad a este grupo bacteriano a nivel de esta especie. Para EN1 y EN2 la similitud respecto a *P. immobilis* LMG 7203<sup>T</sup> es inferior, entre el 63-70 %, en el borde para considerarlas de la misma especie. No obstante, las

**Tabla 5.2.9.** Niveles de homología DNA-DNA entre los aislamientos bacterianos antárticos cocobacilares y otras especies relacionadas.

CEPAS	% HOMOLOGÍA DNA-DNA																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
NF1	100																	21 (6)
NF7	57 (18) <sup>a</sup>	100																21 (4)
NF8	59 (12)	97 (9)	100															
NF11	42 (15)	40 (15)	39 (13)	100														20 (5)
NF18	40 (5)	40 (7)	37 (3)	43 (9)	100													
NF19	40 (4)	39 (7)	39 (15)	40 (24)	101 (24)	100												
NF20	42 (6)	39 (4)	38 (1)	42 (8)	96 (0)	93 (23)	100											
NF23	34 (8)	32 (8)	33 (12)	34 (23)	38 (19)	35 (7)	38 (15)	100										26 (2)
EN1	37 (10)	40 (9)	37 (16)	38 (30)	66 (9)	68 (21)	68 (5)	33(12)	100									
EN2	40 (3)	38 (0)	38 (6)	38 (15)	63 (18)	63 (9)	67 (9)	33 (2)	98 (12)	100								
<b>EN4</b>	36 (16)	36 (20)	32 (8)	34 (4)	36 (4)	35 (7)	34 (6)	82 (19)	36 (26)	35 (13)	100							
<i>P. immobilis</i> LMG 7203 <sup>T</sup>	39 (8)	38 (10)	38 (10)	39 (20)	91 (18)	86 (2)	83 (26)	36 (2)	63 (28)	70 (6)	39 (13)	100						
<i>P. glacincola</i> ACAM 483 <sup>T</sup>	51 (10)	57 (8)	55 (7)	38 (10)	33 (1)	32 (5)	29 (9)	36 (3)	33 (16)	32 (12)	24 (1)	33 (5)	100					
<i>P. frigidicola</i> ACAM 304 <sup>T</sup>	31 (8)	30 (12)	22 (7)	30 (10)	30 (7)	28 (0)	25 (5)	24 (4)	27 (11)	26 (6)	21 (5)	27 (2)	27 (5)	100				
<i>P. urativorans</i> ACAM 534 <sup>T</sup>	27 (9)	27 (8)	29 (4)	29 (18)	24 (13)	21 (3)	23 (12)	22 (2)	24 (3)	23 (2)	25 (5)	23 (2)	21 (6)	24 (2)	100			
<i>P. phenylpiruvica</i> LMG 5372 <sup>T</sup>	15 (1)	15 (4)	15 (5)	15 (1)	12 (4)	11 (5)	10 (1)	11 (6)	13 (10)	12 (8)	10 (2)	13 (8)	18 (1)	12 (4)	11 (5)	100		
<i>P. proteoliticus</i> LMG 21313 <sup>T</sup>																		100

<sup>a)</sup> Los valores dados entre paréntesis corresponden a la diferencia entre el valor medio de la serie de hibridaciones A x B y el valor medio de la serie recíproca B x A.

características fenotípicas de EN1 y EN2 tales como la capacidad para producir ácido a partir de determinados carbohidratos (Tabla 5.2.4) reforzarían su ubicación a nivel de *P. immobilis*.

Los grupos “NF1” y “NF7, NF8”, relativamente relacionados a nivel de homología DNA-DNA, presentan características comunes que sitúan a estos aislamientos bacterianos a nivel de la misma especie. La relación DNA-DNA más alta encontrada para estos tres aislamientos con especies conocidas del género *Psychrobacter* ha sido con *Psychrobacter glacincola* LMG 21281<sup>T</sup>, encontrándose valores de similaridad entre el 51-57 %.

Para los grupos “NF11” y “EN4, NF23” no se han encontrado valores de similaridad significativos respecto a especies conocidas del género *Psychrobacter*. La relación de similaridad DNA-DNA más alta encontrada para estos aislamientos ha sido con *P. immobilis* LMG 7023<sup>T</sup> (36-39 %).

Para confirmar la posición dentro del género *Psychrobacter* de los grupos “NF1”, “NF7-NF8”, “NF11” y “EN4-NF23”, se procedió al estudio filogenético del rRNA 16S de los aislamientos bacterianos NF1, NF7, NF11 y NF23. Las similaridades encontradas entre los biotipos bacterianos cocobacilares y las especies conocidas del género *Psychrobacter* en el año 2001, se muestran en la figura 5.2.11. Valores de similaridad significativos, por encima del 97 %, que pueden suponer una posible relación a nivel de especie (Stackebrandt y Goebel, 1994), se han encontrado entre los cuatro aislamientos bacterianos: NF11-NF23 (99.1 %), NF1-NF7 (99.0 %), NF7-NF23 (98.9 %), NF1-NF11 (98.8 %), NF7-NF11 (98.5 %) y NF1-NF23 (98.3 %).

Las similaridades más elevadas presentadas por NF1 y NF7 respecto a especies tipo conocidas se encuentran para *P. glacincola* LMG 21282<sup>T</sup>, 98.9 y 99.0 % respectivamente, especie con la que también presentan la mayor relación a nivel de homología DNA-DNA.

Para NF11 y NF23 se encuentran también similaridades elevadas, superiores al 97 %, con diversas especies del género *Psychrobacter*, corroborándose al igual que en los aislamientos anteriores su ubicación a nivel de este género. Sin embargo, las especies

tipo con las que presentan un porcentaje mayor de similitud a nivel del rRNA 16S quedan totalmente alejadas si se atiende a la relación DNA-DNA.

**Figura 5.2.11.** % de similitud en base a los estudios filogenéticos del rRNA 16S de NF1, NF7, NF11 y NF23. Los valores de similitud significativos que indican una posible relación a nivel de especie (> 97 %) quedan indicados en negrilla. (T, especie tipo).

#### NF23

<b>NF11</b>	<b>99.1</b>
<b><i>Psychrobacter immobilis</i> DSM 7229 T</b>	<b>99.0</b>
<b>NF7</b>	<b>98.9</b>
<b><i>Psychrobacter glacincola</i> DSM 12194 T</b>	<b>98.8</b>
<b>NF1</b>	<b>98.3</b>
<b><i>Psychrobacter proteolyticus</i> 116 T</b>	<b>98.2</b>
<b><i>Psychrobacter submarinus</i> KMM 225 T</b>	<b>97.0</b>
<b><i>Psychrobacter marincola</i> KMM 277 T</b>	<b>97.0</b>
<i>Psychrobacter faecalis</i> Iso-46 T	96.9
<i>Psychrobacter phenylpyruvicum</i> ATCC 23333 T	96.0
<i>Psychrobacter pacificensis</i> IFO 16279 T	95.6
<i>Psychrobacter urativorans</i> ATCC 15174 T	95.1
<i>Psychrobacter frigidicola</i> ACAM 304 T	93.7

#### NF11

<b>NF23</b>	<b>99.1</b>
<b>NF1</b>	<b>98.8</b>
<b>NF7</b>	<b>98.5</b>
<b><i>Psychrobacter glacincola</i> DSM 12194 T</b>	<b>98.4</b>
<b><i>Psychrobacter immobilis</i> DSM 7229 T</b>	<b>98.2</b>
<b><i>Psychrobacter submarinus</i> KMM 225 T</b>	<b>98.0</b>
<b><i>Psychrobacter proteolyticus</i> 116 T</b>	<b>97.8</b>
<b><i>Psychrobacter marincola</i> KMM 277 T</b>	<b>97.8</b>
<b><i>Psychrobacter faecalis</i> Iso-46 T</b>	<b>97.8</b>
<i>Psychrobacter phenylpyruvicum</i> ATCC 23333 T	96.2
<i>Psychrobacter pacificensis</i> IFO 16279 T	95.7
<i>Psychrobacter urativorans</i> ATCC 15174 T	94.4
<i>Psychrobacter frigidicola</i> ACAM 304 T	94.2

Figura 5.2.11. (Continuación)

## NF7

<i>Psychrobacter glacincola</i> DSM 12194 <sup>T</sup>	99.9
NF1	99.0
NF23	98.9
<i>Psychrobacter immobilis</i> DSM 7229 <sup>T</sup>	98.8
NF11	98.5
<i>Psychrobacter proteolyticus</i> 116 <sup>T</sup>	97.7
<i>Psychrobacter faecalis</i> Iso-46 <sup>T</sup>	97.4
<i>Psychrobacter submarinus</i> KMM 225 <sup>T</sup>	96.8
<i>Psychrobacter marincola</i> KMM 277 <sup>T</sup>	96.7
<i>Psychrobacter phenylpyruvicum</i> ATCC 23333 <sup>T</sup>	95.8
<i>Psychrobacter pacificensis</i> IFO 16279 <sup>T</sup>	95.1
<i>Psychrobacter urativorans</i> ATCC 15174 <sup>T</sup>	94.4
<i>Psychrobacter frigidicola</i> ACAM 304 <sup>T</sup>	93.7

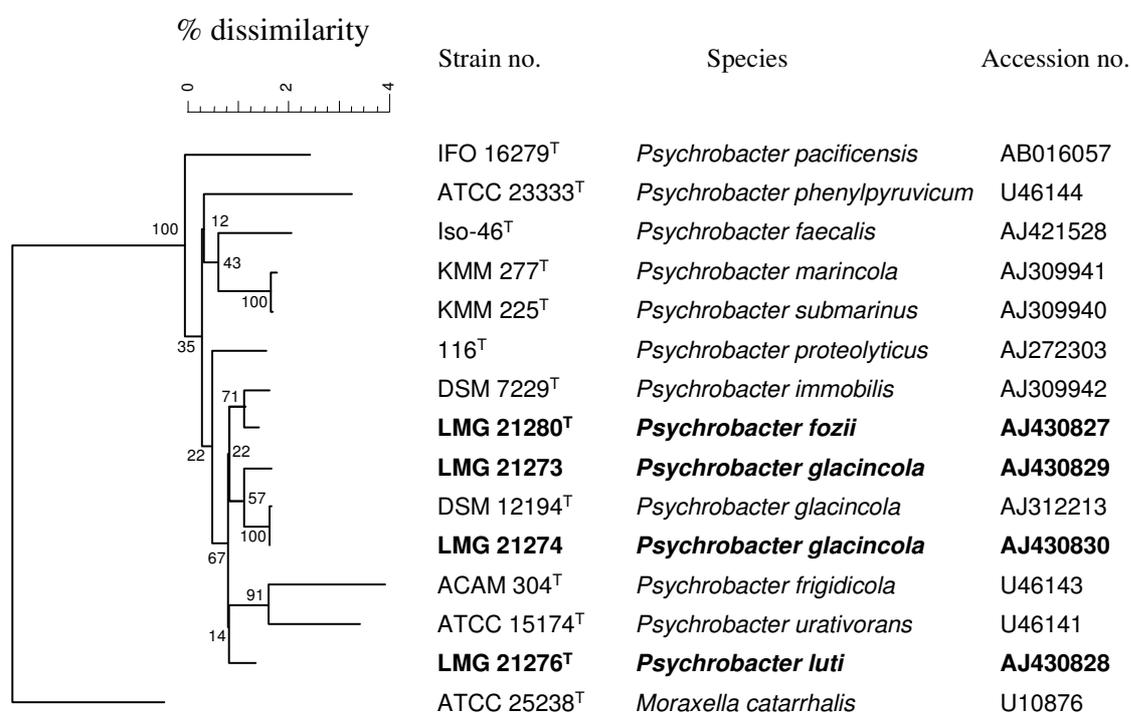
## NF1

NF7	99.0
<i>Psychrobacter glacincola</i> DSM 12194 <sup>T</sup>	98.9
NF11	98.8
NF23	98.3
<i>Psychrobacter immobilis</i> DSM 7229 <sup>T</sup>	97.8
<i>Psychrobacter faecalis</i> Iso-46 <sup>T</sup>	97.8
<i>Psychrobacter proteolyticus</i> 116 <sup>T</sup>	97.8
<i>Psychrobacter submarinus</i> KMM 225 <sup>T</sup>	97.3
<i>Psychrobacter marincola</i> KMM 277 <sup>T</sup>	97.1
<i>Psychrobacter pacificensis</i> IFO 16279 <sup>T</sup>	95.5
<i>Psychrobacter phenylpyruvicum</i> ATCC 23333 <sup>T</sup>	95.5
<i>Psychrobacter frigidicola</i> ACAM 304 <sup>T</sup>	94.4
<i>Psychrobacter urativorans</i> ATCC 15174 <sup>T</sup>	93.6

El árbol filogenético resultante de los estudios filogenéticos del rRNA 16S donde se refleja la posición de los biotipos NF1, NF7, NF11 y NF23 se muestra en la figura 5.2.12.

Los resultados de los análisis de hibridación DNA-DNA y los análisis filogenéticos del rRNA 16S permiten establecer que NF18, NF19, NF20, EN2 y EN1 corresponden a un mismo grupo que se emplaza a nivel de *P. immobilis*. Así mismo, los aislamientos NF1, NF7 y NF8 se ubicarían en un mismo nicho a nivel de *P. glacincola*. Los aislamientos EN4 y NF23 corresponderían a una misma especie del género *Psychrobacter*, próxima a *P. immobilis* y *P. glacincola* a nivel del rRNA 16S, pero alejada de estas atendiendo a la homología DNA-DNA. En la misma situación estaría el último grupo constituido por NF11 que quedaría situado también en el género *Psychrobacter*, pero al igual que los biotipos EN4 y NF23, en una posición separada de las especies conocidas en el año 2001, cuando se realizaron los estudios filogenéticos.

**Figura 5.2.12.** Árbol filogenético resultante de los análisis de las secuencias del rRNA 16S, donde se muestran las posiciones de los aislamientos antárticos NF23 (*Psychrobacter fozii* LMG 21280<sup>T</sup>), NF11 (*Psychrobacter luti* LMG21276<sup>T</sup>), NF1 y NF7 (*Psychrobacter glacincola* LMG21273 y LMG 21274) respecto a las especies relacionadas.



**Tabla 5.2.10.** Denominaciones de las cepas utilizadas en el estudio del grupo bacteriano antártico cocobacilar.

CEPAS	OTRAS DESIGNACIONES	PROCEDENCIA
<i>Moraxella nonliquefaciens</i> CECT 465 <sup>T</sup>	ATCC 19975 <sup>T</sup>	CECT
<i>Moraxella bovis</i> CECT 468	ATCC 10900 <sup>T</sup>	CECT
<i>Psychrobacter frigidicola</i> ACAM 304 <sup>T</sup>	LMG 21281 <sup>T</sup>	ACAM
<i>Psychrobacter glacincola</i> ACAM 483 <sup>T</sup>	LMG 21282 <sup>T</sup> , DSM 12194 <sup>T</sup>	ACAM
<i>Psychrobacter immobilis</i> CECT 5008 <sup>T</sup>	DSM 7229 <sup>T</sup> , ATCC 43116, LMG 7203 <sup>T</sup>	CECT, LMG
<i>Psychrobacter immobilis</i> CECT 4646	ATCC 43117	CECT
<i>Psychrobacter phenylpyruvica</i> LMG 5372 <sup>T</sup>	ATCC 23333 <sup>T</sup> , ACAM 535 <sup>T</sup>	LMG
<i>Psychrobacter proteolyticus</i> 116 <sup>T</sup>	LMG 21313 <sup>T</sup> , CIP106830 <sup>T</sup> , DSM13887 <sup>T</sup>	LMG
<i>Psychrobacter urativorans</i> ACAM 534 <sup>T</sup>	LMG 21283 <sup>T</sup> , ATCC 15174 <sup>T</sup>	ACAM
NF1	LMG 21273, CECT 5882	Lodo glaciar, Admiralty Bay, Antártida.
NF7	LMG 21274, CECT 5883	Lodo glaciar, Admiralty Bay, Antártida.
NF8	LMG 21275, CECT 5884	Lodo glaciar, Admiralty Bay, Antártida.
NF11 <sup>T</sup>	LMG 21276 <sup>T</sup> , CECT 5885 <sup>T</sup>	Lodo glaciar, Admiralty Bay, Antártida.
NF18	LMG 21277, CECT 5886	Agua, Johnson's Dock, Antártida.
NF19	LMG 21278, CECT 5887	Agua, Johnson's Dock, Antártida.
NF20	LMG 21279, CECT 5888	Agua, Johnson's Dock, Antártida.
EN1	LMG 21270, CECT 5879	Agua, Johnson's Dock, Antártida.
EN2	LMG 21271, CECT 5880	Agua, Johnson's Dock, Antártida.
EN4	LMG 21272, CECT 5881	Agua, Johnson's Dock, Antártida.
NF23 <sup>T</sup>	LMG 21280 <sup>T</sup> , CECT 5889 <sup>T</sup>	Sedimentos, Johnson's Dock, Antártida.

ACAM, Colección Australiana de Microorganismos de la Antártida.

ATCC, Colección Americana de Cultivos Tipo.

CECT, Colección Española de Cultivos Tipo.

LMG, BCCM/LMB, Colección de Bacterias del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Ghent, Bélgica.

### **5.3. CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DEL GRUPO DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS ANTÁRTICOS PERTENECIENTES AL GÉNERO *Paenibacillus*.**

Este grupo bacteriano está constituido por dos aislamientos, denominados 20CM y 20CO, procedentes de sedimentos de Chlorite Bay, en la Península de Byers (Isla de Livingston), recogidos durante el verano austral de 1990-1991.

Corresponde este grupo bacteriano a microorganismos de morfología bacilar, Gram variables, pues no se observa una clara afinidad por el cristal violeta, y móviles mediante flagelación peritrica. Se caracterizan por su capacidad para formar esporas elipsoidales que deforman el esporangio, las cuales se localizan en la región terminal o subterminal de la célula.

Cuando el biotipo bacteriano 20CM se desarrolla sobre TSA a 15 °C, se observan colonias circulares, convexas, de borde liso, no pigmentadas, brillantes y de aspecto cremoso, mientras que el aislamiento bacteriano 20CO produce colonias similares con el borde irregular, aproximadamente del mismo diámetro que 20CM (1-1.5 mm) pero opacas, sin presentar el aspecto cremoso de la anterior. En la tabla 5.3.1. se resumen las características morfológicas de los aislamientos bacterianos 20CM y 20CO.

**Tabla 5.3.1.** Características morfológicas de los aislamientos bacterianos antárticos 20CM y 20CO.

<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>20CM</b>	<b>20CO</b>
Gram	variable	variable
Morfología	bacilar	bacilar
Longitud celular (µm)	1.5-3	1.5-3
Diámetro celular (µm)	0.5-0.8	0.5-0.8
Movilidad	+ (peritrica)	+ (peritrica)
Coloración colonias	-	-

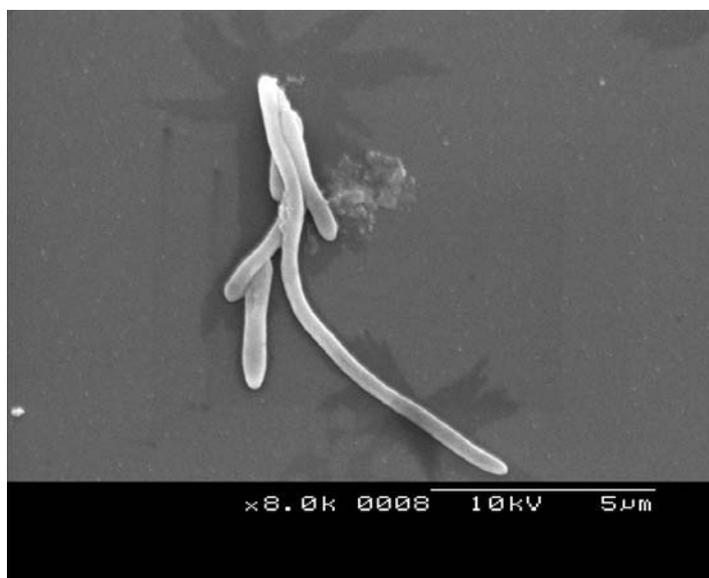
Mediante microscopía electrónica de barrido se han calculado las dimensiones celulares las cuales oscilan entre 1.5-3 µm de largo y 0.5-0.8 µm de ancho, pudiendo originar alguna forma filamentosa de hasta 10 µm de longitud. La morfología bacilar así como la posición y forma de la spora pueden observarse en las micrografías electrónicas de las figuras 5.3.1. a 5.3.3. El tipo de flagelación peritrica de estos

aislamientos se demostró mediante la observación de tinciones negativas en el microscopio electrónico de transmisión (Figura 5.3.4.).

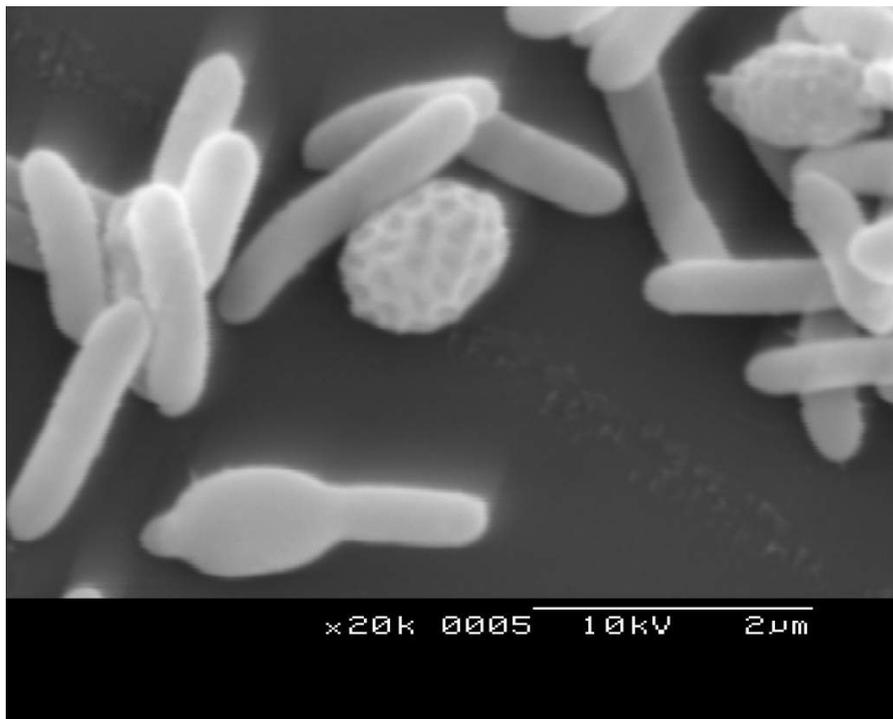
En cuanto a las condiciones culturales, 20CM y 20CO no toleran concentraciones superiores al 4 % (p/v) de NaCl, siendo incapaces de desarrollarse en TSA + Agua de mar. El rango de temperatura de crecimiento para estos biotipos bacterianos es de 4 a 31 °C, dándose el desarrollo óptimo entre 10 y 15 °C. En presencia de lisozima al 0.001 % (p/v) 20CM y 20CO son capaces de desarrollarse, aunque se observa una cierta inhibición (Tabla 5.3.2.).

**Tabla 5.3.2.** Condiciones de crecimiento de los aislamientos bacterianos antárticos 20CM y 20CO.

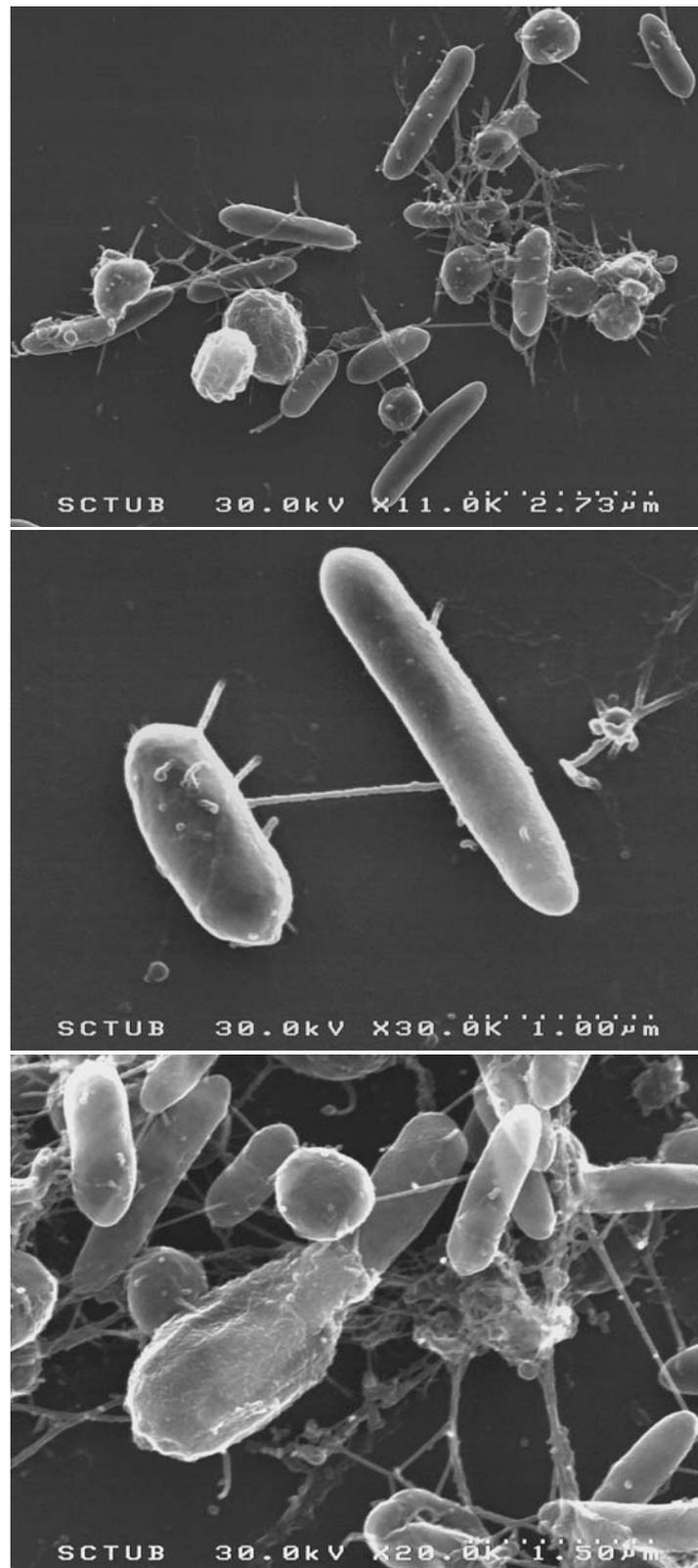
CARACTERÍSTICAS	20CM	20CO
Rango de T <sup>a</sup> de crecimiento (°C)	4-31	4-31
Tolerancia NaCl 5 % (p/v)	-	-
Crecimiento en TSA + Agua de Mar	-	-
Crecimiento en presencia de lisozima (0.001 %)	+	+



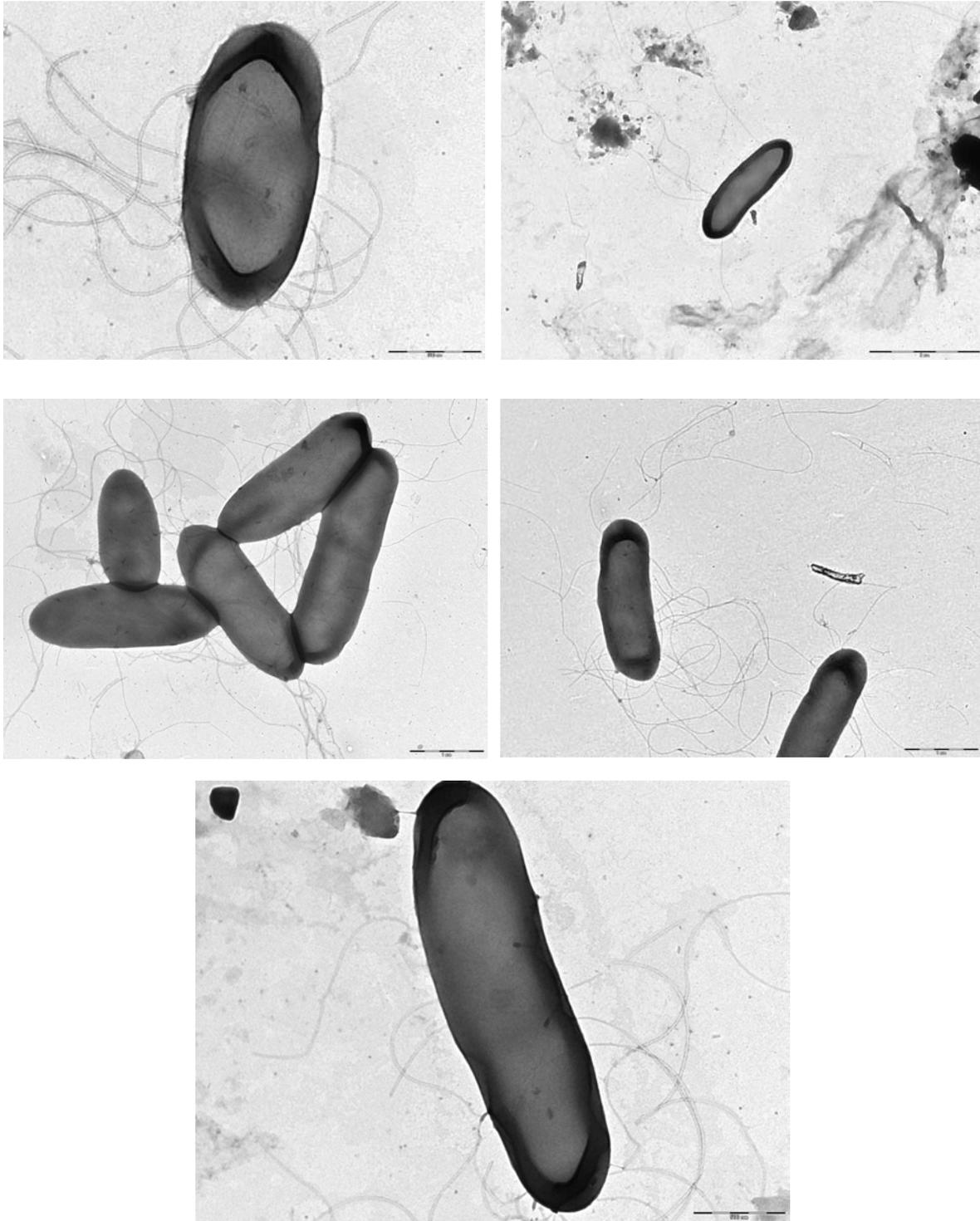
**Figura 5.3.1.** Micrografía electrónica de barrido del aislamiento 20CO desarrollado en TSA durante 48 h a 15 °C.



**Figura 5.3.2.** Micrografías electrónicas de barrido del aislamiento bacteriano 20CM desarrollado en TSA durante 48 h a 15°C.



**Figura 5.3.3.** Micrografías electrónicas de barrido del aislamiento bacteriano 20CM desarrollado en TSA durante 72 h a 15 °C, utilizando cubreobjetos tratados con poli-L-lisina.



**Figura 5.3.4.** Micrografías electrónicas de transmisión de tinciones negativas del aislamiento bacteriano antártico 20CM.

Las características bioquímicas y fisiológicas de 20CM y 20CO se muestran en la tabla 5.3.3. Ambos aislamientos son oxidasa, catalasa y ureasa positivos, presentando un metabolismo anaerobio facultativo. Son negativos para la producción de acetil-metil-carbinol, la descomposición de la tirosina y la reducción de nitratos, pero positivos en la reacción del rojo de metilo. Cuando se desarrollan en el caldo de Voges-Proskauer durante 7 días de incubación a 15 °C el pH final alcanzado es inferior a 6.

**Tabla 5.3.3.** Características bioquímicas y fisiológicas de los aislamientos bacterianos antárticos 20CM y 20CO.

CARACTERÍSTICAS	20CM	20CO
Oxidasa	+	+
Catalasa	+	+
Indol	-	-
Rojo de Metilo	+	+
Voges- Proskauer	-	-
pH en caldo Voges-Proskauer	5.75	5.75
Urea	+	+
O/F	-/-	-/-
Reducción de nitratos	-	-
Fenilalanina desaminasa	-	-
Producción de dihidroxiacetona	-	-
Crecimiento en anaerobiosis	+	+
Producción de H <sub>2</sub> S	-	-
β-Galactosidasa	-	-
Arginina dihidrolasa	-	-
Lisina descarboxilasa	-	-
Ornitina descarboxilasa	-	-
Test KOH	+	+
<b>Hidrólisis de:</b>		
Almidón	+	+
DNA	-	-
Lecitina	-	-
Gelatina	-	-
Tween 80	+	+
Tirosina	-	-
Caseína	-	-
<b>Caracteres quimiotaxonómicos:</b>		
L-Alanina aminopeptidasa	+	+
G+C ( mol %)	40.7	ND

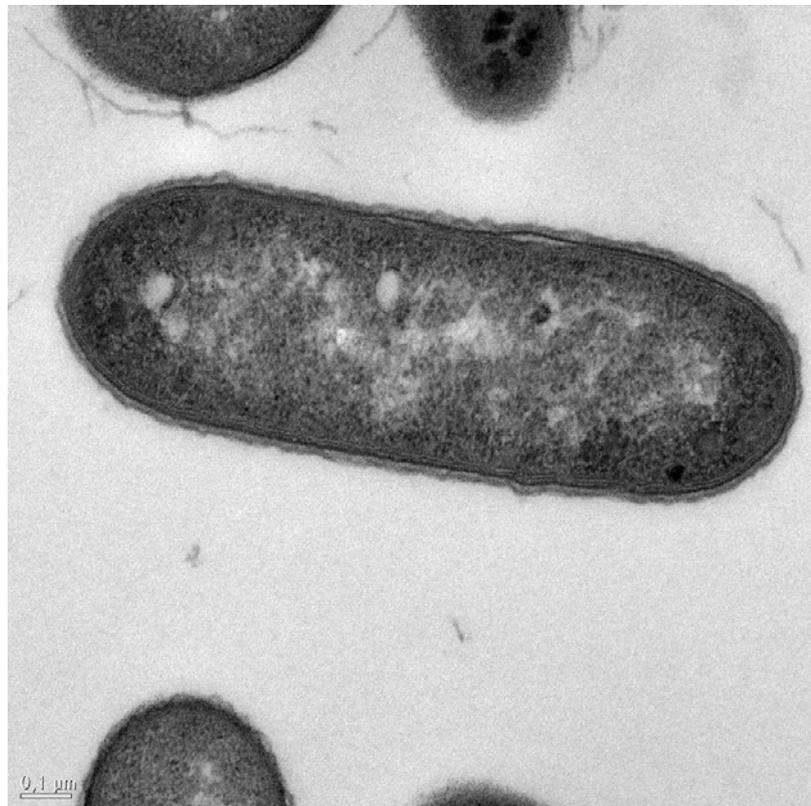
En cuanto a los resultados obtenidos en la producción de ácido a partir de los 50 carbohidratos ensayados (API 50 CH, apartado 4.3.17.), estos son exactamente iguales para las dos cepas 20CM y 20CO, no observándose diferencias entre los resultados en condiciones de oxidación y de fermentación (Tabla 5.3.4.).

**Tabla 5.3.4.** Producción de ácido a partir de carbohidratos en los aislamientos bacterianos antárticos 20CM y 20CO.

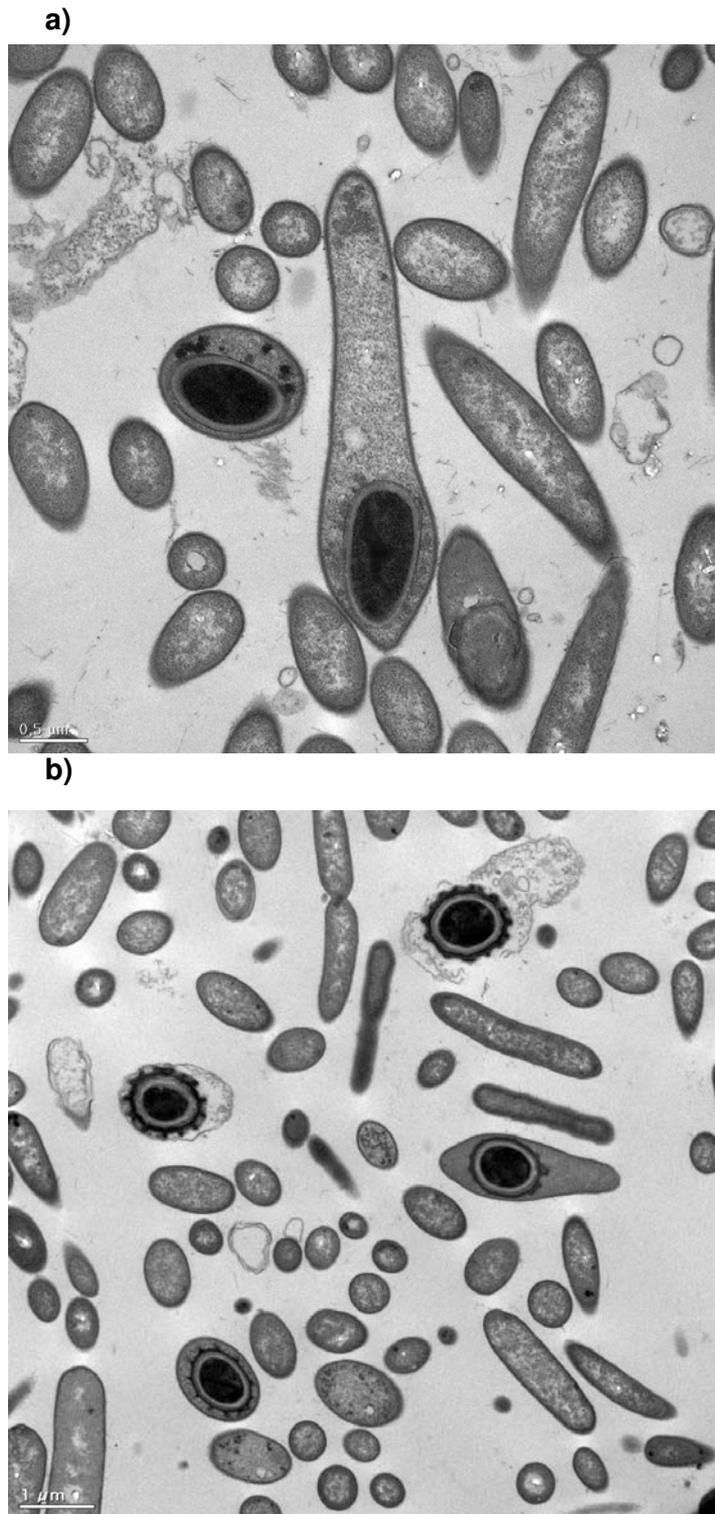
CARBOHIDRATO	OXIDACIÓN		FERMENTACIÓN	
	20CM	20CO	20CM	20CO
L-Arabinosa, ribosa, D-xilosa, β-metil-D-xilosido, galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, α-metil-D-glucósido, N-acetil-glucosamina, esculina, amigdalina, salicina, celobiosa, maltosa, lactosa, melibiosa, sacarosa, trealosa, D-rafinosa, almidón, β-gentibiosa, D-turanosa.	+	+	+	+
L-Xilosa, glicerol, eritritol, D-arabinosa, adonitol, L-sorbosa, ramnosa, dulcitol, inositol, manitol, sorbitol, inulina, arbutina, α-metil-D-manosido, melezitosa, glicógeno xilitol, D-lixosa, D-tagatosa, D-fucosa, L-fucosa, D-arabitol, L-arabitol, gluconato, 2-ceto-gluconato, 5-ceto-gluconato.	-	-	-	-

En base a las características fenotípicas, este grupo bacteriano constituido por los aislamientos denominados 20CM y 20CO, que corresponde a bacilos Gram positivos pero que se tiñen usualmente como Gram negativos, móviles mediante flagelación peritrica, no pigmentados, capaces de formar endosporas elipsoidales que deforman el esporangio, con un metabolismo anaeróbico facultativo y que presentan un G+C de 40.7 mol %, se emplazaría a nivel del género *Paenibacillus* (Ash y col., 1993).

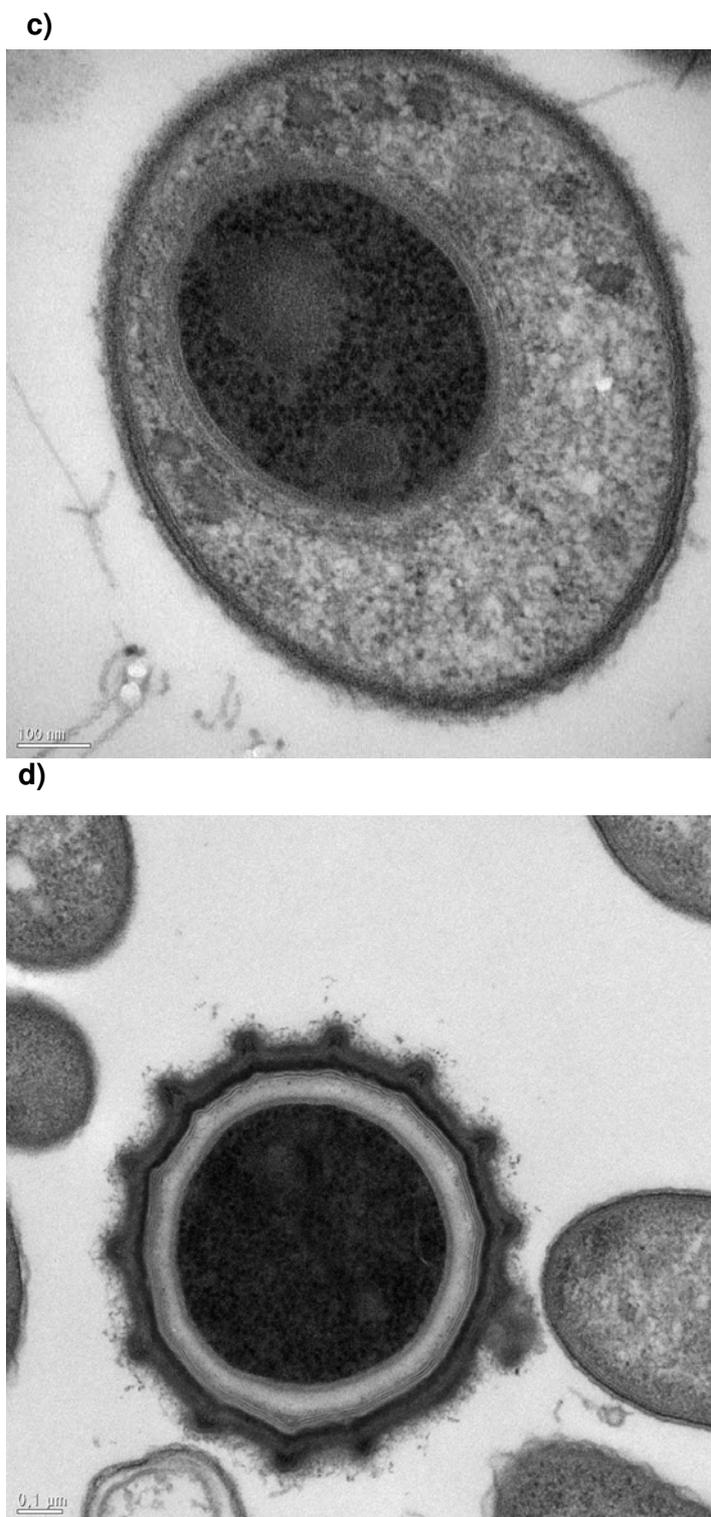
Mediante la observación de cortes ultrafinos en el microscopio electrónico de transmisión se ha podido confirmar la estructura Gram-positiva de la pared celular, aunque los resultados de los ensayos del test del KOH y de la L-alanina aminopeptidasa indiquen un carácter Gram-negativo (Tabla 5.3.3.). En las figuras 5.3.5. a 5.3.7 puede observarse la estructura de pared Gram positiva, así como las esporas que forman y su emplazamiento dentro del esporangio. En la figura 5.3.9. puede observarse también la ultraestructura de este microorganismo en muestras sometidas a criofijación por alta presión.



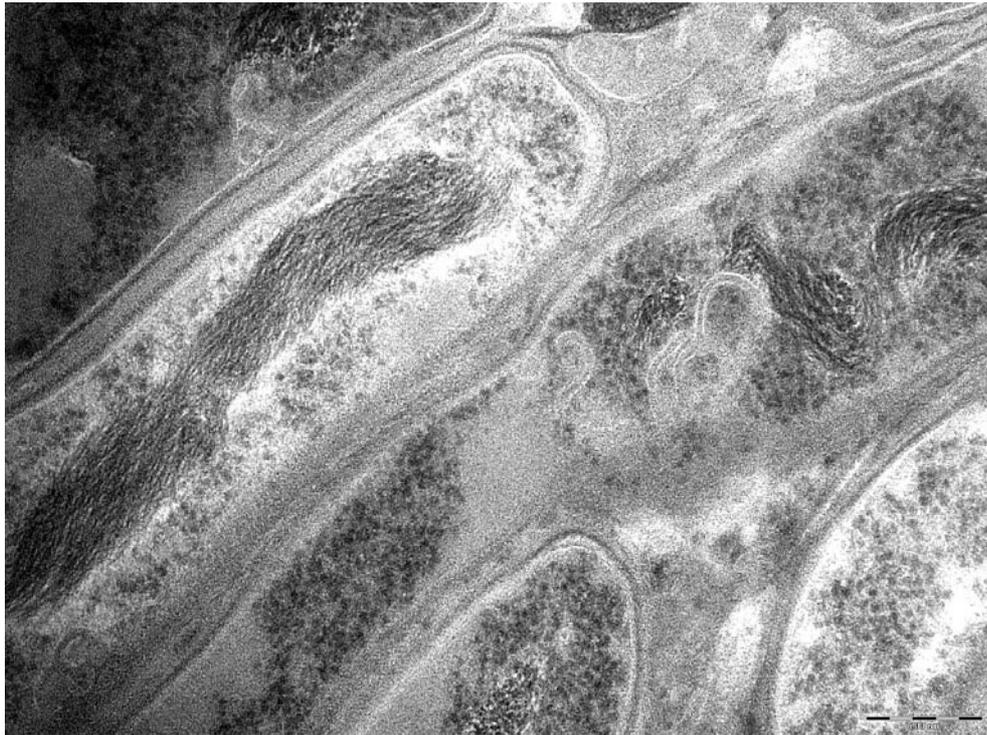
**Figura 5.3.5.** Micrografía electrónica de transmisión del aislamiento bacteriano 20CM desarrollado en TSB durante 24 h a 15 °C.



**Figura 5.3.6.** Micrografías electrónicas de transmisión de los aislamientos bacterianos antárticos desarrollados en TSB durante 24 h a 15 °C. a) 20CO y b) 20 CM



**Figura 5.3.7.** Micrografía electrónica de transmisión de los aislamientos bacterianos antárticos desarrollados en TSB durante 24 h a 15 °C. c) 20CO y d) 20 CM.



**Figura 5.3.8.** Micrografías electrónicas de transmisión del aislamiento bacteriano 20CM desarrollado en TSA durante 72 h y sometido a criofijación por alta presión.

En la tabla 5.3.5. se muestra el perfil de ácidos grasos de los aislamientos 20CM y 20CO. El ácido graso 15:0 anteiso se presenta como mayoritario (55.32 y 57.87 %) seguido del ácido graso 15:0 iso (15.0 y 13.24 %) y en menor proporción el ácido graso 16:1  $\omega$ 11c (7.72 y 7.14 %). Al igual que ocurre con todos los miembros del género *Paenibacillus*, los biotipos 20CM y 20CO presentan como mayoritario el ácido graso saturado de cadena ramificada 15:0 anteiso.

**Tabla 5.3.5.** Composición de ácidos grasos de los aislamientos bacterianos antárticos 20CM y 20CO.

ÁCIDO GRASO	% Ácido Graso	
	20CM	20CO
14:0 iso	3.04	2.01
14:0	1.55	3.17
15:0 iso	15.04	13.24
15:0 anteiso	55.32	57.87
15:0	4.17	0.49
16:1 $\omega$ 7c alcohol	1.97	0.97
16:0 iso	3.20	2.79
16:1 $\omega$ 11c	7.72	7.14
16:0	3.99	9.27
17:0 iso	2.11	1.72
17:0 anteiso	1.87	1.33

Los estudios filogenéticos basados en la secuencia de genes del rRNA 16S confirman que la cepa 20CM es miembro del género *Paenibacillus*, mostrando un nivel de similitud del 99.5% respecto *Paenibacillus macquariensis* DSM 2<sup>T</sup> (Figura 5.3.9.) el cual es suficientemente significativo como para indicar una posible relación a nivel de especie (Stackebrandt y Goebel, 1994).

Los análisis de hibridación DNA-DNA han permitido verificar la posición taxonómica del aislamiento 20CM respecto de *Paenibacillus macquariensis* DSM 2<sup>T</sup>, especie más próxima a nivel del rRNA 16S. El porcentaje de similitud encontrado entre estas dos cepas es del orden del 47 mol %, lo que indica con claridad que se trata de dos especies diferentes.

**Figura 5.3.9.** % de similitud en base a los estudios filogenéticos del rRNA 16S del aislamiento bacteriano 20CM. Los valores de similitud más significativos que indican una posible relación a nivel de especie (>97 %) quedan señalados en negrilla. (T, especie tipo)

**20CM**

<b><i>Paenibacillus macquariensis</i> DSM 2<sup>T</sup></b>	<b>99.5</b>
<i>Paenibacillus borealis</i> KK19 <sup>T</sup>	95.5
<i>Paenibacillus odorifer</i> LMG 19079 <sup>T</sup>	94.7
<i>Paenibacillus chibensis</i> NRRL B-142	94.3
<i>Paenibacillus pabuli</i> NCIMB 12781 <sup>T</sup>	94.0
<i>Paenibacillus azotofixans</i> LMG 14658 <sup>T</sup>	93.3
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i> DSM 5162 <sup>T</sup>	93.2

En el árbol filogenético de la figura 5.3.10. puede verse la posición del aislamiento 20CM respecto a las especies relacionadas del género *Paenibacillus*. El biotipo 20CM queda situado en el género *Paenibacillus* pero en una posición separada de las especies conocidas en el año 2003 cuando se realizaron los análisis filogenéticos.

**Tabla 5.3.6.** Denominaciones de las cepas utilizadas en el estudio del grupo bacteriano 20CM y 20CO

CEPAS	OTRAS DESIGNACIONES	PROCEDENCIA
<b><i>Paenibacillus macquariensis</i> DSM 2<sup>T</sup></b>	ATCC 23464 <sup>T</sup> , LMG 6935 <sup>T</sup>	LMG
<b>20CM</b>	LMG 22078 <sup>T</sup> , CECT 5836 <sup>T</sup>	Sedimentos, Chlorite Bay, Antártida.
<b>20CO</b>		Sedimentos, Chlorite Bay, Antártida.

ATCC, Colección Americana de Cultivos Tipo.

CECT, Colección Española de Cultivos Tipo.

LMG, BCCM/LMB, Colección de Bacterias del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Ghent, Bélgica.

DSM, Colección Alemana de Microorganismos.

**Figura 5.3.10.** Árbol filogenético resultante del análisis de la secuencia del rRNA 16S donde se muestra en negrilla la posición del aislamiento antártico 20CM respecto a otras especies del género *Paenibacillus* relacionadas. AJ605292 es el número de acceso del biotipo bacteriano 20CM en la librería EMBL.

