

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSION

Entre los catorce aislamientos de bacterias Gram negativas que forman parte de este estudio taxonómico de la microbiota antártica, y como ya se ha señalado en el capítulo de resultados, tres representantes pertenecen a uno de los géneros bacterianos más interesantes y de mayor actualidad en el campo de la microbiología aplicada, nos referimos al género *Shewanella*. Los biotipos bacterianos NF12 y NF24 corresponden a *Shewanella frigidimarina* mientras que el biotipo NF22 ocupa una posición nueva en el género y ha recibido la denominación de *Shewanella livingstonensis*, LMG 19866^T (Bozal y col., 2002)

La caracterización fenotípica de estos microorganismos, bacilos Gram negativos, psicrotrofos, móviles por flagelación polar, oxidasa y catalasa positivos, quimiorganotrofos, capaces de reducir nitratos a nitritos pero sin acumular nitrógeno y de crecer anaeróbicamente mediante la reducción de TAMAO (trimetilamina N-óxido) y compuestos férricos, usando DL-Lactato como donador de electrones, permite ubicarlos a nivel del género *Shewanella*. El biotipo NF22 es el único con capacidad para acumular sulfhídrico a partir de tiosulfato. En cuanto a la fermentación de carbohidratos se detecta la producción de ácido pero no se ha observado acumulación de gas. Tradicionalmente la incapacidad para fermentar la glucosa se ha empleado como una de las características que define el género *Shewanella*, sin embargo, la capacidad de fermentación de la glucosa ha sido descrita en especies de este género como *Shewanella benthica* y *Shewanella frigidimarina* (McDonell y Colwell, 1985; Bowman y col. 1997). *S.benthica* se separa de *S.frigidimarina* por su incapacidad para crecer a 20°C.

El resto de ensayos experimentales también concuerdan con la ubicación de estos aislamientos en el género *Shewanella*. Nos referimos al perfil de proteínas (Figura 5.1.7.), en el que se puede observar que NF12 y NF24 son muy similares a *S.algae* y *S.baltica*, siendo NF22 el que presenta un perfil algo distinto respecto de los otros dos aislamientos y de las especies de *Shewanella* utilizadas. La diferenciación de NF22 respecto NF12 y NF24 también se detecta en la composición de los ácidos grasos celulares ya que su perfil, como se ha indicado en el apartado 5.1 de resultados, se aproxima más a los hallados en *S.frigidimarina*, *S.benthica*, *S.hanedai* y *S.putrefaciens*. Sin embargo, los aislamientos NF12 y NF24 presentan un perfil de

ácidos grasos con una distribución semejante a la que presentan *S.algae*, *S.amazonensis*, *S.gelidimarina* y *S.oneidens*.

Otros resultados, como los que hacen referencia a la presencia de ubiquinonas y menaquinonas, refuerzan su pertenencia al género *Shewanella*. Este planteamiento experimental se fundamenta en los trabajos de Akagawa-Matsushita *y col.* (1992), que establecen el perfil de quinonas como una característica relevante del género *Shewanella*, ya que permite separarlo de otros géneros marinos próximos como *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* o *Marinomonas*. Los aislamientos NF12, NF22 y NF24 muestran, así mismo, pequeñas cantidades de metilmenaquinonas al igual que algunas cepas de *Shewanella putrefaciens*. (Akagawa-Matsushita *y col.*, 1992 y Venkateswaran *y col.*, 1999).

Además, el contenido de G+C de estos aislamientos bacterianos, comprendido entre 41-42 mol %, se ajusta perfectamente al rango descrito para el género *Shewanella* 39-55 mol % (Venkateswaran *y col.*, 1999).

Así mismo, los resultados del estudio filogenético del rRNA 16S confirman que NF12 y NF22 pertenecen al género *Shewanella*, presentando similitudes superiores al 97 % respecto *S.frigidimarina* LMG 19475^T (98.7 y 98.9 % respectivamente).

Finalmente, los resultados aportados en las experiencias de hibridación señalan que entre NF12 y NF24 existe un porcentaje de reasociación del 88 % y más de un 70 % entre *S.frigidimarina* y estos dos aislamientos. Sin embargo, no sucede lo mismo con los resultados del análisis comparado entre NF22 respecto NF12 y NF24 y entre NF22 y *S.frigidimarina* LMG 19475^T, especie tipo del género *Shewanella* más próxima a este biotipo bacteriano a nivel de hibridación DNA-DNA (Tabla 5.1.8.). La similitud en el primer caso sólo alcanza valores del 38-32 % y todavía más baja es la homología encontrada entre NF22 y la cepa de referencia (24 %). Es evidente que NF22 ocupa una posición separada dentro del género *Shewanella*. Se trata de una nueva especie que hemos designado como *Shewanella livingstonensis*, por el origen del microorganismo, el cual fue aislado de una muestra recogida en la Isla de Livingston. Los aislamientos NF12 y NF24, que corresponden a una misma especie, se sitúan a nivel de *S.frigidimarina*.

Pero veamos algunos aspectos relacionados con la ubicación del género *Shewanella*. En 1985, Macdonell y Colwell describían por vez primera al género *Shewanella*. La definición de este género se basó fundamentalmente en la secuencia del rRNA 5S y se incluyó además una breve caracterización fenotípica. Se define como un género bacteriano formado por bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram negativos, no pigmentados, móviles por flagelación polar, quimioorganotrofos, positivos a la prueba de la oxidasa, con un G+C en torno al 44-47 mol % y generalmente asociados a ecosistemas acuáticos.

Los cambios de nomenclatura de *Shewanella* son plenamente justificables. La especie original, ahora denominada *S.putrefaciens*, fue aislada a partir de mantequilla rancia y se designó como *Achromobacter putrefaciens* (Derby y Hammer, 1931). Posteriormente, Shewan y col. en 1960 la reclasificaron como *Pseudomonas putrefaciens*. Sin embargo, su contenido en G+C respecto a otros miembros característicos del género *Pseudomonas* hizo que su reclasificación se modificara de nuevo y situase a nivel de *Alteromonas putrefaciens* (Lee y col., 1977). Finalmente, se crea el género *Shewanella* que comprende a *S.putrefaciens*, *S.benthica* y *S.hanedai* como representantes más conspicuos. Recientemente, los análisis filogenéticos basados en la secuencia rRNA 16S de las especies de *Shewanella* indican que los géneros *Vibrio*, *Ferrimonas*, *Pseudoalteromonas* y *Colwellia* se encuentran muy próximos.

Clásicamente *Shewanella* se ha dividido en dos grupos relativamente fáciles de separar por sus características bioquímicas y filogenéticas, sobre todo la temperatura de crecimiento, los requerimientos de Na⁺ y la composición de ácidos grasos. Para el caso de *S.putrefaciens* hay que reconocer que podría definirse de una forma sencilla afirmando que se trata de una bacteria no halófila, mesófila y carente de capacidad para producir ácido eicosapentaenoico (20:5 ω 3) (EPA). El segundo grupo está constituido por *S.benthica*, que procede de fondos marinos y corresponde a un modelo de shewanella psicrófila, halófila y que produce una gran cantidad de ácido eicosapentaenoico. Todos los representantes específicos que son psicrófilos y halófilos suelen proceder de ambientes marinos.

Es interesante señalar que durante mucho tiempo se consideró a los organismos procariotas incapaces de producir ácidos grasos poliinsaturados como el ácido eicosapentaenoico (EPA), el docosahexanoico (DHA) y el araquidónico (AA). A partir de 1985 se pudo comprobar que algunas bacterias eran capaces de producir estos ácidos grasos como sucede con algunas especies de *Shewanella*, *S.hanedai*, *S.benthica*, *S.frigidimarina* y *S. gelidimarina*. La función de estos ácidos grasos poliinsaturados es mantener la homeoviscosidad de las membranas celulares manteniéndolas permeables en ambientes de bajas temperaturas y altas presiones.

Shewanella es en la actualidad una bacteria muy estudiada a causa de la versatilidad de su fisiología así como la diversidad de nichos ecológicos que puede colonizar. Es conocido que los representantes de *Shewanella* se encuentran ampliamente distribuidos y se han aislado de lugares tan dispares como ambientes antárticos, sedimentos, campos petrolíferos y alimentos deteriorados con elevado nivel proteico. Se la puede considerar como una patógena oportunista para humanos y animales acuáticos.

Shewanella, en los suelos, es capaz de combinarse con compuestos oxidados de hierro con valencia III. Se establece pues una curiosa relación entre un material inanimado, como es un mineral, y un microorganismo. Si no hay oxígeno usan el Fe^{3+} como aceptor final de electrones, si se encuentra disponible. Este comportamiento tiene un impacto significativo en el fenómeno de solución de minerales y el movimiento del hierro en el ambiente.

Un ejemplo recientemente divulgado es el que señala la interacción entre *Shewanella* y la goethita, un mineral de hierro. El óxido de hierro se transforma produciendo un amarilleamiento del mineral como consecuencia del fenómeno de la reducción. Con la adición de cada electrón se rompe un puente entre los átomos de este mineral y permite que la goethita ceda hierro. El resultado es previsible porque se produce un fenómeno de movilización del hierro que pasa a las aguas superficiales. En su superficie las moléculas pasan de Fe^{3+} a Fe^{2+} . Si la goethita se encontrase rodeada de metales tóxicos como el Zn, Pb, Cr, Sr o Tc estos podrían asimismo ser liberados al medio. Estos metales a su vez pueden percolarse a través del suelo llegando a contaminar suministros de agua. Una cuestión importante es la interacción entre los

sustratos orgánicos y la bacteria. La materia orgánica podría actuar de lanzadera de electrones desde la bacteria hasta la superficie que contiene el óxido de hierro, exaltando la tasa de reducción del hierro. Con la adición de materia orgánica de bajo costo podríamos acelerar el proceso estimulador de la reducción del hierro.

La clave del comportamiento singular de esta bacteria estriba en la utilización de compuestos férricos, óxido de manganeso, molibdeno, compuestos de azufre y nitrato, como aceptores terminales de electrones en ausencia de oxígeno. La reducción desasimiladora del hierro ha sido así mismo detectada en *S.algae*, *S.frigidimarina*, *S.gelidimarina* y en organismos filogenéticamente próximos como *Ferrimonas balearica*. Obviamente, la habilidad para usar metales insolubles ha generado un interés sustancial en este grupo de organismos si se considera que la vía de reducción del Mn^{+4} y del Fe^{3+} no está completamente establecida. De acuerdo a las publicaciones de C. R. Myers y J. M. Myers (1992), las bacterias que utilizan sustratos sólidos como compuestos oxidados de hierro y manganeso como aceptores terminales de electrones pueden localizar aproximadamente hasta el 80 % de los citocromos en su membrana externa. Esta distribución de citocromos en la membrana externa podría desempeñar papeles trascendentes en condiciones de respiración anaeróbica.

El fundamento de este comportamiento se basa en la existencia de moléculas complejas que facilitan la transferencia de electrones. La producción de una proteína específica es la razón de esta movilización de minerales.

La segunda parte del trabajo recogido en esta Memoria Doctoral corresponde al grupo bacteriano más mayoritario ya que comprende 11 aislamientos de bacterias Gram negativas incluidas en el género *Psychrobacter* y que corresponden a los aislamientos NF1, NF7, NF8, NF11, NF18, NF19, NF20, NF23, EN1, EN2 y EN4.

Como es conocido, la ubicación taxonómica del género *Psychrobacter* ha experimentado notables variaciones, como ha sucedido con otros representantes de bacterias Gram negativas incluidas en las Proteobacterias. *Psychrobacter* se define como una bacteria Gram negativa, carente de motilidad, positiva a la prueba de la oxidasa, no pigmentada, psicotolerante, que suele presentarse en forma de

cocobacilos y puede localizarse en la superficie de peces y aves adaptadas a ambientes fríos.

En los primeros tratados rigurosos de taxonomía bacteriana, relativamente alejados de nuestros días (1974), ya se comentaba la existencia de un grupo bacteriano formado por bacterias saprofitas, no pigmentadas, Gram negativas, representadas por bacilos cortos, propios de suelos y aguas. El representante más conspicuo era el género *Achromobacter*. Sin embargo, entre los achromobacters, existían representantes que podían separarse de las formas móviles. En este caso, nos encontraríamos ante el género *Acinetobacter* (“akinetos”, falta de actividad motriz).

La incorporación de la prueba de la oxidasa, como ensayo fundamental para precisar el modelo de cadena respiratoria en bacterias Gram negativas, permitió comprobar que en el género *Acinetobacter* había representantes oxidasa positivos y oxidasa negativos. Ante esta situación, se consideró asignar solamente las poblaciones negativas a la prueba de la oxidasa al género *Acinetobacter*.

En cambio, el grupo, por cierto muy numeroso, de bacterias positivas a la prueba de la oxidasa, carentes de movilidad, incapaces de producir pigmentos, psicrotrofas, con formas esféricas o cocobacilares, colonizadoras de la piel, escamas de peces y algunos alimentos, se agruparon en un auténtico cajón de sastre denominado *Moraxella-like*. Sus características específicas se fundamentaron en parámetros fenotípicos. Sin embargo, un aspecto importante de estas poblaciones es el que ha revelado la capacidad de algún grupo para presentar competencia para el DNA transformante.

Actualmente, los géneros *Psychrobacter*, *Acinetobacter* y *Moraxella* se incluyen en la familia Moraxeláceas. Durante algún tiempo en esta familia se han distinguido dos ramas mayoritarias. La rama *Moraxella* incluye representantes del género *Alysella* y del género *Branhamella* que comprende falsas neiserias como *B.catarrhalis*, *B.caviae*, *B.ovis* y *B.cuniculi*. La rama *Psychrobacter* estaría representada por la especie más característica *Psychrobacter immobilis* (Juni y Heym, 1986), así como una moraxella mal ubicada, *Moraxella phenylpiruvica* y otros organismos relacionados.

Como hemos indicado anteriormente, un grupo de estos organismos ha revelado su competencia para llevar a cabo la transformación genética. Este hallazgo hizo posible la realización de un ensayo de transformación que centraba mucho mejor la posición taxonómica de algunos de sus representantes. Solamente el DNA de algunas cepas muy relacionadas puede transformar una cepa competente auxotrofa de *Psychrobacter* (Juni y Heym, 1980). La demostración de este comportamiento tan singular no suele emplearse normalmente en las técnicas taxonómicas rutinarias. Aunque este ensayo pudiera considerarse prácticamente exclusivo para la identificación de *Psychrobacter*, algunos especialistas han mostrado que este comportamiento puede presentarse en algunos representantes de otros géneros afines, como es el caso de algunas cepas de *Acinetobacter* (Gómez-Lus, comunicación personal).

El reconocimiento de *Psychrobacter* como género propio se ha basado en el estudio integrado de las características morfológicas, caracterización fenotípica, identificación mediante el experimento de transformación, la composición de ácidos grasos celulares, el contenido en G+C, los valores del rRNA 16S y, por supuesto, la hibridación DNA-DNA.

Tras la descripción de la primera especie de este género, *P.immobilis*, se han descrito numerosas especies, del orden de ocho, procedentes básicamente de ambientes naturales.

En nuestro trabajo sobre este segundo grupo de bacterias Gram negativas, podemos afirmar que las once corresponden al género *Psychrobacter*. El estudio fenotípico, genotípico, quimiotaxonómico y el análisis filogenético ha permitido establecer que la posición taxonómica de tres de estos nuevos aislamientos bacterianos corresponde a dos nuevas especies, a las que se ha denominado como *Psychrobacter luti* y *Psychrobacter fozii*.

Todos los aislamientos cumplen con las características del género *Psychrobacter*. Su rango óptimo de temperaturas de crecimiento oscila mayoritariamente entre 4°C y 30°C. Son halotolerantes, adaptándose a concentraciones de NaCl comprendidas

entre 9.5 y 12.5 %. Su contenido en G+C, entre 44-47 mol %, concuerda con el rango descrito para *Psychrobacter*, 44-46 mol % (Juni, E.,1991).

Respecto al perfil de ácidos grasos hay que señalar que es similar al encontrado en las especies de este género, siendo 18:1 ω 9c, 17:1 ω 8c y 16:1 ω 7c los ácidos grasos predominantes. El ácido oleico (18:1 ω 9c) es el mayoritario, con niveles en torno al 41-63 %, tal como ocurre en diferentes especies de *Psychrobacter*, *P.immobilis* (Moss y col., 1988), *Psychrobacter frigidicola* (Bowman y col., 1996), *Psychrobacter glacicola* (Bowman y col., 1997), *Psychrobacter pacificensis* (Maruyama y col., 2000) *Psychrobacter proteolyticus* (Denner y col., 2001), *Psychrobacter faecalis* (Kämpfer y col., 2002) *Psychrobacter submarinus* y *Psychrobacter marincola* (Romanenko y col., 2002). Los aislamientos NF23 y EN4 presentan algunas diferencias respecto al perfil de ácidos grasos presentado por el resto de aislamientos, tal como se ha indicado en el apartado 5.2., mostrando porcentajes algo distintos. En este sentido los biotipos EN4 y NF23 se separan del resto de biotipos en su incapacidad para hidrolizar macromoléculas del tipo lecitina, caseína o tween 80.

Los niveles de homología DNA-DNA entre los aislamientos bacterianos antárticos nos han permitido establecer básicamente cuatro grupos de homología (Apartado 5.2., Tabla 5.2.9.) con valores de relación a nivel de especie superiores al 70 % (Wayne y col., 1987). Por un lado tendríamos los aislamientos EN1 y EN2 que muestran una homología DNA-DNA del 98 %, lo que permite establecer claramente que pertenecen a una misma especie. Las otras agrupaciones corresponderían a NF7 y NF8 (97 %), NF18, NF19 y NF20 (93-100 %) y EN4 y NF23 (82 %). Separados de estos cuatro grupos quedarían los aislamientos NF1 y NF11. Concretamente el aislamiento NF1 presenta un nivel de relación con NF7 y NF8 del orden del 57-59 %, mientras que la relación más elevada encontrada para NF11 respecto de los otros aislamientos ha sido con NF4 y NF23, presentando valores alrededor del 33 %.

El grupo NF18, NF19 y NF20, que presentan una relación del orden del 63-70 % respecto EN1 y EN2, en la frontera para considerarlas una misma especie, se sitúan con claridad a nivel de *P. immobilis*, con valores de homología DNA-DNA superiores al 83 % respecto a la especie tipo. En cambio la similaridad entre EN1 y EN2 respecto *P. immobilis* LMG 7203^T es mas baja (63-70 %). No obstante el perfil bioquímico de los

aislamientos EN1 y EN2, en particular su capacidad para producir ácido a partir de carbohidratos, avalaría su ubicación a nivel de la especie *P.immobilis*. Bien es cierto que otras especies de *Psychrobacter* recientemente descritas como *P.pacificensis* y *P.submarinus* también pueden formar ácido a partir de carbohidratos, pero se separan de *P.immobilis* y de los grupos objeto de nuestro estudio en otras características importantes. Por otra parte, todos los biotipos de estos dos grupos NF18, NF19, NF20, EN1 y EN2 coinciden con *P.immobilis* en su capacidad para utilizar como única fuente de carbono y energía substratos como L-alanina, L-prolina, putrescina, L-histidina, L-málico, acetato y propionato. Estos aislamientos coinciden asimismo con *P.immobilis* en la existencia de esterasa (C4) y leucina arilamidasa y el grupo NF18, NF19, NF20 en la actividad lipásica. En cambio, difieren de *P.immobilis* en la presencia de fosfatasa alcalina. De acuerdo a estos resultados es muy probable que todos estos biotipos bacterianos sean especies de *P.immobilis*.

La siguiente relación más próxima (57-59 %) viene dada por el aislamiento NF1 y los biotipos bacterianos NF7 y NF8, los cuales a su vez presentan homologías del orden del 51 %, 57 % y 55 % respectivamente, con *P.glacincola* ACAM 483^T, especie tipo más próxima encontrada a este nivel (Tabla 5.2.9.). En este sentido, los estudios filogenéticos del rRNA 16S han permitido establecer que NF1 y NF7, con valores de similaridad entre ellos del 99.0 %, pueden considerarse en un mismo grupo y pertenecientes a su vez a la especie *P.glacincola*, con la que presentan similaridades del 98.9 y 99.0 %, respectivamente (Figura 5.2.11). Se han encontrado algunos rasgos diferenciales entre la cepa tipo *P.glacincola* y los aislamientos NF1, NF7 y NF8, pero no se han considerado suficientemente importantes como para considerar estos biotipos pertenecientes a otro taxón.

El biotipo bacteriano NF11, al igual que el grupo de homología constituido por NF23 y EN4, no han presentado valores significativos de homología DNA-DNA respecto a las especies ensayadas del género *Psychrobacter* (Tabla 5.2.9.). Los estudios filogenéticos del rRNA 16S confirman que son representantes del género *Psychrobacter*, sin embargo, las especies más próximas a este nivel quedan alejadas por los valores de hibridación DNA-DNA, lo que sugiere que deben ser considerados como nuevas especies del género *Psychrobacter*. Han sido denominadas, NF11^T

como *Psychrobacter luti* LMG 21276^T, NF23^T como *Psychrobacter fozii* LMG 21280^T y EN4 como *Psychrobacter fozii* LMG 21272 (Bozal y col., 2003).

En la labor experimental de nuestra Memoria Doctoral también hemos estudiado dos cepas ubicadas en el género *Paenibacillus* que corresponden a los aislamientos bacterianos denominados 20CM y 20CO. Como se ha indicado en el capítulo 5.3. de resultados, se trata de formas bacterianas bacilares, Gram positivas, anaerobias facultativas, provistas de esporas elipsoidales que deforman el esporangio. Entre los biotipos 20CM y 20CO la diferencia significativa reside en el aspecto de sus colonias, pero el estudio comparado de su morfología microscópica y su perfil bioquímico ha conducido a considerarlos como representantes de la misma especie.

Como es conocido, en la segunda edición del Manual Bergey se reúne en una Sección llamada Bacilli y Lactobacilli a una amplia variedad de bacterias Gram positivas. Se establece una Clase, *Bacilli*, con dos Ordenes, *Bacillales* y *Lactobacillales*. Tradicionalmente, las bacterias bacilares, Gram positivas, formadoras de esporas, se han incluido en el género *Bacillus*. Algunos especialistas en este género como Logan y Berkeley, en 1984, desarrollaron un sistema de identificación de las especies de este género basado en la utilización del sistema API de ensayos enzimáticos y bioquímicos, pero la heterogeneidad de la fisiología, ecología y genética de sus representantes presentaba una gran complejidad para ordenar de una forma asequible a modelos bacterianos provistos de una diversidad tan grande. En efecto, aparecen representantes fijadores de nitrógeno, desnitrificantes, nitrificantes, oxidadores y reductores de Mn, acidófilos, alcalinófilos, psicrófilos y termófilos, etc. y además con un rango de G+C excesivamente amplio, nada menos que entre 32-69 mol %.

Con la llegada de abundantes datos a partir del estudio de la secuencia del rRNA 16S, el género *Bacillus* se ha conseguido ordenar de un modo más riguroso en líneas que han dado origen a nuevos géneros que todavía no están recogidos en el Manual Bergey, creando pues, dificultades a bacteriólogos no especialistas. En cambio, para los expertos en bacterias formadoras de endosporas se podrían distinguir de entrada no sólo al género *Bacillus*, sino también a *Sporolactobacillus*, que es microaerófilo y catalasa negativo, a *Clostridium*, anaeróbico y sin capacidad reductora de sulfato, *Desulfotomaculum*, anaeróbico y reductor de sulfatos, *Sporosarcina*, un coco aeróbico,

productora de catalasa, con un flagelo por célula, en parejas, tétradas o grupos más complejos y *Thermoactinomyces*, una bacteria productora de endosporas con características de actinomicetal.

Dicho esto y reiterando la importancia del análisis del rRNA 16S para este grupo bacteriano, Ash y col. (1993) proponen al género *Paenibacillus* con la finalidad de acomodar a un grupo de bacilos filogenéticamente relacionados, aerobios o anaerobios facultativos. El género comprende a unas treinta especies, obviamente relacionadas con la familia Baciláceas. Para la detección del gen del RNA 16S se ha empleado un primer específico (PAEN515F) utilizado para producir mediante PCR un amplicón de 0.8 Kb. Con este procedimiento se han diferenciado e identificado distintas especies de *Paenibacillus* relativamente recientes. Son los casos de *Paenibacillus lentimorbus* y *Paenibacillus popilliae*, patógenos para insectos. Así mismo, se han incluido en el género *Paenibacillus* las especies *Paenibacillus polymyxa* y *Paenibacillus thiaminolyticus*, buenas productoras de antibióticos. Otro aspecto interesante de algunos representantes de este género es su capacidad secretora de enzimas que degradan polímeros como la quitina y la condroitina.

Entre algunos marcadores quimiotaxonómicos significativos de este género bacteriano, cabe considerar la presencia del ácido graso mayoritario 15:0 anteiso y un contenido en G+C entre 40-54 mol % (Ash y col., 1993).

Si tomamos el biotipo 20CM como referencia, se ha podido comprobar que el estudio filogenético de la secuencia del rRNA 16S ha presentado un nivel de similitud del 99.5 % respecto a *Paenibacillus macquariensis* DSM2^T. Este resultado permite confirmar que 20CM es un miembro del género *Paenibacillus*. En cambio, los valores de similitud respecto a otras especies de *Paenibacillus* son inferiores al 97 %, límite para una posible relación a nivel de especie (Stackebrandt y Goebel, 1994). Las especies más cercanas como *Paenibacillus borealis* DSM 1388^T y *Paenibacillus odorifer* LMG 19079^T se sitúan a niveles de similitud del orden del 95.5 y 94.7 % respectivamente.

La constatación de la existencia de una nueva especie se afianza con los estudios de hibridación DNA-DNA entre *P. macquariensis* DSM 2^T y el aislamiento 20CM que ha

mostrado un nivel bajo de reasociación, 47 %, lo que sugiere que se trata de una nueva especie del género *Paenibacillus*.

Sin duda, se puede afirmar pues, que con los datos estudiados, morfológicos, fisiológicos, quimiotaxonómicos y filogenéticos, la cepa 20CM^T pertenece al género *Paenibacillus*. El análisis de hibridación DNA-DNA distingue claramente entre nuestro aislamiento y la especie *P.macquariensis* (Marshall y Ohye, 1966). Ante estas evidencias se ha propuesto que la cepa 20CM^T se asigne como la cepa tipo de una nueva especie del género *Paenibacillus*, que ha sido designada como *Paenibacillus antarcticus* LMG 22078^T.