

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA**



**AVANCES EN LA SISTEMÁTICA DEL GÉNERO**  
***Micromonospora*: ESTUDIO DE CEPAS AISLADAS DE LA**  
**RIZOSFERA Y NÓDULOS DE *Pisum sativum***

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

LORENA CARRO GARCÍA

Salamanca 2009

**MARTHA E. TRUJILLO TOLEDO PROFESOR DOCTOR CONTRATADO  
PERMANENTE DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA  
DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y EUSTOQUIO MARTÍNEZ MOLINA,  
PROFESOR CATEDRÁTICO DEL MISMO DEPARTAMENTO,**

**CERTIFICAMOS:**

Que la memoria titulada AVANCES EN LA SISTEMÁTICA DEL GÉNERO *Micromonospora*: ESTUDIO DE CEPAS AISLADAS DE LA RIZOSFERA Y NÓDULOS DE *Pisum sativum* presentada por Lorena Carro García para optar el grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, extendemos el presente certificado en Salamanca a 10 de Noviembre de 2009.

Fdo. Dra. Martha E. Trujillo Toledo Fdo. Dr. Eustoquio Martínez Molina

ÁNGEL DOMÍNGUEZ OLAVARRI CATEDRÁTICO DE MICROBIOLOGÍA Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

CERTIFICA:

Que la memoria titulada AVANCES EN LA SISTEMÁTICA DEL GÉNERO *Micromonospora*: ESTUDIO DE CEPAS AISLADAS DE RIZOSFERA Y NÓDULOS DE *Pisum sativum* presentada por Lorena Carro García para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Martha E. Trujillo Toledo y del Dr. Eustoquio Martínez Molina en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Salamanca a 10 de Noviembre de 2009.

Fdo. Ángel Domínguez Olavarri.

*Con mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han colaborado, de una forma u otra, a que este trabajo llegara a buen puerto.*



## ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	5
1.1.	Las leguminosas .....	5
1.2.	El guisante ( <i>Pisum sativum</i> ).....	6
1.2.1.	Botánica .....	6
1.2.2.	Clasificación taxonómica .....	8
1.2.3.	Desarrollo radicular y nodulación .....	9
1.2.4.	El guisante como alimento .....	11
1.3.	Actinobacterias .....	12
1.4.	Micromonospora.....	13
1.4.1.	Clasificación taxonómica .....	15
1.4.2.	Hábitat .....	18
1.4.3.	Importancia del género .....	19
1.5.	Interacción planta-microorganismo.....	20
1.6.	Biodiversidad y Taxonomía. ....	24
1.6.1.	Métodos de tipado para el estudio de la biodiversidad.....	24
1.6.2.	Avances en la taxonomía de procariotas .....	27
2.	OBJETIVOS .....	42
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
3.1.	Preparación y análisis del entorno de aislamiento de los microorganismos... 44	44
3.2.	Aislamiento de microorganismos .....	45
3.2.1.	Microorganismos aislados a partir de nódulos .....	45
3.2.2.	Microorganismos aislados a partir de la rizosfera .....	46
3.3.	Mantenimiento y conservación de las cepas.....	46
3.4.	Diversidad genética de los microorganismos aislados .....	47
3.4.1.	Microorganismos utilizados en el estudio de diversidad genética .....	47
3.4.2.	Recogida de células .....	47
3.4.3.	Extracción de ADN .....	48
3.4.4.	Perfiles de BOX-PCR.....	49
3.4.5.	Perfiles de Microsatélites.....	50
3.4.6.	Perfiles de TP-RAPD .....	51
3.4.7.	Perfiles de ARDRA .....	52
3.4.8.	Separación de los fragmentos amplificados .....	53
3.4.9.	Análisis de los resultados .....	54
3.4.10.	Análisis de escalado multidimensional.....	54
3.5.	Análisis multilocus de los microorganismos .....	55
3.5.1.	Microorganismos utilizados en el análisis multilocus.....	55
3.5.2.	Obtención de ADN genómico .....	55
3.5.3.	Preparación de las muestras para su amplificación .....	58
3.5.4.	Secuenciación del gen ribosómico 16S .....	58
3.5.5.	Secuenciación del gen que codifica la subunidad B de la girasa ( <i>gyrB</i> ) 60	60
3.5.6.	Secuenciación del gen que codifica una recombinasa ( <i>recA</i> ).....	61
3.5.7.	Secuenciación del gen que codifica la subunidad B de la ARN polimerasa ( <i>rpoB</i> ).....	62
3.5.8.	Secuenciación del gen que codifica la subunidad $\beta$ de la atp sintetasa ( <i>atpD</i> ) .....	63
3.5.9.	Separación de los fragmentos amplificados .....	63
3.5.10.	Purificación de los productos de PCR .....	64
3.5.11.	Secuenciación automática de los productos de PCR.....	65
3.5.12.	Análisis de los fragmentos secuenciados .....	66

3.6.	Estudios de hibridación ADN-ADN.....	67
3.6.1.	Extracción de ADN para la hibridación .....	67
3.6.2.	Hibridación ADN-ADN .....	69
3.7.	Estudio de quimiotaonomía.....	71
3.7.1.	Microorganismos utilizados en el análisis quimiotaonómico.....	71
3.7.2.	Recogida de células .....	71
3.7.3.	Estudio de isómeros del ácido diaminopimélico (DAP) .....	72
3.7.4.	Contenido en azúcares celulares totales .....	73
3.7.5.	Composición del perfil de menaquinonas .....	74
3.7.6.	Ácidos grasos.....	75
3.7.7.	Lípidos polares .....	76
3.8.	Estudios de fisiología .....	79
3.8.1.	Microorganismos estudiados .....	79
3.8.2.	Tinción de Gram.....	79
3.8.3.	Características del cultivo y morfología.....	79
3.8.4.	Preparación de inóculos.....	79
3.8.5.	Utilización de fuentes de carbono .....	80
3.8.6.	Pruebas de degradación e hidrólisis.....	80
3.8.7.	Pruebas de resistencia a la temperatura .....	82
3.8.8.	Pruebas de resistencia al pH .....	82
3.8.9.	Pruebas de resistencia a la salinidad.....	82
3.8.10.	Catalasa.....	83
3.8.11.	Oxidasa.....	83
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	86
4.1	Recogida de muestras y análisis del entorno.....	86
4.2	Aislamiento de microorganismos .....	89
4.2.1.	Microorganismos aislados de nódulos.....	89
4.2.2.	Microorganismos aislados de rizosfera .....	90
4.3	Estudio de la diversidad genética de los microorganismos aislados .....	96
4.3.1.	Perfiles de BOX-PCR.....	96
4.3.2.	Perfiles de Microsatélites.....	103
4.3.3.	Perfiles de TP-RAPD .....	110
4.3.4.	Perfiles de ARDRA .....	116
4.3.5.	Evaluación de las técnicas de tipado analizadas.....	128
4.3.6.	Análisis de escalado multidimensional.....	132
4.4	Filogenia del género <i>Micromonospora</i> .....	134
4.4.1.	Cepas utilizadas en el análisis de secuencias multilocus.....	136
4.4.2.	Secuenciación del gen ribosómico 16S .....	137
4.4.3.	Secuenciación del gen <i>gyrB</i> .....	147
4.4.4.	Secuenciación del gen <i>recA</i> .....	156
4.4.5.	Secuenciación del gen <i>rpoB</i> .....	164
4.4.6.	Secuenciación del gen <i>atpD</i> .....	172
4.4.7.	Análisis conjunto de los genes estudiados.....	180
4.5	Estudios de hibridación ADN-ADN.....	188
4.6	Quimiotaonomía .....	198
4.6.1.	Estudio de isómeros del ácido diaminopimélico (DAP) .....	198
4.6.2.	Contenido en azúcares celulares totales .....	201
4.6.3.	Composición del perfil de menaquinonas .....	203
4.6.4.	Ácidos grasos.....	208
4.6.5.	Lípidos polares .....	212

4.7	Estudios de fisiología .....	219
4.7.1.	Microscopía y tinción de Gram .....	219
4.7.2.	Características del cultivo y morfología.....	220
4.7.3.	Utilización de fuentes de carbono .....	226
4.7.4.	Pruebas de degradación e hidrólisis.....	233
4.7.5.	Catalasa y Oxidasa.....	238
4.7.6.	Pruebas de resistencia.....	238
5.	DISCUSIÓN GENERAL .....	245
6.	PROPUESTA DE NUEVAS ESPECIES.....	255
7.	CONCLUSIONES.....	268
8.	BIBLIOGRAFÍA .....	271
	APÉNDICE .....	292
	ANEXO I.....	302
	ANEXO II .....	387

# *INTRODUCCIÓN*

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. *Las leguminosas*

Las leguminosas son hierbas, arbustos o árboles, anuales o perennes, que forman una de las mayores familias de angiospermas, con cerca de 700 géneros y 18.000 especies, distribuidas por todo el mundo, aunque son más frecuentes en las regiones tropicales y subtropicales (Figura 1).



Fig. 1. Plantas de leguminosas.

Pertenecen a la familia *Leguminosae*, cuyo nombre deriva del latín *legumen* (semillas con vainas). Aunque algunos autores la han separado en tres familias independientes –*Caesalpiniaceae*, *Mimosaceae* y *Papilionaceae*–, seguiremos el modelo de Flora Ibérica (Castroviejo, 1999), en el que se consideran tres subfamilias (Polhill *et al.*, 1981).

Son plantas dicotiledóneas caracterizadas por poseer pétalos libres, frecuentemente en disposición papilionada, es decir, con un pétalo superior o estandarte

que envuelve a dos pétalos laterales o alas, y éstas a otros dos pétalos inferiores que en su conjunto forman la quilla, y por su fruto en legumbre.

Otra característica a destacar en las leguminosas, es su capacidad de establecer simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno en unos órganos de las raíces llamados nódulos, lo que hace que los suelos donde habitan sean más fértiles y que sean capaces

de crecer en terrenos secos, pobres en nitrógeno o calcáreos, siendo las primeras colonizadoras tras la degradación de ecosistemas.

Las leguminosas se han cultivado tanto por sus semillas o legumbres comestibles como para utilizarlas en forrajes e incluso como ornamentales. Además se pueden extraer a partir de ellas aceites, tinturas o principios activos medicinales (Castroviejo, 1999).

## 1.2. *El guisante (Pisum sativum)*

### 1.2.1. Botánica

El guisante o arveja, *Pisum sativum* L., es una especie dicotiledónea anual que pertenece a la familia de las leguminosas y se encuentra mayoritariamente en pastizales, matorrales, bordes de camino y cultivos.

Posee hojas alternas, pecioladas, paripinnadas, herbáceas, libres, semicoradas, semiamplexicaules, con nerviación pinnado-reticulada y dentadas al menos hacia la base. Están compuestas por dos o tres folíolos provistos de zarcillo que pueden tener el margen entero o irregularmente aserrado. Todas las hojas disponen de dos estípulas insertas en la base del peciolo (Figura 2).

Los tallos son ascendentes o procumbentes, redondeados y ápteros, normalmente formados por un solo tallo dominante.



Fig. 2. Ilustración de *Pisum sativum*.

Las flores son papilionáceas, pedunculadas y axilares y crecen solitarias o reunidas. Existen dos tipos de flores, blancas y coloreadas. Las primeras dan lugar a semillas amarillas o azul-verdosas, que no contienen taninos. Prácticamente todos los guisantes utilizados en Europa tanto para el consumo humano como para alimentación animal, son de flores blancas. Las variedades de flores coloreadas dan lugar a semillas de colores oscuros y siempre contienen taninos. El cultivo de este tipo de guisantes está quedando relegado exclusivamente a la producción de forraje.

El fruto es una legumbre arqueada, dehiscente, sentada, simétrica en ambas caras, algo hinchada, y polisperma, que encierra semillas (entre 6 y 10) alineadas y esféricas que pueden ser lisas o rugosas (Figura 3) (Castroviejo, 1999).

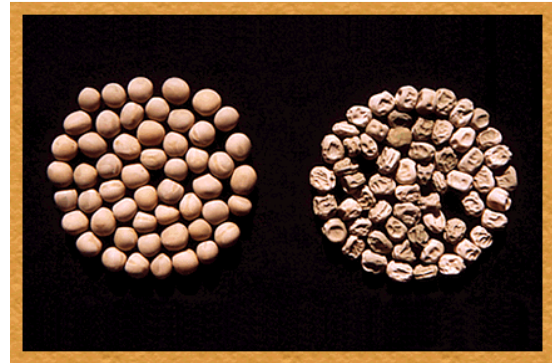


Fig. 3. Semillas de *Pisum sativum* lisas y rugosas.

El sistema radicular generalmente está compuesto por una raíz principal y por raíces laterales de primer y segundo orden. La raíz principal puede extenderse a una profundidad de 1,2 m e incluso más, las laterales se extienden regularmente a lo largo de la raíz principal, su profusión varía entre genotipos (Franco y Ramos, 1996).

*Pisum sativum* posee infinidad de nombres vulgares, se cultiva ampliamente, requiriendo terrenos de regadío, y se recolecta en verano.

La germinación de la semilla se inicia con la captación de agua, que da lugar junto al material de reserva de los cotiledones a la aparición de la radícula y de la plúmula; a partir de éstas aparecen las primeras hojas, y bajo ellas se puede apreciar el epicótilo. Los cotiledones presentan germinación hipogea, por lo que permanecen bajo el suelo mientras van cediendo sus nutrientes a la planta. La radícula presenta ya en este momento raíces secundarias y el tallo se va desarrollando de forma progresiva hacia la parte alta. Las plantas presentan un hábito de crecimiento erecto hasta la floración, momento en que comienzan a tenderse por el exceso de peso. La fecundación se

produce fundamentalmente de forma autógena dando lugar a los frutos en legumbre (Figura 4).

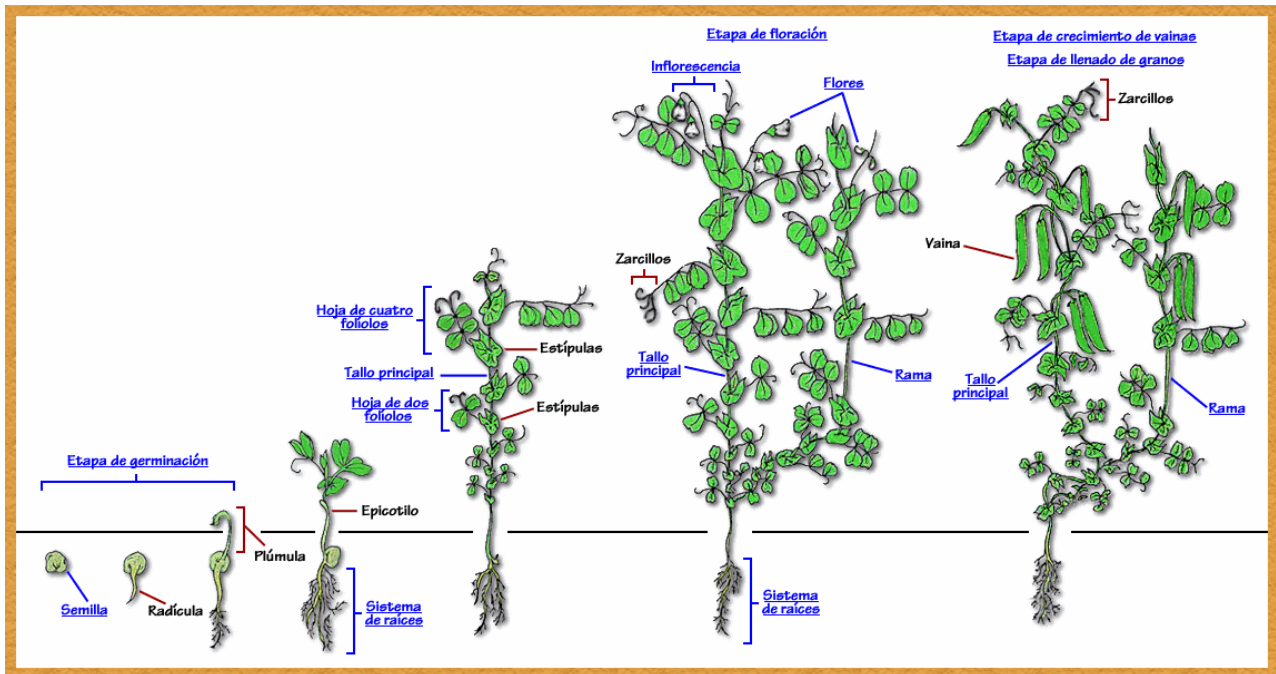


Fig. 4. Germinación y crecimiento de *Pisum sativum*.

### 1.2.2. Clasificación taxonómica

Dominio: *Eukaryota*  
 Filo: *Streptophyta*  
 Orden: *Fabales*  
 Familia: *Leguminosae*  
 Género: *Pisum*  
 Especie: *Pisum sativum*

En la actualidad solamente están reconocidas dos especies dentro del género *Pisum* (Franco y Ramos, 1996), el guisante cultivado *Pisum sativum* L., y el del Próximo Oriente Mediterráneo *Pisum fulvum* (Colonna y Mercier., 1979). Otros nombres utilizados en la clasificación específica del guisante han sido reducidos al rango subespecífico, o bien se les ha dado la categoría de sinónimos. El guisante perenne



salvaje *Pisum formosus* (Stev.) Alef. se ha clasificado como un género independiente *Vavilovia formosa* (Stev) Fed (Colonna y Mercier, 1979).

A continuación se describen las dos variedades botánicas de la subespecie *sativum*:

a) *Pisum sativum* L. ssp. *sativum* var. *sativum*: se cultiva fundamentalmente para la obtención de granos tiernos inmaduros, éstos pueden destinarse directamente al consumo humano o procesarse, ya sea para la obtención de producto congelado o enlatado. Los cultivares pertenecientes a esta variedad botánica presentan, en su mayoría, flores de color blanco. Entre los nombres comunes más importantes que se utilizan para denominar a esta variedad están los siguientes: arveja, guisante, garden pea, green pea, canning pea, pois, etc.

b) *Pisum sativum* L. ssp. *sativum* var. *arvense* (L.) Poir.: se cultiva fundamentalmente para la obtención de granos secos, los cuales pueden ser utilizados en alimentación humana o animal. Los cultivares usados con fines forrajeros corresponden también a esta variedad botánica. Las flores que presentan los cultivares de esta variedad son generalmente de color púrpura. Entre los nombres comunes más importantes que se utilizan para denominar a esta variedad, están los siguientes: arveja seca, arveja forrajera, field pea, etc.

### 1.2.3. Desarrollo radicular y nodulación

En el desarrollo radicular de *Pisum sativum*, un proceso importante que sucede, como en muchas leguminosas, es la generación de unas estructuras llamadas nódulos (Figura 5). Éstos se forman a través de una interrelación existente entre la planta y algunos microorganismos endosimbiontes. Como las plantas no son móviles el primer contacto lo realiza la bacteria aproximándose a la raíz. En ese momento emiten unos compuestos que inducen la deformación de los pelos radiculares (Hiltner y Störmer, 1903), que son los llamados factores de nodulación (factores Nod), (Lloret y Martínez-Romero, 2005). De este modo



Fig. 5. Nódulos de *Pisum sativum*.

se forma un primordio nodular, y posteriormente las bacterias penetran en la planta para infectar células primordiales y así desarrollar un nódulo efectivo.



Fig. 6. Sistema radicular nodulado en *Pisum sativum*.

Un nódulo efectivo es aquel en el que se produce la fijación simbiótica de nitrógeno, es decir, en el que se transforma el nitrógeno atmosférico en nitrógeno asimilable para la planta, y de esta manera se incorpora a la cadena trófica. Esta reacción está catalizada por un complejo enzimático denominado nitrogenasa (Van Elsas *et al.*, 1997).

Las nodulaciones son más abundantes en los primeros 10 a 30 cm de profundidad del suelo (Figura 6), donde son más favorables las condiciones de aireación. La infección por bacterias tiene lugar a través de los pelos radicales, y por tanto la iniciación de los nódulos está ligada inevitablemente a la expansión del sistema radicular (Pate, 1975). La nodulación de las raíces primarias y de las primeras laterales ocurre a expensas de las reservas de los cotiledones.

El mayor número de nódulos se produce hacia la mitad del crecimiento vegetativo, y es en torno a ese momento cuando se registra la relación más alta del peso de los nódulos respecto al peso total de la planta. Durante el crecimiento posterior hay un aumento el tamaño medio y en la eficiencia de los nódulos, que alcanza un máximo durante la floración.

Durante la maduración del fruto hay una pérdida importante de nódulos y un deterioro significativo de la raíz (Salter y Drew, 1965).

Como ocurre con otras leguminosas, la nodulación en el guisante exige unos contenidos altos de calcio en el suelo.

#### **1.2.4. El guisante como alimento**

Los guisantes han formado parte de la dieta humana y animal desde la prehistoria. En algunas regiones se ha dependido siempre de los guisantes y otras leguminosas como suministradores de proteína para complementar los cereales de su dieta (Hedrick *et al.*, 1928, Franco y Ramos, 1996). Los guisantes ya eran cultivados hace 8000 años en el Mediterráneo Oriental y en el Próximo Oriente. Formas “salvajes” y primitivas de guisante aparecen en una amplísima región. Se reconocen así cuatro posibles centros de origen (Davies, 1976; Sutcliffe y Pate, 1977): el abisinico (Etiopía), el mediterráneo (Turquía, Grecia, la antigua Yugoslavia, Líbano), el de Oriente Próximo (Irán, Irak, Cáucaso) y el de Asia Central (noreste de la India, Pakistán, Afganistán y Rusia).

A partir del siglo XVII empieza a entrar en la dieta humana del mundo occidental, primero consumidos en fresco y más recientemente en forma de enlatados y congelados. En la actualidad tiene gran importancia su consumo en fresco en los países del tercer mundo.

Los bajos rendimientos en España se deben en gran parte a que, desgraciadamente, el aumento de superficie dedicada a guisante proteaginoso no se ha visto acompañado de la presencia en el mercado de variedades comerciales adaptadas a nuestras condiciones específicas de clima semiárido (Franco y Ramos, 1996).

### 1.3. Actinobacterias

Las actinobacterias son bacterias aerobias, Gram positivas, de alto contenido en guanina-citosina (GC), que están ampliamente distribuidas en el suelo donde juegan un papel importante en la descomposición de la materia orgánica. Morfológicamente varían desde forma de cocos o hifas fragmentadas a micelio ramificado bien diferenciado; a este último grupo también se le conoce como actinomicetos. Muchas de estas bacterias asimismo son capaces de formar esporas (Figura 7). Conforman el orden *Actinomycetales*, de la clase *Actinobacteria*, que, aunque es un grupo muy diverso, posee muchas propiedades comunes. En un principio fueron clasificados como hongos, ya que poseían un micelio similar a éstos, probablemente debido a la adaptación a los mismos hábitats, sin embargo, actualmente forman parte del dominio *Bacteria*. (Trujillo, 2008).

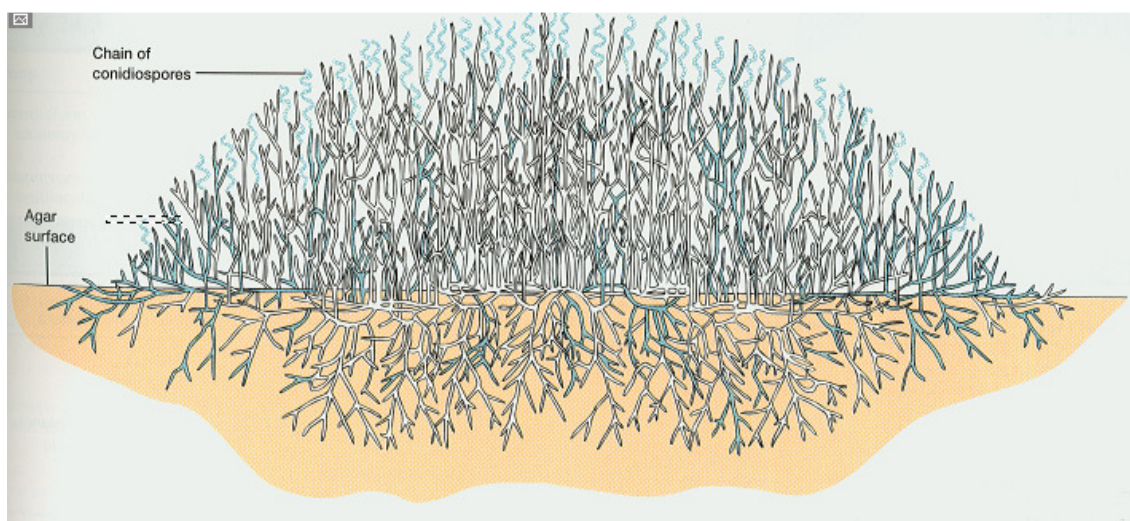


Fig. 7. Ilustración de una colonia de un actinomiceto. (Prescott *et al.*, 1999).

Las actinobacterias son microorganismos saprófitos, la gran mayoría no móviles, descritos en una amplia variedad de entornos, tanto naturales como modificados por el hombre, que pueden desarrollarse sobre un amplio rango de sustratos como tierra, material vegetal vivo o en descomposición, agua salada, agua dulce, estiércol o compost. Presentan gran diversidad metabólica, son capaces de descomponer la lignocelulosa de los residuos de plantas y se han descrito especies productoras de celulasas, xilanasas, amilasas, proteasas y ligninasas (Trujillo, 2008). A pesar de que la

mayoría de estas bacterias son saprófitas estrictas, algunas pueden formar asociaciones parasíticas o simbióticas con plantas o animales (Williams *et al.*, 1983).

La mayoría de los géneros descritos corresponden a cepas aisladas de suelos, sin embargo, en muchos de los casos no se ha estudiado cómo crecen y sobreviven en su hábitat natural. Se sabe que cuando disponen de sustratos orgánicos asequibles, éstos son colonizados rápidamente mediante crecimiento micelial que, al agotarse los nutrientes, inicia nuevamente su diferenciación y la producción de esporas. La dispersión de estas esporas en el suelo depende de los artrópodos y del movimiento del agua intersticial, en función de su forma e hidrofobicidad. Así, las esporas hidrofílicas del género *Micromonospora* se separan y dispersan en el agua más fácilmente que las cadenas de esporas hidrófobas del género *Streptomyces* (Williams *et al.*, 1983).

Los actinomicetos comparten su entorno con otras bacterias y hongos filamentosos, formando una comunidad ecológica interconectada que, normalmente, cuenta con una cantidad de sustrato limitada. Por ello se cree que, para poder sobrevivir en el medio, producen antibióticos contra otros microorganismos existentes en el suelo (Ohta *et al.*, 2001). La producción de estos antibióticos viene dada por la formación de una gran variedad de metabolitos secundarios que habitualmente no tienen un papel directo en el crecimiento o reproducción del microorganismo. La omisión de estos metabolitos no suele tener un efecto perjudicial sobre la viabilidad o el crecimiento vegetativo, sin embargo, la conservación de una rutas metabólicas tan largas y costosas sólo se justifican si los metabolitos producidos juegan algún papel esencial o beneficioso para la célula (Gräfe, 1988).

#### **1.4. *Micromonospora***

*Micromonospora* (*Mikros* = pequeño, *mono* = una y *spora* = espora), es un género de bacterias pertenecientes al orden *Actinomycetales* caracterizadas por poseer esporas únicas y carecer de micelio aéreo.

Las colonias que crecen en medios sólidos inicialmente tienen un color amarillo o naranja claro, que va cambiando a naranja, rojo, marrón, azul-verdoso o morado. Al

madurar las colonias adquieren un color progresivamente más oscuro con la producción de esporas marrón-negras, verde-negras, o negras y se vuelven mucosas.

La formación de esporas únicas en el micelio de sustrato, como ya se ha comentado, es uno de los criterios que definen el género *Micromonospora* (Figura 8), pero el crecimiento del micelio y la morfología de las esporas tienen poco valor diagnóstico para las especies. Rara vez aparecen esporas en parejas de forma longitudinal y más raramente de forma múltiple y longitudinal (Luedemann y Casmer, 1973).

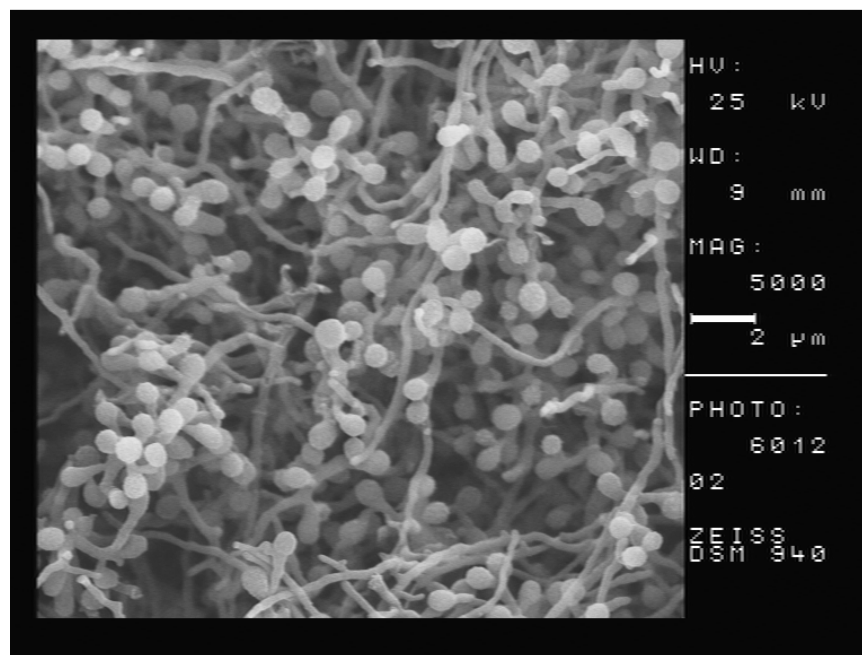


Fig. 8. Esporas de *Micromonospora* sp. Escala, 2  $\mu$ m.

Algunas especies producen pigmentos, sin embargo, éstos también carecen de valor diagnóstico a la hora de reconocer especies. Hay dos pigmentos de micelio característicos conocidos como indicadores de pH, el pigmento marrón-morado de *Micromonospora echinospora* y el pigmento azul-verdoso de *Micromonospora coerulea*. También existen otros pigmentos difusibles característicos que son producidos por otras especies (Kawamoto, 1989).

Las fuentes de carbono utilizadas por todas las especies del género descritas hasta ahora son glucosa, maltosa, sacarosa, y almidón; la mayoría son capaces de utilizar también D-xilosa, celobiosa, D-manosa y trehalosa, aunque sólo se obtiene un escaso

crecimiento o nulo en dulcitol, sorbitol, L-sorbosa o melecitosa. La utilización de carbohidratos se ve bastante afectada por el medio base utilizado.

Muchas cepas son altamente proteolíticas y celulolíticas produciendo celulasas, xilanasas o amilasas entre otras enzimas. La tolerancia media al cloruro sódico es del 3% y el máximo es del 5%. No existe crecimiento por debajo de un pH de 5,5 ni por encima de 9,5 y la mayoría de las cepas son incapaces de crecer a 45°C.

#### 1.4.1. Clasificación taxonómica

El género *Micromonospora* que es el género tipo de la familia *Micromonosporaceae* dentro del suborden *Micromonosporineae* fue descrito por primera vez en 1923 por Ørskov. En las Listas Aprobadas de Nomenclatura de 1980 (Skerman *et al.*), el género incluía 12 especies (*Micromonospora aurantiaca*, *Micromonospora brunnea*, *Micromonospora carbonacea*, *Micromonospora chalcea* –especie tipo del género-, *Micromonospora coerulea*, *Micromonospora echinospora*, *Micromonospora gallica*, *Micromonospora halophytica*, *Micromonospora inositola*, *Micromonospora purpurea*, *Micromonospora purpureochromogenes* y *Micromonospora rhodorangea*) y siete subespecies (*Micromonospora carbonacea* subsp. *aurantiaca*, *Micromonospora carbonacea* subsp. *carbonacea*, *Micromonospora echinospora* subsp. *echinospora*, *Micromonospora echinospora* subsp. *ferruginea*, *Micromonospora echinospora* subsp. *pallida*, *Micromonospora halophytica* subsp. *Halophytica* y *Micromonospora halophytica* subsp. *nigra*) que posteriormente fueron variando. El mantenimiento de estas cepas tipo se realizó de forma discontinua en la Colección Nacional de Cultivos Tipo del Reino Unido resultando imposible la recuperación de la especie *M. gallica* (Kawamoto, 1989). Durante esa década se añadieron dos especies más, *Micromonospora olivasterospora* (Kawamoto *et al.* 1983) y *Micromonospora rosaria* (Horan y Brodsky, 1986) ambas descubiertas en la búsqueda de nuevos antibióticos y descritas con posterioridad. En 1984 se unificó la especie *Micromonospora brunnea* en *Micromonospora purpureochromogenes* tras la comparación de las correspondientes cepas tipo (Szabó y Fernández, 1984).

En los años noventa se describió *Micromonospora chersina* (Tomita *et al.*, 1992) y la especie *Catellatospora matsumotoense* se reclasificó en el género *Micromonospora* como *Micromonospora matsumotoense* en base al análisis del gen ARN ribosómico 16S (Lee *et al.*, 1999).

En el inicio de la década siguiente se llevó a cabo una reclasificación del género *Micromonospora* (Kasai *et al.*, 2000), basada en los análisis de la secuencia del gen de la girasa B (*gyrB*) y experimentos de hibridación ADN-ADN, de modo que las subespecies *Micromonospora echinospora* subsp. *pallida* y *Micromonospora halophytica* subsp. *nigra* se redefinieron como especies, *Micromonospora pallida* y *Micromonospora nigra* respectivamente; y las especies *Micromonospora echinospora* subsp. *ferruginea*, *Micromonospora rhodorangea* y *Micromonospora purpurea* quedaron dentro de la especie *Micromonospora echinospora*. Asimismo, se observó que las dos subespecies de *Micromonospora carbonacea* estaban muy relacionadas y que no debían permanecer divididas en dos subespecies.

En el año 2004 se describieron las especies *Micromonospora endolithica* (Hirsch *et al.*, 2004) y *Micromonospora aurantionigra* (Thawai *et al.*, 2004), que fue renombrada en su validación como *Micromonospora auratinigra*, y durante 2005 se describieron once especies más, *Micromonospora mirobrigensis* (Trujillo *et al.*, 2005), *Micromonospora citrea*, *Micromonospora echinaurantiaca*, *Micromonospora echinofusca*, *Micromonospora fulviviridis*, *Micromonospora inyonensis*, *Micromonospora peucetia*, *Micromonospora sagamiensis*, *Micromonospora viridifaciens* (Kroppenstedt *et al.*, 2005), *Micromonospora eburnea* (Thawai *et al.*, 2005) y *Micromonospora siamensis* (Thawai *et al.*, 2005). En el año 2006 se describió la especie *Micromonospora coriaria* (Trujillo *et al.*, 2006) y en el 2007 las especies *Micromonospora lupini* y *Micromonospora saelicesensis* (Trujillo *et al.*, 2007), las tres últimas obtenidas a partir de nódulos fijadores de nitrógeno. En ese último año se describieron además *Micromonospora chokoriensis*, *Micromonospora coxensis* (Ara y Kudo, 2007) y *Micromonospora narathiwatensis* (Thawai *et al.*, 2007), mientras que en el 2008 se describieron cuatro especies más *Micromonospora rifamycinica* (Huang *et al.*, 2008), *Micromonospora chaiyaphumensis* (Jongrungruangchuck *et al.*, 2008a), *Micromonospora pattaloongensis* (Thawai *et al.*, 2008) y *Micromonospora krabiensis* (Jongrungruangchuck *et al.*, 2008b). En el 2009 se ha descrito una nueva especie



*Micromonospora pisi* (Carro *et al.*, 2009) procedente de nódulos de *Pisum sativum*, dando un total de 38 especies reconocidas de manera oficial actualmente (Tabla 1).

Tabla 1. Especies del género *Micromonospora* descritas actualmente.

ESPECIE	CÓDIGO	ORIGEN	AUTOR Y AÑO
<i>Micromonospora aurantiaca</i>	DSM 43813 <sup>T</sup>	suelo	Sveshnikova <i>et al.</i> 1969
<i>Micromonospora auratinigra</i>	DSM 44815 <sup>T</sup>	suelo	Thawai <i>et al.</i> 2004
<i>Micromonospora carbonacea</i>	DSM 43168 <sup>T</sup>	suelo	Luedemann y Brodsky 1964b
<i>Micromonospora chaiyaphumensis</i>	JCM 12873 <sup>T</sup>	suelo	Jongrugruangchok <i>et al.</i> 2008a
<i>Micromonospora chalcea</i>	DSM 43026 <sup>T</sup>	suelo, aire y medios acuáticos	(Foulerton 1905) Orskov 1923
<i>Micromonospora chersina</i>	DSM 44151 <sup>T</sup>	suelo	Tomita <i>et al.</i> 1992
<i>Micromonospora chokoriensis</i>	2-19(6) <sup>T</sup>	suelo arenoso	Ara y Kudo 2007
<i>Micromonospora citrea</i>	DSM 43903 <sup>T</sup>	fango de lago	Kroppenstedt <i>et al.</i> 2005
<i>Micromonospora coerulea</i>	DSM 43143 <sup>T</sup>	suelo	Jensen 1932
<i>Micromonospora coriariae</i>	DSM 44875 <sup>T</sup>	nódulos radicales de <i>Coriaria</i>	Trujillo <i>et al.</i> 2006
<i>Micromonospora coxensis</i>	2-30-b(28) <sup>T</sup>	suelo arenoso	Ara y Kudo 2007
<i>Micromonospora eburnea</i>	DSM 44814 <sup>T</sup>	suelo	Thawai <i>et al.</i> 2005a
<i>Micromonospora echinaurantiaca</i>	DSM 43904 <sup>T</sup>	suelo	Kroppenstedt <i>et al.</i> 2005
<i>Micromonospora echinofusca</i>	DSM 43913 <sup>T</sup>	excremento de chukar	Kroppenstedt <i>et al.</i> 2005
<i>Micromonospora echinospora</i>	DSM 43816 <sup>T</sup>	suelo	(Luedemann y Brodsky 1964a) Kasai <i>et al.</i> 2000
<i>Micromonospora endolithica</i>	DSM 44398 <sup>T</sup>	arenisca de terraza (1600 m)	Hirsch <i>et al.</i> 2004
<i>Micromonospora fulviviridis</i>	DSM 43906 <sup>T</sup>	suelo	Kroppenstedt <i>et al.</i> 2005
<i>Micromonospora halophytica</i>	DSM 43171 <sup>T</sup>	charca salina	Weinstein <i>et al.</i> 1968
<i>Micromonospora inositolata</i>	DSM 43819 <sup>T</sup>	suelo forestal	Kawamoto <i>et al.</i> 1974
<i>Micromonospora inyonensis</i>	DSM 46123 <sup>T</sup>	suelo	Kroppenstedt <i>et al.</i> 2005
<i>Micromonospora krabiensis</i>	JCM 12869 <sup>T</sup>	suelo	Jongrugruangchok <i>et al.</i> 2008b
<i>Micromonospora lupini</i>	DSM 44874 <sup>T</sup>	nódulos radicales de <i>Lupinus</i>	Trujillo <i>et al.</i> 2007
<i>Micromonospora matsumotoense</i>	IMSNU 220013 <sup>T</sup>	suelo forestal	(Asano <i>et al.</i> 1989) Lee <i>et al.</i> 1999
<i>Micromonospora mirobrigensis</i>	DSM 44830 <sup>T</sup>	agua	Trujillo <i>et al.</i> 2005
<i>Micromonospora narathiwatensis</i>	JCM 12833 <sup>T</sup>	fango de pantano	Thawai <i>et al.</i> 2008
<i>Micromonospora nigra</i>	DSM 43818 <sup>T</sup>	charca salina	(Weinstein <i>et al.</i> 1968) Kasai <i>et al.</i> 2000
<i>Micromonospora olivasterospora</i>	DSM 43868 <sup>T</sup>	arrozal	Kawamoto <i>et al.</i> 1983
<i>Micromonospora pallida</i>	DSM 43817 <sup>T</sup>	suelo	(Luedemann y Brodsky 1964a) Kasai <i>et al.</i> 2000
<i>Micromonospora pattaloongensis</i>	JCM 12394 <sup>T</sup>	manglar	Thawai <i>et al.</i> 2008
<i>Micromonospora peucetia</i>	DSM 43363 <sup>T</sup>	suelo	Kroppenstedt <i>et al.</i> 2005
<i>Micromonospora pisi</i>	DSM 45175 <sup>T</sup>	nódulos radicales de <i>Pisum</i>	Carro <i>et al.</i> 2009
<i>Micromonospora purpureochromogenes</i>	DSM 43821 <sup>T</sup>	suelo	(Waksman y Curtis 1916) Luedemann 1971
<i>Micromonospora rifamycinica</i>	DSM 44983 <sup>T</sup>	manglar	Huang <i>et al.</i> 2008
<i>Micromonospora rosaria</i>	DSM 803 <sup>T</sup>	suelo	Horan y Brodsky 1986
<i>Micromonospora saelicesensis</i>	DSM 44871 <sup>T</sup>	nódulos radicales de <i>Lupinus</i>	Trujillo <i>et al.</i> 2007
<i>Micromonospora sagamiensis</i>	DSM 43912 <sup>T</sup>	suelo	Kroppenstedt <i>et al.</i> 2005
<i>Micromonospora siamensis</i>	TT2-4 <sup>T</sup>	turba de bosque pantanoso	Thawai <i>et al.</i> 2005b
<i>Micromonospora viridifaciens</i>	DSM 43909 <sup>T</sup>	suelo	Kroppenstedt <i>et al.</i> 2005

### 1.4.2. Hábitat

Los microorganismos pertenecientes al género *Micromonospora* aparecen con cierta frecuencia en suelos, pero lo hacen en cifras relativamente elevadas en hábitats acuáticos, como lagos, lodos y sedimentos fluviales (Kroppenstedt *et al.*, 2005; Thawai *et al.*, 2005; Trujillo *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2008). Se han descrito asimismo, cepas del género *Micromonospora* aisladas de muestras de roca arenisca de la Antártida (Hirsch *et al.*, 2004).

En estudios ecológicos se ha descrito el aislamiento de cepas de este género en ambientes marinos, como arenas de playa (Watson y Williams, 1974, Zhao *et al.*, 2004, Tanasupawat *et al.*, 2009), sedimentos de las profundidades marinas (Weyland, 1969), sedimentos del mar blanco y el mar negro (Solovieva, 1972; Solovieva y Singal, 1972) y más recientemente de esponjas marinas (Zhang *et al.*, 2006; Selvin *et al.*, 2009). Se han encontrado además algunas cepas de *Micromonospora* en el tracto intestinal de termitas (Hungate, 1946; Sebald y Prevot, 1962; Kurtböke y French, 2007), y en el rumen de ovejas (Maluszynska y Janota-Bassalik, 1974; Sallam y Steinbüchel, 2009), estas cepas son anaerobias y su función en el hospedador no se conoce bien. En estos estudios no se ha confirmado que estas cepas realmente pertenezcan al género *Micromonospora*.

Más recientemente, el género *Micromonospora* se ha descrito como endófito de diversas especies vegetales, aislándose a partir de tejidos de diferentes plantas herbáceas (raíz, tallo y hojas) (Taechowisan *et al.*, 2003; Kirby y Meyers, 2009), y cepas estrechamente relacionadas con las especies “*Micromonospora yugolensis*” (Coombs y Franco, 2003b), “*Micromonospora peucetica*” o *Micromonospora endolithica* (Conn y Franco, 2004) han sido aisladas de raíces de trigo (*Triticum aestivum*).

En estudios recientes, se ha observado de forma frecuente que al realizar aislamientos de bacterias (tipo *Rhizobium*) a partir de nódulos de leguminosas, aparecían colonias en las placas de aislamiento que presentaban una morfología típica del género *Micromonospora*. En concreto, en muestras de *Lupinus angustifolius* se ha conseguido aislar a partir de los tejidos de nódulos fijadores de nitrógeno, diversas

cepas del género *Micromonospora* (Fernández-Molinero, 2005), entre ellas dos nuevas especies *Micromonospora lupini* y *Micromonospora saelicesensis* (Trujillo *et al.*, 2007). También se han aislado cepas relacionadas con “*Micromonospora aurantiaca*” de nódulos de *Casuarina equisetifolia* (Niner *et al.*, 1996; Valdés *et al.*, 2005) y, a partir de nódulos de *Coriaria myrtifolia* se ha descrito otra especie de éste género, *Micromonospora coriariae* (Trujillo *et al.*, 2006). Esto plantea la posibilidad de que estos microorganismos habiten en los nódulos de la planta y aporten un beneficio mediante la producción de metabolitos secundarios con actividad protectora frente a patógenos, o bien como promotores del crecimiento vegetal, siendo los nódulos de leguminosas una posible fuente de nuevas especies de *Micromonospora*.

### 1.4.3. Importancia del género

Una de las características que distinguen a los actinomicetos del resto de las bacterias, es la capacidad de producir un amplio espectro de metabolitos secundarios que son utilizados con fines terapéuticos por su actividad como antineoplásicos, antibióticos, inmunomoduladores o inhibidores enzimáticos entre otros.

El género *Micromonospora* posee un elevado potencial de producción de metabolitos secundarios (Fiedler *et al.*, 2005; Antal *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2009). A partir de este género se han obtenido importantes antibióticos tales como aminociclitolos (gentamicinas y sisomicinas), macrólidos (mycinamicina y rosamicina) y antibióticos polisacáridos (everninomicina) (Lazzarini *et al.*, 2000). La gentamicina se obtuvo de *Micromonospora purpurea* en 1958 y la sisomicina de *Micromonospora inyonensis* (“*Micromonospora inyoensis*”) en 1978. Entre las sustancias pertenecientes al grupo de los antitumorales se encuentran algunos ejemplos como la calicheamicina, aislada en 1987 por Lee *et al.* de la bacteria “*Micromonospora echinospora* subsp. *calichensis*”, encontrada en una muestra de suelo calizo proveniente de Texas (EEUU) (Lee *et al.*, 1987; Maiese *et al.*, 1989), la dinemicina A, que fue aislada en 1989 de la bacteria *Micromonospora chersina* por el grupo Myers Squibbs (Miyoshi-Saitoh *et al.*, 1991) y más recientemente la retimicina, la galtamicina y la saquayamicina (Antal *et al.*, 2005) o la lupinamicina, aislada a partir de *Micromonospora lupini* (Igarashi *et al.*, 2007).

Se ha descrito también el aislamiento de especies de *Micromonospora* con potencial para el control biológico debido a su capacidad para suprimir el crecimiento de los hongos fitopatógenos *Pythium* spp. y *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, (El-Tarabily *et al.* 1997; Coombs *et al.* 2003b).

### **1.5. Interacción planta-microorganismo**

En los últimos años se ha observado un gran interés a nivel mundial en el estudio de las interacciones planta-microorganismo, fundamentalmente con el objetivo de generar nuevos conocimientos básicos aplicables a los sistemas de producción.

La rizosfera es el volumen de suelo que recibe influencia de la raíz de las plantas (Hiltner y Störmer, 1903). Esa zona se presenta como un ambiente favorable para el desarrollo de una amplia variedad de microorganismos que forman parte de esa microbiota del suelo, y, cuando se analizan muestras de estas zonas suelen presentar un número más elevado de microorganismos que los mismos suelos en las zonas que carecen de plantas. Muchos microorganismos penetran en las raíces de las plantas ya que éstas le proporcionan un lugar apropiado para su desarrollo, al ser ricas en nutrientes orgánicos y factores de crecimiento requeridos por los heterótrofos, y suministrar condiciones relativamente constantes de pH y presión osmótica en un hábitat, el suelo, en el que la presencia de nutrientes y agua puede variar enormemente. Sin embargo, los límites de dependencia entre microorganismo y planta son difíciles de determinar (Azevedo *et al.*, 2000), ya que existen distintos tipos de relaciones, con beneficio mutuo, beneficio unilateral o sin beneficio conocido.

De éste modo, en el medio rizosférico existe una compleja interacción entre la planta, los microorganismos y el suelo; dando lugar a una serie de beneficios mutuos entre la parte biótica y con una importante intervención de la parte abiótica.

La planta genera beneficios sobre la microbiota cuando la raíz exuda azúcares, como monómeros o polisacáridos, aminoácidos y ácidos orgánicos que son aprovechados por las poblaciones microbianas. Los componentes del exudado,

dependiendo de su naturaleza, pueden participar en la activación de los genes microbianos responsables de la iniciación de la asociación simbiótica.

Los microorganismos rizosféricos tienen también efecto sobre el crecimiento de las plantas: incrementan el reciclaje y la solubilización de nutrientes minerales, aportan por síntesis vitaminas, aminoácidos, auxinas, citoquininas y giberelinas que estimulan el crecimiento de la planta. De este modo, los microorganismos pueden verse como agentes biológicos útiles para los cultivos y susceptibles, por tanto, de ser utilizados como biofertilizantes por su potencial de favorecer la nutrición de las plantas y como elicitores de resistencia sistémica frente a patógenos.

La composición inorgánica del suelo también influye sobre la planta y la microbiota. Del tipo de suelo dependen el contenido de humedad y la aireación, que a su vez influyen notablemente en la colonización microbiana.

Dentro de los microorganismos, los endófitos son los que tienen una relación más estrecha con la planta, estos se definen como aquellos que en "alguna etapa" de su ciclo de vida permanecen asintóticamente dentro de la planta hospedadora. Los endófitos se introducen en la planta principalmente a través de la raíz al comienzo de la germinación o a través de las raíces secundarias. Existe una elevada biodiversidad entre los endófitos de plantas, que se ve influenciada por la especie, el género, el tipo de tejido y la etapa de desarrollo en la que se encuentra la planta, además de la influencia que ejercen otros factores ecológicos como el suelo o el agua entre otros (Conn y Franco, 2004).

Dos ejemplos destacables dentro de los endosimbiontes que establecen una relación de beneficio mutuo con la planta son las bacterias del suelo *Frankia* y *Rhizobium* (Figuras 9 y 10), que fijan nitrógeno atmosférico en los nódulos que forman en sus respectivas plantas hospedadoras. De este modo, la planta consigue cubrir sus necesidades de nitrógeno y la bacteria obtiene un hábitat adecuado con los nutrientes que necesita. Las bacterias del género *Rhizobium* son bacilos Gram negativos pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae* del orden de los *Rhizobiales*, que forman simbiosis con leguminosas y una especie de la familia *Ulmaceae*. El género *Frankia* agrupa a bacterias filamentosas Gram positivas que pertenecen a la familia *Frankiaceae*

del orden de los *Actinomycetales* y forman simbiosis con algunas angiospermas denominadas plantas actinorrizas.

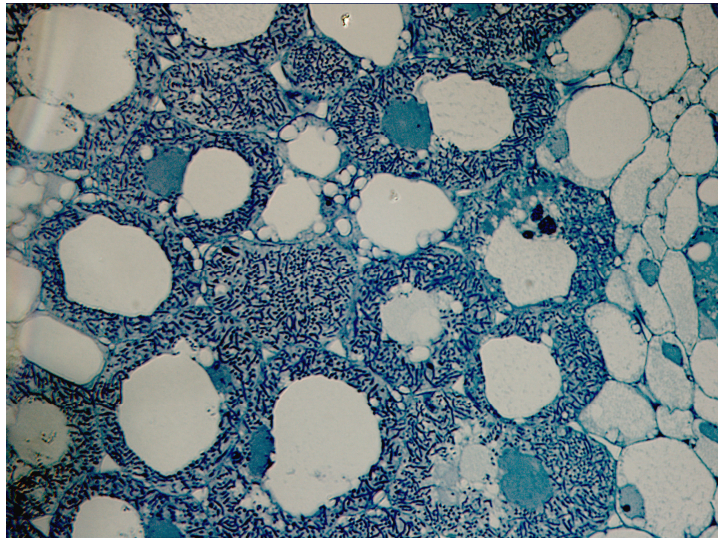


Fig. 9. Bacteroides de *Rhizobium* en nódulos.

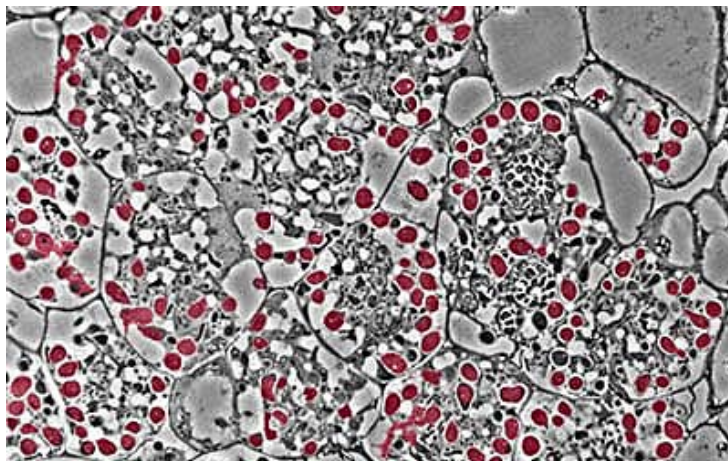


Fig. 10. Vesículas de fijación de *Frankia* en nódulos.

Existen diferencias entre los nódulos de ambas simbiosis y también en la disposición de los genes que codifican para la nitrogenasa (enzima a través de la cual se lleva a cabo la fijación de nitrógeno), que está en el cromosoma en cepas de *Frankia* (Normand *et al.*, 1988) y en un megaplásmido en *Rhizobium*. Sin embargo, el proceso de infección y el de fijación de nitrógeno son similares (Pawloski *et al.*, 1996). El primer reconocimiento entre *Rhizobium* y las leguminosas se lleva a cabo mediante la liberación por la planta de algunos compuestos conocidos como flavonoides (Hirsch, 1992). Algunos estudios sugieren que esto puede ocurrir también en la simbiosis actinorrízica (Berry, 1994).

Más recientemente se han descrito nuevas interacciones planta-microorganismo. El aislamiento de distintos grupos de actinobacterias a partir de nódulos radicales de fijación de nitrógeno y otras zonas de la raíz, indican que los hospedadores ofrecen beneficios a estas plantas. Como ya se ha descrito en el apartado 1.4.2, se ha observado la presencia de actinobacterias del género *Micromonospora* como endófitos de plantas sanas de *Triticum aestivum* (Coombs y Franco, 2003b), de *Tulbaghia violacea* (Kirby y Meyers, 2009), de *Casuarina equisetifolia* (Valdés *et al.*, 2005) y en nódulos de diversas plantas de *Lupinus angustifolius* (Fernández-Molinero, 2005; Trujillo *et al.*, 2007) y *Coriaria myrtifolia* (Trujillo *et al.*, 2006).

Por otro lado, los datos aportados por Valdés *et al.* (2005) sobre la capacidad de fijar nitrógeno en vida libre de una cepa aislada de nódulos de *Casuarina equisetifolia* e identificada como *Micromonospora* sp. sugieren la posibilidad de que un grupo muy selecto de actinomicetos, además de *Frankia*, sean capaces de fijar nitrógeno en interacción con plantas.

Se han aislado cepas de *Streptomyces* endófitas a partir de raíces esterilizadas en superficie de 28 especies de plantas diferentes (Sardi *et al.*, 1992), y se ha logrado su visualización sobre el tejido radical (Figura 11) (Coombs y Franco, 2003a). Además se han visto beneficios de la interacción *Streptomyces-Rhizobium*-leguminosa en plantas de *Pisum sativum*, en las que se producía una mejora tanto en crecimiento como en salud en las plantas inoculadas con *Streptomyces+Rhizobium* en comparación con las plantas control en las que se inoculó sólo *Rhizobium*; aumentando la frecuencia de nodulación, el tamaño medio de los nódulos y el vigor y número de bacteroides de *Rhizobium* en su interior, e incrementando a su vez la asimilación de hierro y probablemente de otros nutrientes del suelo.

De este modo, mediante la colonización de las raíces y los nódulos, *Streptomyces* puede actuar como una bacteria promotora del crecimiento en plantas (Tokala *et al.* 2002).

Así mismo, también se ha observado más recientemente este proceso de promoción del crecimiento vegetal en plantas de *Arabidopsis thaliana*, tanto de cepas del género *Streptomyces* como en cepas del género *Micromonospora* (Conn *et al.*, 2008). En este



estudio se observó la capacidad de estas actinobacterias para activar los mecanismos de defensa de las plantas, que variaba según las condiciones a las que estuvieran expuestos.

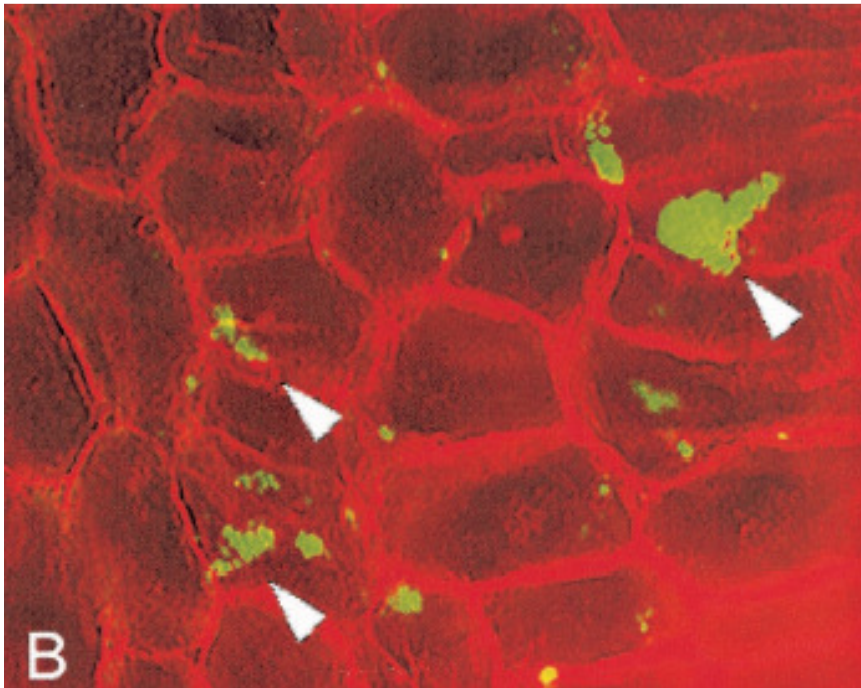


Fig 11. Microcolonias de *Streptomyces* en tejido de trigo (Coombs y Franco, 2003a).

## **1.6. Biodiversidad y Taxonomía.**

Se sabe muy poco sobre la diversidad de los microorganismos que constituyen los ecosistemas naturales y artificiales. La imposibilidad de cultivar la gran mayoría de los microorganismos que existen en la naturaleza (>99%) mediante las técnicas estándares ha constituido una de las principales limitaciones en el estudio de la diversidad microbiana. Sin embargo, las nuevas técnicas de identificación y clasificación moleculares han permitido superar muchas de estas barreras, haciendo posible el estudio ecológico de las comunidades microbianas (Stahl, 1995).

### **1.6.1. Métodos de tipado para el estudio de la biodiversidad**

Se han desarrollado numerosas técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para determinar la diversidad genética de microorganismos aislados



de muestras ambientales. A este tipo de técnicas se las conoce como métodos de genotipado. En todos ellos, los perfiles de ADN que resultan de la amplificación por PCR se visualizan en geles de agarosa tras una separación electroforética, obteniendo de este modo huellas moleculares que permiten agrupar a los microorganismos altamente relacionados y conocer así la variabilidad intraespecífica (Welsh y McClelland, 1990; Caetano-Anolles *et al.*, 1991).

Se han desarrollado para ello una serie de métodos que permiten la caracterización y comparación de los diferentes microorganismos mediante la obtención de patrones específicos a partir de información derivada de su genoma. Estos patrones se obtienen mediante diversas técnicas, como la digestión del ADN genómico con enzimas de restricción (RFLPs), la amplificación del ADN genómico con oligonucleótidos inespecíficos (RAPDs), la amplificación del ADN ribosómico con oligonucleótidos específicos y su posterior digestión con enzimas de restricción (ARDRA) o la amplificación con oligonucleótidos específicos de regiones que aparecen repetidas a lo largo del genoma bacteriano (rep-PCR) entre otras posibilidades (Wawrik *et al.*, 2007; Ninawe *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2005; Gu *et al.*, 2006). Adicionalmente, la comparación de cada patrón individual con el de microorganismos conocidos permite su asociación a distintos grupos taxonómicos.

Específicamente, la rep-PCR es una técnica desarrollada a partir de la PCR en la que se amplifican regiones que aparecen repetidas a lo largo del genoma bacteriano (repetitive PCR) (Versalovic *et al.*, 1991). Dependiendo de los elementos repetidos en la bacteria que amplifiquemos, podemos distinguir tres tipos de rep-PCR, en cada uno de los cuales se utiliza un cebador diferente. La primera, REP-PCR (Repetitive extragenic palindromic) que es una secuencia de entre 35 y 40 pares de bases de elementos palindrómicos repetidos, la segunda, ERIC-PCR (Enterobacterial repetitive intergenic consensus) que es una secuencia de entre 124 y 127 pares de bases que están diseñados a partir de elementos consenso intergénicos repetitivos de enterobacterias y la tercera, BOX-PCR, que son elementos de 154 pares de bases repetidos en el genoma bacteriano. El uso de estos cebadores en la PCR realiza una amplificación selectiva de las distintas regiones genómicas localizadas entre las secuencias de REP, ERIC o BOX. (Bruijn *et al.*, 1996).

Los patrones obtenidos mediante BOX-PCR son específicos para cada cepa bacteriana, de modo que estos patrones se pueden comparar para estimar grados de similitud entre distintas cepas y ayudar a la determinación de los microorganismos aislados que puedan ser clones, ya que reflejan una estructura genómica específica para cada cepa. Esta técnica fue la primera en la que se describieron elementos repetidos en un organismo Gram positivo. En principio se describieron tres subunidades diferentes para elementos de BOX, boxA (59 bp), boxB (45 bp) y box C (50 bp) (Martin *et al.*, 1992), aunque se vio que solo el boxA aparecía altamente conservado en bacterias (Versalovic *et al.*, 1994). La técnica de BOX-PCR se ha utilizado con éxito en el estudio de un género tan complejo como es *Streptomyces*, resultando una técnica rápida y altamente reproducible a la hora de reducir el número de cepas que representan diferentes especies siendo realmente una misma especie de este género. Además, las comprobaciones realizadas mediante hibridación ADN-ADN, corroboraron los resultados obtenidos (Lanoot *et al.*, 2004). Más recientemente también se ha descrito el uso de esta técnica para el género *Micromonospora* (Maldonado *et al.*, 2008), encontrando una alta correlación entre los grupos obtenidos a través de BOX-PCR y los resultados de la secuenciación del gen ribosómico 16S.

Otra técnica a destacar es la de Microsatélites, técnica incluida dentro de las conocidas como RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) (Williams *et al.*, 1990). Esta técnica se utiliza también para la diferenciación a nivel de cepa, por lo que es un buen indicador de la diversidad existente. El análisis de los perfiles de microsatélites es utilizado en la caracterización taxonómica tanto bacteriana como a nivel eucariota (Huey y Hall, 1989; Andrighetto *et al.*, 2000 y Libkind *et al.*, 2003), lo que le diferencia de otras de las técnicas utilizadas. En este caso se realiza un estudio de la diversidad microbiana por las diferencias encontradas en el número de unidades repetidas a lo largo del genoma. Este tipo de técnicas de amplificación de ADN al azar, se consideran de gran utilidad a la hora de manejar un alto número de aislados, al igual que en el caso de la técnica de BOX-PCR. En este caso se utiliza un oligonucleótido de corta longitud que anilla a bajas temperaturas, que es el M13, obtenido a partir de una región del genoma del bacteriófago M13 (Huey y Hall, 1989). Este oligonucleótido permite amplificar diversas regiones del genoma complementarias en el cromosoma, obteniéndose moléculas de ADN de distintos tamaños. Las variaciones en las secuencias de nucleótidos en las zonas de unión (sustituciones, inserciones, deleciones)

conlleven la presencia o ausencia de bandas en los perfiles generados. Esta técnica ha sido utilizada con anterioridad en actinobacterias (Kapoe *et al.*, 2007) y en el caso de *Micromonospora* se ha empleado en los trabajos de Cerda (2008) y Rodríguez (2008).

Otra técnica utilizada en la clasificación bacteriana es la de los TP-RAPD (Two primers-RAPD). En ella se realiza una amplificación a partir de dos oligonucleótidos complementarios de regiones altamente conservadas del ADN ribosómico 16S (Iguar *et al.*, 2003; Rivas *et al.*, 2001; Rivas *et al.*, 2002), que es lo que le aporta mayor especificidad al método. Su utilidad se ha visto en diferentes tipos de bacterias, incluidas las actinobacterias (Velázquez *et al.*, 2008) y también en el caso concreto de *Micromonospora* se ha utilizado en los trabajos de Fernández-Molinero (2005) y Rodríguez (2008).

Los perfiles de ARDRA se obtienen a partir de la digestión con enzimas de restricción de los productos de PCR amplificados para el gen ribosómico 16S. Esto le confiere una gran especificidad al método, ya que se parte de la propia secuencia que se utiliza mayoritariamente en la clasificación bacteriana. La elección de las enzimas a utilizar es clave a la hora de obtener buenos resultados, ya que un número excesivo o demasiado escaso en el número de bandas obtenidas puede dificultar enormemente el análisis. Un número adecuado sería entre 4 y 5 bandas por enzima utilizada, siendo necesario el empleo de más de una para poder interpretar los resultados a nivel de especie. El uso de dos a cuatro enzimas es un número aceptable para el análisis de acuerdo a los resultados de Lanoot *et al.* (2005) y Álvarez *et al.* (2008). En actinomicetos se ha utilizado con anterioridad (Álvarez *et al.*, 2008), sin embargo, para el caso del género *Micromonospora* no se han realizado este tipo de estudios.

### **1.6.2. Avances en la taxonomía de procariontas**

La Taxonomía es la ciencia de la clasificación biológica, y surge como una necesidad de dar sentido a la alta diversidad de organismos existente, para agrupar a los que poseen características similares; de este modo, la taxonomía bacteriana se ocupa de la clasificación, nomenclatura e identificación de las bacterias.

Aunque la taxonomía numérica convencional ha sido el método más efectivo a la hora de establecer relaciones por debajo del nivel de género, la taxonomía basada en las propiedades químicas, morfológicas y fisiológicas dio como resultado la asignación de bacterias a grupos supragenéricos de los cuales se demostró posteriormente una composición heterogénea (Goodfellow, 1989). De hecho, fue sólo a partir de la introducción de estudios de ácidos nucleicos cuando la clasificación supragenérica fue posible. Esta clasificación agrupa a los organismos en base a sus relaciones evolutivas formando un sistema filogenético. Desde la aparición en 1859 de “El origen de las especies” de Darwin, los biólogos comenzaron a desarrollar sistemas de clasificación filogenéticos o filéticos, los cuales se basan en las relaciones evolutivas en lugar de la apariencia general. En un principio, este sistema resultó de difícil aplicación para bacterias y otros microorganismos, principalmente debido a la falta de un buen registro fósil. Sin embargo, la comparación directa tanto del material genético y los productos génicos, como del ARN y las proteínas, permite superar muchos de estos problemas. Una clasificación basada en relaciones genómicas presenta una serie de ventajas, como la estabilidad del sistema de clasificación, su eficacia como sistema de identificación y la obtención de información útil que permita entender cómo han evolucionado varios grupos de bacterias y cómo pueden ser clasificados según sus relaciones ancestrales.

Tanto la taxonomía numérica como el estudio mediante ácidos nucleicos quedan recogidos en lo que se conoce como taxonomía polifásica, que es un método taxonómico que clasifica, nombra e identifica los organismos recogiendo toda la información procedente de los métodos tradicionales de cultivo y de las nuevas tecnologías de genética molecular, teniendo su origen en tres fuentes: los métodos clásicos, los experimentos de hibridación ADN-ADN (con los que se determina la similitud entre ADN de hebra sencilla de cepas de especies cercanas) y el estudio de la similitud entre las secuencias de ARNr 16S, que muestran el grado de variación de las secuencias entre cepas a nivel de género (Vandamme *et al*, 1996).

### **1.1.1 Métodos moleculares**

#### **(a) *Gen ribosómico 16S***

El desarrollo de herramientas de identificación basadas en la detección de secuencias específicas para grupos taxonómicos logró un punto de inflexión en la

determinación de la evolución y filogenia de los procariotas. Los genes ribosómicos son los más estudiados y los más abundantes en las bases de datos de secuencias debido a su importancia taxonómica. El operón ribosómico se transcribe en un pre-ARN que incluye los siguientes componentes en el orden (5'-3'): ARN 16S, ARNt, ARNr 23S, y el ARNr 5S. Se comenzó estudiando la molécula ARNr 5S y, tras los estudios de Woese y Olsen (1986) sobre evolución de microorganismos, se empezó a utilizar el gen ARNr 16S y el gen ARNr 23S para el estudio de la taxonomía y la filogenia bacteriana. Sin embargo, el ARN ribosómico 5S se ve limitado por su pequeño tamaño a la hora de establecer relaciones filogenéticas (120 nucleótidos), mientras que los 3000 pares de bases del ARN ribosómico 23S dificultan su manejo. Así, la molécula intermedia (1500 pares de bases) que resulta más adecuada como cronómetro evolutivo es el ARN ribosómico 16S. Esta molécula presenta una serie de características que la adecuan para esta función: gran cantidad de ARNr en las células, amplificación en una sola etapa, funcionalidad constante, un rango muy conservado y gran disponibilidad de bases de datos para el análisis comparativo de la secuencia. Además, actualmente, la definición de un nuevo género o especie requiere la obtención de la secuencia de la molécula ARNr 16S completa o casi completa, el alineamiento de dicha secuencia con secuencias de referencia y la determinación de la relación filogenética del taxón con el que el organismo se agrupe.

Sin embargo, con la acumulación de secuencias diferentes de los operones ribosómicos de distintos organismos, se ha cuestionado la homogeneidad de estos genes. Hay cepas que en los experimentos de reasociación ADN-ADN presentan un grado de homología suficientemente bajo como para justificar la existencia de dos especies diferentes y que, por el contrario, tras el análisis de las secuencias de sus ARNr 16S, éstas resultan idénticas. Estos resultados apoyan que una alta similitud de las secuencias del ARNr 16S puede no ser necesariamente un criterio válido que garantice que dos microorganismos pertenezcan a la misma especie. Por lo tanto, si bien las secuencias del ARNr 16S pueden ser utilizadas rutinariamente para distinguir y establecer relaciones entre géneros y especies bien definidas, en el caso de especies cuya divergencia es muy reciente estas diferencias pueden no ser reconocidas (Fox *et al.*, 1992).

El análisis filogenético ha tenido cada vez mayor peso en taxonomía, y en 1997, Stackebrandt *et al.* propusieron una nueva clasificación supragenérica para actinomicetos basada únicamente en relaciones filogenéticas. En lugar de utilizar una amplia variedad de propiedades quimiotaxonómicas, morfológicas y fisiológicas como se viene haciendo para el género y la especie, la clasificación se fundamentó únicamente en las agrupaciones filogenéticas basadas en las secuencias del gen ARNr 16S. Definiendo así una nueva clasificación de los géneros filogenéticamente cercanos que se agrupan en familias, subórdenes, órdenes, y subclases hasta llegar a una nueva jerarquía, la clase *Actinobacteria*, independientemente de las características fenotípicas sobre las que se basó la clasificación del taxón en el pasado. Y no se hizo una revisión completa de nuevo hasta el trabajo de Zhi *et al.*, (2009), en el que se propusieron dos nuevos subórdenes y cuatro nuevas familias además de la corrección de otros taxones ya descritos. En este caso, además del gen ribosómico 16S, se analizaron otros genes esenciales de cepas de actinobacterias cuyos genomas están secuenciados.

**(b) Caracterización a través del análisis de genes esenciales. Análisis multilocus.**

El análisis de secuencias multilocus (MLST – “Multilocus Sequence Typing”) consiste en la utilización de varias secuencias de forma concatenada o no en los análisis filogenéticos. Para ello, además del gen ribosómico 16S, se suelen utilizar genes altamente conservados que codifican para proteínas. Este método se ha utilizado con éxito en la caracterización de patógenos bacterianos, y en el análisis de grupos muy diversos de bacterias como *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Haemophilus* y *Streptomyces*, ya que es fácilmente reproducible y se ha demostrado su eficiencia tanto a nivel interespecífico como a nivel intraespecífico (Guo *et al.*, 2008).

La pertenencia de una nueva cepa a la clase *Actinobacteria* requiere valores de similitud de la secuencia del ARNr 16S superiores al 80%. Esto deriva del sistema de clasificación, y por lo tanto se determina por los organismos que están presentes en cada grupo. La realización de nuevos estudios a partir de otros genes conservados en los mismos microorganismos que se agrupan mediante el análisis del ARNr 16S, permitirá validar la nueva estructura jerárquica propuesta. El uso de estos genes conservados, también conocidos como genes de mantenimiento celular (“housekeeping genes”), cuya

secuencia codifica proteínas de carácter imprescindible para el mantenimiento celular, se ha propuesto en numerosas ocasiones para la clasificación bacteriana, sobretodo en los últimos años (Zeigler *et al.*, 2003; Stackebrandt *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2008). Su uso se ha generalizado gracias a los avances tecnológicos en la secuenciación de ADN, lo que hace que este método sea relativamente rápido y no muy caro. Además de ser altamente reproducible, las secuencias están disponibles en las bases de datos para su uso por otros grupos de investigación (Zeigler *et al.*, 2003). En el año 2002, Stackbrandt *et al.*, propusieron el uso de cinco genes que se encontraran en diferentes *loci* cromosómicos y ampliamente distribuidos para distinguir una especie bacteriana. Un ejemplo de genes que cumplan estas características y ampliamente utilizados en taxonomía son: el gen que codifica para la subunidad B de la girasa (*gyrB*), el gen que codifica para una recombinasa (*recA*), el gen que codifica para la subunidad B de la ARN polimerasa (*rpoB*) y el gen que codifica para la subunidad  $\beta$  de la ATP sintetasa (*atpD*); todos ellos alejados entre sí y respecto al gen ribosómico 16S en el cromosoma.

El gen *gyrB* fue fundamental en la reclasificación llevada a cabo por Kasai *et al.*, en el año 2000 para el género *Micromonospora*, mostrando su utilidad a la hora de diferenciar cepas pertenecientes a especies cercanas, siendo más resolutivo que el gen ribosómico 16S y presentando una coincidencia elevada con los resultados obtenidos para la hibridación ADN-ADN. Ejemplos de la utilización de este gen son: *Pseudomonas* (Yamamoto y Harayama, 1995), *Acinetobacter* (Yamamoto y Harayama, 1996), *Streptomyces* (Hatano *et al.*, 2003) o *Gordonia* (Shen *et al.*, 2006) entre otros.

El gen *recA* presenta por regla general unos resultados más similares al gen ribosómico 16S. Este gen, que codifica parte del sistema de recombinación homóloga y de reparación del ADN, ha sido ampliamente utilizado en cepas Gram negativas (Gaunt *et al.*, 2001; Vinuesa *et al.*, 2005; Rivas *et al.*, 2009) y también ha sido útil en la clasificación de diferentes bacterias Gram positivas (Blackwood *et al.*, 2000; Maréchal *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 2006).

El gen *rpoB* se ha utilizado de forma habitual en el análisis de secuencias multilocus en los últimos tiempos, en cepas de *Streptomyces* (Guo *et al.*, 2008), *Mycobacterium* (Adekambi *et al.*, 2004; Adekambi *et al.*, 2006; Gomila *et al.*, 2007), *Microbacterium*

(Richert *et al.*, 2005), *Aureobacterium* (Richert *et al.*, 2007) o *Corallocooccus* (Stackebrandt *et al.*, 2007) entre otras.

El gen *atpD* es esencial en la producción de energía y se aplica frecuentemente en el análisis de bacterias Gram negativas (Ramirez-Bahena *et al.*, 2008; Rivas *et al.*, 2009) en el que suele presentar una distribución bastante relacionada a la ofrecida por el gen ribosómico 16S. También se ha utilizado para bacterias Gram positivas como *Bifidobacterium* (Ventura *et al.*, 2004) o *Streptomyces* (Guo *et al.*, 2008).

### **(c) Hibridación ADN-ADN**

La abundante información que existe en la macromolécula de ADN reside en la secuencia de nucleótidos existente en los genomas bacterianos y, aunque encaminados en esta dirección, todavía no es factible contar con esta información a nivel general. Por ello, la comparación de secuencias de nucleótidos mediante el emparejamiento ADN-ADN es la única forma indirecta de medir el porcentaje de bases complementarias entre dos genomas diferentes.

Con la especificidad que aporta la formación de pares de bases, la secuencia de bases de una cadena de ADN determina la secuencia de la cadena complementaria. Las cadenas complementarias pueden separarse por calor o por tratamientos alcalinos, pero bajo las condiciones adecuadas, pueden reasociarse dando la molécula original de doble cadena. Los estudios de homología del ADN usan esta propiedad de renaturalización del ADN de modo que los ácidos nucleicos de cepas estrechamente relacionadas pueden llegar a tener un reagrupamiento casi completo, mientras que, si se producen escasas formaciones dobles, nos indica que existe baja homología y, por lo tanto, baja relación genética entre las cepas (Goodfellow y Minnikin, 1985). En general, se considera que con relaciones por encima de un 70% de homología dos cepas pertenecen a la misma especie, mientras que si el nivel de homología es inferior al 70% estamos hablando de especies diferentes (Wayne *et al.*, 1987). Este es el método genotípico aceptado a la hora de definir especies, y constituye un requisito en las nuevas descripciones cuyo porcentaje de similitud del gen ribosómico 16S con respecto a la cepa tipo más cercana es superior al 97% (Stackebrandt *et al.*, 2002 y Bishop *et al.*, 2009).



El problema está en que esta técnica es larga y costosa (Johnson, 1994), además de no ser muy reproducible entre diferentes laboratorios, y este valor de corte no siempre es adecuado para todas las poblaciones bacterianas (Goris *et al.*, 2007 y Stackebrandt y Ebers, 2006). Por otro lado, los datos obtenidos no pueden almacenarse en una base de datos.

#### **2.4.1.1. Métodos clásicos**

Al inicio de la identificación de cepas aisladas la morfología y las propiedades fisiológicas se utilizaron ampliamente. Existen una serie de rasgos morfológicos que permitían identificar los actinomicetos, incluyendo la estructura del micelio, tanto aéreo como vegetativo, las características de estructuras de diferenciación, el tipo de esporas y la presencia de otras estructuras poco comunes (Lechevalier, 1989). Sin embargo, utilizando estos rasgos como único criterio, resultaba difícil una clasificación de los actinomicetos en grupos coherentes.

Ante la dificultad de llevar a cabo una identificación sistemática basada exclusivamente en características morfológicas y metabólicas, y ante la acumulación de evidencias de que la clasificación que se estaba realizando conducía a incoherencias, se desarrolló la quimiotaxonomía como sistema alternativo para la clasificación bacteriana. La quimiotaxonomía se basa en la utilización de ciertos componentes de organismos o de fracciones celulares para clasificar e identificar bacterias. Existe una amplia gama de métodos químicos para determinar los componentes celulares mayoritarios de microorganismos completos.

##### **(a) *Quimiotaxonomía***

La quimiotaxonomía, o química taxonómica, es el estudio de las variaciones químicas de los organismos vivos y el uso de estas características en la clasificación y la identificación de los mismos. También se puede definir como el establecimiento de la distribución que existe de las macromoléculas y otros componentes celulares específicos (aminoácidos, azúcares, lípidos, etc.) y que pueden ser usados con fines de identificación. Inicialmente, muchos de los caracteres químicos utilizados eran subproductos del metabolismo y no fue sino hasta la llegada de técnicas cromatográficas

muy sensibles que la quimiotaxonomía se hizo parte integral de las técnicas de diagnóstico. Los métodos químicos varían en velocidad y facilidad de aplicación, pero pueden proporcionar datos importantes para la identificación de microorganismos. Sin embargo, es importante tener en mente que aún los mejores métodos quimiotaxonómicos pueden parecer inútiles si las cepas de referencia están mal clasificadas o no son cultivos puros. Ciertas diferencias químicas pueden tener mayor importancia taxonómica que otras, de modo que la sustitución de lisina en los peptidoglicanos por ornitina (un aminoácido muy similar químicamente), es probablemente menos significativa que la sustitución por un componente químico muy distinto como es el ácido diaminopimérico. Se ha visto que el mismo marcador químico puede tener diferente valor taxonómico dependiendo de las especies que se estén tratando de estudiar. Por ejemplo, la composición de las menaquinonas y el patrón de lípidos polares son poco útiles en la taxonomía de *Bacillus* y *Staphylococcus*, aunque son de capital importancia en la taxonomía de las actinobacterias (Goodfellow y Minnikin, 1985).

#### A. Estudio de isómeros del ácido diaminopimérico (DAP)

El peptidoglicano es el polímero fundamental de las paredes tanto de bacterias Gram-positivas como de bacterias Gram-negativas. En bacterias Gram-positivas aparecen notables diferencias en sus paredes celulares, que son específicas de cada taxon y un buen criterio para diferenciar este tipo de bacterias (Schleifer y Kandler, 1972), mientras que en las bacterias Gram-negativas la estructura y la composición de aminoácidos del peptidoglicano es homogénea. El análisis del ácido diaminopimérico, existente en el peptidoglicano de las actinobacterias, es la característica taxonómica más importante aportada por el análisis de la pared de éstas. La posición 3 de la cadena de péptidos en actinobacterias puede ser ocupada por la lisina o el ácido 2,6-Diaminopimérico (DAP) en forma de uno de sus isómeros: la forma *meso* (*meso*-DAP) o la forma LL (LL-DAP). El ácido diaminopimérico nunca se ha encontrado en proteínas, por lo que, cuando se hidrolizan células completas todo lo obtenido procede del peptidoglicano. Este ácido es muy polar, lo que garantiza una buena separación del resto de los aminoácidos. Además, el isómero hidroxilado (OH-DAP) también se separa. Si éstos no aparecen al realizar el análisis, la lisina u otro diaminoácido habrán ocupado la

posición del DAP en la cadena peptídica, y estos aminoácidos sólo se pueden identificar en paredes celulares purificadas (Komagata y Suzuki, 1987).

#### B. Contenido en azúcares

En la hidrólisis de células completas de bacterias suelen aparecer diferentes tipos de azúcares. Estos azúcares proceden en su mayoría de polisacáridos de la pared celular. La composición de azúcares aporta información valiosa a la hora de clasificar e identificar algunas bacterias, especialmente bacterias Gram-positivas y actinobacterias. Los estudios llevados a cabo por Cummins y Harris (1956) mostraron diferencias significativas en los patrones de azúcares llevados a cabo en actinobacterias y, este tipo de patrones, determinan junto a otros parámetros los tipos de pared celular de actinobacterias propuestos por Lechevalier y Lechevalier (1970).

Según Komawata y Suzuki (1987), los patrones obtenidos del contenido en azúcares celulares totales de bacterias que contienen *meso*-DAP en su peptidoglicano se pueden dividir en cuatro grupos (Tabla 2).

Tabla 2. Patrones según el tipo de azúcares celulares.

	Presencia	Ausencia
Tipo A	Arabinosa, Galactosa	Xilosa, Madurosa
Tipo B	Madurosa, Galactosa (v)	Arabinosa, Xilosa
Tipo C	Galactosa (v)	Arabinosa, Madurosa, Xilosa
Tipo D	Xilosa, Arabinosa (v) Galactosa (v)	Madurosa

v = variable.

En el caso de los actinomicetos, Lechevalier y Lechevalier (1970) definieron ocho quimiotipos basándose en los aminoácidos de la pared celular y los azúcares (Tabla 3).

Tabla 3. Constituyentes mayoritarios de la pared celular de actinobacterias.

TIPO	DAB	Lisina	Ornitina	Á. Aspártico	Glicina	<i>meso</i> - DAP	LL- DAP	Arabinosa	Galactosa
I	-	-	-	-	+	-	+	-	-
II	-	-	-	-	+	***	-	-	-
III	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IV	-	-	-	-	-	+	-	+	+
V	-	+	+	-	*	-	-	-	-
VI	-	+	-	+	*	-	-	-	-
VII	+	+	-	+	*	-	-	-	-
VIII	-	-	-	+	*	-	-	-	-

+ presencia, - ausencia, \* glicina de forma variable, \*\*\*hidroxi DAP de forma variable, DAB ácido 2,4-diaminobutírico, DAP ácido 2,6-diaminopimélico.

### C. Menaquinonas

Las quinonas tienen un papel importante en muchas de las reacciones redox que se producen en las células bacterianas, como por ejemplo en el sistema de transporte de electrones de la cadena respiratoria o en la fosforilación oxidativa. Las quinonas son componentes de la membrana citoplasmática y como en muchos otros lípidos, es fácil realizar una extracción cuantitativa de las células bacterianas mediante una mezcla cloroformo/etanol. En las bacterias existen dos tipos de quinonas, benzoquinonas (en su mayoría ubiquinonas – Q-) y naftoquinonas (en su mayoría menaquinonas – MK-). En bacterias Gram positivas sólo se han encontrado menaquinonas, mientras que en Gram negativas se han detectado los dos tipos de quinonas. Estas moléculas son fácilmente separables por cromatografía en capa fina (TLC) o cromatografía líquida de alta presión (HPLC), aunque existen muchos métodos diferentes para el estudio de quinonas. No sólo el tipo de quinona tiene valor taxonómico, también lo tienen la longitud de la cadena de isoprenos, su grado de saturación y el grado de hidrogenación en los dobles enlaces de la cadena de isoprenos. Hay una clasificación propuesta por Kroppenstedt (1982) para actinobacterias en la que se reconocen cuatro grupos según el tipo de menaquinonas presentes (Tabla 4).

Tabla 4. Tipo de actinobacterias según el tipo de menaquinonas presentes.

Tipo		Menaquinonas principales		Representantes
<b>Tipo <i>Eubacteria</i></b> (sin hidrogenación de las unidades de isoprenos)	1	a	MK-7	<i>Thermoactinomyces candidus</i>
		b	MK-9	" <i>Gordona aurantiaca</i> "
<b>Tipo <i>Mycobacterium</i></b> (sólo un tipo de menaquinona sucede principalmente - dihidro- o tetrahidroquinona con ocho o nueve unidades isoprenos)	2	a	MK-8(H2)	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>
		b	MK-8(H4)*	<i>Nocardia sensu stricto</i>
		c	MK-9(H2)	<i>Mycobacterium</i>
		d	MK-9(H4)	<i>Geodermatophilus</i>
<b>Tipo <i>Saccharomonospora</i></b> (tetrahidromultiprenil menaquinona)	3	a	MK-8(H4), MK-9(H4)	<i>Saccharomonospora</i>
		b	MK-9(H4), MK-10(H4)	<i>Actinoplanes</i> **
<b>Tipo <i>Streptomyces</i></b> (menaquinonas con la misma longitud de cadena pero diferentes grados de saturación)	4	a	MK-9(H2), MK-9(H4), MK-9(H6)	<i>Microtetraspora</i>
		b	MK-9(H4), MK-9(H6), MK-9(H8)	<i>Streptomyces</i>
		c	MK-10(H4), MK-10(H6)	<i>Nocardiopsis</i>

\* Puede diferenciarse en subgrupos

\*\* El solapamiento puede ocurrir a veces en el grupo 2 en *Micromonospora*.

#### D. Ácidos grasos

Los ácidos grasos son uno de los componentes principales de los lípidos celulares y se obtienen de éstos por transesterificación. La mayoría se encuentran en la membrana celular y el grupo alquil de los ácidos grasos es uno de los componentes principales de la membrana citoplasmática. Algunos ácidos grasos sólo se encuentran en actinobacterias, además, éstas últimas, a diferencia de muchas otras bacterias, sintetizan sus ácidos grasos por vía aeróbica (Scheuerbrandt y Bloch, 1961). Hay dos tipos principales de ácidos grasos, saturados e insaturados, siendo los primeros mayoritarios en actinobacterias. Los ácidos grasos pueden liberarse de sus ésteres glicerolés mediante transesterificación con metanol-HCl. Estos metilésteres pueden ser identificados por cromatografía de gases, sobre la que se han implementado mejoras para aumentar la velocidad del proceso (Buyer, 2002; Buyer, 2003; Destailats y Cruz-Hernandez, 2007). Si se mantienen unas condiciones estándares durante el crecimiento de los microorganismos, los patrones de ácidos grasos pueden tener un alto valor identificativo.

De acuerdo con los perfiles de ácidos grasos se han establecido diferentes grupos de actinobacterias que mantienen una buena relación con respecto a la filogenia descrita (Tabla 5).

Tabla 5. Patrones de ácidos grasos en *Actinomycetales*.

	Saturados	Insaturados	Iso 14/16/18	Iso 15/17	Anteiso 15/17	10-metil 17 18	Ciclopropano
1 <i>a Corynebacterium*</i>	+++	+++	-	-	-	- - -	-
<i>b Mycobacterium</i>	+++	+++	-	-	-	- ++ -	-
<i>c Rhodococcus</i>	+++	+++	-	-	-	+ ++ -	-
<i>d Act. israelii</i>	+++	+++	-	-	-	- - ++	++
2 <i>a Saccharomnospora</i>	++	+	+++	+	(+)	- - -	-
<i>b Thermoactinomyces</i>	(+)	+	++	+++	+	- - -	-
<i>c Streptomyces</i>	+	(v)	+++	+	+++	- - -	-
<i>d Actinoplanes†</i>	+	+	+++	+++	+++	- - -	-
3 <i>a Amad. madurae</i>	+++	++	+++	(+)	(+)	(+) +++	-
<i>b Micromonospora</i>	+	+	+++	+++	++	++ (+)	-
<i>c Amad. pusilla</i>	+	+	++	+	+	+++ (+)	-
<i>d Nocardiosis</i>	+	+	+++	++	+++	(+) +++	-

(Kroppensted y Kutzner, 1976). (v) variable. \*Excluyendo a *Corynebacterium bovis*, † solo aquellos géneros de *Actinoplanes* que contienen xilosa en la pared celular.

### E. Lípidos polares

Los fosfolípidos son los lípidos polares más comunes, aunque también incluyen glicolípidos y ciertos aminoácidos aminados. Los fosfolípidos son un componente esencial de la membrana celular y están relacionados con la permeabilidad y la regulación en la membrana. Tienen una doble característica ya que, por un lado poseen una región hidrofóbica y por otro también poseen una región hidrofílica. Los fosfolípidos más ampliamente distribuidos son: Fosfatidiletanolamina (PE), Fosfatidilinositol (PI), Fosfatidilglicerol (PG) y Difosfatidilglicerol (DPG). La extracción de los lípidos polares de las bacterias con solventes orgánicos y el análisis mediante TLC dan lugar a patrones con valor de diagnóstico. En 1977, Lechevalier *et al.* desarrollaron un sistema de identificación de actinobacterias distinguiendo 5 clases según sus fosfolípidos (Tabla 6).

Tabla 6. Patrones de fosfolípidos en actinobacterias.

Tipo de fosfolípido	PIM	PI	PC	PG	PE	PME	GluNU	APG	DPG	Diagnóstico
I	+	+	-	v	-	-	-	v	v	Sin nitrógeno
II	+	+	-	v	+	-	-	v	+	PE
III	v	+	+	v	v	+	-	v	v	PC
IV		+	-	-	v	v	+	-	+	GluNU
V		+	-	+	v	-	+	v	+	GluNU y PG

PME=Fosfatidilmetilelanolamina; GluNU:Fosfolípidos no conocidos que contienen glucosamina; APG:Glicerol acil fosfatidil  
(v) variable, (+) presencia, (-) ausencia.

### (b) *Fisiología*

Los caracteres fenotípicos pueden ser morfológicos, fisiológicos, bioquímicos o ecológicos. Son muy útiles en la identificación rutinaria de microorganismos y proporcionan información filogenética de forma indirecta, ya que son un reflejo de la información de diferentes genes. Los datos genotípicos generan una clasificación práctica que permite la identificación de un determinado taxón.

En las pruebas fenotípicas clásicas se estudian las características morfológicas, fisiológicas y ecológicas de las bacterias:

- En el estudio de las características morfológicas se incluyen tanto las características de las propias células (forma, presencia de endosporas, flagelos, etc.) como las características de las colonias (color, dimensiones y forma) (Vandamme *et al.*, 1996).

- En el estudio de las características fisiológicas y metabólicas se incluyen datos de crecimiento a distintas temperaturas, valores de pH, concentraciones de sal, condiciones atmosféricas (aerobias/anaerobias), crecimiento en presencia de sustancias que actúan como agentes antimicrobianos, actividad enzimática, metabolización de compuestos, etc. (Vandamme *et al.*, 1996).

- En el estudio de las características ecológicas se examinan todas aquellas condiciones que afectan a la relación del organismo con el ambiente. Ejemplos de características ecológicas son la naturaleza de las relaciones simbióticas, la habilidad

para causar enfermedades a distintos hospedadores o las preferencias por distintos hábitats.

A pesar de los avances en las técnicas moleculares, los estudios fenotípicos siguen siendo de gran importancia en taxonomía, y se deben seguir realizando para la caracterización de los microorganismos como se recomienda en el comité de definición de especies (Stackebrandt *et al.*, 2002). Las propiedades estructurales dependen de la expresión de muchos genes, suelen ser genéticamente estables y normalmente no presentan grandes variaciones con los cambios ambientales por lo que suelen ser buenos indicadores de la proximidad filogenética (Vandamme *et al.*, 1996). Por otro lado las características fisiológicas y metabólicas están directamente relacionadas con la naturaleza y actividad de los enzimas y proteínas de transporte microbiano y, al ser las proteínas productos genéticos, el análisis de estas características es una comparación indirecta de los genomas microbianos. Las características ecológicas son importantes desde el punto de vista de la biodiversidad, ya que incluso microorganismos muy relacionados filogenéticamente pueden diferir significativamente respecto de los rasgos ecológicos (García-Fraile, 2008).



## *OBJETIVOS*

## 2. OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto es: el análisis de la diversidad, caracterización y clasificación de bacterias del género *Micromonospora* asociadas a raíz de guisante.

Para cumplir este objetivo general se proponen los siguientes objetivos concretos:

1.- Aislamiento de actinobacterias del género *Micromonospora* a partir de nódulos de *Pisum sativum*.

2.- Aislamiento de actinobacterias del género *Micromonospora* a partir de la rizosfera de *Pisum sativum*.

3.- Análisis de cuatro de técnicas moleculares de tipado (TP-RAPD, BOX-PCR, Microsatélites y ARDRA) sobre el género *Micromonospora*, para tratar de determinar así cuales son las más adecuadas en la clasificación de este género.

4.- Caracterización de las cepas de *Micromonospora* aisladas utilizando las diferentes técnicas moleculares y analizando sus características fisiológicas, bioquímicas, etc.

5.- Análisis de distintos genes conservados como marcadores de clasificación taxonómica para el género *Micromonospora*.

6.- Propuesta de un nuevo método para la identificación de microorganismos aislados que pertenezcan al género *Micromonospora*.

## *MATERIALES Y MÉTODOS*

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Preparación y análisis del entorno de aislamiento de los microorganismos

En los meses de octubre y noviembre de 2005 se procedió a la siembra de semillas de guisante (*Pisum sativum*) en distintas localidades de Castilla y León (Figura 12), todas ellas utilizadas habitualmente como tierras de cultivo o huertas.

Las plantas se recogieron justo antes de llegar a la etapa de floración, entre los meses de marzo y abril dependiendo de la localización. Las zonas de muestreo fueron las siguientes: Arcellares del Tozo, situado a 57 km al noroeste de Burgos; Cañizal, al sureste de la provincia de Zamora y a 55 km de la capital; Cardeñosa, a 12 km al norte de Ávila; Ferreras de Abajo, a 62 km al noroeste de Zamora; Riego de la Vega, a 48 km al suroeste de León; Salamanca capital y Valladolid capital.

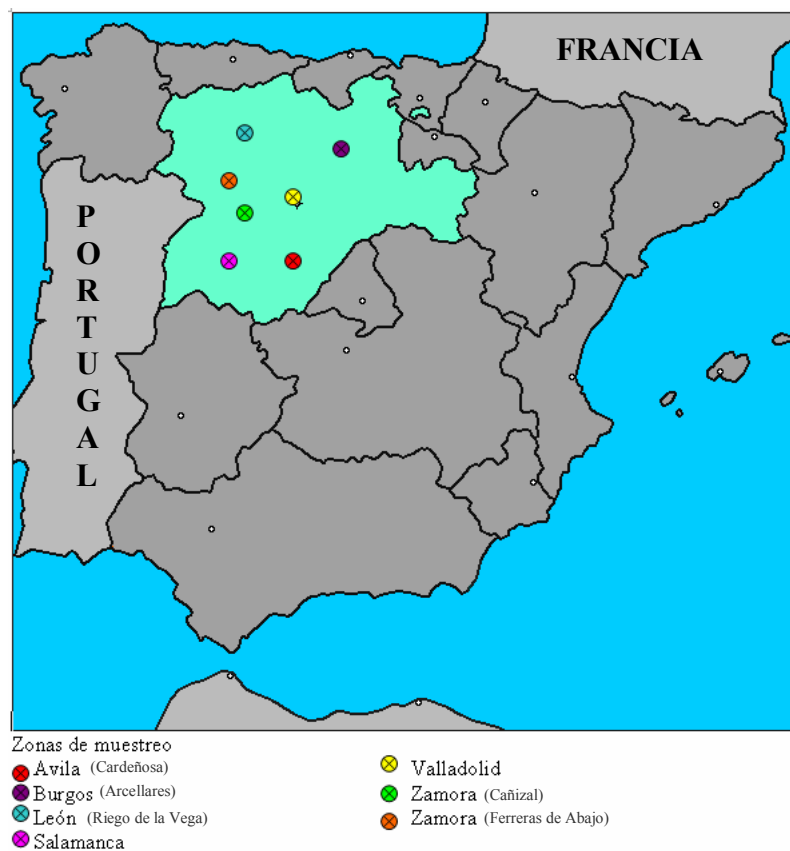


Fig. 12. Mapa de localización de toma de muestras.

## Análisis de los suelos

Para la realización de los análisis, el suelo se secó previamente y se trituró hasta alcanzar un tamaño de partícula de aproximadamente 2 mm. Las mediciones de pH se realizaron utilizando un potenciómetro (CRISON, modelo micropH 2001) en el que se introdujo una suspensión de agua-suelo (1:1 p/v). La determinación de la materia orgánica del suelo se llevó a cabo por el método de oxidación del dicromato potásico descrito por Walkey (1947), y la del nitrógeno orgánico se obtuvo por el método de Kjeldahl (Bremner y Malvaney, 1982).

La concentración de calcio, magnesio y potasio disponible se obtuvo mediante extracción con acetato de amonio 1M y los análisis se realizaron en un espectrofotómetro de emisión de plasma (ICP-OES modelo Joven Yvon Ultima-2). Para determinar la concentración de fósforo asimilable se utilizó el método de Bray II, modificado por Bray y Kurtz (1945).

## **3.2. Aislamiento de microorganismos**

### **3.2.1. Microorganismos aislados a partir de nódulos**

Se seleccionaron los nódulos que presentaban un color más rojizo, es decir, más cantidad de leghemoglobina, por ser más efectivos, y se esterilizaron mediante el método de Vincent (1970), utilizando una solución de cloruro de mercurio (2,5%) (p/v) durante 2 min y lavando a continuación con agua destilada estéril. Se homogeneizaron con un asa de vidrio estéril, se sembraron en placas de agar de manitol extracto de levadura (YMA) (ver apéndice), y se incubaron a 28°C durante dos semanas. En todos los aislamientos se utilizó un nódulo control esterilizado que se depositó sobre la placa para comprobar la ausencia de microorganismos resistentes a la esterilización.

### Selección de actinobacterias

Tras la incubación, se seleccionaron aquellas colonias que, por su morfología, podrían ser identificadas como actinobacterias. Las colonias se sembraron en placas de agar M65 (ver apéndice) para obtener cultivos puros. Las placas se incubaron a 28°C durante dos o tres semanas.

### **3.2.2. Microorganismos aislados a partir de la rizosfera**

El suelo recogido se dejó secando durante tres días a temperatura ambiente, posteriormente se diluyó un gramo del suelo en 9 ml de agua estéril. La mezcla se calentó a 70°C durante 15 min y se agitó durante una hora en un agitador de tubos (Dynal simple Mixer. Model MXIC1) para dispersar las bacterias. A partir de esta suspensión se prepararon diluciones seriadas hasta  $10^{-7}$ .

Se tomó una alícuota de 0,2 ml de las diluciones correspondientes:  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  y se extendió sobre la superficie de los medios de YMA, caseína-almidón, ácido húmico I y ácido húmico II (ver apéndice), suplementados con cicloheximida (50 mg/l), un antifúngico. Se inocularon 3 placas de cada dilución y se mantuvieron a 28°C entre cuatro y ocho semanas.

Tras la incubación, y al igual que en el caso anterior, se seleccionaron aquellas colonias que por su morfología podrían ser identificadas como actinobacterias. Las colonias se sembraron en placas de agar M65 (ver apéndice) para obtener cultivos puros y se incubaron a 28°C durante dos o tres semanas.

### **3.3. *Mantenimiento y conservación de las cepas***

El mantenimiento para el uso rutinario de las cepas se llevó a cabo en placas de medio SA1 (ver apéndice) a 4°C. La conservación de las cepas a largo plazo se realizó por congelación a -80°C, utilizando como agente crioprotector glicerol al 20% (v/v).

### **3.4. Diversidad genética de los microorganismos aislados**

#### **3.4.1. Microorganismos utilizados en el estudio de diversidad genética**

En un primer paso para estudiar la diversidad genética de los microorganismos aislados se realizaron perfiles de BOX-PCR, en los cuales se analizaron 266 microorganismos, 235 procedentes de nódulos de *Pisum sativum* y 33 obtenidos de la rizosfera de esta planta.

A continuación se realizaron también perfiles de Microsatélites, TP-RAPD y ARDRA, pero en este caso se redujo el número de cepas utilizadas a dos grupos de trabajo, las cepas procedentes de Cañizal y las procedentes de Salamanca, analizando 74 cepas procedentes de nódulos y 33 procedentes de la rizosfera, manejando de este modo un total de 107 cepas.

#### **3.4.2. Recogida de células**

Los microorganismos se inocularon en medio líquido SA1 (ver apéndice) y se incubaron durante 48 horas en agitación a 28°C y 125 rpm (Kühner shaker ISF-1-W), hasta conseguir un crecimiento adecuado.

Posteriormente se tomaron 700 µl de la suspensión bacteriana depositándolos en un tubo Eppendorf y se centrifugaron a 14.000 rpm (Eppendorf centrifuge 5418) durante 10 min. A continuación se eliminó el sobrenadante.

Las células se mantuvieron en congelación a –20 °C hasta su utilización.

### 3.4.3. Extracción de ADN

El protocolo de extracción de ADN que se utilizó fue el siguiente (Encinar, 2004):

1.- Sobre las células recogidas previamente se añadieron 500  $\mu$ l de sarcosil (0,1%)(p/v) y se centrifugó posteriormente a 14.000 rpm (Eppendorf centrifuge 5418) durante 5 min y se eliminó el sobrenadante.

2.- Se añadieron 100  $\mu$ l de la solución A (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA).

3.- Seguidamente se añadieron 100  $\mu$ l de la solución B (0,2 M NaOH, 1% SDS), se mezcló con un agitador vortex suavemente e incubó a 65°C durante 20 min, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente.

4.- Se añadieron 100  $\mu$ l de la solución C (3M acetato potásico, pH 5,5), se agitó la mezcla y se centrifugó a 12.500 rpm (Eppendorf centrifuge 5415D) durante 8 min a 4°C. Sin remover el precipitado, se transfirieron 250  $\mu$ l del sobrenadante clarificado a un tubo Eppendorf nuevo y se desechó el resto.

5.- Se añadieron 150  $\mu$ l de agua milliQ y se precipitó con 40  $\mu$ l de acetato sódico 3M (pH 7,0) (p/v) y 310  $\mu$ l de isopropanol, se centrifugó en frío (4°C) a 12.500 rpm (Eppendorf centrifuge 5415D) durante 20 min, posteriormente se eliminó el sobrenadante.

6.- Se lavó con 300  $\mu$ l de etanol al 70% (v/v) (sin resuspender), se centrifugó 5 min a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante.

7.- Por último, se dejó secar al aire durante unos minutos y se resuspendió el pellet (invisible) en 20  $\mu$ l de agua milli-Q.

Las muestras se mantuvieron congeladas a -20 °C hasta su utilización.



### 3.4.4. Perfiles de BOX-PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se llevó a cabo utilizando un oligonucleótido universal diseñado para amplificar de forma selectiva las distintas regiones genómicas localizadas entre las secuencias de BOX (Bruijn *et al.*, 1996).

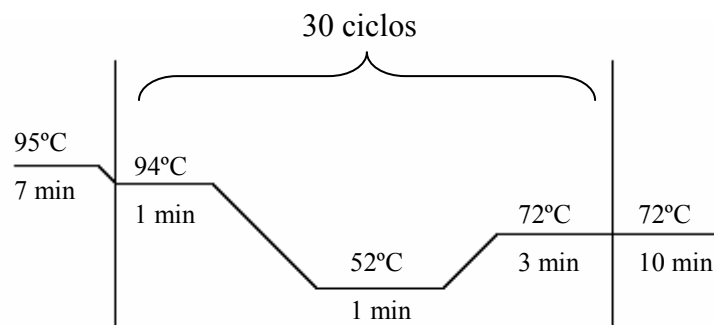
La secuencia del oligonucleótido empleado fue:

BOXA1R: 5'- CTACGGCAAGGCGACGCTGACG – 3'

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ l. La mezcla y las concentraciones de los reactivos fueron las siguientes:

Reactivos (concentración inicial)	Volumen por reacción de PCR ( $\mu$ l)	Casa comercial
Tampón (10x)	2,5	Perkin-Elmer®
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	6,0	Perkin-Elmer®
dNTP's (10 mM)	0,75	Pharmacia®
BSA (0,1% p/v)	1,0	Sigma®
Oligonucleótido BOX A1R (20 $\mu$ M)	2,5	Isogen®
Agua milli-Q estéril	9,85	
<i>Taq</i> polimerasa (2U/ $\mu$ l)	0,4	Perkin-Elmer®
ADN molde (100-150 ng)	2,0	

La reacción de amplificación del ADN se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) utilizando las siguientes condiciones:



### 3.4.5. Perfiles de Microsatélites

En el caso de los perfiles de Microsatélites, la PCR se llevó a cabo utilizando el oligonucleótido M13 diseñado para amplificar secuencias que aparecen repetidas a lo largo del genoma bacteriano.

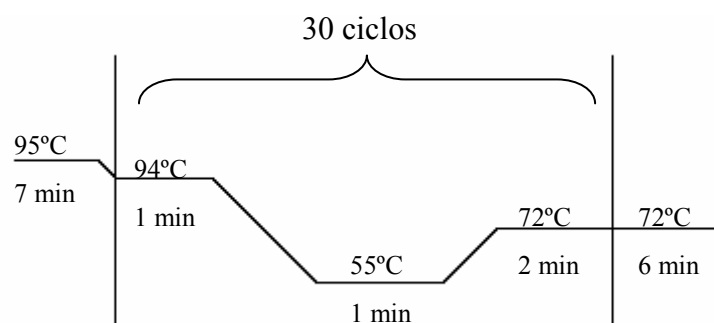
La secuencia del oligonucleótido empleado fue:

M13: 5'- GAGGGTGGCGGTTCT – 3'

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ l. La mezcla y las concentraciones de los reactivos fueron las siguientes:

Reactivos (concentración inicial)	Volumen por reacción de PCR ( $\mu$ l)	Casa comercial
Tampón (10x)	2,5	Perkin-Elmer®
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5,9	Perkin-Elmer®
dNTP's (10 mM)	0,5	Pharmacia®
BSA (0,1% p/v)	1,0	Sigma®
Oligonucleótido csM13 (20 $\mu$ M)	1,0	Isogen®
Agua milli-Q estéril	11,7	
<i>Taq</i> polimerasa (2U/ $\mu$ l)	0,4	Perkin-Elmer®
ADN molde (100-150 ng)	2,0	

Para la reacción de amplificación se utilizó el mismo termociclador que en el apartado anterior pero con las siguientes condiciones:



### 3.4.6. Perfiles de TP-RAPD

Para obtener los perfiles de TP-RAPD se utilizaron en la PCR dos oligonucleótidos universales diseñados de acuerdo con la secuencia del ARNr 16S.

Las secuencias de los oligonucleótidos empleados fueron:

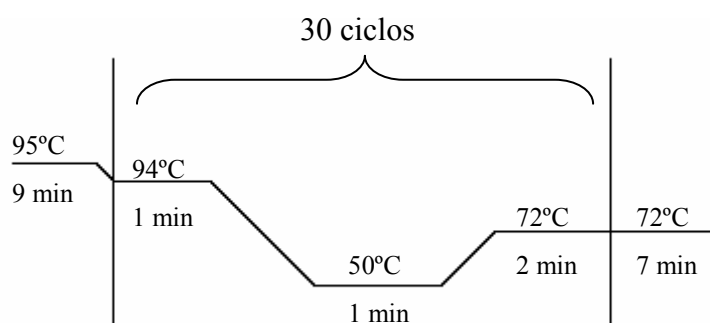
879F 5'-GCCTGGGGAGTACGGCCGCA – 3'

1522R 5'-AAGGAGGTGATCCANCC-3'

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl. La mezcla y las concentraciones de los reactivos fueron las siguientes:

Reactivos (concentración inicial)	Volumen por reacción de PCR (µl)	Casa comercial
Tampón (10x)	2,5	Perkin-Elmer®
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	6,0	Perkin-Elmer®
dNTP's (10 mM)	0,5	Pharmacia®
BSA (0,1% p/v)	1,0	Sigma®
Oligonucleótido 879F (20 µM)	2,5	Isogen®
Oligonucleótido 1522R (20 µM)	2,5	Isogen®
Agua milli-Q estéril	7,6	
<i>Taq</i> polimerasa (2U/µl)	0,4	Perkin-Elmer®
ADN molde (100-150 ng)	2,0	

Las muestras se amplificaron con el mismo termociclador que para los perfiles de BOX-PCR pero teniendo en cuenta las siguientes condiciones:



### 3.4.7. Perfiles de ARDRA

#### A- Amplificación del gen ribosómico 16S

Se amplificó la secuencia comprendida entre las posiciones 27-1525 del ADN que codifica para el gen ARNr 16S, lo que se llevó a cabo mediante los oligonucleótidos SF1 y SR5, cuya secuencia es la siguiente:

SF1: 5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG – 3'

SR5: 5'- AAGGAGGTGWTCCARCC – 3'

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl. La mezcla y las concentraciones de los reactivos fueron las siguientes:

Reactivos (concentración inicial)	Volumen por reacción de PCR (µl)	Casa comercial
Tampón (10x)	5,0	Perkin-Elmer®
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4,0	Perkin-Elmer®
dNTP's (10 mM)	1,25	Pharmacia®
BSA (0,1% p/v)	2,0	Sigma®
Oligonucleótido SF1 (20 µM)	0,5	Isogen®
Oligonucleótido SR5 (20 µM)	0,5	Isogen®
Agua milli-Q estéril	31,95	
<i>Taq</i> polimerasa (2U/µl)	0,8	Perkin-Elmer®
ADN molde (100-150 ng)	4,0	

Para llevar a cabo la reacción de amplificación del ADN se utilizó el mismo sistema que en el apartado 3.4.3, y se utilizaron las mismas condiciones que en el apartado 3.5.4 (secuenciación del gen ribosómico 16S).

#### B- Digestión con enzimas de restricción

Las enzimas utilizadas para la digestión del ARNr 16S fueron las siguientes:

Enzima	Secuencia
Pst I	5'-CTGCA <sup>^</sup> G-3'
Hin6 I (Hha I)	5'-G <sup>^</sup> CGC-3'
Bsh1285 I (Mcr I)	5'-CGPuPy <sup>^</sup> CG-3'
EspB I (Mae I)	5'-C <sup>^</sup> TAG-3'

Para cada una de las enzimas se llevó a cabo una reacción en la que se utilizaron los siguientes reactivos:

Buffer 10X (de la enzima correspondiente)	1 $\mu$ l
Enzima (10 U/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O milliQ	2,5 $\mu$ l
Producto de PCR	4 $\mu$ l

La mezcla se incubó a 37°C durante toda la noche.

### 3.4.8. Separación de los fragmentos amplificados

Los productos amplificados por PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa de modo que se separaran de forma correcta las diferentes bandas amplificadas, para ello se utilizaron las condiciones que aparecen en la siguiente tabla para cada una de las técnicas descritas:

	% AGAROSA	TAMPÓN	TIEMPO (h)	VOLTAJE (V)
BOX-PCR	2	TBE*	2	85
Microsatélites	1,5	TAE*	1,5	85
TP-RAPD	1,5	TAE*	1,5	75
ARDRA	2	TBE*	2	75

\*Ver apéndice

Se utilizó una cubeta de 15 x 20 cm y como fuente eléctrica se utilizó Power PAC 300 (Bio Rad®). Como marcador de referencia se utilizó “DNA Molecular Weight Marker VI” (Roche®).

### **3.4.9. Análisis de los resultados**

En los cuatro tipos de perfiles analizados (BOX-PCR, Microsatélites, TP-RAPD y ARDRA), se obtuvo la imagen digital de los geles teñidos con bromuro de etidio en formato tiff, a través del sistema Gel Doc 2000 (Bio-Rad®), utilizando luz ultravioleta. Los análisis de cada uno de los perfiles se realizaron empleando el programa Bionumerics (Applied Math®, Kortrijk, Belgium), aplicando el coeficiente de correlación de Pearson y el método de agrupación UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages).

### **3.4.10. Análisis de escalado multidimensional**

Esta técnica se llevó a cabo a través del programa Bionumerics. Para ello primero se evaluaron los perfiles de bandas obtenidos para todas las cepas muestreadas utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. A partir de estos perfiles se desarrolló una matriz de similitud que fue utilizada por el programa para construir un mapa de escalado multidimensional.

### **3.5. Análisis multilocus de los microorganismos**

#### **3.5.1. Microorganismos utilizados en el análisis multilocus**

Tras el estudio de la diversidad genética de los microorganismos, se seleccionaron representantes de los grupos obtenidos para realizar la secuenciación de distintos genes: el ARNr 16S, el gen que codifica para la subunidad B de la girasa (*gyrB*), el gen que codifica para la subunidad B de la ARN polimerasa (*rpoB*), el gen que codifica para la subunidad  $\beta$  de la atp sintetasa (*atpD*) y el gen que codifica para una recombinasa (*recA*).

De los microorganismos aislados en este estudio se seleccionaron 43 cepas para llevar a cabo este análisis, de las cuales 20 procedían de nódulos de Cañizal, 12 de nódulos de Salamanca, 6 de la rizosfera de Cañizal y 5 de la rizosfera de Salamanca (Tabla 7). Además, para poder realizar un análisis más completo del género *Micromonospora* se amplió el estudio con todas las cepas tipo del género descritas hasta el momento de inicio de este trabajo (33) y con la cepa tipo del género *Polymorphospora*, ya que es muy próximo al género *Micromonospora*.

#### **3.5.2. Obtención de ADN genómico**

Para la secuenciación de los diferentes genes estudiados en este trabajo se realizó la extracción de ADN mediante “REDExtract-N-Amp Plant PCR Kit” de SIGMA®:

1. Se recogieron las células en un tubo Eppendorf (una cantidad pequeña, por la línea del tubo Eppendorf o ligeramente inferior).
2. Se añadieron 100  $\mu$ l de la solución de extracción y se resuspendieron las células mediante un agitador vortex de forma suave.
3. Se incubaron a 95 °C durante 10 min para provocar la lisis celular.

4. Se añadieron seguidamente 100  $\mu$ l de la solución de dilución y se agitaron mediante un agitador vortex.

### Purificación:

5. Se agregaron 100  $\mu$ l de una solución de fenol-cloroformo-isoamílico 25:24:1 (v/v), se mezcló hasta conseguir una suspensión homogénea de color lechoso y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min (Eppendorf centrifuge 5418).
6. Se recogieron 100  $\mu$ l del sobrenadante y se añadió la misma cantidad de una solución de cloroformo-isoamílico 24:1 (v/v), mezclando bien hasta obtener una sola fase homogénea.
7. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min y se recogieron 80  $\mu$ l del sobrenadante (ADN bacteriano).
8. Se conservó a -20 °C hasta su utilización.



Tabla 7. Cepas utilizadas en el análisis multilocus.

CEPAS	PROCEDENCIA	LOCALIDAD	CEPAS TIPO	CÓDIGO
GUI 2	Nódulo	Cañizal	<i>Micromonospora aurantiaca</i>	DSM 43813 <sup>T</sup>
GUI 3	Nódulo	Cañizal	<i>Micromonospora auratinigra</i>	DSM 44815 <sup>T</sup>
GUI 8	Nódulo	Cañizal	<i>Micromonospora carbonacea</i>	DSM 43168 <sup>T</sup>
GUI 12	Nódulo	Cañizal	<i>Micromonospora chalcea</i>	DSM 43026 <sup>T</sup>
GUI 13	Nódulo	Cañizal	<i>Micromonospora chersina</i>	DSM 44151 <sup>T</sup>
GUI 14	Nódulo	Cañizal	<i>Micromonospora chokoriensis</i>	2-19(6) <sup>T</sup>
GUI 15	Nódulo	Cañizal	<i>Micromonospora citrea</i>	DSM 43903 <sup>T</sup>
GUI 16	Nódulo	Cañizal	<i>Micromonospora coerulea</i>	DSM 43143 <sup>T</sup>
GUI 19	Nódulo	Cañizal	<i>Micromonospora coriariae</i>	DSM 44875 <sup>T</sup>
GUI 23	Nódulo	Cañizal	<i>Micromonospora coxensis</i>	2-30-b(28) <sup>T</sup>
GUI 27	Nódulo	Cañizal	<i>Micromonospora eburnea</i>	DSM 44814 <sup>T</sup>
GUI 28	Nódulo	Cañizal	<i>Micromonospora echinaurantiaca</i>	DSM 43904 <sup>T</sup>
GUI 34	Nódulo	Cañizal	<i>Micromonospora echinofusca</i>	DSM 43913 <sup>T</sup>
GUI 37	Nódulo	Cañizal	<i>Micromonospora echinospora</i>	DSM 43816 <sup>T</sup>
GUI 40	Nódulo	Cañizal	<i>Micromonospora endolithica</i>	DSM 44398 <sup>T</sup>
GUI 41	Nódulo	Cañizal	<i>Micromonospora fulviviridis</i>	DSM 43906 <sup>T</sup>
GUI 42	Nódulo	Cañizal	<i>Micromonospora halophytica</i>	DSM 43171 <sup>T</sup>
GUI 43	Nódulo	Cañizal	<i>Micromonospora inositola</i>	DSM 43819 <sup>T</sup>
GUI 61	Nódulo	Cañizal	<i>Micromonospora lupini</i>	DSM 44874 <sup>T</sup>
GUI 63	Nódulo	Cañizal	<i>Micromonospora matsumotoense</i>	IMSNU 220013 <sup>T</sup>
CR 18	Rizosfera	Cañizal	<i>Micromonospora mirobrigensis</i>	DSM 44830 <sup>T</sup>
CR 21	Rizosfera	Cañizal	<i>Micromonospora nigra</i>	DSM 43818 <sup>T</sup>
CR 30	Rizosfera	Cañizal	<i>Micromonospora olivasterospora</i>	DSM 43868 <sup>T</sup>
CR 36	Rizosfera	Cañizal	<i>Micromonospora pallida</i>	DSM 43817 <sup>T</sup>
CR 38	Rizosfera	Cañizal	<i>Micromonospora pattaloongensis</i>	JCM 12394 <sup>T</sup>
CR 39	Rizosfera	Cañizal	<i>Micromonospora peucetia</i>	DSM 43363 <sup>T</sup>
SG 2	Nódulo	Salamanca	<i>Micromonospora purpureochromogenes</i>	DSM 43821 <sup>T</sup>
SG 8	Nódulo	Salamanca	<i>Micromonospora rifamycinica</i>	DSM 44983 <sup>T</sup>
SG 10	Nódulo	Salamanca	<i>Micromonospora rosaria</i>	DSM 803 <sup>T</sup>
SG 15	Nódulo	Salamanca	<i>Micromonospora saelicesensis</i>	DSM 44871 <sup>T</sup>
SG 16	Nódulo	Salamanca	<i>Micromonospora sagamiensis</i>	DSM 43912 <sup>T</sup>
SGA 3	Nódulo	Salamanca	<i>Micromonospora siamensis</i>	TT2-4 <sup>T</sup>
SGA 5	Nódulo	Salamanca	<i>Micromonospora viridifaciens</i>	DSM 43909 <sup>T</sup>
SGA 9	Nódulo	Salamanca	<i>Polymorphospora rubra</i>	DSM 44947 <sup>T</sup>
SGA 16	Nódulo	Salamanca		
SGA 18	Nódulo	Salamanca		
SGA 21	Nódulo	Salamanca		
SGB 14	Nódulo	Salamanca		
SR 1	Rizosfera	Salamanca		
SR 2	Rizosfera	Salamanca		
SR 4	Rizosfera	Salamanca		
SR 6	Rizosfera	Salamanca		
SR 15	Rizosfera	Salamanca		

### 3.5.3. Preparación de las muestras para su amplificación

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 20  $\mu$ l siguiendo las instrucciones del kit “REDEExtract-N-Amp Plant PCR” (Sigma®). La mezcla total y las concentraciones de los reactivos fueron las siguientes:

Reactivos (concentración inicial)	Volumen por reacción de PCR ( $\mu$ l)	Casa comercial
Reactivo mezcla	10,0	Sigma®
Dilucion-extracción (1:1)	2,0	Sigma®
Oligonucleótido F (20 $\mu$ M)	0,4	Isogen®
Oligonucleótido R (20 $\mu$ M)	0,4	Isogen®
Agua milli-Q estéril	6,2	
ADN molde	1,0	

El termociclador utilizado para las amplificaciones fue GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems®).

### 3.5.4. Secuenciación del gen ribosómico 16S

#### Amplificación del gen ribosómico 16S

Se amplificó la secuencia comprendida entre las posiciones 27-1522 del ADN que codifica para el gen ARNr 16S, lo que se llevó a cabo mediante los oligonucleótidos SF1 y 1522R (Tabla 8) y siguiendo las siguientes condiciones:

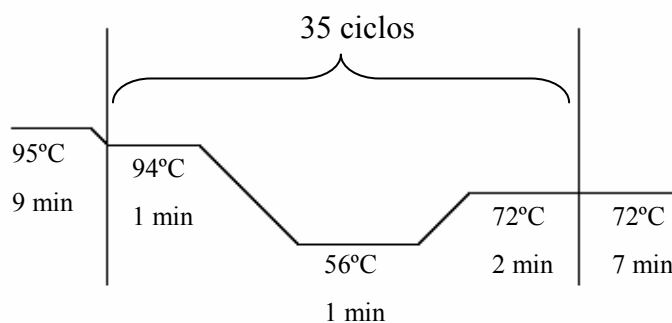


Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados en la amplificación y secuenciación de los genes usados en el análisis multilocus.

Oligos	Secuencia del Oligonucleótido	Posición	Gen	Amplificar	Secuenciar
SF1	5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG - 3'	27-47 <sup>+</sup>	16S	√	
SR2	5'- GWATTACCGCGGCKGCTG - 3'	501-519 <sup>+</sup>	16S		√
SR3	5'- CCGTCAATTCMTTTRAGTTT - 3'	887-907 <sup>+</sup>	16S		√
SR4	5'- GGGTTGCGCTCGTTG - 3'	1505-1100 <sup>+</sup>	16S		√
1522R	5'-AAGGAGGTGATCCANCC-3'	1505-1522 <sup>+</sup>	16S	√	√
GYF1	5'- TCCGGYGGYCTGCACGGCGT - 3'	19-38*	<i>gyrB</i>	√	√
GYF3	5'- ACSGTCGACTTCGACTTCCA - 3'	220-239*	<i>gyrB</i>	√	√
GYF4	5'- ACCCACGAGGAGGGCTCCG - 3'	548-567*	<i>gyrB</i>		√
GYR1B	5'- CGGAAGCCCTCYTCGTGSGT - 3'	548-567*	<i>gyrB</i>	√	√
GYR3B	5'- CAGCAC SAYCTTGTGGTA - 3'	1210-1226*	<i>gyrB</i>	√	√
MYCOF	5'- GGYAAGGTCACSCCSAAGGG - 3'	2573-2593 <sup>o</sup>	<i>rpoB</i>	√	√
MYCOR	5'- ARCGGCTGCTGGGTRATC - 3'	3319-3337 <sup>o</sup>	<i>rpoB</i>	√	√
RAU	5'- GGYAARGGYKCBGYNATGCG - 3'	717-735 <sup>‡</sup>	<i>recA</i>	√	√
RAD	5'- CTTVRMSCGGGTGCGGTT - 3'	64-84 <sup>‡</sup>	<i>recA</i>	√	√
ATPDF1	5'- AAGGSMASGMTTCAA - 3'	290-307 <sup>∞</sup>	<i>atpD</i>		√
ATPDF2	5'- TGGTCSATYCACCGCAAG - 3'	362-380 <sup>∞</sup>	<i>atpD</i>	√	√
ATPDF3	5'- GTSCTSATYCAGGAGATGATC - 3'	513-534 <sup>∞</sup>	<i>atpD</i>		√
ATPDF4	5'- GTGTTCGCGCGGHGTSGGYGAGCG-3'	567-591 <sup>∞</sup>	<i>atpD</i>		√
ATPDF5	5'- GAGCGCACCCGYGAGGGCAACGA - 3'	585-608 <sup>∞</sup>	<i>atpD</i>		√
ATPDF6	5'- TTCATCGACAACATCTTCCG-3'	765-785 <sup>∞</sup>	<i>atpD</i>		√
ATPDR1	5'- CCCATCTCGTCRGCCAGSGT - 3'	855-875 <sup>∞</sup>	<i>atpD</i>		√
ATPDR2	5'- ATGTCCTGVAGGTCCTTGT-3'	1146-1165 <sup>∞</sup>	<i>atpD</i>		√
ATPDR3	5'- GAAGAASGCCTGYTCNGG-3'	1362-1380 <sup>∞</sup>	<i>atpD</i>	√	√
ATPDR4	5'- TCGTTGCCCTCRCGGTTGCGCTC - 3'	585-608 <sup>∞</sup>	<i>atpD</i>		√

+Las cifras corresponden a la posición de los oligonucleótidos respecto al gen ribosómico 16S en *Escherichia coli* ATCC 8739 (NC010468).

\*Las cifras corresponden a la posición de los oligonucleótidos respecto al gen *gyrB* en la cepa *Microbacterium imperiale* taxon 33884 (AB074922).

∞Las cifras corresponden a la posición de los oligonucleótidos respecto al gen *atpD* en la cepa *Mycobacterium smegmatis* str. MC2 155 (NC008596).

oLas cifras corresponden a la posición de los oligonucleótidos respecto al gen *rpoB* en la cepa *Mycobacterium smegmatis* ATCC 14468 (U224494).

‡Las cifras corresponden a la posición de los oligonucleótidos respecto al gen *recA* en la cepa *Streptomyces coelicolor* A3(2) (NC 003888).

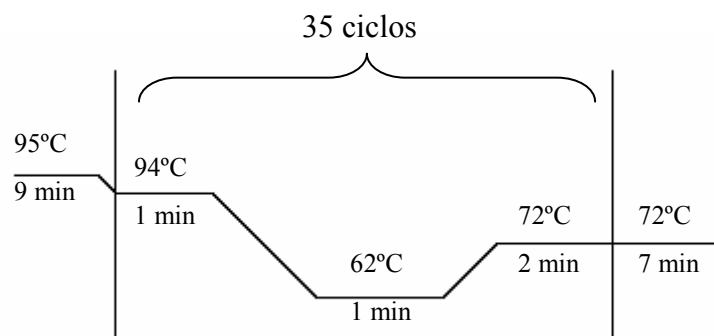
### 3.5.5. Secuenciación del gen que codifica la subunidad B de la girasa (*gyrB*)

#### Diseño de oligonucleótidos que amplifican el gen *gyrB*

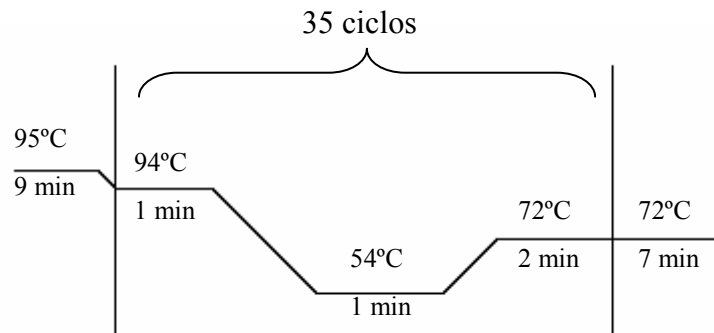
El diseño de los oligonucleótidos se basó en los descritos por Richert *et al.* (2005), pero modificados para el género *Micromonospora*. Para ello se utilizaron las secuencias de *Micromonospora* descritas por Kasai *et al.* (2000); se agruparon mediante el programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997; Jeanmougin *et al.*, 1998) y se buscaron las zonas más conservadas. A partir de ellas se diseñaron los oligonucleótidos que se muestran en la tabla 8.

#### Amplificación del gen *gyrB*

Para llevar a cabo la amplificación del gen *gyrB*, fue necesario utilizar dos reacciones de amplificación. Con la primera de ellas se amplificó una secuencia de aproximadamente 500 pb, para ello se utilizaron los oligonucleótidos GYF1 y GYR1B (Tabla 8) y las siguientes condiciones de amplificación:



En la segunda reacción de amplificación se obtuvo una secuencia de aproximadamente 900 pb, para ello se utilizaron los oligonucleótidos GYF3 y GYR3B (Tabla 8) y las condiciones que se muestran a continuación:

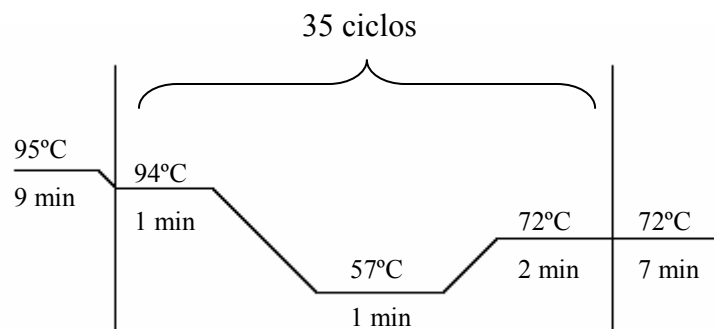


### 3.5.6. Secuenciación del gen que codifica una recombinasa (*recA*)

#### Amplificación del gen *recA*

Se amplificó una secuencia de aproximadamente 650 pb del ADN del gen *recA*, lo que se llevó a cabo mediante los oligonucleótidos RAU y RAD diseñados por Rossi *et al.* (2006) (Tabla 8).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:



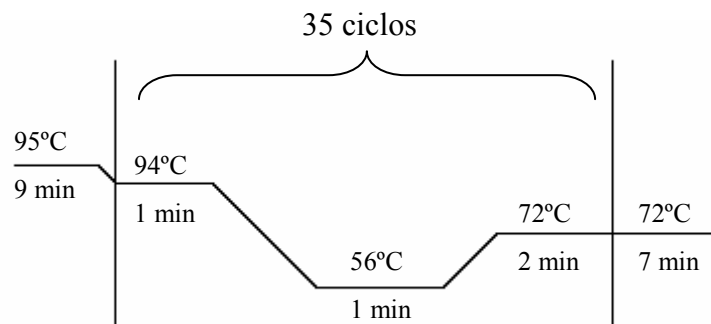
### 3.5.7. Secuenciación del gen que codifica la subunidad B de la ARN polimerasa (*rpoB*)

#### Diseño de oligonucleótidos que amplifican el gen *rpoB*

El diseño de los oligonucleótidos se basó en los descritos por Adekambi *et al.* (2003), pero modificados para un uso más generalizado dentro de los actinomicetos. Para ello se utilizaron las secuencias del gen *rpoB* de *Bifidobacterium longum* (NC\_010816.1), *Corynebacterium diphtheriae* (NC\_002935.1), *Corynebacterium glutamicum* (NC\_009342.1), *Mycobacterium avium* (NC\_008595.1), *Mycobacterium leprae* (NC\_002677.1), *Mycobacterium smegmatis* (NC\_008596.1), *Mycobacterium ulcerans* (NC\_008611.1), *Nocardia farcinica* (AB243742), *Nocardia ignorata* (AY885686), *Propionibacterium acnes* (NC\_006085.1), *Streptomyces avermitilis* (NC\_004719.1), *Streptomyces coelicolor* (NC\_003888.1) y *Tropheryma whipplei* (NC\_004551.1). Estas secuencias se agruparon mediante el programa Clustal X y se buscaron las zonas más conservadas a partir de las cuales se diseñaron los siguientes oligonucleótidos: MYCOF y MYCOR (Tabla 8).

#### Amplificación del gen *rpoB*

Se amplificó una secuencia de aproximadamente 800 pb del ADN que codifica para el gen *rpoB*, lo que se llevó a cabo mediante los oligonucleótidos MYCOF y MYCOR y las condiciones siguientes:



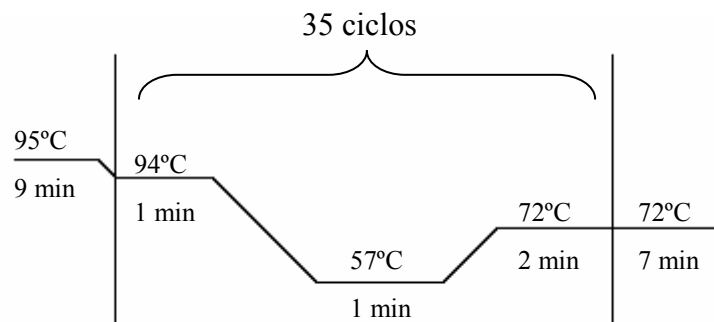
### 3.5.8. Secuenciación del gen que codifica la subunidad $\beta$ de la atp sintetasa (*atpD*)

#### Diseño de oligonucleótidos que amplifican el gen *atpD*

Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizaron las secuencias del gen *atpD* de *Mycobacterium tuberculosis* (NC\_000962.1), *Mycobacterium marinum* (NC\_01612.1), *Mycobacterium ulcerans* (NC\_008611.1), *Frankia alni* (NC\_008278.1), *Mycobacterium bovis* (NC\_008769.1), *Streptomyces avermitilis* (NC\_003155.1), *Tropheryma whipplei* (NC\_004551.1) y *Mycobacterium smegmatis* (NC\_008596.1). Estas secuencias se agruparon mediante el programa Clustal X y se buscaron las zonas más conservadas a partir de las cuales se diseñaron los oligonucleótidos que aparecen en la Tabla 8.

#### Amplificación del gen *atpD*

Se amplificó una secuencia de aproximadamente 1.000 pb del ADN que codifica para el gen *atpD*, lo que se llevó a cabo mediante los oligonucleótidos ATPDF2 y ATPDR3 y siguiendo las condiciones siguientes:



### 3.5.9. Separación de los fragmentos amplificados

Los productos amplificados por PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando como tampón TAE 1X (Tris-Acetato EDTA) (Millipore®) en una cubeta de 15 x 20 cm a 80V durante 1 h. Como fuente eléctrica se utilizó Power PAC 300 (Bio Rad®) y como marcador de referencia se utilizó el “DNA Molecular Weight Marker VI” (Roche®). Las bandas amplificadas se cortaron y se recogieron en tubos Eppendorf.

### 3.5.10. Purificación de los productos de PCR

La purificación de las bandas obtenidas al separar los fragmentos amplificados mediante electroforesis se llevó a cabo con el kit comercial QIAquick (gel extraction kit) de QIAGEN®. El protocolo utilizado fue el descrito por la marca comercial.

1. Se añadió tampón QG en una proporción 3:1 a cada una de las bandas cortadas.
2. Se incubó a 50°C hasta disolver la agarosa (agitando cada minuto). Una vez disuelta la agarosa el color debe ser amarillo.
3. Se pasó la mezcla a la columna de purificación, siendo el volumen máximo de la columna de 800 µl, y se centrifugaron a 14.000 rpm (Eppendorf centrifuge 5418) durante 1 min. Si nos quedaba más muestra se añadía a la columna y volvía a centrifugar.
4. Se eliminó el líquido del fondo de la columna.
5. Se añadieron 500 µl de tampón QG y se centrifugaron a 14.000 rpm (Eppendorf centrifuge 5418) durante 1 min.
6. Se eliminó el líquido del fondo de la columna.
7. Se añadieron 750 µl de tampón PE y se esperaron 5 min, luego se centrifugaron a 14.000 rpm (Eppendorf centrifuge 5418) durante 1 min.
8. Se eliminó el líquido del fondo de la columna y se centrifugaron de nuevo 1 min a 14.000 rpm (Eppendorf centrifuge 5418) (para limpiar la membrana).
9. Se pasó la columna a un tubo de centrifuga normal.
10. Se añadieron 50 µl de tampón EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) directamente sobre la membrana, se esperaron 5 min y se centrifugaron a 14.000 rpm (Eppendorf centrifuge 5418) durante 5 min.



En cada tubo Eppendorf quedó una solución de tampón EB con el ADN purificado y con un volumen final de 48  $\mu$ l.

Este ADN se cuantificó mediante electroforesis en gel de agarosa (1%) utilizando como tampón TAE 1X (Tris-Acetato EDTA) (Millipore®) en una cubeta de 6 x 10 cm a 70V durante 1 h para determinar la cantidad necesaria para la secuenciación directa del fragmento. La cuantificación se realizó por comparación con el plásmido pGEM a una concentración de 100 ng/ $\mu$ l.

### 3.5.11. Secuenciación automática de los productos de PCR

Una vez separados los fragmentos y purificados se procedió a la secuenciación de los diferentes genes amplificados. En el caso del gen ribosómico 16S se utilizaron los oligonucleótidos SR2, SR3, SR4 y SR5, basados en zonas universales del gen ribosómico 16S. Para la secuenciación del gen *gyrB* se utilizaron los oligonucleótidos GYF1, GYF3, GYF4, GYR1B y GYR3B. Los oligonucleótidos RAU y RAD fueron los usados en la secuenciación del gen *recA*, los mismos que para su amplificación. Para la secuenciación del gen *rpoB* se utilizaron también los mismos oligonucleótidos que para la amplificación del gen, MYCOF y MYCOR. En la secuenciación del gen *atpD* se utilizaron los oligonucleótidos ATPDF2, ATPDF3, ATPDF4, ATPDF5, ATPDF6, ATPDR1, ATPDR2, ATPDR3 y ATPDR4 (Tabla 8).

Se preparó una mezcla con 100 ng de ADN y 3 picomoles del oligonucleótido para cada reacción de PCR de secuenciación. Cada una de ellas se llevó a un volumen de 8  $\mu$ l con agua milli-Q. La secuenciación automática de cada fragmento se llevó a cabo en el servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca, en un secuenciador capilar ABI PRISM (Applied Biosystems®), empleando “Big Dye Terminador v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (Applied Biosystems®).

### 3.5.12. Análisis de los fragmentos secuenciados

Para corregir las secuencias obtenidas en el secuenciador automático se utilizó el programa Chromas, mientras que el ensamblaje de la secuencia completa de cada gen se realizó con el programa Seqman II, incluido en el paquete de programas DNA Star (Lasergene®).

Las secuencias obtenidas se analizaron a través del programa BLASTn, versión 2.0, que compara cada una de las secuencias obtenidas con las depositadas en las bases de datos públicas y nos ofrece un listado de aquellas con las que presentan una mayor similitud (Brenner, 1995).

Las secuencias obtenidas se alinearon posteriormente junto con 33 cepas tipo de *Micromonospora* utilizando el programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997; Jeanmougin *et al.*, 1998).

Finalmente se utilizaron los programas Mega 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) y ARB (Ludwig *et al.*, 2004) para realizar los análisis filogenéticos de las secuencias utilizando el método del vecino más cercano (Neighbour-Joining) (Saitou y Nei, 1987), el método de máxima parsimonia y el método de máxima verosimilitud y seleccionando un muestreo de 1000 réplicas (“bootstrap”).

### **3.6. Estudios de hibridación ADN-ADN**

Se recogieron células para la extracción del ADN. Para ello se inocularon matraces de 500 ml de medio M65 que se mantuvieron en agitación a 128 rpm y a 28°C durante 7 días. Una vez que los microorganismos crecieron, se centrifugó el contenido de los matraces a 10.000 rpm durante 20 min. Se resuspendieron las células en 50 ml de NaCl 0,85% (p/v) y se centrifugaron de nuevo a 10.000 rpm durante 15 min. Finalmente se recogieron las células y se guardaron a -20°C hasta su utilización.

#### **3.6.1. Extracción de ADN para la hibridación**

Este proceso se llevó a cabo en las instalaciones de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ) por parte de su personal utilizando el método descrito por Cashion *et al.* (1977):

1. Primero se resuspendieron las células en 25 ml de tampón de urea (ver apéndice).
2. Se produjo la lisis celular a través de una prensa Francesa (Thermo Spectronic) realizando el proceso de aumento de presión dos veces.
3. Previamente a la lisis se añadieron 100 ml de tampón de urea a 5 g de una matriz de hidroxiapatito, dejando que la mezcla precipitara durante 30 min.
4. Se mezcló a continuación la suspensión de células lisadas con la matriz de hidroxiapatito y se dejó la mezcla durante toda la noche.
5. A continuación, se retiró el sobrenadante y se lavó la matriz con 100 ml de tampón de urea dos veces, esperando 10 min entre cada lavado para que precipitara la matriz.
6. La matriz se lavó de nuevo cinco veces con tampón PB1 (ver apéndice).

7. Se pasó la matriz a una jeringa de 10 ml conectada a un tubo. Se encendió la bomba, el fotómetro y el colector. Se introdujo primero el tampón PB, a continuación se colocó la jeringa y se conectó al espectrofotómetro.

8. Se utilizó el tampón PB2 como eluyente del ADN y se bombeó a través de la matriz. Se comprobó la calidad del ADN utilizando el espectrofotómetro y se recogió únicamente la fracción más pura, alrededor de 10 ml, en un tubo nuevo.

9. Se transfirió a una bolsa de diálisis (conservadas en EDTA) en la que se había hecho un nudo en un extremo, se eliminó el aire y se anudó el otro extremo. Se colocaron las bolsas enganchadas a tubos Eppendorf marcados y se introdujeron en 2 litros de SSC (2X) durante 2 días a 8°C con un movimiento leve.

10. Se pasó el contenido de las bolsas a tubos nuevos estériles de 15 ml con tapa.

11. Se midió la densidad óptica del ADN a 260 nm utilizando como blanco tampón SSC (2X) y se diluyó cuando fue necesario con este mismo tampón para obtener unos valores entre 0,95 y 1,05.

12. El ADN se conservó a 4°C hasta su utilización.

### 3.6.2. Hibridación ADN-ADN

La hibridación ADN-ADN se llevó a cabo en las instalaciones de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ) por parte de su personal como se describe por De Ley *et al.*, (1970) y considerando las modificaciones descritas por Huss *et al.* (1983).

#### Curva de fusión

1. Cuando no se conocía el contenido en guanina-citosina (G+C), se diluyó el ADN al 10% en formamida. Se añadieron a un tubo Eppendorf 40  $\mu$ l de formamida y 400  $\mu$ l de ADN y se mezcló con un agitador vortex.

2. Se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 min, se pasaron 440  $\mu$ l a una cubeta y se realizó el vacío durante 5 min.

3. Se eliminaron las posibles burbujas de la cubeta, se le añadieron 2 gotas de aceite sobre la superficie y a continuación se cerró la cubeta.

4. Se midió la densidad óptica dentro de un programa específico para curvas de fusión (Espectrofotómetro Cary 100 Bio UV/Vis). Se aumentó la temperatura hasta 64,5°C y a continuación se realizó una rampa desde 65 a 99°C. Se calculó automáticamente el contenido en G+C [%G+C = 2.44 (T<sub>m</sub> – 69.4°)].

#### Desnaturalización

1. Se depositaron en un tubo Eppendorf 200  $\mu$ l 2X del ADN 1, en otro 200  $\mu$ l 2X del ADN 2 y en un tercero se puso una mezcla de 200  $\mu$ l de ADN 1 y 200  $\mu$ l de ADN 2.

2. Los tres tubos Eppendorf se centrifugaron durante 1 min a 13.000 rpm y se pasaron 400  $\mu$ l de cada uno a tres cubetas diferentes.

3. A continuación, se degasificaron las cubetas durante 5 min, se eliminaron las burbujas, se sellaron las cubetas con dos gotas de acetice y se taparon.

4. Para medir en el espectrofotómetro se utilizó como blanco el porcentaje de formamida que se utilizó para las medidas de la curva de fusión (10%). Se activó el programa de desnaturalización, en el que se introdujo la temperatura de fusión ( $T_m$ ) obtenida y se dejó funcionando durante 20 min.

5. A continuación se abrió el programa de hibridación y se introdujo la  $T_m$  de las cepas a hibridar. Cuando la temperatura de desnaturalización cayó  $0,7^\circ\text{C}$  por debajo de la  $T_m$  se cerró el programa de desnaturalización y se inició el de hibridación, que se dejó actuando durante 30 minutos.

6. Se realizó otra desnaturalización de las muestras durante 20 min de la misma forma que la vez anterior, y a continuación se llevó a cabo una nueva hibridación de las mismas durante 30 min.

7. Se midió la absorbancia a 260 nm cada 15 s durante 30 min. El porcentaje de hibridación se determinó según la fórmula:  $\%D = 100 \times (4v'_M - v'_A - v'_B) / 2(v'_A \times v'_B)^{1/2}$ .

$v'$ : tasa de renaturalización.

M: mezcla de los dos ADN.

A: ADN 1.

B: ADN 2.

### 3.7. Estudio de quimiotaxonomía

#### 3.7.1. Microorganismos utilizados en el análisis quimiotaxonómico

Tras los distintos análisis realizados a las cepas de estudio se seleccionaron 15 microorganismos representantes en los que fueron analizados distintos marcadores quimiotaxonómicos, que incluyeron: isómeros del ácido diaminopimélico, azúcares celulares, menaquinonas, ácidos grasos y lípidos polares.

CEPA	PROCEDENCIA	LOCALIDAD
GUI 2	Nódulo	Cañizal
GUI 13	Nódulo	Cañizal
GUI 23	Nódulo	Cañizal
GUI 40	Nódulo	Cañizal
GUI 43	Nódulo	Cañizal
GUI 63	Nódulo	Cañizal
CR 18	Rizosfera	Cañizal
CR 30	Rizosfera	Cañizal
CR 38	Rizosfera	Cañizal
SG 15	Nódulo	Salamanca
SG 16	Nódulo	Salamanca
SGA 5	Nódulo	Salamanca
SGA 18	Nódulo	Salamanca
SGA 21	Nódulo	Salamanca
SGB 14	Nódulo	Salamanca

Las pruebas de isómeros del ácido diaminopimélico y ácidos grasos se realizaron además sobre las otras 28 cepas estudiadas en el análisis multilocus.

#### 3.7.2. Recogida de células

Los microorganismos se cultivaron en medio SA1 (ver apéndice) durante una semana, una vez crecidas las células se recogieron por centrifugación a 9.000 rpm durante 10 min (Sorvall® RC-5B). A continuación se procedió a un lavado de las células con NaCl (0,85%) (p/v) y de nuevo se centrifugó a 9.000 rpm durante 15 min. Se recogieron las células y se liofilizaron durante 24 horas. Este sistema de recogida de muestras celulares se utilizó en todas las pruebas salvo para los ácidos grasos, cuyo proceso se describe en el apartado correspondiente.

### 3.7.3. Estudio de isómeros del ácido diaminopimélico (DAP)

Para determinar los isómeros del ácido diaminopimélico se siguió el siguiente protocolo:

- Se pesaron 2 mg de muestra liofilizada en una balanza de precisión y se depositaron en una ampolla de vidrio a la que se añadieron 200  $\mu$ l de ácido clorhídrico 4N.
- Los tubos se sellaron con la llama del mechero y se dejaron a 100°C durante 16 horas para que se produjera la hidrólisis ácida sobre las células. Dejando posteriormente enfriar las muestras a temperatura ambiente durante 20 min.
- Se abrieron las ampollas y se filtraron las muestras a través de papel de filtro.
- Las muestras se incubaron en un baño a 37°C durante 20 min con una aplicación de aire desde la parte superior de los tubos.
- Se comprobó que las muestras estaban secas y se realizó un lavado añadiendo dos gotas de agua destilada a cada una, volviéndolas a colocar en el baño durante otros 20 min.
- Una vez secas, se sacaron las muestras y se volvieron a depositar un par de gotas de agua destilada.
- Sobre placas de celulosa (Merk®, 20x20 cm) se realizaron marcas interespaciadas entre sí 1,5 cm sobre las que se colocaron las muestras, 3  $\mu$ l de cada una y 3  $\mu$ l de cada marcador (ácido diaminobutírico -DAB- y ácido diaminopimélico -DPM-, SIGMA®), con una pipeta Pasteur.
- Las placas se dejaron secar y a continuación se introdujeron en un tanque de vidrio que contenía 0,5 centímetros de medio de Rhuland (ver apéndice) como fase móvil y se dejó corriendo hasta aproximadamente 2 cm del final de la placa.
- Se sacaron y se dejaron secar durante al menos 2 h.
- En la campana de extracción se rociaron con ninhidrina (ver apéndice) y a continuación se introdujeron las placas de celulosa en una estufa a 100°C.
- Después de 2 min se sacaron las placas con las bandas ya marcadas. Se conservaron las placas de celulosa en oscuridad.



### 3.7.4. Contenido en azúcares celulares totales

La determinación de los azúcares celulares totales se realizó siguiendo el protocolo que se muestra a continuación:

- Se pesaron 50 mg de cada muestra liofilizada y se pasó a un tubo de hidrólisis.
- Se añadió 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N.
- A continuación se incubaron las muestras a 95°C en un baño durante 2 h y posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente (aproximadamente 5 min).
- En este momento se ajustó el pH entre 5 y 5,5 añadiendo como base BaOH, ya que el medio queda muy acidificado por el ácido sulfúrico. En principio se aproximó el valor mediante tiras de pH, ya que el volumen que se tenía era muy pequeño y finalmente se ajustó con un pH-metro.
- Después se centrifugó la muestra a 1.500 rpm durante 5 min.
- Se recogió el sobrenadante y se pasó a un tubo nuevo, se tapó y se congeló a -20°C durante 2 h.
- Se liofilizó durante toda la noche.
- A la mañana siguiente se resuspendió en 400 µl de agua destilada.
- Sobre placas de cromatografía en capa fina de celulosa (Merk® 20x20 cm), se realizaron marcas de aproximadamente 1 cm de ancho sobre las que se colocaron las muestras, 5 µl de cada muestra y 3 µl de una solución estándar de azúcares (1% de cada azúcar en 10 ml de agua destilada).
- A continuación se introdujeron las placas en un tanque de vidrio que contenía acetato etílico:piridina:agua (100:35:25) (v/v) como fase móvil y se dejó corriendo hasta que faltaban 2 o 3 cm para el final (aproximadamente 2,5 h).
- Se dejó secar durante 45 min y se volvió a introducir en el tanque dos veces más.
- Después de correr las placas tres veces, cuando estuvieron secas, se rociaron con ftalato de anilina (Fluka®) hasta que comenzaron a verse húmedas.
- Se calentaron sobre una placa a 100°C hasta que aparecieron las bandas que se identificaban con los diferentes azúcares.

### 3.7.5. Composición del perfil de menaquinonas

Para determinar las menaquinonas principales de los microorganismos de estudio se realizó el siguiente protocolo:

- Se pesó una cantidad igual o superior a 250 mg de liófilo de las muestras a analizar que se depositó en tubos de vidrio a los que se añadió una mezcla de cloroformo-metanol 2:1 (v/v) (20 ml aproximadamente) para la hidrólisis de las células.
- Las muestras se dejaron en agitación durante toda la noche, primero unas vueltas a mayor velocidad (60 rpm) y después se dejaron más lentas, aproximadamente 10 rpm.
- A la mañana siguiente se recogió el sobrenadante, filtrándolo con papel de filtro para pasarlo a tubos nuevos (los restos celulares del tubo se conservaron).
- Los tubos nuevos con el sobrenadante se introdujeron en un desecador de N<sub>2</sub> a 40°C en el que se dejaron durante una hora.
- Por otro lado, a las células que quedaban en el primer tubo, se les añadió de nuevo cloroformo-metanol 2:1 (v/v) para una segunda hidrólisis, y se dejó en agitación durante una hora.
- Se volvió a filtrar el contenido de los tubos en agitación sobre los tubos que estaban en el desecador y se volvieron a introducir en este durante otra hora (hasta que estuvieron totalmente secos).
- Mientras se secaban los tubos, se prepararon las placas de sílice (Merk®, GF 254 nm tipo 60), (tres cepas por placa), se dejó medio cm por cada lado y se marcó una línea por cada cepa a unos 2 cm del fondo.
- A continuación, se añadieron 4 o 5 ml de acetona sobre los tubos desecados, se disolvió su contenido y se colocó sobre las líneas marcadas en las placas con una pipeta Pasteur.
- A continuación se introdujeron las placas en un tanque de vidrio que contenía en el fondo 100 ml de una solución de éter de petróleo (60-80°) - dietil éter (v/v=85/15) que se preparó en el momento y se dejó corriendo hasta aproximadamente 2 cm del final de la placa.
- Posteriormente las placas se dejaron secando bajo una campana de extracción.

- Las placas se colocaron después bajo luz ultravioleta para observar las manchas de las quinonas en color violeta, sobre las que se dibujó el perfil con un lápiz.
- Las muestras obtenidas se introdujeron en tubos de vidrio (uno para cada una), a los que se les añadió dietil éter para extraer las muestras de la placa de sílice, se dejaron unos minutos y se les dió la vuelta para conseguir la completa extracción.
- Se comprobó que no quedaba nada exponiendo los trozos de placa de nuevo a la luz ultravioleta (cuando permanecía el color morado se volvía a introducir en dietil éter).
- A continuación se colocaron los tubos en el desecador de N<sub>2</sub> hasta que se evaporó todo el dietil éter.
- Cuando estuvieron secos se añadió isopropanol en función de la biomasa que se había recogido (aproximadamente 100 µl por cada 250 mg).
- Se filtraron las muestras y se pasaron a tubos de HPLC.
- Se conservaron a 4°C hasta que se introdujeron en el aparato de HPLC, del que se obtuvieron los resultados en papel.

### 3.7.6. Ácidos grasos

La determinación de los ácidos grasos se realizó siguiendo el método que se muestra a continuación:

- Las cepas se inocularon en medio TSA (Trypticase Soya Agar) (Ver apéndice) y en medio M65, en tubos que contenían 5 ml de medio cada uno y se dejaron creciendo durante tres días, cuando ya se observaba turbidez en el tubo.
- Una vez comprobada la pureza del cultivo, se centrifugaron las muestras a 1.500 rpm durante 5 min, se retiró el sobrenadante y se congelaron a -20°C.
- Para realizar la saponificación de las muestras se añadió 1 ml del reactivo 1 (45 g NaOH, 150 ml metanol y 150 ml de agua destilada) a cada tubo y se mezclaron en un vortex durante unos segundos.
- Posteriormente se calentaron los tubos a 100 °C durante 5 min, comprobando que estaban bien cerrados.

- Se mezclaron de nuevo vigorosamente con un vortex durante unos segundos, a continuación se volvieron a dejar en el baño a 100 °C durante 25 min, para completar un tiempo de 30 min e inmediatamente se enfriaron los tubos en un baño con agua.
- Para realizar el proceso de metilación se añadieron 2 ml del reactivo 2 (325 ml de ácido clorhídrico 6N y 275 ml de alcohol metílico) a cada tubo, que hace disminuir el pH por debajo de 1,5 y produce la metilación de los ácidos grasos, y se mezclaron en un vortex durante unos segundos.
- A continuación se calentaron los tubos a 80 °C durante 10 min y se enfriaron rápidamente, en agua con hielo (en estos dos últimos pasos es muy importante que el tiempo y la temperatura sean lo más exactos posibles).
- Para realizar la extracción se añadieron 1,25 ml del reactivo 3 (200 ml de hexano y 200 ml de metil terc-butil éter), con lo que se consiguió que los ácidos grasos pasasen a la fase orgánica, para ello se dejaron los tubos en agitación durante 10 min.
- A continuación se utilizaron pipetas Pasteur para desechar la fase inferior del tubo y se dejó la superior dentro, a la que se le realizó un lavado añadiendo 3 ml del reactivo 4 (10,8 g de NaOH en 900 ml de agua destilada). Con este paso se consigue reducir contaminaciones de la aguja de inyección, la columna y el detector.
- Los tubos se dejaron en agitación durante 5 min y a continuación se les añadió 1 ml de NaCl (40%) (p/v) para mejorar la separación entre las dos fases existentes.
- Aproximadamente dos tercios de la fase superior se recogieron mediante pipeta Pasteur y se transfirieron a un tubo para HPLC, que permaneció a 4°C hasta su utilización.
- El tubo se colocó en el aparato de HPLC que analizó las muestras y expresó los resultados en formato digital.

### **3.7.7. Lípidos polares**

Para la determinación de los lípidos polares se llevó a cabo un proceso de extracción y a continuación uno de revelado:

## Extracción:

- Se pesaron 0,1 gramos de cada muestra liofilizada que se quería analizar sobre un tubo de vidrio y se añadieron 2 ml de metanol: 0,3% NaCl (100:10 v/v) y 2 ml de éter de petróleo 60 - 80 °C a cada una.
- Los tubos se dejaron en agitación durante 15 min y posteriormente se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 min.
- A continuación se desechó la fase superior y se conservó la inferior de cada tubo a la que se le añadió 1 ml de éter de petróleo 60-80 °C.
- Se dejaron de nuevo las muestras en agitación durante 15 min y se centrifugó después a 1.500 rpm durante 5 min, tras lo que se desechó nuevamente la fase superior y se conservó la inferior del tubo.
- Se calentaron las muestras en baño a 100 °C durante 5 min y seguidamente se pasó a otro baño a 37 °C en el que se dejaron durante 5 min.
- Se añadieron 2,3 ml de  $\text{CHCl}_3$  -  $\text{CH}_3\text{OH}$  - 0,3 % NaCl (90:100:30 v/v) a 20°C a cada muestra, se dejaron en agitación durante 30 min y se centrifugaron después a 1.500 rpm durante 5 min.
- El sobrenadante (líquido) se recogió y se pasó a un tubo nuevo mientras que al resto de las células se le añadió 0,75 ml de una solución de  $\text{CHCl}_3$  -  $\text{CH}_3\text{OH}$  - 0,3 % NaCl (50:100:40 v/v) a 20°C.
- Los tubos con restos celulares se dejaron en agitación durante 30 min, se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 min y se recogió el sobrenadante que fue añadido al recogido anteriormente.
- Se repitieron los dos últimos pasos una vez más.
- A la fase líquida recogida se le añadieron 1,3 ml de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) y 1,3 ml de 0,3 % NaCl (p/v), se agitó en el vortex cada muestra durante 30 s y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min.
- La fase inferior se recogió con pipetas Pasteur evitando tomar impurezas y se introdujo en otro tubo nuevo que se dejó en un evaporador de  $\text{N}_2$  a 40 °C hasta que se evaporó completamente.
- Cada muestra se disolvió en 0,4 ml de cloroformo-metanol ( $\text{CHCl}_3$ - $\text{CH}_3\text{OH}$ ) (v/v) 2:1 y se transfirió a un tubo de HPLC mediante pipeta Pasteur.

## Proceso de revelado:

- Se depositaron 20  $\mu$ l de cada muestra sobre una marca realizada previamente en un placa de sílice (Merck®, HPTLC Silica gel 60 10x10 cm) en la esquina inferior izquierda. Se pusieron dos placas por muestra.
- Se introdujeron las placas en tanques de vidrio que contenían 10 ml de una solución de cloroformo-metanol-agua (65:25:4 v/v) de modo que la muestra ascendía verticalmente y se dejaron corriendo durante aproximadamente 30 min, hasta que quedó un cm para el final (la solución se cambió para cada muestra).
- Se dejaron secar sobre papel de filtro.
- A continuación se introdujeron de nuevo en los tanques que ahora contenían una solución de 10 ml de cloroformo-ácido acético glacial (100%)-metanol-agua (80:15:12:4 v/v) colocando las placas con la parte que había corrido primero en el fondo para que se separaran de nuevo hacia arriba. Se dejó también hasta que quedó un cm para el final.
- Se dejaron secar sobre papel de filtro.
- Una vez secas se tomó una placa de cada muestra y se rociaron con ninhidrina 0,2 % (p/v) (en propanol o metanol).
- Se colocaron sobre una placa a 130 °C y se dejaron durante unos minutos hasta que aparecieron unas marcas de color rojizo.
- Las mismas placas rociadas con ninhidrina se utilizaron para rociarlas posteriormente con azul de molibdeno 1,3 % (p/v), en este caso no era necesario calentar, se esperó unos minutos y aparecieron las marcas.
- Las otras placas que se habían preparado se rociaron con anisaldehído, que debe prepararse en el momento (10 ml de alcohol ácido comercial (metanol:ácido sulfúrico: ácido acético – 90:5:5-) y 0,5 ml de p-anisaldehído(v/v)).

### **3.8. Estudios de fisiología**

#### **3.8.1. Microorganismos estudiados**

A nivel fenotípico se estudiaron 106 cepas aisladas procedentes de la rizosfera y los nódulos de Cañizal y Salamanca y 33 cepas tipo del género *Micromonospora*, analizando las características de tinción, la morfología, la utilización de diferentes fuentes de carbono, la capacidad de degradación de varios compuestos químicos, pruebas de resistencia, producción de catalasa y producción de oxidasa (Tabla 9).

#### **3.8.2. Tinción de Gram**

Para determinar el tipo de Gram, positivo o negativo, se realizó la tinción de Gram de la pared celular. Para ello se tomó una muestra de un cultivo joven, de aproximadamente una semana de crecimiento, y se realizó la tinción de acuerdo al protocolo de Doetsch (1981). Las preparaciones se observaron a través de microscopio óptico (CTRMIC Leica®, Germany) con un objetivo de inmersión en aceite 100X.

#### **3.8.3. Características del cultivo y morfología**

Para determinar las condiciones óptimas de crecimiento de los microorganismos aislados, así como la observación de varias características morfológicas que incluyeron el color, borde, relieve, producción de micelio y producción de pigmentos difundibles de las colonias, se utilizaron los siguientes medios de cultivo: YMA, Avena, Bennett y SA1 (ver apéndice). Los datos se recogieron a los 7, 14 y 21 días.

#### **3.8.4. Preparación de inóculos**

Las cepas se cultivaron en medio SA1 durante una semana, posteriormente se prepararon suspensiones en NaCl (0,85%) (p/v) estéril y de esta suspensión ( $10^6$  ufc/ml) se tomaron 10  $\mu$ l que se inocularon sobre el medio correspondiente a cada prueba (apartados 3.8.5, 3.8.6, 3.8.7, 3.8.8 y 3.8.9).

### 3.8.5. Utilización de fuentes de carbono

La capacidad de los microorganismos para emplear varios carbohidratos y aminoácidos (Tabla 9) como fuente de carbono se analizó mediante la metodología de Williams *et al.* (1983). Las sustancias se prepararon como soluciones acuosas y se esterilizaron por tindalización a 100°C durante 30 min tres días consecutivos, para luego añadirse al medio basal de Stevenson (ver apéndice). Los controles positivos y negativos se realizaron añadiendo glucosa como fuente de carbono en el primer caso, y el mismo medio sin añadir ninguna fuente de carbono en el segundo. Los resultados se recogieron teniendo en cuenta estos controles, de modo que se consideró un resultado positivo siempre que existiera un crecimiento igual o superior al del control positivo, y se consideró negativo siempre que existiera un crecimiento igual o inferior al control negativo. Los resultados se recogieron a los 7, 14 y 21 días.

### 3.8.6. Pruebas de degradación e hidrólisis

Prueba de hidrólisis del almidón: se analizó en el medio SA1 suplementado con almidón (10 g/l) en placa. Después de incubar se inundaron las placas con lugol, que al unirse con el almidón intacto forma un complejo marrón oscuro. Los resultados se recogieron a los 14 días de incubación.

Pruebas de hidrólisis de la arbutina y de la esculina: se utilizó en su determinación el medio diseñado por Williams (ver apéndice). Tras la incubación si el medio permanece del mismo color el resultado de la prueba es negativo, si se ennegrece el tubo se interpretaría como un resultado positivo. En estas pruebas se utiliza un control (ver apéndice) en el que se debe observar crecimiento del microorganismo. Se hicieron lecturas de resultados a los 7, 14 y 21 días.

Prueba de degradación de caseína: se inocularon las cepas usando como medio base SA1 al que se le adiciona caseína (ver apéndice). El resultado de la prueba es positivo si se observa la aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano, si a



pesar de que haya crecimiento no se observa el halo, el resultado es negativo. Se hicieron lecturas de resultados a los 7, 14 y 21 días.

Prueba de degradación de xilano: las cepas se inocularon en un medio base de SA1 al que se le había añadido previamente xilano (4 g/l). El resultado de la prueba es positivo si se observa la aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano, si a pesar de que haya crecimiento no se observa el halo, el resultado es negativo. Se hicieron lecturas de resultados a los 7, 14 y 21 días.

Prueba de degradación de gelatina: se inocularon las cepas en medio SA1 al que se le había añadido gelatina (ver apéndice). Para poder observar el resultado de la prueba es necesario cubrir las placas con una solución de revelado de HgCl<sub>2</sub> (ver apéndice). El resultado de la prueba es positivo si se observa la aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano, si a pesar de que haya crecimiento no se observa el halo, el resultado es negativo. En esta prueba se realiza una sola lectura a los 14 días.

Prueba de degradación de L-tirosina: las cepas de este estudio se inocularon en medio SA1 al que se le había añadido previamente L-tirosina (4 g/l). El resultado de la prueba es positivo si se observa la aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano. Si a pesar de que haya crecimiento no se observa el halo, el resultado es negativo. Se hicieron lecturas de resultados a los 7, 14 y 21 días.

Degradación de la urea: se utilizó el medio Urea Broth (Fluka®). Se emplearon cepas crecidas en medio sólido durante una semana para inocular los tubos con el medio de urea (ver apéndice). Cuando se produce la degradación de la urea el amoníaco que se libera produce el viraje del indicador que contiene el medio de rosa a púrpura, de modo que si a los 15 días se observa color púrpura el resultado es positivo, si permanece el color rosa el resultado es negativo. Como controles se utilizaron, *Escherichia coli* como negativo y *Proteus mirabilis* como positivo.

Degradación de Tween 20 y 80: las cepas se inocularon sobre un medio base (Sierra *et al.*, 1975) (ver apéndice) el cual contenía Tween a una concentración del 1% (v/v) que se había esterilizado por separado a 110°C durante 20 minutos. Tras la incubación, las placas que poseían un halo de agregados alrededor del crecimiento del inóculo

correspondían con un resultado positivo, mientras que los que carecían de él, aún existiendo crecimiento sobre la placa, correspondían con un resultado negativo. La lectura de los resultados se tomó a los 7, 14 y 21 días.

### **3.8.7. Pruebas de resistencia a la temperatura**

Para ver la capacidad de los organismos para crecer a diferentes temperaturas, se inocularon en placas de medio SA1 que fueron incubadas a: 4°C, 12°C, 20°C, 37°C y 45°C. Si se produce crecimiento en la placa se considera un resultado positivo, mientras que la ausencia de crecimiento indica un resultado negativo siempre y cuando haya un correcto crecimiento en la placa control, que debe estar a una temperatura de 28°C. El crecimiento en las placas se observó a los 7, 14 y 21 días.

### **3.8.8. Pruebas de resistencia al pH**

Se comprobó la capacidad de las cepas para crecer a diferentes pHs: 4,4; 5,4; 6,4; 8 y 9, utilizando como medio base SA1 (ver apéndice) y ajustando a los diferentes pHs mediante tampones (ver apéndice). El medio y los tampones se esterilizaron por separado y se mezclaron de forma aséptica justo antes de servir las placas. Si se produce crecimiento en la placa se considera un resultado positivo, mientras que la ausencia de crecimiento indica un resultado negativo siempre y cuando haya un correcto crecimiento en la placa control, que debe estar a un pH de 7,2. El crecimiento en las placas se observó a los 7, 14 y 21 días.

### **3.8.9. Pruebas de resistencia a la salinidad**

Se determinó la capacidad de las cepas para crecer a diferentes concentraciones de cloruro sódico: 1%, 3%, 5%, 7% y 9% (p/v). Los medios se realizaron con medio base SA1 al que se añadió NaCl en los porcentajes correspondientes. Si se produce crecimiento en la placa se considera un resultado positivo, mientras que la ausencia de crecimiento indica un resultado negativo siempre y cuando haya un correcto crecimiento en la placa control. El crecimiento en las placas se observó a los 7, 14 y 21 días.

### **3.8.10. Catalasa**

Se utilizaron placas con cultivos jóvenes, con crecimiento de aproximadamente una semana. La catalasa degrada el peróxido de hidrógeno hasta agua y oxígeno. Sobre el cultivo fresco de los microorganismos, se añadieron unas gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (Panreac®). Si se producen burbujas de oxígeno la reacción es positiva, y es negativa si no se forman burbujas.

### **3.8.11. Oxidasa**

La citocromo C oxidasa interviene en reacciones de oxidación de la cadena respiratoria (Kovacs, 1956). Para observar la reacción se añadieron unas gotas de una suspensión al 1% de N, N, N', N'-Tetrametil-1,4-fenilendiamina diclorhidrato (Fluka®) en agua milli-Q estéril, sobre el cultivo fresco de los microorganismos. La reacción es positiva cuando se produce el viraje a un color morado en menos de 20 s.

Tabla 9. Pruebas realizadas para comprobar la resistencia y la utilización y degradación de compuestos por parte de los microorganismos.

Prueba	Concentración (%) (p/v)	Prueba	Concentración (%) (p/v)
<b>Fuentes de carbono</b>		<b>Hidrólisis de:</b>	
<i>Carbohidratos</i>		Almidón	1
Ácido galacturónico	1	Arbutina	0,1
Ácido glutárico	1	Caseína	1
Ácido propiónico	1	Esculina	0,1
Ácido quínico	1	Gelatina	0,4
Almidón	1	Tirosina	0,5
Arabinosa	1	Urea	2
Celobiosa	1	Xilano	0,4
Fructosa	1		
Galactosa	1	<b>Catalasa</b>	
Gluconato de Na	1	<b>Oxidasa</b>	
Glucosa	1	<b>Tween 20</b>	
Maltosa	1	<b>Tween 80</b>	
Manosa	1	<b>Crecimiento en:</b>	
Melebiosa	1	NaCl	1
Melecitosa	1		3
Mesoeritritol	1		5
Rafinosa	1		7
Ramnosa	1		9
Sacarosa	1		
Sorbitol	1	pH	4,5
Sorbosa	1		5,5
Trehalosa	1		6,5
Xilitol	1		8
Xilosa	1		9
		Temperaturas	4°C
<i>Aminoácidos</i>			12°C
Alanina	0,1		20°C
Arginina	0,1		37°C
Histidina	0,1		45°C
Lisina	0,1		
Prolina	0,1		
Salicina	0,1		
Serina	0,1		
Tirosina	0,1		
Valina	0,1		

## *RESULTADOS Y DISCUSIÓN*

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 *Recogida de muestras y análisis del entorno*

En cada una de las zonas de muestreo se recolectaron entre 2 y 5 plantas de guisante (*Pisum sativum*) y una vez en el laboratorio se procedió al recuento del número de nódulos existente en cada una de ellas (Tabla 10).

Tabla 10. Nódulos presentes en las plantas recolectadas.

Localidad	Código planta	Nº nódulos	Media
Arcellares del Tozo	BUGA	83	61
Arcellares del Tozo	BUGB	28	
Arcellares del Tozo	BUGC	72	
Cañizal	GUI	109	73,5
Cañizal	GUI	38	
Cardeñosa	AG	96	103,7
Cardeñosa	AG	103	
Cardeñosa	AG	119	
Cardeñosa	AG	97	
Ferrerías de Abajo	FGA	123	135
Ferrerías de Abajo	FGB	38	
Ferrerías de Abajo	FGC	237	
Ferrerías de Abajo	FGD	144	
Ferrerías de Abajo	FGE	133	
Riego de la Vega	LG	21	20
Riego de la Vega	LG	19	
Salamanca	SG	81	61
Salamanca	SGA	45	
Salamanca	SGB	57	
Valladolid	VGA	119	84,7
Valladolid	VGB	69	
Valladolid	VGC	66	

Con los datos obtenidos se puede observar que las plantas con mayor número de nódulos proceden de la localidad de Ferrerías de Abajo y en las que hubo menos de la localidad de Riego de la Vega.

De cada una de las zonas de muestreo se recogieron además 500 g de suelo, para posteriormente realizar el análisis físico-químico de cada uno de ellos. Este proceso se llevó a cabo en el laboratorio de Edafología de la facultad de Ciencias Agrarias y

Ambientales de la Universidad de Salamanca y los resultados pueden observarse en la tabla 11.

Tabla 11. Análisis de los suelos de las zonas de muestreo.

Muestras	pH	% Materia Orgánica	% Nitrógeno	Ca asimilable	Mg asimilable	K asimilable	P asimilable
Arcellares del Tozo	7.33	3.66	0.195	2650	45	256	65.4
Cañizal	7.37	2.14	0.150	1714	195	298	24.2
Cardeñosa	7.55	3.25	0.194	1560	186	190	40.8
Ferreras de Abajo	6.05	7.16	0.445	1593	125	455	116.4
Riego de la Vega	6.26	1.74	0.137	478	37	62	62.4
Salamanca	7.86	1.16	0.080	2710	180	215	42.6
Valladolid	7.26	2.97	0.177	2668	232	248	149.5

Ca, Mg, K y P se expresan en mg/kg.

Los valores de pH muestran diferencias entre los distintos suelos analizados, ya que varían entre valores moderadamente ácidos, como los suelos procedentes de Ferreras de Abajo y de Riego de la Vega, suelos neutros, como el de Valladolid y suelos medianamente alcalinos, como los observados en Arcellares del Tozo, Cañizal, Cardeñosa y Salamanca, según la clasificación de Fernández-Linares (2006). Estos niveles se encuentran dentro de los límites descritos para el crecimiento del género *Micromonospora* (Kawamoto, 1989) y son adecuados para el crecimiento de las plantas de guisante, ya que estas se desarrollan bien entre valores de 6 y 7,5.

En el porcentaje de materia orgánica también se observan grandes variaciones, ya que se consideran bajos los valores inferiores al 1,5%, como es el caso del suelo de Salamanca; un valor intermedio está determinado entre un 1,5% y un 3,5%, valor que encontramos en la mayoría de los suelos analizados. Desde el 3,6 al 6%, se considera un valor alto, como es el caso del suelo de Arcellares del Tozo, y suelos como el de Ferreras de Abajo, con un valor superior a un 6% se considera un nivel muy alto de porcentaje de materia orgánica ([www.infoagro.com](http://www.infoagro.com)).

El contenido de nitrógeno es un valor de alta importancia en el estudio de un suelo en el que se espera que se produzca la fijación de nitrógeno, ya que algunos autores han descrito que una alta concentración de este elemento químico disminuye la formación

de nódulos en leguminosas (Huss-Danell, 1997; Wall *et al.*, 2000). Sin embargo, a la vista de los resultados, no parece que esto sea así, ya que el suelo de Ferreras de Abajo, que posee el contenido más alto de N<sub>2</sub>, y considerado un valor extremadamente rico (> 0,221) en la clasificación de Moreno (1978), es en el que se han producido un mayor número de nódulos por planta, con una media de 135 (Tabla 10). El suelo con menor contenido en nitrógeno es el de Salamanca, con una producción intermedia de nódulos y que se incluye en la categoría de medianamente pobre. Los suelos de Cañizal y Riego de la Vega quedan clasificados como medianamente ricos, mientras que los de Arcellares del Tozo, Cardeñosa y Valladolid son ricos.

Otros elementos de importancia son el fósforo, el potasio, el calcio y el magnesio, ya que son elementos esenciales para el desarrollo de las plantas y pueden intervenir en la fijación del nitrógeno y en los intercambios catiónicos. Los valores de calcio se consideran bajos en torno a los 460 mg/kg y altos por encima de 2000 mg/kg (Rincón *et al.*, 2004), por lo que de nuevo vemos una alta variabilidad entre nuestros suelos ya que los valores varían entre 478 mg/kg en Riego de la Vega, a 2668 mg/kg en el suelo de Valladolid. En el caso del magnesio, los valores obtenidos para la mayoría de los suelos se consideran valores altos, ya que los valores medios son entre 0,1 y 100 mg/kg, entre los que están únicamente los suelos de Arcellares del Tozo y Riego de la Vega, estando los demás suelos por encima de estos niveles. En el caso del potasio ocurre algo similar, ya que valores por encima de 100 se consideran altos, y en nuestro caso existen valores, como el obtenido para Ferreras de Abajo, que se encuentra por encima de los 450 mg/kg; sólo el suelo perteneciente a Riego de la Vega presentaba un valor intermedio (entre 60 y 100 mg/kg). Al analizar el fósforo asimilable, vemos que el suelo procedente de Cañizal presenta valores bajos (entre 0 y 25 mg/kg), los suelos de Cardeñosa, y Salamanca presentan valores intermedios (entre 25 y 50 mg/kg) y el resto de los suelos presentan valores altos (>100 mg/kg).

En general, se puede decir que, aunque existen variaciones importantes de unos suelos analizados a otros, la mayoría son bastante ricos en nutrientes, favoreciendo así un buen desarrollo vegetal y del mismo modo la presencia de un número más elevado de microorganismos.



## 4.2 **Aislamiento de microorganismos**

### 4.2.1. **Microorganismos aislados de nódulos**

Tanscurridas entre dos y tres semanas, sobre las placas de aislamiento de los nódulos se podían distinguir fundamentalmente dos tipos de microorganismos, los que poseían un crecimiento tipo-rhizobia, aislados típicos de este nicho, que se caracterizaban por un color blanquecino y una textura mucosa, y otros microorganismos que poseían características morfológicas típicas de actinomicetos, presentando colonias cuyo micelio se fijaba sobre el agar. De entre estos últimos, fueron seleccionados para obtener cultivos puros los aislados que se caracterizaban por su similitud morfológica con el género *Micromonospora*, es decir, poseían micelio ramificado que penetraba en el agar, carecían de micelio aéreo y su coloración variaba entre distintos tonos de naranja que se oscurecían con el tiempo debido a la formación de esporas.

Se obtuvieron de este modo 239 cepas sobre el medio YMA a partir de los nódulos de guisante (*Pisum sativum*) (Figura 13). Destacar la ausencia de otros microorganismos de crecimiento más rápido que los actinomicetos (*Bacillus*, *Paenibacillus*), así como de hongos sobre las placas. Alrededor de los nódulos control esterilizados que se depositaron sobre las placas de aislamiento se pudo comprobar la ausencia de microorganismos resistentes a la esterilización (Figura 14a). De las cepas aisladas 5 fueron obtenidas de nódulos recogidos en Arcellares del Tozo, 27 de los recogidos en Cañizal, 16 de los nódulos tomados en Cardeñosa, 103 de los de Ferreras de Abajo, 9 a partir de los de Riego de la Vega, 46 de los de Salamanca y 33 de los de Valladolid (Tabla 13). Los códigos establecidos para las cepas hacen referencia a la localidad y/o a la planta de la que fueron aislados.

Teniendo en cuenta la gran cantidad de cepas aisladas y la imposibilidad de llevar a cabo sobre todas ellas un análisis taxonómico comparativo entre las poblaciones de nódulos y rizosfera, se tomo la decisión de reducir a 2 las zonas para continuar el análisis, las que poseían un número intermedio de cepas, que fueron las zonas de Cañizal y Salamanca.



Fig. 13. Planta de guisante, nódulos radicales y rizosfera.

#### 4.2.2. Microorganismos aislados de rizosfera

A partir de las tres semanas de incubación de las placas se empezó a observar el desarrollo de microorganismos tipo actinomiceto, aunque con anterioridad ya habían aparecido otro tipo de colonias (tipo *Rhizobia* o tipo *Bacillus*) que no fueron recogidas. De entre las colonias tipo actinomiceto observadas, se seleccionaron las que poseían una similitud morfológica con el género *Micromonospora* (Figura 14b), es decir, crecimiento filamentososo que penetraba en el agar, colores naranjas que se oscurecían con la formación de esporas y carencia de micelio aéreo.

Para el aislamiento, además del medio YMA, se utilizaron los medios de caseína-almidón, ácido húmico I y ácido húmico II (ver apéndice), que resultaron más eficaces en el aislamiento de microorganismos tipo actinomiceto, ya que limitan más el crecimiento de los microorganismos Gram negativos y permiten que los actinomicetos, que tardan más en crecer, aparezcan en las placas sin que estas hayan sido colonizadas por otros microorganismos de crecimiento más rápido. Los resultados de las cepas obtenidas en cada uno de los medios se presentan en la tabla 12.

El medio más eficaz en el aislamiento de los microorganismos buscados fue el de ácido húmico I, en el que se obtuvieron más de la mitad de los aislados, mientras que en el medio YMA se obtuvo el porcentaje más bajo de aislados.

Tabla 12. Porcentaje de cepas aisladas en función del medio de aislamiento.

Medio	% de cepas aisladas
YMA	6,06
Caseína-almidón	24,24
Ácido húmico I	45,45
Ácido húmico II	24,24

Se aislaron 33 microorganismos a partir de la rizosfera de los nódulos de guisante, 21 cepas a partir de la rizosfera de los guisantes de Cañizal y 12 a partir de la rizosfera de los guisantes de Salamanca (Tabla 13). En éste caso se utilizaron los códigos CR y SR, en el que la C y la S vienen de las localidades donde se recogieron las muestras, Cañizal y Salamanca respectivamente, y la R en ambos casos por ser extraídas de la rizosfera.

En total se realizó el aislamiento de 272 microorganismos (Tabla 13), 239 de los cuales pertenecían a aislamientos procedentes de nódulos y 33 a aislamientos procedentes de la rizosfera.

Tabla 13. Microorganismos aislados recogidos en cada zona de estudio.

Zona Aislamiento	Nº de aislados	
	Nódulos	Rizosfera
<b>Arcellares del Tozo</b>	5	-
<b>Cañizal</b>	27	21
<b>Cardenosa</b>	16	-
<b>Ferreras de Abajo</b>	103	-
<b>Riego de la Vega</b>	9	-
<b>Salamanca</b>	46	12
<b>Valladolid</b>	33	-
<b>Total</b>	239	33

Las 106 cepas con las que se continuó el estudio con sus respectivos códigos, aparecen detalladas en la Tabla 14.

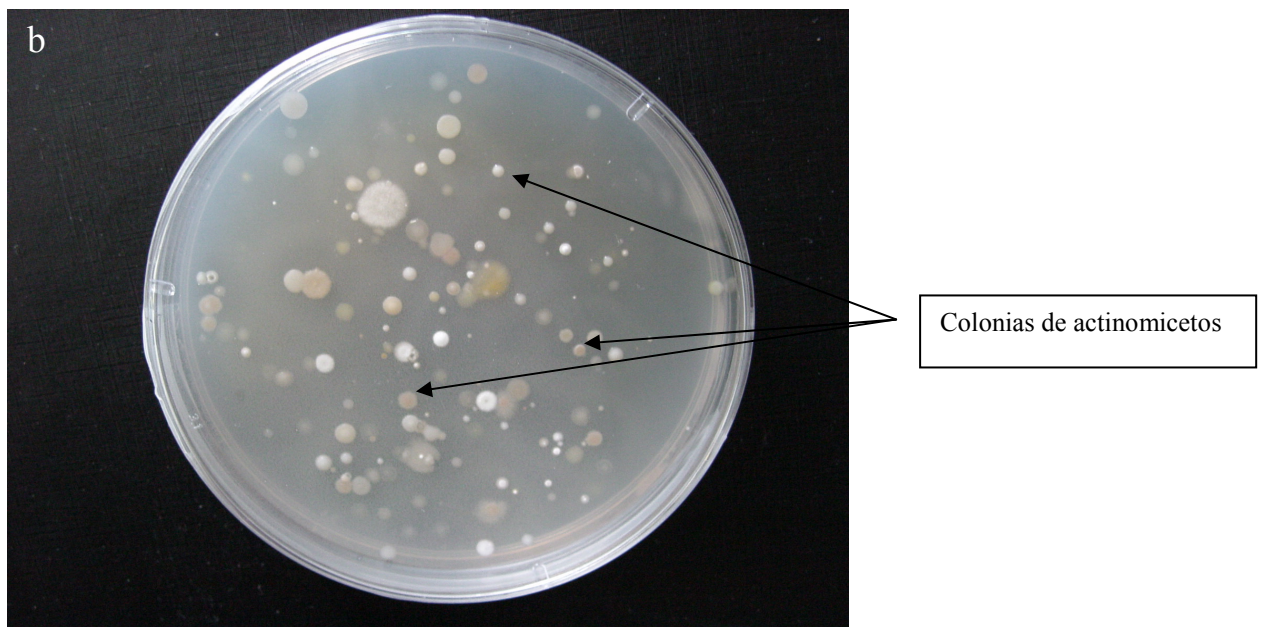
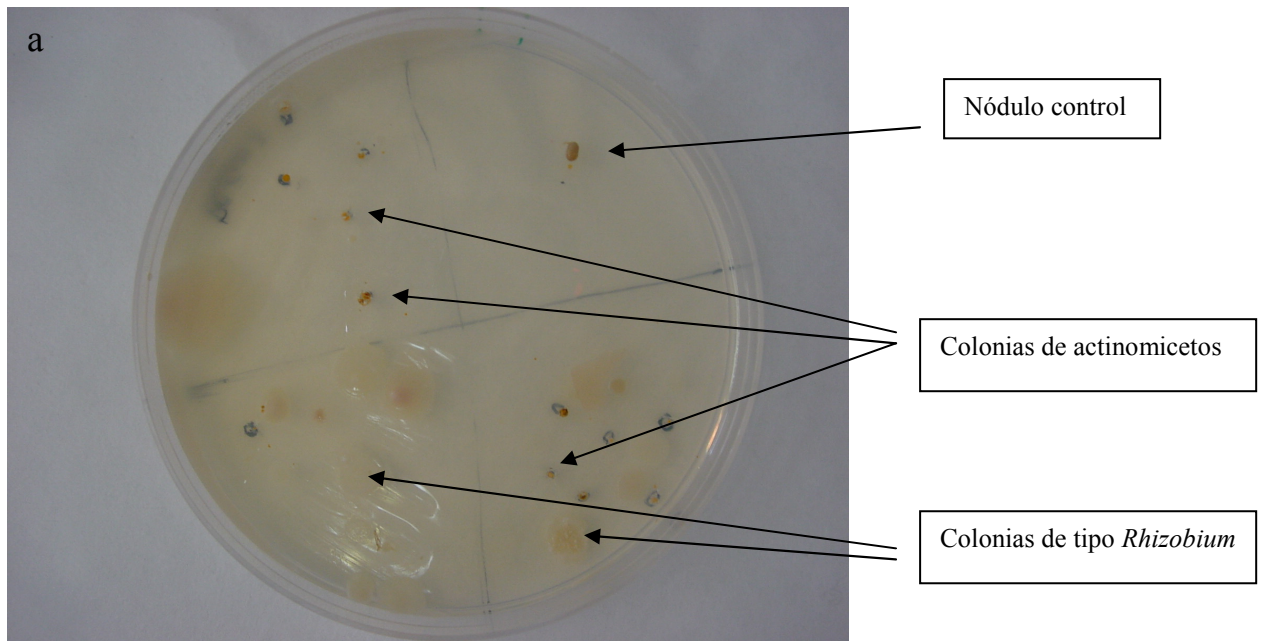


Fig. 14. Placas de aislamiento de nódulos (a) y de suelo (b).

Tabla 14. Cepas utilizadas en el estudio procedentes de nódulos y rizosfera de plantas de *Pisum sativum* recogidas en Cañizal y Salamanca.

CEPA	LOCALIDAD	HÁBITAT	MEDIO DE AISLAMIENTO
<b>GUI 2</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>GUI 3</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>GUI 4</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>GUI 6</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>GUI 8</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>GUI 10</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>GUI 11</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>GUI 12</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>GUI 13</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>GUI 14</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>GUI 15</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>GUI 16</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>GUI 19</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>GUI 23</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>GUI 27</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>GUI 28</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>GUI 30</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>GUI 31</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>GUI 34</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>GUI 37</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>GUI 40</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>GUI 41</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>GUI 42</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>GUI 43</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>GUI 44</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>GUI 61</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>GUI 63</b>	Cañizal	Nódulo	YMA
<b>SG 1</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SG 2</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SG 3</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SG 4</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SG 5</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SG 6</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SG 7</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SG 8</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SG 9</b>	Salamanca	Nódulo	YMA

GUI: cepas nódulos de Cañizal; SG: cepas de nódulos de Salamanca.

Continúa...

CEPA	LOCALIDAD	HÁBITAT	MEDIO DE AISLAMIENTO
<b>SG 10</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SG 11</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SG 13</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SG 14</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SG 15</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SG 16</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SG 17</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SG 18</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGA 1</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGA 2</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGA 3</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGA 4</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGA 5</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGA 6</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGA 7b</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGA 8</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGA 9</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGA 11</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGA 12</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGA 13</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGA 14</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGA 16</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGA 17</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGA 18</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGA 19</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGA 20</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGA 21</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGB 1</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGB 3</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGB 4</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGB 7</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGB 8</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGB 12</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGB 13</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGB 14</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>SGB 15</b>	Salamanca	Nódulo	YMA

SG (planta 1), SGA (planta 2), SGB (planta 3): cepas de nódulos de Salamanca.

Continúa...



CEPA	LOCALIDAD	HÁBITAT	MEDIO DE AISLAMIENTO
<b>SGB 16</b>	Salamanca	Nódulo	YMA
<b>CR 1A</b>	Cañizal	Rizosfera	Caseína-almidón
<b>CR 6</b>	Cañizal	Rizosfera	Caseína-almidón
<b>CR 8</b>	Cañizal	Rizosfera	Ácido húmico II
<b>CR 9</b>	Cañizal	Rizosfera	Caseína-almidón
<b>CR 10</b>	Cañizal	Rizosfera	Ácido húmico II
<b>CR 18</b>	Cañizal	Rizosfera	Ácido húmico II
<b>CR 19</b>	Cañizal	Rizosfera	Ácido húmico I
<b>CR 20</b>	Cañizal	Rizosfera	Ácido húmico I
<b>CR 21</b>	Cañizal	Rizosfera	Ácido húmico I
<b>CR 22</b>	Cañizal	Rizosfera	Caseína-almidón
<b>CR 23</b>	Cañizal	Rizosfera	Caseína-almidón
<b>CR 24</b>	Cañizal	Rizosfera	Ácido húmico I
<b>CR 25</b>	Cañizal	Rizosfera	Ácido húmico I
<b>CR 26</b>	Cañizal	Rizosfera	Ácido húmico I
<b>CR 27</b>	Cañizal	Rizosfera	YMA
<b>CR 30</b>	Cañizal	Rizosfera	Ácido húmico II
<b>CR 36</b>	Cañizal	Rizosfera	Ácido húmico II
<b>CR 37</b>	Cañizal	Rizosfera	Ácido húmico I
<b>CR 38</b>	Cañizal	Rizosfera	Ácido húmico I
<b>CR 39</b>	Cañizal	Rizosfera	Ácido húmico I
<b>CR 40</b>	Cañizal	Rizosfera	Ácido húmico I
<b>SR 1</b>	Salamanca	Rizosfera	Ácido húmico I
<b>SR 2</b>	Salamanca	Rizosfera	Ácido húmico I
<b>SR 3</b>	Salamanca	Rizosfera	Ácido húmico II
<b>SR 4</b>	Salamanca	Rizosfera	Ácido húmico I
<b>SR 5</b>	Salamanca	Rizosfera	Ácido húmico II
<b>SR 6</b>	Salamanca	Rizosfera	Ácido húmico II
<b>SR 10A</b>	Salamanca	Rizosfera	Caseína-almidón
<b>SR 10B</b>	Salamanca	Rizosfera	Caseína-almidón
<b>SR 11</b>	Salamanca	Rizosfera	Caseína-almidón
<b>SR 12</b>	Salamanca	Rizosfera	Ácido húmico I
<b>SR 14</b>	Salamanca	Rizosfera	YMA
<b>SR 15</b>	Salamanca	Rizosfera	Ácido húmico I

**SGB**: cepas de nódulos de Salamanca; **CR**: cepas de rizosfera de Cañizal; **SR**: cepas de rizosfera de Salamanca.

### **4.3 Estudio de la diversidad genética de los microorganismos aislados**

Las 106 cepas de actinomicetos aisladas de nódulos y rizosfera de Cañizal y Salamanca se seleccionaron para llevar a cabo el estudio de la diversidad genética existente. Se obtuvieron 27 cepas de nódulos de *Pisum sativum* de Cañizal, 46 de nódulos de *Pisum sativum* de Salamanca, 21 aisladas de la rizosfera de *Pisum sativum* de Cañizal y 12 de la rizosfera de *Pisum sativum* de Salamanca. Con estas cepas se evaluaron cuatro técnicas de tipado: BOX-PCR, Microsatélites, TP-RAPD y ARDRA, para determinar el nivel de resolución de cada una de ellas y seleccionar la más adecuada a la hora de analizar la diversidad genómica de los microorganismos aislados.

#### **4.3.1. Perfiles de BOX-PCR**

Dentro de las técnicas rep-PCR, que consisten en amplificar regiones que aparecen repetidas a lo largo del genoma bacteriano (Versalovic *et al.*, 1991), están incluidos los perfiles de BOX-PCR.

Los resultados obtenidos para este análisis los podemos observar en las figuras 15 a 18. Se observa la distribución de las bandas en los perfiles a lo largo del gel, con un tamaño que va desde 0,1 a 2,2 kb, existiendo perfiles con un número muy elevado de bandas, como la cepa GUI 61 con 16 (Figura 15) y otros, como la cepa SGB 1 (Figura 16), en los que sólo se observan 2. A nivel general, las cepas aisladas presentan una elevada diversidad genética, observándose que muy pocas cepas presentaron una huella idéntica a otra, lo cual indica una alta diversidad entre ellas. Estos perfiles permitieron diferenciar entre sí todas las cepas que no eran clones, es decir, cepas que podrían haber sido recogidas dos veces de las placas de aislamiento. Los trabajos de Lanoot *et al.* (2004), lograron diferenciar cepas de la misma especie para el género *Streptomyces*, y además demostraron una alta correlación entre las agrupaciones obtenidas a partir de los perfiles de BOX-PCR y los resultados obtenidos en hibridación ADN-ADN.



Analizando por separado cada uno de los grupos podemos ver que, en las cepas obtenidas de los nódulos de Cañizal las cepas GUI 32 y GUI 34 presentan perfiles idénticos (Figura 15), siendo diferentes en todas las demás. En las cepas procedentes de la rizosfera de Cañizal, vemos que tanto las cepas CR 10 y CR 21 como las CR 9 y CR 22 son prácticamente iguales entre sí (Figura 17). Así, teniendo en cuenta el número de cepas analizadas, podríamos decir que es más diversa la población correspondiente al nódulo que la correspondiente a la rizosfera de Cañizal. En el caso de los aislados de Salamanca se observa que para las cepas obtenidas de nódulos ninguno de los aislados es idéntico a otro, y teniendo en cuenta que es el grupo con mayor número de muestras analizadas, podríamos decir que, aparentemente, parece la zona más diversa de las cuatro, ya que, para los aislados de rizosfera sí tenemos dos cepas idénticas, la SR 4 y la SR 15 (Figura 18).

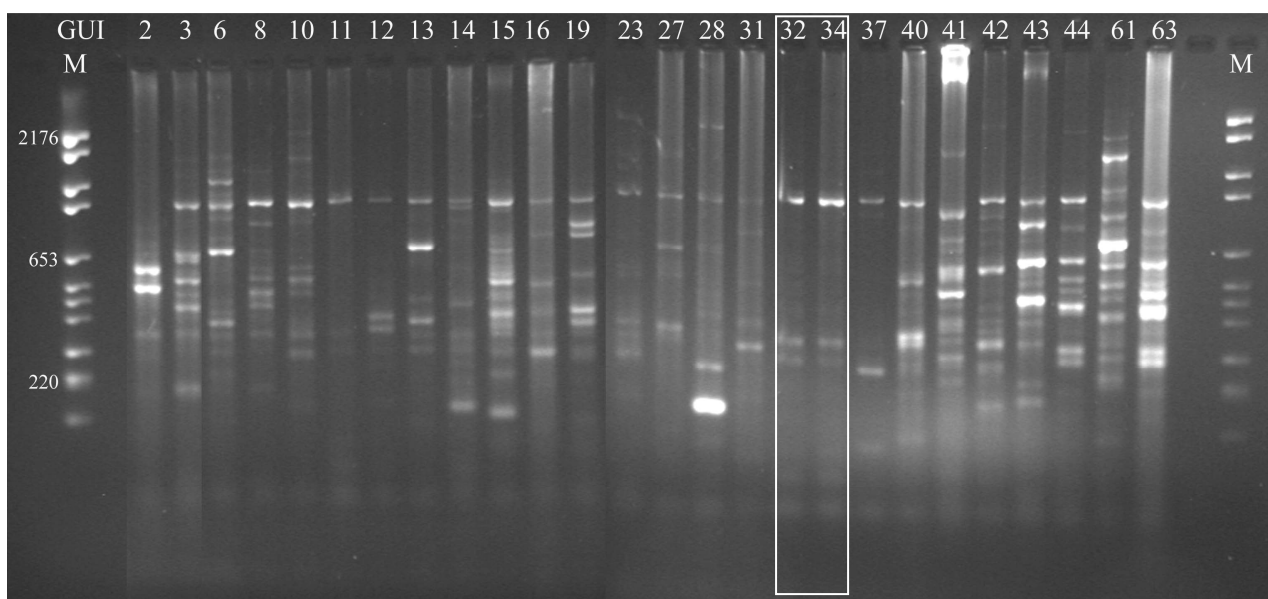


Fig. 15. Perfiles de BOX-PCR de cepas aisladas de nódulos de *Pisum sativum* de Cañizal.

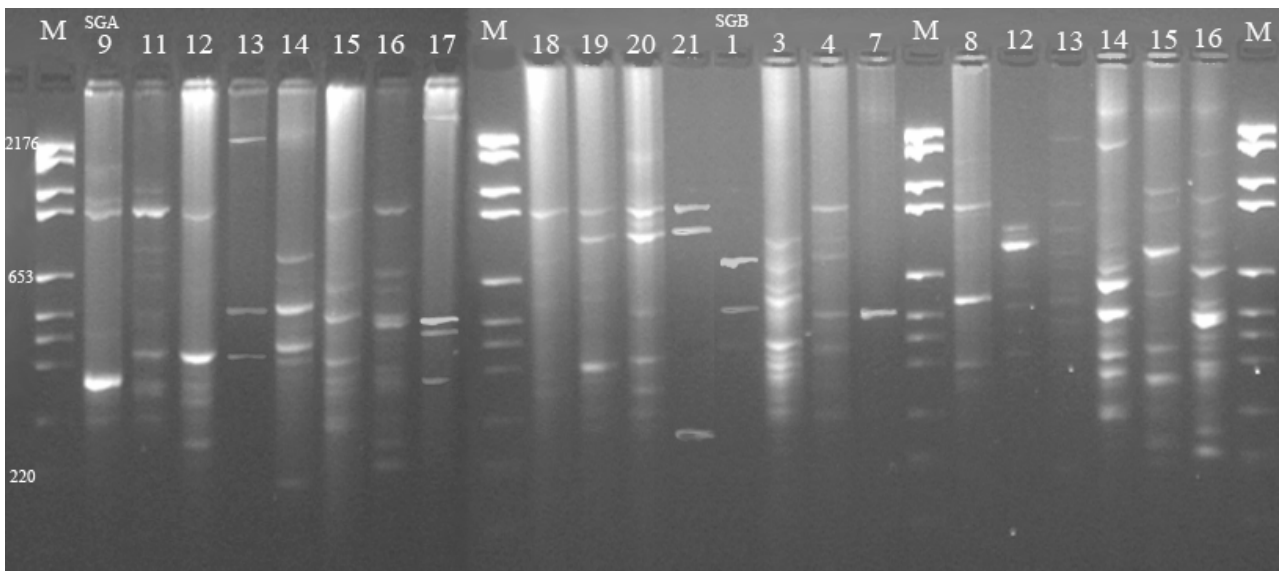
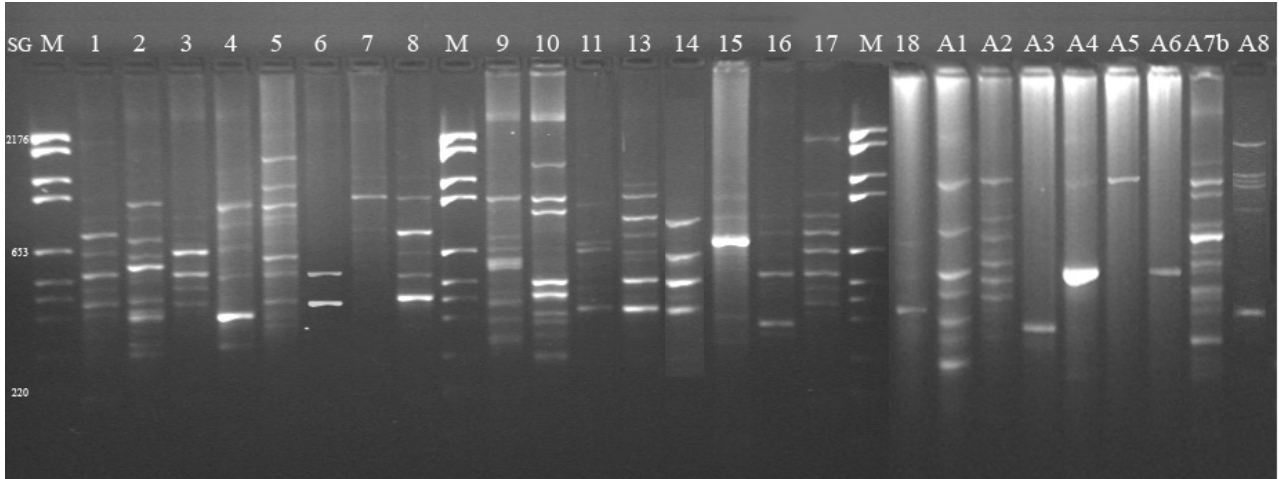


Fig. 16. Perfiles de BOX-PCR de cepas aisladas de nódulos de *Pisum sativum* de Salamanca.

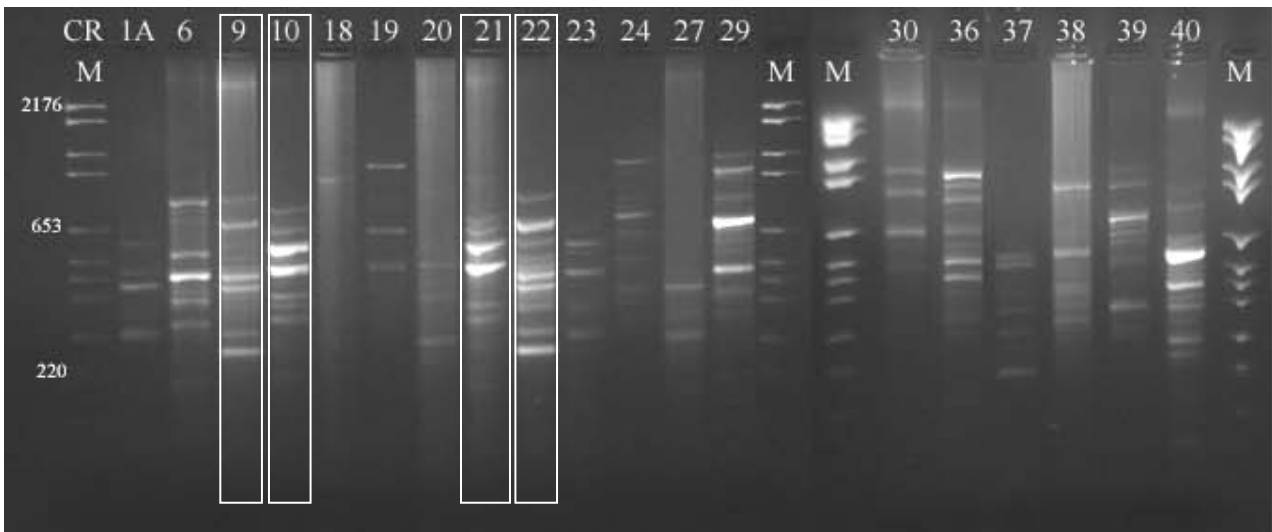


Fig. 17. Perfiles de BOX-PCR de cepas aisladas de rizosfera de *Pisum sativum* de Cañizal.

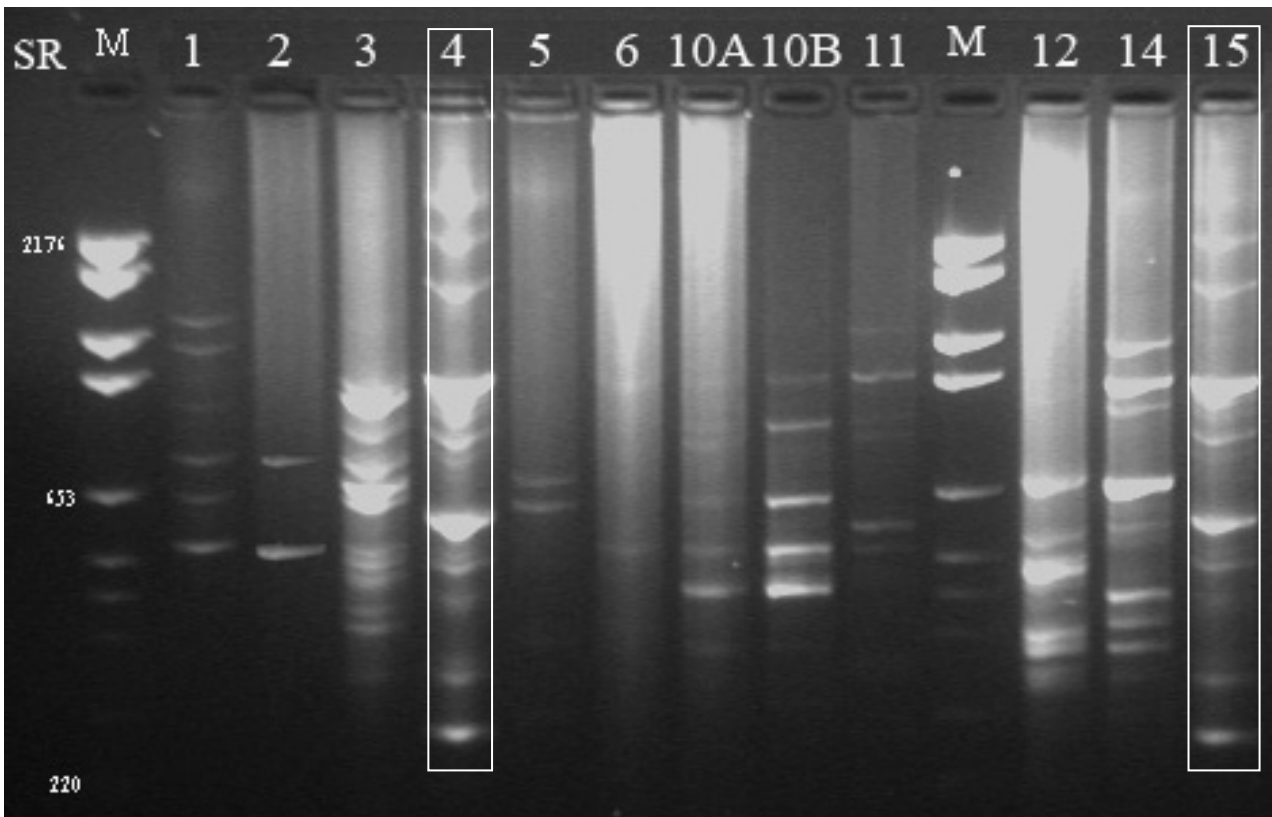


Fig. 18. Perfiles de BOX-PCR de cepas aisladas de rizosfera de *Pisum sativum* de Salamanca.

A continuación se realizó un análisis de forma conjunta con los aislados procedentes de los nódulos y de la rizosfera de las dos localidades de estudio a través del programa Bionumerics, utilizando el método de agrupamiento UPGMA y el coeficiente de correlación de Pearson, obteniendo el dendrograma que se puede observar en la figura 19. A partir de este dendrograma se establecieron 18 grupos utilizando un porcentaje aproximado de similitud en torno al 55 %. Los grupos obtenidos variaron enormemente en el número de cepas, ya que existían varios grupos con una sola cepa, como es el caso del grupo XII, que incluía únicamente la cepa CR 38 y otros grupos mucho más numerosos, llegando a incluir 15 cepas, como es el caso del grupo IV. La composición de los grupos se muestra en la tabla 15.

Al analizar los grupos obtenidos en cuanto a la diferente procedencia de las cepas muestreadas, se observa que no existe una correlación directa entre la zona de aislamiento y el grupo al que corresponde, ya que, a pesar de que existe una tendencia a estar agrupadas las cepas que proceden del mismo hábitat, como se observa en los grupos V y XVIII, existen grupos en los que aparecen cepas de las 4 procedencias (nódulos de Cañizal y Salamanca y rizosfera de Cañizal y Salamanca), como son los grupos IV y XVII. Sin embargo, en casi todos ellos podemos ver la presencia de un grupo mayoritario, correspondiente a una de las cuatro procedencias, que predomina sobre los demás.

A la vista de los resultados se puede concluir que la técnica de BOX-PCR:

- resulta muy resolutiva para analizar la diversidad.
- nos permite excluir clones, ya que el perfil sería idéntico, lo cual sería un resultado esperable en el análisis de cepas obtenidas de un hábitat tan concreto como son los nódulos.

Sin embargo, una vez analizadas las muestras, se comprobó que:

- la diversidad es muy alta.
- esta diversidad no sólo varía dependiendo de las zonas de muestreo, ya que en una misma zona los perfiles obtenidos difieren enormemente.

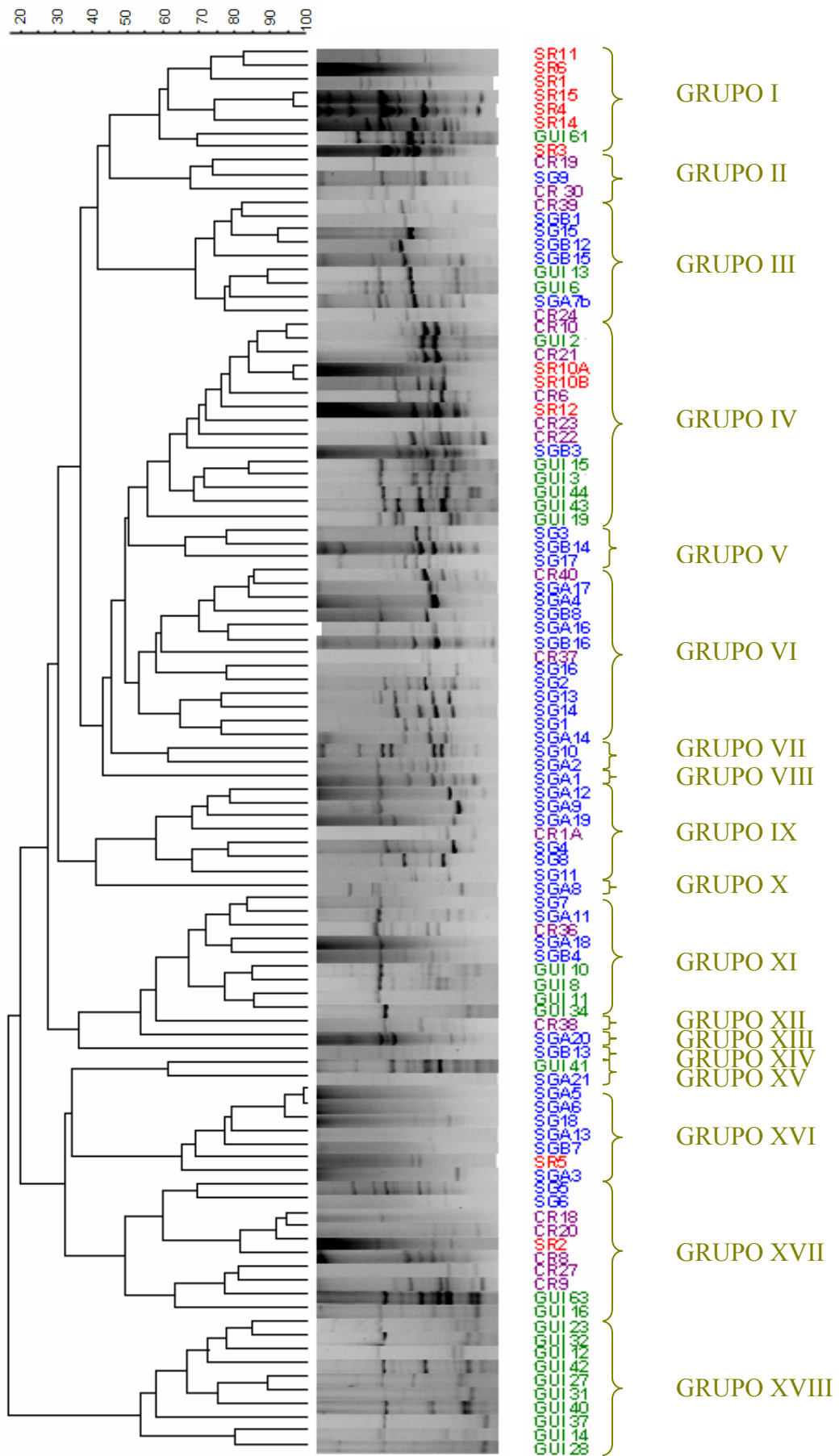


Fig. 19. Dendrograma de las cepas analizadas por BOX-PCR utilizando el coeficiente de Pearson y el método UPGMA. Cañizal (GUI: nódulos, CR: rizosfera), Salamanca (SG: nódulos, SR: rizosfera).

Tabla 15. Cepas incluidas en cada grupo según los perfiles de BOX-PCR.

GRUPO	CEPAS	Número de cepas				Total
		Nódulos		Rizosfera		
		Cañizal	Salamanca	Cañizal	Salamanca	
<b>I</b>	SR 11, SR 6, SR 1, SR 15, SR 4, SR 14, GUI 63, SR 3	1			7	8
<b>II</b>	CR 19, SG 9, CR 30		1	2		3
<b>III</b>	CR 39, SGB 1, SG 15, SGB 12, SGB 15, GUI 13, GUI 6, SGA 7b, CR 24	2	5	2		9
<b>IV</b>	CR 10, GUI 2, CR 21, SR 10A, SR 10B, CR 6, SR 12, CR 23, CR 22, SGB 3, GUI 15, GUI 3, GUI 44, GUI 43, GUI 19	6	1	5	3	15
<b>V</b>	SG 3, SGB 14, SG 17		3			3
<b>VI</b>	CR 40, SGA 17, SGA 4, SGB 8, SGA 16, SGB 16, CR 37, SG 16, SG 2, SG 13, SG 14, SG 1, SGA 14		11	2		13
<b>VII</b>	SG 10, SGA 2		2			2
<b>VIII</b>	SGA 1		1			1
<b>IX</b>	SGA 12, SGA 9, SGA 19, CR 1A, SG 4, SG 8, SG 11		6	1		7
<b>X</b>	SGA 8		1			1
<b>XI</b>	SG 7, SGA 11, CR 36, SGA 18, SGB 4, GUI 10, GUI 8, GUI 11, GUI 34	4	4	1		9
<b>XII</b>	CR 38			1		1
<b>XIII</b>	SGA 20		1			1
<b>XIV</b>	SGB 13		1			1
<b>XV</b>	GUI 41, SGA 21	1	1			2
<b>XVI</b>	SGA 5, SGA 6, SG 18, SGA 13, SGB 7, SR 5, SGA 3		6		1	7
<b>XVII</b>	SG 5, SG 6, CR 18, CR 20, SR 2, CR 8, CR 9, CR 27, GUI 63, GUI 16	2	2	5	1	10
<b>XVIII</b>	GUI 23, GUI 32, GUI 12, GUI 42, GUI 27, GUI 31, GUI 40, GUI 37, GUI 14, GUI 28	10				10

### 4.3.2. Perfiles de Microsatélites

El análisis de los perfiles de microsatélites nos muestra la diversidad microbiana a través de las diferencias encontradas en el número de unidades repetidas a lo largo del genoma, por lo que se consideran de gran utilidad a la hora de manejar un elevado número de aislados.

Una vez realizados los experimentos se obtuvieron los perfiles que se presentan en las figuras 20 a 23. En este caso los tamaños de bandas observados en los perfiles variaron entre 0,4 y 2,5 kb, existiendo también grandes diferencias en el número de bandas observadas en los aislados, desde 2 bandas en la cepa CR 23 (Figura 21), a 13 en la cepa SG 9 (Figura 22). Aquí se puede comprobar que la alta diversidad genética existente entre nuestros aislados se mantiene, observando una gran cantidad de perfiles diferentes en las cepas estudiadas. En este caso, al analizar cada una de las zonas de muestreo de forma individual podemos observar que en el caso de cepas obtenidas de nódulos de Cañizal, existen cuatro cepas que poseen exactamente el mismo perfil, que son GUI 11, GUI 12, GUI 32 y GUI 34, y dos cepas que presentan un perfil prácticamente idéntico, que son GUI 10 y GUI 16 (Figura 20). El resto de los perfiles son diferentes. En el caso de los aislados de rizosfera de Cañizal se observan perfiles idénticos entre las cepas CR 10 y CR 21, entre las cepas CR 1A y CR 27 y muy similares entre las cepas CR 18 y CR 38 y entre las cepas CR 9 y CR 22 (Figura 21). Por lo que teniendo en cuenta el número de cepas analizadas parece que la diversidad es mayor en los nódulos de Cañizal. En el caso de los aislados de Salamanca se pueden observar perfiles idénticos entre las cepas SGB 12 y SGB 13, entre las cepas SGA 17 y SGB 16, entre las cepas SGA 7b y SGA 8 y entre las cepas SG 13 y SG 16 y otras prácticamente iguales, como las cepas SG 1 y SG 18 (Figura 22). En los aislados de la rizosfera de Salamanca presentan perfiles similares sólo las cepas SR 4 y SR 15 (Figura 23), por lo que en este caso son más diversas las cepas procedentes de rizosfera que de nódulos. Cuando comparamos las cuatro zonas, vemos que la más diversa en este caso es la correspondiente a la rizosfera de Salamanca, aunque está próxima la perteneciente a los nódulos de Salamanca y la de los nódulos de Cañizal. Siendo la menos diversa la zona que corresponde con los aislados de rizosfera de Cañizal.

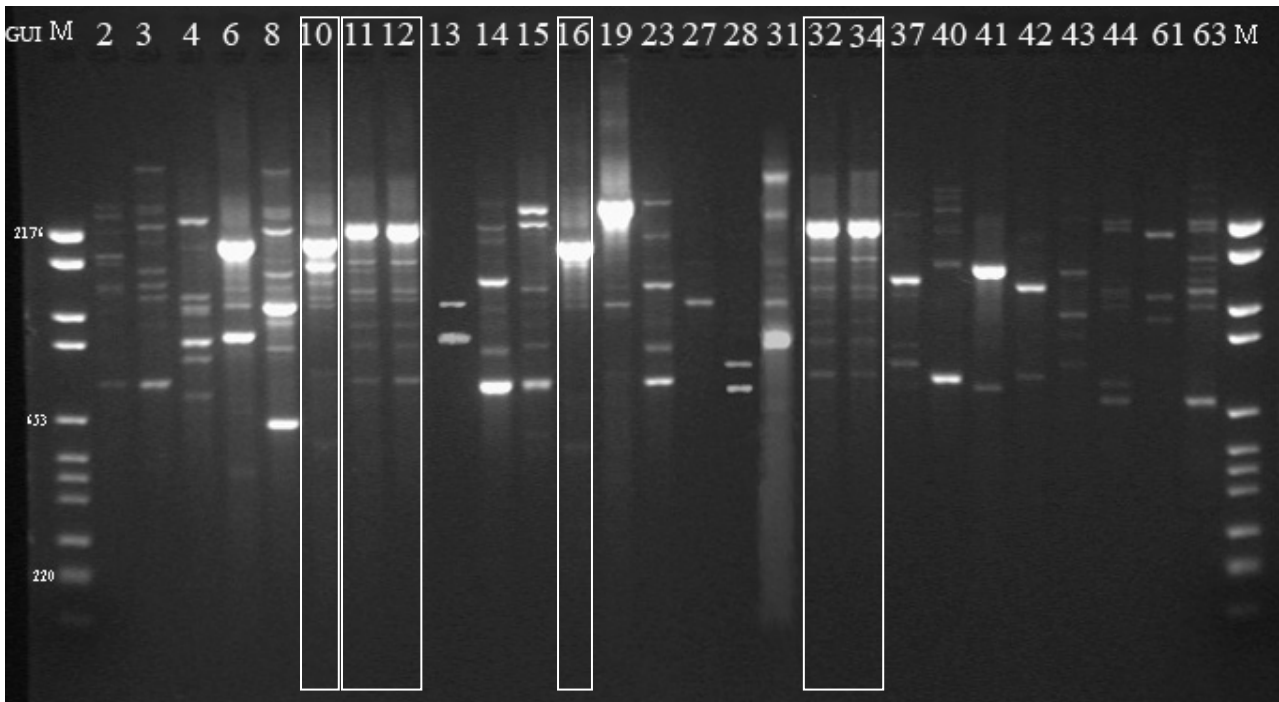


Fig. 20. Perfiles de Microsatélites de cepas aisladas de nódulos de *Pisum sativum* de Cañizal.

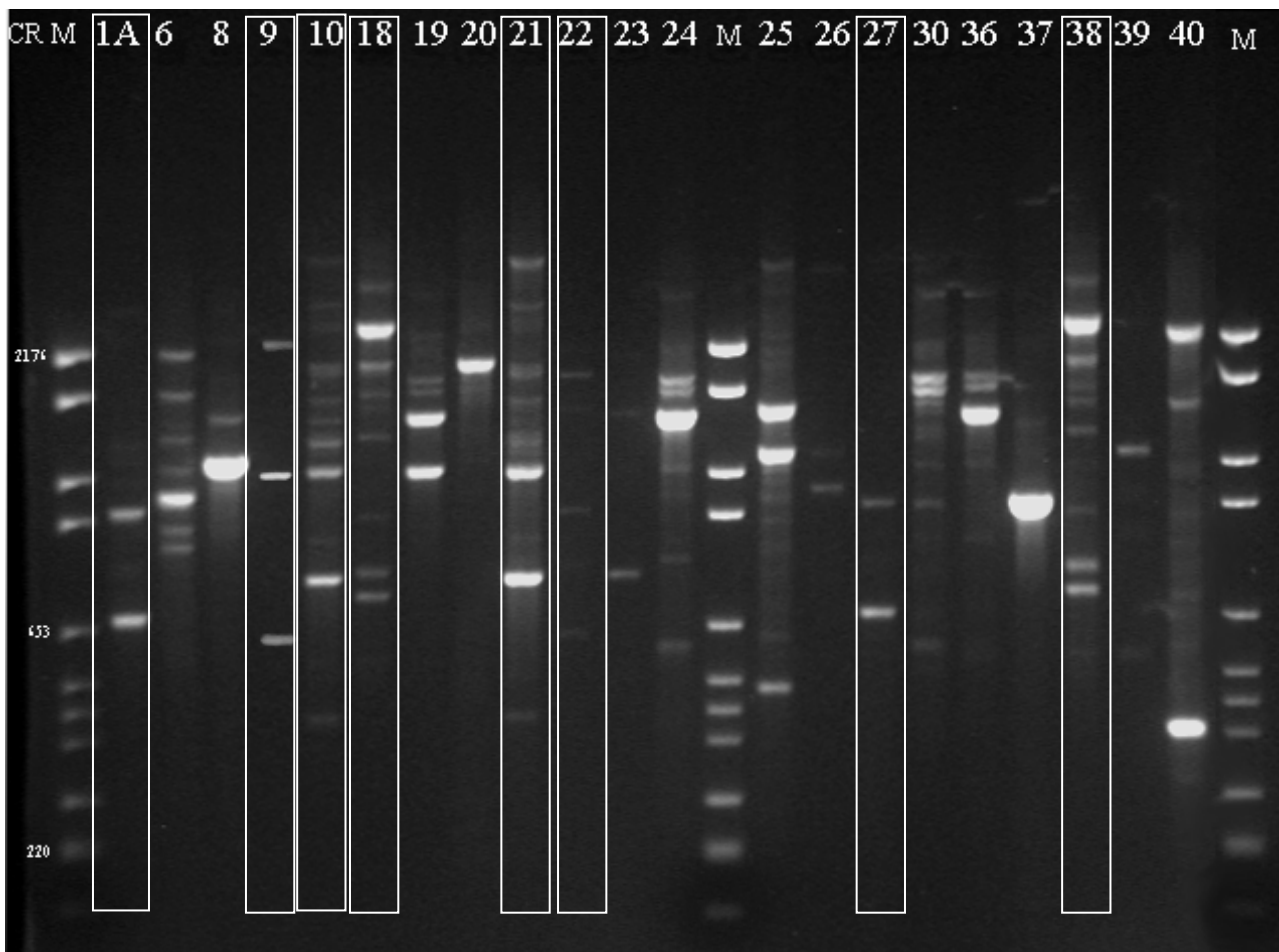


Fig. 21. Perfiles de Microsatélites de cepas aisladas de rizosfera de *Pisum sativum* de Cañizal.



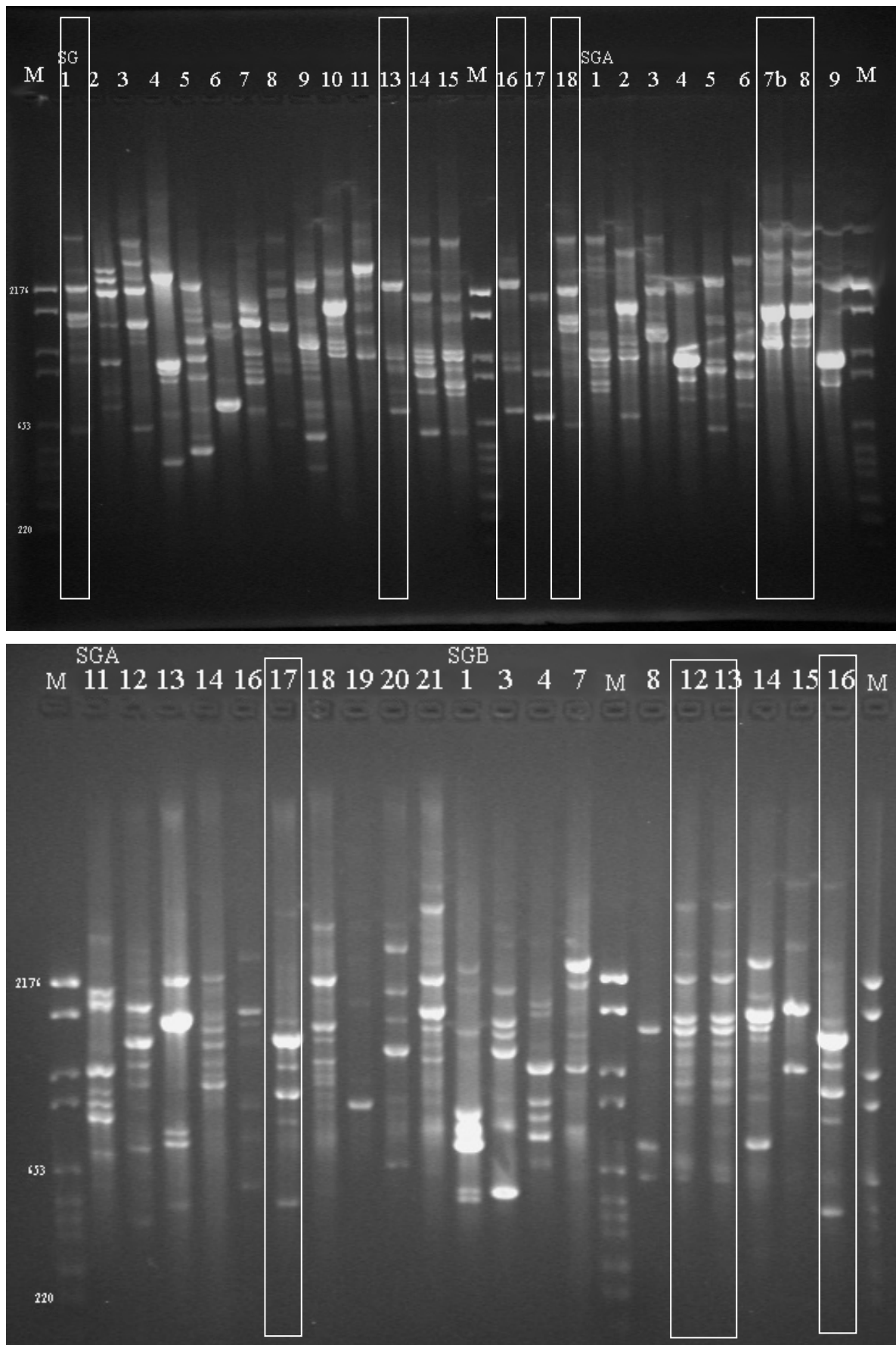


Fig. 22. Perfiles de Microsatélites de cepas aisladas de nódulos de *Pisum sativum* de Salamanca.

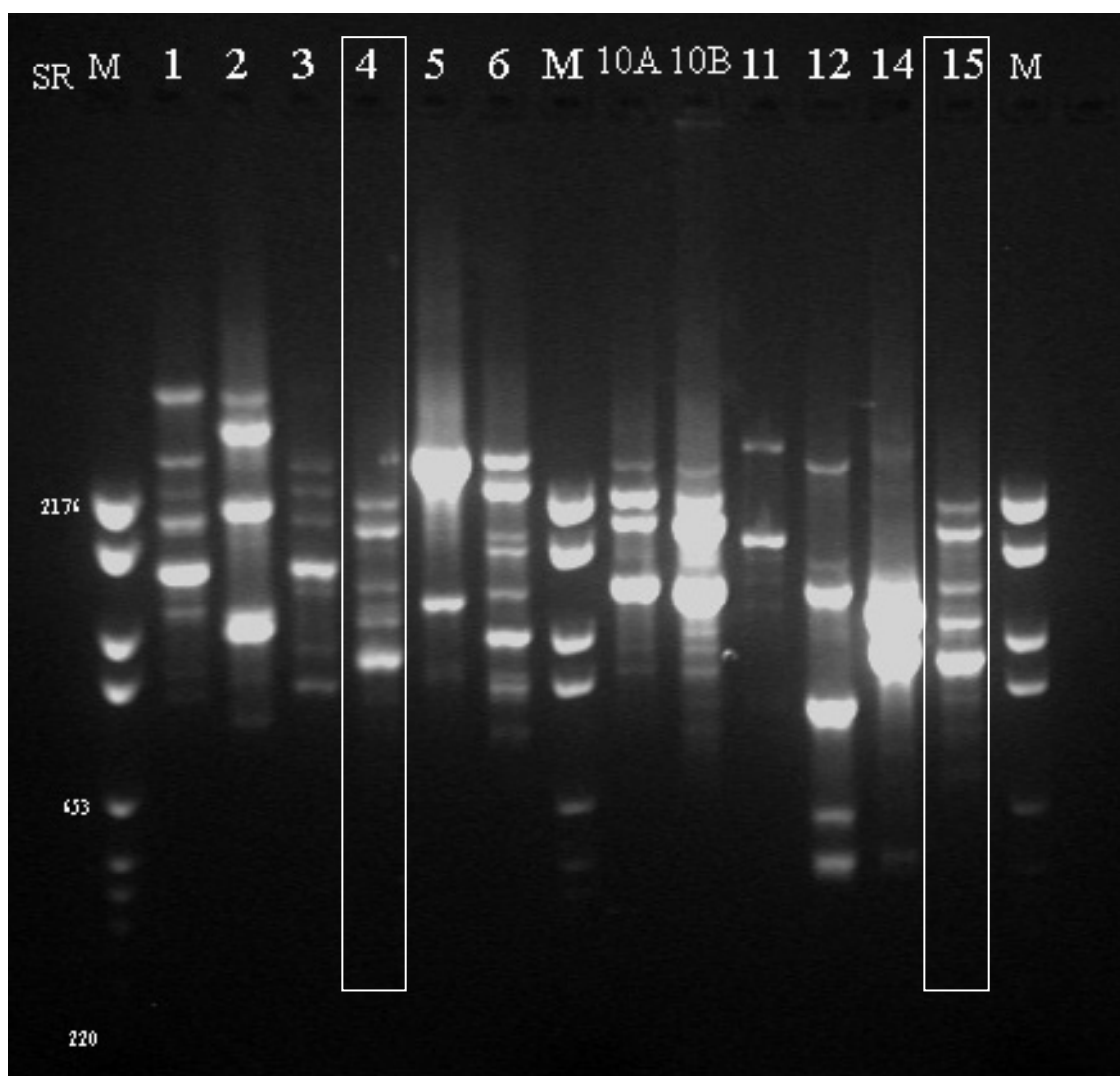


Fig. 23. Perfiles de Microsatélites de cepas aisladas de rizosfera de *Pisum sativum* de Salamanca.

Posteriormente, se procedió al análisis conjunto de los aislados procedentes de nódulos y rizosfera de Cañizal y Salamanca a través del programa Bionumerics. Se aplicó el coeficiente de correlación de Pearson y el método UPGMA, y se obtuvo de este modo el dendrograma que se observa en la figura 24. A partir de este dendrograma y tomando un porcentaje de similitud aproximado al 50% se establecieron 14 grupos, cuya composición se puede observar en la tabla 16.

Estos grupos, al igual que ocurría con los obtenidos del análisis de BOX-PCR, variaron mucho de unos a otros, los grupos más pequeños, que incluían sólo un aislado cada uno, fueron el grupo D, en el que aparecía la cepa GUI 28, el grupo H, en el que aparecía la cepa CR 22 y el grupo J, en el que aparecía la cepa CR 40. Por otro lado, los grupos mayoritarios fueron el A y el E, que incluían 20 aislados cada uno de ellos.

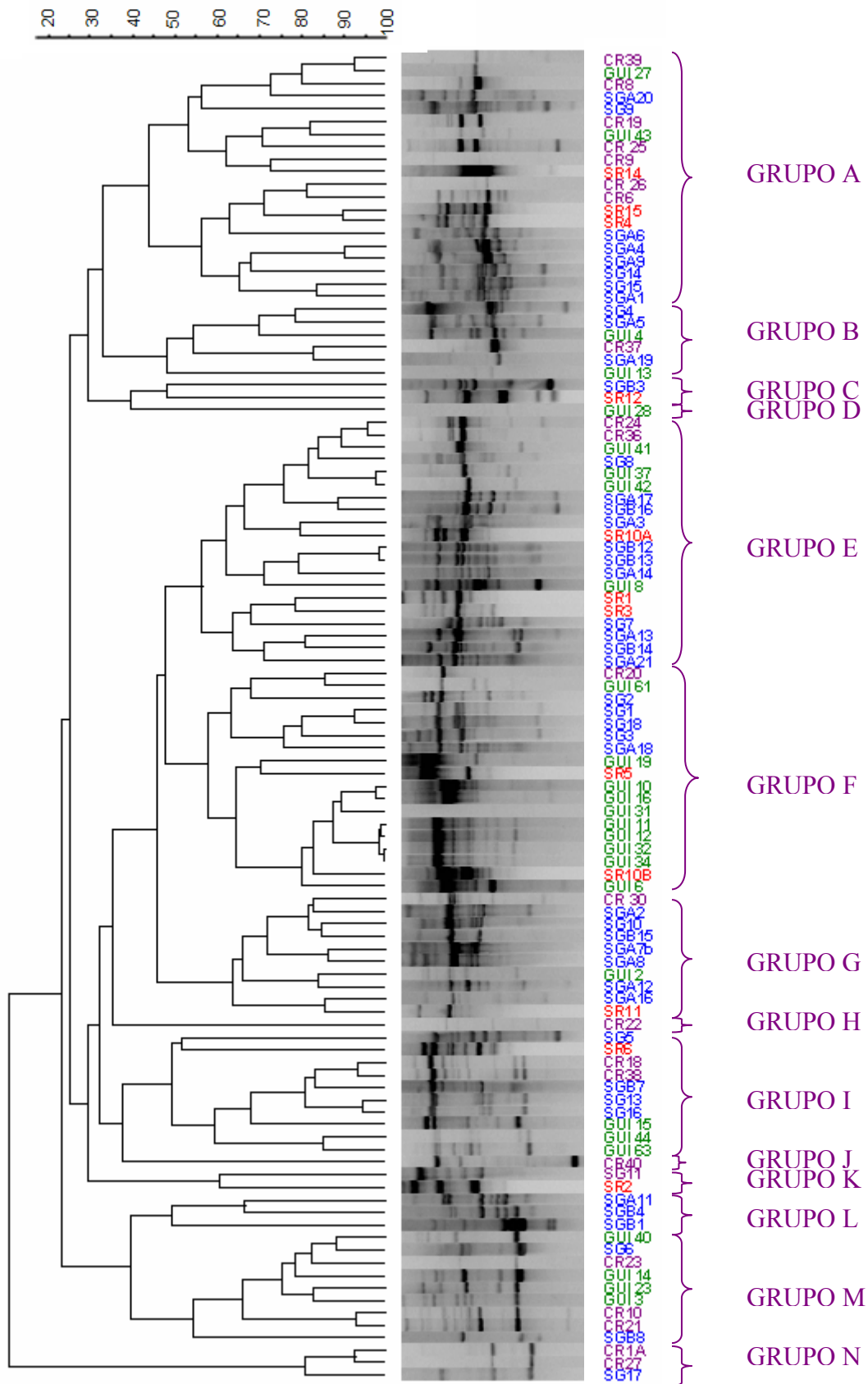


Fig. 24. Dendrograma de las cepas analizadas por Microsatélites basado en el método de agrupación UPGMA y el coeficiente de Pearson. Cañizal (GUI: nódulos, CR: rizosfera), Salamanca (SG: nódulos, SR: rizosfera).

Tabla 16. Cepas incluidas en cada grupo según los perfiles de Microsatélites.

GRUPO	CEPAS	Número de cepas				Total
		Nódulos		Rizosfera		
		Cañizal	Salamanca	Cañizal	Salamanca	
<b>A</b>	CR 39, GUI 27, CR 8, SGA 20, SG 9, CR 19, GUI 43, CR 25, CR 9, SR 14, CR 26, CR 6, SR 15, SR 4, SGA 6, SGA 4, SGA 9, SG 14, SG 15, SGA 1	2	8	7	3	20
<b>B</b>	SG 4, SGA 5, GUI 4, CR 37, SGA 19, GUI 13	2	3	1		6
<b>C</b>	SGB 3, SR 12		1		1	2
<b>D</b>	GUI 28	1				1
<b>E</b>	CR 24, CR 36, GUI 41, SG 8, GUI 37, GUI 42, SGA 17, SGB 16, SGA 3, SR 10A, SGB 12, SGB 13, SGA 14, GUI 8, SR 1, SR 3, SG 7, SGA 13, SGB 14, SGA 21	4	11	2	3	20
<b>F</b>	CR 20, GUI 61, SG 2, SG 1, SG 18, SG 3, SGA 18, GUI 19, SR 5, GUI 10, GUI 16, GUI 31, GUI 11, GUI 12, GUI 32, GUI 34, SR 10B, GUI 6	10	5	1	2	18
<b>G</b>	CR 30, SGA 2, SG 10, SGB 15, SGA 7b, SGA 8, GUI 2, SGA 12, SGA 16, SR 11	1	7	1	1	10
<b>H</b>	CR22			1		1
<b>I</b>	SG 5, SR 6, CR 18, CR 38, SGB 7, SG 13, SG 16, GUI 15, GUI 44, GUI 63	3	4	2	1	10
<b>J</b>	CR 40			1		1
<b>K</b>	SG 11, SR 2		1		1	2
<b>L</b>	SGA 11, SGB 4, SGB 1		3			3
<b>M</b>	GUI 40, SG 6, CR 23, GUI 14, GUI 23, GUI 3, CR 10, CR 21, SGB 8	4	3	2		9
<b>N</b>	CR 1A, CR 27, SG 17		1	2		3

Los aislados no se agruparon según su procedencia, de hecho, muchos de los grupos formados incluían cepas pertenecientes a todos los nichos muestreados, nódulos y rizosfera de Cañizal y Salamanca. Esto parece indicar que no existe una relación directa entre el tipo de microorganismos analizados y los correspondientes nichos, ya que existen cepas parecidas que aparecen en todos ellos. Tampoco se puede observar una relación entre los aislados que aparecen en los nódulos y los correspondientes a la rizosfera de esos nódulos, a este respecto sólo se observa una posible relación en los grupos C y K, en los que aparecen una cepa obtenida de nódulo y una obtenida de su correspondiente rizosfera, pero al ser sólo una cepa de cada grupo, no podemos decir que esa relación sea generalizada.

A modo de resumen se puede decir que:

- se observa una diversidad elevada de nuestros aislados, existiendo un amplio número de cepas que presentan perfiles únicos para los perfiles de Microsatélites.
- la técnica de microsatélites tiene un elevado potencial a la hora de determinar la diversidad existente.
- no se observa una relación directa entre las cepas procedentes de nódulos y las de la rizosfera de su misma zona de muestreo.

### 4.3.3. Perfiles de TP-RAPD

Los perfiles de TP-RAPD utilizan secuencias de oligonucleótidos basadas en zonas altamente conservadas de la secuencia del gen ribosómico 16S, los cuales poseen un alto contenido en G+C, lo que los hace especialmente adecuados para bacterias con esta característica, como es el caso del género *Micromonospora*. Los resultados obtenidos en este tipo de perfiles son huellas moleculares específicas que permiten agrupar a los microorganismos altamente relacionados a nivel de especie (Rivas *et al.*, 2001).

Los resultados obtenidos al realizar esta técnica se pueden observar en las figuras 25 a 28. Las bandas observadas en los perfiles variaron en tamaño desde 0,3 a 1,8 kb, mientras que su número no era demasiado elevado. La mayoría de las cepas poseían un número aproximado de 4 bandas, aunque había perfiles poseían hasta 7 bandas, como es el caso de la cepa GUI 34 (Figura 25) y también hubo cepas como la CR 25 en las que sólo se observaban 2 bandas (Figura 26). En este caso aparece un mayor número de cepas con perfiles muy similares o idénticos. En el estudio de las cepas obtenidas de nódulos de Cañizal se observan este tipo de perfiles entre las cepas GUI 3, GUI 6, GUI 19 y GUI 27, también entre GUI 63 y GUI 44 y entre GUI 11, GUI 12, GUI 32 y GUI 34 (Figura 25). Para los aislados de rizosfera de Cañizal se observan perfiles similares entre CR 9 y CR 20, entre CR 1A y CR 27, entre CR 19, CR 8 y CR 39, entre CR 25 y CR 26 y entre CR 10 y CR 18 (Figura 26). Observando los aislados procedentes de nódulos de Salamanca vemos que SGA 4 y SGA 5 presentan perfiles muy similares, también entre SG 14 y SG 1, entre SGB 14 y SGB 15, entre SGA 16 y SGB 16 y entre SG 16 y SGA 17 (Figura 27). En la rizosfera de Salamanca sólo existen tres cepas con perfiles similares SR 3, SR 4 y SR 15 (Figura 28). A partir de estos datos, se puede decir que el hábitat en la que existe una mayor diversidad de microorganismos, según los perfiles de TP-RAPD, es la correspondiente a los nódulos de Salamanca; también existe más diversidad en la zona de los nódulos de Cañizal que la de su rizosfera, pero en ambas esta diversidad es menor que la zona de la rizosfera de Salamanca.

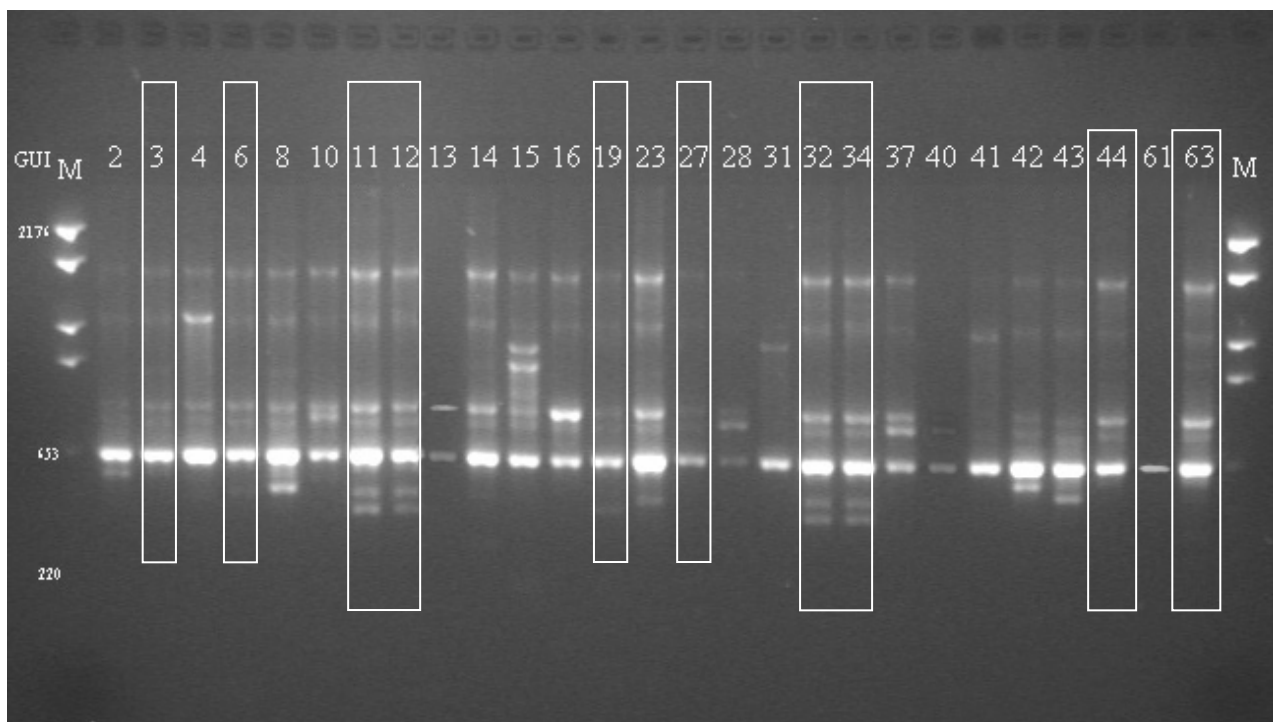


Fig. 25. Perfiles de TP-RAPD de cepas aisladas de nódulos de *Pisum sativum* de Cañizal.

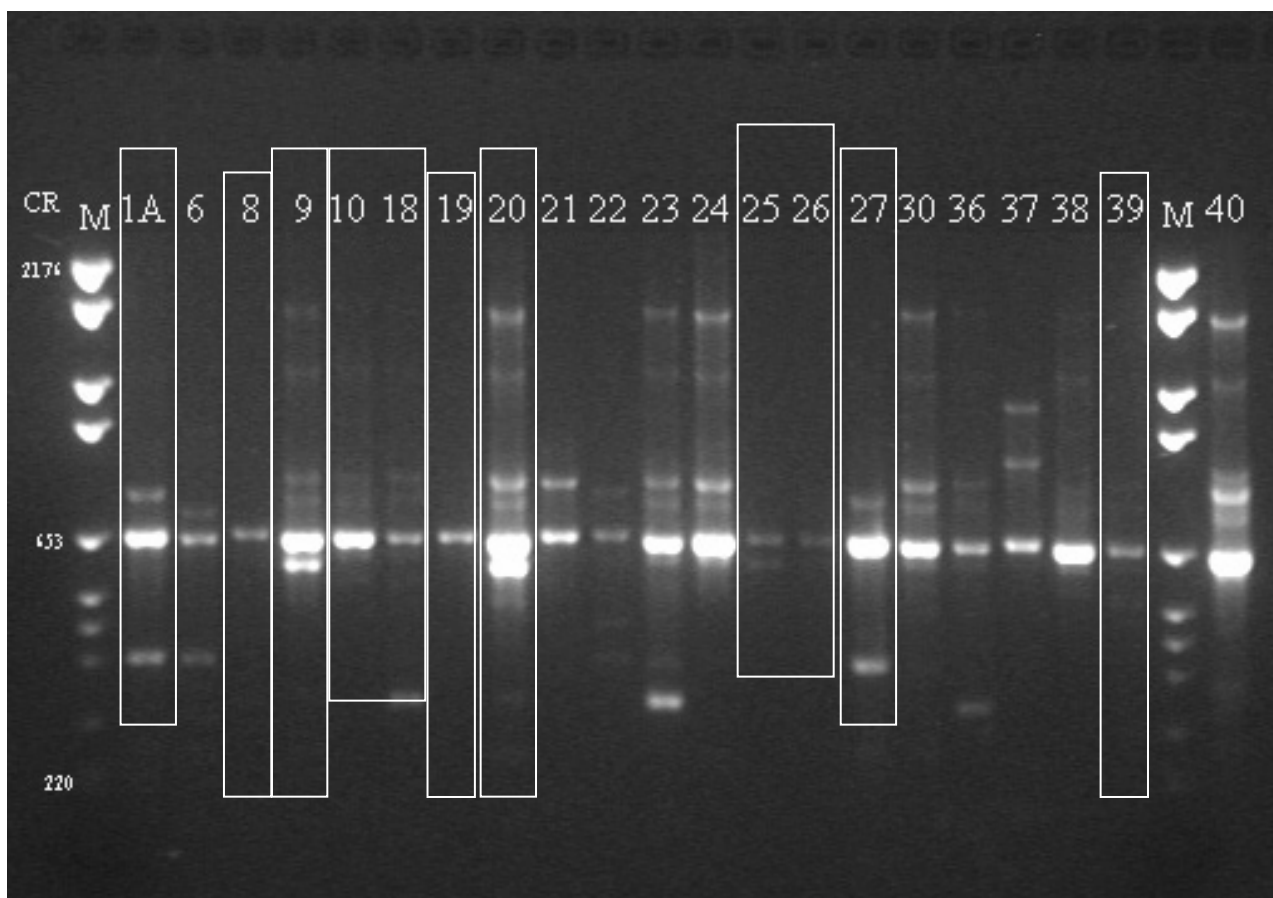


Fig. 26. Perfiles de TP-RAPD de cepas aisladas de rizosfera de *Pisum sativum* de Cañizal.

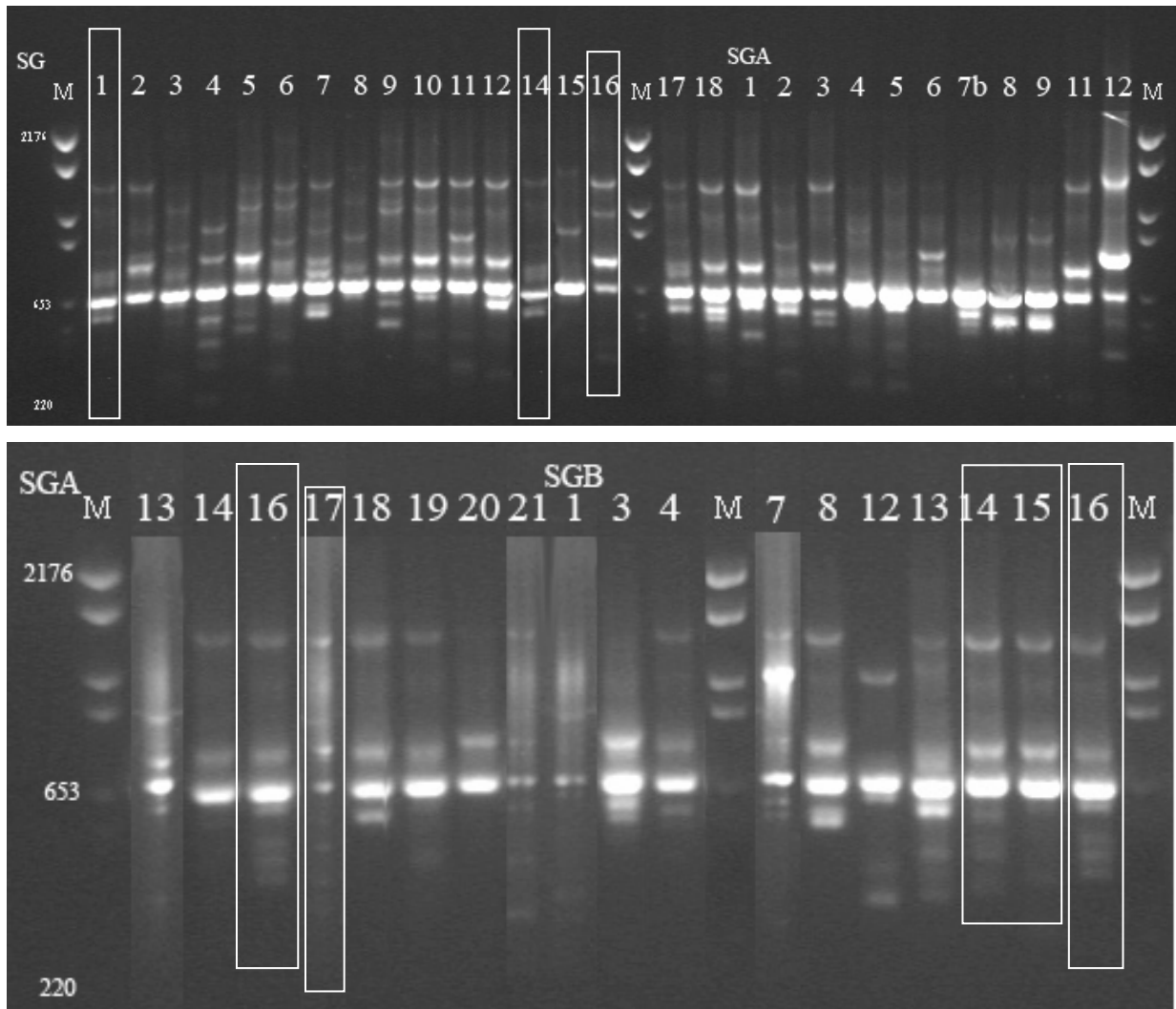


Fig. 27. Perfiles de TP-RAPD de cepas aisladas de nódulos de *Pisum sativum* de Salamanca.

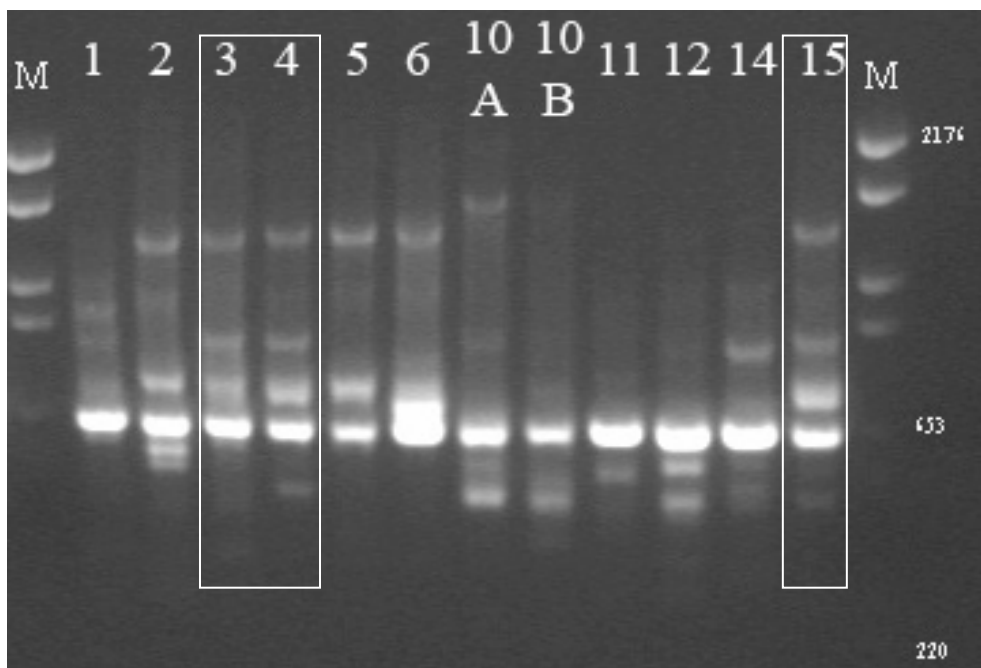


Fig. 28. Perfiles de TP-RAPD de cepas aisladas de rizosfera de *Pisum sativum* de Salamanca.



Como en los casos anteriores se utilizó el programa Bionumerics a la hora de agrupar los perfiles, y tras el análisis de las imágenes de los geles se realizó un dendrograma conjunto que agrupara los diferentes aislados estudiados utilizando el coeficiente de correlación de Pearson y el método UPGMA (Figura 27).

Una vez realizado el dendrograma se obtuvieron una serie de grupos a partir del mismo que incluían perfiles similares, para ello se tomó un porcentaje de similitud de aproximadamente el 80%, obteniendo de este modo 14 grupos cuya composición podemos ver en la Tabla 17.

Podría pensarse que la cantidad de grupos obtenida para esta técnica es elevada, pero hay que tener en cuenta que, en este caso, hemos tomado el punto de corte en torno al 80%, mucho más elevado que en otros casos. La cantidad de cepas por grupo varió enormemente, desde el grupo h que incluía 44 aislados, a grupos como el n que sólo incluían 1 aislado, en este caso la cepa GUI 13.

Al igual que en las técnicas de tipado que hemos visto anteriormente, no se observa una relación entre los grupos obtenidos y el hábitat de procedencia de cada una de las cepas a primera vista. Sin embargo, al observar el dendrograma con detenimiento, sí se puede distinguir una mayor similitud entre cepas obtenidas de la misma zona de la que obteníamos con los perfiles de BOX-PCR o Microsatélites. Por ejemplo, en dos ramas internas del grupo h, aparecen prácticamente todos los aislados obtenidos de la rizosfera de Cañizal y existen otras ramas internas dentro de los grupos, que corresponden únicamente con una zona de aislamiento.

Aunque como era previsible el número de perfiles diferentes observados es menor que con las técnicas anteriormente estudiadas, sigue presentándose una elevada diversidad entre nuestros aislados y sobre todo si tenemos en cuenta el hábitat restringido de donde proceden la mayor parte de los aislados, los nódulos.

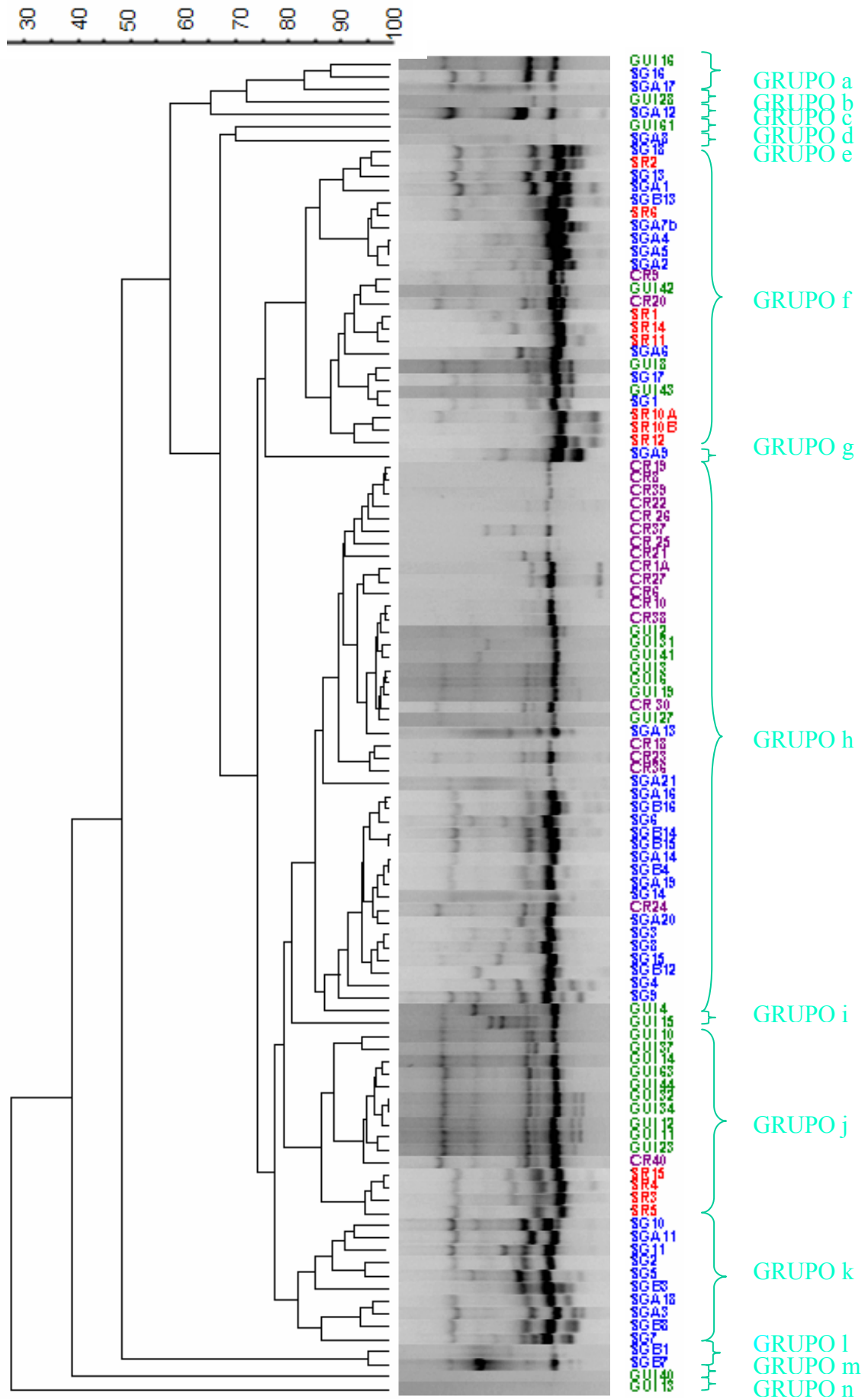


Figura. 29. Dendrograma de las cepas analizadas por TP-RAPD utilizando el método UPGMA y el coeficiente de Pearson. Cañizal (GUI: nódulos, CR: rizosfera), Salamanca (SG: nódulos, SR: rizosfera).

Tabla 17. Cepas incluidas en cada grupo según los perfiles de TP-RAPD.

GRUPO	CEPAS	Número de cepas				
		Nódulos		Rizosfera		Total
		Cañizal	Salamanca	Cañizal	Salamanca	
<b>a</b>	GUI 16, SG 16, SGA 17	1	2			3
<b>b</b>	GUI 28	1				1
<b>c</b>	SGA 12		1			1
<b>d</b>	GUI 61	1				1
<b>e</b>	SGA 8		1			1
<b>f</b>	SG 18, SR 2, SG 13, SGA 1, SGB 13, SR 6, SGA 7b, SGA 4, SGA 5, SGA 2, CR 9, GUI 42, CR 20, SR 1, SR 14, SR 11, SGA 6, GUI 8, SG 17, GUI 43, SG 1, SR 10A, SR 10B, SR 12	3	11	2	8	24
<b>g</b>	SGA 9		1			1
<b>h</b>	CR 19, CR 8, CR 39, CR 22, CR 26, CR 37, CR 25, CR 21, CR 1A, CR 27, CR 6, CR 10, CR 38, GUI 2, GUI 31, GUI 41, GUI 3, GUI 6, GUI 19, CR 30, GUI 27, SGA 13, CR 18, CR 23, CR 36, SGA 21, SGA 16, SGB 16, SG 6, SGB 14, SGB 15, SGA 14, SGB 4, SGA 19, SG 14, CR 24, SGA 20, SG 3, SG 8, SG 15, SGB 12, SG 4, SG 9, GUI 4.	8	18	18		44
<b>i</b>	GUI 15	1				1
<b>j</b>	GUI 10, GUI 37, GUI 14, GUI 63, GUI 44, GUI 32, GUI 34, GUI 12, GUI 11, GUI 23, CR 40, SR 15, SR 4, SR 3, SR 5	10		1	4	15
<b>k</b>	SG 10, SGA 11, SG 11, SG 2, SG 5, SGB 3, SGA 18, SGA 3, SGB 8, SG 7		10			10
<b>l</b>	SGB 1, SGB 7		2			2
<b>m</b>	GUI 40	1				1
<b>n</b>	GUI 13	1				1

#### 4.3.4. Perfiles de ARDRA

El análisis de la diversidad a través de perfiles de ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) muestra las diferencias existentes entre las cepas analizadas a nivel de especie, ya que en este caso se utilizan enzimas de restricción dirigidas que cortan sobre una secuencia ya amplificada del gen ribosómico 16S.

Para este trabajo se analizaron *in silico* una serie de 20 enzimas sobre las cepas tipo del género *Micromonospora*. De estas se seleccionaron cuatro, que realizaban entre 3 y 5 cortes dando tamaños de entre 1500 y 100 pb, que fueron: Bsh1285 I (Mcr I), Hin6 I (Hha I), FspB I (Mae I) y Pst I.

Una vez obtenidos los perfiles de ARDRA para las muestras analizadas que se muestran en las figuras 30 a 37, determinados por la enzima usada en cada caso, se observó ya una variación mucho más limitada que en los análisis anteriores. En el caso de la enzima Bsh1285 I (Figuras 30 y 31), se obtuvieron perfiles de entre 2 bandas, como es el caso de la cepa CR 37 (Figura 30), y ocho bandas en el caso de la cepa SGA 1 (Figura 31). Estas bandas variaban en su tamaño de 0,1 a 1,5 kb. Para la enzima Hin6 I (Figuras 32 y 33), los tamaños de las bandas se encontraban entre 0,1 y 0,7 kb, y el número de bandas por perfil varió de dos bandas, como en la cepa GUI 43, a 7 bandas en la cepa CR 25 (Figura 32). Al realizar el estudio de la enzima FspB I (Figuras 34 y 35), se observó que los tamaños de las bandas variaron entre 0,05 y 1,5 kb y el número de éstas estaba entre 2 y 10, para cepas como la CR 1A (Figura 34) y la SGB 3 (Figura 35) respectivamente. En el análisis de la enzima Pst I (Figuras 36 y 37), se observaron bandas con tamaños entre 0,1 y 1,5 kb y perfiles de entre 1 banda (GUI 61) (Figura 36) y 8 bandas (SGA16) (Figura 37).

El análisis de las bandas que cada enzima produce de forma individual no aporta demasiada información, ya que resultan bastante conservados, es el análisis conjunto de las cuatro enzimas el que aporta una información más fiable. Por ello, el análisis que se muestra en la figura 38, refleja el análisis conjunto de las cuatro enzimas a través del programa Bionumerics para las cuatro zonas de muestreo, nódulos de Cañizal, rizosfera de Cañizal, nódulos de Salamanca y rizosfera de Salamanca.

Bsh 1285 I

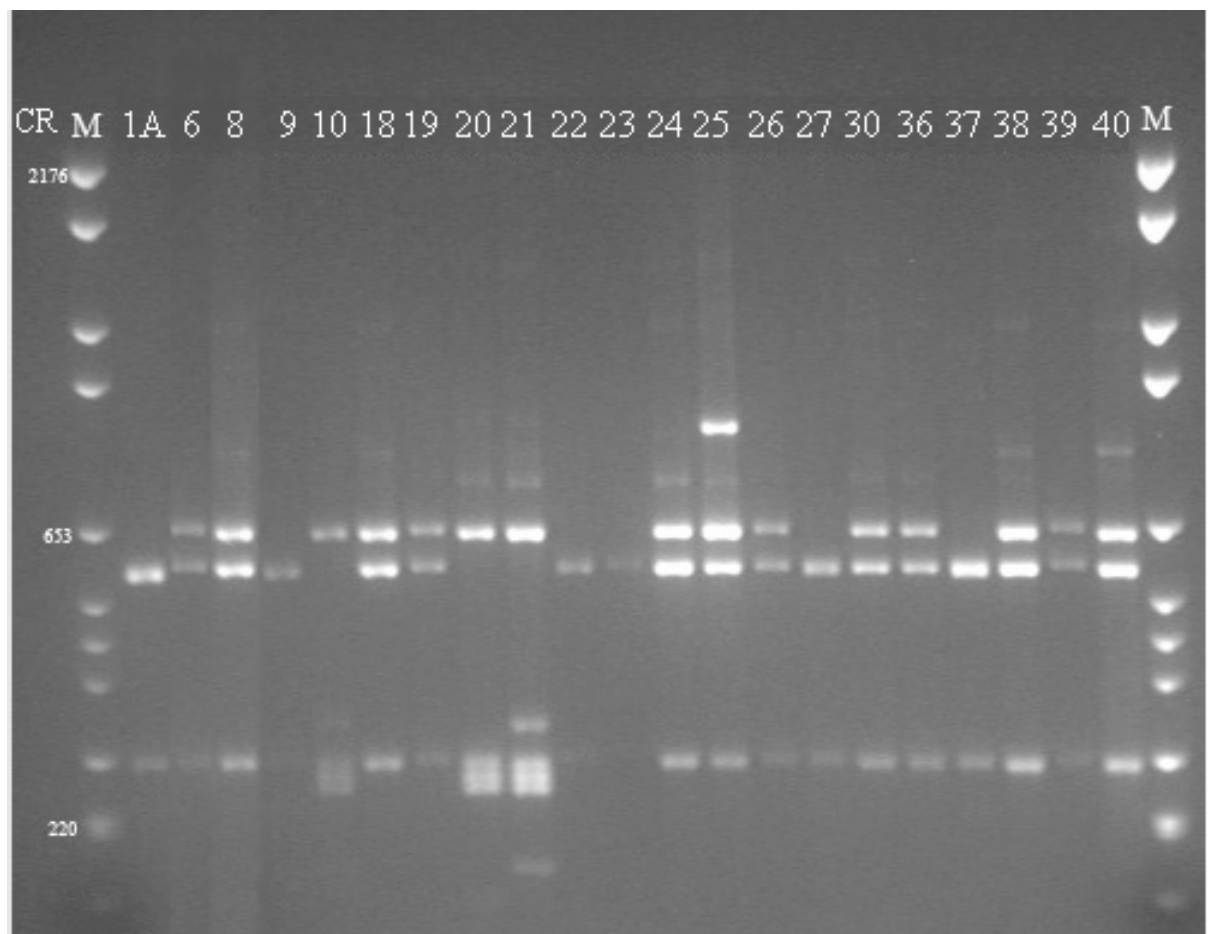
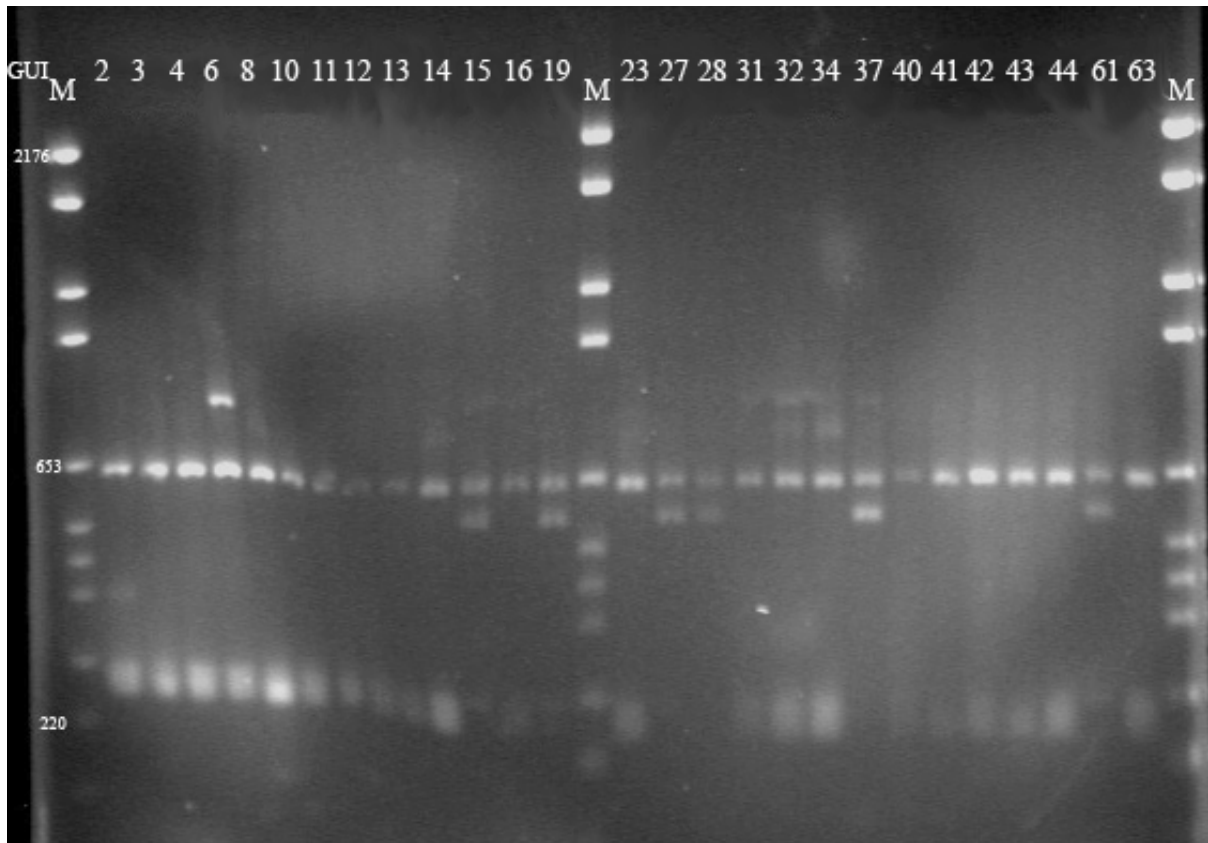


Fig. 30. Perfiles de ARDRA de cepas aisladas de Cañizal. Nódulos (arriba), rizosfera (abajo).

Bsh 1285 I

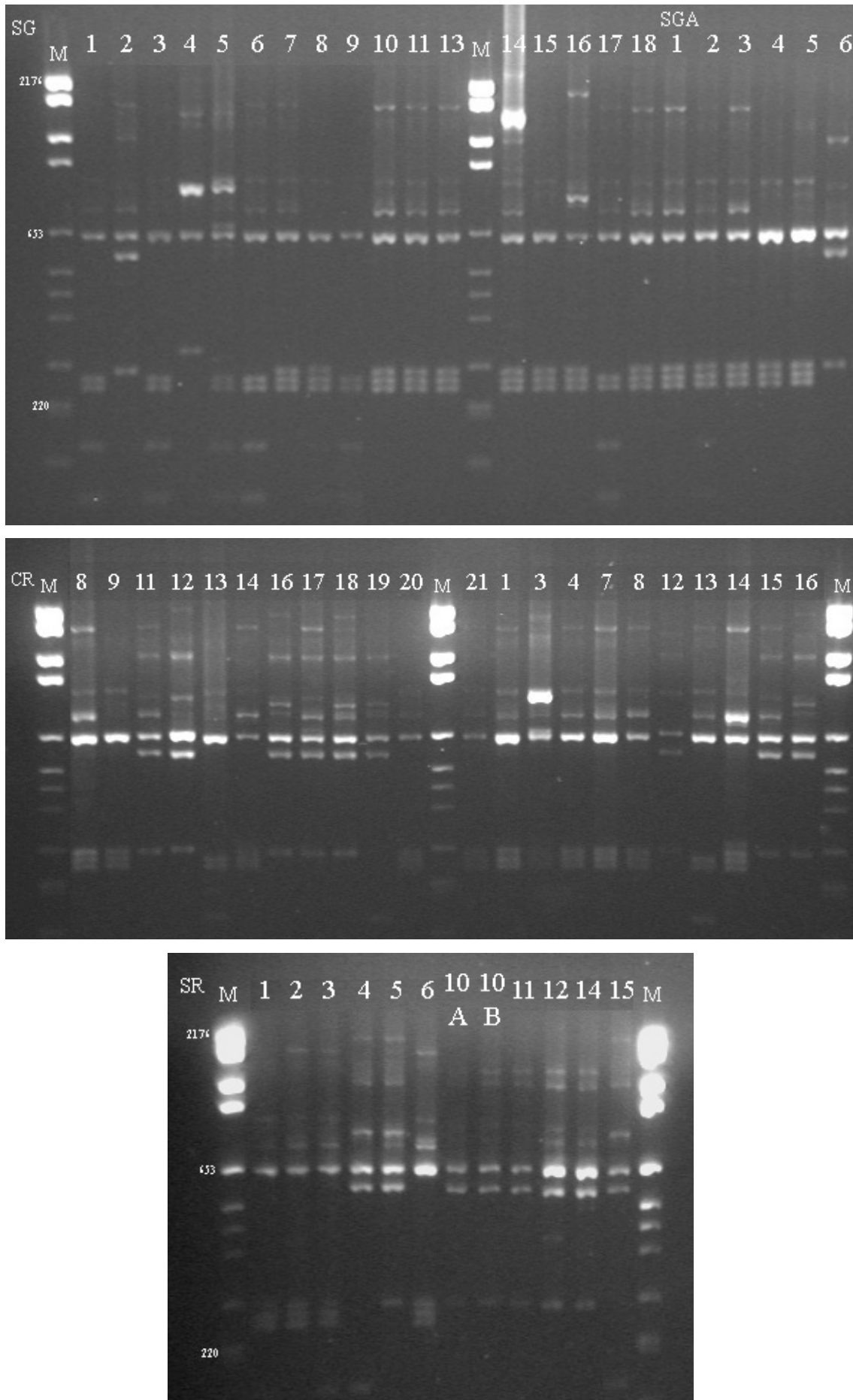


Fig. 31. Perfiles de ARDRA de cepas aisladas de Salamanca. Nódulos (arriba y centro), rizosfera (abajo).

Hin6 I

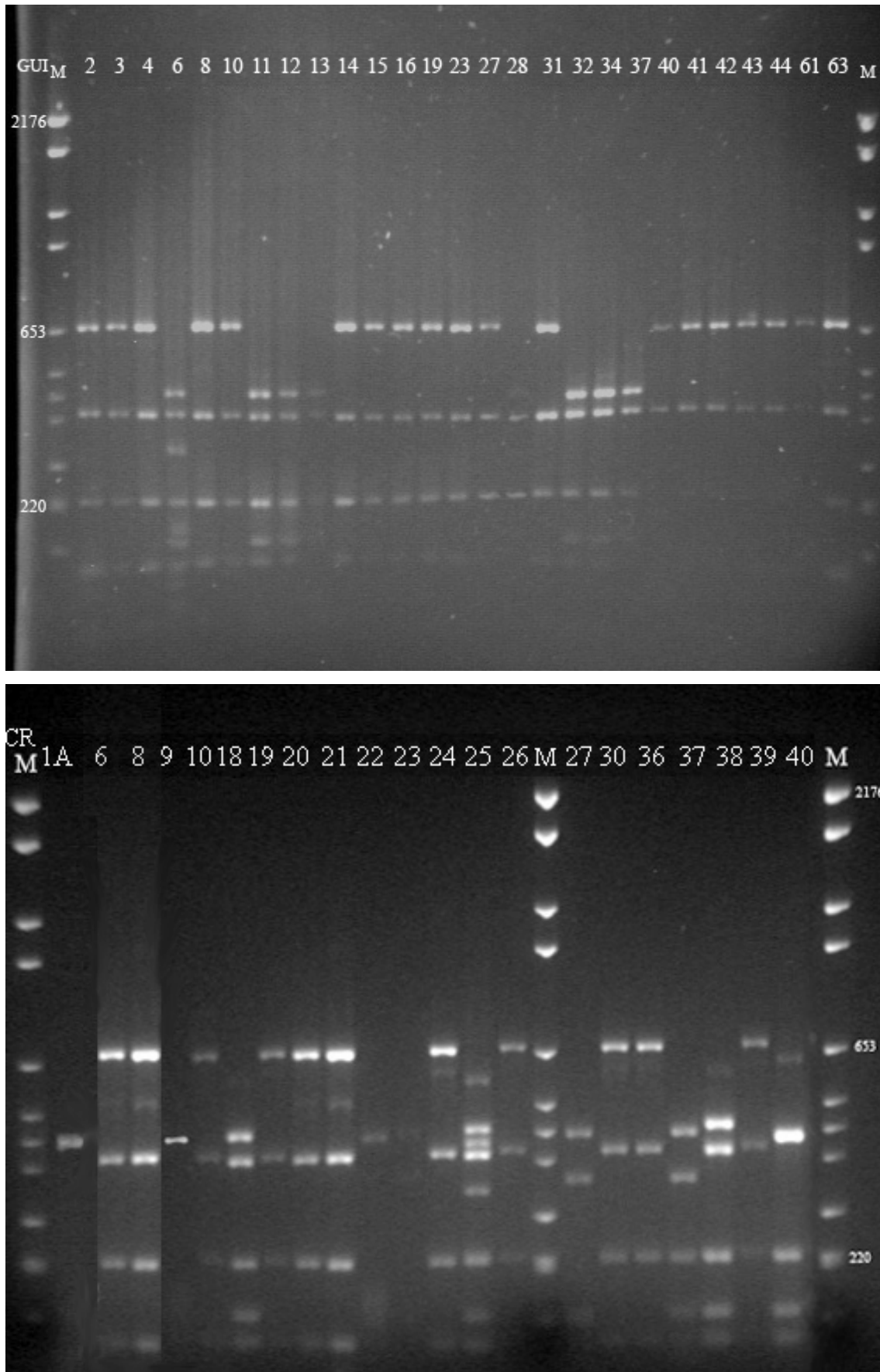


Fig. 32. Perfiles de ARDRA de cepas aisladas de Cañizal. Nódulos (arriba), rizosfera (abajo).

Hin6 I

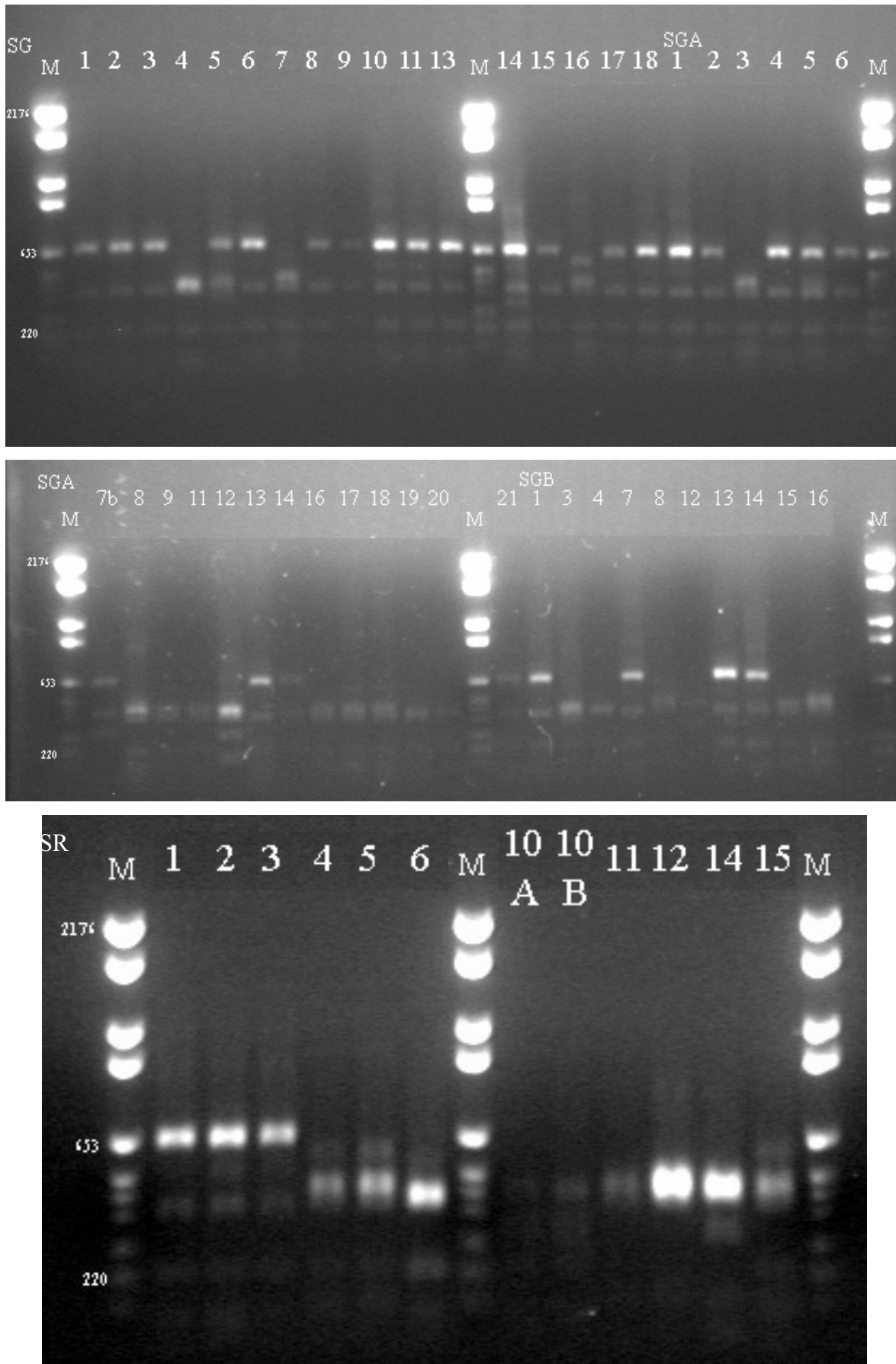


Fig. 33. Perfiles de ARDRA de cepas aisladas de Salamanca. Nódulos (arriba y centro), rizosfera (abajo).



FspB I

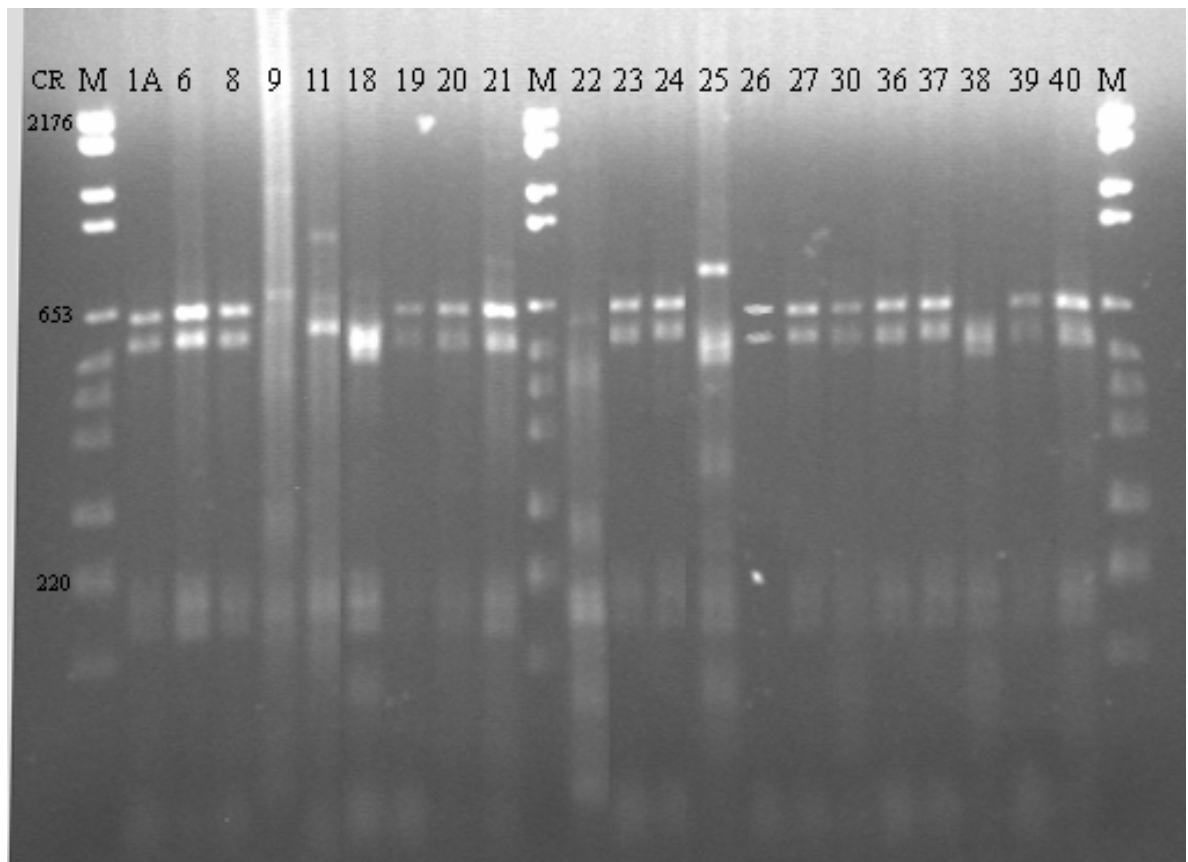
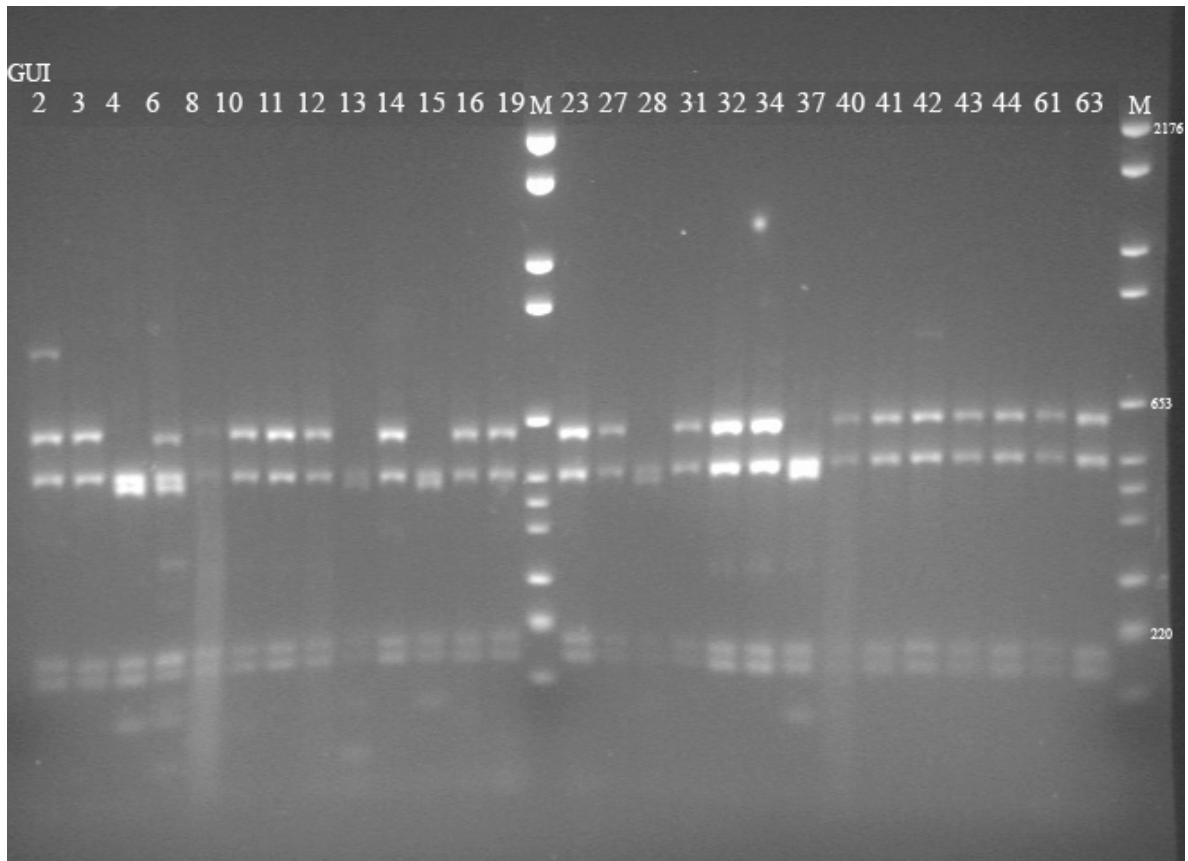


Fig. 34. Perfiles de ARDRA de cepas aisladas de Cañizal. Nódulos (arriba), rizosfera (abajo).

FspB I

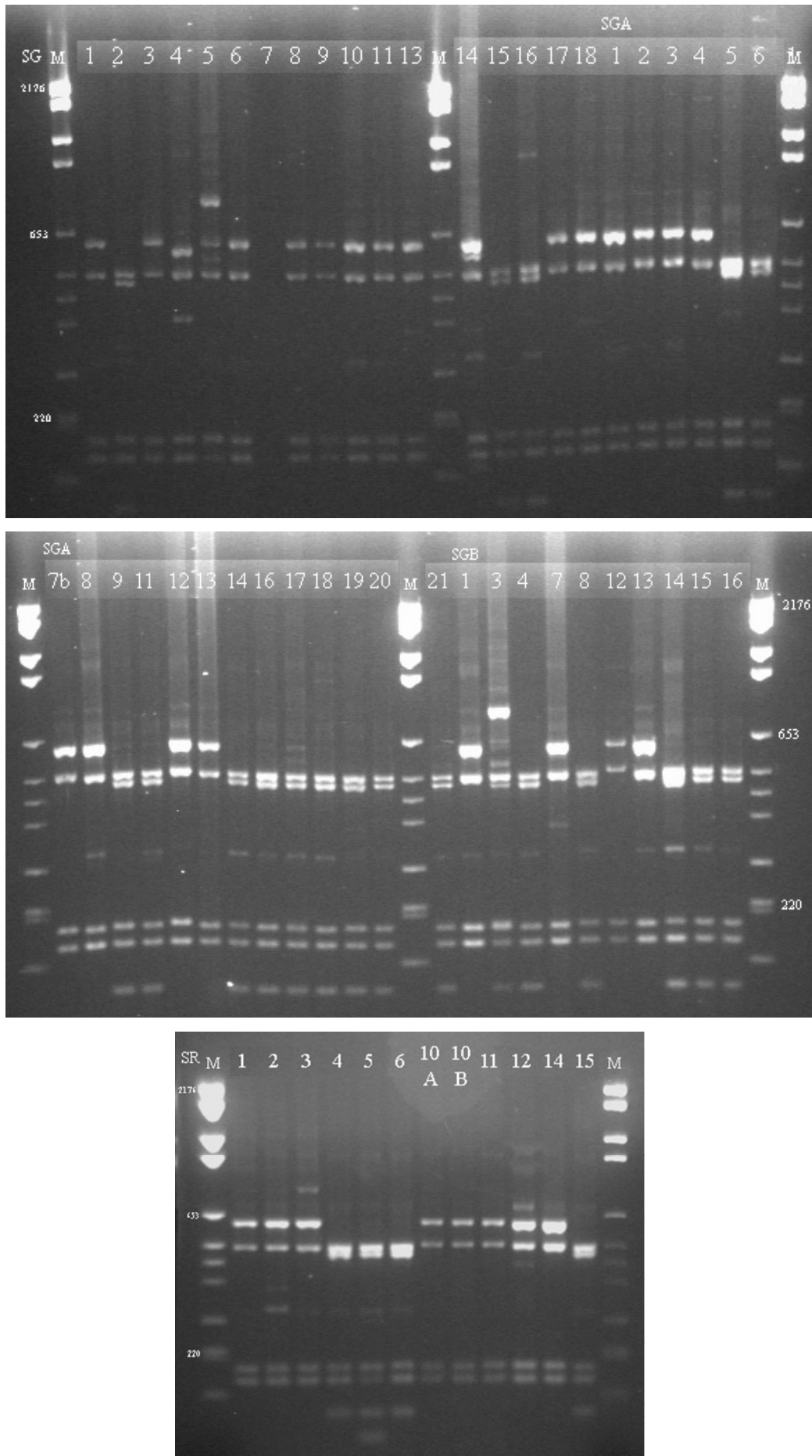


Fig. 35. Perfiles de ARDRA de cepas aisladas de Salamanca. Nódulos (arriba y centro), rizosfera (abajo).

Pst I

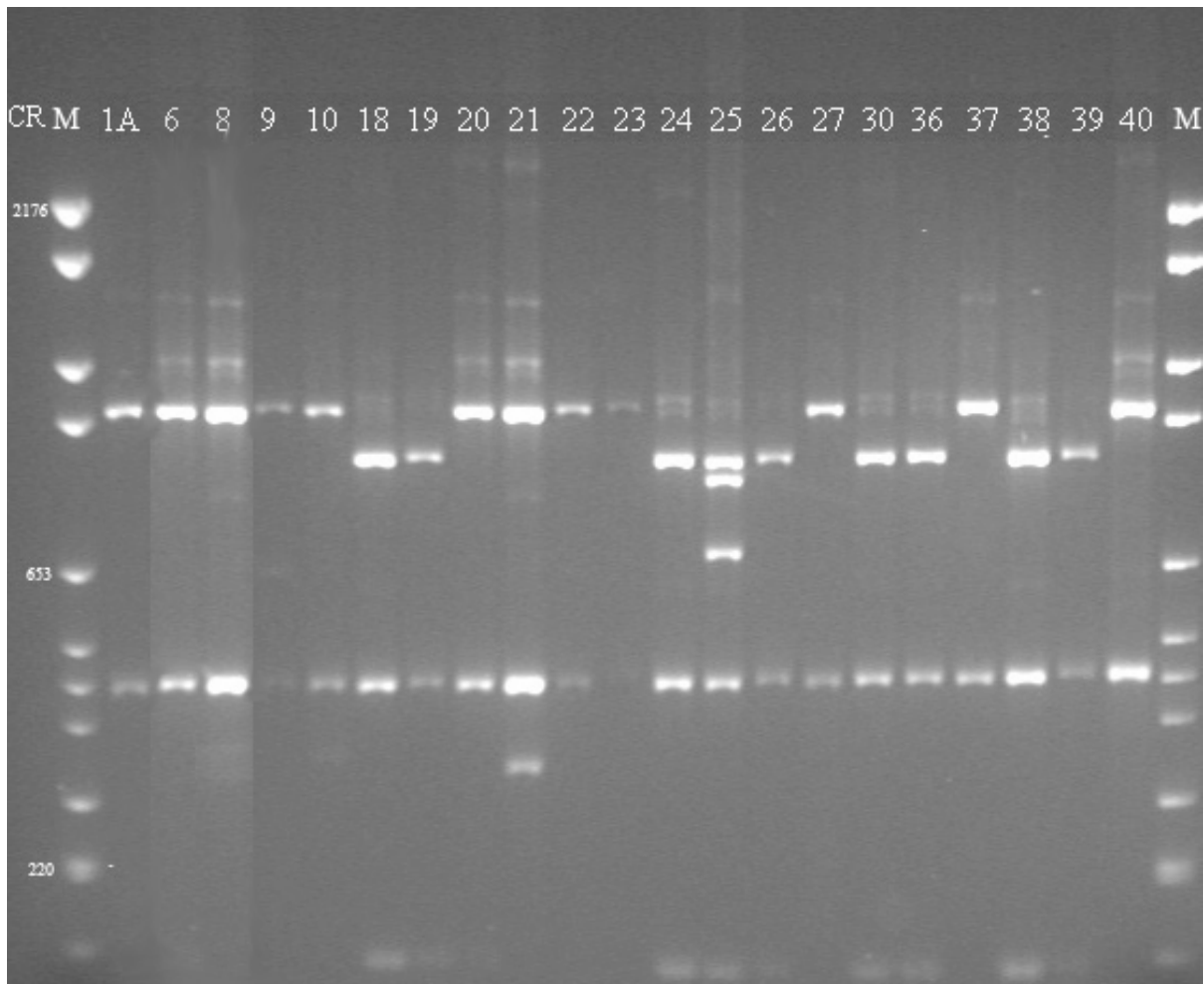
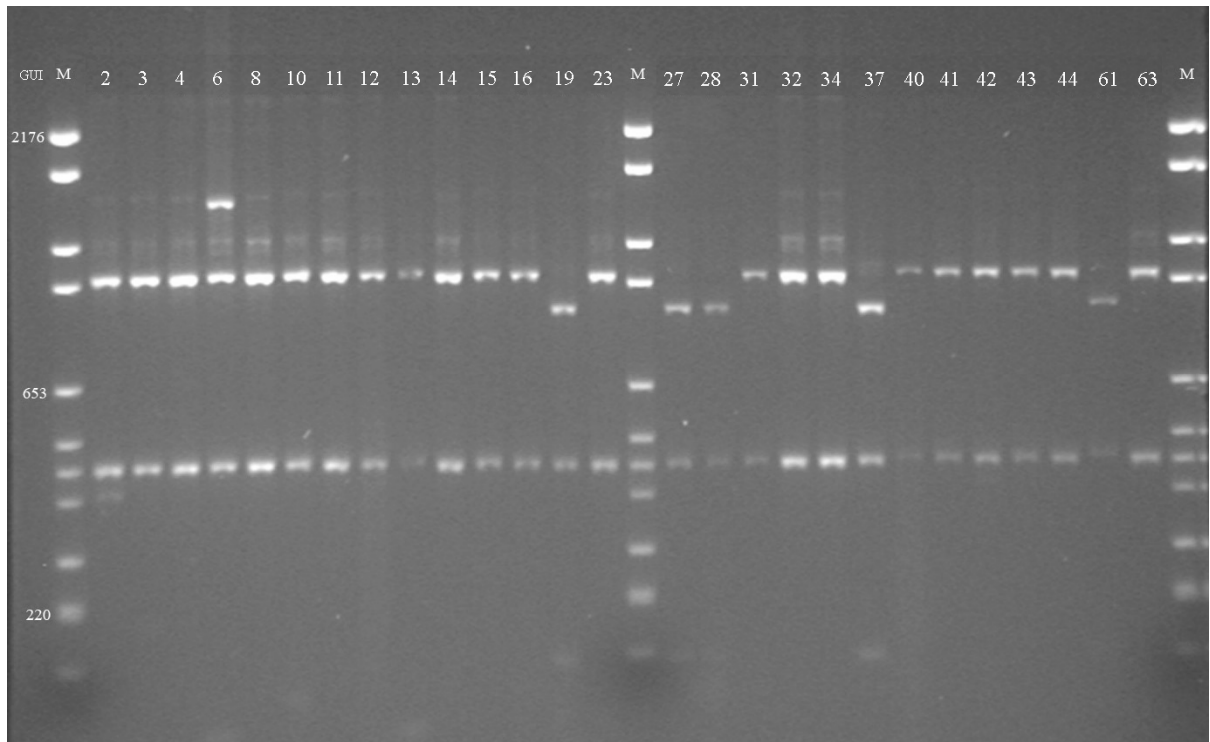


Fig. 36. Perfiles de ARDRA de cepas aisladas de Cañizal. Nódulos (arriba), rizosfera (abajo).

Pst I

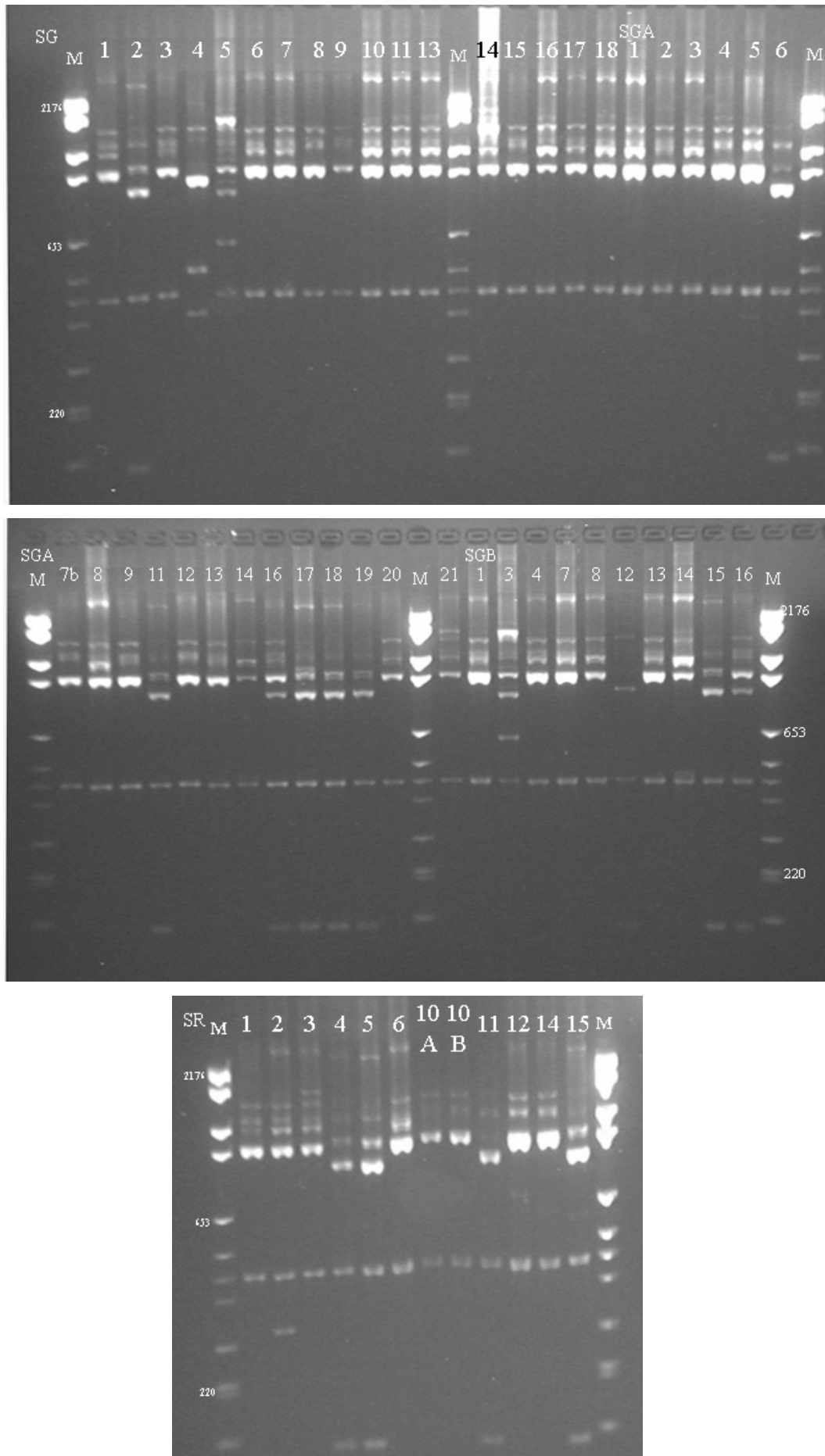


Fig. 37. Perfiles de ARDRA de cepas aisladas de Salamanca. Nódulos (arriba y centro), rizosfera (abajo).

Se analizaron los perfiles obtenidos para cada una de las enzimas por separado y a continuación se realizó un análisis en el que se incluyeron las cuatro enzimas para todas las cepas de estudio, aportando cada una de las enzimas el mismo peso en el análisis y agrupándolas a través del método UPGMA. A partir del dendrograma obtenido (Figura 38) y utilizando un porcentaje de similitud de aproximadamente el 50% se obtuvieron 11 grupos cuya composición podemos observar en la tabla 18.

El tamaño de los grupos varió desde los que contaban con una sola cepa, los grupos 9 y 11 que incluían las cepas SG 4 y SBG 12 respectivamente, a grupos mucho más grandes, como el grupo 2 que contaba con 43 cepas.

Al analizar los aislados según su origen, sí se puede observar en este caso la presencia de grupos que corresponden por completo a una zona de muestreo, como son el grupo 4, el grupo 6, el grupo 8, el grupo 9 y el grupo 11 donde todos los aislados pertenecen a nódulos de Salamanca, el grupo 7 donde los aislados corresponden con cepas de la rizosfera de Salamanca y el grupo 10 donde todos los aislados corresponden con cepas procedentes de la rizosfera de Cañizal. Sin embargo, a excepción de éste último grupo que consta de 9 cepas, el resto son grupos pequeños, de entre una y cuatro cepas. Si comparamos el número de grupos en el que aparecen los aislados de una zona con el número total de aislados estudiados para esa misma zona, se puede decir que la zona de Salamanca es más diversa que la zona de Cañizal, tanto en nódulos como en rizosfera, coincidiendo estos resultados con los vistos en los análisis de los perfiles anteriormente expuestos (BOX-PCR, Microsatélites y TP-RAPD).

Esta técnica se ha utilizado en numerosas ocasiones para la clasificación de microorganismos (Kawano *et al.*, 2006; Ruiz-Díez *et al.*, 2009; Qiu *et al.*, 2008) y ampliamente dentro del grupo de las actinobacterias (Dherbécourt *et al.*, 2007; Álvarez *et al.*, 2008; Baik *et al.*, 2008; Matarelli *et al.*, 2008), pero es la primera vez que se utiliza en la caracterización del género *Micromonospora*.



Tabla 18. Cepas incluidas en cada grupo según los perfiles de ARDRA.

GRUPO	CEPAS	Número de cepas				
		Nódulos		Rizosfera		Total
		Cañizal	Salamanca	Cañizal	Salamanca	
<b>1</b>	GUI 11, GUI 12, GUI 32, GUI 34, SGA 3, SGA 8, SGA 12, GUI 13, GUI 6	6	3			9
<b>2</b>	SG 6, SG 8, SG 1, SG 3, SG 9, SG 10, SG 11, SG 13, SGB 13, SGB 7, SGB 1, SR 2, SR 3, SR 1, SGA 7b, SG 18, SGA 1, SGA 4, SG 17, SGA 2, SGA 13, SG 15, SGA 5, SG 14, GUI 15, GUI 4, GUI 8, GUI 3, GUI 2, GUI 14, GUI 16, GUI 23, GUI 10, GUI 63, GUI 41, GUI 42, GUI 43, GUI 44, GUI 31, GUI 40, CR 20, CR 21, CR 10	16	21	3	3	43
<b>3</b>	SG 2, SGA 6, GUI 19, GUI 27, GUI 61, CR 18, CR 38, CR 25, CR 26, CR 39, CR 19, CR 30, CR 36, CR 24	3	2	9		14
<b>4</b>	SG 16, SG 7		2			2
<b>5</b>	SGA 17, SGA 18, SGA 19, SGB 15, SGA 11 SR 4, SR 5, SR 15, GUI 28, GUI 37, SGB 4, SR 6, SGA 16, SGA 9, SGB 16, SGB 8, SR 12, SR 14	2	10		6	18
<b>6</b>	SGA 14, SGB 14, SGA 20, SGA 21		4			4
<b>7</b>	SR 10A, SR 10B, SR 11				3	3
<b>8</b>	SG 5, SGB 3		2			2
<b>9</b>	SG 4		1			1
<b>10</b>	CR 22, CR 23, CR 9, CR 1A, CR 27, CR 37, CR 40, CR 6, CR 8			9		9
<b>11</b>	SGB 12		1			1

#### 4.3.5. Evaluación de las técnicas de tipado analizadas

Tras aplicar las cuatro técnicas de tipado propuestas (BOX-PCR, Microsatélites, TP-RAPD y ARDRA) en el estudio de nuestros aislados podemos ver que el número de perfiles diferentes y la cantidad de grupos establecidos a través del programa Bionumerics varía en cada una de ellas. De modo que la caracterización a través de BOX-PCR es la que aporta un mayor número de grupos (18), mientras que los perfiles de Microsatélites y TP-RAPD poseen un número intermedio de grupos (14 cada una) y la técnica de ARDRA, que resulta la más restrictiva de las cuatro, presenta 11 grupos. Una tabla resumen de los grupos que corresponden a cada cepa en función de las cuatro técnicas utilizadas se presenta en la tabla 19.

Aunque en los perfiles de TP-RAPD el número de grupos formados sea el mismo que para la técnica de Microsatélites, si nos fijamos en el número de perfiles diferentes observados, se ve claramente que la técnica de Microsatélites tiene un mayor poder discriminatorio. En estos perfiles de Microsatélites, al igual que se pudo observar en los perfiles de BOX-PCR, la diversidad entre las cepas es muy elevada, ya que muy pocos de los perfiles que aparecen son idénticos entre ellos. Esto se observa en todas las zonas de muestreo por igual. Sin embargo, se puede ver que la diversidad observada es ligeramente inferior para la técnica de Microsatélites a la descrita para el método de los perfiles de BOX-PCR, ya que este método es capaz de diferenciar a nivel de cepa y en el caso de los perfiles de Microsatélites no siempre es así, esto se puede distinguir fácilmente en las cepas GUI 11, GUI 12, GUI 32 y GUI 34, cuyo perfil para la técnica de Microsatélites es idéntico y, sin embargo, difieren en el correspondiente a BOX-PCR.

De modo que, aunque resulta indudable la capacidad de los perfiles de Microsatélites en el análisis de la diversidad del género *Micromonospora*, al comparar con el método de BOX-PCR, vemos que este último nos aporta la misma información y además es capaz de diferenciar las cepas de un modo más eficaz, siendo más adecuado a la hora de indicar la diversidad existente dentro del género *Micromonospora*. Por ello se propone la técnica de BOX-PCR como técnica en el análisis de un gran número de



cepas, resultando de gran eficacia a la hora de mostrar la diversidad genética de los aislados de estudio y para la eliminación de clones.

Tabla 19. Resumen de los grupos formados en los análisis de los perfiles estudiados.

CEPA	BOX-PCR	TP-RAPD	Microsatélites	ARDRA	
<b>SR 4</b>	I	j	A	5	
<b>SR 15</b>			E	2	
SR 3			I	2	
<b>GUI 63</b>		f		I	5
<b>SR 6</b>				A	
SR 14				G	7
<b>SR 11</b>				E	2
<b>SR 1</b>	II	h	A	2	
CR 19			G	3	
<b>CR 30</b>					
SG 9	III	h	E	3	
CR 24				11	
<b>CR 39</b>			F	1	
SGB 12			G	5	
GUI 6			A	2	
SGB 15		n	1		
<b>SG 15</b>		f	G	2	
<b>GUI 13</b>		l	L		
SGA 7b		IV	h	H	10
SGB 1	A				
<b>CR 22</b>					
CR 6					
CR 23	M				2
CR 10					
<b>CR 21</b>					
<b>GUI 3</b>	G				
<b>GUI 2</b>					
<b>GUI 19</b>	F				3
<b>GUI 43</b>	A				2
<b>SR 10A</b>	f			E	7
SR 10B				F	
<b>SR 12</b>	k			C	5
SGB 3				8	
<b>GUI15</b>		i		I	2
GUI 44	V	h	E	6	
<b>SGB14</b>			F	2	
SG 3			N		
SG 17	VI	i	J	10	
<b>CR 40</b>			B		
CR 37		h		A	2
SG 14				E	6
SGA 14					5
SGB 16		G			
<b>SGA 16</b>					
SG 1		f		F	2
SG 13				I	
SGA 4				A	
<b>SG 16</b>		a		I	4
SGA 17				E	5
SGB 8		k		M	3
<b>SG 2</b>				F	
<b>SG 10</b>		VII	k	G	2
SGA 2				f	

Continúa...

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CEPA	BOX-PCR	TP-RAPD	Microsatélites	ARDRA	
SGA 1	VIII	f	A	2	
<b>CR 1A</b>	IX	h	N	10	
<b>SG 8</b>			E	2	
SG 4			B	9	
SGA 19				5	
<b>SGA 9</b>			g	A	1
SGA 12			c	G	1
SG 11			k	K	2
SGA 8	X	e	G	1	
GUI 10	XI	j	F	2	
GUI 11				1	
<b>GUI 34</b>				5	
<b>SGA 18</b>				4	
SG 7		k	E	5	
SGA 11			L	3	
SGB 4		h	E	2	
<b>CR 36</b>		f		3	
<b>GUI 8</b>	XII	h	I	3	
SGA 20	XIII	h	A	6	
SGB 13	XIV	f	E	2	
<b>GUI 41</b>	XV	h	E	2	
<b>SGA 21</b>				6	
SGA 6	XVI	f	A	3	
<b>SGA 5</b>			B	2	
SG 18			F	5	
SR 5				1	
<b>SGA 3</b>		h	E	2	
SGA 13			I	2	
SGB 7				2	
SG 6			XVII	h	M
<b>CR 18</b>	I	3			
CR 25	A				10
CR 26		N			
CR 8	A				
CR 27	f	K			2
CR 9		F			
<b>SR 2</b>	a	I			
CR 20	j				
<b>GUI 16</b>	k			8	
SG 5	XVIII	h		B	2
GUI 4				M	
<b>GUI 14</b>			A	3	
<b>GUI 27</b>			E	5	
<b>GUI 37</b>			F	2	
GUI 31		1			
<b>GUI 12</b>		j	E	2	
GUI 32			M		
<b>GUI 42</b>				m	
<b>GUI 23</b>			2		
<b>GUI 40</b>		b	D	5	
<b>GUI 28</b>					

En negrita: cepas seleccionadas para su secuenciación.

En cuanto a los perfiles de ARDRA, que resultan los más restrictivos de los cuatro, se podrían utilizar a la hora de seleccionar cepas para la secuenciación, ya que de este modo se podría evitar la selección de muchas cepas que pudieran corresponder con la misma especie.

Analizando ya los resultados en base a BOX-PCR, podemos concluir que la diversidad genética de los aislados de Salamanca es mayor, tanto a nivel de nódulos como a nivel de rizosfera, que la de los aislados procedentes de Cañizal. En ambos casos se observa así mismo una mayor diversidad en los aislados de nódulos que para los aislados de su rizosfera. Los grupos obtenidos a partir de los perfiles de BOX-PCR se utilizaron para la selección de los aislados representantes de nuestras cepas para la posterior secuenciación del gen ribosómico 16S. Las cepas seleccionadas aparecen marcadas en negrita en la tabla 19. Se seleccionaron entre 1 y 8 cepas por grupo, en función del tamaño de cada uno de ellos. En total se seleccionaron 49 cepas de las 106 estudiadas para proseguir el estudio, que son las que se presentan en la tabla 20.

Tabla 20. Cepas seleccionadas como representantes a partir de los perfiles.

CEPA	LOCALIDAD	ORIGEN
GUI 2	Cañizal	Nódulos
GUI 3	Cañizal	Nódulos
GUI 8	Cañizal	Nódulos
GUI 12	Cañizal	Nódulos
GUI 13	Cañizal	Nódulos
GUI 14	Cañizal	Nódulos
GUI 15	Cañizal	Nódulos
GUI 16	Cañizal	Nódulos
GUI 19	Cañizal	Nódulos
GUI 23	Cañizal	Nódulos
GUI 27	Cañizal	Nódulos
GUI 28	Cañizal	Nódulos
GUI 34	Cañizal	Nódulos
GUI 37	Cañizal	Nódulos
GUI 40	Cañizal	Nódulos
GUI 41	Cañizal	Nódulos
GUI 42	Cañizal	Nódulos
GUI 43	Cañizal	Nódulos
GUI 61	Cañizal	Nódulos
GUI 63	Cañizal	Nódulos
CR 1A	Cañizal	Rizosfera
CR 18	Cañizal	Rizosfera
CR 21	Cañizal	Rizosfera
CR 22	Cañizal	Rizosfera
CR 30	Cañizal	Rizosfera

CEPA	LOCALIDAD	ORIGEN
CR 36	Cañizal	Rizosfera
CR 38	Cañizal	Rizosfera
CR 39	Cañizal	Rizosfera
CR 40	Cañizal	Rizosfera
SG 2	Salamanca	Nódulos
SG 8	Salamanca	Nódulos
SG 10	Salamanca	Nódulos
SG 15	Salamanca	Nódulos
SG 16	Salamanca	Nódulos
SGA 3	Salamanca	Nódulos
SGA 5	Salamanca	Nódulos
SGA 9	Salamanca	Nódulos
SGA 16	Salamanca	Nódulos
SGA 18	Salamanca	Nódulos
SGA 21	Salamanca	Nódulos
SGB 14	Salamanca	Nódulos
SR 1	Salamanca	Rizosfera
SR 2	Salamanca	Rizosfera
SR 4	Salamanca	Rizosfera
SR 6	Salamanca	Rizosfera
SR 10A	Salamanca	Rizosfera
SR 11	Salamanca	Rizosfera
SR 12	Salamanca	Rizosfera
SR 15	Salamanca	Rizosfera

### 4.3.6. Análisis de escalado multidimensional

Los perfiles obtenidos de BOX-PCR se analizaron también a través de una técnica estadística conocida como escalado multidimensional (EMD o MDS). A través de esta técnica se obtiene información de las relaciones existentes entre los microorganismos aislados de las cuatro zonas de muestreo, nódulos y rizosfera de Cañizal y Salamanca. Los resultados se muestran representados en la imagen en tres dimensiones que aparece en la figura 27.

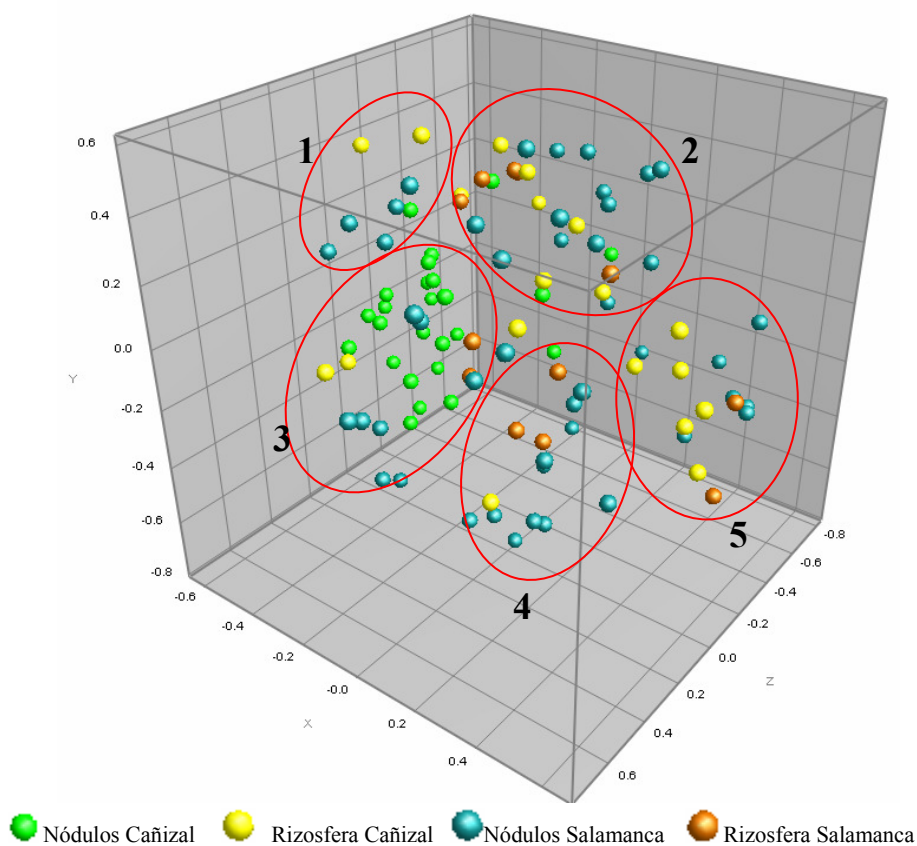


Figura 39. Análisis de escalado multidimensional de las cepas analizadas para perfiles de BOX-PCR.

Al observar los resultados no se aprecia una distribución marcada en función del origen geográfico de los aislados. De los cinco grupos obtenidos, marcados en la figura 27 a través de círculos rojos, ninguno de ellos estaba compuesto por aislados procedentes de una única zona de muestreo. Las cepas que aparecían más relacionadas entre sí eran las aisladas de los nódulos de Cañizal, que formaban un 58,8% del grupo 3, aunque también aparecían algunas cepas de esta zona de forma aislada en los grupos 1,

2 y 4, aportando un 12,5%, un 10,3% y un 6% respectivamente en cada uno de ellos. Los aislados de nódulos de Salamanca aparecían ampliamente representados en los cinco grupos obtenidos, representando un 62,5 % en el grupo 1, un 48,3% en el grupo 2, un 26,5% en el grupo 3, un 68,7% en el grupo 4 y un 46,7% en el grupo 5. Los aislados procedentes de la rizosfera de Cañizal son más abundantes en los grupos 2 y 5, en los que representan un 20,6% y un 40% respectivamente; y minoritarios en los grupos 1, 3 y 4, con un 25%, un 8,8% y un 6,2% en cada uno de ellos. Los aislados procedentes de la rizosfera de Salamanca aparecen dispersos en cuatro de los cinco grupos obtenidos constituyendo un 13,8% del grupo 2, un 5,9% del grupo 3, un 18,7% en el grupo 4 y un 13,3% del grupo 5.

Estos resultados ponen de manifiesto la alta diversidad existente entre las cepas aisladas en base a sus perfiles de BOX-PCR, corroborando así los resultados anteriormente vistos y mostrando la alta complejidad existente en las poblaciones de *Micromonospora* aisladas. Esta complejidad se pone de manifiesto al observar que existen cepas pertenecientes a la misma zona de aislamiento que no quedan agrupadas juntas, y por otro lado, cepas de procedencias distintas aparecen muy cerca entre sí, mostrando una alta relación.

A través de este análisis se obtiene información sobre la diversidad de las cepas en relación a las diferentes zonas de muestreo (Nódulos de Cañizal y Salamanca y rizosfera de Cañizal y Salamanca). Con ello se obtiene una imagen más comprensible de la relación que existe entre las 106 cepas analizadas en base a sus perfiles de BOX-PCR. Donde se nos muestra la alta diversidad genética existente entre nuestros aislados y se mantiene que las cepas más diversas se corresponden con los aislados obtenidos de los nódulos de Salamanca y nos muestra que esta diversidad es mucho menor en el caso de los aislados de Cañizal. Aún así, la diversidad tan alta de poblaciones de *Micromonospora* obtenida para los nódulos de *Pisum sativum* es algo destacable e inesperado.

#### 4.4 Filogenia del género *Micromonospora*

Se ha debatido mucho acerca de los métodos que se utilizan a la hora de asignar cepas a una especie bacteriana y sobre la propia definición de especie (Rosello-Mora y Amann, 2001). Los métodos actuales para distinguir entre géneros y para definir nuevas especies se basan en la taxonomía polifásica, en la cual se incluyen todos los datos genotípicos y fenotípicos disponibles en una clasificación conjunta. El método genotípico aceptado a la hora de definir especies está basado en relaciones genómicas, siendo aceptado que valores de un 70% o superiores al aplicar la técnica de hibridación ADN-ADN entre dos cepas, nos indica que éstas pertenecen a la misma especie (Wayne *et al.*, 1987; Bishop *et al.*, 2009). El problema está en que esta técnica es larga y cara (Johnson, 1994), además de no ser muy reproducible de unos laboratorios a otros, y este valor de corte no siempre es adecuado para todas las poblaciones bacterianas. Por ello, se siguen buscando otras técnicas de identificación y definición de especies. Se ha observado que la secuenciación de varios genes estructurales de mantenimiento (“housekeeping genes”) puede aportar suficiente información para distinguir especies de un mismo género (Stackebrandt *et al.*, 2002). Además, estudios comparativos entre secuencias de genomas completos y genes estructurales, que codifican para proteínas esenciales, muestran la existencia de una relación directa entre los cambios producidos en estos genes y los identificados en el genoma completo del microorganismo, de modo que un grupo pequeño pero representativo de genes compartidos nos daría la relación existente entre genomas completos (Zeigler, 2003). Los criterios utilizados en la búsqueda de estos genes son fundamentalmente cuatro:

- 1- Los genes deben estar ampliamente distribuidos en los genomas.
- 2- Los genes deben ser únicos para un genoma dado.
- 3- Las secuencias de los genes deben ser suficientemente largas para contener información filogenética útil pero suficientemente cortas para poder secuenciarlos.
- 4- Las secuencias deben predecir las relaciones del genoma completo con una precisión y exactitud adecuada.

Actualmente, en base a las recomendaciones del comité para la evaluación de la definición de especie en bacteriología, está siendo evaluado el uso del análisis de

secuencias multilocus (MLSA) como método alternativo en la identificación de especies en diferentes géneros (Guo *et al.*, 2008; Bishop *et al.*, 2009; Pascual *et al.*, 2009). Hasta el momento este análisis no se ha realizado para el género *Micromonospora*, y teniendo en cuenta el gran incremento en número de especies que ha sufrido este género en los últimos años, este método resultaría de gran interés, por lo que se propuso llevarlo a cabo en este estudio.

Se optó por la utilización de, además del gen ribosómico 16S, cuatro genes estructurales: el gen que codifica para la subunidad B de la girasa (*gyrB*), el gen que codifica para una recombinasa (*recA*), el gen que codifica para la subunidad B de la ARN polimerasa (*rpoB*) y el gen que codifica para la subunidad  $\beta$  de la atp sintetasa (*atpD*). Estos genes que codifican para proteínas y que ya habían sido utilizados con anterioridad en actinobacterias, fueron evaluados para el género *Micromonospora* utilizando las cepas tipo de las especies descritas hasta el momento. Tras este análisis, se procedió a la identificación de las cepas que previamente se habían seleccionado mediante los estudios de genotipado anteriormente expuestos. Una vez obtenidas las secuencias y realizados análisis individuales de cada uno de los genes, se procedió a un análisis filogenético conjunto de los mismos, concatenando los cinco genes amplificados.

#### 4.4.1. Cepas utilizadas en el análisis de secuencias multilocus

Además de las 49 cepas del estudio seleccionadas a partir de los perfiles obtenidos en las técnicas de tipado también se incluyeron 33 cepas tipo del género *Micromonospora*, la cepa tipo descrita para el género *Polymorphospora*, muy próximo a *Micromonospora* y la cepa *Salinispora arenicola* DSM 44219<sup>T</sup> como elemento externo (Tabla 21), perteneciente también a la familia *Micromonosporaceae*.

Tabla 21. Cepas tipo utilizadas en el estudio.

	CEPA
<i>Micromonospora aurantiaca</i>	DSM 43813 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora auratinigra</i>	DSM 44815 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora carbonacea</i>	DSM 43168 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora chalcea</i>	DSM 43026 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora chersina</i>	DSM 44151 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora chokoriensis</i>	JCM 13247 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora citrea</i>	DSM 43903 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora coerulea</i>	DSM 43143 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora coriariae</i>	DSM 44875 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora coxensis</i>	2-30-b(28) <sup>T</sup>
<i>Micromonospora eburnea</i>	DSM 44814 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora echinaurantiaca</i>	DSM 43904 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora echinofusca</i>	DSM 43913 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora echinospora</i>	DSM 43816 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora endolithica</i>	DSM 44398 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora fulviviridis</i>	DSM 43906 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora halophytica</i>	DSM 43171 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora inositola</i>	DSM 43819 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora lupini</i>	DSM 44874 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora matsumotoense</i>	IMSNU 22003 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora mirobrigensis</i>	DSM 44830 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora nigra</i>	DSM 43818 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora olivasterospora</i>	DSM 43868 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora pallida</i>	DSM 43817 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora pattaloongensis</i>	JCM 12394 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora peucetia</i>	DSM 43363 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora purpureochromogenes</i>	DSM 43821 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora rifamycinica</i>	DSM 44983 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora rosaria</i>	DSM 803 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora saelicesensis</i>	DSM 44871 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora sagamiensis</i>	DSM 43912 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora siamensis</i>	TT2-4 <sup>T</sup>
<i>Micromonospora viridifaciens</i>	DSM 43909 <sup>T</sup>
<i>Polymorphospora rubra</i>	TT97-42 <sup>T</sup>
<i>Salinispora arenicola</i>	DSM 44219 <sup>T</sup>



#### 4.4.2. Secuenciación del gen ribosómico 16S

La comparación de las secuencias del gen ribosómico 16S fue introducida en la sistemática bacteriana como una herramienta de clasificación basada en la filogenia molecular que revolucionó la taxonomía (Ludwig y Schleifer, 1994).

La secuenciación de este gen es un requisito para describir una especie nueva, y se admite que si dos organismos presentan una similitud inferior al 97% posiblemente se trate de dos especies diferentes, mientras que si presentan una similitud entre 97% y 99% se necesita además que la hibridación ADN-ADN confirme que son especies diferentes (Stackebrandt y Goebel, 1994). Sin embargo, más recientemente se ha descrito que en el caso de las actinobacterias estos márgenes se pueden reajustar, considerando que dos especies son distintas cuando su porcentaje de similitud es inferior a un 99%, siendo necesaria la hibridación ADN-ADN sólo en los casos en que este valor sea superado (Stackebrandt y Ebers, 2006).

A partir de los datos obtenidos en la caracterización genotípica de los microorganismos aislados, se decidió secuenciar representantes de cada uno de los grupos obtenidos, analizando un total de 49 cepas (Tabla 22).

Tabla 22. Cepas representantes utilizadas en la secuenciación del gen ARNr 16S.

Aislados de Cañizal			Aislados de Salamanca	
Nódulos		Rizosfera	Nódulos	Rizosfera
GUI 2	GUI34	CR 1A	SG 2	SR 1
GUI 3	GUI37	CR 18	SG 8	SR 2
GUI 8	GUI40	CR 21	SG 10	SR 4
GUI 12	GUI41	CR 22	SG 15	SR 6
GUI 13	GUI42	CR 30	SG 16	SR 10A
GUI 14	GUI43	CR 36	SGA 3	SR 11
GUI 15	GUI61	CR 38	SGA 5	SR 12
GUI 16	GUI63	CR 39	SGA 9	SR 15
GUI 19		CR 40	SGA 16	
GUI 23			SGA 18	
GUI 27			SGA 21	
GUI 28			SGB 14	

Las secuencias obtenidas para las cepas fueron de aproximadamente 1450 pb, siendo en todos los casos superiores a 1400 pb.

En la tabla 23 se presentan los porcentajes de similitud obtenidos entre las secuencias de los microorganismos seleccionados y las de las cepas tipo más próximas depositadas en las bases de datos públicas (EMBL, Genbank, y NCBI) y comparadas a través del servidor Ez-Taxon. (<http://www.eztaxon.org/>; Chun *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos confirmaron que el 88% de las cepas pertenecían al género *Micromonospora*. Además, todos los microorganismos aislados a partir de los nódulos pertenecían a este género, lo cual es un dato destacable. En el caso de las muestras de rizosfera hubo una mayor variedad de géneros, como la cepa CR 40 identificada con el género *Asanoa* y las cepas CR 1A y CR 22 con el género *Nonomurea* en las cepas aisladas de Cañizal, mientras que las cepas SR 10A, SR 11 y SR 12, aisladas de Salamanca, fueron identificadas con los géneros *Kribella* y *Streptomyces* respectivamente. No se continuaron los estudios con los demás genes con estas cepas que no correspondían con el género *Micromonospora*, ya que el objetivo del trabajo era la caracterización de este género.

Al analizar los resultados de la tabla 23 se puede observar que el 33% de las cepas presentaron una similitud alta con *M. saelicesensis* DSM 44871<sup>T</sup>, 16 de las cepas presentan una mayor similitud con esta especie, y la siguiente en número es con *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup>, (6 cepas). Estos datos son destacables ya que estas dos especies han sido aisladas de nódulos fijadores de nitrógeno. El resto de las identificaciones sólo incluyen entre una y cuatro cepas cada una: *M. sagamiensis* DSM 43912<sup>T</sup> (4 cepas), *M. aurantiaca* DSM 43813<sup>T</sup> (3 cepas), *M. coxensis* JCM 13248<sup>T</sup> (3 cepas), *M. matsumotoense* IMSNU 22003<sup>T</sup> (2 cepas), *M. siamensis* JCM 12769<sup>T</sup> (2 cepas), *M. pattaloongensis* TJ2-2<sup>T</sup> (1 cepa), *M. auratinigra* JCM 12357<sup>T</sup> (1 cepa), *M. coerulea* DSM 43143<sup>T</sup> (1 cepa), *M. chaiyaphumensis* JCM 12873<sup>T</sup> (1 cepa), *M. chersina* DSM 44151<sup>T</sup> (1 cepa), *M. fulviviridis* DSM 43906<sup>T</sup> (1 cepa) y *M. lupini* DSM 44874<sup>T</sup> (1 cepa).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 23. Similitud de las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas de este estudio comparadas con las depositadas en las bases de datos públicas.

CEPA	CEPA TIPO MÁS PRÓXIMA	% SIMILITUD	Diff/Total nt
<b>GUI 2</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>†</sup>	99.101	13/1446
<b>GUI 3</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>†</sup>	99.583	4/1439
<b>GUI 8</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>†</sup>	99.586	6/1449
<b>GUI 12</b>	<i>Micromonospora aurantiaca</i> DSM 43813 <sup>†</sup>	99.653	5/1443
<b>GUI 13</b>	<i>Micromonospora matsumotoense</i> IMSNU 22003 <sup>†</sup>	98.871	17/1506
<b>GUI 14</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>†</sup>	99.172	12/1449
<b>GUI 15</b>	<i>Micromonospora pattaloongensis</i> TJ2-2 <sup>†</sup>	98.757	18/1448
<b>GUI 16</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>†</sup>	99.862	2/1450
<b>GUI 19</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>†</sup>	99.583	6/1439
<b>GUI 23</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>†</sup>	99.586	6/1449
<b>GUI 27</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>†</sup>	99.586	6/1451
<b>GUI 28</b>	<i>Micromonospora sagamiensis</i> DSM 43912 <sup>†</sup>	99.318	10/1466
<b>GUI 34</b>	<i>Micromonospora aurantiaca</i> DSM 43813 <sup>†</sup>	99.578	6/1423
<b>GUI 37</b>	<i>Micromonospora sagamiensis</i> DSM 43912 <sup>†</sup>	99.371	9/1431
<b>GUI 40</b>	<i>Micromonospora auratinigra</i> TT1-11 <sup>†</sup>	98.954	15/1434
<b>GUI 41</b>	<i>Micromonospora lupini</i> Lupac 14N <sup>†</sup>	99.375	9/1440
<b>GUI 42</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>†</sup>	99.097	13/1440
<b>GUI 43</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>†</sup>	99.445	8/1441
<b>GUI 61</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>†</sup>	99.444	8/1439
<b>GUI 63</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>†</sup>	99.444	8/1438
<b>CR 1A</b>	<i>Nonomuraea turkmeniaca</i> DSM 43926 <sup>†</sup>	98.864	16/1409
<b>CR 18</b>	<i>Micromonospora chersina</i> DSM 44151 <sup>†</sup>	99.168	12/1442
<b>CR 21</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>†</sup>	99.103	13/1449
<b>CR 22</b>	<i>Nonomuraea dietziae</i> DSM 44320 <sup>†</sup>	97.427	36/1399
<b>CR 30</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>†</sup>	99.311	10/1451
<b>CR 36</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>†</sup>	99.309	10/1448
<b>CR 38</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>†</sup>	99.033	14/1448
<b>CR 39</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>†</sup>	99.518	7/1451
<b>CR 40</b>	<i>Asanoa ishikariensis</i> IMSNU 22004 <sup>†</sup>	99.582	6/1436
<b>SG 2</b>	<i>Micromonospora coerulea</i> DSM 43143 <sup>†</sup>	99.446	8/1443
<b>SG 8</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>†</sup>	99.793	3/1447
<b>SG 10</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>†</sup>	99.793	3/1447
<b>SG 15</b>	<i>Micromonospora coxensis</i> 2-30-b/28 <sup>†</sup>	99.095	13/1436
<b>SG 16</b>	<i>Micromonospora coxensis</i> 2-30-b/28 <sup>†</sup>	99.028	14/1440
<b>SGA 3</b>	<i>Micromonospora aurantiaca</i> DSM 43813 <sup>†</sup>	99.653	5/1442
<b>SGA 5</b>	<i>Micromonospora siamensis</i> TT2-4 <sup>†</sup>	99.281	10/1391
<b>SGA 9</b>	<i>Micromonospora matsumotoense</i> IMSNU 22003 <sup>†</sup>	98.893	16/1446
<b>SGA 16</b>	<i>Micromonospora fulvividis</i> DSM 43906 <sup>†</sup>	99.583	6/1440
<b>SGA 18</b>	<i>Micromonospora chaiyaphumensis</i> MC5-1 <sup>†</sup>	99.719	4/1426
<b>SGA 21</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>†</sup>	98.825	17/1447
<b>SGB 14</b>	<i>Micromonospora coxensis</i> 2-30-b/28 <sup>†</sup>	99.240	11/1447
<b>SR 1</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>†</sup>	99.585	6/1447
<b>SR 2</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>†</sup>	99.447	8/1447
<b>SR 4</b>	<i>Micromonospora sagamiensis</i> DSM 43912 <sup>†</sup>	99.092	13/1432
<b>SR 6</b>	<i>Micromonospora siamensis</i> TT2-4 <sup>†</sup>	99.139	12/1393
<b>SR 10A</b>	<i>Kribbella swartbergensis</i> HMC25 <sup>†</sup>	99.272	10/1374
<b>SR 11</b>	<i>Streptomyces violaceolatus</i> LMG 20293 <sup>†</sup>	100	0/1438
<b>SR 12</b>	<i>Streptomyces canus</i> NBRC 12752 <sup>†</sup>	100	0/1437
<b>SR 15</b>	<i>Micromonospora sagamiensis</i> DSM 43912 <sup>†</sup>	99.167	12/1440

Al analizar los porcentajes de similitud que presentan las cepas identificadas con el género *Micromonospora* con las cepas tipo del género, se puede observar que los valores varían entre un 95,88% y un 99,86%. Estos valores varían entre un 95,88% entre las cepas tipo más alejadas, *M. pattaloongensis* TJ2-2<sup>T</sup> y *M. matsumotoense* IMSNU 22003<sup>T</sup> y un 99,45% de similitud entre las dos cepas tipo que presentan un valor más alto entre ellas, *M. sagamiensis* DSM 43912<sup>T</sup> y *M. inyonensis* DSM 46123<sup>T</sup>. Los valores de similitud más altos de muchas de nuestras cepas son inferiores a ese valor, pudiendo representar nuevas especies.

### Análisis filogenético

El análisis filogenético de las secuencias obtenidas sirvió para conocer la relación de las cepas aisladas con respecto a las especies de *Micromonospora* ya descritas. Para ello se utilizaron los programas informáticos Mega 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) y ARB (Ludwig *et al.*, 2004), con los que se calcularon las distancias evolutivas de las secuencias y se construyeron los árboles filogenéticos. Estos programas permiten el análisis de los datos empleando varios métodos y algoritmos distintos, pudiendo así comparar los árboles obtenidos y determinar si la topología presentada es estable. Previamente a esto se utilizó el programa Clustal X, con el que se alinearon las secuencias. Adicionalmente, mediante el programa Phylit se realizaron matrices de similitud de las secuencias del gen ARN ribosómico 16S de las cepas incluidas en este estudio.

En la figura 40 se muestra el árbol filogenético de las secuencias del gen ribosómico 16S de las cepas tipo del género *Micromonospora* obtenidas a partir de las bases de datos públicas, analizadas con el método del vecino más cercano (Neighbor-joining) y utilizando el parámetro dos de Kimura (Kimura 2-p). Este análisis se realizó para observar la separación que se muestra entre las distintas especies y ver su distribución con respecto a este gen, para así tener un patrón comparativo con respecto a los obtenidos en los demás genes analizados.

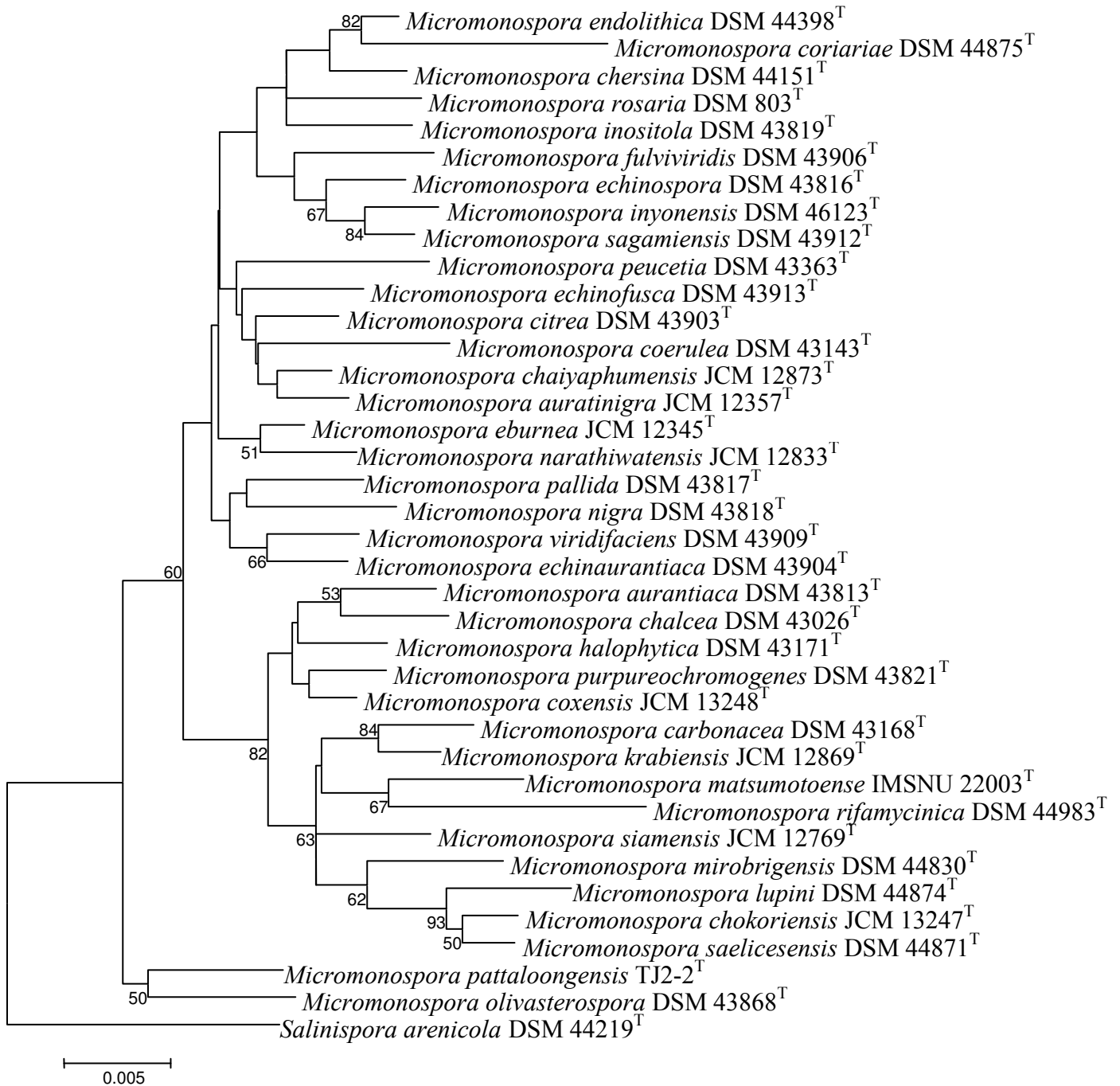


Fig. 40. Árbol filogenético derivado de las secuencias del gen ARNr 16S mostrando la relación entre las cepas tipo del género *Micromonospora* mediante el método del vecino más cercano y el parámetro de Kimura 2-p.

En la figura 41 podemos observar un árbol filogenético basado en el método del vecino más cercano (NJ) y el parámetro de Kimura 2-p, en el que se incluyeron las 37 especies validadas del género *Micromonospora*, la cepa tipo del género *Polymorphospora*, muy próximo al género *Micromonospora* y 43 cepas secuenciadas en este trabajo. Sobre el árbol se muestran marcas para los nodos que se mantienen estables con los otros métodos utilizados (p para máxima parsimonia y l para máxima verosimilitud).

En este árbol se puede observar que las cepas de estudio quedan distribuidas a lo largo del mismo, lo que confirma la elevada diversidad existente entre las cepas aisladas. Sin embargo, muchas quedan agrupadas en una rama común, que presenta una mayor similitud con *M. saelicesensis* DSM 44871<sup>T</sup>. Nueve cepas se aislaron de nódulos de Cañizal, dos de nódulos de Salamanca, dos de la rizosfera de Cañizal y dos de la rizosfera de Salamanca, para un total de 15 cepas con unos porcentajes de similitud que variaron entre un 99,03 y un 99,86%. Estos datos son un resultado a destacar, teniendo en cuenta que la cepa *M. saelicesensis* DSM 44871<sup>T</sup> fue aislada de nódulos de *Lupinus angustifolius* (Trujillo *et al.*, 2007). Dentro de este grupo se pueden observar varias agrupaciones internas que presentan diferencias, un primer clado formando por cinco cepas muy semejantes entre sí (GUI 3, SR 1, GUI 43, GUI 8 y SG 8), que presentan entre ellas valores superiores al 99,65% y en algunos casos del 100%. Las cepas GUI 16 y SG 10 son las más próximas a la cepa tipo, perteneciendo muy probablemente a esta especie. Otra clado en este grupo lo forman otras cuatro cepas GUI 23, GUI 63, CR 38 y SR 2, aunque estas ya presentan mayores diferencias entre sí, con porcentajes de similitud entre un 98,83 y un 99,59%. Otro clado bien diferenciado es el formado por las cepas GUI 2, GUI 14, GUI 42 y CR 21, que forman una rama independiente, las tres más próximas se identifican en un 100%, mientras que con la GUI 14 el porcentaje es de un 99,79%. La cepa GUI 41 que aparece próxima a *M. lupini* DSM 44874<sup>T</sup> (99,37%) se muestra también cerca.

Los cinco grupos siguientes formados por cepas aisladas en este trabajo no muestran una relación marcada con ninguna de las cepas tipo, en el primero de ellos aparecen las cepas SGA 21 y SGB 14 aisladas de nódulos de Salamanca, aunque la distancia entre ellas es bastante elevada, presentando un 99,17% de similitud. El segundo está únicamente formado por la cepa SG 15. El tercero lo conforman las cepas SGA 5 y

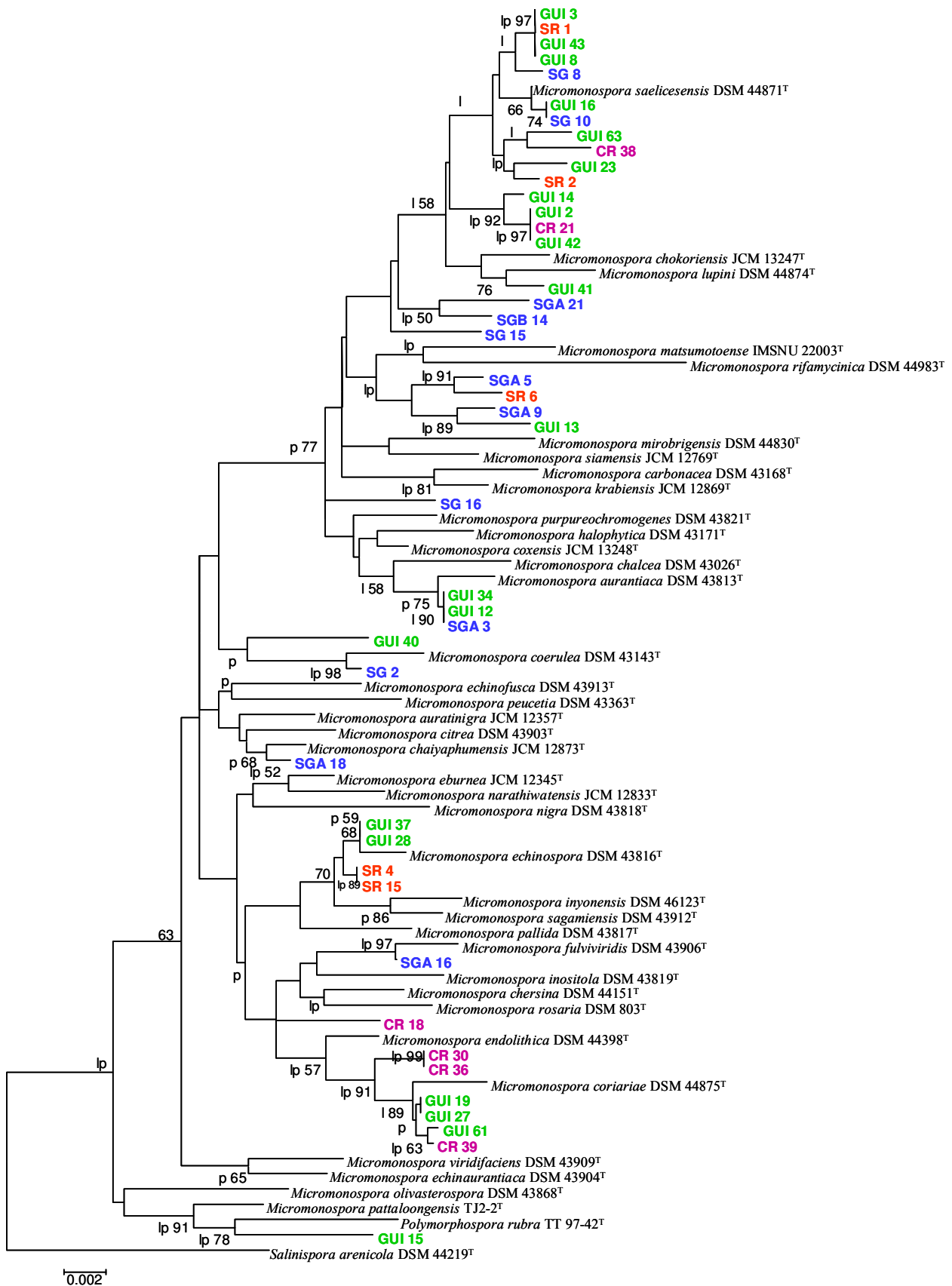


Fig. 41. Árbol filogenético derivado de las secuencias del gen ARNr 16S mostrando la relación entre las cepas identificadas como *Micromonospora* y las cepas tipo de éste género mediante el método del vecino más cercano y el parámetro de Kimura 2-p. Cañizal (GUI: nódulos, CR: rizosfera), Salamanca (SG: nódulos, SR: rizosfera). Nodos conservados: p: máxima parsimonia, l: máxima verosimilitud y lp: ambos.

SR 6, ambas aisladas de Salamanca aunque de nódulo y rizosfera respectivamente, y presentan entre sí una similitud de 99,65%; en el cuarto grupo aparecen las cepas GUI 13 y SGA 9, aisladas de nódulos de Cañizal la primera y de la rizosfera de Salamanca la segunda, y comparten un 99,52% de similitud. El quinto grupo lo forma la cepa SG 16 que aparece formando una rama independiente en el árbol.

Las cepas GUI 12, GUI 34 y SGA 3 se muestran junto a *M. aurantiaca* DSM 43813<sup>T</sup> formando otro grupo, en el que también queda próxima la cepa *M. chalcea* DSM 43026<sup>T</sup>. Las tres cepas fueron aisladas de nódulos, las dos primeras de Cañizal y la última de Salamanca y sus porcentajes de similitud varían entre un 99,59 y un 99,65%.

Aunque la cepa GUI 40 presenta un porcentaje de similitud más alto con *M. auratinigra* JCM 12357<sup>T</sup>, en el árbol aparece en una rama aislada, próxima al grupo formado por la cepa SG 2, aislada de nódulos de Salamanca, con la cepa *M. coerulea* DSM 43143<sup>T</sup> (99,45%). En el siguiente grupo aparece la cepa SGA 18 junto a *M. chaiyaphumensis* JCM 12873<sup>T</sup>, entre las que existe un porcentaje de similitud del 99,72%.

Las cepas GUI 28, GUI 37, SR 4 y SR 15 también quedan agrupadas, las dos primeras procedentes de nódulos de Cañizal y las dos segundas de la rizosfera de Salamanca, y aparecen más próximas a *Micromonospora echinospora* DSM 43816<sup>T</sup> presentando unos porcentaje de similitud entre un 99,17 y un 99,65%. La cepa SGA 16 se presenta junto a *M. fulviviridis* DSM 43906<sup>T</sup>, con la que posee un 99,58% de similitud mientras que la cepa CR 18 se presenta en una rama aislada y forma un grupo independiente.

El siguiente grupo, que incluye seis cepas, está compuesto por GUI 19, GUI 27, GUI 61, CR 30, CR 36 y CR 39. Estos microorganismos formaron un clado muy relacionado con *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup>, aislada de nódulos de *Coriaria myrtiflora* (Trujillo *et al.*, 2006), con una estabilidad del 91% (“bootstrap”). Estas cepas procedían todas de Cañizal, siendo 3 de ellas aisladas de nódulos y las otras 3 de la rizosfera y sus porcentajes de similitud variaron entre un 99,31 y un 99,59%.



La cepa GUI 15 aparece próxima a la cepa tipo del género *Polymorphospora* TT97-42<sup>T</sup> con una estabilidad del 78% y con la que posee un porcentaje de similitud del 98,53%, y la rama completa, perfectamente integrada en el género *Micromonospora* tiene un valor de 91, en la que también queda englobada la cepa *M. pattaloongensis* TJ2-2<sup>T</sup>. Esta agrupación es igual en los otros dos métodos estudiados (máxima parsimonia y máxima verosimilitud). Los porcentajes de similitud de este complejo grupo y las cepas tipo de *Micromonospora* se muestran en el anexo II.

Como se puede observar, en la mayoría de los casos las cepas obtenidas a partir de la rizosfera de las plantas de *Pisum sativum* se incluyen en grupos junto con las cepas obtenidas a partir de los nódulos fijadores de nitrógeno. Sin embargo, no se observa una relación directa entre las cepas obtenidas de una zona concreta, es decir, no siempre los microorganismos aislados de rizosfera de una zona se agrupan con los microorganismos aislados de nódulo de su misma zona de muestreo. Esto ocurre en el caso de las cepas que aparecen junto a *M. echinospora* DSM 43816<sup>T</sup>, dos de ellas se corresponden con microorganismos aislados de nódulos de Cañizal mientras que las otras dos se aislaron de la rizosfera de Salamanca. Sin embargo, sí que aparecen casos de cepas próximas, como la GUI 61 y la CR 39, que proceden de una misma zona, en este caso Cañizal, siendo la primera aislada de nódulo y la otra de la rizosfera.

Además, los resultados del análisis filogenético basado en el gen ARNr 16S, sugieren la existencia de al menos cuatro nuevas especies, teniendo en cuenta los valores utilizados para definir la separación de dos especies en el género *Micromonospora* y confirma resultados previos sobre la alta diversidad de especies que habita en nódulos fijadores de nitrógeno (Trujillo *et al.*, 2007, Carro *et al.*, 2009).

De este modo, algunos de los resultados que se pueden extraer del análisis del gen ribosómico 16S son los siguientes:

- Todos los microorganismos aislados de nódulos pertenecían al género *Micromonospora*.
- El 46,5% de las cepas de *Micromonospora* aisladas se identificaban con las cepas tipo *M. saelicesensis* DSM 44871<sup>T</sup>, *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup> y *M. lupini* DSM 44874<sup>T</sup>,

aisladas todas ellas de nódulos. El resto de los aislados eran muy diversos, distribuyéndose a lo largo de todo el árbol.

- Un 63% de los microorganismos aislados pertenecientes al género *Micromonospora* presenta un porcentaje de similitud inferior al 99,45%, valor que presentan entre sí dos de las cepas tipo ya descritas, *M. sagamiensis* DSM 43912<sup>T</sup> y *M. inyonensis* DSM 46123<sup>T</sup>.

- La estabilidad del gen ARNr 16S respecto al análisis con máxima parsimonia y máxima verosimilitud es intermedia.

- Los microorganismos aislados de nódulos y de rizosfera no presentan una tendencia concreta, pudiendo existir cepas correspondientes a la misma especie ocupando uno u otro nicho indistintamente.

#### 4.4.3. Secuenciación del gen *gyrB*

El gen ribosómico 16S evoluciona de una forma muy lenta, de modo que en ocasiones valores de similitud superiores al 99% corresponden a cepas que pertenecen a diferentes especies (Yamamoto y Harayama, 1995; Richert *et al.*, 2005). En estos casos la utilización de otros genes en los cuales no se produzca transferencia horizontal, su tasa de evolución molecular sea superior a la del ARNr 16S y que se distribuyan universalmente entre las especies bacterianas puede aportar información relevante. Este es el caso del gen que codifica para la subunidad B de la girasa (*gyrB*). En este gen, el número de sustituciones posibles es mucho mayor que en el caso del gen ribosómico 16S, ya que en el caso del gen *gyrB* sustituciones en bases que no provoquen cambios en la secuencia de aminoácidos, por regla general, son aceptadas, mientras que en el gen ARNr 16S estos cambios están más restringidos. Por ello se considera que el gen *gyrB* es mejor que el gen ARNr 16S a la hora de establecer relaciones filogenéticas a nivel de especie (Yamamoto y Harayama, 1995; Kasai *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2006; Parkinson *et al.*, 2009).

En el año 2000 Kasai *et al.* utilizaron el gen *gyrB* para reclasificar el género *Micromonospora*. En este estudio se comprobó la correspondencia entre los resultados obtenidos a través de análisis filogenéticos de gen *gyrB* y los resultados de hibridación ADN-ADN. Sin embargo, las cepas descritas con posterioridad no incluyeron el estudio de este gen.

En el presente trabajo se secuenció el gen *gyrB* de 78 cepas, 33 cepas tipo del género *Micromonospora*, la cepa tipo del género *Polymorphospora* y 43 cepas aisladas de nódulos de *Pisum sativum* y de su rizosfera. Para la secuenciación parcial de este gen se diseñaron nuevos oligonucleótidos, ya que cuando se intentó amplificar con los oligonucleótidos utilizados en artículos anteriores (Yamamoto y Harayama, 1995; Kasai *et al.*, 2000) no se consiguieron buenos resultados. Los oligonucleótidos se diseñaron en base a los descritos por Richert *et al.* (2005) como se muestra en el apartado de materiales y métodos, y al igual que en su caso, se necesitaron dos amplificaciones, ya que una directa nunca dio un buen resultado, a pesar de que se probaron diferentes condiciones de amplificación.

Se obtuvieron secuencias de aproximadamente 1050 pb para todas las cepas estudiadas, siendo en todos los casos superiores a 1000 pb. En la tabla 24 se presentan los porcentajes de similitud obtenidos entre las secuencias del gen *gyrB* de los microorganismos aislados seleccionados y las de las cepas tipo analizadas en este estudio. Los valores que se muestran en la tabla varían desde un 92,96% a un 100%, con lo que podemos ver ya un rango mucho más amplio que el que se presentaba para el gen ribosómico 16S (98,76 - 99,65%).

La cepa tipo con la que un mayor número de cepas (13) presentaron su máxima similitud fue *M. saelicesensis* DSM 44871<sup>T</sup> y la siguiente fue *M. lupini* DSM 44874<sup>T</sup>, con 7 cepas. Con la cepa *M. purpureochromogenes* DSM 43821<sup>T</sup> aparecen 5 cepas, con *M. echinospora* DSM 43816<sup>T</sup> y con *M. coriariae* 44875<sup>T</sup> se muestran 4 cepas, mientras que con *M. aurantiaca* DSM 43813<sup>T</sup> y *M. fulviviridis* DSM 43906<sup>T</sup> aparecen 3 y de las otras cuatro cepas sólo hay una similar con cada una de ellas, *M. coerulea* DSM 43143<sup>T</sup>, *M. echinaurantiaca* DSM 43904<sup>T</sup>, *M. chokoriensis* JCM 13247<sup>T</sup> y *M. echinofusca* DSM 43913<sup>T</sup>. Los porcentajes de similitud de todas las cepas estudiadas se muestran en el anexo II.

En algunos estudios se aproximaban valores de porcentajes de similitud del gen *gyrB* con porcentajes de similitud de hibridación ADN-ADN (Kasai *et al.*, 2000; Hatano *et al.*, 2003), estableciendo que valores superiores al 98.5% coinciden con valores de hibridación superiores al 70%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 24. Similitud de las secuencias del gen *gyrB* de las cepas de este estudio comparadas con 33 cepas tipo del género *Micromonospora*.

CEPA	CEPA TIPO MÁS PRÓXIMA	% SIMILITUD	Diff/Total nt
<b>GUI 2</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>T</sup>	95,88	45/1091
<b>GUI 3</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>T</sup>	98,44	17/1091
<b>GUI 8</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>T</sup>	98,33	18/1075
<b>GUI 12</b>	<i>Micromonospora aurantiaca</i> DSM 43813 <sup>T</sup>	99,82	2/1094
<b>GUI 13</b>	<i>Micromonospora lupini</i> Lupac 14 <sup>T</sup>	95,76	44/1037
<b>GUI 14</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>T</sup>	97,71	24/1049
<b>GUI 15</b>	<i>Micromonospora fulvivoridis</i> DSM 43906 <sup>T</sup>	92,93	71/1004
<b>GUI 16</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>T</sup>	98,14	19/1021
<b>GUI 19</b>	<i>Micromonospora lupini</i> Lupac 14 <sup>T</sup>	95,78	44/1043
<b>GUI 23</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>T</sup>	98,00	21/1051
<b>GUI 27</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	100	0/1037
<b>GUI 28</b>	<i>Micromonospora echinospora</i> DSM 43816 <sup>T</sup>	97,61	25/1045
<b>GUI 34</b>	<i>Micromonospora aurantiaca</i> DSM 43813 <sup>T</sup>	99,90	1/1033
<b>GUI 37</b>	<i>Micromonospora echinospora</i> DSM 43816 <sup>T</sup>	97,80	23/1044
<b>GUI 40</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	99,61	4/1038
<b>GUI 41</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>T</sup>	96,91	33/1067
<b>GUI 42</b>	<i>Micromonospora lupini</i> Lupac 14 <sup>T</sup>	95,90	35/1056
<b>GUI 43</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>T</sup>	98,31	18/1065
<b>GUI 61</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	99,12	9/1018
<b>GUI 63</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>T</sup>	97,37	28/1066
<b>CR 18</b>	<i>Micromonospora fulvivoridis</i> DSM 43906 <sup>T</sup>	95,24	49/1030
<b>CR 21</b>	<i>Micromonospora lupini</i> Lupac 14 <sup>T</sup>	95,80	44/1047
<b>CR 30</b>	<i>Micromonospora lupini</i> Lupac 14 <sup>T</sup>	95,71	45/1050
<b>CR 36</b>	<i>Micromonospora lupini</i> Lupac 14 <sup>T</sup>	95,71	41/1049
<b>CR 38</b>	<i>Micromonospora lupini</i> Lupac 14 <sup>T</sup>	96,97	32/1056
<b>CR 39</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	99,11	9/1016
<b>SG 2</b>	<i>Micromonospora coerulea</i> DSM 43143 <sup>T</sup>	96,29	39/1051
<b>SG 8</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>T</sup>	98,47	16/1049
<b>SG 10</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>T</sup>	97,92	22/1058
<b>SG 15</b>	<i>Micromonospora chokoriensis</i> JCM 13247 <sup>T</sup>	95,25	43/1037
<b>SG 16</b>	<i>Micromonospora echinaurantiaca</i> DSM 43904 <sup>T</sup>	97,19	29/1033
<b>SGA 3</b>	<i>Micromonospora aurantiaca</i> DSM 43813 <sup>T</sup>	97,96	22/1078
<b>SGA 5</b>	<i>Micromonospora purpureochromogenes</i> DSM 43821 <sup>T</sup>	98,55	15/1037
<b>SGA 9</b>	<i>Micromonospora purpureochromogenes</i> DSM 43821 <sup>T</sup>	94,91	55/1081
<b>SGA 16</b>	<i>Micromonospora fulvivoridis</i> DSM 43906 <sup>T</sup>	96,67	34/1021
<b>SGA 18</b>	<i>Micromonospora echinofusca</i> DSM 43913 <sup>T</sup>	96,70	35/1062
<b>SGA 21</b>	<i>Micromonospora purpureochromogenes</i> DSM 43821 <sup>T</sup>	98,38	17/1048
<b>SGB 14</b>	<i>Micromonospora purpureochromogenes</i> DSM 43821 <sup>T</sup>	98,37	18/1105
<b>SR 1</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>T</sup>	98,44	17/1091
<b>SR 2</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>T</sup>	98,63	15/1091
<b>SR 4</b>	<i>Micromonospora echinospora</i> DSM 43816 <sup>T</sup>	98,31	18/1062
<b>SR 6</b>	<i>Micromonospora purpureochromogenes</i> DSM 43821 <sup>T</sup>	99,62	4/1045
<b>SR 15</b>	<i>Micromonospora echinospora</i> IFO 14109	98,01	22/1103

En la figura 42 se muestra un árbol filogenético en el que se han incluido 33 cepas tipo del género *Micromonospora* analizadas con el método del vecino más cercano y el parámetro de Kimura 2-p.

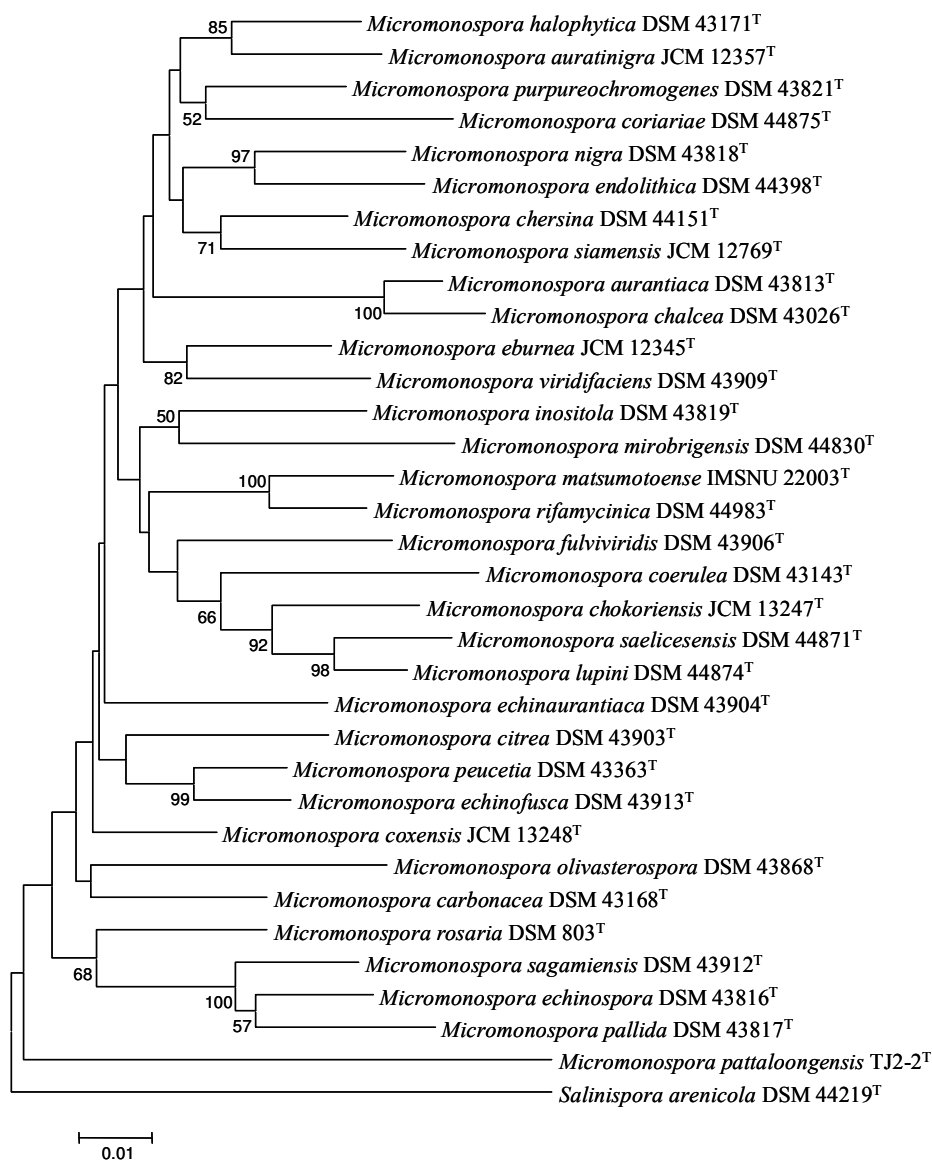


Fig. 42. Árbol filogenético derivado de las secuencias del gen *gyrB* mostrando la relación entre 33 cepas tipo del género *Micromonospora* mediante el método del vecino más cercano y el parámetro de Kimura 2-p.

En este árbol lo primero que se puede observar es que todas las cepas de *Micromonospora* descritas se pueden diferenciar claramente como especies distintas. Además, si comparamos con el árbol que se obtuvo para las secuencias del gen

ribosómico 16S de las cepas tipo (Figura 40), se puede observar que en este caso los brazos de las ramas son mucho más largos, ofreciendo una diferenciación mayor entre las diferentes especies. La estructura formada para el gen *gyrB* es bastante estable al repetir los árboles con otros métodos, aunque no se corresponda por completo con la que se muestra para el gen ribosómico 16S.

Los valores obtenidos en la tabla de similitud van desde un 87,31 a un 100%. En el caso de las cepas tipo los valores varían entre 87,31 y 97,73%, y teniendo en cuenta las distancias que presentan las cepas tipo en la representación mediante árbol filogenético, quedando perfectamente separadas, se podría establecer este valor de 97,73% de similitud como el valor mínimo para considerar que dos cepas podrían representar especies diferentes.

La figura 43 muestra el árbol correspondiente al análisis de las secuencias del gen *gyrB* a través del método del vecino más cercano y el parámetro de Kimura 2-p para todas las cepas de estudio. Al igual que habíamos observado en el árbol de las cepas tipo, las ramas obtenidas en este caso son bastante más largas que las que se obtenían en el gen ARNr 16S. Esto puede deberse fundamentalmente a que el gen *gyrB* evoluciona de forma más rápida. En general, los grupos se conservan bastante bien con los que aparecían para el gen ribosómico 16S: las cepas de estudio quedan distribuidas a lo largo de todo el árbol, lo que confirma de nuevo la elevada diversidad existente entre las cepas muestreadas.

El clado principal es el que forma el grupo en el que el 30% de las cepas presentan una mayor relación con la cepa tipo *M. saelicesensis* DSM 44871<sup>T</sup>, con valores de similitud que varían entre un 95,88 y un 98,63%. Dentro de este clado existen distintos grupos reseñables, el primero de ellos, formado por cinco cepas (GUI 3, GUI 8, GUI 43, SG 8 y SR 1), que presentan entre ellas valores superiores a 99,62% y con respecto a la cepa tipo presentan valores inferiores a 98,46%. El siguiente grupo estaría únicamente formado por la cepa SR 2, que presenta un 98,63% con *M. saelicesensis* DSM 44871<sup>T</sup>. Otros dos grupos los forman las cepas GUI 16 y SG 10 y GUI 14 y GUI 23, que presentan alta similitud entre ellos y valores con la cepa tipo inferiores a 98,14 y 98% respectivamente. Las otras dos cepas que aparecen en este grupo se presentan más alejas y en ramas independientes (GUI 63 y GUI 41).

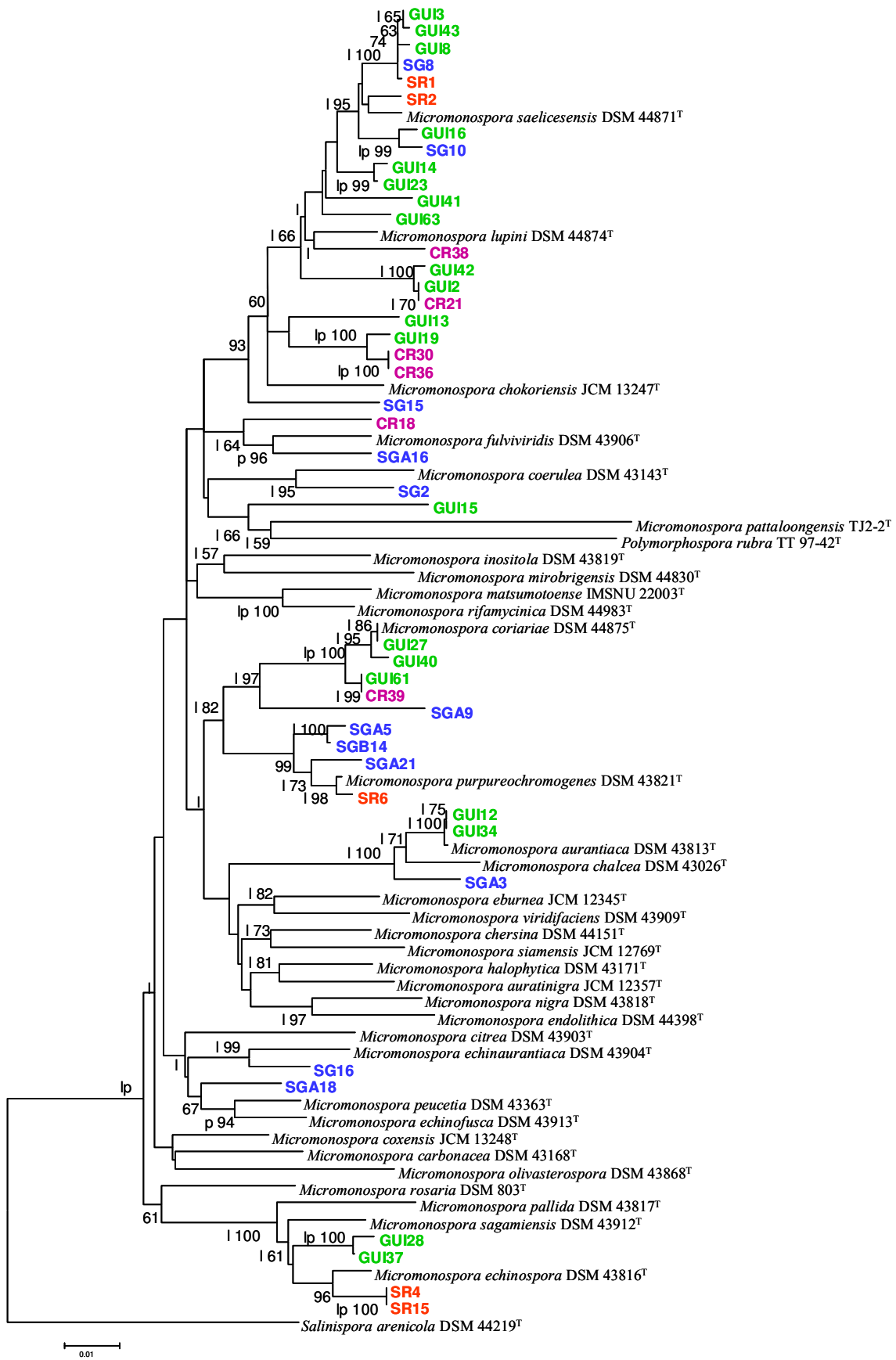


Fig. 43. Árbol filogenético derivado de la secuencia del gen *gyrB* mostrando la relación entre las cepas identificadas como *Micromonospora* y 33 cepas tipo de éste género mediante el método del vecino más cercano y el parámetro de Kimura 2-p. Cañizal (GUI: nódulos, CR: rizosfera), Salamanca (SG: nódulos, SR: rizosfera). Nodos conservados: p: máxima parsimonia, l: máxima verosimilitud y lp: ambos.



La cepa CR 38 aparece relativamente próxima a *M. lupini* (96,97%). Las cepas GUI 2, GUI 42 y CR 21 forman un clado independiente con un porcentaje de similitud respecto a esta cepa tipo inferior al 96% para todas ellas. Otro clado independiente aparece formado por la cepa GUI 13 que presenta una larga rama que la diferencia de las otras tres cepas de este clado, GUI 19, CR 30 y CR 36, que presentan entre ellas valores superiores a un 99,23%.

La cepa SG 15 aparece en una rama bien diferenciada, y lo mismo le ocurre a la cepa CR 18. La cepa SGA 16 aparece relativamente próxima a *M. fulvividis* DSM 43906<sup>T</sup> (96,67%) y lo mismo le ocurre a la cepa SG 2 con *M. coerulea* DSM 43143<sup>T</sup> (96,29%).

El grupo en el que aparecen la cepa GUI 15 con la cepa *Polymorphospora rubra* TT97-42<sup>T</sup> (90,50%) y con *Micromonospora pattaloongensis* TJ2-2<sup>T</sup> (89,55%) posee un porcentaje de repeticiones de 66, presentándose completamente integrado en el árbol. El género *Polymorphospora*, está representado por una sola especie que se muestra muy próxima a distintas cepas del género *Micromonospora*, presentando únicamente una diferenciación morfológica (Carro *et al.*, 2009), por lo que cabría considerar una revisión taxonómica del mismo.

Las cepas GUI 27, GUI 40, GUI 61 y CR 39 aparecen en una rama independiente del árbol junto a la cepa tipo *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup> presentando entre todas ellas valores superiores a un 99,11% y en una rama independiente pero dentro del mismo clado aparece la cepa SGA 9 con una similitud inferior a un 95,29% con las otras cepas. Otro grupo cercano estaba formado por las cepas SGA 21, SGB 14, SGA 5 y SR 6, formando una rama independiente junto a la cepa tipo *M. purpureochromogenes* DSM 43821<sup>T</sup> con la que presentan valores de similitud bastante altos, entre un 98,37 y un 99,62%.

Las cepas GUI 12 y GUI 34 se muestran junto a *M. aurantiaca* DSM 43813<sup>T</sup> con valores superiores a un 99,82% y próximas a *M. chalcea* DSM 43026<sup>T</sup>. La cepa SGA 3 queda más distante en una rama independiente pero más relacionada con *M. aurantiaca* DSM 43813<sup>T</sup> (97,96%).

La cepa SG 16 se presenta próxima a *M. echinaurantiaca* DSM 43904<sup>T</sup> (97,19%) y la cepa SGA 18 forma una rama independiente. El grupo formado por las cepas GUI 28, GUI 37, SR 4 y SR 15 aparece relacionado a la cepa *M. echinospora* DSM 43816<sup>T</sup>, con valores entre 97,61% y 98,31%.

Al buscar la relación existente entre las cepas de nódulo y rizosfera obtenidas de una misma zona de aislamiento, vemos que los resultados son muy similares a lo que se veía para el gen ribosómico 16S, ya que las cepas de estudio quedan agrupadas de una forma muy similar a como lo hacían para este gen.

La estabilidad de las ramas formadas, teniendo en cuenta las marcas representadas en el árbol de los métodos de máxima parsimonia (p) y de máxima verosimilitud (l), es bastante similar entre el gen ribosómico 16S y el gen *gyrB*, aunque para este último es mayor por el método de máxima verosimilitud. Además, hay que destacar que la longitud de las ramas, y por consiguiente, la resolución de las distancias evolutivas es superior para el gen *gyrB*, por lo que es capaz de diferenciar mejor entre cepas más similares.

Tras el análisis del gen *gyrB* se pueden señalar los siguientes resultados:

- El rango de los porcentajes de similitud es mucho mayor para el gen *gyrB* que para el gen ARNr 16S.
- Se confirma que la capacidad de resolución a nivel de especie es superior para el gen *gyrB* que para el gen ARNr 16S en el género *Micromonospora*.
- El 58% de las cepas de *Micromonospora* aisladas se identifican, respecto del gen *gyrB*, con las cepas *M. saelicesensis* DSM 44871<sup>T</sup>, *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup> y *M. lupini* DSM 44874<sup>T</sup>, aisladas todas ellas de nódulos. El resto de las cepas se muestran distribuidas a lo largo de todo el árbol filogenético.
- El 79% de las cepas presentaban un porcentaje más elevado de similitud inferior al 98,5% propuesto como posible valor de corte y un 46,5% de ellas poseían uno inferior a 97,73%, valor que presentaban las dos cepas tipo más cercanas respecto a este gen, *M. saelicesensis* DSM 44871<sup>T</sup> y *M. lupini* DSM 44874<sup>T</sup>.
- No se muestra una relación directa entre las especies de *Micromonospora* y su zona de aislamiento o nicho ecológico.

- Las cepas que presentan una posición diferente respecto de la cepa tipo más cercana en comparación con el gen ARNr 16S de forma destacable son: CR 38, GUI 19, CR 30, CR 36, GUI 40, SGA 9, SR 6 y SG 16.
- El grupo que incluye la cepa GUI 15 y las cepas tipo de *M. pattaloongensis* TJ2-2<sup>T</sup> y *P. rubra* TT 97-42<sup>T</sup>, que para el gen 16S aparecían en un rama independiente más alejada del resto, en este gen aparecen perfectamente englobadas junto al resto de Micromonosporas.

#### 4.4.4. Secuenciación del gen *recA*

Otro de los genes que codifican para proteínas esenciales utilizado con frecuencia como marcador filogenético es el gen que codifica para una recombinasa (*recA*), el cual existe en todas las bacterias debido a la función que realiza en la recombinación de ADN homólogo, en la reparación de ADN dañado y en la inducción de la respuesta SOS, y además está altamente conservado (Blackwood *et al.*, 2000; Maréchal *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 2006). La comparación de análisis filogenéticos basados en las secuencias de los genes *recA* y ARNr 16S de diferentes especies bacterianas han demostrado que presentan agrupaciones similares, indicando que el gen *recA* es una buena elección a la hora de llevar a cabo estudios de sistemática y de identificación de especies en géneros como *Mycobacterium* (Blackwood *et al.*, 2000). Sin embargo, este gen aún no se ha estudiado para el género *Micromonospora*, no habiendo sido publicada ni depositada en las bases de datos públicas ninguna secuencia correspondiente a este género. Al igual que se había comentado para el gen *gyrB*, en el gen *recA* se produce una cantidad elevada de sustituciones, pero que generalmente no cambian el significado de la secuencia de aminoácidos y por lo tanto su función. Aunque estas sustituciones se producen a lo largo de todo el gen, se concentran sobre todo en la tercera base del codón, también conocida como “zona temblorosa” (Blackwood *et al.*, 2000; Gomila *et al.*, 2007).

En el presente trabajo se analizó el gen *recA* de 77 cepas, 33 cepas tipo del género *Micromonospora* descritas en el inicio de este estudio, la cepa *Polymorphospora rubra* TT97-42<sup>T</sup> y 43 cepas aisladas en este trabajo. Sin embargo, no se consiguió la correcta amplificación de todas ellas, siendo incapaces de obtener con los oligonucleótidos utilizados la secuencia para las cepas tipo *M. nigra* DSM 43818<sup>T</sup>, *M. inositola* DSM 43819<sup>T</sup>, *M. olivasterospora* DSM 43868<sup>T</sup>, *M. saelicesensis* DSM 44871<sup>T</sup> y *Micromonospora coxensis* JCM 13248<sup>T</sup>, además de las cepas de estudio GUI 15 y SG 10. La secuencia del gen *recA* contiene aproximadamente 1000 pb, de los cuales se amplificaron en este estudio unos 550 pb de la zona más conservada para las actinobacterias (Rossi *et al.*, 2006).

Los estudios de similitud de las secuencias amplificadas de las cepas de estudio con las cepas depositadas en las bases de datos públicas (GenBank) mostraban que todas las cepas presentaban sus máximas similitudes con el gen *recA* del género *Salinispora* (perteneciente a la misma familia que el género *Micromonospora*), bien con *Salinispora arenicola* o bien con *Salinispora tropica*, de las cuales está depositado el genoma completo.

En la tabla 25 se muestra un resumen de la tabla de similitud (anexo II) en el que se muestran los mayores porcentajes para cada una de las cepas de estudio con respecto a las cepas tipo del género *Micromonospora* incluidas en este trabajo.

Según los porcentajes de similitud, se observa que el mayor número de cepas (15), son similares a *M. lupini* DSM 44874<sup>T</sup>, con unos porcentajes de entre un 95,52 y un 97,02% y cuya procedencia es de las cuatro zonas de aislamiento, nódulos y rizosfera de Cañizal y Salamanca. La siguiente cepa tipo con la que existió un mayor número de similitudes es *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup>, con la que muestran sus porcentajes más altos seis cepas, todas ellas procedentes de Cañizal, tres de los nódulos y tres de la rizosfera. Para las demás cepas tipo sólo se dio una mayor similitud con entre una y cuatro cepas: *M. echinospora* DSM 43816<sup>T</sup> (4 cepas), *M. aurantiaca* DSM 43813<sup>T</sup> (3 cepas), *M. echinaurantiaca* DSM 43804<sup>T</sup> (3 cepas), *M. coerulea* DSM 43143<sup>T</sup> (3 cepas), *M. purpureochromogenes* DSM 43821<sup>T</sup> (3 cepas), *M. fulviviridis* DSM 43906<sup>T</sup> (2 cepas), *M. chokoriensis* JCM 13247<sup>T</sup> (1 cepa) y *M. echinofusca* DSM 43913<sup>T</sup> (1 cepa). Los porcentajes de similitud de todas las cepas de estudio entre ellas y con las cepas tipo se muestran en el anexo II.

En la figura 44 se muestra un árbol filogenético en el que se han incluido 33 cepas tipo del género *Micromonospora* analizadas con el método del vecino más cercano y el parámetro Kimura 2-p.

Tabla 25. Similitud de las secuencias del gen *recA* de las cepas de este estudio comparadas con 33 cepas tipo del género *Micromonospora*.

CEPA	CEPA TIPO MÁS PRÓXIMA	% SIMILITUD	Diff/Total nt
<b>GUI 2</b>	<i>Micromonospora lupini</i> Lupac 14N <sup>T</sup>	96,28	20/537
<b>GUI 3</b>	<i>Micromonospora lupini</i> Lupac 14N <sup>T</sup>	97,02	16/537
<b>GUI 8</b>	<i>Micromonospora lupini</i> Lupac 14N <sup>T</sup>	97,01	16/535
<b>GUI 12</b>	<i>Micromonospora aurantiaca</i> DSM 43813 <sup>T</sup>	99,46	3/551
<b>GUI 13</b>	<i>Micromonospora echinaurantiaca</i> DSM 43804 <sup>T</sup>	94,8	28/537
<b>GUI 14</b>	<i>Micromonospora lupini</i> Lupac 14N <sup>T</sup>	95,52	24/536
<b>GUI 16</b>	<i>Micromonospora lupini</i> Lupac 14N <sup>T</sup>	97,01	16/535
<b>GUI 19</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	95,83	23/551
<b>GUI 23</b>	<i>Micromonospora lupini</i> Lupac 14N <sup>T</sup>	96,08	21/536
<b>GUI 27</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	99,45	3/548
<b>GUI 28</b>	<i>Micromonospora echinospora</i> DSM 43816 <sup>T</sup>	99,06	5/530
<b>GUI 34</b>	<i>Micromonospora aurantiaca</i> DSM 43813 <sup>T</sup>	99,44	3/539
<b>GUI 37</b>	<i>Micromonospora echinospora</i> DSM 43816 <sup>T</sup>	98,84	6/519
<b>GUI 40</b>	<i>Micromonospora lupini</i> Lupac 14N <sup>T</sup>	96,09	21/537
<b>GUI 41</b>	<i>Micromonospora lupini</i> Lupac 14N <sup>T</sup>	96,16	20/521
<b>GUI 42</b>	<i>Micromonospora lupini</i> Lupac 14N <sup>T</sup>	96,28	20/537
<b>GUI 43</b>	<i>Micromonospora lupini</i> Lupac 14N <sup>T</sup>	97,02	16/537
<b>GUI 61</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	95,76	23/543
<b>GUI 63</b>	<i>Micromonospora lupini</i> Lupac 14N <sup>T</sup>	96,83	17/537
<b>CR 18</b>	<i>Micromonospora purpureochromogenes</i> DSM 43821 <sup>T</sup>	97,88	11/518
<b>CR 21</b>	<i>Micromonospora lupini</i> Lupac 14N <sup>T</sup>	96,46	19/537
<b>CR 30</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	97,11	16/554
<b>CR 36</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	97,1	16/551
<b>CR 38</b>	<i>Micromonospora chokoriensis</i> JCM 13247 <sup>T</sup>	95,25	27/568
<b>CR 39</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	95,72	23/538
<b>SG 2</b>	<i>Micromonospora coerulea</i> DSM 43143 <sup>T</sup>	99,82	1/549
<b>SG 8</b>	<i>Micromonospora lupini</i> Lupac 14N <sup>T</sup>	97,02	16/537
<b>SG 15</b>	<i>Micromonospora fulviviridis</i> DSM 43906 <sup>T</sup>	94,98	27/538
<b>SG 16</b>	<i>Micromonospora echinaurantiaca</i> DSM 43804 <sup>T</sup>	99,47	3/564
<b>SGA 3</b>	<i>Micromonospora aurantiaca</i> DSM 43813 <sup>T</sup>	99,64	2/554
<b>SGA 5</b>	<i>Micromonospora purpureochromogenes</i> DSM 43821 <sup>T</sup>	99,23	4/518
<b>SGA 9</b>	<i>Micromonospora echinaurantiaca</i> DSM 43804 <sup>T</sup>	94,68	30/564
<b>SGA 16</b>	<i>Micromonospora fulviviridis</i> DSM 43906 <sup>T</sup>	99,81	1/539
<b>SGA 18</b>	<i>Micromonospora echinofusca</i> DSM43913 <sup>T</sup>	98,52	8/540
<b>SGA 21</b>	<i>Micromonospora coerulea</i> DSM 43143 <sup>T</sup>	97,07	16/554
<b>SGB 14</b>	<i>Micromonospora coerulea</i> DSM 43143 <sup>T</sup>	99,07	5/540
<b>SR 1</b>	<i>Micromonospora lupini</i> Lupac 14N <sup>T</sup>	97,01	17/537
<b>SR 2</b>	<i>Micromonospora lupini</i> Lupac 14N <sup>T</sup>	96,28	23/537
<b>SR 4</b>	<i>Micromonospora echinospora</i> DSM 43816 <sup>T</sup>	99,62	2/530
<b>SR 6</b>	<i>Micromonospora purpureochromogenes</i> DSM 43821 <sup>T</sup>	99,42	3/518
<b>SR 15</b>	<i>Micromonospora echinospora</i> DSM 43816 <sup>T</sup>	99,62	2/530

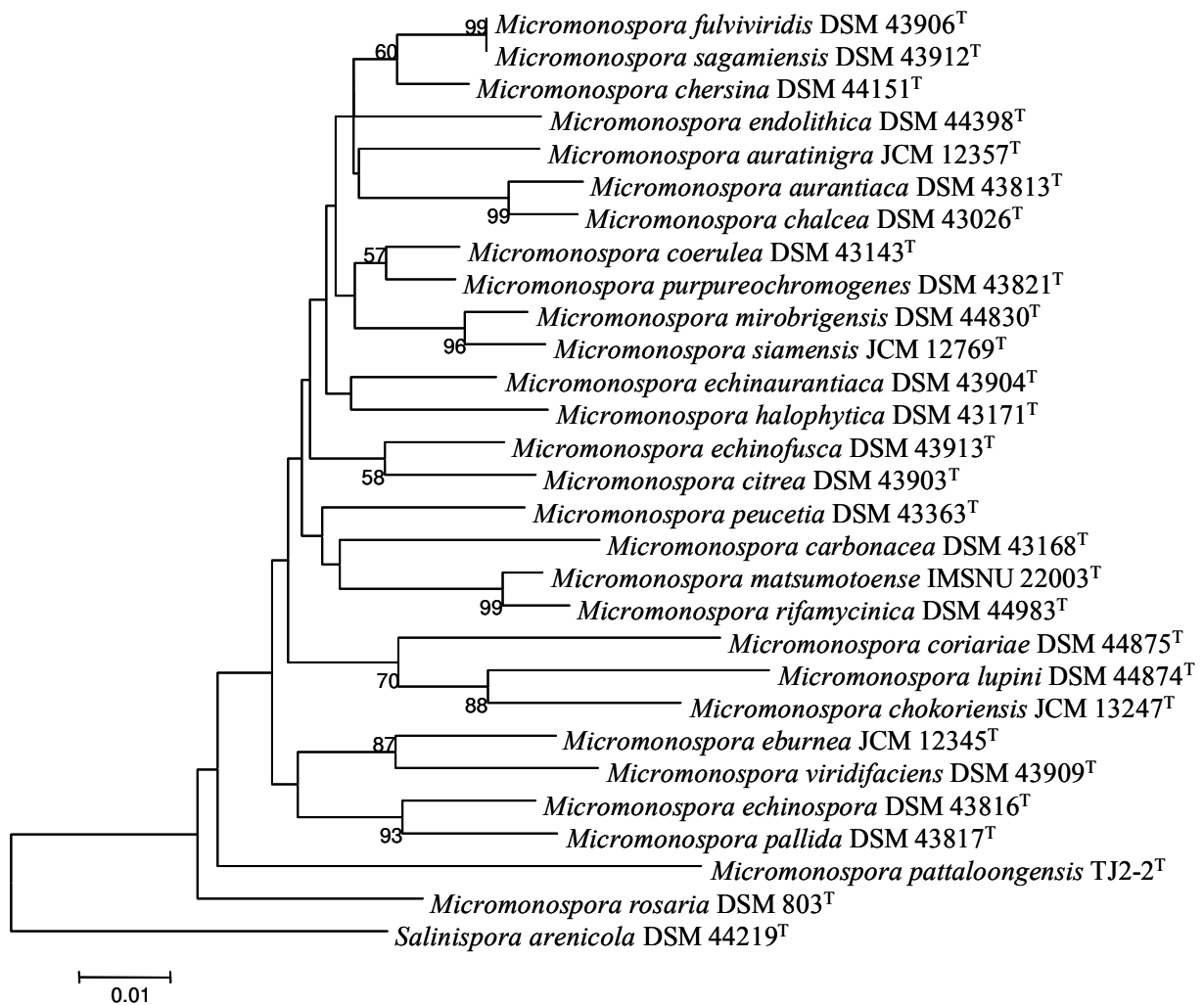


Fig. 44. Árbol filogenético derivado de las secuencias del gen *recA* mostrando la relación entre 33 cepas tipo del género *Micromonospora* mediante el método del vecino más cercano y el parámetro de Kimura 2-p.

Al analizar la capacidad resolutoria del gen *recA* para las cepas tipo estudiadas, se observa que no es capaz de separar las cepas *M. fulviviridis* DSM 43906<sup>T</sup> y *M. sagamiensis* DSM 43912<sup>T</sup>, aunque sí consigue mostrar diferencias para todas las demás especies. En algunos casos presenta mayor diferenciación que el gen ribosómico 16S, como entre las especies *M. lupini* y *M. chokoriensis*, pero en otros esta diferenciación es menor, como las cepas *M. rifamycinica* DSM 44983<sup>T</sup> y *M. matsumotoense* IMSNU 22003<sup>T</sup>.

En la correspondiente tabla del anexo II, podemos observar que los valores entre las cepas tipo varían desde un 90,43% entre las cepas *M. rifamycinica* DSM 44983<sup>T</sup> y *M. pattaloongenesis* TJ2-2<sup>T</sup>, a un 99,81% entre las cepas *M. sagamiensis* DSM 43912<sup>T</sup> y *M. fulviviridis* DSM 43906<sup>T</sup>. Al igual que se hizo para el estudio del gen *gyrB*, se podría decir, en principio, que cepas que presenten entre sí valores inferiores a un 99,81% de similitud en el gen *recA* podrían ser especies diferentes, aunque probablemente este sea un valor muy alto que proceda de la incapacidad de este gen para distinguir estas dos especies. Pudiendo ser que el análisis de este fragmento del gen *recA* no consiga diferenciar entre algunas cepas que pertenezcan a diferentes especies para el género *Micromonospora*.

A continuación, se realizó el análisis de las cepas de estudio junto a las cepas tipo del género, resultando el árbol filogenético que se ofrece en la figura 45. En él podemos ver un primer clado que muestra 16 cepas relacionadas con *M. lupini* DSM 44874<sup>T</sup>, con la que presentan porcentajes de similitud que varían entre un 95,16 y un 97,02%. Dentro del mismo podemos distinguir diferentes grupos, el primero de ellos contiene cinco cepas (GUI 3, GUI 8, GUI 43, SG 8 y SR 1) que presentan entre ellas valores de similitud superiores a 99,64%. Otro grupo está formado por tres cepas (GUI 2, GUI 42 y CR 21), presentando entre ellas porcentajes de similitud superiores a 99,64%. El siguiente grupo lo forman las cepas GUI 14, GUI 23 y GUI 40, que presentan entre sí valores superiores a un 99,27%. El resto de las cepas forman ramas individuales.

Las cepas GUI 19, GUI 27, GUI 61, CR 30, CR 36 y CR 39 presentan una mayor relación con la cepa *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup> y aparecen en el árbol agrupadas en un mismo clado aunque divididas en dos ramas bien diferenciadas. La primera de ellas incluye las cepas GUI 19, GUI 61 y CR 39 presentando entre ellas un valor de similitud del 100%, y en la segunda se muestran las cepas CR 30 y CR 36 por un lado, con una similitud entre ellas del 100%, y por otro la cepa GUI 27 más relacionada con la cepa tipo (99,45%).

Las siguientes cuatro cepas aparecen en ramas individuales que no se relacionan con ninguna cepa tipo descrita, la cepa SG 15, las cepas GUI 13 y SGA 9 que presentan entre ellas un 98,51% de similitud, y la cepa SGA 21.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

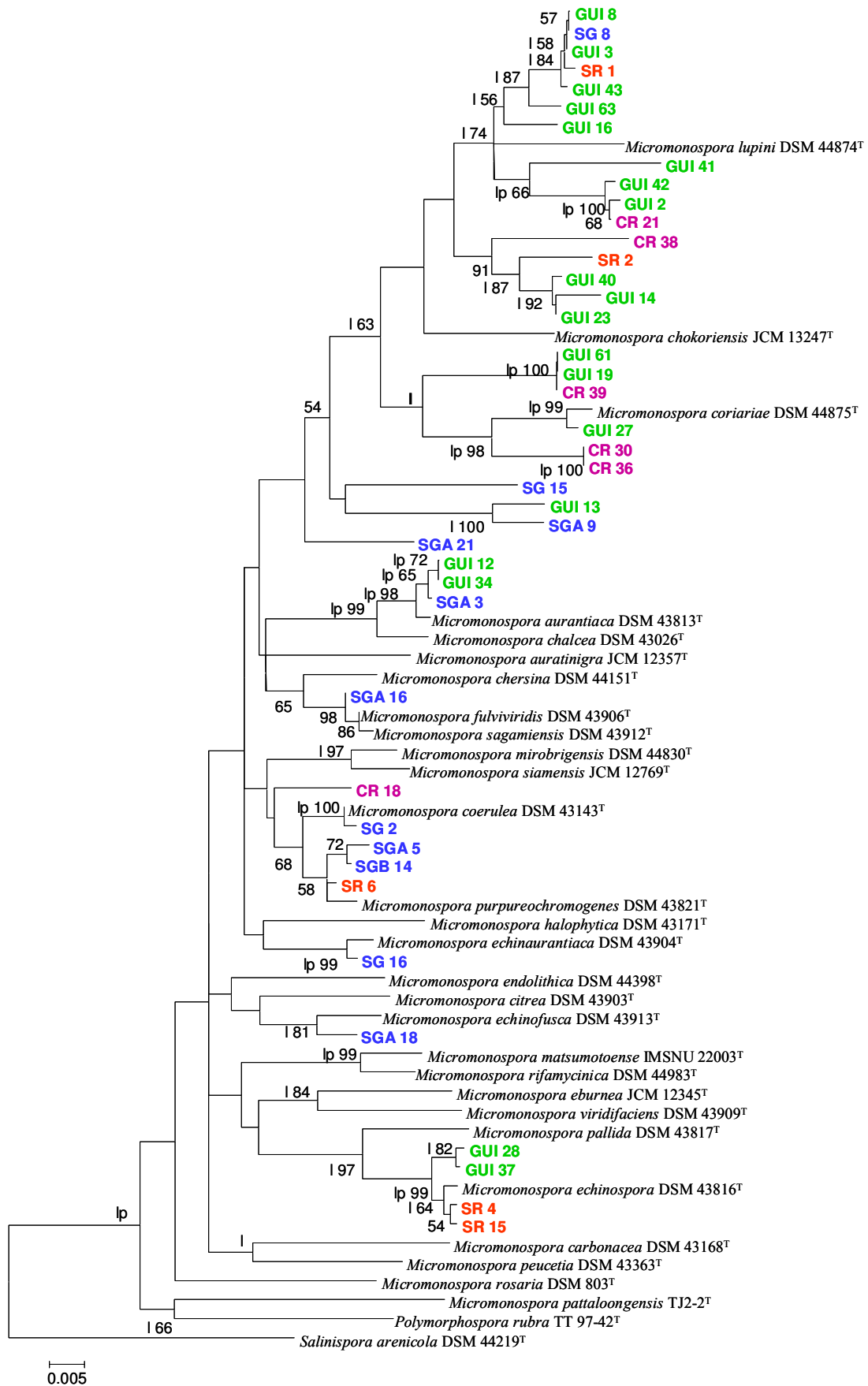


Fig.45. Árbol filogenético derivado del estudio del gen *recA* mostrando la relación entre las cepas identificadas como *Micromonospora* y 33 cepas tipo de este género mediante el método del vecino más cercano y el parámetro de Kimura 2-p. Cañizal (GUI: nódulos, CR: rizosfera), Salamanca (SG: nódulos, SR: rizosfera). Nodos conservados: p: máxima parsimonia, l: máxima verosimilitud y lp: ambos.

El grupo siguiente lo forman las cepas GUI 12, GUI 34 y SGA 3 que se muestran cercanas a la cepa *M. aurantiaca* DSM 43813<sup>T</sup>, presentando entre ellas valores superiores a 99,81% y con respecto a la cepa tipo valores entre un 99,44 y un 99,64%.

La cepa SGA 16 aparece relacionada a *M. fulviviridis* DSM 43906<sup>T</sup>, presentando una similitud de 99,81%, mientras que la cepa CR 18 se ubica en una rama independiente. La cepa SG 2 aparece junto a *M. coerulea* DSM 43143<sup>T</sup> (99,82%).

SGA 5, SGB 14 y SR 6 aparecen próximas a *M. purpureochromogenes* DSM 43821<sup>T</sup>, con la que presentan porcentajes de similitud por encima del 99,03%. Esta última agrupación es más similar a la que ocurre en el gen *gyrB* que a la que se muestra para el gen ribosómico 16S.

La cepa SG 16 se muestra próxima a *M. echinaurantiaca* DSM 43804<sup>T</sup> (99,47%) y la cepa SGA 18 aparece junto a *M. echinofusca* DSM 43913<sup>T</sup> (98,52%).

El grupo formado por las cepas GUI 28, GUI 37, SR 4 y SR 15 aparece exactamente igual que en los genes estudiados anteriormente, próximo a *M. echinospora* DSM 43816<sup>T</sup>, presentando unos valores de similitud entre ellas superiores a 99,23% y con la cepa tipo entre 98,84 y 99,62%.

En general, no se presentan muchos cambios en la topología del árbol obtenido para el gen *recA* con respecto a los que se presentaban en el gen ribosómico 16S, sólo algunas cepas han cambiado su posición respecto de las cepas tipo, como la GUI 40, la SGA 5, la SGB 14 o la SR 6. Respecto al gen *gyrB* aparecen algunos cambios más, aunque también se conserva la estructura general, cambian su posición algunas cepas inestables como son las cepas GUI 40, SGA 9 y SGA 21, y también se produce un cambio en las cepas similares a *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup>, ya que en el gen *gyrB* aparecen divididas en dos grupos alejados, y en el gen *recA*, al igual que en el 16S, se mantienen agrupadas las dos ramas. La estabilidad del árbol es la más baja de todos los genes estudiados, según el número de nodos conservados al analizar con los métodos de máxima parsimonia (p) y máxima verosimilitud (l).

La capacidad de distinguir entre especies diferentes es menor en este gen que lo que se podía observar para el gen *gyrB*, ya que con el gen *recA* las cepas *M. fulviviridis* DSM 43906<sup>T</sup> y *M. sagamiensis* DSM 43912<sup>T</sup> no se diferencian, mientras que con el gen *gyrB* aparecen en ramas bastante alejadas entre sí.

Una vez analizado el gen *recA* se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- El 48,8% de las cepas de estudio poseían una similitud mayor con las cepas *M. lupini* DSM 44874<sup>T</sup> y *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup>, ambas aisladas de nódulos. Puntualizar que la cepa *M. saelicesensis* DSM 44871<sup>T</sup> no pudo ser amplificada, por lo que no se pudo comparar con ella. El resto de las cepas quedaron repartidas a lo largo de todo el árbol filogenético.
- No en todas las cepas del género *Micromonospora* es posible la amplificación del gen *recA*, al menos mediante el uso de los oligonucleótidos empleados en este trabajo.
- El gen *recA* no muestra diferencias entre dos cepas tipo ya descritas, *M. fulviviridis* DSM 43906<sup>T</sup> y *M. sagamiensis* DSM 43912<sup>T</sup>, mostrando entre ellas un porcentaje de similitud del 99,81% por lo que su capacidad resolutive es baja, inferior a la presentada por los genes ARNr 16S y *gyrB*.
- Si tomáramos ese valor de 99,81% como punto de corte, el 97,7% de las cepas de estudio estarían por debajo del mismo.
- No se observó una relación directa de las especies de *Micromonospora* obtenidas en relación a las diferentes zonas de muestreo o nicho ecológico ocupado en base al gen *recA*.

#### 4.4.5. Secuenciación del gen *rpoB*

El gen *rpoB* codifica para la subunidad B de la ARN polimerasa, un complejo enzimático que aparece tanto en bacterias como en arqueas (Mollet *et al.*, 1998). Su amplia distribución y la presencia de una sola copia en el genoma le hace un buen candidato para su utilización en la identificación de microorganismos (Kim *et al.*, 1999; Adekambi *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005). El gen se compone de aproximadamente 4.000 pb, sin embargo los oligonucleótidos se diseñaron en dos zonas conservadas que flanqueaban la zona más variable del gen *rpoB*, de 764 pb, que se corresponde con la quinta región variable de las cinco existentes en el gen y se ha observado que los porcentajes de similitud obtenidos a partir de esta región se corresponden perfectamente con los obtenidos a partir de la secuencia completa del gen *rpoB* en los géneros estudiados (Adékambi *et al.*, 2003). El diseño de los oligonucleótidos se hizo adaptando los descritos por Adékambi *et al.*,(2003) para el género *Mycobacterium* según se indica en el correspondiente apartado de materiales y métodos.

El estudio del gen *rpoB* para establecer relaciones filogenéticas se ha usado con anterioridad en los géneros: *Pseudomonas* (Marchand *et al.*, 2009), *Bradyrhizobium* (Rivas *et al.*, 2009) y también en actinobacterias como *Coxiella* (Mollet *et al.*, 1998), *Mycobacterium* (Kim *et al.*, 1999; Adekambi *et al.*, 2003) y *Streptomyces* (Kim *et al.*, 2004), entre otras. Sin embargo, no hay estudios previos a éste, al igual que ocurría con el gen *recA*, en los que se haya estudiado el gen *rpoB* del género *Micromonospora*.

En este trabajo se amplificaron 77 secuencias, 33 de ellas pertenecientes a secuencias de cepas tipo, una perteneciente a la cepa *Polymorphospora rubra* TT 97-42<sup>T</sup>, 20 pertenecientes a cepas obtenidas de los nódulos de Cañizal, 6 de cepas obtenidas de la rizosfera de Cañizal, 12 de cepas obtenidas de los nódulos de Salamanca y 5 de cepas obtenidas de la rizosfera de Salamanca. Las secuencias amplificadas fueron de aproximadamente 630 pb para todas las cepas.

Todas las secuencias presentaron la mayor similitud con el gen *rpoB* de cepas del género *Salinispora*, próximo a *Micromonospora* cuando fueron introducidas en las bases de datos públicas.

En la tabla 26 se muestran los porcentajes de similitud más altos para cada una de las cepas de estudio con respecto a las cepas tipo del género *Micromonospora* obtenidas en este trabajo. Más similares a *M. saelicesensis* DSM 44879<sup>T</sup> aparecen 15 cepas con porcentajes entre un 97,92 a un 98,88%. La siguiente cepa tipo que presenta un mayor número de cepas similares es *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup>, con 10 cepas que varían en sus porcentajes entre un 92,60 y un 99,68%. Cuatro cepas presentan una mayor similitud con *M. sagamiensis* DSM 43912<sup>T</sup> (97,57 y 98,5%). Más similares a *M. aurantiaca* DSM 43813<sup>T</sup> aparecen tres cepas (99,5%). Existen varias cepas tipo con las que dos de las cepas de estudio presentan una mayor similitud, entre ellas *M. fulviviridis* DSM 43906<sup>T</sup> (98,38 - 98,83%), *M. coerulea* DSM 43143<sup>T</sup> (96,78 - 99,36%), *M. echinaurantiaca* DSM 43804<sup>T</sup> (96,12 - 99,68%) y *M. inositola* DSM 43819<sup>T</sup> (96,99 - 97,56%). Tan sólo una cepa apareció más próxima a *M. lupini* DSM 44874<sup>T</sup> (97,65%), a *M. echinofusca* DSM 43913<sup>T</sup> (98,23%) y a *M. purpureochromogenes* DSM 43821<sup>T</sup> (98,55%).

Los porcentajes de similitud máximos obtenidos para las cepas aisladas en este estudio varían desde un 92,60 en el caso de la cepa GUI 15 con *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup> a un 100 % en el caso de la cepa GUI 40 con *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup>. Este último es un resultado a destacar, ya que posee un 100% de similitud respecto a este gen, mientras que en los otros genes analizados con anterioridad (16S, *gyrB*, *recA*) presentaba valores de similitud con las cepas tipo bastante bajos, y ni siquiera los valores más altos de la cepa GUI 40 correspondían con esta cepa tipo. Otro dato importante en esta tabla es que aquellas cepas que presentaban una alta similitud con *M. echinospora* DSM 43816<sup>T</sup> ahora la presentan con *M. sagamiensis* DSM 43912<sup>T</sup>.

Tabla 26. Similitud de las secuencias del gen *rpoB* de las cepas de este estudio comparadas con 33 cepas tipo del género *Micromonospora*.

CEPA	CEPA TIPO MÁS PRÓXIMA	% SIMILITUD	Diff/Total nt
<b>GUI 2</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	97,95	13/634
<b>GUI 3</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	98,66	8/596
<b>GUI 8</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	98,69	8/609
<b>GUI 12</b>	<i>Micromonospora aurantiaca</i> DSM 43813 <sup>T</sup>	99,52	3/619
<b>GUI 13</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	96,96	19/626
<b>GUI 14</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	97,93	13/629
<b>GUI 16</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	98,25	11/629
<b>GUI 15</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	92,60	47/635
<b>GUI 19</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	99,68	2/626
<b>GUI 23</b>	<i>Micromonospora lupini</i> Lupac 14N <sup>T</sup>	97,65	15/639
<b>GUI 27</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	99,67	2/608
<b>GUI 28</b>	<i>Micromonospora sagamiensis</i> DSM 43912 <sup>T</sup>	98,5	9/601
<b>GUI 34</b>	<i>Micromonospora aurantiaca</i> DSM 43813 <sup>T</sup>	99,52	3/625
<b>GUI 37</b>	<i>Micromonospora sagamiensis</i> DSM 43912 <sup>T</sup>	98,39	10/621
<b>GUI 40</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	100	0/633
<b>GUI 41</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	97,94	13/630
<b>GUI 42</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	97,92	13/625
<b>GUI 43</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	98,42	10/632
<b>GUI 61</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	99,68	2/624
<b>GUI 63</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	98,56	9/625
<b>CR 18</b>	<i>Micromonospora fulviviridis</i> DSM 43906 <sup>T</sup>	98,38	10/619
<b>CR 21</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	98,06	12/619
<b>CR 30</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	98,55	9/622
<b>CR 36</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	98,63	8/582
<b>CR 38</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	98,11	12/634
<b>CR 39</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	99,66	2/583
<b>SG 2</b>	<i>Micromonospora coerulea</i> DSM 43143 <sup>T</sup>	99,36	4/621
<b>SG 8</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	98,84	7/603
<b>SG 10</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	98,39	10/621
<b>SG 15</b>	<i>Micromonospora echinaurantiaca</i> DSM 43804 <sup>T</sup>	96,12	24/618
<b>SG 16</b>	<i>Micromonospora echinaurantiaca</i> DSM 43804 <sup>T</sup>	99,68	2/623
<b>SGA 3</b>	<i>Micromonospora aurantiaca</i> DSM 43813 <sup>T</sup>	99,5	3/602
<b>SGA 5</b>	<i>Micromonospora inositola</i> DSM 43819 <sup>T</sup>	96,99	19/631
<b>SGA 9</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	96,79	20/623
<b>SGA 16</b>	<i>Micromonospora fulviviridis</i> DSM 43906 <sup>T</sup>	98,83	7/600
<b>SGA 18</b>	<i>Micromonospora echinofusca</i> DSM43913 <sup>T</sup>	98,23	11/621
<b>SGA 21</b>	<i>Micromonospora inositola</i> DSM 43819 <sup>T</sup>	97,56	15/616
<b>SGB 14</b>	<i>Micromonospora coerulea</i> DSM 43143 <sup>T</sup>	96,78	20/621
<b>SR 1</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	98,87	7/621
<b>SR 2</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	98,71	8/619
<b>SR 4</b>	<i>Micromonospora sagamiensis</i> DSM 43912 <sup>T</sup>	97,57	15/617
<b>SR 6</b>	<i>Micromonospora purpureochromogenes</i> DSM 43821 <sup>T</sup>	98,55	9/622
<b>SR 15</b>	<i>Micromonospora sagamiensis</i> DSM 43912 <sup>T</sup>	97,58	15/620

A partir de las secuencias se elaboró un análisis filogenético en el que se incluyeron todas las cepas tipo de *Micromonospora* analizadas en este estudio. Utilizando el método del vecino más cercano y el parámetro de Kimura 2-p se obtuvo el árbol que se presenta en la figura 46. Aquí se puede observar que, al igual que ocurría con el gen *gyrB*, se consiguió la separación y diferenciación de todas las cepas tipo estudiadas, sin embargo, en este caso la longitud de las ramas y por tanto, la capacidad resolutoria del gen, es inferior a la que se obtenía con el gen *gyrB*, ya que con este gen se conseguía una mayor diferenciación entre las cepas tipo.

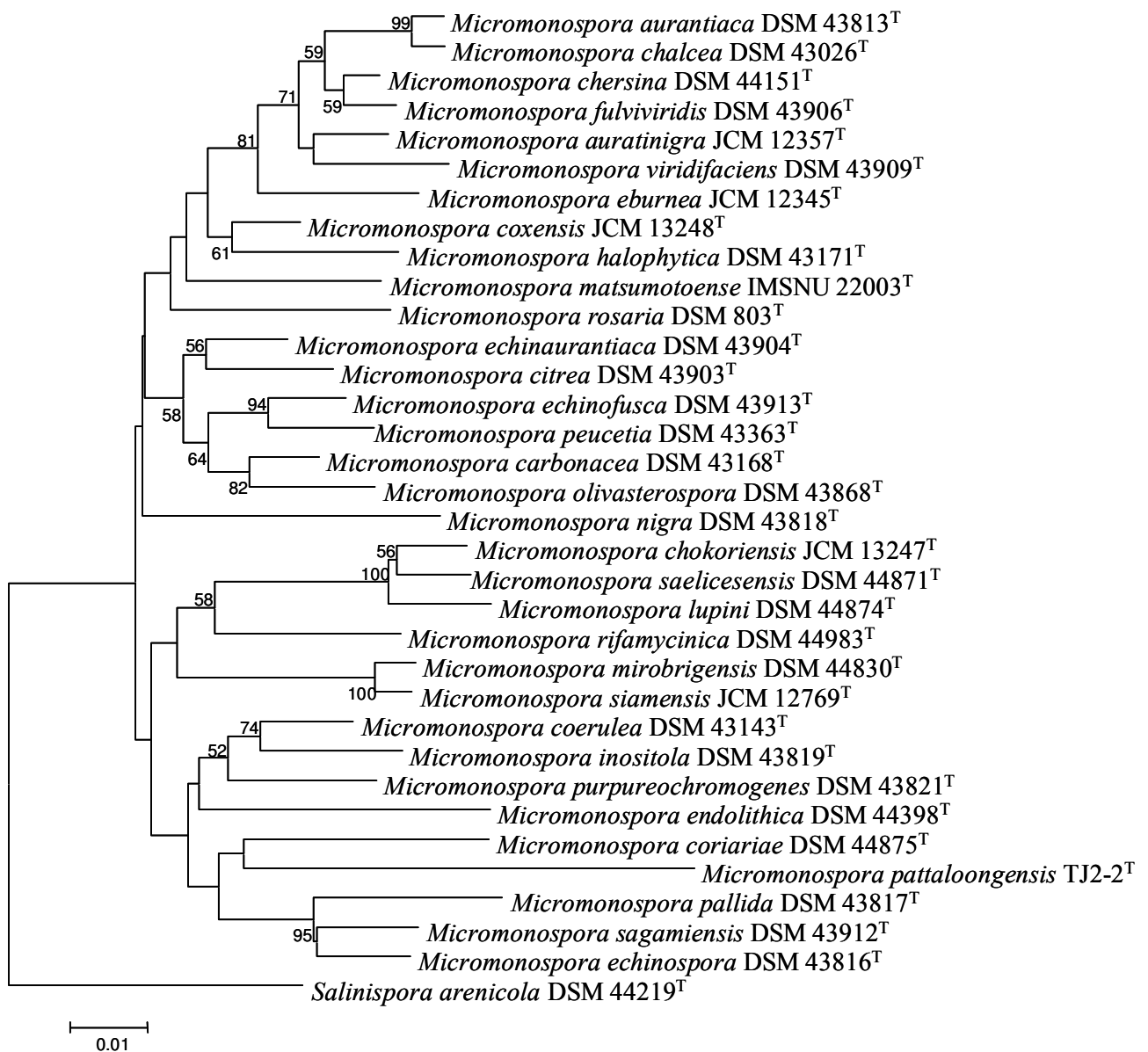


Fig. 46. Árbol filogenético derivado de las secuencias del gen *rpoB* mostrando la relación entre 33 cepas tipo del género *Micromonospora* mediante el método del vecino más cercano y el parámetro de Kimura 2-p.

Los valores de similitud entre las cepas de estudio y las cepas tipo analizadas se presentan en el anexo II y varían desde un 88,44% a un 100%, mientras que los valores de las cepas tipo estudiadas para este gen van desde un 88,44% entre *M. chalcea* DSM 43026<sup>T</sup> y *M. pattaloongensis* TJ2-2<sup>T</sup> a un 99,04% entre *M. mirobrigensis* DSM 44830<sup>T</sup> y *M. siamensis* JCM 12769<sup>T</sup>, por lo que en principio se podría tomar el valor de 99% como límite en el que dos cepas podrían pertenecer a especies distintas.

A continuación se realizó un análisis filogenético en el que se incluyeron las cepas aisladas en este estudio además de 33 cepas tipo del género *Micromonospora*. En este caso también se aplicó el método del vecino más cercano y la representación en forma de árbol se puede observar en la figura 47. El primer grupo que aparece es el formado por tres cepas aisladas de nódulos, dos de Cañizal y una de Salamanca, que aparecen cercanas a *M. aurantiaca* DSM 43813<sup>T</sup>, con la que presentan unos valores de similitud superiores a un 99,50%.

El siguiente grupo lo forman dos aislados, CR 18, de la rizosfera de Cañizal, y SGA 16, de nódulos de Salamanca, y aparecen próximos a la cepa tipo *M. fulviviridis* DSM 43906<sup>T</sup> (98,38 – 98,83%). La cepa SG 15 aparece en una rama independiente más cercana a *M. nigra* DSM 43818<sup>T</sup> (94,50%). Próxima a *M. echinaurantiaca* DSM 43904<sup>T</sup> aparece la cepa SG 16 (99,68%) y la cepa SGA 18 junto a *M. peucetia* DSM 43363<sup>T</sup> (97,91%).

El siguiente clado es el que presenta un mayor número de cepas aisladas en este estudio (16) y la mayoría presentan su máxima similitud con *M. saelicesensis* DSM 44871<sup>T</sup>. Dentro de esta rama se pueden diferenciar varios grupos, el primero de ellas queda formado por cuatro cepas (GUI 2, GUI 41, GUI 42 y CR 21), que entre ellos presentan porcentajes de similitud superiores a un 98,44%, y con la cepa tipo valores entre 97,92 - 98,06%. El segundo grupo es el formado por las cepas GUI 63 y CR 38 (98,11 - 98,56%). El siguiente lo forman las cepas GUI 14 y GUI 23, con un porcentaje de similitud de 99,37% entre ellas y entre 97,61 - 97,93% con la cepa tipo. En otro grupo aparecen las cepas SG 10, GUI 16 y SR 2 (98,25 - 98,71%). El último grupo lo componen cinco cepas muy próximas entre sí (GUI 3, GUI 8, GUI 43, SG 8 y SR 1) cuyos valores de similitud son superiores a un 99,67% y con *M. saelicesensis* DSM 44871<sup>T</sup> varían de 98,42 - 98,87%.



Otro clado muestra una mayor relación filogenética con la cepa tipo *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup>, con ella aparecen 7 cepas, las más cercanas GUI 19, GUI 27, GUI 40, GUI 61 y CR 39, y todas ellas presentan respecto a la cepa tipo valores superiores a 99,66%. Las otras dos cepas, CR 30 y CR 36 presentan entre sí un 100% de similitud y con la cepa tipo presentan porcentajes de similitud inferiores a 98,65%. Otras dos cepas que aparecen próximas pero formando una rama independiente son GUI 13 y SGA 9 que comparten un 98,86% de similitud.

Las cepas SGA 5 y SGB 14 también se presentan en una rama independiente y comparten una similitud de 99,36%. La cepa SGA 21 aparece relativamente próxima a *M. inositol* DSM 43819<sup>T</sup> (97,56%). SG 2 y *M. coerulea* DSM 43143<sup>T</sup> comparten un 99,36% de similitud, y muy probablemente pertenezcan a la misma especie. Por otro lado las cepas SR 6 y *M. purpureochromogenes* DSM 43821<sup>T</sup> muestran un 98,55% de similitud entre ellas.

El último grupo es el que incluye las cepas GUI 28, GUI 37, SR 4 y SR 15, entre las dos primeras poseen un valor de similitud del 100% y entre las dos últimas también, pero entre los dos grupos la similitud es de 97,77 - 98%. Ambos grupos presentan con la cepa tipo que aparece más próxima, *M. sagamiensis* DSM 43912<sup>T</sup>, valores de similitud entre un 97,57 y un 98,50%. La cepa GUI 15 se ubica en una rama completamente independiente.

Se conserva a nivel general la estructura vista hasta ahora para los demás genes. Sin embargo, al profundizar algo más en su análisis podemos ver diferencias destacables, como es el caso de la cepa GUI 15, que en este caso forma una rama separada e independiente del grupo con el que suele aparecer, *M. pattaloongensis* TJ2-2<sup>T</sup> y *P. rubra* DSM 44947<sup>T</sup>, que aparecen también en una rama independiente del árbol. La cepa GUI 40 aparece también de un modo diferente a su representación en el gen ribosómico 16S y en el *recA*, pero similar a su posición en el gen *gyrB*, incluyéndose en el grupo de *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup>, junto a las otras seis cepas que suelen aparecer en este grupo. SGA 5, SGA 21 y SGB 14 aparecen junto a *M. inositol* DSM 43819<sup>T</sup>, relación que no habían mostrado hasta ahora, y algo más lejos de otra de las cepas

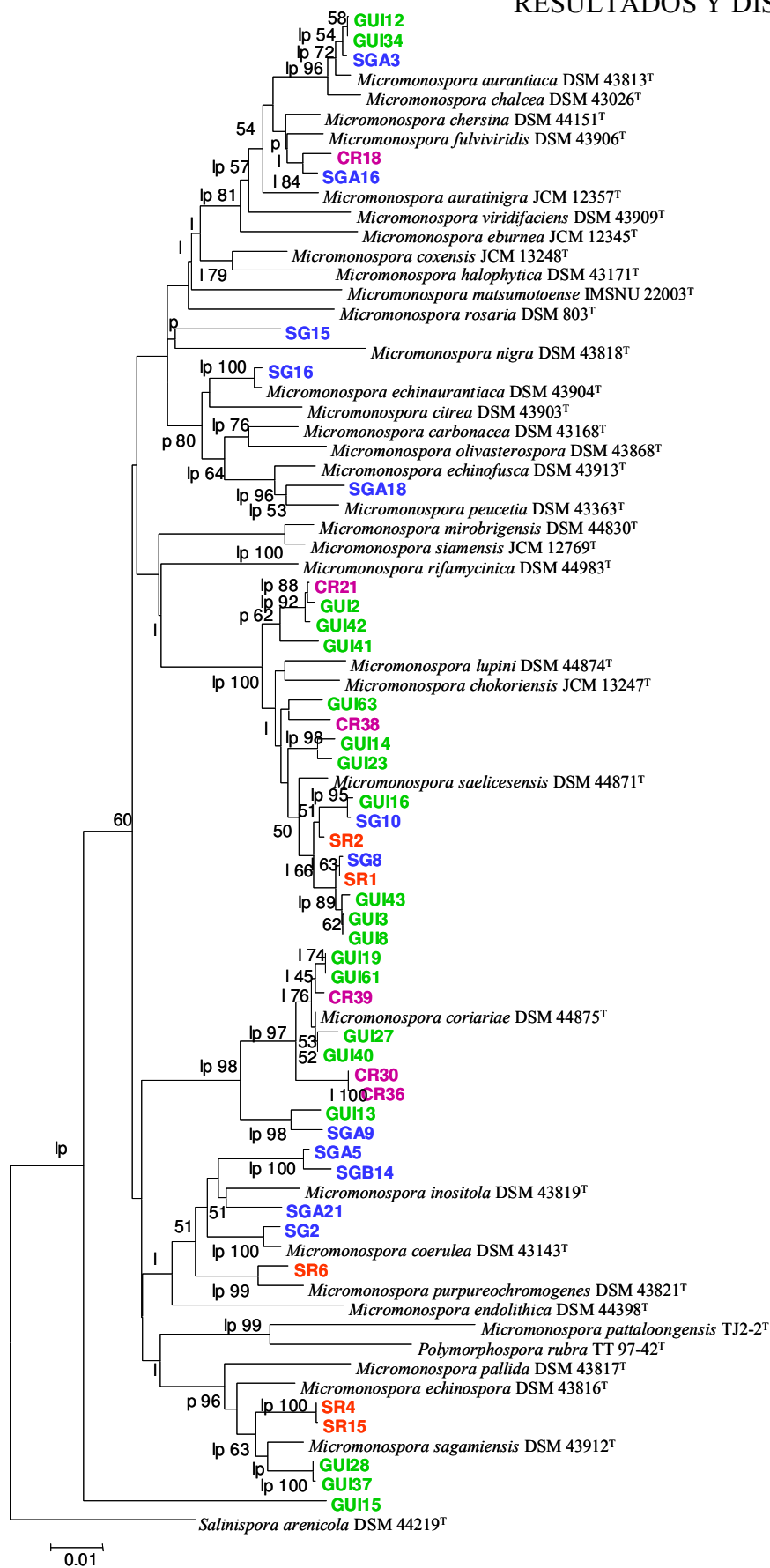


Fig. 47. Árbol filogenético derivado del estudio del gen *rpoB* mostrando la relación entre las cepas identificadas como *Micromonospora* y las cepas tipo de éste género mediante el método del vecino más cercano y el parámetro de Kimura 2-p. Cañizal (GUI: nódulos, CR: rizosfera), Salamanca (SG: nódulos, SR: rizosfera). Nodos conservados: p: máxima parsimonia, l: máxima verosimilitud y lp: ambos.

relacionadas con ellas, que es SR 6, la cual sigue apareciendo junto a *M. purpureochromogenes* DSM 43821<sup>T</sup>, como ocurría en los dos últimos genes estudiados (*gyrB* y *recA*). En este caso el grupo de cepas que aparecen junto a *M. saelicesensis* DSM 44879<sup>T</sup> se conserva con una estructura muy similar a los casos anteriores, aunque esta vez, se incluyen en el mismo clado otras dos cepas tipo muy relacionadas, *M. lupini* DSM 44874<sup>T</sup> y *M. chokoriensis* JCM 13247<sup>T</sup>. Uno de los grupos más conservados en todos los genes, y que para este no es una excepción es el formado por las cepas SGA 3, GUI 12 y GUI 34, con la cepa tipo *M. aurantiaca* DSM 43813<sup>T</sup>. Sin embargo, la cepa SG 16, que normalmente presenta bajos porcentajes de similitud, en este caso presenta un 99,68% con *M. echinaurantiaca* DSM 43804<sup>T</sup>.

La estabilidad del árbol filogenético del gen *rpoB* con respecto a los otros métodos analizados (máxima parsimonia -p- y máxima verosimilitud -l-) es bastante más elevada, manteniéndose estables un mayor número de nodos que para los otros genes estudiados.

Tras el análisis del gen *rpoB* se podrían extraer una serie de resultados:

- El 60% de las cepas de estudio presentan un mayor porcentaje de similitud con las cepas tipo *M. saelicesensis* DSM 44871<sup>T</sup>, *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup> y *M. lupini* DSM 44874<sup>T</sup>, que fueron aisladas de nódulos. El resto de los aislados eran muy diversos, distribuyéndose a lo largo de todo el árbol.
- El gen *rpoB* es capaz de separar todas las cepas tipo estudiadas, siendo más resolutivo que el gen ribosómico 16S y el gen *recA*, aunque no tanto como el gen *gyrB*.
- El 76,7% de las cepas de estudio presenta un porcentaje más alto de similitud inferior a 90,04%, valor de similitud que presentan entre sí las cepas tipo *M. mirobrigensis* DSM 44830<sup>T</sup> y *M. siamensis* JCM 12769<sup>T</sup>.
- El gen *rpoB* presenta una alta estabilidad en su conformación, siendo esta la más alta de todos los genes estudiados.
- Las similitudes de las cepas de estudio no muestran una afinidad en función de la zona de muestreo o del nicho ocupado según el gen *rpoB*.
- La cepa GUI 15 se muestra alejada de su grupo habitual, pero éste, incluida la cepa *P. rubra* TT 97-42<sup>T</sup>, se muestra perfectamente integrado en el árbol filogenético.

#### 4.4.6. Secuenciación del gen *atpD*

El operón *atp* está formado en muchas bacterias por ocho genes (*atpB*, *atpE*, *atpF*, *atpH*, *atpA*, *atpG*, *atpD* y *atpC*) que codifican para ocho subunidades proteicas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$  y  $\theta$ ). Estos genes están considerados como genes esenciales para el mantenimiento de la célula. Dentro de éstos, el gen que codifica para la subunidad  $\beta$  de la atp-sintetasa de membrana, esencial en la producción de energía, se considera un buen marcador molecular en estudios filogenéticos por su ubicuidad, su constancia en la funcionalidad y por ser un gen conservado (Ventura *et al.*, 2004).

Este gen se ha utilizado previamente en estudios de filogenia, siendo su uso habitual en bacterias Gram negativas (Ramirez-Bahena *et al.*, 2008; Rivas *et al.*, 2009) y también se ha utilizado para bacterias Gram positivas (Ventura *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2008). Sin embargo, para el género *Micromonospora* no se ha empleado con anterioridad a este trabajo. Los oligonucleótidos para la amplificación se diseñaron en base a otras secuencias de géneros similares como se describe en el apartado de materiales y métodos obteniendo secuencias de aproximadamente 900 pb.

Se analizó el gen *atpD* de 77 cepas, las mismas que se habían utilizado en los análisis de los demás genes que codifican para proteínas, consiguiendo una correcta amplificación de todas ellas con los oligonucleótidos diseñados.

Al introducir las secuencias en las bases de datos públicas, sólo se obtuvo con todas las cepas una alta similitud con el gen *atpD* de las cepas tipo del género *Salinispora*. Por ello, en la tabla 27 los valores que se muestran son los valores de similitud más elevados de las cepas aisladas con respecto a las cepas tipo analizadas en este trabajo. Estos valores varían entre un 97,32% existente entre la cepa GUI 63 y *M. lupini* DSM 44874<sup>T</sup> y un 100% que posee la cepa GUI 27 respecto a *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup>.

Tabla 27. Similitud de las secuencias del gen *atpD* de las cepas de este estudio comparadas con 33 cepas tipo del género *Micromonospora*.

CEPA	CEPA TIPO MÁS PRÓXIMA	% SIMILITUD	Diff/Total nt
<b>GUI 2</b>	<i>Micromonospora chokoriensis</i> JCM 13247 <sup>T</sup>	97,88	19/896
<b>GUI 3</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	99,33	6/896
<b>GUI 8</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	97,88	6/897
<b>GUI 12</b>	<i>Micromonospora chalcea</i> DSM 43026 <sup>T</sup>	97,88	19/896
<b>GUI 13</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	97,32	24/896
<b>GUI 14</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	97,54	22/896
<b>GUI 15</b>	<i>Micromonospora viridifaciens</i> DSM 43909 <sup>T</sup>	98,12	17/906
<b>GUI 16</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	98,1	17/896
<b>GUI 19</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	98,55	13/896
<b>GUI 23</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	97,88	19/896
<b>GUI 27</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	100	0/896
<b>GUI 28</b>	<i>Micromonospora pallida</i> DSM 43817 <sup>T</sup>	98,79	11/906
<b>GUI 34</b>	<i>Micromonospora chalcea</i> DSM 43026 <sup>T</sup>	97,99	18/896
<b>GUI 37</b>	<i>Micromonospora pallida</i> DSM 43817 <sup>T</sup>	99	9/896
<b>GUI 40</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	97,77	20/896
<b>GUI 41</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	97,43	23/896
<b>GUI 42</b>	<i>Micromonospora chokoriensis</i> JCM 13247 <sup>T</sup>	97,77	20/896
<b>GUI 43</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	99,44	5/896
<b>GUI 61</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	98,44	14/896
<b>GUI 63</b>	<i>Micromonospora lupini</i> Lupac 14N <sup>T</sup>	97,32	25/896
<b>CR 18</b>	<i>Micromonospora fulviviridis</i> DSM 43906 <sup>T</sup>	98,34	15/906
<b>CR 21</b>	<i>Micromonospora chokoriensis</i> JCM 13247 <sup>T</sup>	97,79	20/906
<b>CR 30</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	98,33	15/896
<b>CR 36</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	98,1	17/896
<b>CR 38</b>	<i>Micromonospora chokoriensis</i> JCM 13247 <sup>T</sup>	97,54	22/896
<b>CR 39</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	98,1	17/896
<b>SG 2</b>	<i>Micromonospora coerulea</i> DSM 43143 <sup>T</sup>	98,23	16/905
<b>SG 8</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	99,44	5/896
<b>SG 10</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	98,21	16/896
<b>SG 15</b>	<i>Micromonospora chokoriensis</i> JCM 13247 <sup>T</sup>	97,46	23/906
<b>SG 16</b>	<i>Micromonospora echinaurantiaca</i> DSM 43804 <sup>T</sup>	99,12	8/906
<b>SGA 3</b>	<i>Micromonospora chalcea</i> DSM 43026 <sup>T</sup>	97,88	19/896
<b>SGA 5</b>	<i>Micromonospora inositola</i> DSM 43819 <sup>T</sup>	98,12	17/906
<b>SGA 9</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	97,43	23/896
<b>SGA 16</b>	<i>Micromonospora fulviviridis</i> DSM 43906 <sup>T</sup>	98,57	13/906
<b>SGA 18</b>	<i>Micromonospora echinofusca</i> DSM43913 <sup>T</sup>	98,9	10/906
<b>SGA 21</b>	<i>Micromonospora coerulea</i> DSM 43143 <sup>T</sup>	97,9	19/905
<b>SGB 14</b>	<i>Micromonospora inositola</i> DSM 43819 <sup>T</sup>	97,35	24/906
<b>SR 1</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	99,22	7/896
<b>SR 2</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	98,44	21/896
<b>SR 4</b>	<i>Micromonospora pallida</i> DSM 43817 <sup>T</sup>	98,76	11/889
<b>SR 6</b>	<i>Micromonospora inositola</i> DSM 43819 <sup>T</sup>	97,46	23/906
<b>SR 15</b>	<i>Micromonospora pallida</i> DSM 43817 <sup>T</sup>	98,79	11/906

En este caso, se puede observar que once cepas presentan una mayor similitud con *M. saelicesensis* DSM 44871<sup>T</sup>, aunque este número es menor que para los otros genes estudiados. Con *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup> hay 9 cepas y similares a *M. chokoriensis* JCM 13247<sup>T</sup> hay 5 cepas. El resto de las cepas tipo que se muestran tienen entre una y cuatro cepas similares: *M. pallida* DSM 43817<sup>T</sup> (4 cepas), *M. chalcea* DSM 43026<sup>T</sup> (3 cepas), *M. inositola* DSM 43819<sup>T</sup> (3 cepas), *M. fulviviridis* DSM 43906<sup>T</sup> (2 cepas), *M. coerulea* DSM 43143<sup>T</sup> (2 cepas), *M. viridifaciens* DSM 43909<sup>T</sup> (1 cepa), *M. lupini* DSM 44874<sup>T</sup> (1 cepa), *M. echinaurantiaca* DSM 43804<sup>T</sup> (1 cepa) y *M. echinofusca* DSM 43913<sup>T</sup> (1 cepa).

Con las secuencias obtenidas para las cepas tipo se realizó un análisis filogenético utilizando el método del vecino más cercano y el parámetro de Kimura 2-p. Estos resultados se muestran en la figura 48. Aquí podemos ver que la mayoría de las cepas tipo consiguen diferenciarse. Sin embargo, la distribución de las cepas varía bastante en relación a la disposición que presentaban para los otros genes analizados. Además, tres de las cepas tipo no han podido ser diferenciadas entre sí, *M. eburnea* JCM 12345<sup>T</sup>, *M. echinospora* DSM 43816<sup>T</sup> y *M. coxensis* JCM 13248<sup>T</sup>, teniendo también en cuenta el hecho de que estas cepas no aparecen ni siquiera próximas en los otros genes analizados.

En el anexo II se muestran los porcentajes de similitud de todas las cepas analizadas para el gen *atpD* entre sí. Los valores variaron entre un 88,53% y un 100%. Para las cepas tipo los valores se encontraron entre un 88,53% entre las cepas *M. pattaloongensis* TJ2-2) y *M. rifamycinica* DSM 44983<sup>T</sup> y un 99,78% entre *M. eburnea* JCM 12345<sup>T</sup> y *M. coxensis* JCM 13248<sup>T</sup>. Este valor máximo que se presenta entre dos cepas tipo es demasiado alto, mayor incluso que el que obtenemos cuando analizamos con el gen ribosómico 16S, por lo que, a priori, no parece muy apropiado tomarlo como valor diferenciador entre dos cepas.

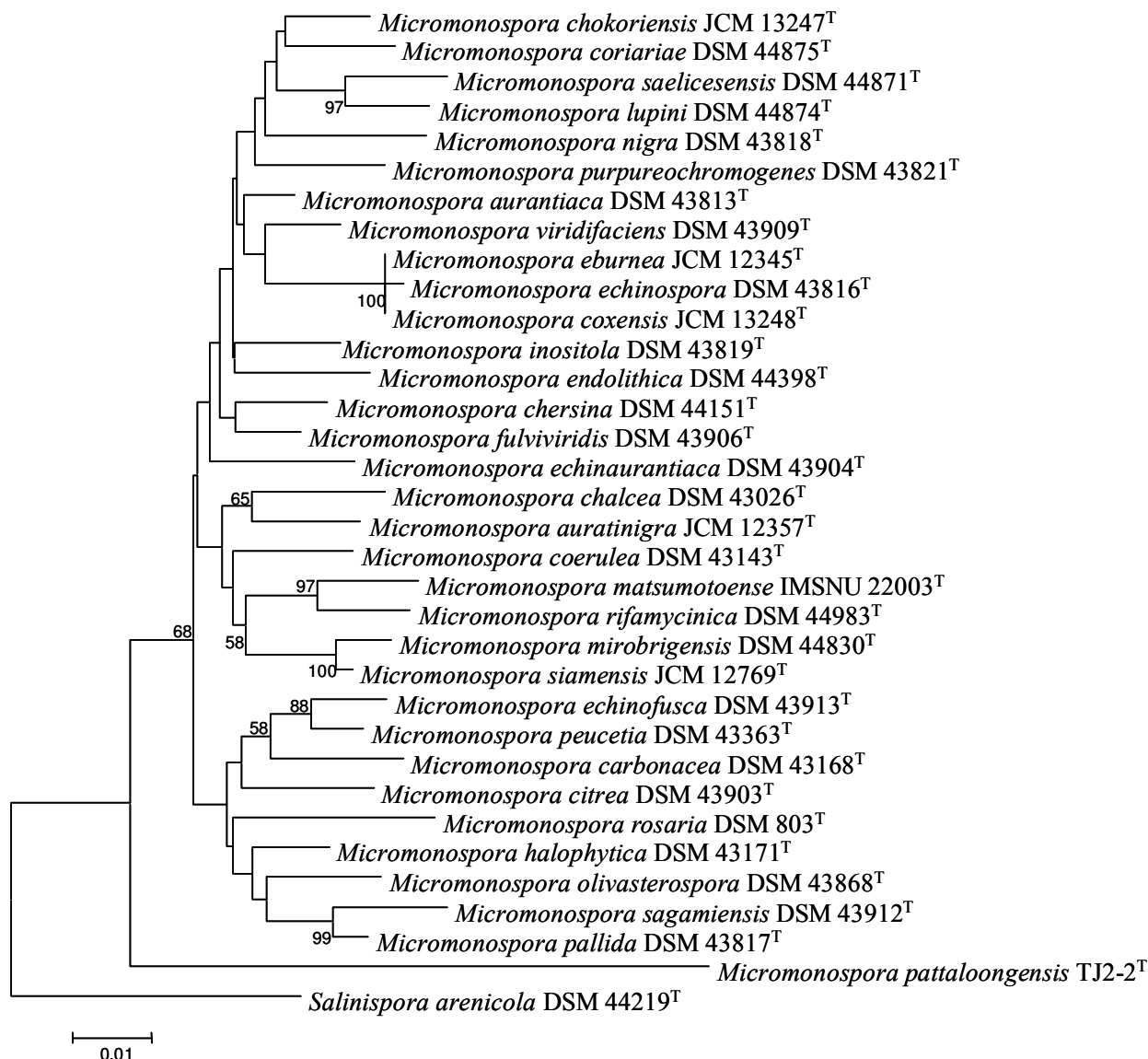


Fig. 48. Árbol filogenético derivado de las secuencias del gen *atpD* mostrando la relación entre 33 cepas tipo del género *Micromonospora* mediante el método del vecino más cercano y el parámetro de Kimura 2-p.

Posteriormente se elaboró un análisis filogenético que incluía además de las cepas tipo, las cepas aisladas en este trabajo. El árbol obtenido a través del método del vecino más cercano y el parámetro de Kimura 2-p se muestra en la figura 49. El primer clado aparece formado por las cepas relacionadas con *M. saelicesensis* DSM 44871<sup>T</sup>, que en este caso son 17. Un primer grupo formado por cinco cepas (GUI 3, GUI 8, GUI 43, SG 8 y SR 1) que presentan entre sí valores superiores al 99,67%, y con la cepa tipo valores entre 99,22 y 99,44%.

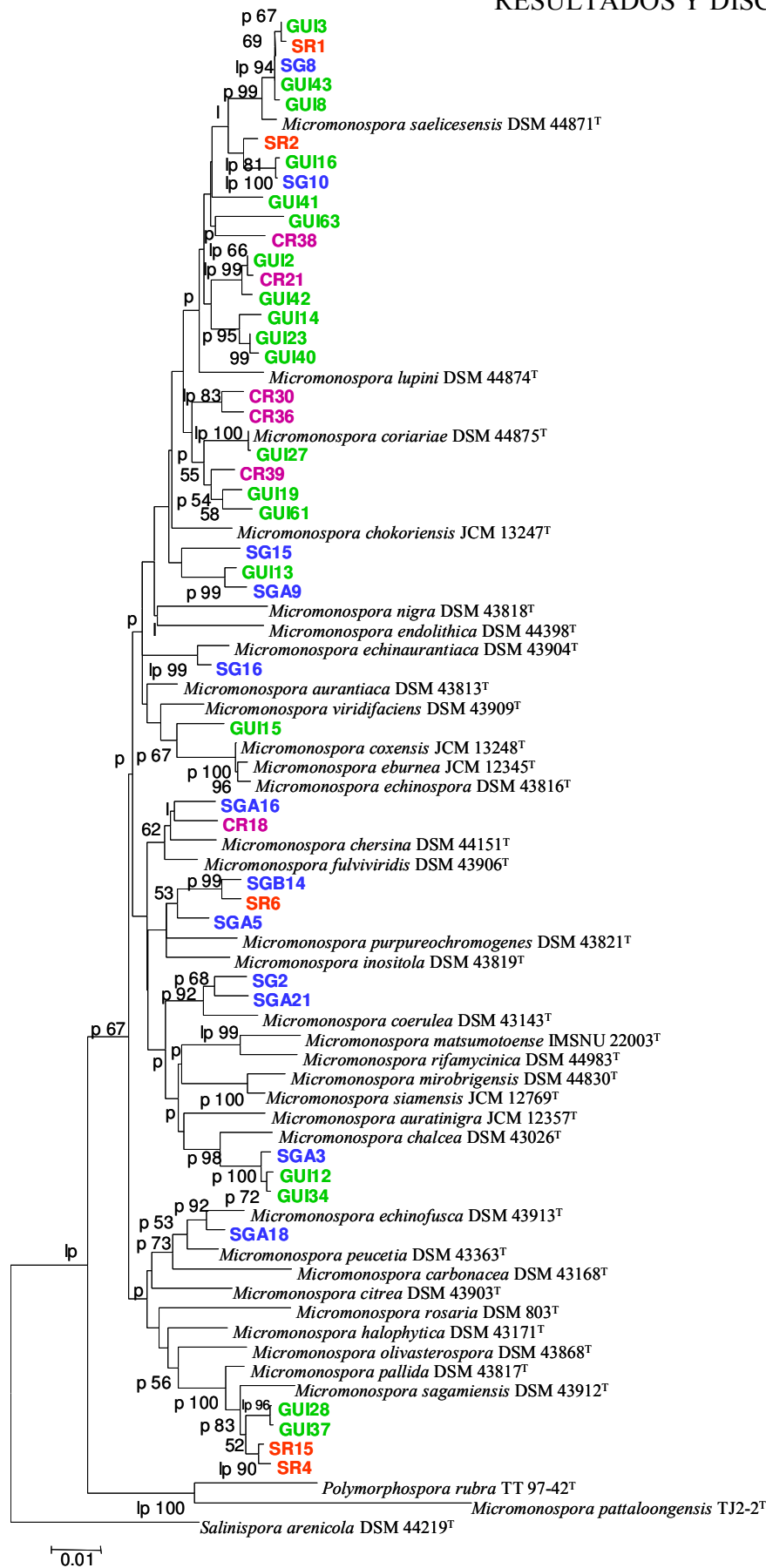


Fig. 49. Árbol filogenético derivado del estudio del gen *atpD* mostrando la relación entre las cepas identificadas como *Micromonospora* y 33 cepas tipo de éste género mediante el método del vecino más cercano y el parámetro de Kimura 2-p. Cañizal (GUI: nódulos, CR: rizosfera), Salamanca (SG: nódulos, SR: rizosfera). Nodos conservados: p: máxima parsimonia, l: máxima verosimilitud y lp: ambos.



Un segundo grupo formado por las cepas GUI 16, SG 10 y SR 2, las dos primeras más próximas entre sí (99,89%) y más distantes con la tercera (99%), que presentan con la cepa tipo valores entre 98,10 y 99,44%. Las cepas GUI 41, GUI 63 y CR 38 se muestran en ramas individuales bastante diferenciadas. Los otros dos grupos de este clado son las cepas GUI 2, GUI 42 y CR 21 (>99,55%) por un lado y GUI 14, GUI 23 y GUI 40 (>99,22%) por otro, que presentan respecto a la cepa tipo valores de 97,3 - 97,54% y 97,43 - 97,88% respectivamente.

El siguiente clado es el formado por las cepas relacionados con *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup>, que lo forman por un lado las cepas GUI 19, GUI 27, GUI 61 y CR 39, más similares a la cepa tipo (98,10 - 100%), y por otro las cepas CR 30 y CR 36 que presentan con la cepa tipo valores más alejados (98,10 - 98,33%). Las cepas GUI 13, SG 15 y SGA 9 aparecen en una rama independiente. La cepa SG 16 se muestra próxima a *M. echinaurantiaca* DSM 43904<sup>T</sup> (99,12%).

GUI 15 se presenta formando un grupo con las tres cepas tipo indiferenciadas (*M. eburnea* JCM 12345<sup>T</sup>, *M. echinospora* DSM 43816<sup>T</sup> y *M. coxensis* JCM 13248<sup>T</sup>), aunque con ellas sólo presenta entre un 97,57 y un 97,90% de similitud; en lugar de aparecer próxima a *M. pattaloongensis* TJ2-2<sup>T</sup> y *P. rubra* TT97-42<sup>T</sup>, como venía sucediendo en otros genes estudiados. Estas dos cepas tipo sí que permanecen juntas con un valor de 100% en porcentaje de repeticiones.

Las cepas SGA 16 y CR 18 aparecen relacionadas con la cepa tipo *M. chersina* DSM 44151<sup>T</sup> (98,23 y 98,12% respectivamente). Las cepas SGA 5, SGB 14 y SR 6 aparecen agrupadas (>98,12%) y próximas a *M. purpureochromogenes* DSM 43821<sup>T</sup> (97,21 - 97,54%). Y lo mismo ocurre para las cepas SG 2 y SGA 21 (98,68%), que se muestran próximas a *M. coerulea* DSM 43343<sup>T</sup> (97,90 - 98,23%).

Otro grupo es el formado por las cepas GUI 12, GUI 34 y SGA 3 que presentan entre ellas valores superiores a 99,45%, y valores entre 97,88 y 97,99% con la cepa tipo *M. chalcea* DSM 43026<sup>T</sup>. La cepa SGA 18 se presenta próxima a *M. echinofusca* DSM 43913<sup>T</sup> (98,90%). Y el último grupo es el formado por las cepas GUI 28, GUI 37, SR 4 y SR 15 (98,88 - 99,66%), que en este caso aparecen próximas a *M. sagamiensis* DSM 43912<sup>T</sup>, con la que presentan valores entre 98,09 y 98,45%.

En general, los porcentajes de similitud obtenidos para el gen *atpD* son inferiores a los presentados para el gen ribosómico 16S, existiendo una mayor variación, sin embargo, algunos de los valores mostrados para el gen *atpD* son superiores, como en la cepa GUI 27, que presentaba un 99,58% con respecto a *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup> en el gen ARNr 16S mientras que para el gen *atpD* el porcentaje de similitud es del 100%. Estos valores indican que existe una estrecha relación entre estas dos cepas.

La estructura general del árbol se mantiene, aunque sí se observan algunas diferencias relevantes, la cepa GUI 15 aparece en una rama con las cepas *M. coxensis* JCM 13248<sup>T</sup>, *M. eburnea* JCM 12345<sup>T</sup> y *M. echinospora* DSM 43816<sup>T</sup>, en lugar de junto a *P. rubra* DSM 44947<sup>T</sup> y *M. pattaloongensis* TJ2-2<sup>T</sup>, que aparecen en un rama independiente. Estas tres cepas tipo que aparecen en un solo clado muy próximas entre sí, *M. coxensis* JCM 13248<sup>T</sup>, *M. eburnea* JCM 12345<sup>T</sup> y *M. echinospora* DSM 43816<sup>T</sup>, presentan unos porcentajes de similitud respecto al gen *atpD* muy altos, por encima del 99,5%, mientras que en el gen ribosómico 16S los valores de similitud de estas cepas oscilan entre 98,22 y 98,90%, por lo que este gen, utilizado de forma individual, ofrece valores poco resolutivos. Las cepas GUI 12, GUI 34 y SGA 3 aparecen agrupadas de forma similar a como lo hacían en otros genes estudiados, pero la cepa con la que aparecían, *M. aurantiaca* DSM 43813<sup>T</sup>, aparece en una rama completamente distinta, cercana a *M. viridifaciens* DSM 43909<sup>T</sup>.

A pesar de que el gen *atpD* no se muestre especialmente resolutivo, la estabilidad de los datos obtenidos a través del árbol filogenético es bastante elevada, al igual que nos ocurría con el gen *rpoB*, ya que existe una cantidad de nodos importante que se mantiene con los distintos métodos utilizados, máxima parsimonia (p) y máxima verosimilitud (l).

Una vez analizado el gen *atpD* se pueden establecer algunos resultados:

- El 48,8% de las cepas estudiadas presentan un mayor porcentaje de similitud con las cepas *M. saelicesensis* DSM 44871<sup>T</sup>, *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup> y *M. lupini* DSM 44874<sup>T</sup>, aisladas todas ellas de nódulos, mientras que el resto de los microorganismos aislados eran muy diversos, distribuyéndose a lo largo de todo el árbol.

- A través del análisis del gen *atpD* no es posible diferenciar las cepas tipo *M. eburnea* JCM 12345<sup>T</sup>, *M. echinospora* DSM 43818<sup>T</sup> y *M. coxensis* JCM 13248<sup>T</sup> entre sí, ofreciendo de este modo una baja resolución a nivel de especie.
- Si se tomara como valor de corte el porcentaje de similitud más elevado para dos cepas tipo, 99,78%, el 97,7% de las cepas de estudio tendrían valores inferiores a éste.
- La estabilidad que se muestra en los análisis del gen *atpD* es elevada.
- No se observa una relación entre las especies encontradas con sus hábitats de aislamiento o sus nichos ecológicos para el gen *atpD*.

#### 4.4.7. Análisis conjunto de los genes estudiados

Una vez analizados cada uno de los genes por separado se procedió a realizar un análisis concatenado de todos ellos. Para ello se utilizó previamente el programa Bioedit (Hall, 1999), con el que se alinearon cada uno de los genes por separado y se seleccionaron las zonas comunes para todas las cepas secuenciadas. A continuación se concatenaron los genes en el siguiente orden: ARNr 16S (1385 pb), *gyrB* (950 pb), *rpoB* (575 pb), *atpD* (873 pb) y, finalmente, *recA* (514 pb).

A partir del concatenado (4297 pb) se obtuvieron porcentajes de similitud para todas las cepas analizadas. En la tabla 28 se presentan los valores más altos de las cepas seleccionadas en el estudio con respecto a las cepas tipo que se incluyeron en el análisis. En ella se puede observar que aproximadamente el 70% de las identificaciones se mantienen con respecto a las que se mostraban para los genes analizados de forma individual.

Al analizar la tabla de porcentajes de similitud se observa que el mayor número de cepas, 16, presentan un valor más alto con *M. saelicesensis* DSM 44871<sup>T</sup> (97,67-99,13%). Estas cepas se aislaron de las cuatro zonas de muestreo, aunque principalmente de nódulos, por lo tanto, se observa que esta especie está presente tanto en nódulos como en la rizosfera de los mismos de plantas de guisante, además de los nódulos de plantas de altramuz de donde fue aislada por primera vez (Trujillo *et al.*, 2007). Ocho son las cepas que presentan un valor más alto con *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup>, con porcentajes que oscilan entre un 96,44 y un 99,77%. Entre una y cuatro cepas muestran una mayor similitud con las siguientes cepas tipo: *M. purpureochromogenes* DSM 43821<sup>T</sup> (4 cepas), *M. aurantiaca* DSM 43813<sup>T</sup> (3 cepas), *M. sagamiensis* DSM 43912<sup>T</sup> (2 cepas), *M. echinospora* DSM 43816<sup>T</sup> (2 cepas), *M. echinaurantiaca* DSM 43804<sup>T</sup> (2 cepas), *M. chokoriensis* JCM 13247<sup>T</sup> (2 cepas), *M. chersina* DSM 44151<sup>T</sup> (1 cepa), *M. coerulea* DSM 43143<sup>T</sup> (1 cepa), *M. fulviviridis* DSM 43906<sup>T</sup> (1 cepa) y *M. echinofusca* DSM 43913<sup>T</sup> (1 cepa).

Tabla 28. Similitud de las secuencias de todos los genes concatenados de las cepas de este estudio comparadas con 33 cepas tipo del género *Micromonospora*.

CEPA	CEPA TIPO MÁS PRÓXIMA	% SIMILITUD	Diff/Total nt
<b>GUI 2</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	97,7	87/3780
<b>GUI 3</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	99,13	33/3780
<b>GUI 8</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	99,13	33/3781
<b>GUI 12</b>	<i>Micromonospora aurantiaca</i> DSM 43813 <sup>T</sup>	99,19	35/4295
<b>GUI 13</b>	<i>Micromonospora chokoriensis</i> JCM 13247 <sup>T</sup>	96,25	161/4294
<b>GUI 14</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	98,15	70/3779
<b>GUI 15</b>	<i>Micromonospora echinaurantiaca</i> DSM 43804 <sup>T</sup>	95,50	170/3774
<b>GUI 16</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	98,73	48/3779
<b>GUI 19</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	97,46	109/4296
<b>GUI 23</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	98,44	59/3781
<b>GUI 27</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	99,77	10/4297
<b>GUI 28</b>	<i>Micromonospora sagamiensis</i> DSM 43912 <sup>T</sup>	98,11	81/4295
<b>GUI 34</b>	<i>Micromonospora aurantiaca</i> DSM 43813 <sup>T</sup>	99,21	34/4295
<b>GUI 37</b>	<i>Micromonospora sagamiensis</i> DSM 43912 <sup>T</sup>	98,16	79/4295
<b>GUI 40</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	98,3	73/4297
<b>GUI 41</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	97,91	79/3779
<b>GUI 42</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	97,67	88/3781
<b>GUI 43</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	99,1	34/3781
<b>GUI 61</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	98,7	56/4295
<b>GUI 63</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	98,28	65/3780
<b>CR 18</b>	<i>Micromonospora chersina</i> DSM 44151 <sup>T</sup>	97,74	97/4294
<b>CR 21</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	97,72	86/3780
<b>CR 30</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	97,37	113/4297
<b>CR 36</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	97,32	115/4297
<b>CR 38</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	97,91	79/3781
<b>CR 39</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	98,67	57/4297
<b>SG 2</b>	<i>Micromonospora coerulea</i> DSM 43143 <sup>T</sup>	98,58	61/4295
<b>SG 8</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	99,26	28/3781
<b>SG 10</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	98,73	48/3779
<b>SG 15</b>	<i>Micromonospora chokoriensis</i> JCM 13247 <sup>T</sup>	96,51	150/4293
<b>SG 16</b>	<i>Micromonospora echinaurantiaca</i> DSM 43804 <sup>T</sup>	98,65	58/4292
<b>SGA 3</b>	<i>Micromonospora aurantiaca</i> DSM 43813 <sup>T</sup>	98,74	54/4295
<b>SGA 5</b>	<i>Micromonospora purpureochromogenes</i> DSM 43821 <sup>T</sup>	98,25	75/4294
<b>SGA 9</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	96,44	153/4297
<b>SGA 16</b>	<i>Micromonospora fulviviridis</i> DSM 43906 <sup>T</sup>	98,65	58/4294
<b>SGA 18</b>	<i>Micromonospora echinofusca</i> DSM 43913 <sup>T</sup>	98,46	66/4292
<b>SGA 21</b>	<i>Micromonospora purpureochromogenes</i> DSM 43821 <sup>T</sup>	97,48	108/4294
<b>SGB 14</b>	<i>Micromonospora purpureochromogenes</i> DSM 43821 <sup>T</sup>	98,3	73/4295
<b>SR 1</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	99,1	34/3781
<b>SR 2</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 9 <sup>T</sup>	98,92	41/3779
<b>SR 4</b>	<i>Micromonospora echinospora</i> DSM 43816 <sup>T</sup>	98	86/4294
<b>SR 6</b>	<i>Micromonospora purpureochromogenes</i> DSM 43821 <sup>T</sup>	98,7	56/4295
<b>SR 15</b>	<i>Micromonospora echinospora</i> DSM 43816 <sup>T</sup>	98,02	85/4294

Con las secuencias obtenidas se realizó un análisis filogenético cuyo resultado gráfico se muestra en la figura 50 utilizando el método del vecino más cercano y el parámetro de Kimura 2-p.



Fig. 50. Árbol filogenético derivado de las secuencias concatenadas de los genes ARNr 16S, *gyrB*, *rpoB*, *atpD* y *recA*, mostrando la relación entre 33 cepas tipo del género *Micromonospora* mediante el método del vecino más cercano y parámetro de Kimura 2-p.

En este árbol se puede observar que se consiguen separar todas las cepas tipo estudiadas, obteniendo brazos suficientemente largos para cada una de las ramas. Además, los valores del porcentaje de repeticiones (“bootstrap”) son bastante elevados, con valores superiores a los que se mostraban para cada uno de los genes analizados de forma individual. En la agrupación de las cepas, vemos que se conserva bastante la

estructura que se presentaba para el gen *gyrB*, aunque en este último la longitud que se mostraban las ramas era superior. Por lo que el gen *gyrB* es capaz de separar especies diferentes con una mayor eficiencia.

Los valores de similitud de las cepas de estudio con respecto a las cepas tipo del género *Micromonospora* se muestran en el anexo II. Estos valores varían en la tabla correspondiente desde 91,82% a 99,98%. En las cepas tipo analizadas estos valores variaron desde 91,82% para las cepas *M. chalcea* DSM 43026<sup>T</sup> y *M. pattaloongensis* TJ2-2<sup>T</sup> a 98,25% entre *M. chalcea* DSM 43026<sup>T</sup> y *M. aurantiaca* DSM 43813<sup>T</sup>. En principio, podríamos decir que teniendo en cuenta el análisis concatenado de los genes, valores entre dos cepas iguales o inferiores a 98,25% nos indicaría que se trata de posibles nuevas especies genómicas.

Una vez analizadas las cepas tipo de forma individual, se llevó a cabo el análisis con todas las cepas de estudio, éste se muestra en la figura 51; para este análisis también se utilizó el método del vecino más cercano y el parámetro de Kimura 2-p. En el primer clado aparecen las cepas relacionadas con *M. saelicesensis* DSM 44871<sup>T</sup>, un primer grupo dentro de éste lo forman las cepas GUI 3, GUI 8, GUI 43, SG 8 y SR 1 que entre ellas presentan valores superiores a 99,84% de similitud. El segundo grupo lo forman las cepas GUI 16, SG 10 y SR 2 (98,73 - 98,92%). Las cepas GUI 63, GUI 41 y CR 38 presentan ramas individuales de bastante longitud. Otro grupo lo forman las cepas GUI 14 y GUI 23 (99,37%) que presentan con la cepa tipo valores entre un 98,15 y un 98,44%, y el último grupo lo forman las cepas GUI 2, GUI 42 y CR 21 que entre ellas presentan valores superiores a 99,81% y con la cepa tipo valores de 97,7%, pudiendo representar una nueva especie.

Las cepas SG 15, GUI 13 y SGA 9 aparecen en ramas independientes, por lo que podrían ser representantes de nuevas especies. El siguiente clado es el formado por las cepas cercanas a *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup>, en el que podemos encontrar un primer grupo compuesto por las cepas GUI 19, CR 30 y CR 36 que entre ellas presentan valores superiores a 98,42% y con la cepa tipo valores que oscilan entre un 97,32 y un 97,47%. Un segundo grupo queda formado por las cepas GUI 27, GUI 61 y CR 39 (>98,84%) que son las más próximas a la cepa tipo (98,67-99,77%) y próximo a este

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

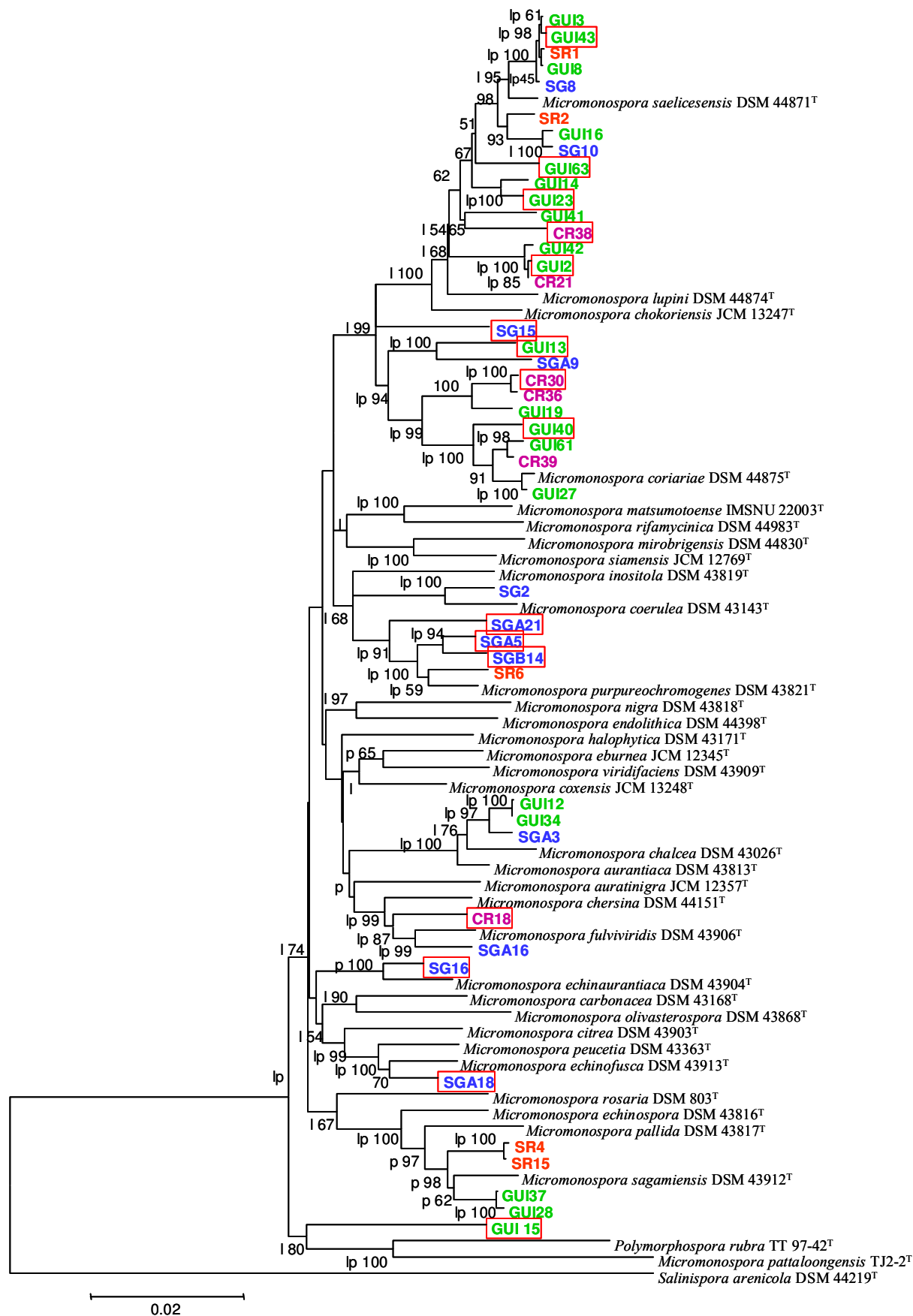


Fig. 51. Árbol concatenado de los genes de estudio *16S*, *gyrB*, *rpoB*, *atpD* y *recA* mediante el método del vecino más cercano y el parámetro de Kimura 2p. Cañizal (GUI: nódulos, CR: rizosfera), Salamanca (SG: nódulos, SR: rizosfera). Nodos conservados: p: máxima parsimonia, l: máxima verosimilitud y lp: ambos.  Cepas seleccionadas para estudios de quimiotaxonomía e hibridación ADN-ADN.



grupo aparece en un rama independiente la cepa GUI 40 que presenta con la cepa tipo un porcentaje de similitud de 98,30%.

Junto a *M. coerulea* DSM 43143<sup>T</sup> aparece la cepa SG 2 (98,58%) y la cepa SGA 21 aparece en una rama independiente próxima al grupo formado por SGA 5, SGB 14 y SR 6, que tiene relación con la cepa *M. purpureochromogenes* DSM 43821<sup>T</sup> (98,25-98,70%).

El siguiente grupo es el formado por las cepas GUI 12, GUI 34 y SGA 3, que aparecen en el árbol próximas a la cepa tipo *M. chalcea* DSM 43026<sup>T</sup>, entre ellas poseen valores de similitud superiores al 99,46%. La cepa CR 18 aparece en una rama independiente, la cepa SGA 16 junto a *M. fulviviridis* DSM 43906<sup>T</sup> (98,65%), la cepa SG 16 junto a *M. echinaurantiaca* DSM 43904<sup>T</sup> (98,65%) y la cepa SGA 18 junto a *M. echinofusca* DSM 43913<sup>T</sup> (98,46%).

El último grupo es el formado por las cepas GUI 28, GUI 37, SR 4 y SR 15, que aparecen agrupadas de dos en dos por zona de aislamiento. Las dos primeras presentan entre sí un 99,88% de similitud y con la cepa tipo del grupo *M. sagamiensis* DSM 43912<sup>T</sup> un 98,1%, mientras que las dos últimas presentan entre sí un valor de 99,93% y con la cepa tipo un 97,7%.

En el caso de la cepa GUI 15 el análisis conjunto la deja agrupada junto a *P. rubra* DSM 44947<sup>T</sup> y *M. pattaloongensis* TJ2-2<sup>T</sup>, que aparecen en un clado independiente del árbol sostenido por valores altos en el porcentaje de repeticiones.

La línea general del árbol se mantiene para el concatenado, lo cual es lógico, ya que esto había venido ocurriendo en todos los genes analizados individualmente: el mayor número de cepas pertenecen al grupo de *M. saelicesensis* DSM 44871<sup>T</sup>, que aparecen de nuevo en una rama independiente y formando un clado junto a *M. lupini* DSM 44874<sup>T</sup> y *M. chokoriensis* JCM 13247<sup>T</sup>. También el grupo de *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup> se mantiene en un clado, en el que en este caso se ha sumado GUI 40, cepa que no se mantiene estable de unos árboles a otros. Sin embargo, este análisis común muestra una mayor divergencia de los microorganismos aislados de lo que se podía observar en los demás casos, cepas que en todos los casos han aparecido muy cercanas a una cepa tipo,

como es el caso de GUI 12, GUI 34 y SGA 3 con respecto a *M. aurantiaca* DSM 43813<sup>T</sup>, aparecen aquí formando una rama algo más alejada, y lo mismo ocurre con las cepas GUI 28, GUI 37, SR 4 y SR 15.

La estabilidad que se puede observar en el árbol procedente del análisis de los genes concatenados es muy superior a la que presenta cualquiera de los genes utilizados de forma individual, incluido el gen ribosómico 16S, lo que se puede observar en la cantidad de nodos conservados marcados en el árbol a partir de los métodos de máxima parsimonia (p) y de máxima verosimilitud (l). Los valores obtenidos de porcentaje de repeticiones son, asimismo, más elevados que en cualquiera de los análisis de los genes por sí solos y la capacidad resolutoria entre dos cepas similares también es superior en este caso, pudiendo observar diferencias en cepas que en los otros análisis aparecían como idénticas, como es el caso del grupo que incluye a GUI 3, GUI 43, SR 1, GUI 8 y SG8, el grupo de GUI 42, GUI 2 y CR 21 o algunas cepas pertenecientes al grupo relacionado con *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup>.

En la figura 51 se han marcado con un recuadro rojo las cepas seleccionadas como posibles nuevas especies para llevar sobre ellas los estudios de quimiotaenología y de hibridación ADN-ADN para confirmar estos resultados. Esta selección se ha llevado a cabo teniendo en cuenta, además del árbol concatenado, cada uno de los árboles de los genes individuales.

Al analizar la procedencia de las cepas del estudio, se observa en general la tendencia descrita para el gen ribosómico 16S, es decir, que cepas procedentes de la rizosfera y cepas procedentes de los nódulos se identifican, en algunos casos, con la misma especie. Sin embargo esto no es sistemático, y no siempre ocurre que las cepas que se corresponden procedan de la misma localidad. Con lo que se podría decir que no existe una especificidad de nicho por parte de unas especies concretas, las mismas que podemos encontrar en los nódulos se pueden obtener de la rizosfera y tampoco parece que haya diferencia entre las cepas procedentes de Cañizal y de Salamanca.

Tras el análisis de cada uno de los genes por separado y del concatenado de éstos, se puede observar que la estabilidad de los genes que codifican para proteínas es mayor entre ellos que la que se corresponde en cada uno de los mismos con el gen ribosómico

16S, conservándose un mayor número de nodos; y a su vez, el concatenado de todos los genes ofrece una mayor estabilidad y una mayor resolución que los genes utilizados de forma individual. Genes que en principio podrían no parecer los más adecuados en este tipo de análisis, como el *rpoB*, para el que existen valores muy altos de similitud en algunas cepas que no se corresponden con los resultados para los demás genes estudiados, o el *atpD*, por la alta similitud que presenta entre especies distintas, podrían aportar estabilidad al árbol concatenado, siendo así importante su inclusión en el mismo. A la vista de los resultados, se puede concluir que el uso del concatenado de los genes estudiados en este trabajo aporta más información, y ésta a su vez es más estable, que la que se puede obtener con análisis individuales, incluido el del gen ribosómico 16S.

Una vez analizado el concatenado de las secuencias de los diferentes genes utilizados en el análisis se pueden resumir los siguientes resultados:

- El 55,8% de las cepas de estudio presentan una importante relación con las cepas tipo *M. saelicesensis* DSM 44871<sup>T</sup> y *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup>, cepas que fueron aisladas de nódulos. El resto de los aislados aparecían distribuidos a lo largo de todo el árbol.
- Utilizando el concatenado de las secuencias de los genes de estudio se logra la diferenciación entre todas las cepas tipo del género *Micromonospora* empleadas, ofreciendo una buena resolución a nivel de especie de este género.
- Los porcentajes de repeticiones para los árboles filogenéticos son altos y su estabilidad respecto de otros modelos también lo es.
- El 46,5% de las cepas de estudio presentan valores de similitud inferiores a 98,25%, valor que presentan entre sí las cepas tipo *M. chalcea* DSM 43026<sup>T</sup> y *M. aurantiaca* DSM 43813<sup>T</sup>.
- La cepa GUI 15 se presenta de nuevo agrupada con *P. rubra* TT 97-42<sup>T</sup> y *M. pattaloongensis* TJ2-2<sup>T</sup>, formando un clado estable.
- Las especies que aparecen no muestran dependencia con la zona de muestreo ni con el nicho ocupado en la misma.

#### 4.5 Estudios de hibridación ADN-ADN

La hibridación de las cepas seleccionadas en base a los estudios de filogenia anteriormente descritos fue llevada a cabo por la Dra. Cathrin Spröer en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ), en Braunschweig (Alemania). Para ello se siguió el protocolo descrito por De Ley *et al.* (1970) y modificado por Huss *et al.* (1983). Los microorganismos seleccionados para estos análisis se muestran en la tabla 29.

Tabla 29. Microorganismos seleccionados para los estudios de hibridación ADN-ADN.

CEPA ESTUDIO	CEPA COMPARACIÓN
<b>GUI 2</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> DSM 44871 <sup>T</sup>
<b>GUI 13</b>	<i>Micromonospora siamensis</i> DSM 45097 <sup>T</sup>
<b>GUI 13</b>	<b>SGA5</b>
<b>GUI 23</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> DSM 44871 <sup>T</sup>
<b>GUI 23</b>	<b>GUI63</b>
<b>GUI 40</b>	<i>Micromonospora auratinigra</i> DSM 44815 <sup>T</sup>
<b>GUI 43</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> DSM 44871 <sup>T</sup>
<b>GUI 43</b>	<b>GUI63</b>
<b>GUI 43</b>	<b>GUI23</b>
<b>GUI 63</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> DSM 44871 <sup>T</sup>
<b>CR 18</b>	<i>Micromonospora chersina</i> DSM 44151 <sup>T</sup>
<b>CR 18</b>	<i>Micromonospora endolithica</i> DSM 44398 <sup>T</sup>
<b>CR 30</b>	<i>Micromonospora coriariae</i> DSM 44875 <sup>T</sup>
<b>CR 30</b>	<i>Micromonospora endolithica</i> DSM 44398 <sup>T</sup>
<b>CR 38</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> DSM 44871 <sup>T</sup>
<b>CR 38</b>	<b>GUI63</b>
<b>SG 15</b>	<i>Micromonospora coxensis</i> DSM 45161 <sup>T</sup>
<b>SG 16</b>	<i>Micromonospora coxensis</i> DSM 45161 <sup>T</sup>
<b>SGA 21</b>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> DSM 44871 <sup>T</sup>
<b>SGA 5</b>	<i>Micromonospora siamensis</i> DSM 45097 <sup>T</sup>
<b>SGB 14</b>	<i>Micromonospora purpureochromogenes</i> DSM 43821 <sup>T</sup>

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de las hibridaciones ordenados de menor a mayor se muestran en la tabla 30, aquí podemos ver que todas las combinaciones analizadas nos dan resultados inferiores al 70% por lo que siguiendo las recomendaciones del comité *ad hoc* (Wayne *et al.*, 1987), es posible que las cepas estudiadas representen nuevas especies. Los valores obtenidos para las cepas analizadas variaron desde un 14.9% a un 63,4%. Muchas de las cepas fueron estudiadas frente a la cepa tipo *M. saelicesensis* DSM 44871<sup>T</sup>, esto es debido a que en torno al 35% de las cepas estudiadas presentaban sus valores más altos de similitud con esta especie. A pesar de presentar porcentajes de similitud altos en los distintos genes estudiados respecto de esta cepa tipo (>99,44% 16S, >97,37% *gyrB*, >97,61% *rpoB*, >97,21% *atpD*, 98,28% MLSA), las cepas GUI 23, GUI 43 y GUI 63, presentaron porcentajes de hibridación inferiores al 70% tanto con la cepa tipo como entre ellas.

Tabla 30. Resultados de los estudios de hibridación ADN-ADN (en 2 X SSC + 10% formamida a 70°C) de las cepas analizadas y porcentajes de similitud para los distintos genes estudiados y el análisis multilocus.

		Hibridación	16S	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>rpoB</i>	<i>atpD</i>	MLSA
CR 30	<i>Micromonospora endolithica</i>	14.9 (23.6)	99,1	91,34	92,36	92,28	96,47	95,16
GUI 13	<i>Micromonospora siamensis</i>	15.8 (20.2)	98,68	92,14	93,65	92,5	94,75	95,04
SG 15	<i>Micromonospora coxensis</i>	16.7 (21.2)	99,03	93,31	-	95,48	96,03	96,32
GUI 13	SGA5	16.8 (20.4)	99,17	92,96	94,05	94,16	97,43	96,11
CR 18	<i>Micromonospora chersina</i>	27.2 (22.8)	99,17	95,66	97,22	98,34	98,12	97,74
CR 18	<i>Micromonospora endolithica</i>	28.8 (28.1)	99,17	92,79	96,47	93,43	95,47	96,04
SGA 21	<i>Micromonospora saelicesensis</i>	29.1 (32.7)	98,89	92,37	-	93,21	94,87	95,5
CR 38	<i>Micromonospora saelicesensis</i>	35.8 (47.5)	98,76	-	-	-	-	-
SGA 5	<i>Micromonospora siamensis</i>	43.8 (37.8)	99,28	94,86	96,65	93,53	96,57	96,69
GUI 43	GUI23	45.1 (56.6)	99,24	97,91	97,21	98,12	97,99	98,32
CR 38	GUI63	46.5 (46.7)	99,31	-	-	-	-	-
SG 16	<i>Micromonospora coxensis</i>	47.8 (42.6)	99,09	96,37	-	96,21	96,14	97,25
GUI 2	<i>Micromonospora saelicesensis</i>	50.0 (46.3)	99,03	95,88	-	97,95	97,54	97,7
GUI 23	GUI63	52.4 (51.7)	99,24	97,62	97,39	98,11	97,77	98,18
GUI 43	GUI63	52.8 (61.3)	99,31	97,37	99,07	98,11	97,35	98,3
CR 30	<i>Micromonospora coriariae</i>	53.0 (53.9)	99,31	93,4	97,11	98,55	98,33	97,37
GUI 40	<i>Micromonospora auratinigra</i>	56.3 (46.4)	98,95	93,66	93,88	92,05	94,98	95,41
GUI 23	<i>Micromonospora saelicesensis</i>	56.7 (57.1)	99,52	98	-	97,61	97,88	98,44
SGB 14	<i>Micromonospora purpureochromogenes</i>	58.6 (49.8)	99,24	98,37	99,03	96,46	97,21	98,3
GUI 63	<i>Micromonospora saelicesensis</i>	59.9 (55.9)	99,44	97,37	-	98,56	97,21	98,28
GUI 43	<i>Micromonospora saelicesensis</i>	63.4 (62.3)	99,44	98,31	-	98,42	99,44	99,1

En esta misma tabla 30 se muestran los valores de los porcentajes de similitud obtenidos, para todos los genes estudiados y para su concatenado, en cada una de las parejas de cepas estudiadas por hibridación ADN-ADN. Analizando los porcentajes de similitud para cada uno de los genes vemos que en el género *Micromonospora*, valores de similitud superiores al 99% para secuencias del gen ribosómico 16S pueden corresponder con cepas que pertenecen a especies diferentes, por lo que el margen de diferenciación es pequeño (Figura 52). En el extremo opuesto se encuentra el gen *gyrB*, que en los valores de la tabla varía desde un 91,34 a un 98,31%, por lo que su margen de diferenciación es significativamente mayor. De hecho, sus porcentajes de similitud muestran una relación elevada con los ofrecidos por la hibridación; aunque, como es esperable, ya que se trata de un solo gen, no todos los valores tienen una relación lineal respecto a los porcentajes de hibridación, existiendo valores por encima de la recta como la hibridación entre la cepa CR 18 y la cepa tipo *M. chersina* DSM 44151<sup>T</sup> (95,66%), y otros por debajo de la misma, los correspondientes a GUI 2 y *M. saelicesensis* DSM 44871<sup>T</sup> (95,88%), CR 30 y *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup> (93,40%), y GUI 40 y *M. auratinigra* DSM 44815<sup>T</sup> (93,66%). Con estos valores podemos aspirar a un valor de corte para el gen *gyrB* superior al provisional que habíamos propuesto a partir de los resultados de las cepas tipo (97,73%), ya que hemos visto que un resultado de 98,37% corresponde con especies diferentes. Este valor es cercano al valor de 98,5% que se había propuesto con anterioridad para este gen (Hatano *et al.*, 2003), por lo que nuestros datos confirmarían la validez de este punto de corte para el gen *gyrB* en el género *Micromonospora*.

En el gen *recA* no se pueden observar muchos de los datos debido a que la amplificación de la cepa *M. saelicesensis* DSM 44871<sup>T</sup> no pudo llevarse a cabo en este gen. Aún así, el resto de los datos obtenidos presentan una relación intermedia con los resultados de hibridación respecto a los otros dos genes comentados, ARNr 16S y *gyrB*, dando valores que se presentan fuera de la recta hipotética que supondría una relación lineal entre los porcentajes de similitud del gen *recA* y los porcentajes de hibridación, como las combinaciones CR 18 - *M. chersina* DSM 44151<sup>T</sup> (97,22%), CR 30 - *M. coriariae* DSM 44875<sup>T</sup> (97,11%), y GUI 40 - *M. auratinigra* DSM 44815<sup>T</sup> (93,88%), igual que para el gen *gyrB*.

El gen *rpoB* presenta también un amplio rango en la tabla, desde 92,28 a 98,42%, sin embargo, las correspondencias entre porcentajes de similitud y porcentajes de hibridación no son tan buenas como en el gen *gyrB*, existiendo cuatro valores que aparecen por encima de la recta que supondría una relación lineal con los porcentajes de hibridación (SG 15 - *M. coxensis* DSM 45161<sup>T</sup> (95,48%), CR 18 - *M. chersina* DSM 44151<sup>T</sup> (98,34%), GUI 23 - *M. saelicensis* DSM 44871<sup>T</sup> (97,61%) y SGB 14 - *M. purpureochromogenes* DSM 43821<sup>T</sup> (96,46%)) y uno inferior (GUI 40 - *M. auratinigra* DSM 44815<sup>T</sup> (92,05%)). En este caso no se supera en ninguno de los casos el valor de corte provisional que se había indicado a partir de los resultados de las cepas tipo, 99%, por lo que a falta de más estudios de hibridación entre cepas más cercanas, se podría proponer este valor como punto de corte. De modo que, dos cepas que presenten entre sí porcentajes de similitud inferiores a un 99%, muy probablemente pertenezcan a especies diferentes.

Al analizar el gen *atpD*, vemos que los porcentajes de similitud obtenidos no muestran una relación lineal con los resultados de hibridación ADN-ADN, ya que aparecen valores en torno al 97% de similitud para muchos de los porcentajes de hibridación, desde 14 a 59%. Para este gen no habíamos propuesto un valor de corte, ya que no conseguía diferenciar bien entre algunas cepas tipo, y con este análisis confirmamos que no es un buen gen para analizar el género *Micromonospora* de forma individual.

Los porcentajes de similitud del concatenado de genes, sí muestran una correlación bastante buena con los resultados de hibridación, existiendo tan sólo un porcentaje de similitud por encima de la recta que supondría una relación lineal con el valor de hibridación, CR 18 - *M. chersina* DSM 44151<sup>T</sup> (97,74%), que aparece alto también en los otros cuatro genes analizados, y un valor por debajo de esta recta para el porcentaje de hibridación entre la cepa GUI 40 y la cepa *Micromonospora auratinigra* DSM 44815<sup>T</sup> (95,41%), pero que se presenta por debajo para todos los demás genes analizados, incluido el ARNr 16S. Al igual que nos ocurría con el gen *gyrB*, el valor de corte provisional que se había propuesto a partir de las dos cepas tipo más próximas (98,25%) es demasiado bajo, ya que se muestra que un valor de 99,1% corresponde con especies distintas. Por lo que con los datos disponibles, se podría establecer como valor

de corte del concatenado por debajo del cual dos cepas tendrían muchas posibilidades de pertenecer a especies diferentes, un valor de 99%.

A la vista de los resultados, se puede decir que el gen que mejor refleja las relaciones entre cepas de *Micromonospora* de forma individual es el gen *gyrB*, aunque el análisis a través del concatenado da mejores resultados, ofreciendo unos datos más estables y cuyos porcentajes de similitud se corresponden bastante bien con los porcentajes obtenidos para hibridación ADN-ADN.

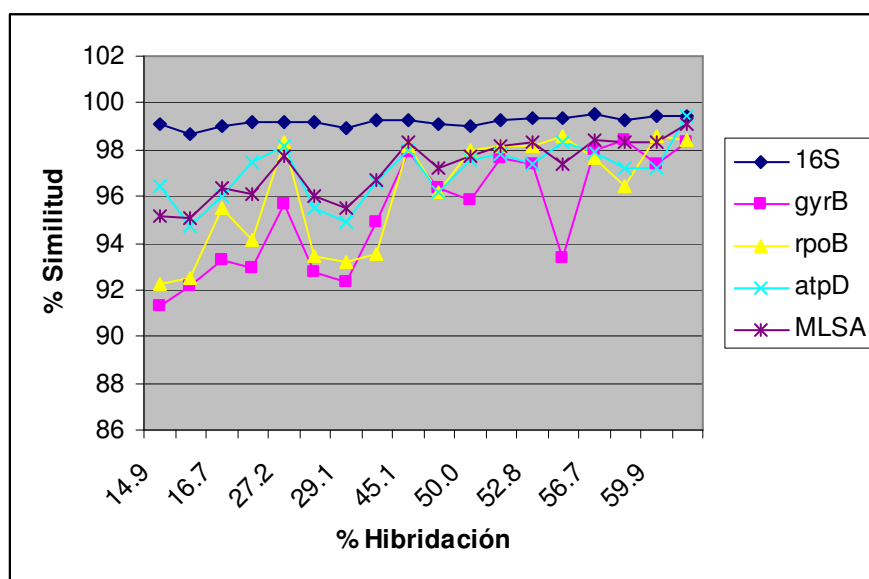


Fig. 52. Representación gráfica de los datos de la tabla 30 a excepción del gen *recA*.

A pesar de que los datos de hibridación obtenidos con diferentes métodos o en distintas condiciones no son comparables, se analizaron también los porcentajes de similitud para todos los genes analizados de las cepas tipo con los resultados de las hibridaciones presentados en la bibliografía, y estos resultados se muestran en la tabla 31. En ellos vemos que existe más variación de los porcentajes de similitud con respecto a los datos de hibridación para todos los genes analizados, incluido el concatenado, que la que se había observado para nuestras cepas, pero sigue mostrando que los mejores resultados se obtienen con el análisis multilocus.

Tras el análisis de todos los genes de estudio comparados con los porcentajes de hibridación de las cepas revisadas se pueden destacar los siguientes puntos:



- Se confirman los resultados del estudio de los genes en los que no se mostraban como buenos candidatos para el estudio de la filogenia del género *Micromonospora*, al menos de forma individual, los genes *recA* y *atpD*.

- El gen *gyrB* se confirma como el gen analizado que aporta mejores resultados de forma individual de los examinados dentro de este estudio, obteniendo que un valor de similitud inferior al 98,5% muy probablemente corresponda a cepas que pertenezcan a especies diferentes.

- Se obtuvo un posible valor de corte para el estudio de este género a través del gen *rpoB* de 99%.

- La relación entre los porcentajes de similitud y los porcentajes de hibridación fue mejor en el caso del análisis de secuencias multilocus que para cualquiera de los análisis de genes individuales. El porcentaje de similitud obtenido como posible punto de corte para el análisis concatenado de los genes expuestos es 99%, por debajo del cual dos cepas probablemente pertenecerían a especies diferentes. Este porcentaje de similitud es el mismo que se establece en actinobacterias para el gen ribosómico 16S, sin embargo, hay que tener en cuenta que cepas que en el análisis de secuencias multilocus obtienen valores del 99%, en el análisis individual del gen ARNr 16S presentan valores superiores a 99,4%.

- El estudio del género *Micromonospora* utilizando este análisis de secuencias multilocus puede suponer un sustituto de los estudios de hibridación, aunque para confirmar la relación existente a todos los niveles, se deben ampliar los estudios de hibridación realizados a más cepas con porcentajes de similitud más elevados.

Tabla 31. Resultados de los estudios de hibridación ADN-ADN\* de cepas tipo de *Micromonospora* y porcentajes de similitud para los distintos genes estudiados y el análisis multilocus.

CEPA 1	CEPA 2	HIBRIDACIÓN	16S	<i>gvrB</i>	<i>recA</i>	<i>rpoB</i>	<i>atpD</i>	MLSA
<i>M. nigra</i>	<i>M. rosaria</i>	1 (13)	98,29	93,21	-	93,56	94,2	95,35
<i>M. aurantiaca</i>	<i>M. echinospora</i>	5 (11)	97,68	91,11	93,02	93,55	97,24	94,43
<i>M. aurantiaca</i>	<i>M. olivasterospora</i>	5 (15)	97,69	91	-	93,71	96,43	95,05
<i>M. aurantiaca</i>	<i>M. pallida</i>	5 (17)	97,89	90,3	93,64	91,48	96,69	94,43
<i>M. aurantiaca</i>	<i>M. nigra</i>	6 (18)	97,95	93,18	-	91,96	96,43	95,48
<i>M. aurantiaca</i>	<i>M. rosaria</i>	6 (6)	98,17	92,31	93,88	94,2	95,47	95,25
<i>M. chalcea</i>	<i>M. olivasterospora</i>	7 (14)	97,29	90,88	-	93,38	95,09	94,57
<i>M. carbonacea</i>	<i>M. chalcea</i>	7 (19)	97,69	93,06	93,64	93,87	93,64	94,95
<i>M. coerulea</i>	<i>M. echinospora</i>	8 (11)	98,02	91,13	95,08	94,34	95,14	95,04
<i>M. echinospora</i>	<i>M. olivasterospora</i>	8 (11)	97,75	92,05	-	93,81	95,31	95,13
<i>M. nigra</i>	<i>M. olivasterospora</i>	8 (11)	98,02	90,9	-	92,7	94,53	94,52
<i>M. chalcea</i>	<i>M. pallida</i>	8 (15)	97,76	89,29	94,02	91,79	94,98	93,99
<i>M. olivasterospora</i>	<i>M. purpureochromogenes</i>	8 (15)	97,96	91,84	-	92,37	94,64	94,87
<i>M. chalcea</i>	<i>M. rosaria</i>	9 (10)	98,44	91,66	93,32	94,19	94,75	95,02
<i>M. coerulea</i>	<i>M. nigra</i>	9 (15)	97,88	91,77	-	93,87	94,97	94,97
<i>M. chalcea</i>	<i>M. coerulea</i>	9 (16)	97,56	90,72	96,17	93,88	96,31	94,97
<i>M. chalcea</i>	<i>M. purpureochromogenes</i>	9 (16)	98,5	93,16	96,53	93,4	95,75	95,85
<i>M. halophytica</i>	<i>M. olivasterospora</i>	9 (19)	97,63	92,01	-	94,01	97,1	95,53
<i>M. chalcea</i>	<i>M. coxensis</i>	10	98,71	93,12	-	95,34	95,42	96,11
<i>M. coxensis</i>	<i>M. purpureochromogenes</i>	10	99,39	89,66	-	94,29	96,65	96,41
<i>M. chersina</i>	<i>M. olivasterospora</i>	10 (13)	97,63	91,92	-	94,53	96,32	95,34
<i>M. echinospora</i>	<i>M. rosaria</i>	10 (16)	98,57	89,26	93,63	93,87	94,04	95,44
<i>M. chalcea</i>	<i>M. nigra</i>	10 (17)	97,95	92,31	-	91,79	94,53	94,9
<i>M. chalcea</i>	<i>M. echinospora</i>	10 (18)	97,75	90,07	93,77	93,05	95,2	94,43
<i>M. chersina</i>	<i>M. nigra</i>	10 (19)	98,36	94,4	-	92,54	95,31	95,82
<i>M. nigra</i>	<i>M. purpureochromogenes</i>	10 (19)	98,02	94,32	-	93,66	95,98	96,01
<i>M. olivasterospora</i>	<i>M. pallida</i>	10 (19)	98,16	90,71	-	92,39	97,43	95,18
<i>M. coerulea</i>	<i>M. rosaria</i>	11	97,97	92,28	94,81	95,48	95,25	95,41
<i>M. coriariae</i>	<i>M. endolithica</i>	11,5	98,68	91,5	92,36	92,79	95,98	95,3
<i>M. halophytica</i>	<i>M. pallida</i>	11 (14)	98,3	91,41	94,21	92,57	97,43	95,25
<i>M. aurantiaca</i>	<i>M. halophytica</i>	11 (16)	99,05	93,35	95,45	94,51	97,1	96,39
<i>M. inositola</i>	<i>M. rosaria</i>	11 (16)	98,71	94,53	-	94,19	95,14	96,11
<i>M. purpureochromogenes</i>	<i>M. rosaria</i>	11 (16)	98,1	93,13	94,21	93,88	94,53	95,2
<i>M. coerulea</i>	<i>M. olivasterospora</i>	11 (18)	98,03	91,16	-	93,53	95,75	95,05
<i>M. pallida</i>	<i>M. purpureochromogenes</i>	11 (20)	98,1	91,58	94,96	93,34	94,53	94,83
<i>M. inositola</i>	<i>M. olivasterospora</i>	11 (21)	97,76	92,63	-	92,87	95,54	95
<i>M. coerulea</i>	<i>M. pallida</i>	11 (22)	98,03	90,56	95,33	93,39	95,47	94,85
<i>M. halophytica</i>	<i>M. rosaria</i>	12 (15)	97,97	93,21	93,87	94,18	95,76	95,51
<i>M. aurantiaca</i>	<i>M. inositola</i>	12 (17)	97,76	92,47	-	93,55	97,35	95,61
<i>M. chersina</i>	<i>M. coerulea</i>	12 (18)	98,24	92,03	96,9	95,02	96,46	95,95
<i>M. carbonacea</i>	<i>M. olivasterospora</i>	12 (20)	97,96	93,48	-	97,62	95,98	96,53
<i>M. chersina</i>	<i>M. echinospora</i>	12 (20)	98,7	91,73	94,34	93,69	96,58	95,55

Continúa...

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CEPA 1	CEPA 2	HIBRIDACIÓN	16S	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>rpoB</i>	<i>atpD</i>	MLSA
<i>M. aurantiaca</i>	<i>M. chersina</i>	12 (23)	97,76	94,21	96	97,84	98,34	96,58
<i>M. echinospora</i>	<i>M. purpureochromogenes</i>	12 (23)	97,88	91,9	94,98	94,28	96,42	95,43
<i>M. olivasterospora</i>	<i>M. rosaria</i>	13 (13)	97,9	92,26	-	94,35	95,54	95,39
<i>M. chersina</i>	<i>M. rosaria</i>	13 (14)	99,19	93,38	94,24	95,02	94,48	95,85
<i>M. echinospora</i>	<i>M. inositola</i>	13 (19)	98,84	92,29	-	93,81	96,69	95,92
<i>M. inositola</i>	<i>M. purpureochromogenes</i>	13 (21)	98,1	94,35	-	95,23	97,09	96,59
<i>M. chersina</i>	<i>M. pallida</i>	13 (22)	98,44	90,99	94,58	92,37	96,14	94,99
<i>M. carbonacea</i>	<i>M. nigra</i>	13 (26)	97,54	93,59	-	93,82	94,08	95,37
<i>M. carbonacea</i>	<i>M. pallida</i>	13 (29)	97,89	92,48	92,9	93,04	95,54	95,11
<i>M. aurantiaca</i>	<i>M. carbonacea</i>	14 (14)	98,24	92,77	93,82	94,2	95,76	95,62
<i>M. nigra</i>	<i>M. pallida</i>	14 (16)	98,77	90,82	-	91,3	94,87	94,57
<i>M. carbonacea</i>	<i>M. coerulea</i>	14 (17)	97,22	94,22	94,34	94,83	94,42	95,41
<i>M. echinospora</i>	<i>M. nigra</i>	14 (17)	98,43	91,13	-	92,22	94,98	94,84
<i>M. halophytica</i>	<i>M. inositola</i>	14 (18)	98,1	93,82	-	93,53	96,43	96,01
<i>M. echinospora</i>	<i>M. halophytica</i>	14 (19)	98,22	92,24	94,34	94,01	95,76	95,37
<i>M. halophytica</i>	<i>M. nigra</i>	14 (19)	97,95	94,57	-	92,73	94,98	95,61
<i>M. carbonacea</i>	<i>M. inositola</i>	14 (20)	97,63	94,49	-	94,45	94,43	95,69
<i>M. inositola</i>	<i>M. nigra</i>	14 (23)	98,43	93,37	-	92,7	95,65	95,61
<i>M. carbonacea</i>	<i>M. chersina</i>	14 (24)	97,42	93,95	94,36	94,86	94,76	95,65
<i>M. carbonacea</i>	<i>M. echinospora</i>	15 (23)	97,61	93,22	93,4	93,98	94,98	95,3
<i>M. aurantiaca</i>	<i>M. purpureochromogenes</i>	15 (25)	99,18	93,35	96,14	93,41	96,98	96,39
<i>M. inositola</i>	<i>M. pallida</i>	15 (25)	98,91	91,02	-	93,19	95,36	95,15
<i>M. olivasterospora</i>	<i>M. pattaloongensis</i>	16,8	98,38	88,38	-	91,44	89,51	92,98
<i>M. aurantiaca</i>	<i>M. coerulea</i>	16 (19)	97,69	91,45	96,17	93,72	96,8	94,97
<i>M. pallida</i>	<i>M. rosaria</i>	16 (19)	98,44	92,69	93,64	92,59	95,58	95,27
<i>M. carbonacea</i>	<i>M. rosaria</i>	16 (21)	97,56	94,22	94,05	93,88	94,09	95,44
<i>M. carbonacea</i>	<i>M. purpureochromogenes</i>	17 (21)	98,37	94,85	94,79	94,13	94,19	95,88
<i>M. chalcea</i>	<i>M. inositola</i>	19 (23)	97,9	91,75	-	93,38	96,32	95,16
<i>M. carbonacea</i>	<i>M. halophytica</i>	19 (28)	98,44	93,68	94,36	95,32	95,2	95,97
<i>M. aurantiaca</i>	<i>M. coxensis</i>	21	99,19	93,6	-	95,18	97,57	96,11
<i>M. chalcea</i>	<i>M. halophytica</i>	21 (24)	98,71	92,78	95,27	94,67	95,54	95,88
<i>M. coerulea</i>	<i>M. purpureochromogenes</i>	21 (28)	98,23	93,64	98,26	96,45	96,2	96,41
<i>M. chersina</i>	<i>M. inositola</i>	22 (25)	99,12	93,64	-	93,7	97,02	96,48
<i>M. coerulea</i>	<i>M. halophytica</i>	22 (28)	97,83	92,88	96,17	94,35	96,65	95,72
<i>M. chersina</i>	<i>M. halophytica</i>	23 (26)	97,83	94,57	95,64	95,19	97,21	96,39
<i>M. chersina</i>	<i>M. purpureochromogenes</i>	23 (31)	98,23	95,08	97,68	93,53	96,2	96,53
<i>M. mirobrigensis</i>	<i>M. siamensis</i>	24	98,82	93,58	98,51	99,04	98,89	97,6
<i>M. chalcea</i>	<i>M. chersina</i>	24 (28)	98,1	93,63	96	98,34	96,32	96,58
<i>M. chersina</i>	<i>M. coriariae</i>	25	98,4	93,4	93,45	92,21	96,09	95,55
<i>M. eburnea</i>	<i>M. narathiwatensis</i>	26	99,32	-	-	-	-	-
<i>M. lupini</i>	<i>M. saelicesensis</i>	26	98,96	97,73	-	97,62	97,66	98,07
<i>M. matsumotoense</i>	<i>M. siamensis</i>	26	97,51	93,42	94,98	92,56	96,32	95,92
<i>M. matsumotoense</i>	<i>M. saelicesensis</i>	27,9	97,76	93,15	-	92,73	93,53	95,18
<i>M. halophytica</i>	<i>M. purpureochromogenes</i>	29 (33)	98,98	96,01	95,56	93,38	95,31	96,46
<i>M. carbonacea</i>	<i>M. siamensis</i>	30	98,6	92,9	93,68	93,82	94,76	95,43
<i>M. carbonacea</i>	<i>M. krabiensis</i>	30,1	99,16	-	-	-	-	-
<i>M. pallida</i>	<i>M. siamensis</i>	31	98,03	91,06	94,39	92,41	96,21	94,85

Continúa...

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CEPA 1	CEPA 2	HIBRIDACIÓN	16S	gyrB	recA	rpoB	atpD	MLSA
<i>M. chaiyaphumensis</i>	<i>M. coerulea</i>	32,7	98,75	-	-	-	-	-
<i>M. echinospora</i>	<i>M. siamensis</i>	33	98,09	91,63	94,8	93,33	95,09	95,04
<i>M. lupini</i>	<i>M. matsumotoense</i>	33,2	97,93	93,47	91,99	93,14	93,97	94,74
<i>M. chersina</i>	<i>M. endolithica</i>	33,5	99,32	94,06	96,55	93,2	95,7	96,53
<i>M. inositola</i>	<i>M. siamensis</i>	34	98,18	93,45	-	93,81	95,88	95,74
<i>M. aurantiaca</i>	<i>M. chalcea</i>	34 (44)	99,05	97,66	98,56	98,89	96,32	98,25
<i>M. eburnea</i>	<i>M. echinospora</i>	36	98,9	92,76	95,17	93,37	99,55	96,39
<i>M. carbonacea</i>	<i>M. mirobragensis</i>	36,5	98,44	93,24	94,36	94,02	94,31	95,44
<i>M. purpureochromogenes</i>	<i>M. siamensis</i>	37	98,73	95,27	96,53	93,34	95,31	96,48
<i>M. auratinigra</i>	<i>M. chaiyaphumensis</i>	37,9	98,33	-	-	-	-	-
<i>M. chokoriensis</i>	<i>M. mirobragensis</i>	37 (44,1)	98,93	92,58	93,15	93,89	95,25	95,36
<i>M. coerulea</i>	<i>M. siamensis</i>	38	97,61	91,72	97,03	93,56	96,54	95,41
<i>M. eburnea</i>	<i>M. olivasterospora</i>	38	98,22	92,11	-	94,34	95,3	95,36
<i>M. eburnea</i>	<i>M. matsumotoense</i>	39	96,95	93,53	95,17	94,36	94,41	95,48
<i>M. aurantiaca</i>	<i>M. siamensis</i>	40	98,39	93,54	94,8	93,36	96,54	95,76
<i>M. coerulea</i>	<i>M. eburnea</i>	40	98,29	92,85	94,61	94,2	95,18	95,45
<i>M. eburnea</i>	<i>M. rosaria</i>	40	98,7	94,21	94,24	94,83	93,96	95,64
<i>M. fulviviridis</i>	<i>M. sagamiensis</i>	40	98,63	92,16	99,81	93,54	95,58	95,95
<i>M. aurantiaca</i>	<i>M. eburnea</i>	41	98,15	93,94	93,12	95,45	97,32	95,5
<i>M. chalcea</i>	<i>M. eburnea</i>	41	98,15	93,06	93,49	95,34	95,19	95,5
<i>M. nigra</i>	<i>M. siamensis</i>	41	97,81	94,63	-	93,04	94,46	95,63
<i>M. fulviviridis</i>	<i>M. inyonensis</i>	41,6	98,7	-	-	-	-	-
<i>M. coerulea</i>	<i>M. inositola</i>	41 (42)	97,96	92,56	-	96,93	97,02	96,16
<i>M. eburnea</i>	<i>M. nigra</i>	42	98,9	94,75	-	92,1	94,97	95,82
<i>M. chalcea</i>	<i>M. siamensis</i>	43	98,6	92,93	95,17	93,83	96,09	95,76
<i>M. eburnea</i>	<i>M. inositola</i>	45	98,77	94,21	-	93,85	96,76	96,4
<i>M. eburnea</i>	<i>M. pallida</i>	45	98,76	92,38	94,95	92,42	94,97	95,05
<i>M. echinospora</i>	<i>M. pallida</i>	45 (52)	98,91	95,98	96,9	96,51	94,81	96,78
<i>M. coerulea</i>	<i>M. echinofusca</i>	46	98,64	92,47	96,17	94,51	94,81	95,55
<i>M. coxensis</i>	<i>M. halophytica</i>	47	99,32	96,08	-	97,09	95,98	95,72
<i>M. halophytica</i>	<i>M. siamensis</i>	47	98,53	94,63	95,91	94,67	96,65	96,51
<i>M. citrea</i>	<i>M. coerulea</i>	48	98,71	91,41	95,55	94,02	95,87	95,65
<i>M. naratiwathensis</i>	<i>M. nigra</i>	48,3	98,57	-	-	-	-	-
<i>M. chersina</i>	<i>M. siamensis</i>	50	98,39	95,81	96,28	94,69	96,1	96,62
<i>M. chersina</i>	<i>M. eburnea</i>	51	98,9	95,11	95,54	96,35	96,64	96,83
<i>M. echinospora</i>	<i>M. sagamiensis</i>	52	99,18	97,04	94,91	97,42	93,82	96,9
<i>M. citrea</i>	<i>M. echinofusca</i>	53	99,12	94,69	96,93	96,17	97,21	97,18
<i>M. echinaurantiaca</i>	<i>M. viridifaciens</i>	53	99,12	93,4	94,35	95,15	97,02	96,2
<i>M. matsumotoense</i>	<i>M. rifamycinica</i>	53,6	98,03	97,05	98,35	93,34	97,68	97,28
<i>M. carbonacea</i>	<i>M. eburnea</i>	54	98,22	94,12	93,49	94,99	95,3	95,78
<i>M. eburnea</i>	<i>M. halophytica</i>	58	98,56	94,93	93,31	95,32	95,86	96,15
<i>M. inyonensis</i>	<i>M. sagamiensis</i>	61,3	99,45	-	-	-	-	-

\* Resultados de hibridación ADN-ADN obtenidos por Kasai *et al.* (2000), Hirsch *et al.* (2004), Kroppenstedt *et al.* (2005), Thawai *et al.* (2005a), Thawai *et al.* (2005b),

Trujillo *et al.* (2005), Trujillo *et al.* (2006), Trujillo *et al.* (2007), Thawai *et al.* (2007), Ara y Kudo (2007), Huang *et al.* (2008), Jongrungruangchok *et al.* (2008a) y Jongrungruangchok *et al.* (2008b).

( ) Valores de la hibridación recíproca.

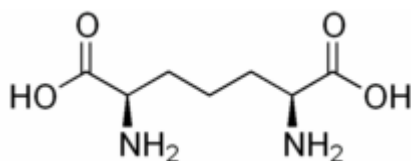
## 4.6 Quimiotaxonomía

Para poder caracterizar correctamente el género *Micromonospora* se hace necesario un análisis quimiotaxonómico de las cepas de estudio a través del cual podemos determinar si estas cepas cumplen las características de quimiotaxonomía típicas del género. Los análisis realizados a este respecto fueron: los isómeros del ácido diaminopimélico, los azúcares celulares, el contenido de menaquinonas, los ácidos grasos presentes y su proporción y el perfil de lípidos polares.

Estos estudios se llevaron a cabo para 15 cepas seleccionadas a partir del análisis filogenético anteriormente presentado. Se tomaron las cepas que podrían representar nuevas especies del género, que fueron seis obtenidas de los nódulos de Cañizal, tres obtenidas de la rizosfera de Cañizal y seis de los nódulos de Salamanca, estas cepas en su mayoría son representantes de un grupo más amplio de características moleculares muy similares.

### 4.6.1. Estudio de isómeros del ácido diaminopimélico (DAP)

El ácido diaminopimélico es un aminoácido que puede estar presente en la pared celular, que juega un papel muy importante en la rigidez de la misma, uniéndose a moléculas de D-Alanina.



El análisis de DAP se realizó para un total de 43 cepas siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.7.3 de materiales y métodos obteniendo los resultados que se observan en las figuras 53 y 54.

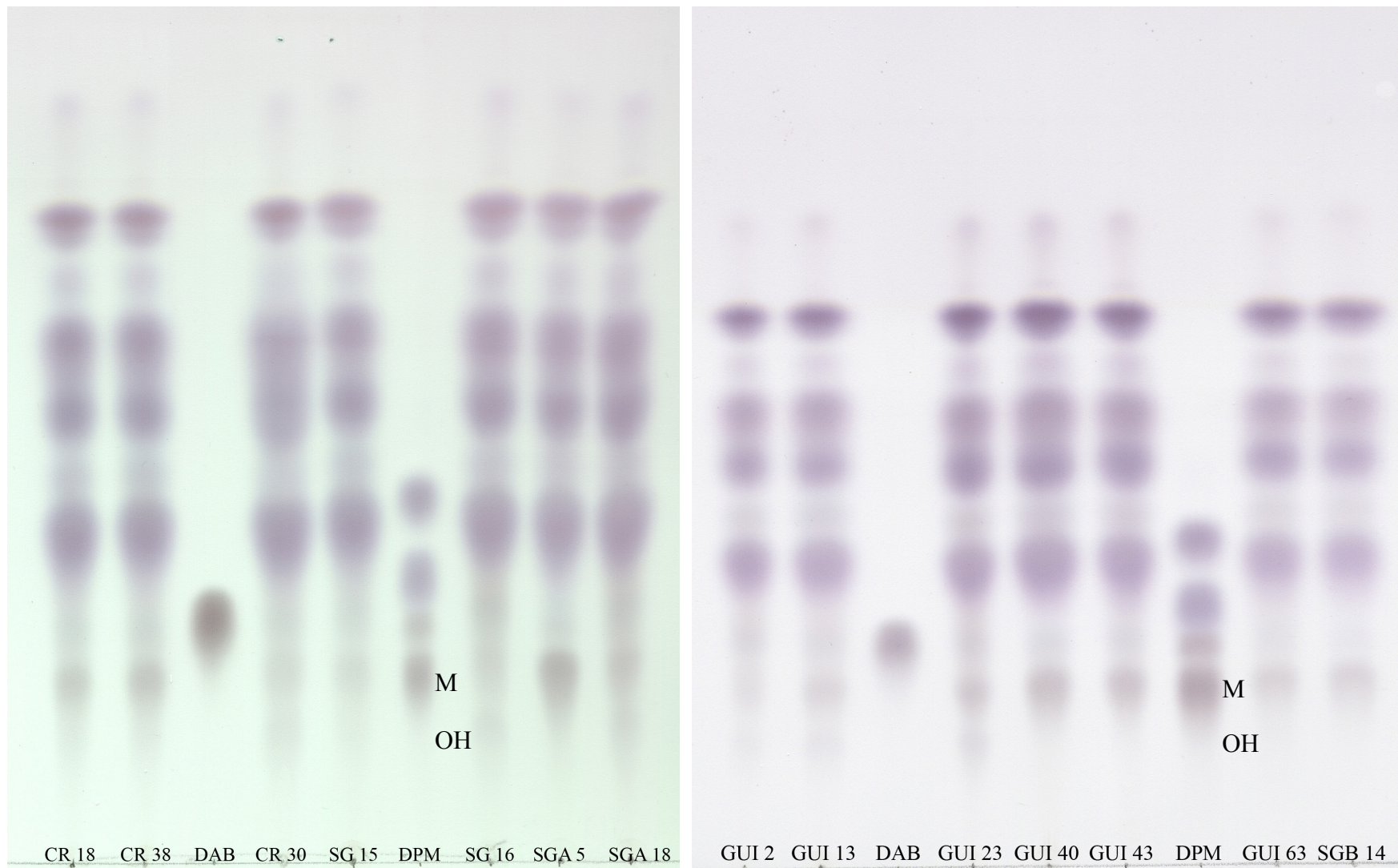


Fig. 53. Placas de celulosa sobre las que se muestra el análisis de isómeros del ácido diaminopimélico de las cepas estudiadas. M: *meso*-DAP, OH: OH-DAP. DAB: ácido 3,4-diaminobutírico, DPM: ácido 2,6-diaminopimélico.



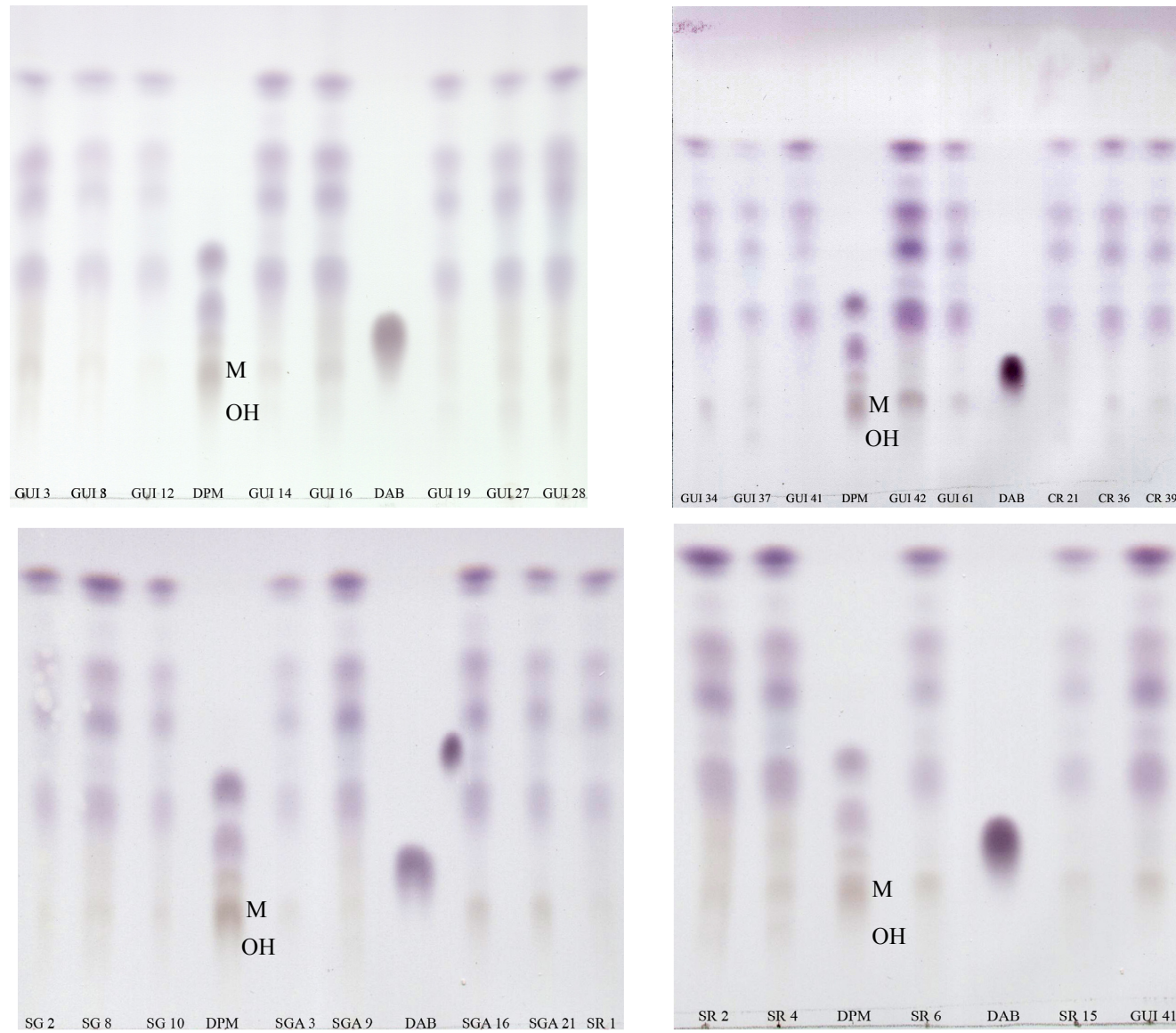


Fig. 33. Placas de celulosa sobre las que se muestra el análisis de isómeros del ácido diaminopimérico de las cepas estudiadas. M: *meso*-DAP, OH: OH-DAP. DAB: ácido 3,4-diaminobutírico, DPM: ácido 2,6-diaminopimérico.



Observando las placas podemos ver que todas las cepas estudiadas contienen el ácido *meso*-diaminopimélico (*m*-DAP), además las cepas GUI 2, GUI 3, GUI 8, GUI 13, GUI 14, GUI 16, GUI 23, GUI 27, GUI 28, GUI 37, GUI 42, CR 30, SG 8, SG 10, SG 16, SGA 16, SGA 18, SGA 21, SR 2 y SR 4 contienen también el isómero hidroxilado (OH-DAP).

La presencia de *m*-DAP en la pared celular se corresponde con una característica del género *Micromonospora*.

#### 4.6.2. Contenido en azúcares celulares totales

La composición de azúcares presenta con frecuencia información para la identificación y clasificación de algunas bacterias, sobre todo en bacterias Gram positivas y especialmente en actinomicetos. Los patrones de azúcares celulares totales forman parte de los quimiotipos de la pared celular propuestos por Lechevalier y Lechevalier (1970b). Para la clasificación bacteriana el análisis de azúcares celulares se suele llevar a cabo sobre células completas.

En la tabla 34 aparece un resumen de los azúcares presentes en cada cepa analizada. Los compuestos que aparecen más abundantemente en los microorganismos estudiados son ribosa, xilosa y glucosa. Algunas cepas, como la GUI 2, presentan cantidades importantes de manosa, y en las cepas CR 18, GUI 15 y *P. rubra* (DSM 44947<sup>T</sup>) aparece una marca destacable para la galactosa. Todas las cepas analizadas presentaron un perfil de tipo D (Tabla 2), que se corresponde con el género *Micromonospora* (Komagata y Suzuki, 1987). Según Tamura *et al.* (2006), el perfil de azúcares de la cepa *Polymorphospora rubra* (DSM 44947<sup>T</sup>) está formado por manosa, 3-*O*-metilmanosa, glucosa y galactosa, por lo que no se incluía en el perfil tipo D, sin embargo, al reanalizarla de nuevo, su perfil se corresponde perfectamente con el de las demás cepas estudiadas (Figura 55), apareciendo galactosa, glucosa, ribosa y xilosa pero no 3-*O*-metilmanosa.

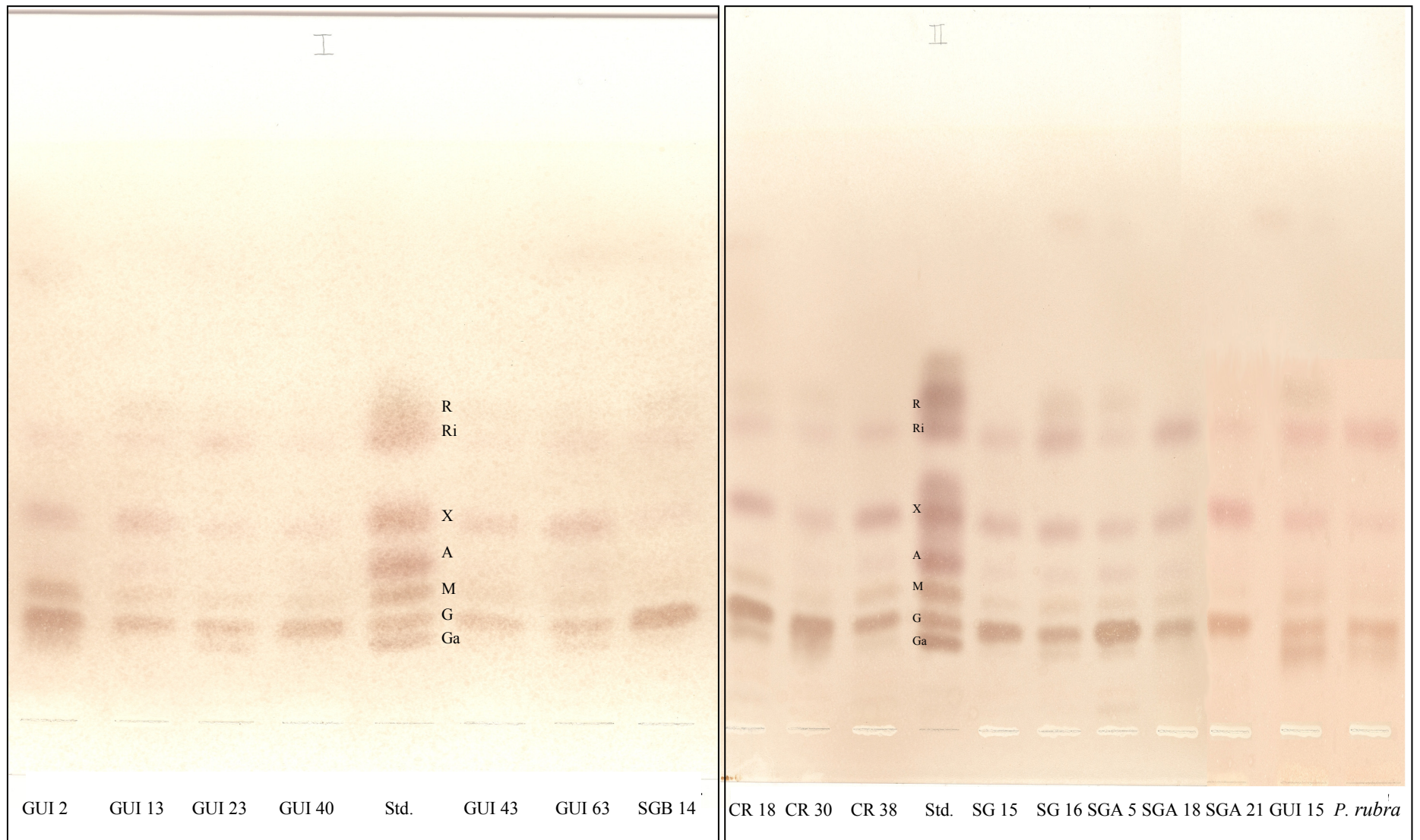


Fig. 55. Perfil de azúcares obtenido para las cepas de estudio. (A) Arabinosa, (Ga) Galactosa, (G) Glucosa, (M) Manosa, (R) Ramnosa, (Ri) Ribosa, (X) Xilosa.

### 4.6.3. Composición del perfil de menaquinonas

Una quinona es uno de los dos isómeros de la ciclohexanodiona o bien un derivado de los mismos (Figura 56). Su fórmula es  $C_6H_4O_2$ , químicamente presentan estructuras cíclicas que incluyen dos dobles enlaces carbono-oxígeno. Las quinonas juegan un importante papel en muchas de las reacciones redox que se producen en las células bacterianas, como pueden ser el transporte de electrones en la cadena respiratoria o en la fosforilación oxidativa. Son componentes de la membrana citoplasmática. Su valor taxonómico reside en las variaciones estructurales que poseen (Collins y Jones, 1981), variando la longitud de la cadena que se une al carbono 3 de 1 a 14 unidades de isopreno (de 5 a 70 átomos de carbono), así como su grado de saturación.

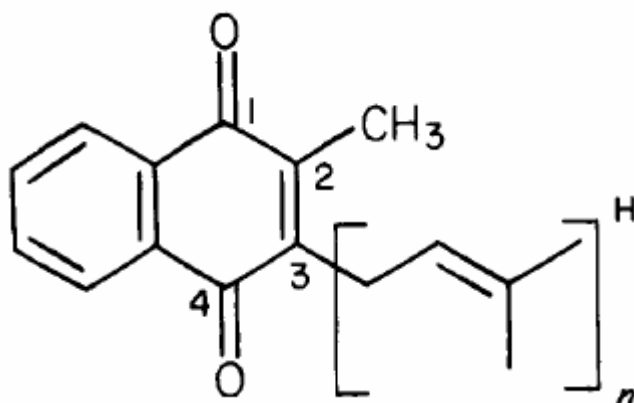


Fig. 56. Estructura de una menaquinona  
(2-metil, 3-poliisoprenilo, 1,4-naftoquinona)

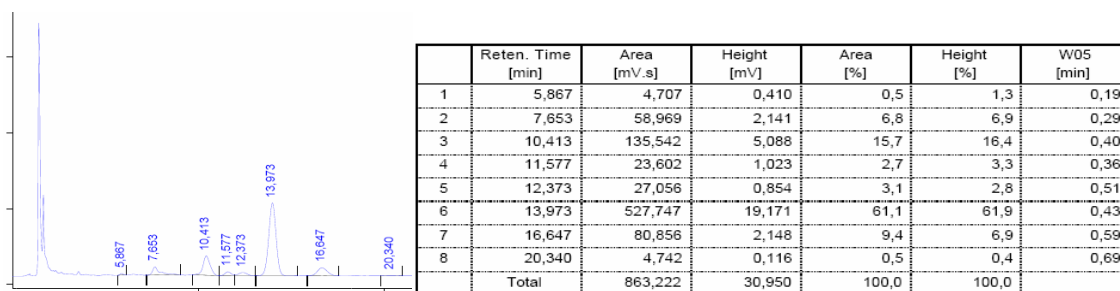
Para llevar a cabo una rápida y adecuada identificación de las menaquinonas existentes se utilizó la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Presión (H.P.L.C.), en base a la cual, y tras extraer las menaquinonas de las células completas, pudimos obtener los cromatogramas que se presentan a continuación (Figuras 57 a 60).

Una vez analizados cada uno de los cromatogramas y comparando con las cepas patrón, los resultados obtenidos mostraron que la mayoría de las cepas analizadas contenían las menaquinonas 9 (MK9) y 10 (MK10), salvo las cepas CR 18 y CR 38 que sólo incluyeron la menaquinona MK10. El 53% poseía la menaquinona MK10(H<sub>2</sub>), el 100% de los aislados poseían la menaquinona MK10(H<sub>4</sub>) y la menaquinona MK10(H<sub>6</sub>) y sólo el 13% poseía la menaquinona MK10(H<sub>8</sub>). En el 60% de los casos aparecía la

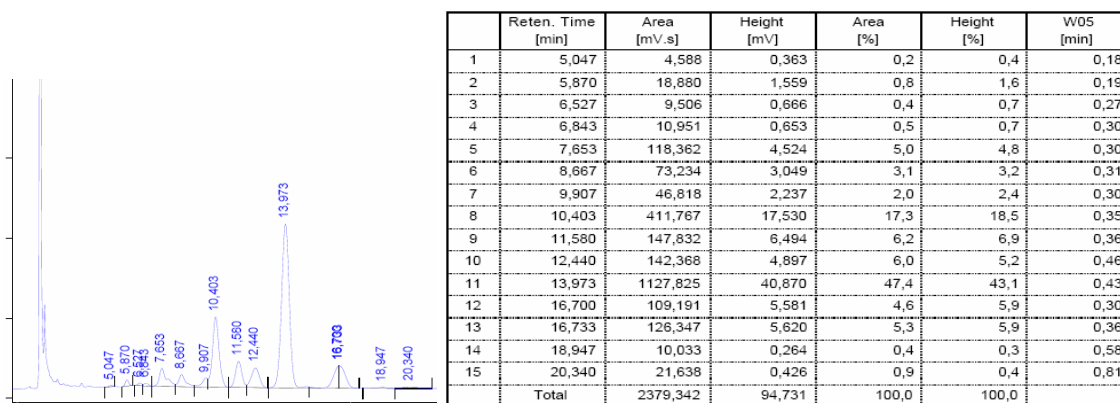
menaquinona MK9(H<sub>2</sub>), el 80% presentó la menaquinona MK9(H<sub>4</sub>), el 66% presentó la menaquinona MK9(H<sub>6</sub>) y sólo la cepa SGA 21 presentó la menaquinona MK9(H<sub>0</sub>) y la SGA 5 la menaquinona MK9 (H<sub>8</sub>).

Los datos obtenidos coinciden con los generalmente producidos para especies del género *Micromonospora*, pero además se observan diferencias notables en los porcentajes y los tipos de quinonas que pueden ser importantes a la hora de diferenciar entre especies. Esta alta variabilidad en la composición de menaquinonas dentro del género *Micromonospora* ya había sido descrita en estudios anteriores (Koch *et al.*, 1996).

GUI 2



GUI 13



GUI 23

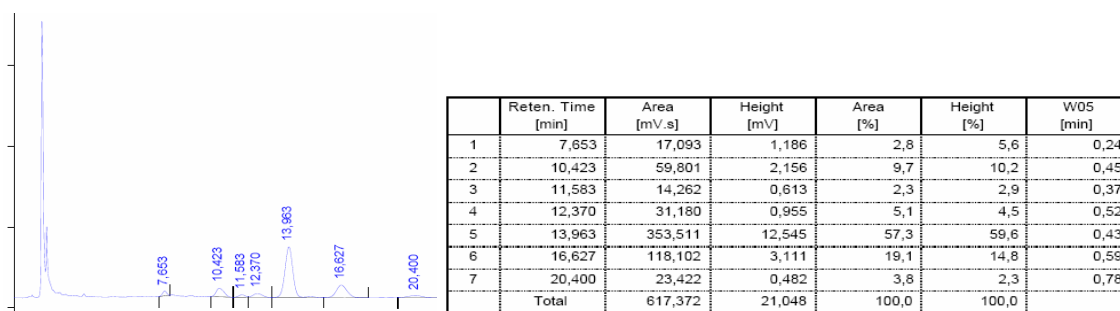
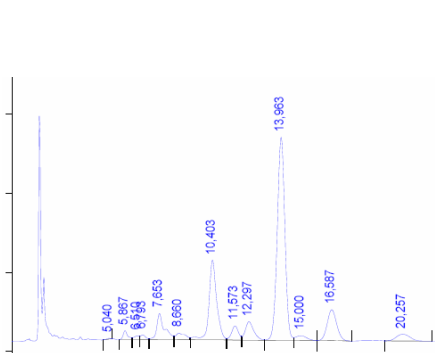


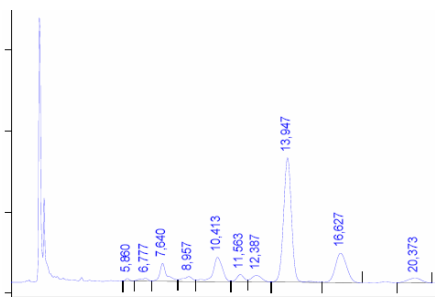
Fig. 57. Cromatogramas de las menaquinonas obtenidas por HPLC (I).

GUI 40



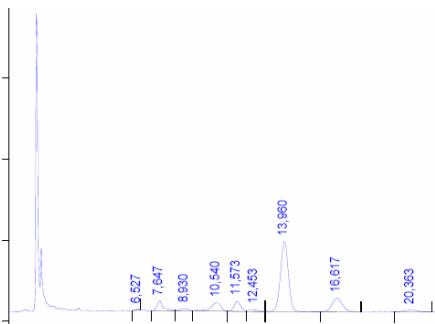
	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	5,040	2,761	0,205	0,1	0,2	0,21
2	5,867	36,055	2,223	1,2	2,2	0,22
3	6,510	17,599	0,952	0,6	0,9	0,38
4	6,793	22,498	1,205	0,8	1,2	0,32
5	7,653	183,441	6,606	6,3	6,4	0,30
6	8,660	59,247	1,682	2,0	1,6	0,69
7	10,403	564,283	20,163	19,3	19,5	0,39
8	11,573	89,363	3,581	3,1	3,5	0,38
9	12,297	143,113	4,671	4,9	4,5	0,46
10	13,963	1411,840	51,264	48,2	49,6	0,43
11	15,000	47,188	1,164	1,6	1,1	0,72
12	16,587	269,001	7,842	9,2	7,6	0,53
13	20,257	83,512	1,717	2,9	1,7	0,79
Total		2929,902	103,274	100,0	100,0	

GUI 43



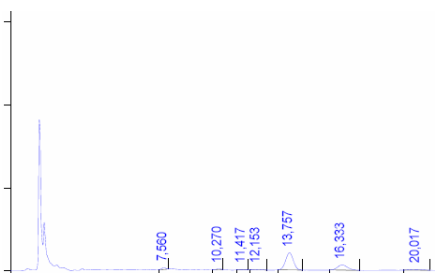
	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	5,960	9,414	0,636	0,6	1,1	0,20
2	6,777	21,976	0,736	1,3	1,3	0,55
3	7,640	108,638	4,430	6,5	8,0	0,28
4	8,957	41,561	1,207	2,5	2,2	0,63
5	10,413	199,751	6,019	11,9	10,8	0,47
6	11,563	45,975	1,819	2,7	3,3	0,39
7	12,387	58,746	1,610	3,5	2,9	0,59
8	13,947	855,689	30,672	50,9	55,2	0,43
9	16,627	283,747	7,241	16,9	13,0	0,62
10	20,373	55,084	1,156	3,3	2,1	0,77
Total		1680,562	55,526	100,0	100,0	

GUI 63



	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	6,527	2,742	0,227	0,3	0,8	0,20
2	7,647	54,652	2,438	6,4	8,3	0,27
3	8,930	18,165	0,587	2,1	2,0	0,56
4	10,540	77,717	2,057	9,1	7,0	0,51
5	11,573	59,250	2,480	6,9	8,5	0,37
6	12,453	15,862	0,454	1,9	1,5	0,64
7	13,960	480,984	17,242	56,2	58,8	0,43
8	16,617	124,064	3,360	14,5	11,5	0,57
9	20,363	22,307	0,458	2,6	1,6	0,79
Total		855,743	29,302	100,0	100,0	

CR 18

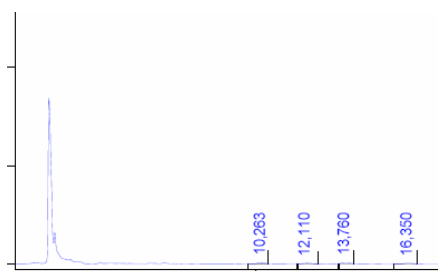


	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	7,560	5,560	0,405	3,2	6,3	0,23
2	10,270	2,790	0,175	1,6	2,7	0,27
3	11,417	2,088	0,119	1,2	1,9	0,30
4	12,153	3,430	0,132	2,0	2,1	0,43
5	13,757	110,477	4,144	63,2	64,8	0,42
6	16,333	43,359	1,257	24,8	19,6	0,54
7	20,017	7,158	0,169	4,1	2,6	0,72
Total		174,862	6,400	100,0	100,0	

Fig. 58. Cromatogramas de las menaquinonas obtenidas por HPLC (II).

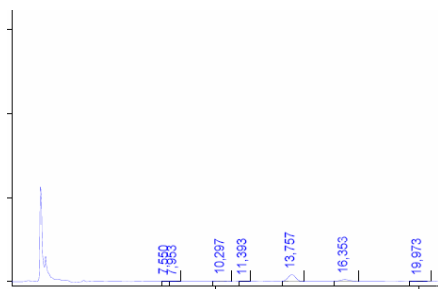


CR 30



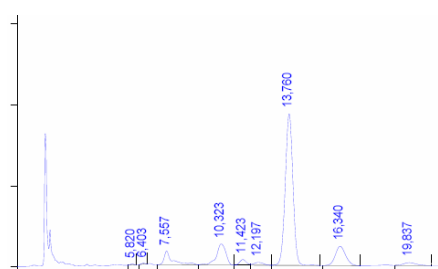
	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	10,263	4,353	0,229	25,2	29,7	0,30
2	12,110	3,639	0,141	21,0	18,3	0,39
3	13,760	5,421	0,260	31,3	33,8	0,36
4	16,350	3,885	0,140	22,5	18,2	0,43
Total		17,297	0,771	100,0	100,0	

CR38



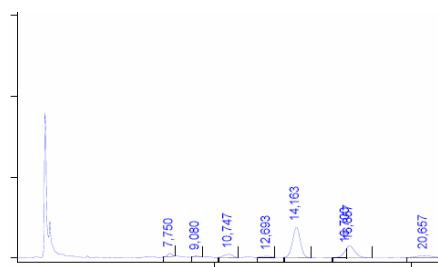
	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	7,550	1,364	0,093	2,1	3,9	0,26
2	7,953	1,320	0,068	2,1	2,9	0,38
3	10,297	2,801	0,105	4,4	4,4	0,45
4	11,393	0,972	0,050	1,5	2,1	0,34
5	13,757	41,616	1,596	65,2	66,9	0,42
6	16,353	13,742	0,420	21,5	17,6	0,53
7	19,973	1,972	0,055	3,1	2,3	0,60
Total		63,789	2,386	100,0	100,0	

SG 15



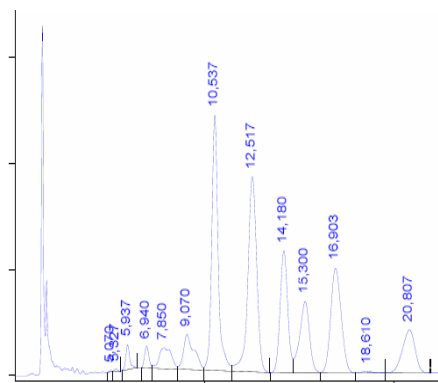
	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	5,820	2,993	0,274	0,2	0,5	0,19
2	6,403	2,978	0,221	0,2	0,4	0,22
3	7,557	106,759	3,424	6,9	6,3	0,28
4	10,323	175,934	5,246	11,3	9,7	0,48
5	11,423	33,027	1,408	2,1	2,6	0,37
6	12,197	23,733	0,704	1,5	1,3	0,56
7	13,760	1011,616	37,342	65,0	69,1	0,42
8	16,340	170,388	4,754	10,9	8,8	0,56
9	19,837	28,876	0,689	1,9	1,3	0,66
Total		1556,303	54,061	100,0	100,0	

SG 16



	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	7,750	12,346	0,838	3,3	5,5	0,24
2	9,080	5,367	0,323	1,4	2,1	0,27
3	10,747	23,636	0,777	6,3	5,1	0,52
4	12,693	8,198	0,264	2,2	1,7	0,54
5	14,163	202,523	7,401	53,6	48,7	0,43
6	16,700	24,034	2,249	6,4	14,8	0,16
7	16,857	77,253	2,873	20,5	18,9	0,43
8	20,657	24,221	0,460	6,4	3,0	0,84
Total		377,577	15,186	100,0	100,0	

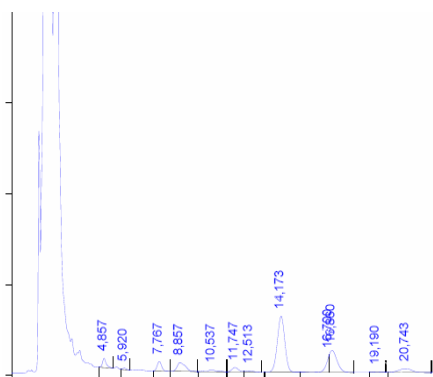
SGA 5



	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	5,070	2,437	0,233	4,699e-02	0,1	0,18
2	5,327	5,594	0,472	0,1	0,3	0,19
3	5,937	65,465	4,661	1,3	2,8	0,20
4	6,940	66,302	4,115	1,3	2,4	0,26
5	7,850	179,542	3,906	3,5	2,3	0,73
6	9,070	257,516	6,622	5,0	3,9	0,69
7	10,537	1134,446	48,095	21,9	28,4	0,33
8	12,517	1196,812	36,780	23,1	21,7	0,48
9	14,180	644,535	22,956	12,4	13,6	0,43
10	15,300	485,496	13,419	9,4	7,9	0,55
11	16,903	758,881	19,716	14,6	11,6	0,61
12	18,610	10,581	0,261	0,2	0,2	0,65
13	20,807	379,820	8,129	7,3	4,8	0,73
Total		5187,426	169,364	100,0	100,0	

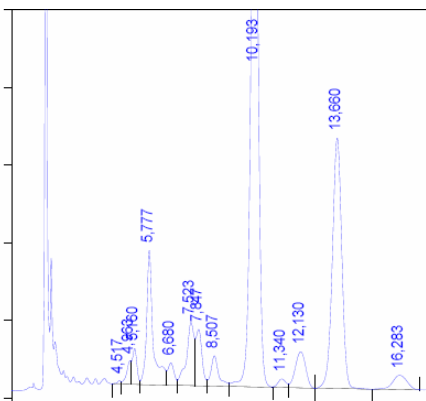
Fig. 59. Cromatogramas de las menaquinonas obtenidas por HPLC (III).

SGA 18



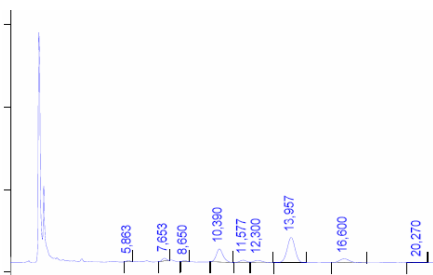
	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	4,857	27,758	2,058	3,8	6,8	0,19
2	5,920	4,013	0,320	0,5	1,1	0,20
3	7,767	34,885	2,138	4,8	7,1	0,25
4	8,857	58,516	1,948	8,0	6,5	0,50
5	10,537	14,659	0,451	2,0	1,5	0,36
6	11,747	23,920	0,966	3,3	3,3	0,37
7	12,513	8,154	0,297	1,1	1,0	0,49
8	14,173	341,913	12,322	46,8	40,9	0,43
9	16,700	41,800	3,750	5,7	12,5	0,15
10	16,860	130,142	4,863	17,8	16,1	0,43
11	19,190	4,065	0,145	0,6	0,5	0,47
12	20,743	40,528	0,838	5,5	2,8	0,78
Total		730,352	30,116	100,0	100,0	

SGA 21



	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	4,517	5,045	0,442	0,1	0,3	0,17
2	4,963	38,281	3,020	1,0	1,8	0,19
3	5,160	63,913	4,635	1,7	2,7	0,25
4	5,777	332,415	17,300	8,7	10,2	0,22
5	6,680	52,584	2,888	1,4	1,7	0,33
6	7,523	185,394	8,174	4,9	4,8	0,34
7	7,847	130,371	7,276	3,4	4,3	0,29
8	8,507	87,094	3,909	2,3	2,3	0,29
9	10,193	1781,340	82,815	46,8	48,6	0,33
10	11,340	25,636	1,112	0,7	0,7	0,39
11	12,130	140,692	4,657	3,7	2,7	0,48
12	13,660	886,642	32,269	23,3	18,9	0,42
13	16,283	76,624	1,863	2,1	1,1	0,65
Total		3808,033	170,360	100,0	100,0	

SGB 14



	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	5,863	4,078	0,360	1,3	2,8	0,19
2	7,653	9,343	0,653	2,9	5,1	0,24
3	8,650	3,250	0,238	1,0	1,9	0,23
4	10,390	74,373	3,182	22,9	25,0	0,35
5	11,577	13,079	0,570	4,0	4,5	0,36
6	12,300	16,144	0,560	5,0	4,4	0,44
7	13,957	168,132	6,099	51,7	48,0	0,43
8	16,600	34,221	0,977	10,5	7,7	0,53
9	20,270	2,756	0,070	0,8	0,6	0,69
Total		325,376	12,708	100,0	100,0	

Fig. 60. Cromatogramas de las menaquinonas obtenidas por HPLC (IV).

#### 4.6.4. Ácidos grasos

Los ácidos grasos son componentes esenciales de los lípidos celulares. La mayor proporción se encuentra formando parte de los lípidos polares y de los glicolípidos de la membrana celular. Los componentes fundamentales de los ácidos grasos celulares no cambian dependiendo de las condiciones de cultivo, pero la composición si puede verse afectada dependiendo del medio, la temperatura o el periodo de incubación. Por ello, para comparar un grupo de bacterias entre sí, las condiciones deben ser homogéneas para todas ellas (Komagata y Suzuki, 1987). En este análisis se mantuvieron las mismas condiciones para todos los aislados, tres días de crecimiento a 28°C en agitación (130 rpm) en los medios TSA y M65 (Ver apéndice).

Las cepas sobre las que se analizó la composición de ácidos grasos fueron, además de las 15 cepas seleccionadas como representantes, las otras 28 cepas utilizadas en el análisis filogenético. Todas ellas fueron crecidas tanto en el medio TSA como en el medio M65, sin embargo las cepas GUI 13, GUI 41, CR 21 y SG 2, no fueron capaces de crecer en el medio TSA y solamente fueron analizadas para el otro medio. Los resultados del análisis completo de ácidos grasos de las cepas utilizadas en este estudio se presentan en el Anexo I. En las tablas 32 y 33 se muestra una tabla resumen de los resultados obtenidos que incluye los porcentajes de los ácidos grasos mayoritarios y de los ácidos grasos característicos para el género *Micromonospora* (Kroppensted, 1985).

A la vista de los resultados, se confirma que las condiciones de cultivo en esta técnica son un punto crucial para poder realizar una buena comparación entre las cepas de estudio.

Atendiendo a los parámetros que engloban a las cepas a nivel de género, los resultados se corresponden perfectamente con los vistos para el género *Micromonospora*, ya que todos los aislados poseen los ácidos grasos iso-16:0 y/o iso-15:0, la mayoría presentan los ácidos grasos anteiso-15:0 o anteiso-17:0, y todos han presentado en mayor o menor grado el ácido graso 10 metil-17:0. Aún así tenemos diferencias suficientes para poder distinguir unas cepas de otras. Destacar en este caso la cepa SGA 5, la única cepa analizada que posee un porcentaje alto del ácido graso iso-



16:1 con un 11,22%. Además podemos observar que cepas muy similares presentan un perfil prácticamente idéntico en ambos medios, como es el caso de las cepas CR 30 y CR 36, que como habíamos visto en el análisis genético son cepas muy cercanas. Si analizamos las 15 cepas seleccionadas como representantes: GUI 2, GUI 13, GUI 23, GUI 40, GUI 43, GUI 63, CR 18, CR 30, CR 38, SG 15, SG 16, SGA 5, SGA 18, SGA 21 y SGB 14, podemos ver que utilizando los dos tipos de análisis, se diferencian prácticamente todas las cepas unas de otras en el contenido de sus ácidos grasos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 32. Comparación de los ácidos grasos principales de las cepas estudiadas en medio M65.

<b>M65</b>	iso-15:0	iso-16:0	iso-17:0	anteiso-15:0	anteiso-17:0	17:1 $\omega$ 8c	18:1 $\omega$ 9c	iso-17:1 $\omega$ 9c	Iso-16:1G	10metil-17:0
<b>GUI 2</b>	14,70	41,64		6,08				5,12		4,86
<b>GUI 3</b>	16,98	20,71		6,20	7,98					2,37
<b>GUI 8</b>	19,63	17,84			9,08			9,41		2,4
<b>GUI 12</b>	15,26	19,74	11,27		12,91					3,43
<b>GUI 13</b>	15,69	27,48		5,92	14,24					2,71
<b>GUI 14</b>	18,87	15,58			10,24	14,62				3,92
<b>GUI 15</b>	13,74	27,38		22,95	15,43					0,29
<b>GUI 16</b>	22,54	8,00				14,70	8,20			1,79
<b>GUI 19</b>	8,85	45,57			5,85			6,07		5,13
<b>GUI 23</b>	13,27	26,35			9,77		9,53			5,19
<b>GUI 27</b>	24,52	18,24		9,05		14,5				2,48
<b>GUI 28</b>	9,32	31,59				8,58	12,24			2,42
<b>GUI 34</b>	15,24	29,31			10,05			10,49		5,15
<b>GUI 37</b>	10,03	29,94				9,79	11,10			2,34
<b>GUI 40</b>	9,68	24,03	10,66		14,92					4,48
<b>GUI 41</b>	13,83	19,18		9,61	10,29					2,03
<b>GUI 42</b>	22,24	33,95		8,63				4,96		2,33
<b>GUI 43</b>	27,60	20,44				8,08		10,88		2,86
<b>GUI 61</b>	16,31	39,23	7,09					6,98		5,18
<b>GUI 63</b>	12,34	31,55				7,74	7,15			3,51
<b>CR 18</b>	20,58	19,31			11,25			16,30		2,26
<b>CR 21</b>	13,63	27,73		15,71				6,96		2,58
<b>CR 30</b>	17,87	29,33	7,85		8,38					2,47
<b>CR 36</b>	16,89	29,48	7,09		9,02					1,88
<b>CR 38</b>	10,01	22,15		8,61	9,11					3,38
<b>CR 39</b>	12,69	44,12			6,00			6,17		5,42
<b>SG 2</b>	13,83	40,54	5,38		7,22					2,83
<b>SG 8</b>	21,41	23,97				7,23		10,01		2,24
<b>SG 10</b>	20,12	14,84				9,29	10,17			2,09
<b>SG 15</b>	12,31	30,12					10,23	15,58		3,28
<b>SG 16</b>	19,13		14,9		17,47	9,29				0,84
<b>SGA 3</b>	13,89	21,15			15,48			12,07		3,10
<b>SGA 5</b>		24,01			9,14			12,34	11,22	3,48
<b>SGA 9</b>	8,75	34,69			12,84			8,33		5,12
<b>SGA 16</b>	11,17	33,75	6,94		9,97					3,36
<b>SGA 18</b>	6,52	34,14					16,93	5,93		3,66
<b>SGA 21</b>	20,67		13,5		10,71			9,04		6,39
<b>SGB 14</b>	10,76	18,25			8,65			20,99		3,52
<b>SR 1</b>	19,23	25,52					9,35	9,16		2,54
<b>SR 2</b>	9,21	40,55			6,52			7,83		5,11
<b>SR 4</b>	9,31	37,92				13,75	5,18			4,13
<b>SR 6</b>	10,92	22,71			10,00			11,97		2,50
<b>SR 15</b>	15,79	25,47	6,59			16,31				2,04

Tabla 33. Comparación de los ácidos grasos principales de las cepas estudiadas en medio TSA.

<b>TSA</b>	iso-15:0	iso-16:0	iso-17:0	anteiso-15:0	anteiso-17:0	17:1 $\omega$ 8c	iso-17:1 $\omega$ 9c	18:1 $\omega$ 9c	17:0	10metil-17:0
<b>GUI 2</b>	26,77	20,30				8,91	5,47			6,35
<b>GUI 3</b>	43,44	6,33	12,68				8,74			1,55
<b>GUI 8</b>	41,61		9,29			6,94	9,82			2,7
<b>GUI 12</b>	16,11		14,08		24,41		9,73			3,71
<b>GUI 14</b>	23,78	13,53				11,23	11,06			2,34
<b>GUI 15</b>	14,17	26,54		25,21	13,6					1,53
<b>GUI 16</b>	33,42		14,53		8,23		10,16			3,58
<b>GUI 19</b>	25,25	24,18			6,82		6,18			5,49
<b>GUI 23</b>	29,70		11,91				14,48	6,85		1,66
<b>GUI 27</b>	27,58	12,38			9,92				12,39	4,03
<b>GUI 28</b>	7,64	32,72				26,21			6,13	1,99
<b>GUI 34</b>	20,27	10,15	13,81		15,85		16,35			4,41
<b>GUI 37</b>	12,37	25,45	5,93			25,32				1,80
<b>GUI 40</b>	28,24		11,38		13,34		14,78			3,23
<b>GUI 42</b>	21,95	28,57				6,48	7,17			4,84
<b>GUI 43</b>	34,34	10,33	11,75				10,61			4,32
<b>GUI 61</b>	22,78	27,30	8,03						7,18	5,62
<b>GUI 63</b>	25,33	23,16				7,52			7,72	3,51
<b>CR 18</b>	18,94	22,80				17,37	7,25			1,68
<b>CR 30</b>	33,97	16,32		9,24	6,03					4,33
<b>CR 36</b>	21,81	31,20		5,92	7,49					2,27
<b>CR 38</b>	31,20			10,49	8,02	18,93				5,39
<b>CR 39</b>	31,46	19,83	5,88						6,10	4,93
<b>SG 8</b>	43,79		8,5			7,77	8,73			3,14
<b>SG 10</b>	36,27		12,55		6,74		10,3			2,51
<b>SG 15</b>	17,96	22,28				9,78	16,92			5,21
<b>SG 16</b>	25,48		18,1		13,47		14,14			0,88
<b>SGA 3</b>	17,96		12,6		20,76		17,3			3,04
<b>SGA 5</b>	17,17	16,33				8,1	19,89			3,86
<b>SGA 9</b>	17,69	24,7			13,28		8,14			4,07
<b>SGA 16</b>	27,82	19,81	9,82		11,8					3,54
<b>SGA 18</b>	10,18	36,55				9,54	5,93			12,54
<b>SGA 21</b>	14,3	31,06				6,64	18,04			4,31
<b>SGB 14</b>	17,31	14,27				10,04	23,4			4,07
<b>SR 1</b>	34,25	8,86				10,02			8,20	5,04
<b>SR 2</b>	23,33	16,86				13,14			8,87	6,40
<b>SR 4</b>	15,91	18,58				33,65			7,19	1,23
<b>SR 6</b>	8,29	21,2			8,09		20,23			6,94
<b>SR 15</b>	9,92	32,46				7,47	7,98			9,41

#### 4.6.5. Lípidos polares

La membrana citoplasmática de todas las células vivas, a excepción de las arqueas, esta formada por fosfolípidos que están esterificados en la posición 1 y 2 con cadenas de ácidos grasos. En la posición 3 de la molécula de glicerol se unen grupos de moléculas polares como la fosfatidiletanolamina (PE) o la fosfatidilcolina (PC) mediante enlaces fosfodiéster. Los fosfolípidos se encuentran en la membrana formando una bicapa, en la que los grupos polares están hacia el medio acuoso, mientras que las cadenas hidrofóbicas están enfrentadas construyendo una capa semifluida en la que se encuentran embebidas las proteínas. Los fosfolípidos son los lípidos polares más comunes, pero también se incluyen en este grupo los glicolípidos, los esfingolípidos o el colesterol entre otros. Los fosfolípidos se extraen de las células con facilidad a través de disolventes orgánicos. Esta separación se realiza mediante cromatografía en capa fina.

El género *Micromonospora* se caracteriza por pertenecer al grupo II de los actinomicetos establecidos por el tipo de fosfolípidos (Lechevalier *et al.*, 1977), es decir, que se caracteriza por la presencia de fosfatidiletanolamina (PE).

Los perfiles de lípidos de las 15 cepas de estudio se revelaron con ninhidrina (hidrato de tricetohidrindeno), azul de molibdeno y p-anisaldehído una vez separados los fosfolípidos a través de cromatografía en capa fina en sílice. Las manchas o bandas obtenidas son muy compactas y es posible por lo tanto detectar compuestos a concentraciones muy bajas. El análisis que se realizó fue de tipo cualitativo, no cuantitativo, para observar la presencia o ausencia de los distintos fosfolípidos.

Al añadir p-anilsaldehído a las placas pueden aparecer sobre ellas marcas de diferentes colores para distintos compuestos (azúcares libres, saponinas tipo avenacósidos, saponinas tipo avenacina, galactosilgliceridos, lisofosfátidos...). En nuestro caso, los fosfolípidos buscados se ven de un color morado, y se puede observar que todas las cepas analizadas presentan un patrón muy similar típico de *Micromonospora*. Destacar la presencia de tres manchas moradas en las figuras 62 a 65 columna a, arriba a la derecha (PE), arriba a la izquierda (difosfatidilglicerol –DPG-) y abajo (fosfatidilinositol –PI-), se puede observar alguna mancha más, pero de modo

mucho más tenue, y la presencia de fosfo-azúcares, que quedan reflejados en la zona inferior a la izquierda como una línea marrón-verdosa.

El azul de molibdeno es una mezcla que incluye trióxido de molibdeno disuelto en ácido sulfúrico, que al ser añadido sobre las placas se une a los compuestos de ésteres fosfatos dando lugar a manchas azules. En las cepas analizadas que se muestran en las figuras 62 a 65 columna b, podemos observar un patrón muy similar al obtenido cuando se roció con p-anisaldehído para los fosfolípidos, ya que en este caso sólo aparecen las manchas que se corresponden con fosfolípidos. En todas las muestras obtenemos las tres manchas principales que se corresponden con PE, DPG y PI, y otras manchas mucho más tenues, confirmando así los resultados obtenidos con el anisaldehído.

La ninhidrina posee una reacción específica con los grupos amino que quedan libres (Figura 61), por ello los fosfolípidos que posean estos grupos se van a poder observar debido a las manchas de color malva que aparecen tras la reacción.

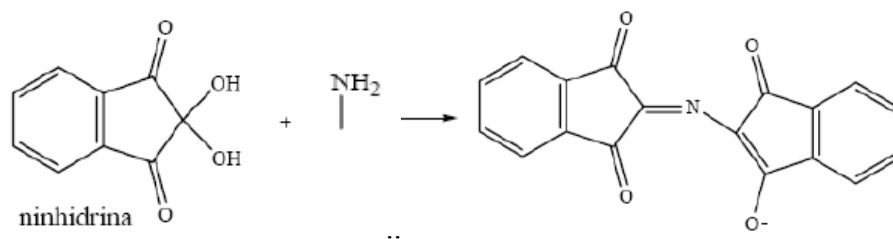


Figura 61. Reacción de la ninhidrina con grupos amino libres.

Para la ninhidrina, lo que podemos observar en todos los aislados, es una mancha que se corresponde con la fosfatidiletanolamina (Figuras 62 a 65 columna c), fosfolípido característico del género *Micromonospora*. Además, en algunas cepas se observó que esta mancha era doble, existiendo un posible segundo fosfolípido. Para confirmar su presencia, se repitió la cromatografía, incluida la extracción, hasta en tres ocasiones, obteniendo siempre el mismo resultado. Sin embargo, no fue posible identificar el fosfolípido correspondiente. Esto se puede observar en las cepas SG 15, SGA 5 y SGA 21 (Figuras 64 y 65 columna c).

Todas las cepas presentaban fosfatidiletanolamina, que es un marcador diagnóstico que se corresponde con el patrón II de Lechevalier *et al.* (1977) en el que se incluye el género *Micromonospora*.

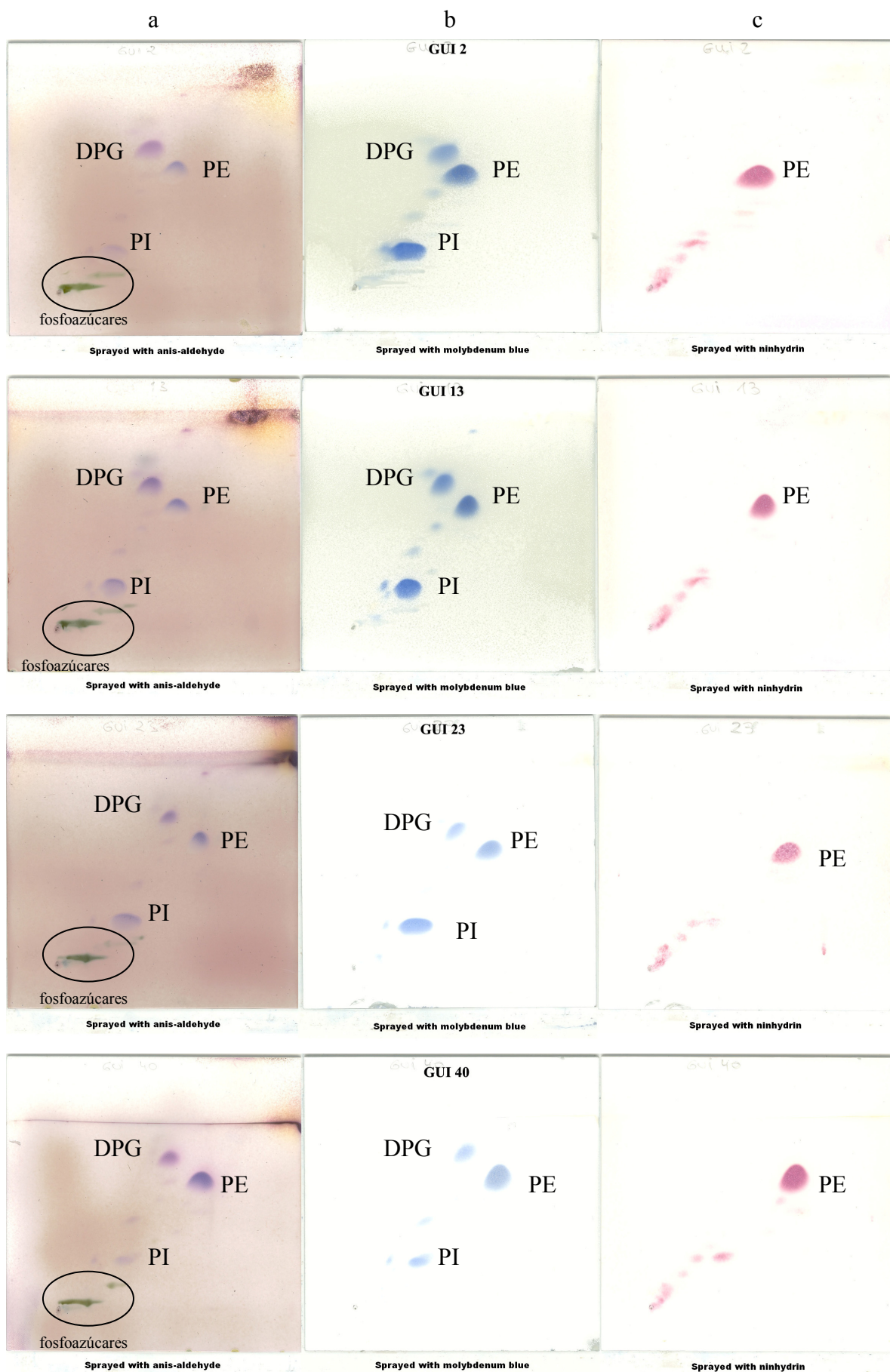


Fig. 62. Cromatografía en capa fina de lípidos polares de las cepas de estudio (I).



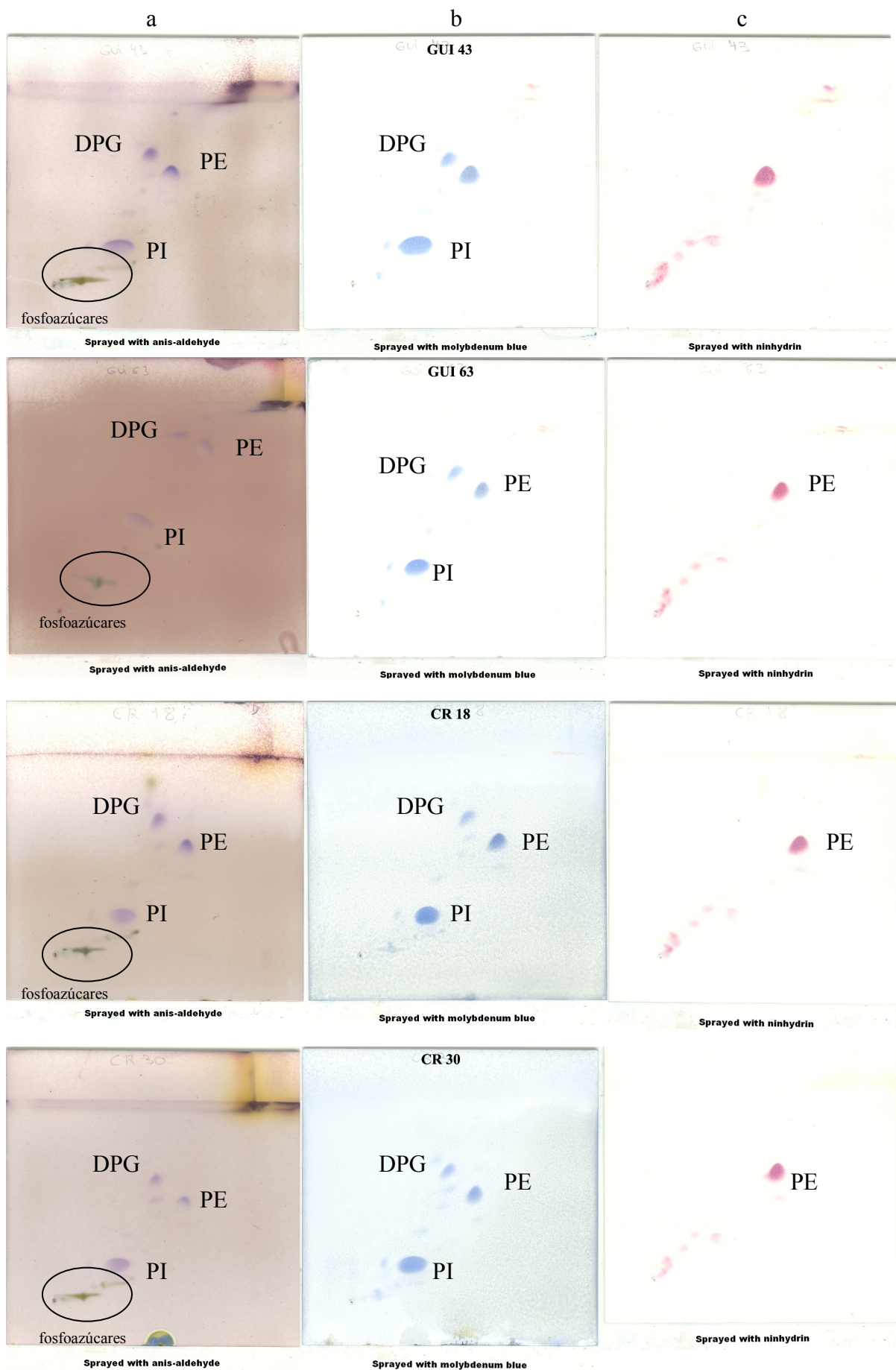


Fig. 63. Cromatografía en capa fina de lípidos polares de las cepas de estudio (II).

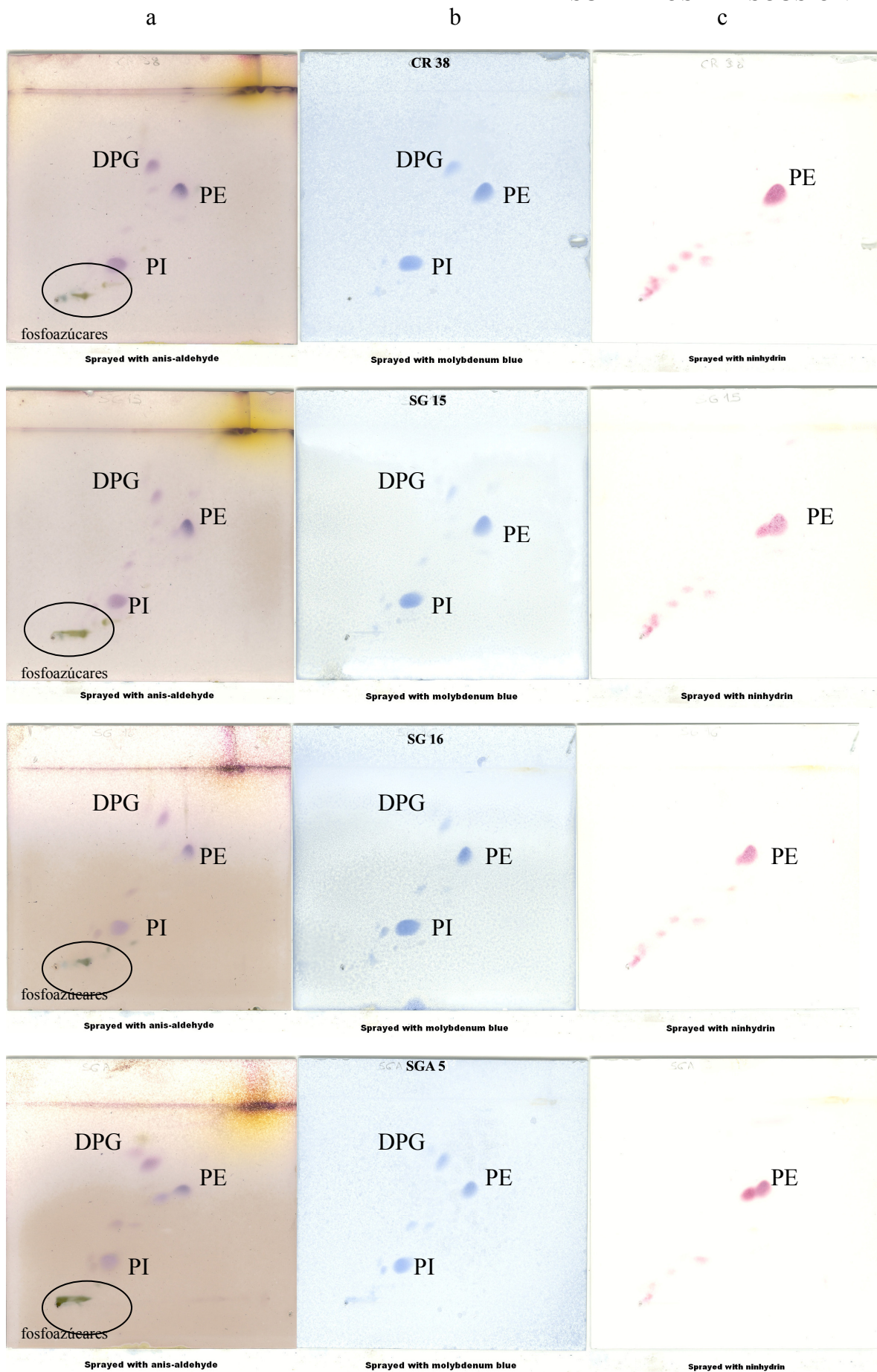


Fig. 64. Cromatografía en capa fina de lípidos polares de las cepas de estudio (III).



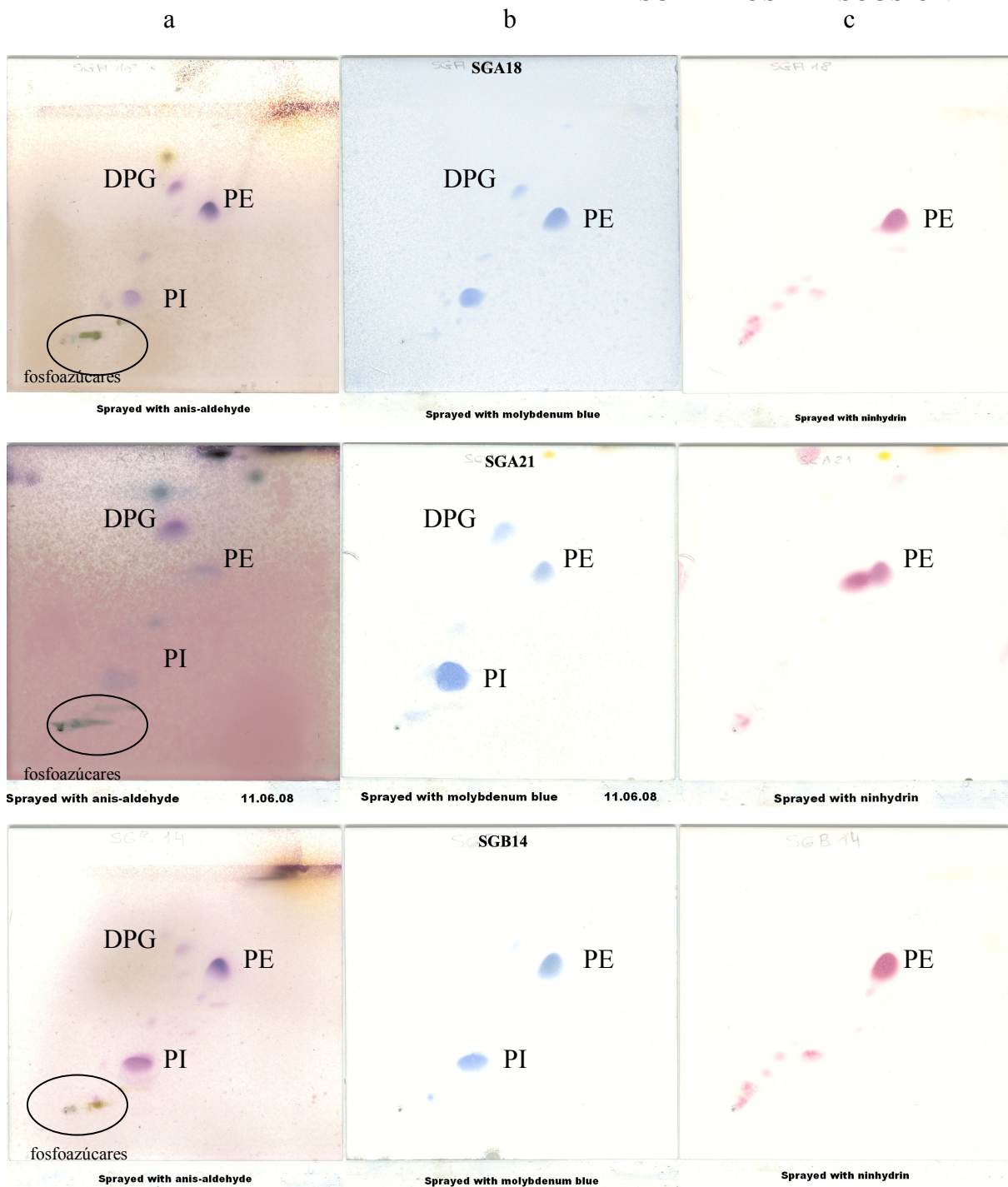


Fig. 65. Cromatografía en capa fina de lípidos polares de las cepas de estudio (IV).

Un resumen de los resultados obtenidos para las cepas en las que se analizó la quimiotaonomía se muestra en la tabla 34, en la que aparecen los principales componentes encontrados para cada una de las cinco pruebas analizadas.

Tabla 34. Resumen de los marcadores quimiotaxonómicos de las cepas de estudio.

	Menaquinonas	DAP	Ácidos grasos M65	Ácidos grasos TSA	Lípidos polares	Azúcares celulares
GUI 2	MK-10 (H <sub>2</sub> ,H <sub>4</sub> ,H <sub>6</sub> ), MK-9 (H <sub>2</sub> ,H <sub>4</sub> ,H <sub>6</sub> )	OH-dap, Dap	iso-16:0, iso-15:0, anteiso-15:0, 9methyl-16:0	iso-15:0, iso-16:0, cis9-17:1, anteiso-15:0	PE, DPG, PI	Galactosa, glucosa, manosa, xilosa, ribosa
GUI 3		OH-dap, Dap	iso-16:0, iso-15:0, anteiso-17:0, anteiso-15:0	iso-15:0, iso-17:0, 9methyl-16:0, anteiso-17:0		
GUI 8		OH-dap, Dap	iso-15:0, iso-16:0, 9methyl-16:0, anteiso-17:0	iso-15:0, 9methyl-16:0, iso-17:0, cis9-17:1		
GUI 12		Dap	iso-16:0, iso-15:0, anteiso-17:0, iso-17:0	anteiso-17:0, iso-15:0, iso-17:0, 9methyl-16:0		
GUI 13	MK-10 (H <sub>2</sub> ,H <sub>4</sub> ,H <sub>6</sub> ), MK-9 (H <sub>2</sub> ,H <sub>4</sub> ,H <sub>6</sub> )	OH-dap, Dap	iso-16:0, iso-15:0, anteiso-17:0, anteiso-15:0		PE, DPG, PI	Glucosa, manosa, arabinosa, xilosa, ribosa, ramnosa
GUI 14		OH-dap, Dap	iso-15:0, iso-16:0, cis9-17:1, anteiso-17:0	iso-15:0, iso-16:0, cis9-17:1, 9methyl-16:0		
GUI 16		OH-dap, Dap	iso-15:0, cis9-17:1, anteiso-17:0, cis9-18:1	iso-15:0, iso-17:0, 9methyl-16:0, anteiso-17:0		
GUI 19		OH-dap, Dap	iso-16:0, iso-15:0, 9methyl-16:0, anteiso-17:0	iso-15:0, iso-16:0, anteiso-17:0, 9methyl-16:0		
GUI 23	MK-10 (H <sub>2</sub> ,H <sub>4</sub> ,H <sub>6</sub> ), MK-9 (H <sub>2</sub> ,H <sub>4</sub> ,H <sub>6</sub> )	OH-dap, Dap	iso-16:0, iso-15:0, anteiso-17:0, w9c-18:1	iso-15:0, 9methyl-16:0, iso-17:0, anteiso-17:0	PE, DPG, PI	Galactosa, glucosa, manosa, xilosa, ribosa
GUI 27		OH-dap, Dap	iso-15:0, iso-16:0, cis9-17:1, anteiso-15:0	iso-15:0, iso-17:0, iso-16:0, anteiso-17:0		
GUI 28		OH-dap, Dap	iso-16:0, cis9-18:1, iso-15:0, cis9-17:1	iso-16:0, cis9-17:1, iso-15:0, 17:0		
GUI 34		Dap	iso-16:0, iso-15:0, w9c-iso-17:1, anteiso-17:0	iso-15:0, 9methyl-16:0, anteiso-17:0, iso-17:0		
GUI 37		OH-dap, Dap	iso-16:0, cis9-18:1, iso-15:0, cis9-17:1	iso-16:0, cis9-17:1, iso-15:0, iso-17:0		
GUI 40	MK-10 (H <sub>2</sub> ,H <sub>4</sub> ,H <sub>6</sub> ), MK-9 (H <sub>2</sub> ,H <sub>4</sub> ,H <sub>6</sub> )	Dap	iso-16:0, anteiso-17:0, iso-17:0, iso-15:0	iso-15:0, 9methyl-16:0, anteiso-17:0, iso-17:0	PE, DPG, PI	Glucosa, manosa, xilosa, ribosa
GUI 41		Dap	iso-16:0, iso-15:0, anteiso-17:0, anteiso-15:0			
GUI 42		OH-dap, Dap	iso-16:0, iso-15:0, anteiso-15:0, iso-14:0	iso-16:0, iso-15:0, 9methyl-16:0, anteiso-15:0		
GUI 43	MK-10 (H <sub>2</sub> ,H <sub>4</sub> ,H <sub>6</sub> ), MK-9 (H <sub>2</sub> ,H <sub>4</sub> ,H <sub>6</sub> )	Dap	iso-15:0, iso-16:0, 9methyl-16:0, cis9-17:1	iso-15:0, iso-17:0, 9methyl-16:0, iso-16:0	PE, DPG, PI	Glucosa, manosa, xilosa, ribosa, ramnosa
GUI 61		Dap	9methyl-16:0, iso-16:0, iso-15:0, anteiso-17:0	iso-16:0, iso-15:0, iso-17:0, anteiso-17:0		
GUI 63	MK-10 (H <sub>2</sub> ,H <sub>4</sub> ,H <sub>6</sub> ), MK-9 (H <sub>2</sub> ,H <sub>4</sub> )	Dap	iso-16:0, iso-15:0, cis9-18:1, anteiso-17:0	iso-15:0, iso-16:0, 17:0, cis9-17:1	PE, DPG, PI	Galactosa, glucosa, manosa, xilosa, ribosa, ramnosa
CR 18	MK-10 (H <sub>4</sub> ,H <sub>6</sub> )	Dap	iso-15:0, iso-16:0, 9methyl-16:0, anteiso-17:0	iso-16:0, iso-15:0, 9cis-17:1, 9methyl-16:0	PE, DPG, PI	Galactosa, glucosa, manosa, xilosa, ribosa, ramnosa
CR 21		Dap	iso-16:0, iso-15:0, anteiso-17:0, cis9-18:1			
CR 30	MK-10 (H <sub>2</sub> ,H <sub>4</sub> ), MK-9 (H <sub>4</sub> ,H <sub>6</sub> )	OH-dap, Dap	iso-16:0, iso-15:0, anteiso-17:0, iso-17:0	iso-15:0, iso-16:0, anteiso-15:0, anteiso-17:0	PE, DPG, PI	Galactosa, glucosa, manosa, xilosa, ribosa, ramnosa
CR 36		Dap	iso-16:0, iso-15:0, anteiso-17:0, iso-17:0	iso-16:0, iso-15:0, anteiso-17:0, anteiso-15:0		
CR 38	MK-10 (H <sub>4</sub> ,H <sub>6</sub> )	Dap	iso-16:0, iso-15:0, anteiso-17:0, anteiso-15:0	iso-15:0, cis9-17:1, anteiso-15:0, anteiso-17:0	PE, DPG, PI	Glucosa, manosa, xilosa, ribosa
CR 39		Dap	iso-16:0, iso-15:0, w9c-iso-17:1, anteiso-17:0	iso-15:0, iso-16:0, 17:0, anteiso-15:0		
SG 2		Dap	iso-16:0, iso-15:0, anteiso-17:0, iso-17:0			
SG 8		OH-dap, Dap	iso-15:0, iso-16:0, cis9-18:1, cis9-17:1	iso-15:0, 9methyl-16:0, iso-17:0, cis9-17:1		
SG 10		OH-dap, Dap	iso-15:0, iso-16:0, w9c-18:1, w8c-17:1	iso-15:0, iso-17:0, 9methyl-16:0, anteiso-17:0		
SG 15	MK-10 (H <sub>2</sub> ,H <sub>4</sub> ), MK-9 (H <sub>2</sub> ,H <sub>4</sub> )	Dap	iso-16:0, 9methyl-16:0, iso-15:0, cis9-18:1	iso-16:0, iso-15:0, 9methyl-16:0, cis9-17:1	PE, DPG, PI	Glucosa, manosa, arabinosa, xilosa, ribosa
SG 16	MK-10 (H <sub>4</sub> ,H <sub>6</sub> ), MK-9 (H <sub>4</sub> ,H <sub>6</sub> )	OH-dap, Dap	iso-15:0, anteiso-17:0, iso-17:0, cis9-17:1	iso-15:0, iso-17:0, 9methyl-16:0, anteiso-17:0	PE, DPG, PI	Galactosa, glucosa, manosa, arabinosa, xilosa, ribosa, ramnosa
SGA 3		Dap	iso-16:0, anteiso-17:0, iso-15:0, 9methyl-16:0	anteiso-17:0, iso-15:0, 9methyl-16:0, iso-17:0		
SGA 5	MK-10 (H <sub>2</sub> ,H <sub>4</sub> ,H <sub>6</sub> ), MK-9 (H <sub>4</sub> ,H <sub>6</sub> ,H <sub>8</sub> )	Dap	iso-16:0, 9methyl-16:0, isog-16:1, anteiso-17:0	9methyl-16:0, iso-15:0, iso-16:0, cis9-17:1	PE, DPG, PI	Galactosa, glucosa, manosa, arabinosa, xilosa, ribosa, ramnosa
SGA 9		Dap	iso-16:0, anteiso-17:0, iso-15:0, 9methyl-16:0	iso-16:0, iso-15:0, anteiso-17:0, 9methyl-16:0		
SGA 16		OH-dap, Dap	iso-16:0, iso-15:0, anteiso-17:0, iso-17:0	iso-15:0, iso-16:0, anteiso-17:0, iso-17:0		
SGA 18	MK-10 (H <sub>2</sub> ,H <sub>4</sub> ,H <sub>6</sub> ), MK-9 (H <sub>2</sub> ,H <sub>4</sub> ,H <sub>6</sub> )	OH-dap, Dap	iso-16:0, iso-15:0, 9methyl-16:0, anteiso-17:0	iso-16:0, 10methyl-17:0, iso-15:0, cis9-17:1	PE, DPG, PI	Glucosa, manosa, arabinosa, xilosa, ribosa
SGA 21	MK-10 (H <sub>2</sub> ,H <sub>4</sub> ,H <sub>6</sub> ), MK-9 (H <sub>6</sub> ,H <sub>2</sub> ,H <sub>4</sub> ,H <sub>6</sub> )	OH-dap, Dap	iso-15:0, iso-17:0, anteiso-17:0, 9methyl-16:0	iso-16:0, 9methyl-16:0, iso-15:0, cis9-17:1	PE, DPG, PI	Glucosa, ribosa, xilosa
SGB 14	MK-10 (H <sub>4</sub> ,H <sub>6</sub> ,H <sub>8</sub> ), MK-9 (H <sub>2</sub> )	Dap	w9c-iso-17:1, iso-16:0, iso-15:0, anteiso-17:0	9methyl-16:0, iso-15:0, iso-16:0, cis9-17:1	PE, DPG, PI	Glucosa, xilosa, ribosa, ramnosa
SR 1		Dap	iso-16:0, iso-15:0, w9c-iso-17:1, w8c-17:1	iso-15:0, cis9-17:1, iso-16:0, 17:0		
SR 2		OH-dap, Dap	iso-16:0, iso-15:0, w9c-iso-17:1, anteiso-17:0	iso-15:0, iso-16:0, 17:0, 10methyl-17:0		
SR 4		OH-dap, Dap	iso-16:0, w8c-17:1, iso-15:0, w9c-iso-17:1	cis9-17:1, iso-16:0, iso-15:0, 17:1		
SR 6		Dap	iso-16:0, w9c-iso-17:1, iso-15:0, anteiso-17:0	iso-16:0, 9methyl-16:0, iso-15:0, anteiso-17:0		
SR 15		Dap	iso-16:0, w8c-17:1, iso-15:0, iso-17:0	iso-16:0, iso-15:0, 10methyl-17:0, 9methyl-16:0		

■ Cepas representantes.



## 4.7 Estudios de fisiología

### 4.7.1. Microscopía y tinción de Gram

Las 112 cepas aisladas y las 33 cepas tipo del género *Micromonospora* estudiadas se examinaron bajo microscopio de contraste de fases (Zeiss®) con un objetivo 100X (Leica CTR Mic), (Figura 66). Todas ellas poseían un micelio ramificado y, tras 3 o 4 semanas de incubación, un elevado número de esporas, que en la mayoría de los casos se presentaban como esporas únicas. Con respecto a la tinción de Gram se observó que todas las cepas eran Gram positivas.

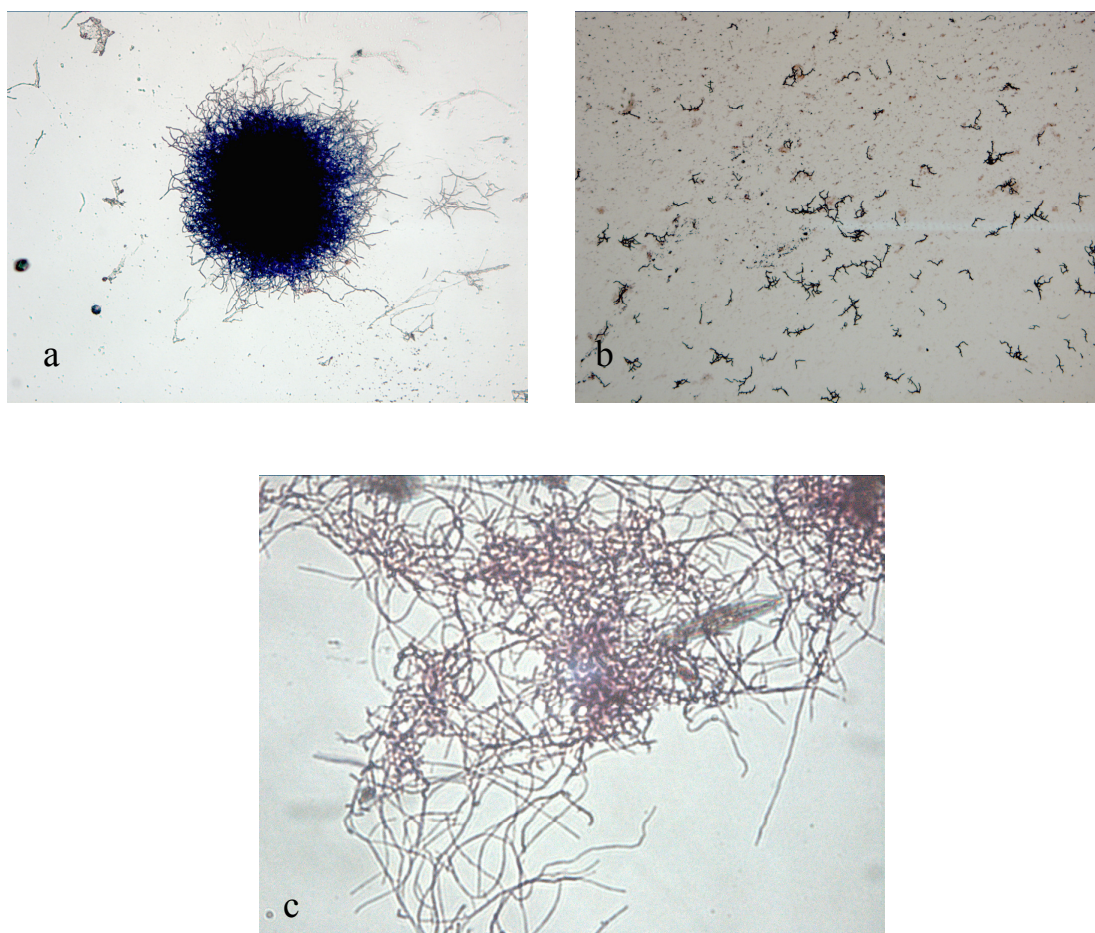


Fig. 66. Microfotografía de GUI 3 (a), GUI 8(b) y GUI 4(c) a distintos aumentos.

#### 4.7.2. Características del cultivo y morfología

El mejor crecimiento para todas las cepas aisladas se produjo en el medio SA1, de modo intermedio en los medios YMA y Bennett y de forma bastante rala en el medio de Avena. Los pigmentos difundibles se distinguieron mejor en el medio de Avena, a pesar de ser el medio en el que menos crecían los microorganismos.

##### a. Microorganismos aislados a partir de nódulos

La textura de las colonias variaba de unas cepas a otras, sin embargo todas ellas aparecían adheridas al medio de cultivo de un modo más o menos fuerte (Figura 67). En su mayoría presentaban tonos anaranjados al comienzo de su crecimiento, oscureciéndose después a tonos más oscuros llegando, en algunos casos, a un color negro. Esto es debido fundamentalmente a que la formación de esporas en el micelio vegetativo era bastante abundante tras 3 o 4 semanas de incubación, lo que generaba en muchas de ellas que el micelio se tornara de ese color oscuro casi negro. Éstas características se consideran típicas del género *Micromonospora*.

Las cepas GUI 12, GUI 19, GUI 23, GUI 42, GUI 43, SG 4, SGA 11 y SGA 20 produjeron pigmentos en SA1 mientras que las cepas GUI 4, GUI 44, GUI 63, SG 2, SGA 4, SGA 5, SGA 16, SGA 17, SGA 20, SGB 14 y SGB 16 lo hicieron en el medio de Avena, las cepas GUI 32, SG 4, SGA 11 y SGA 20 los produjeron en el medio Bennett's y sólo las cepas GUI 1 y GUI 5 lo hicieron en el medio YMA (Tablas 35 y 36).

Una característica a destacar fue la presencia de micelio aéreo en algunas cepas, como es el caso de la cepa SGA 16 (Figura 67), aislada de nódulos de leguminosa de Salamanca e identificada con *Micromonospora fulviviridis* con un porcentaje de similitud del 99,58% con respecto a la cepa tipo de dicha especie. La presencia de micelio aéreo es poco frecuente en el género *Micromonospora* (Kawamoto, 1989).

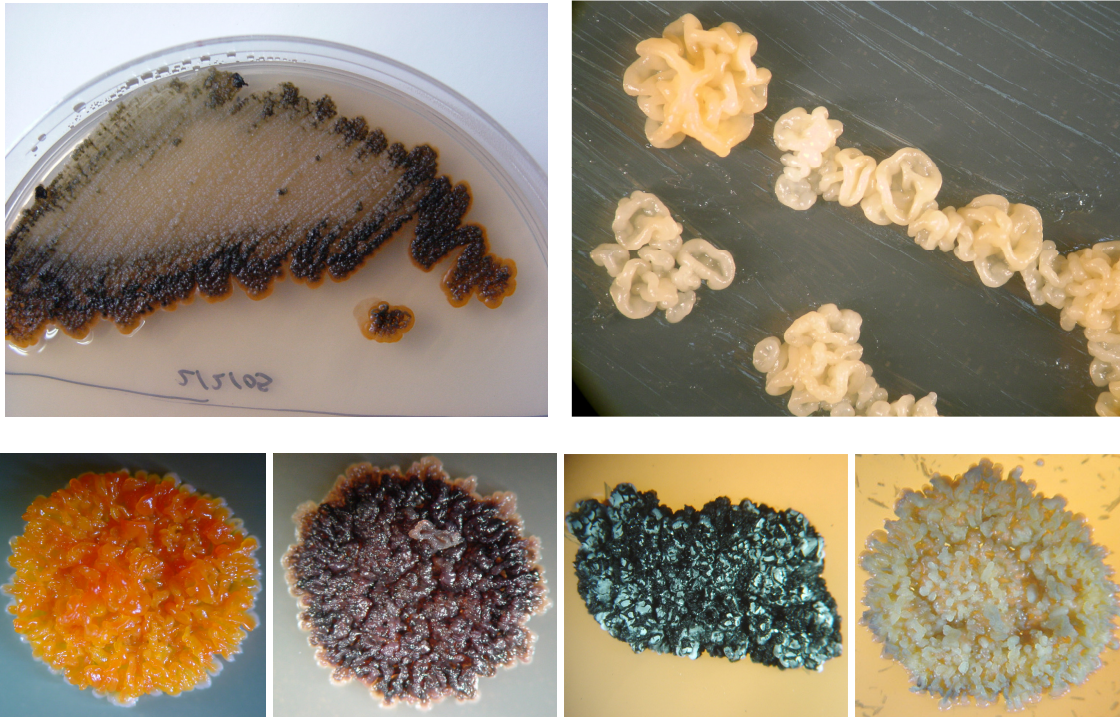


Fig. 67. Arriba: Siembra en estría de las cepas GUI 32 y SGB 14 donde se puede observar el crecimiento de las colonias. Debajo: morfología de las colonias de las cepas GUI 27, GUI 28, SGA 16 y SG 17 observadas a través del microscopio estereoscópico.

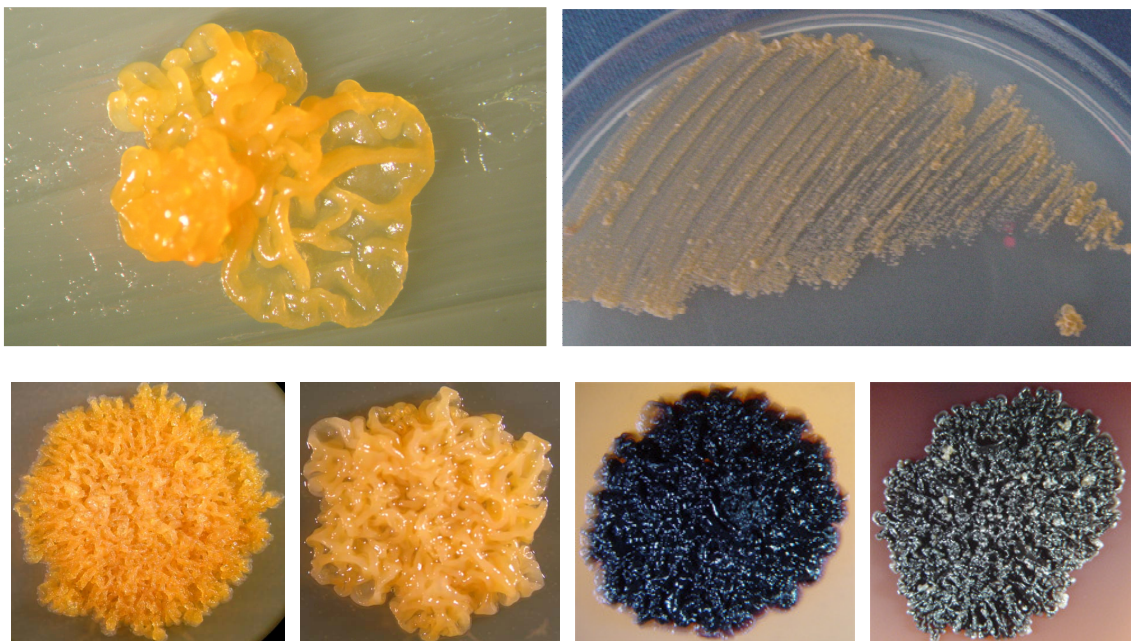


Fig. 68. Imágenes del microscopio estereoscópico de siembra en estría de las cepas CR 20 y SR 4 y de morfología de las colonias de las cepas CR 24, CR 36, SR 4 y SR 6.



### b. Microorganismos aislados a partir de rizosfera

Las cepas aisladas de rizosfera presentaban una textura similar a las cepas obtenidas de nódulos (Figura 68), aparecían adheridas al medio de cultivo de un modo más o menos fuerte, y en su mayoría presentaban tonos anaranjados al comienzo de su crecimiento, oscureciéndose después a tonos más oscuros llegando en algunos casos a colores negros, debido a la formación de esporas en el micelio vegetativo.

Las cepas CR 38, SR 6 y SR 11 produjeron pigmentos en el medio SA1, las cepas CR 22, SR 6, SR 11 y SR 12 en el medio de Bennett, las cepas CR 11, CR 21 y SR 11 los produjeron en el medio YMA y las cepas CR 10, CR 23, SR 3 y SR 11 lograron producirlos en el medio de Avena (Tablas 35 y 36).

Las características morfológicas observadas tanto en las cepas obtenidas de nódulos como en las obtenidas de la rizosfera indicaban que la mayoría de los microorganismos aislados podían pertenecer al género *Micromonospora*, ya que este se caracteriza por el color naranja de sus colonias cambiando a colores más oscuros tras la formación de esporas en el sustrato, la ausencia de micelio aéreo y la producción de esporas sencillas.

### c. Cepas tipo

En cuanto al análisis de las cepas tipo, las cepas *M. chokoriensis* JCM 13247<sup>T</sup>, *M. pallida* DSM 43817<sup>T</sup> y *M. rifamycinica* DSM 44983<sup>T</sup> produjeron pigmentos sobre el medio SA1, las cepas *M. chokoriensis* JCM 13247<sup>T</sup>, *M. pallida* DSM 43817<sup>T</sup> y *M. peucetia* DSM 43363<sup>T</sup> sobre el medio Bennett, mientras que las cepas *M. echinaurantiaca* DSM 43904<sup>T</sup>, *M. fulviviridis* DSM 43906<sup>T</sup>, *M. mirobrigensis* DSM 44830<sup>T</sup> y *M. rosaria* DSM 803<sup>T</sup> los produjeron sobre el medio Avena. Ninguna de las cepas produjo pigmentos sobre el medio YMA (Tabla 37).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 35. Resumen de las características morfológicas estudiadas en las cepas aisladas procedentes de nódulos y rizosfera de Cañizal.

Características morfológicas	Medios	GUI																												
		GUI 1	GUI 2	GUI 3	GUI 4	GUI 5	GUI 6	GUI 8	GUI 10	GUI 11	GUI 12	GUI 13	GUI 14	GUI 15	GUI 16	GUI 19	GUI 23	GUI 27	GUI 28	GUI 31	GUI 32	GUI 34	GUI 37	GUI 40	GUI 41	GUI 42	GUI 43	GUI 44	GUI 61	GUI 63
Crecimiento	SA 1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	YMA	3	3	2	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2	3	3	2	2	3	2	2	2	2	2	3	2	3	2	3	2
	Bennett	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	2	3	2	3
	Avena	2	2	2	3	2	2	2	2	3	2	2	2	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2
Color micelio sustrato	SA 1	m	m	ni	m	b	nc	ni	nc	m	m	b	ma	m	ma	ni	ni	ni	m	ma	m	m	ni	nc	m	m	nc	m	nc	
	YMA	m	m	nc	m	b	nc	nc	nc	ma	m	b	ma	ma	ma	ni	ni	ni	m	m	ma	ma	m	ni	b	m	ma	ma	m	ma
	Bennett	m	ni	ni	ma	b	nc	nc	nc	ma	ma	b	nc	b	nc	ni	nc	ni	m	nc	ma	ma	b	ni	b	m	b	nc	nc	nc
	Avena	b	nc	nc	m	m	nc	nc	nc	ma	ma	b	nc	b	ni	ni	nc	ni	r	ma	ma	ma	ma	nc	nc	m	ma	r	ma	r
Micelio aereo / color	SA 1	g	-	-	-	g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	YMA	g	-	-	-	g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Bennett	g	-	-	-	g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Avena	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Pigmento difusible / color	SA 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g	-	-	-	-	ni	nc	-	-	-	-	-	-	-	-	m	m	-	-	-
	YMA	m	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Bennett	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nc	-	-	-	-	m	-	-	-	-
	Avena	-	-	-	g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	r	-	r

Características morfológicas	Medios	CR																								
		CR 1A	CR 6	CR 8	CR 9	CR 10	CR 11	CR 18	CR 19	CR 20	CR 21	CR 22	CR 23	CR 24	CR 24A	CR 25	CR 26	CR 27	CR 29	CR 30	CR 31	CR 36	CR 37	CR 38	CR 39	CR 40
Crecimiento	SA 1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	0	3	3	3	2	3	3	3
	YMA	3	2	3	3	1	3	1	1	1	3	3	3	2	2	2	0	3	0	1	2	0	0	0	1	3
	Bennett	3	3	3	3	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	3	3
	Avena	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Color micelio sustrato	SA 1	m	b	bl	m	ni	b	nc	ni	ni	nc	m	m	nc	ni	m	ni	m	-	ni	b	ni	b	ni	nc	m
	YMA	m	b	bl	b	ni	b	nc	nc	nc	m	bl	mc	nc	nc	m	-	m	-	nc	mc	-	-	-	nc	m
	Bennett	m	b	bl	b	ni	b	nc	nc	ni	ni	m	m	nc	ni	m	ni	m	b	nc	mc	ni	b	ni	nc	m
	Avena	b	b	b	b	ni	m	ni	nc	r	ni	b	b	r	ni	m	ni	b	b	nc	b	ni	b	ni	ni	m
Micelio aereo / color	SA 1	-	bl	-	-	-	g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	YMA	-	bl	-	-	-	g	-	-	-	g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Bennett	-	bl	-	-	-	g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nc	-	-	-	-	-	-	
	Avena	-	-	bl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nc	-	-	-	-	-	-	
Pigmento difusible / color	SA 1	-	-	-	r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ni	-	-
	YMA	-	-	-	-	-	m	-	-	-	g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bennett	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Avena	-	-	-	-	ni	m	-	-	-	-	-	mc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1 = escaso; 2 = moderado; 3 = abundante; 0 = inexistente

b = beige; bl = blanco; g = gris; m = marrón; ma = marrón anaranjado; mc = marrón claro; mv = marrón verdoso; n = naranja, nc = naranja claro; ni = naranja intenso; ng = negro; r = rosa-rojizo; v = verde; - = negativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 36. Resumen de las características morfológicas estudiadas en las cepas aisladas procedentes de nódulos y rizosfera de Salamanca.

Características morfológicas	Medios	Medios																												
		SG1	SG2	SG3	SG4	SG5	SG6	SG7	SG8	SG9	SG10	SG11	SG12	SG13	SG14	SG15	SG16	SG17	SG18	SGA1	SGA2	SGA3	SGA4	SGA5	SGA6	SGA7	SGA8	SGA9	SGA11	SGA13
Crecimiento	SA 1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3
	YMA	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	3	2	2	2	2
	Bennett	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Avena	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	1	2	3	2	2	2
Color micelio sustrato	SA 1	n	na	ma	n	n	ma	ma	ng	n	ng	n	n	n	n	nc	n	mg	n	n	ma	ng	n	ng	b	b	m	b	ng	ma
	YMA	nc	nc	ng	b	n	ma	mv	mv	n	ng	n	n	n	n	nc	n	ng	n	n	ng	m	n	mv	nc	b	ma	mv	mv	mv
	Bennett	nc	nc	nc	n	n	nc	nc	nc	n	ng	n	n	n	n	nc	n	b	nc	n	ma	m	nc	ma	n	b	m	b	ng	nc
	Avena	b	mv	m	bl	n	r	mc	mc	n	ng	nc	nc	nc	nc	mv	nc	m	nc	nc	mv	mv	m	ng	m	nc	mv	mv	mv	b
Micelio aereo / color	SA 1	-	-	-	bl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	YMA	-	-	-	bl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Bennett	-	-	-	bl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g	-	-	-	-
	Avena	-	-	-	bl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	bl	-	-	-	-
Pigmento difusible / color	SA 1	-	-	-	n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ng	-	
	YMA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bennett	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	-
	Avena	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	r	v	-	-	-	-	-	-

Características morfológicas	Medios	Medios																												
		SGA14	SGA16	SGA17	SGA18	SGA19	SGA20	SGA21	SGB1	SGB3	SGB4	SGB7	SGB8	SGB12	SGB13	SGB14	SGB15	SGB16	SR1	SR2	SR3	SR4	SR5	SR6	SR10A	SR10B	SR11	SR12	SR14	SR15
Crecimiento	SA 1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	YMA	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	2
	Bennett	3	3	3	3	3	3	2	2	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	2	3	2	3	2	3	3	3	3	3	1
	Avena	2	3	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1
Color micelio sustrato	SA 1	ma	ng	ng	n	ma	ng	m	m	n	ma	n	b	b	ma	m	b	ng	ng	m	ma	ng	ng	ng	bl	bl	b	b	ng	
	YMA	n	ng	ng	n	nc	n	n	m	ma	m	nc	ng	b	ma	ma	n	b	ng	ma	ma	ng	ng	ng	bl	bl	m	ng	b	ng
	Bennett	ma	b	b	n	b	m	n	nc	n	m	nc	b	b	nc	nc	b	m	b	b	nc	m	ng	m	bl	bl	b	m	b	m
	Avena	nc	ng	ng	nc	nc	m	n	r	nc	m	nc	nc	b	r	mv	g	ng	r	nc	r	b	ng	m	bl	bl	r	b	b	b
Micelio aereo / color	SA 1	-	bl	bl	-	-	-	-	-	-	-	-	bl	-	-	bl	g	-	-	-	-	-	-	-	-	g	-	-	-	
	YMA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	bl	-	-	bl	-	-	-	-	-	-	-	-	bl	bl	g	g	-	-
	Bennett	-	g	g	-	-	-	-	-	-	-	-	bl	-	-	bl	g	-	-	-	-	-	-	-	-	bl	-	-	-	-
	Avena	-	g	g	-	-	-	-	-	-	-	-	g	-	-	g	-	-	-	-	-	-	-	-	bl	bl	g	-	bl	-
Pigmento difusible / color	SA 1	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	a	-	-	-
	YMA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	-
	Bennett	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	a	m	-	-
	Avena	-	v	v	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	v	-	-	v	-	-	-	-	-	r	-	-	-

1 = escaso; 2 = moderado; 3 = abundante; 0 = inexistente

b = beige; bl = blanco; g = gris; m = marrón; ma = marrón anaranjado; mc = marrón claro; mv = marrón verdoso; n = naranja, nc = naranja claro; ni = naranja intenso; ng = negro; r = rosa-rojizo; v = verde; - = negativo.





### 4.7.3. Utilización de fuentes de carbono

Los resultados de esta prueba se muestran en las tablas 38, 39, 40, 41 y 42. Se tomaron resultados a los 7, 14 y 21 días de crecimiento, mostrándose únicamente en las tablas los resultados finales.

Los porcentajes de cepas con resultado positivo para estas pruebas quedan reflejados en el siguiente cuadro resumen (Cuadro 1):

	Aislados de nódulos (+)		Aislados de rizosfera (+)		Cepas tipo
	Cañizal	Salamanca	Cañizal	Salamanca	
Ac. Galacturónico	0%	0%	0%	0%	0%
Ac. Glutámico	0%	0%	4%	0%	0%
Ac. Propiónico	10%	26%	52%	42%	12%
Ac. Quínico	0%	0%	0%	0%	0%
Alanina	28%	49%	78%	92%	3%
Almidón	62%	47%	96%	92%	85%
Arabinosa	100%	64%	91%	67%	82%
Arginina	69%	91%	74%	100%	73%
Celobiosa	76%	49%	91%	83%	82%
Fructosa	97%	51%	96%	83%	73%
Galactosa	86%	55%	57%	92%	82%
Gluconato	90%	26%	43%	42%	6%
Glucosa	97%	100%	100%	100%	100%
Histidina	69%	21%	0%	50%	0%
Lisina	38%	87%	96%	100%	50%
Maltosa	69%	45%	83%	75%	73%
Manosa	100%	89%	83%	100%	85%
Melibiosa	93%	83%	43%	67%	52%
Melecitosa	38%	66%	65%	58%	60%
Mesoeritritol	3%	15%	17%	50%	0%
Prolina	14%	74%	57%	83%	58%
Rafinosa	97%	83%	100%	100%	76%
Ramnosa	41%	89%	61%	92%	18%
Sacarosa	93%	64%	91%	92%	76%
Salicina	28%	98%	78%	83%	60%
Serina	7%	89%	96%	100%	67%
Sorbitol	7%	43%	13%	33%	0%
Sorbosa	7%	9%	9%	33%	30%
Tirosina	14%	17%	0%	0%	0%
Trehalosa	83%	98%	87%	100%	0%
Valina	10%	96%	52%	67%	18%
Xilitol	0%	6%	9%	25%	0%
Xilosa	100%	2%	96%	0%	0%

Cuadro 1. Porcentajes de utilización de fuentes de carbono por los aislados.

A través del cuadro de porcentajes podemos observar que la mayoría de los microorganismos estudiados fueron capaces de utilizar la manosa, la arabinosa, la glucosa, la rafinosa y la arginina. Mientras que muy pocas de las cepas fueron capaces de emplear la sorbosa, la tirosina, el sorbitol, el ácido galacturónico, el ácido glutámico, el ácido quínico, el xilitol y el mesoeritritol. Las cepas aisladas en este trabajo también fueron en su mayoría capaces de usar la trehalosa, que sin embargo, no fue utilizada por ninguna de las cepas tipo analizadas. Asimismo, el aprovechamiento del ácido propiónico por parte de casi el 50% de los aislados de rizosfera también es una característica a resaltar.

La utilización de la serina y el almidón, fue mucho más habitual en cepas procedentes de la rizosfera que en las obtenidas de nódulos, en los que los porcentajes de empleo fueron mucho menores, al contrario que en el aprovechamiento de melibiosa, que fue mucho más elevada para los aislados obtenidos de los nódulos.

El gluconato fue ampliamente empleado por las cepas obtenidas de nódulos de Cañizal, mientras que el resto de los microorganismos aislados presentaron porcentajes muy bajos en el uso de este compuesto. Al contrario ocurrió con la utilización de la serina, que dio porcentajes elevados para todas las cepas de rizosfera y de nódulos de Salamanca, pero bajo en la cepas procedentes de nódulos de Cañizal.

A partir de estos datos se pueden observar diferencias entre los aislados en función de su hábitat o la localización en la que fueron aislados.

Tabla 38. Utilización de fuentes de carbono de los aislados procedentes de nódulos de Cañizal.

	Ac. Galacturónico	Ac. Glutámico	Ac. Propiónico	Ac. Quínico	Alanina	Almidón	Arabinosa	Arginina	Celobiosa	Fructosa	Galactosa	Gluconato	Glucosa	Histidina	Lisina	Maltosa	Manosa	Melecitosa	Melibiosa	Mesoeritritol	Prolina	Rafinosa	Ramnosa	Sacarosa	Salicina	Serina	Sorbitol	Sorbosa	Tirosina	Trehalosa	Valina	Xilitol	Xilosa				
GUI 1	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+				
GUI 2	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+			
GUI 3	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+			
GUI 4	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+			
GUI 5	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+			
GUI 6	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+			
GUI 8	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+			
GUI 10	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+			
GUI 11	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		
GUI 12	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		
GUI 13	-	-	-	-	-	-	±	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		
GUI 14	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		
GUI 15	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
GUI 16	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	±		
GUI 19	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		
GUI 23	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±		
GUI 27	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
GUI 28	-	-	-	-	-	-	±	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±		
GUI 31	-	-	-	-	-	-	±	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	±	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	
GUI 32	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	
GUI 34	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
GUI 37	-	-	-	-	-	+	±	+	-	±	+	-	+	-	-	-	±	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	±	-	+	+	+	+	-	-	±	
GUI 40	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	±	-	+	-	-	-	-	±	+	+	+	+	+	-	±	
GUI 41	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
GUI 42	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	±	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
GUI 43	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
GUI 44	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
GUI 61	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	±	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
GUI 63	-	-	-	-	-	+	±	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	±	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

+ : positivo, ± : moderado, - : negativo.

Tabla 39. Utilización de fuentes de carbono de los aislados procedentes de rizosfera de Cañizal.

	Ac. Galacturónico	Ac. Glutámico	Ac. Propiónico	Ac. Quínico	Alanina	Almidón	Arabinosa	Arginina	Celobiosa	Fructosa	Galactosa	Gluconato	Glucosa	Histidina	Lisina	Maltosa	Manosa	Melecosa	Melibiosa	Mesoeritritol	Prolina	Rafinosa	Ramnosa	Sacarosa	Salicina	Serina	Sorbitol	Sorbosa	Tirosina	Trehalosa	Valina	Xilitol	Xilosa	
CR 1A	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	
CR 6	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	
CR 8	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	
CR 9	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
CR 10	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	
CR 11	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
CR 18	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
CR 19	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
CR 20	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	
CR 21	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	
CR 22	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
CR 23	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
CR 24	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	
CR 25	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
CR 26	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
CR 27	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-
CR 29	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
CR 30	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
CR 36	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
CR 37	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	
CR 38	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
CR 39	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
CR 40	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-

+ : positivo, ± : moderado, - : negativo.

Tabla 40. Utilización de fuentes de carbono de los aislados procedentes de nódulos de Salamanca.

	Ac. Galacturónico	Ac. Glutámico	Ac. Propiónico	Ac. Quínico	Alanina	Almidón	Arabinosa	Arginina	Celobiosa	Fructosa	Galactosa	Gluconato	Glucosa	Histidina	Lisina	Maltosa	Manosa	Melecitosa	Melibiosa	Mesoeritritol	Prolina	Rafnosa	Ramnosa	Sacarosa	Salicina	Serina	Sorbitol	Sorbosa	Tirosina	Trehalosa	Valina	Xilitol	Xilosa		
SG 1	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-			
SG 2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-		
SG 3	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-		
SG 4	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-		
SG 5	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
SG 6	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-		
SG 7	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	
SG 8	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	
SG 9	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-		
SG 10	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	
SG 11	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	
SG 12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
SG 13	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	
SG 14	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	
SG 15	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
SG 16	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	
SG 17	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	
SG 18	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	
SGA 1	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	
SGA 2	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
SGA 3	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
SGA 4	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
SGA 5	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
SGA 6	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	
SGA 7b	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
SGA 8	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
SGA 9	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
SGA 11	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
SGA 12	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
SGA 13	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	

+ : positivo, ± : moderado, - : negativo.

Tabla 41. Utilización de fuentes de carbono de los aislados procedentes de nódulos y rizosfera de Salamanca.

	Ac. Galacturónico	Ac. Glutárico	Ac. Propiónico	Ac. Quínico	Alanina	Almidón	Arabinosa	Arginina	Celobiosa	Fructosa	Galactosa	Gluconato	Glucosa	Histidina	Lisina	Maltosa	Manosa	Melecitosa	Melibiosa	Mesoeritritol	Prolina	Rafinosa	Ramnosa	Sacarosa	Salicina	Serina	Sorbitol	Sorbosa	Tirosina	Trehalosa	Valina	Xilitol	Xilosa		
SGA 14	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-		
SGA 16	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	
SGA 17	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	
SGA 18	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	
SGA 19	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	
SGA 20	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	
SGA 21	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	
SGB 1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	
SGB 3	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	
SGB 4	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	
SGB 7	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	
SGB 8	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	
SGB 12	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	
SGB 13	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	
SGB 14	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	
SGB 15	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	
SGB 16	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	
SR 1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	
SR 2	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	
SR 3	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	
SR 4	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	
SR 5	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	
SR 6	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	
SR 10A	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	
SR 10B	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
SR 11	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	
SR 12	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	
SR 14	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	
SR 15	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	

+ : positivo, ± : moderado, - : negativo.

Tabla 42. Utilización de fuentes de carbono de cepas tipo del género *Micromonospora*.

	Ac. Galacturónico	Ac. Glutárico	Ac. Propiónico	Ac. Quínico	Alanina	Almidón	Arabinosa	Arginina	Celobrosa	Fructosa	Galactosa	Gluconato	Glucosa	Histidina	Lisina	Maltosa	Manosa	Melcitososa	Melibrosa	Mesoeritritol	Prolina	Rafinosa	Ramnosa	Sacarosa	Salicina	Serina	Sorbitol	Sorbosa	Tirosina	Trehalosa	Valina	Xilitol	Xilosa			
<i>M. aurantiaca</i> DSM 43813 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-			
<i>M. auratinigra</i> DSM 44815 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>M. carbonacea</i> DSM 43168 <sup>T</sup>	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-		
<i>M. chalcea</i> DSM 43026 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>M. chersina</i> DSM 44151 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
<i>M. chokoriensis</i> JCM 13247 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
<i>M. citrea</i> DSM 43903 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>M. coerulea</i> DSM 43143 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>M. coriariae</i> DSM 44875 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>M. coxensis</i> JCM 13248 <sup>T</sup>	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
<i>M. eburnea</i> DSM 44814 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>M. echinaurantiaca</i> DSM 43904 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>M. echinofusca</i> DSM 43913 <sup>T</sup>	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
<i>M. echinospora</i> DSM 43816 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>M. endolithica</i> DSM 44398 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>M. fulviviridis</i> DSM 43906 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>M. halophytica</i> DSM 43171 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. inositol</i> DSM 43819 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. lupini</i> DSM 44874 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. matsumotoense</i> IMSNU 22003 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. mirobrigensis</i> DSM 44830 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. nigra</i> DSM 43818 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. olivasterospora</i> DSM 43868 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>M. pallida</i> DSM 43817 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. pattaloongensis</i> JCM 12394 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>M. peucetia</i> DSM 43363 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. purpureochromogenes</i> DSM 4382 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. rifamycinica</i> DSM 44983 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. rosaria</i> DSM 803 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. saelicesensis</i> DSM 44871 <sup>T</sup>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>M. sagamiensis</i> DSM 43912 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. siamensis</i> JCM 12769 <sup>T</sup>	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>M. viridifaciens</i> DSM 43909 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : positivo, ± : moderado, - : negativo.



#### 4.7.4. Pruebas de degradación e hidrólisis

Los resultados para las pruebas de hidrólisis se pueden observar en las Tablas 43, 44 y 45, aunque para facilitar la comprensión de los resultados se muestra el siguiente cuadro resumen (Cuadro 2) donde quedan reflejados los resultados de las pruebas en tanto por ciento para las cepas aisladas de nódulos y para las cepas obtenidas de la rizosfera:

	Aislados de nódulos (+)		Aislados de rizosfera (+)		Cepas tipo
	Cañizal	Salamanca	Cañizal	Salamanca	
Almidón	72%	100%	56%	100%	97%
Arbutina	90%	96%	84%	83%	82%
Caseína	100%	98%	84%	100%	97%
Esculina	93%	98%	100%	100%	97%
Gelatina	100%	85%	72%	42%	79%
Tirosina	21%	83%	52%	67%	70%
Tween 20	55%	98%	68%	100%	94%
Tween 80	97%	4%	76%	0%	0%
Urea	14%	0%	4%	0%	24%
Xilano	90%	79%	60%	67%	73%

Cuadro 2. Porcentajes de degradación de compuestos por parte de las cepas de estudio.

La mayor parte de las cepas, independientemente de su procedencia, fueron capaces de degradar la caseína y de hidrolizar la esculina y la arbutina, presentando en todos los casos valores superiores al 80%. Es interesante destacar que muchas de las cepas aisladas también producían xilanasas. La hidrólisis de gelatina presentó porcentajes diversos de degradación, siendo en general bastante altos, pero en el caso de los microorganismos aislados de rizosfera de Salamanca no superaron el 50%. Existe también una elevada diferencia en la hidrólisis del almidón, del Tween 20 y de la tirosina, ya que las cepas procedentes de Cañizal, independientemente de si procedían de nódulo o de rizosfera, presentaron valores muy inferiores a los aislados procedentes de Salamanca y las cepas tipo estudiadas, que llegaban prácticamente al 100% para el almidón y el Tween 20 y se encontraban en torno al 70% para la tirosina. En cuanto a la degradación del Tween 80, este compuesto fue altamente degradado por las cepas procedentes de Cañizal (97 y 76%), mientras que para las cepas de Salamanca y las

cepas tipo los valores son muy bajos (0 y 24% respectivamente). La degradación de urea fue llevada a cabo por muy pocos organismos en todos los casos estudiados, 5 cepas aisladas en este trabajo y 8 correspondientes a cepas tipo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 43. Resultados de las pruebas bioquímicas para las cepas procedentes de Cañizal.

	ALMIDON	ARBUTINA	CASEINA	CATALASA	ESCOLINA	GELATINA	OXIDASA	TWEEN 20	TWEEN 80	TIROSINA	UREA	XILANO
GUI 1	+	+	+	+	+	+	w	+	+	-	+	+
GUI 2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
GUI 3	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
GUI 4	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
GUI 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
GUI 6	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
GUI 8	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
GUI 10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
GUI 11	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
GUI 12	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
GUI 13	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
GUI 14	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
GUI 15	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
GUI 16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
GUI 19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
GUI 23	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GUI 27	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
GUI 28	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
GUI 31	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
GUI 32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
GUI 34	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
GUI 37	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+
GUI 40	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
GUI 41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
GUI 42	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
GUI 43	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
GUI 44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
GUI 61	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
GUI 63	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
CR 1A	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
CR 6	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
CR 8	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
CR 9	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
CR 10	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
CR 11	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
CR 18	+	w	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
CR 19	+	w	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
CR 20	+	w	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
CR 21	-	w	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
CR 22	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
CR 23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CR 24	+	w	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+
CR 25	-	w	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
CR 26	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
CR 27	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
CR 29	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
CR 30	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
CR 36	-	w	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
CR 37	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
CR 38	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
CR 39	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
CR 40	+	w	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+

+: positivo, w: moderado, -: negativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 44. Resultados de la pruebas bioquímicas para las cepas procedentes de Salamanca.

	ALMIDON	ARBUTINA	CASEINA	CATALASA	ESCULINA	GELATINA	OXIDASA	TWEEN 20	TWEEN 80	TIROSINA	UREA	XILANO
SG 1	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
SG 2	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
SG 3	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
SG 4	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
SG 5	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
SG 6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
SG 7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
SG 8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
SG 9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
SG 10	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
SG 11	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
SG 12	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
SG 13	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
SG 14	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
SG 15	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
SG 16	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
SG 17	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
SG 18	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
SGA 1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
SGA 2	+	w	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
SGA 3	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
SGA 4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
SGA 5	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
SGA 6	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
SGA 7b	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
SGA 8	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
SGA 9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
SGA 11	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
SGA 12	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
SGA 13	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
SGA 14	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
SGA 16	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
SGA 17	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
SGA 18	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
SGA 19	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
SGA 20	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
SGA 21	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
SGB 1	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
SGB 3	+	w	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
SGB 4	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
SGB 7	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
SGB 8	+	w	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
SGB 12	+	+	+	+	w	+	-	+	-	+	-	+
SGB 13	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
SGB 14	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
SGB 15	+	+	+	+	w	+	-	+	-	+	-	+
SGB 16	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
SR 1	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
SR 2	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
SR 3	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
SR 4	+	-	+	+	w	+	+	+	-	-	-	+
SR 5	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
SR 6	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
SR 10A	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
SR 10B	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
SR 11	+	+	+	+	w	-	-	+	-	-	-	+
SR 12	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
SR 14	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
SR 15	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+

+ : positivo, w : moderado, - : negativo.

Tabla 45. Resultados de la pruebas bioquímicas para cepas tipo del género *Micromonospora*.

	ALMIDON	ARBUTINA	CASEINA	CATALASA	ESCULINA	GELATINA	OXIDASA	TWEEN 20	TWEEN 80	TIROSINA	UREA	XILANO
<i>M. aurantiaca</i> DSM 43813 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
<i>M. auratinigra</i> DSM 44815 <sup>T</sup>	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
<i>M. carbonacea</i> DSM 43168 <sup>T</sup>	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>M. chalcea</i> DSM 43026 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
<i>M. chersina</i> DSM 44151 <sup>T</sup>	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>M. chokoriensis</i> JCM 13247 <sup>T</sup>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>M. citrea</i> DSM 43903 <sup>T</sup>	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>M. coerulea</i> DSM 43143 <sup>T</sup>	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-
<i>M. coriariae</i> DSM 44875 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>M. coxensis</i> JCM 13248 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>M. eburnea</i> DSM 44814 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>M. echinaurantiaca</i> DSM 43904 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>M. echinofusca</i> DSM 43913 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
<i>M. echinospora</i> DSM 43816 <sup>T</sup>	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>M. endolithica</i> DSM 44398 <sup>T</sup>	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+
<i>M. fulviviridis</i> DSM 43906 <sup>T</sup>	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>M. halophytica</i> DSM 43171 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
<i>M. inositol</i> DSM 43819 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
<i>M. lupini</i> DSM 44874 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>M. matsumotoense</i> IMSNU 22003 <sup>T</sup>	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>M. miobrigensis</i> DSM 44830 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
<i>M. nigra</i> DSM 43818 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>M. olivasterospora</i> DSM 43868 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>M. pallida</i> DSM 43817 <sup>T</sup>	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>M. pattaloongensis</i> JCM 12394 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>M. peucetia</i> DSM 43363 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>M. purpureochromogenes</i> DSM 4382 <sup>T</sup>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>M. rifamycinica</i> DSM 44983 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>M. rosaria</i> DSM 803 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
<i>M. saelicesensis</i> DSM 44871 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>M. sagamiensis</i> DSM 43912 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
<i>M. siamensis</i> JCM 12769 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>M. viridifaciens</i> DSM 43909 <sup>T</sup>	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-

+ : positivo, w : moderado, - : negativo

#### 4.7.5. Catalasa y Oxidasa

Todas las cepas estudiadas dieron un resultado catalasa positivo, sin embargo, al hacer el estudio sobre las cepas tipo, cuatro de éstas resultaron catalasa negativas. En el estudio de la oxidasa la mayoría de las cepas tipo y de los aislados de Cañizal fueron positivos, mientras que de las cepas aisladas de Salamanca fueron positivos un porcentaje mucho menor, como se muestra en el siguiente resumen (Cuadro 3):

	Aislados de nódulos (+)		Aislados de rizosfera (+)		Cepas tipo
	Cañizal	Salamanca	Cañizal	Salamanca	
Catalasa	100%	100%	100%	100%	88%
Oxidasa	79%	34%	88%	25%	82%

Cuadro 3. Porcentajes de producción de catalasa y oxidasa en las cepas de estudio.

Los datos concretos para cada cepa se muestran en las tablas 42, 43 y 44.

#### 4.7.6. Pruebas de resistencia

Los resultados de estas pruebas están reflejados en las tablas 45, 46 y 47, en las que se muestra el crecimiento a los 21 días. Todas estas pruebas se realizaron sobre el medio de cultivo SA1.

En la prueba de resistencia a diferentes temperaturas los porcentajes obtenidos según la procedencia los vemos en el siguiente cuadro (Cuadro 4):

Temperatura	Aislados de nódulos (+)		Aislados de rizosfera (+)		Cepas tipo
	Cañizal	Salamanca	Cañizal	Salamanca	
4 °C	0%	6%	0%	25%	15%
12 °C	76%	85%	72%	83%	73%
20 °C	100%	100%	92%	100%	94%
37 °C	97%	98%	92%	100%	100%
45 °C	10%	91%	12%	83%	88%

Cuadro 4. Porcentajes de resistencia a diferentes temperaturas de las cepas de estudio.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estos resultados indican que la mayoría de las cepas poseen un crecimiento mesofílico, lo que concuerda con el género *Micromonospora*. Como diferencias podemos observar que las cepas procedentes de Salamanca poseían una mayor tolerancia a las altas temperaturas que las procedentes de Cañizal.

La tolerancia a distinta concentración de NaCl en los microorganismos estudiados se observa en el cuadro 5.

Concentración NaCl	Aislados de nódulos (+)		Aislados de rizosfera (+)		Cepas tipo
	Cañizal	Salamanca	Cañizal	Salamanca	
1%	100%	100%	100%	100%	100%
3%	69%	87%	44%	92%	57%
5%	10%	17%	24%	25%	3%
7%	7%	6%	8%	17%	0%
9%	0%	4%	4%	8%	0%

Cuadro 5. Porcentajes de resistencia a diferentes concentraciones de NaCl de las cepas de estudio.

Los porcentajes de tolerancia respecto al cloruro sódico son similares entre todas las cepas muestreadas, siendo muy pocos los aislados que pueden crecer por encima de una concentración del 3%.

Los resultados para el estudio de la capacidad de crecimiento de los aislados a diferentes pH se pueden resumir en el siguiente cuadro (Cuadro 6):

pH	Aislados de nódulos (+)		Aislados de rizosfera (+)		Cepas tipo
	Cañizal	Salamanca	Cañizal	Salamanca	
4,4	0%	2%	0%	8%	0%
5,5	0%	38%	8%	50%	12%
6,4	14%	68%	36%	50%	48%
8	100%	100%	92%	100%	100%
9	34%	98%	83%	100%	94%

Cuadro 6. Porcentajes de resistencia a diferentes pH de las cepas de estudio.

En este caso se observan unos resultados bastante similares entre los distintos tipos de aislados, sin embargo, sólo un 34% las cepas procedentes de nódulos de Cañizal consiguió crecer a pH 9, mientras que los microorganismo del resto de procedencias

presentaron porcentajes de crecimiento superiores al 83%. En general, las cepas procedentes de Salamanca poseen un rango de tolerancia mayor.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 45. Crecimiento de las cepas procedentes de Cañizal a diferentes pHs, concentraciones de NaCl y temperaturas.

	TEMPERATURA					pH					NaCl				
	4°C	12°C	20°C	37°C	45°C	4,4	5,4	6,4	8	9	1%	3%	5%	7%	9%
GUI 1	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-
GUI 2	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
GUI 3	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
GUI 4	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
GUI 5	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
GUI 6	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
GUI 8	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
GUI 10	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
GUI 11	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
GUI 12	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
GUI 13	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
GUI 14	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
GUI 15	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
GUI 16	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
GUI 19	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
GUI 23	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
GUI 27	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
GUI 28	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
GUI 31	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
GUI 32	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
GUI 34	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
GUI 37	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
GUI 40	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
GUI 41	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
GUI 42	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
GUI 43	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
GUI 44	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
GUI 61	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
GUI 63	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
CR 1A	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
CR 6	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
CR 8	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
CR 9	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
CR 10	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
CR 11	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CR 18	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
CR 19	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
CR 20	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
CR 21	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
CR 22	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
CR 23	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
CR 24	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
CR 24A	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
CR 25	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
CR 26	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
CR 27	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
CR 29	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CR 30	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
CR31	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
CR 36	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
CR 37	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CR 38	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
CR 39	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
CR 40	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-

+ : positivo, -: negativo

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 46. Crecimiento de las cepas procedentes de Salamanca a diferentes pHs, concentraciones de NaCl y temperaturas.

	TEMPERATURA					pH					NaCl				
	4°C	12°C	20°C	37°C	45°C	4,4	5,4	6,4	8	9	1%	3%	5%	7%	9%
SG 1	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
SG 2	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
SG 3	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
SG 4	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SG 5	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
SG 6	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
SG 7	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
SG 8	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
SG 9	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
SG 10	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
SG 11	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
SG 12	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
SG 13	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
SG 14	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
SG 15	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
SG 16	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
SG 17	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
SG 18	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
SGA 1	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
SGA 2	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
SGA 3	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
SGA 4	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
SGA 5	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
SGA 6	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
SGA 7b	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
SGA 8	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
SGA 9	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
SGA 11	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
SGA 12	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
SGA 13	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
SGA 14	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
SGA 16	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
SGA 17	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
SGA 18	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
SGA 19	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
SGA 20	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
SGA 21	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
SGB 1	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
SGB 3	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
SGB 4	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
SGB 7	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
SGB 8	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
SGB 12	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SGB 13	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
SGB 14	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
SGB 15	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SGB 16	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
SR 1	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
SR 2	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
SR 3	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
SR 4	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
SR 5	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
SR 6	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
SR 10A	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
SR 10B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
SR 11	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SR 12	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
SR 14	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SR 15	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-

+ : positivo, -: negativo

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 47. Crecimiento de las cepas tipo de *Micromonospora* a diferentes pHs, concentraciones de NaCl y temperaturas.

	TEMPERATURA					pH					NaCl				
	4°C	12°C	20°C	37°C	45°C	4,4	5,4	6,4	8	9	1%	3%	5%	7%	9%
<i>M. aurantiaca</i> DSM 43813 <sup>T</sup>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>M. auratinigra</i> DSM 44815 <sup>T</sup>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>M. carbonacea</i> DSM 43168 <sup>T</sup>	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>M. chalcea</i> DSM 43026 <sup>T</sup>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>M. chersina</i> DSM 44151 <sup>T</sup>	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>M. chokoriensis</i> JCM 13247 <sup>T</sup>	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>M. citrea</i> DSM 43903 <sup>T</sup>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>M. coerulea</i> DSM 43143 <sup>T</sup>	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>M. coriariae</i> DSM 44875 <sup>T</sup>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>M. coxensis</i> JCM 13248 <sup>T</sup>	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>M. eburnea</i> DSM 44814 <sup>T</sup>	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>M. echinaurantiaca</i> DSM 43904 <sup>T</sup>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>M. echinofusca</i> DSM 43913 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>M. echinospora</i> DSM 43816 <sup>T</sup>	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>M. endolithica</i> DSM 44398 <sup>T</sup>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>M. fulviviridis</i> DSM 43906 <sup>T</sup>	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>M. halophytica</i> DSM 43171 <sup>T</sup>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>M. inositolia</i> DSM 43819 <sup>T</sup>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>M. lupini</i> DSM 44874 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>M. matsumotoense</i> IMSNU 22003 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>M. mirobrigensis</i> DSM 44830 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>M. nigra</i> DSM 43818 <sup>T</sup>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>M. olivasterospora</i> DSM 43868 <sup>T</sup>	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>M. pallida</i> DSM 43817 <sup>T</sup>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>M. pattaloongensis</i> JCM 12394 <sup>T</sup>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>M. peucetia</i> DSM 43363 <sup>T</sup>	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>M. purpureochromogenes</i> DSM 4382 <sup>T</sup>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>M. rifamycinica</i> DSM 44983 <sup>T</sup>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>M. rosaria</i> DSM 803 <sup>T</sup>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>M. saelicesensis</i> DSM 44871 <sup>T</sup>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>M. sagamiensis</i> DSM 43912 <sup>T</sup>	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>M. siamensis</i> JCM 12769 <sup>T</sup>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>M. viridifaciens</i> DSM 43909 <sup>T</sup>	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-

+ : positivo, -: negativo

## *DISCUSIÓN GENERAL*

## 5. DISCUSIÓN GENERAL

En este trabajo se ha llevado a cabo el aislamiento de 272 cepas, 239 obtenidas a partir de nódulos fijadores de nitrógeno de plantas de *Pisum sativum* esterilizados en superficie y recogidos en siete localidades diferentes de Castilla y León y 33 a partir de la rizosfera de esas mismas plantas. De estas cepas se seleccionaron las 106 obtenidas en Cañizal y en Salamanca, 27 y 46 obtenidas de nódulos, y 21 y 12 obtenidas de rizosfera respectivamente, para realizar un análisis de la diversidad, comprobando la eficacia de los diferentes métodos estudiados para su aplicación en el género *Micromonospora*. Una vez determinada la alta diversidad existente en los microorganismos aislados se seleccionaron representantes para realizar un análisis filogenético de los mismos que incluyó además del gen ribosómico 16S, cuatro genes conservados que codifican para proteínas ampliamente utilizados en análisis de secuencias multilocus, *gyrB*, *recA*, *atpD* y *rpoB* (Adekambi *et al.*, 2004; Adekambi *et al.*, 2006; Gomila *et al.*, 2007; Richert *et al.*, 2007; Stackebrandt *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2008; Rivas *et al.*, 2009). Tras el análisis de cada uno de estos genes de forma individual y concatenada, se llevó a cabo el estudio de hibridación de las cepas que podían representar nuevas especies. Con ello se pudo observar que los datos obtenidos a partir de las secuencias del gen *gyrB* y del concatenado eran los que tenían una correlación más alta con los datos de hibridación. El estudio fenotípico se llevó a cabo sobre las 106 cepas de Cañizal y Salamanca, completando con análisis de quimiotaxonomía para 15 cepas que posteriormente se confirmaron como nuevas especies.

Una vez obtenida toda la información a partir de los datos analizados surgen algunos temas de discusión que se expondrán con mayor amplitud en los siguientes apartados:

### **La presencia del género *Micromonospora* en el interior de los nódulos**

Con las nuevas descripciones de especies del género *Micromonospora* se ha venido observando que los nódulos pueden ser una fuente de nuevas especies de este género (Trujillo *et al.*, 2006; Trujillo *et al.*, 2007; Carro *et al.*, 2009). Se ha podido comprobar la presencia de cepas de *Micromonospora* en el interior de una gran variedad de especies de leguminosas: *Arachis hypogaea*, *Phaseolus vulgaris* (Cerda, 2008), *Lupinus*

*angustifolius* (Fernández-Molinero, 2005; Rodríguez, 2008), *Cicer arietinum*, *Lens culinaris* o *Medicago sativa* entre otras (datos no publicados). En este trabajo se ha confirmado la alta diversidad existente en las cepas aisladas de *Micromonospora* de un nicho tan concreto como son los nódulos de *Pisum sativum*, en los que se ha determinado la presencia de, al menos, 12 especies nuevas del género. También se ha visto que el aislamiento de este género es mucho más sencillo a partir de nódulos (medio YMA) que a partir de la rizosfera de las plantas (medios YMA, Caseína-almidón, Á. húmico I y Á. húmico II), lo que podría indicar que en el interior de los nódulos la competencia por el crecimiento con otros microorganismos es mucho menor o incluso que su presencia es más abundante en el interior de los nódulos. Por la cantidad de cepas que se obtienen a partir de un solo nódulo se podría pensar que esto último es cierto, ya que, en todos los nódulos a partir de los cuales se ha tratado de realizar aislamientos se han obtenido cepas de *Micromonospora*, con una media de aproximadamente 5 cepas por nódulo. Sin embargo, esta abundancia en el número de cepas que no se observa en los aislamientos a partir de la rizosfera, puede no reflejar riqueza de especies. De hecho, cuando analizamos el número de especies nuevas obtenidas respecto al total de cepas aisladas, en el caso de las cepas de rizosfera de Salamanca el porcentaje es mayor que para las cepas de nódulos (Tabla 48). Mientras que en las cepas de Cañizal, este porcentaje es mayor para las cepas obtenidas a partir de los nódulos (Tabla 48). De todos modos, estos datos son relativos, ya que se observó que de las 12 cepas secuenciadas de nódulos de Salamanca, las 12 correspondían con especies diferentes, por lo que podría haber cepas englobadas en el mismo grupo que alguna de estas cepas representantes que no perteneciera a la misma especie.

Tabla 48. Número y porcentaje de nuevas especies encontradas.

Zona Aislamiento	Nº de cepas aisladas	Nº especies nuevas	% especies nuevas
Nódulos Cañizal	27	12	44
Nódulos Salamanca	46	12	26
Rizosfera Cañizal	21	5	24
Rizosfera Salamanca	12	4	33

Debido a que las plantas a partir de las que se aislaron los microorganismos no presentaban síntomas de enfermedad y a que el aislamiento es sistemático, parece razonable pensar que las cepas de *Micromonospora* cumplen una función dentro de la planta. Algunos estudios muestran un mejor desarrollo vegetal o la activación de

mecanismos de defensa al inocular cepas de éste género (Conn *et al.*, 2008), y se ha observado que la coinoculación de cepas de *Micromonospora* con cepas noduladoras de rhizobia incrementa el número de nódulos formados y el desarrollo foliar (Cerdea, 2008); también parece que algunas de estas cepas son capaces de fijar nitrógeno en vida libre y quizá podrían hacerlo en interacción con las plantas (Valdés *et al.*, 2005; Cerde, 2008), pero sería necesario un estudio más profundo para conocer la verdadera interacción *Micromonospora*-leguminosa.

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede decir que la diversidad genética del género en los nódulos es mayor a la que se obtiene de la rizosfera de las plantas. Sin embargo, en los análisis realizados, no se ha observado una especificidad de especie en los diferentes nichos, por lo que la mayor diversidad en los nódulos podría justificarse por una mayor población de cepas de este género en el interior del nódulo, ya que, el número de especies detectadas en el interior fue superior al doble de las especies detectadas en la rizosfera, y aunque el porcentaje respecto al total de cepas aisladas no fuera superior (Tabla 48), sí que se observaba esta mayor diversidad en los análisis de tipado, por lo que esta puede que sea superior sólo a nivel intraespecífico y no en el número de especies. Tampoco se han observado diferencias de especificidad de especie en las dos zonas de aislamiento utilizadas en estos análisis, Cañizal y Salamanca, pero sí se ha observado que un porcentaje muy elevado de las cepas estaban filogenéticamente relacionadas con las cepas *Micromonospora saelicesensis* DSM 44871<sup>T</sup>, *Micromonospora lupini* DSM 44874<sup>T</sup> y *Micromonospora coriariae* DSM 44875<sup>T</sup>.

### **La eficiencia de los diferentes métodos empleados en el estudio de la diversidad genética**

Desde la aparición de los métodos genómicos en la caracterización de microorganismos han surgido numerosas técnicas que permiten la evaluación de la diversidad genética de los microorganismos, tanto aislados como a los que se le ha amplificado directamente su ADN sin necesidad de aislarlos. Sin embargo, no todas las técnicas resultan igual de efectivas, sus resultados varían dependiendo tanto de la técnica utilizada como del tipo de microorganismo con el que se este trabajando. Las cuatro técnicas de tipado analizadas en este trabajo fueron, BOX-PCR, Microsatélites, TP-RAPD y ARDRA. Todas ellas han demostrado su eficacia en la caracterización de diferentes tipos de microorganismos, pero no todas se habían utilizado para el género

*Micromonospora*. Por ello, el análisis de las cepas de estudio con cada una de las técnicas permitió evaluar su eficiencia para este género.

La técnica de BOX-PCR se había utilizado con gran eficacia en *Streptomyces* (Lanoot *et al.*, 2004), en el que se había comprobado una alta relación entre los resultados obtenidos con este método y los resultados de hibridación ADN-ADN. Más recientemente, Maldonado *et al.* (2008), aplicaron esta metodología sobre el género *Micromonospora* obteniendo agrupaciones taxonómicamente relacionadas con los resultados obtenidos tras secuenciar el gen ribosómico 16S. De las técnicas utilizadas en este trabajo para evaluar la diversidad genética de los microorganismos aislados, se comprobó que la más eficiente fue esta técnica de BOX-PCR, utilizando para ello el oligonucleótido BOXA1R. Con ella se consiguió separar todas las cepas que no eran clones, eliminando de este modo posibles duplicados. Además se confirmó que es reproducible y estable.

Del mismo modo, la técnica de Microsatélites o RAPD, utilizando el oligonucleótido M13, resultó de una eficacia similar en este género, aunque ligeramente inferior, dado que el número de cepas diferenciadas fue algo menor al que se obtuvo mediante la técnica de BOX-PCR. Por ello, a pesar de ser una técnica ampliamente utilizada en otros géneros, como los tipo rhizobia (Corich *et al.*, 2001; Iglesias *et al.*, 2007; Santillana *et al.*, 2008), o algunas actinobacterias, como el género *Streptomyces* (Fani *et al.*, 1993; Mehling *et al.*, 1995; Malkawi *et al.*, 1999) con buenos resultados, se ha podido observar que en el caso del género *Micromonospora* estos perfiles son menos resolutivos que los obtenidos con BOX-PCR.

El análisis de un amplio número de aislados a través de la técnica de ARDRA para su caracterización ha sido ampliamente utilizado en muchos tipo de bacterias, incluidas las actinobacterias (Alvarez *et al.*, 2008; Matarelli *et al.*, 2008; Berdoulay *et al.*, 2009), sin embargo, hasta este trabajo no había sido utilizada esta técnica en la caracterización del género *Micromonospora*. En el estudio presentado se pudo observar que los perfiles de ARDRA, utilizando las enzimas de restricción *Bsh 1285 I*, *Hin6 I*, *FspB I* y *Pst I*, son eficaces a la hora de agrupar cepas que pertenezcan a la misma especie, por lo que es una buena técnica para la selección de representantes para su secuenciación dentro del género *Micromonospora*. En un análisis reciente de esta técnica (Sklarz *et al.*, 2009), se



demonstró que la agrupación a nivel de especie es viable si se eligen correctamente las enzimas de restricción, pero que la diferenciación a nivel de cepa requiere la utilización de medidas más estrictas que llevan mucho tiempo; resultados que se corresponden con los obtenidos en este estudio.

La técnica de TP-RAPD se aplica a un nivel más específico, clasificando las bacterias a nivel superior al de cepa, ya que los oligonucleótidos que se utilizan están basados en la secuencia del gen ribosómico 16S (Rivas *et al.*, 2001). Probablemente esta sea una de las razones por las que esta técnica no resulta tan efectiva a la hora de ver la diversidad genética, ya que no es capaz de diferenciar entre cepas próximas que pertenezcan a la misma especie o subespecie. Por ello, esta técnica se queda en un punto intermedio entre los resultados que obtenemos para los perfiles de BOX-PCR y el análisis de los perfiles de ARDRA; técnicas que consideramos que en su conjunto, podrían formar la mejor combinación para obtener la máxima información en la agrupación de cepas del género *Micromonospora*.

#### **“Pros” y “contras” de los diferentes genes analizados y su relación con los datos de hibridación**

Debido a las complicaciones que supone la técnica de hibridación ADN-ADN, sobre todo la ausencia de consenso en los resultados de unos laboratorios a otros, en los últimos años se ha tratado de implementar el análisis de diferentes secuencias conservadas que de forma individual o en su conjunto aporten resultados similares a los obtenidos con hibridación ADN-ADN. El problema de este análisis es que no todas las secuencias de genes conservados funcionan igual en los diferentes microorganismos analizados, por lo que la búsqueda de los genes adecuados se está realizando para cada género de forma individual, ya que los resultados en un genoma no son necesariamente extrapolables para otros géneros. En este estudio se llevó a cabo la evaluación de diferentes genes conservados que codifican para proteínas, el gen que codifica para la subunidad B de la girasa (*gyrB*), el gen que codifica para una recombinasa (*recA*), el gen que codifica para la subunidad B de la ARN polimerasa (*rpoB*) y el gen que codifica para la subunidad  $\beta$  de la atp sintetasa (*atpD*), además del gen ribosómico 16S para determinar su utilidad en el establecimiento de las relaciones filogenéticas del género *Micromonospora*.

El primero de los genes analizados fue el gen *gyrB*, que codifica para la subunidad B de la girasa, ya que este había sido utilizado con anterioridad en estudios del género *Micromonospora* (Kasai *et al.*, 2000). Se trataron de amplificar las secuencias a partir de los oligonucleótidos diseñados por Yamamoto y Harayama (1995), UP1 y UP2, pero al igual que le ocurrió a Richert *et al.* (2005), no se pudo llevar a cabo la amplificación de las cepas analizadas. Por ello, se realizó el diseño de nuevos oligonucleótidos basándose en los ya descritos por Richert *et al.* (2005), pero modificándolos para el género *Micromonospora* por comparación con las secuencias existentes en las bases de datos de este género (Kasai *et al.*, 2000). Con los nuevos oligonucleótidos la amplificación fue correcta para todas las cepas de *Micromonospora* analizadas; el fragmento secuenciado era de aproximadamente 1000 pb. Una vez obtenidas las secuencias de 33 cepas tipo y 49 cepas de estudio y tras realizar su análisis, se determinó que el gen *gyrB* resulta, en su análisis individual, el más eficaz a la hora de establecer la relación filogenética entre dos especies del género *Micromonospora*, siendo mejor incluso que el gen ribosómico 16S. Esto se puede observar en la capacidad resolutoria que se muestra en los árboles filogenéticos. Además, a modo de ejemplo, se puede destacar la utilidad de este gen en cepas cuya identificación es complicada, como es el caso de *Micromonospora pisi*, muy próxima al género *Polymorphospora*, en cuya descripción los datos aportados por el gen *gyrB* fueron claves para ubicarla dentro del género *Micromonospora* (Carro *et al.*, 2009). El valor obtenido como punto de corte para que dos cepas puedan considerarse de diferentes especies fue 98,5%. Este valor se obtuvo tras el análisis de los porcentajes de similitud obtenidos para el gen comparados con los porcentajes de hibridación obtenidos para esas cepas, en los que se observaba que los datos obtenidos para el gen *gyrB* mostraban una relación lineal con los porcentajes de hibridación obtenidos.

El análisis del gen *rpoB* no se había realizado con anterioridad para el género *Micromonospora*, por ello se utilizaron los oligonucleótidos descritos para el género *Mycobacterium* (Adekambi *et al.*, 2003) pero modificados para hacerlos más generales a actinobacterias, utilizando diferentes géneros cuyo genoma estaba depositado en las bases de datos. Los nuevos oligonucleótidos resultaron eficaces en la amplificación para todas las cepas analizadas. La zona amplificada correspondía con una parte del gen que, según los resultados de Adekambi *et al.* (2003) reflejaba fielmente los resultados obtenidos con el análisis del gen completo, debido a su variabilidad. El gen *rpoB*

ofreció buenos resultados en su análisis individual, a pesar de utilizar una zona relativamente pequeña del gen. En los análisis filogenéticos se consiguió la diferenciación entre todas las cepas tipo de las especies representadas, y la estabilidad al utilizar diferentes métodos fue la más elevada de todos los genes utilizados. La relación que ofrecían los porcentajes de similitud obtenidos para el gen *rpoB* mostraban asimismo una relación bastante lineal con los porcentajes de hibridación obtenidos para las cepas de estudio, estableciendo un valor de corte para este gen en torno al 99% de similitud.

Tampoco había habido análisis anteriores de los genes *recA* y *atpD* para el género *Micromonospora*. En el caso del gen *recA*, se utilizaron para su amplificación los oligonucleótidos diseñados por Rossi *et al.* (2006) para el género *Propionibacterium*. Estos oligonucleótidos amplificaron correctamente la mayoría de las cepas, con excepción de siete cepas, por lo que sería recomendable la modificación de los oligonucleótidos para amplificar todas las cepas del género *Micromonospora*. Para la amplificación del gen *atpD* se diseñaron unos oligonucleótidos generales en base a secuencias del gen *atpD* de algunas actinobacterias depositadas en las bases de datos públicas. Estos genes, el *recA* y el *atpD*, en este caso no fueron capaces de resolver bien las relaciones entre las distintas especies del género, a pesar de ser genes de un uso generalizado en otros géneros en los que sí muestran buenos resultados (Blackwood *et al.*, 2000; Gaunt *et al.*, 2001; Rivas *et al.*, 2009). Puede ser que la zona secuenciada no sea adecuada y el uso de la secuencia completa pudiera ofrecer mejores resultados, pero la zona evaluada en este trabajo no ayuda a resolver las relaciones del género *Micromonospora*.

Sin embargo, la evaluación de todas las secuencias obtenidas en este trabajo analizadas de forma concatenada sí que dan unos resultados más estables cuyos porcentajes de similitud mantienen una relación bastante lineal con los porcentajes de hibridación ADN-ADN (Figura 52). Por ello, este análisis podría considerarse un buen sustituto de la técnica de hibridación ADN-ADN en el género *Micromonospora*, ya que cumple con las características requeridas por el comité para la evaluación de la definición de especies (Stackebrandt *et al.*, 2002) y los resultados son estables. Aunque para definir un buen punto de corte a partir de estos datos sería necesaria la evaluación

previa de más resultados de hibridación ADN-ADN, sobre todo entre cepas próximas que pertenezcan a la misma especie.

### **Las pruebas fenotípicas, ¿pasado o futuro?**

A pesar de que la mayoría de los taxónomos están de acuerdo en la gran importancia que recae en los análisis fenotípicos a la hora de caracterizar un microorganismo, no siempre estos son tenidos en cuenta, o al menos en el grado en que se debería, en las nuevas descripciones de especies. Muchas veces estos tipos de análisis se consideran técnicas del pasado a las que se recurría en el inicio de una caracterización basada en la morfología. Olvidando que cada uno de los resultados expresados en las diferentes pruebas viene dado por la expresión de varios genes combinados.

El estudio fenotípico de varias cepas de una misma especie aporta más información sobre las capacidades de la misma que si sólo se analiza la cepa tipo, ya que se pueden obtener las capacidades que son comunes a todas las cepas de la especie y las que son variables dentro de la misma, por lo que es conveniente hacerlo siempre que sea posible. Un inconveniente al realizar este tipo de análisis, es que, al igual que ocurre con la técnica de hibridación ADN-ADN, los resultados que se obtienen varían de unos laboratorios a otros, siendo conveniente el análisis de las cepas tipo más próximas de la especie que se quiere describir bajo las mismas condiciones que las cepas de la nueva especie.

En el análisis fenotípico realizado en este trabajo se incluyeron las 145 cepas aisladas de las localidades de Cañizal y Salamanca y 33 cepas tipo del género *Micromonospora*. Entre los microorganismos aislados de los distintos hábitats, nódulos y rizosfera de Cañizal y nódulos y rizosfera de Salamanca, no hubo muchas diferencias en la utilización de sustratos como fuentes de carbono ni en la degradación de compuestos por parte de los distintos tipos de microorganismos aislados, aunque los obtenidos de rizosfera consiguieron utilizar el ácido propiónico, la alanina y el almidón en mayor proporción que los obtenidos de los nódulos. A partir de este análisis fenotípico se observó que, a diferencia de lo que se indicaba en la introducción (Kawamoto, 1989), gran parte de las cepas de *Micromonospora* son capaces de crecer a 45°C.

Una recomendación clara del uso del análisis fenotípico y las indicaciones de cómo se deben aportar este tipo de datos cuando se presentan en publicaciones científicas aparecen recientemente descritas por Tindall *et al.* (2009).

Los estudios realizados en el presente trabajo claramente indicaban que la sistemática bacteriana es una disciplina muy dinámica y que la descripción de nuevas especies requiere de una correcta selección de la metodología empleada.

Por otro lado, este trabajo destaca la importancia de analizar varias cepas para la descripción de nuevas especies.

*PROPUESTA DE  
NUEVAS ESPECIES*

## 6. PROPUESTA DE NUEVAS ESPECIES

*Micromonospora pisi* sp. nov.

*Micromonospora pisi* (pi'si. L. fem. adj. *pisii* perteneciente a *Pisum*, la planta de la que se aisló la cepa).

Gram positiva, actinobacteria no acidorresistente que presenta un micelio de sustrato ampliamente ramificado y no fragmentado. Presenta esporas únicas, lisas e inmóviles, que son producidas en el extremo de las hifas, aunque a veces se pueden observar pares de esporas. Aerobia estricta y quimioorganotrofa. Las colonias varían desde un color beige a un amarillo palo, son elevadas y con pliegues en el medio ISP 2. Carece de micelio aéreo y no produce pigmentos difundibles. Crece en un rango de pH de 7 a 9. El rango de temperatura de crecimiento es entre 20 y 37°C, con un óptimo a 28°C. Crece por debajo del 1% de NaCl. Es oxidasa y catalasa positiva. Degrada esculina, arbutina, caseína, gelatina, almidón y xilano, pero no Tween 20, Tween 80, tirosina o urea. Utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: L-alanina, almidón, L(+)-arabinosa, L-arginina, D(+)-celobiosa, D(-)-fructosa, D(+)-galactosa, gluconato, D(+)-glucosa, L-histidina, D(+)-manosa, D(+)-melibiosa, L(+)-ramnosa, sacarosa, D(-)-salicina y D(+)-xilosa. No utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: D(+)-ácido galacturónico, ácido propiónico, D(-)-ácido quínico, ácido sebácico, L-lisina, D(+)-maltosa, D(+)-melecitosa, meso-eritritol, L-prolina, D(+)-rafinosa, L-serina, sorbitol, L-sorbosa, D(+)-trehalosa, L-valina o xilitol. Contiene *meso*-DAP en su pared celular. Los azúcares celulares mayoritarios que presenta son galactosa, manosa, ribosa y xilosa. Los ácidos grasos mayoritarios que posee son *iso*-16:0, *anteiso*-15:0, *anteiso*-17:0 e *iso*-15:0. La menaquinona principal es MK-10(H<sub>4</sub>). El contenido en G+C de la cepa tipo es 71 mol%.

La cepa tipo GUI 15<sup>T</sup> (=DSM 45175<sup>T</sup> =LMG 24546<sup>T</sup>) fue aislada de nódulos radicales de *Pisum sativum*. (Carro *et al.*, 2009).

*Micromonospora canizaliensis* sp. nov.

*Micromonospora canizaliensis* (ca.ni.za.lien'sis. L. fem. adj. *canizaliensis* perteneciente a Cañizal, el lugar donde se recogieron las plantas de las que se aisló la cepa).

Gram positiva, actinobacteria no acidorresistente que presenta un micelio de sustrato ampliamente ramificado y no fragmentado. Presenta esporas únicas, lisas e inmóviles,

que son producidas en el extremo de las hifas. Aerobia estricta y quimioorganotrofa. Las colonias varían desde un color naranja claro a un marrón, son elevadas y con pliegues en el medio ISP 2. Carece de micelio aéreo y no produce pigmentos difundibles. Crece en un rango de pH de 7 a 9. El rango de temperatura de crecimiento es entre 12 y 37°C, con un óptimo a 28°C. Crece por debajo del 3% de NaCl. Es oxidasa y catalasa positiva. Degrada almidón, arbutina, caseína, esculina, gelatina, Tween 80 y xilano, pero no tirosina, Tween 20 o urea. Utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: almidón, L(+)-arabinosa, D(+)-celobiosa, D(-)-fructosa, gluconato, D(+)-glucosa, L-histidina, D(+)-manosa, D(+)-melecitosa, D(+)-melibiosa, D(+)-rafinosa, sacarosa, D(+)-trehalosa y D(+)-xilosa. No utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: D(+)-ácido galacturónico, ácido glutárico, ácido propiónico, D(-)-ácido quínico, ácido sebácico, L-alanina, L-arginina, D(+)-galactosa, L-lisina, D(+)-maltosa, meso-eritritol, L-prolina, L(+)-ramnosa, D(-)-salicina, L-serina, sorbitol, L-sorbosa, tirosina, L-valina o xilitol. Contiene *meso*-DAP en su pared celular. Los azúcares celulares mayoritarios que presenta son galactosa, glucosa, manosa, ribosa y xilosa. Los ácidos grasos mayoritarios que posee son *iso*-15:0, *iso*-16:0, *cis*9-17:1 y *anteiso*-15:0. Las menaquinonas principales son MK-10(H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>) y MK-9(H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>). La cepa tipo GUI 2<sup>T</sup> fue aislada de nódulos radicales de *Pisum sativum*. Otras cepas de la especie son GUI 14, GUI 42 y CR 21 las dos primeras aisladas también de nódulos radicales de *Pisum sativum* y la tercera de la rizosfera de esta planta.

*Micromonospora calis* sp. nov.

*Micromonospora calis* (ca'lis. L. fem. adj. calis perteneciente al calcio, elemento nutritivo necesario para el desarrollo de la cepa tipo).

Gram positiva, actinobacteria no acidorresistente que presenta un micelio de sustrato ampliamente ramificado y no fragmentado. Presenta esporas únicas, lisas e inmóviles, que son producidas en el extremo de las hifas. Aerobia estricta y quimioorganotrofa. Las colonias son de color beis, elevadas y con pliegues en el medio ISP 2. Carece de micelio aéreo y no produce pigmentos difundibles. Crece en un rango de pH de 7 a 9. El rango de temperatura de crecimiento es entre 12 y 37°C, con un óptimo a 28°C. Crece por debajo del 1% de NaCl. Es oxidasa y catalasa positiva. Degrada caseína, esculina, gelatina y Tween 80 pero no almidón, arbutina, Tween 20, tirosina, urea o xilano. Utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: L(+)-arabinosa, L-arginina, D(-)-fructosa, D(+)-galactosa, gluconato, D(+)-glucosa, D(+)-maltosa, D(+)-manosa,



D(+)-melibiosa, D(+)-rafinosa, sacarosa, D(+)-trehalosa y D(+)-xilosa. No utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: D(+)-ácido galacturónico, ácido glutárico, ácido propiónico, D(-)-ácido quínico, L-alanina, almidón, D(+)-celobiosa, L-histidina, L-lisina, D(+)-melecitosa, meso-eritritol, L-prolina, L(+)-ramnosa, D(-)-salicina, L-serina, sorbitol, L-sorbosa, tirosina, L-valina o xilitol. Contiene *meso*-DAP en su pared celular. Los azúcares celulares mayoritarios que presenta son arabinosa, glucosa, manosa, ribosa y ramnosa. Los ácidos grasos mayoritarios que posee son *iso*-16:0, *iso*-15:0, *anteiso*-17:0 y *anteiso*-15:0. Las menaquinonas principales son MK-10(H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>) y MK-9(H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>).

La cepa tipo GUI 13<sup>T</sup> fue aislada de nódulos radicales de *Pisum sativum*. Otra cepa de esta especie es SGA 9 aislada también de nódulos radicales.

*Micromonospora xilanacea* sp. nov.

*Micromonospora xilanacea* (xi.la.na'ce.a. L. fem. adj. xilanacea perteneciente a xilano, compuesto que degrada la cepa tipo).

Gram positiva, actinobacteria no acidorresistente que presenta un micelio de sustrato ampliamente ramificado y no fragmentado. Presenta esporas únicas, lisas e inmóviles, que son producidas en el extremo de las hifas. Aerobia estricta y quimioorganotrofa. Las colonias varían desde un naranja claro a un naranja intenso, son elevadas y con pliegues en el medio ISP 2. Carece de micelio aéreo y produce pigmentos difundibles color naranja claro sobre medio SA1. Crece en un rango de pH de 7 a 9. El rango de temperatura de crecimiento es entre 20 y 37°C, con un óptimo a 28°C. Crece por debajo del 1% de NaCl. Es oxidasa y catalasa positiva. Degrada arbutina, caseína, esculina, gelatina, Tween 20, Tween 80, tirosina, urea y xilano, pero no almidón. Utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: L(+)-arabinosa, D(+)-celobiosa, D(-)-fructosa, D(+)-galactosa, gluconato, D(+)-glucosa, L-lisina, D(+)-maltosa, D(+)-manosa, D(+)-melibiosa, D(+)-rafinosa, sacarosa, D(+)-trehalosa y D(+)-xilosa. No utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: D(+)-ácido galacturónico, ácido glutárico, ácido propiónico, D(-)-ácido quínico, ácido sebácico, L-alanina, almidón, L-arginina, L-histidina, D(+)-melecitosa, meso-eritritol, L-prolina, L(+)-ramnosa, D(-)-salicina, L-serina, sorbitol, L-sorbosa, tirosina, L-valina o xilitol. Contiene *meso*-DAP en su pared celular. Los azúcares celulares mayoritarios que presenta son galactosa, glucosa, manosa, ribosa y xilosa. Los ácidos grasos mayoritarios

que posee son *iso*-15:0, *9metil*-16:0, *iso*-17 y *anteiso*-17:0. Las menaquinonas principales son MK-10(H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>) y MK-9(H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>).

La cepa tipo GUI 23<sup>T</sup> fue aislada de nódulos radicales de *Pisum sativum*.

*Micromonospora nodulaceae* sp. nov.

*Micromonospora nodulaceae* (no.du.la.ce.a'e. L. fem. adj. nodulaceae perteneciente al nódulo, la parte de la planta de la que se aisló la cepa).

Gram positiva, actinobacteria no acidorresistente que presenta un micelio de sustrato ampliamente ramificado y no fragmentado. Presenta esporas únicas, lisas e inmóviles, que son producidas en el extremo de las hifas. Aerobia estricta y quimioorganotrofa. Las colonias varían desde un color naranja claro a un naranja intenso, son elevadas y con pliegues en el medio ISP 2. Carece de micelio aéreo y no produce pigmentos difundibles. Crece en un rango de pH de 7 a 10. El rango de temperatura de crecimiento es entre 12 y 37°C, con un óptimo a 28°C. Crece por debajo del 3% de NaCl. Es oxidasa y catalasa positiva. Degrada arbutina, caseína, esculina, gelatina, Tween 20, Tween 80 y xilano pero no almidón, tirosina o urea. Utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: almidón, L(+)-arabinosa, L- arginina, D(+)-celobiosa, D(-)-fructosa, D(+)-galactosa, gluconato, D(+)-glucosa, L-histidina, L-lisina, D(+)-maltosa, D(+)-manosa, D(+)-melibiosa, D(+)-rafinosa, sacarosa, tirosina, D(+)-trehalosa, L-valina y D(+)-xilosa. No utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: D(+)-ácido galacturónico, ácido glutárico, ácido propiónico, D(-)-ácido quínico, L-alanina, D(+)-melecitosa, meso-eritritol, L-prolina, L(+)-ramnosa, D(-)-salicina, L-serina, sorbitol, L-sorbosa o xilitol. Contiene *meso*-DAP en su pared celular. Los azúcares celulares mayoritarios que presenta son arabinosa, glucosa, manosa, xilosa y ribosa. Los ácidos grasos mayoritarios que posee son *iso*-15:0, *9metil*-16:0, *anteiso*-17:0 e *iso*-17:0. Las menaquinonas principales son MK-10(H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>) y MK-9(H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>).

La cepa tipo GUI 40<sup>T</sup> fue aislada de nódulos radicales de *Pisum sativum*.

*Micromonospora cervina* sp. nov.

*Micromonospora cervina* (cer.vi'na. L. fem. adj. cervina perteneciente a cervínus, color marrón oscuro que adquiere la cepa tipo con el tiempo).

Gram positiva, actinobacteria no acidorresistente que presenta un micelio de sustrato ampliamente ramificado y no fragmentado. Presenta esporas únicas, lisas e inmóviles, que son producidas en el extremo de las hifas. Aerobia estricta y quimioorganotrofa.

Las colonias varían desde un beis a un marrón oscuro, son elevadas y con pliegues en el medio ISP 2. Carece de micelio aéreo y produce pigmentos difundibles color marrón sobre medio SA1. Crece en un rango de pH de 7 a 10. El rango de temperatura de crecimiento es entre 12 y 37°C, con un óptimo a 28°C. Crece por debajo del 3% de NaCl. Es oxidasa y catalasa positiva. Degrada arbutina, caseína, esculina, gelatina, Tween 80 y xilano, pero no almidón, Tween 20, tirosina o urea. Utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: almidón, L(+)-arabinosa, D(+)-celobiosa, D(-)-fructosa, D(+)-galactosa, gluconato, D(+)-glucosa, L-histidina, D(+)-maltosa, D(+)-manosa, D(+)-melibiosa, D(+)-rafinosa, sacarosa, D(+)-trehalosa y D(+)-xilosa. No utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: D(+)-ácido galacturónico, ácido glutárico, ácido propiónico, D(-)-ácido quínico, L-alanina, L-arginina, L-lisina, D(+)-melecitosa, meso-eritritol, L-prolina, L(+)-ramnosa, D(-)-salicina, L-serina, sorbitol, L-sorbosa, tirosina, L-valina o xilitol. Contiene *meso*-DAP en su pared celular. Los azúcares celulares mayoritarios que presenta son glucosa, manosa, ramnosa, ribosa y xilosa. Los ácidos grasos mayoritarios que posee son *iso*-15:0, *iso*-16:0, *9metil*-16:0 y *cis*9-17:1. Las menaquinonas principales son MK-10(H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>) y MK-9(H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>). La cepa tipo GUI 43<sup>T</sup> fue aislada de nódulos radicales de *Pisum sativum*. Otras cepas que pertenecen a esta especie son GUI 3, GUI 8, SG 8 y SR 1, las tres primeras aisladas de nódulos y la cuarta de rizosfera.

*Micromonospora armeniaca* sp. nov.

*Micromonospora armeniaca* (ar.me.nia'ca. L. fem. adj. armeniaca perteneciente a *armeniacus*, color amarillo-anaranjado que adquiere la cepa tipo).

Gram positiva, actinobacteria no acidorresistente que presenta un micelio de sustrato ampliamente ramificado y no fragmentado. Presenta esporas únicas, lisas e inmóviles, que son producidas en el extremo de las hifas. Aerobia estricta y quimioorganotrofa. Las colonias varían desde un naranja claro a un marrón, son elevadas y con pliegues en el medio ISP 2. Carece de micelio aéreo y produce pigmentos difundibles color rojizo sobre medio Avena. Crece en un rango de pH de 7 a 10. El rango de temperatura de crecimiento es entre 12 y 37°C, con un óptimo a 28°C. Crece por debajo del 3% de NaCl. Es oxidasa y catalasa positiva. Degrada arbutina, caseína, esculina, gelatina, Tween 20, Tween 80 y xilano, pero no almidón, tirosina o urea. Utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: almidón, L(+)-arabinosa, arginina, D(+)-celobiosa, D(-)-fructosa, D(+)-galactosa, gluconato, D(+)-glucosa, L-histidina, D(+)-maltosa,

D(+)-manosa, D(+)-melibiosa, D(+)-rafinosa, L(+)-ramnosa, sacarosa, D(-)-salicina, D(+)-trehalosa y D(+)-xilosa. No utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: D(+)-ácido galacturónico, ácido glutárico, ácido propiónico, D(-)-ácido quínico, L-alanina, L- L-lisina, D(+)-melecitosa, meso-eritritol, L-prolina, L-serina, sorbitol, L-sorbosa, tirosina, L-valina o xilitol. Contiene *meso*-DAP en su pared celular. Los azúcares celulares mayoritarios que presenta son galactosa, glucosa, manosa, ramnosa, ribosa y xilosa. Los ácidos grasos mayoritarios que posee son *iso*-16:0, *iso*-15:0, *cis*9-18:1 y *anteiso*-17:0. Las menaquinonas principales son MK-10(H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>) y MK-9(H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>).

La cepa tipo GUI 63<sup>T</sup> fue aislada de nódulos radicales de *Pisum sativum*.

*Micromonospora rhizosphaerae* sp. nov.

*Micromonospora rhizosphaerae* (rhi.zo'spher.ae. M.L. *rhizo* raiz; Gr. adj. *sphaera* esfera; M.L. n. *rhizosphaerae* referente a la rizosfera, zona cercana a la raíz donde se aisló la cepa tipo).

Gram positiva, actinobacteria no acidorresistente que presenta un micelio de sustrato ampliamente ramificado y no fragmentado. Presenta esporas únicas, lisas e inmóviles, que son producidas en el extremo de las hifas. Aerobia estricta y quimioorganotrofa. Las colonias varían desde un naranja claro a un naranja intenso, son elevadas y con pliegues en el medio ISP 2. Carece de micelio aéreo y no produce pigmentos difundibles. Crece en un rango de pH de 6 a 10. El rango de temperatura de crecimiento es entre 12 y 45°C, con un óptimo a 28°C. Crece por debajo del 5% de NaCl. Es oxidasa negativa y catalasa positiva. Degrada almidón, arbutina, caseína, esculina, gelatina, Tween 20, Tween 80, tirosina y xilano, pero no urea. Utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: ácido propiónico, L-alanina, almidón, L(+)-arabinosa, arginina, D(+)-celobiosa, D(-)-fructosa, D(+)-galactosa, D(+)-glucosa, L-lisina, D(+)-maltosa, D(+)-manosa, D(+)-melibiosa, L-prolina, D(+)-rafinosa, sacarosa, D(-)-salicina, L-serina, D(+)-trehalosa y L-valina. No utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: D(+)-ácido galacturónico, ácido glutárico, D(-)-ácido quínico, gluconato, L-histidina, D(+)-melecitosa, meso-eritritol, L(+)-ramnosa, sorbitol, L-sorbosa, tirosina, xilitol o D(+)-xilosa. Contiene *meso*-DAP en su pared celular. Los azúcares celulares mayoritarios que presenta son galactosa, glucosa, manosa, ramnosa, ribosa y xilosa. Los ácidos grasos mayoritarios que posee son *iso*-15:0, *iso*-16:0, *9metil*-16:0 y *anteiso*-17:0. Las menaquinonas principales son MK-10(H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>).

La cepa tipo CR 18<sup>T</sup> fue aislada de rizosfera de plantas de *Pisum sativum*.

*Micromonospora rugosa* sp. nov.

*Micromonospora rugosa* (ru.go'sa L. fem. adj. rugosa perteneciente a *rugosus* rugoso referente a la forma rugosa en que se forman las colonias de la cepa tipo).

Gram positiva, actinobacteria no acidorresistente que presenta un micelio de sustrato ampliamente ramificado y no fragmentado. Presenta esporas únicas, lisas e inmóviles, que son producidas en el extremo de las hifas. Aerobia estricta y quimioorganotrofa. Las colonias varían desde un naranja claro a un naranja intenso, son elevadas y con muchos pliegues en el medio ISP 2. Carece de micelio aéreo y no produce pigmentos difundibles. Crece en un rango de pH de 7 a 9. El rango de temperatura de crecimiento es entre 12 y 37°C, con un óptimo a 28°C. Crece por debajo del 1% de NaCl. Es oxidasa y catalasa positiva. Degrada almidón, caseína, esculina, gelatina, Tween 80 y xilano, pero no arbutina, Tween 20, tirosina o urea. Utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: L-alanina, almidón, L(+)-arabinosa, arginina, D(-)-fructosa, D(+)-glucosa, L-lisina, D(+)-maltosa, D(+)-manosa, D(+)-melecitosa, meso-eritritol, D(+)-rafinosa, L(+)-ramnosa, sacarosa, D(-)-salicina, L-serina, D(+)-trehalosa y L-valina. No utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: D(+)-ácido galacturónico, ácido glutárico, ácido propiónico, D(-)-ácido quínico, D(+)-celobiosa, D(+)-galactosa, gluconato, L-histidina, D(+)-melibiosa, L-prolina, sorbitol, L-sorbosa, tirosina, xilitol o D(+)-xilosa. Contiene *meso*-DAP en su pared celular. Los azúcares celulares mayoritarios que presenta son galactosa, glucosa, manosa, ramnosa, ribosa y xilosa. Los ácidos grasos mayoritarios que posee son *iso*-16:0, *iso*-15:0, *anteiso*-17:0 e *iso*-17:0. Las menaquinonas principales son MK-10(H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>) y MK-9(H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>).

La cepa tipo CR 30<sup>T</sup> fue aislada de rizosfera de plantas de *Pisum sativum*. Otra cepa que pertenece a esta especie es CR 36, aislada también de la rizosfera.

*Micromonospora rufula* sp. nov.

*Micromonospora rufula* (ru'fu.la L. fem. adj. rufula perteneciente a *rufulus* rojizo referente al color rojoanaranjado de las colonias de la cepa tipo).

Gram positiva, actinobacteria no acidorresistente que presenta un micelio de sustrato ampliamente ramificado y no fragmentado. Presenta esporas únicas, lisas e inmóviles, que son producidas en el extremo de las hifas. Aerobia estricta y quimioorganotrofa. Las colonias son de color naranja intenso, elevadas y con pliegues en el medio ISP 2.

Carece de micelio aéreo y produce pigmentos difundibles de color naranja intenso sobre medio SA1. Crece en un rango de pH de 6 a 10. El rango de temperatura de crecimiento es entre 12 y 37°C, con un óptimo a 28°C. Crece por debajo del 1% de NaCl. Es oxidasa y catalasa positiva. Degrada almidón, arbutina, caseína, esculina, gelatina, Tween 20, Tween 80, tirosina y xilano, pero no urea. Utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: ácido propiónico, L-alanina, almidón, L(+)-arabinosa, arginina, D(+)-celobiosa, D(-)-fructosa, gluconato, D(+)-glucosa, D(+)-maltosa, D(+)-manosa, D(+)-melecitosa, D(+)-melibiosa, L-prolina, D(+)-rafinosa, L(+)-ramnosa, sacarosa, D(-)-salicina, L-serina, D(+)-trehalosa y L-valina. No utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: D(+)-ácido galacturónico, ácido glutámico, D(-)-ácido quínico, D(+)-galactosa, L-histidina, L-lisina, meso-eritritol, sorbitol, L-sorbosa, tirosina, xilitol o D(+)-xilosa. Contiene *meso*-DAP en su pared celular. Los azúcares celulares mayoritarios que presenta son glucosa, manosa, ribosa y xilosa. Los ácidos grasos mayoritarios que posee son *iso*-16:0, *iso*-15:0, *anteiso*-17:0 y *anteiso*-15:0. Las menaquinonas principales son MK-10(H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>).

La cepa tipo CR 38<sup>T</sup> fue aislada de rizosfera de plantas de *Pisum sativum*.

Descripción de *Micromonospora flava* sp. nov.

*Micromonospora flava* (fla'va. L. fem. adj. *flava* perteneciente a *Flāvus*, dorado amarillento, por el color de la cepa tipo).

Gram positiva, actinobacteria no acidorresistente que presenta un micelio de sustrato ampliamente ramificado y no fragmentado. Presenta esporas únicas, lisas e inmóviles, que son producidas en el extremo de las hifas. Aerobia estricta y quimioorganotrofa. Las colonias varían desde un color beige a un naranja claro, son elevadas y plegadas en el medio ISP 2. Carece de micelio aéreo y no produce pigmentos difundibles. Crece en un rango de pH de 7 a 10. El rango de temperatura de crecimiento es entre 12 y 45°C, con un óptimo a 28°C. Crece por debajo del 1% de NaCl. Es oxidasa negativa y catalasa positiva. Degrada almidón, esculina, arbutina, caseína, gelatina, Tween 20, tirosina y xilano, pero no Tween 80 o urea. Utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: L-alanina, L(+)-arabinosa, D(+)-glucosa, L-lisina, D(+)-manosa, D(+)-rafinosa, L(+)-ramnosa, D(-)-salicina, D(+)-trehalosa y L-valina. No utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: D(+)-ácido galacturónico, ácido glutámico, ácido propiónico, D(-)-ácido quínico, almidón, L-arginina, D(+)-celobiosa, D(-)-fructosa, D(+)-galactosa, gluconato, L-histidina, D(+)-maltosa, D(+)-melecitosa,

D(+)-melibiosa, meso-eritritol, L-prolina, sacarosa, L-serina, sorbitol, L-sorbosa, tirosina, xilitol o D(+)-xilosa. Contiene *meso*-DAP en su pared celular. Los azúcares celulares mayoritarios que presenta son arabinosa, glucosa, manosa, ribosa y xilosa. Los ácidos grasos mayoritarios que posee son *iso*-16:0, *9metil*-16:0, *iso*-15:0 y *cis*9-18:1. Las menaquinonas principales son MK-10(H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>) y MK-9(H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>). La cepa tipo SG 15<sup>T</sup> fue aislada de nódulos radicales de *Pisum sativum*.

*Micromonospora salmantini* sp. nov.

*Micromonospora salmantini* (sal.man.ti'ni. L. fem. adj. *salmantini* perteneciente a Salamanca, localidad de aislamiento de la cepa tipo).

Gram positiva, actinobacteria no acidorresistente que presenta un micelio de sustrato ampliamente ramificado y no fragmentado. Presenta esporas únicas, lisas e inmóviles, que son producidas en el extremo de las hifas. Aerobia estricta y quimioorganotrofa. Las colonias varían desde un color naranja claro a un naranja, son elevadas y plegadas en el medio ISP 2. Carece de micelio aéreo y no produce pigmentos difundibles. Crece en un rango de pH de 7 a 10. El rango de temperatura de crecimiento es entre 20 y 45°C, con un óptimo a 28°C. Crece por debajo del 5% de NaCl. Es oxidasa y catalasa positiva. Degrada almidón, esculina, arbutina, caseína, gelatina, Tween 20 y xilano, pero no Tween 80, tirosina o urea. Utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: almidón, L(+)-arabinosa, L- arginina, D(-)-fructosa, D(+)-glucosa, L-lisina, D(+)-manosa, D(+)-melecitosa, D(+)-melibiosa, L-prolina, D(+)-rafinosa, L(+)-ramnosa, sacarosa, D(-)-salicina, L-serina, sorbitol, D(+)-trehalosa y L-valina. No utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: D(+)-ácido galacturónico, ácido glutámico, ácido propiónico, D(-)-ácido quínico, L-alanina, D(+)-celobiosa, D(+)-galactosa, gluconato, L-histidina, D(+)-maltosa, meso-eritritol, L-sorbosa, tirosina, xilitol o D(+)-xilosa. Contiene *meso*-DAP en su pared celular. Los azúcares celulares mayoritarios que presenta son arabinosa, galactosa, glucosa, manosa, ramnosa, ribosa y xilosa. Los ácidos grasos mayoritarios que posee son *iso*-15:0, *anteiso*-17:0, *iso*-17:0 y *cis*9-17:1. Las menaquinonas principales son MK-10(H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>) y MK-9(H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>). La cepa tipo SG 16<sup>T</sup> fue aislada de nódulos radicales de *Pisum sativum*.

*Micromonospora auratipicea* sp. nov.

*Micromonospora auratipicea* (a.u. ra.ti.pi'cea. L. fem. adj. *auratipicea* perteneciente a *aurantia* naranja y *piceus* negro, cambio de color que presenta la cepa tipo).

Gram positiva, actinobacteria no acidorresistente que presenta un micelio de sustrato ampliamente ramificado y no fragmentado. Presenta esporas únicas, lisas e inmóviles, que son producidas en el extremo de las hifas. Aerobia estricta y quimioorganotrofa. Las colonias varían desde un color naranja claro a negro, son elevadas y plegadas en el medio ISP 2. Carece de micelio aéreo y produce pigmentos difundibles de color verde sobre el medio Avena. Crece en un rango de pH de 7 a 10. El rango de temperatura de crecimiento es entre 12 y 45°C, con un óptimo a 28°C. Crece por debajo del 3% de NaCl. Es oxidasa negativa y catalasa positiva. Degrada almidón, esculina, arbutina, caseína, gelatina, tirosina y Tween 20 pero no Tween 80, urea o xilano. Utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: L-alanina, L(+)-arabinosa, L- arginina, D(+)-celobiosa, D(-)-fructosa, D(+)-galactosa, gluconato, D(+)-glucosa, L-histidina, L-lisina, D(+)-maltosa, D(+)-manosa, D(+)-melecitosa, D(+)-melibiosa, L-prolina, D(+)-rafinosa, L(+)-ramnosa, sacarosa, D(-)-salicina, L-serina, D(+)-trehalosa y L-valina. No utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: D(+)-ácido galacturónico, ácido glutámico, ácido propiónico, D(-)-ácido quínico, almidón, meso-eritritol, sorbitol, L-sorbosa, tirosina, xilitol o D(+)-xilosa. Contiene *meso*-DAP en su pared celular. Los azúcares celulares mayoritarios que presenta son arabinosa, galactosa, glucosa, manosa, ramnosa, ribosa y xilosa. Los ácidos grasos mayoritarios que posee son *iso*-16:0, *9metil*-16:0, *iso*-16:1 y *anteiso*-17:0. Las menaquinonas principales son MK-10(H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>8</sub>) y MK-9(H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>8</sub>).

La cepa tipo SGA 5<sup>T</sup> fue aislada de nódulos radicales de *Pisum sativum*. Otra cepa que pertenece a esta especie es SR 6, aislada de rizosfera.

*Micromonospora castelloleonensis* sp. nov.

*Micromonospora castelloleonensis* (cas.te.llo.le.o.nen'sis. L. fem. adj. *castelloleonensis* perteneciente a Castilla-León comunidad donde fue aislada la cepa tipo).

Gram positiva, actinobacteria no acidorresistente que presenta un micelio de sustrato ampliamente ramificado y no fragmentado. Presenta esporas únicas, lisas e inmóviles, que son producidas en el extremo de las hifas. Aerobia estricta y quimioorganotrofa. Las colonias varían desde un color naranja a marrón, son elevadas y plegadas en el medio ISP 2. Carece de micelio aéreo y no produce pigmentos difundibles. Crece en un rango de pH de 6 a 10. El rango de temperatura de crecimiento es entre 12 y 45°C, con un óptimo a 28°C. Crece por debajo del 1% de NaCl. Es oxidasa negativa y catalasa positiva. Degrada almidón, esculina, arbutina, caseína, gelatina, tirosina y Tween 20



pero no Tween 80, urea o xilano. Utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: L-alanina, almidón, L(+)-arabinosa, L- arginina, D(+)-celobiosa, D(-)-fructosa, D(+)-glucosa, L-histidina, L-lisina, D(+)-maltosa, D(+)-manosa, D(+)-melecitosa, L-prolina, L(+)-ramnosa, sacarosa, D(-)-salicina, sorbitol, D(+)-trehalosa y L-valina. No utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: D(+)-ácido galacturónico, ácido glutámico, ácido propiónico, D(-)-ácido quínico, D(+)-galactosa, gluconato, D(+)-melibiosa, meso-eritritol, D(+)-rafinosa, L-serina, L-sorbosa, tirosina, xilitol o D(+)-xilosa. Contiene *meso*-DAP en su pared celular. Los azúcares celulares mayoritarios que presenta son glucosa, ribosa y xilosa. Los ácidos grasos mayoritarios que posee son *iso*-15:0, *iso*-17:0, *anteiso*-17:0 y *9metil*-16:0. Las menaquinonas principales son MK-10(H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>) y MK-9(H<sub>0</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>).

La cepa tipo SGA 21<sup>T</sup> fue aislada de nódulos radicales de *Pisum sativum*.

*Micromonospora luteovirens* sp. nov.

*Micromonospora luteovirens* (lu.te.o.vi'rens. L. fem. adj. *luteovirens* perteneciente a *luteus* amarillento y *viridêns* verdoso, en referencia al color de la cepa tipo).

Gram positiva, actinobacteria no acidorresistente que presenta un micelio de sustrato ampliamente ramificado y no fragmentado. Presenta esporas únicas, lisas e inmóviles, que son producidas en el extremo de las hifas. Aerobia estricta y quimioorganotrofa. Las colonias varían desde un color naranja claro a un marrón verdoso, son elevadas y plegadas en el medio ISP 2. Carece de micelio aéreo y produce pigmentos difundibles de color verde sobre el medio Avena. Crece en un rango de pH de 5,5 a 10. El rango de temperatura de crecimiento es entre 4 y 45°C, con un óptimo a 28°C. Crece por debajo del 3% de NaCl. Es oxidasa negativa y catalasa positiva. Degrada almidón, esculina, arbutina, caseína, gelatina, tirosina, Tween 20 y xilano pero no Tween 80 o urea. Utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: L- arginina, D(+)-galactosa, D(+)-glucosa, L-lisina, L-prolina, L(+)-ramnosa, sacarosa, D(-)-salicina, D(+)-trehalosa y L-valina. No utiliza los siguientes sustratos como fuentes de carbono: D(+)-ácido galacturónico, ácido glutámico, ácido propionico, D(-)-ácido quínico, L-alanina, almidón, L(+)-arabinosa, D(+)-celobiosa, D(-)-fructosa, gluconato, L-histidina, D(+)-maltosa, D(+)-manosa, D(+)-melecitosa, D(+)-melibiosa, meso-eritritol, D(+)-rafinosa, L-serina, sorbitol, L-sorbosa, tirosina, xilitol o D(+)-xilosa. Contiene *meso*-DAP en su pared celular. Los azúcares celulares mayoritarios que presenta son glucosa, ramnosa, ribosa y xilosa. Los ácidos grasos mayoritarios que posee son  $\omega$ 9c-*iso*-17:1, *iso*-16:0,

*iso*-15:0 y *anteiso*-17:0. Las menaquinonas principales son MK-10(H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>8</sub>) y MK-9(H<sub>2</sub>).

La cepa tipo SGB 14<sup>T</sup> fue aislada de nódulos radicales de *Pisum sativum*.

## *CONCLUSIONES*

## 7. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. Es la primera vez que se describe el aislamiento de cepas del género *Micromonospora* a partir de nódulos de plantas de guisante (*Pisum sativum*) y es posible que estos microorganismos ejerzan alguna influencia sobre la planta, ya que su aparición es sistemática.
2. La diversidad obtenida en los microorganismos aislados, tanto de nódulos como de rizosfera es muy alta, aunque se muestra superior en los nódulos.
3. Las cepas tipo con las que un mayor número de cepas estaban filogenéticamente relacionadas eran las procedentes de nódulos, destacando sobre todas la cepa *Micromonospora saelicesensis* DSM 44871<sup>T</sup>.
4. De todos los genes estudiados, el que muestra unas mejores relaciones filogenéticas es el gen que codifica para la subunidad B de la girasa (*gyrB*). El valor propuesto como punto de corte para que se pueda considerar que dos cepas pertenecen a especies diferentes es de 98,5%.
5. El análisis del gen *rpoB* es el que ofrece unos resultados más estables independientemente del modelo utilizado y al emplearlo de forma individual se obtendría un valor de corte del 99% para separar dos especies.
6. Los genes *recA* y *atpD* no son muy resolutivos a la hora de establecer las relaciones filogenéticas en cepas del género *Micromonospora*, sin embargo esta observación puede cambiar al obtener las secuencias completas de estos genes.
7. El análisis de secuencias concatenadas de los genes estudiados en este trabajo ofrece buenos resultados tanto en distancias evolutivas como en estabilidad, además de mostrar una relación lineal entre sus porcentajes de similitud y los porcentajes de hibridación

ADN-ADN, por lo que podría ser un sustituto de esta técnica para la diferenciación y descripción de nuevas especies del género *Micromonospora*.

## *BIBLIOGRAFÍA*

## 8. BIBLIOGRAFÍA

**Adékambi, T., Colson, P. & Drancourt, M.** (2003). *rpoB*-Based Identification of Nonpigmented and Late-Pigmenting Rapidly Growing *Mycobacteria*. *Journal of clinical microbiology*, **41**(12):5699-5708.

**Adékambi, T. & Drancourt, M.** (2004). Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA* and *rpoB* gene sequencing. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**:2095–2105.

**Adékambi, T., Stein, A., Carvajal, J., Raoult, D. & Drancourt, M.** (2006). Description of *Mycobacterium conceptionense* sp. nov., a *Mycobacterium fortuitum* Group Organism Isolated from a Posttraumatic Osteitis Inflammation. *Journal of clinical microbiology*, **44**(4):1268–1273.

**Alvarez, V. M., Cunha dos Santos, S. C., da Costa Casella, R., Leite Vital, R., Vazquez Sebastin, G. & Seldin, L.** (2009). Bioremediation Potential of a Tropical Soil Contaminated with a Mixture of Crude Oil and Production Water. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **18**(12):1966–1974.

**Alvarez, V. M., Santos, S. C., Casella, Rda. C., Vital, R. L., Sebastin, G. V. & Seldin, L.** (2008). Bioremediation potential of a tropical soil contaminated with a mixture of crude oil and production water. *J Microbiol Biotechnol*, **12**:1966-74.

**Andrighetto, C., Psomas, E., Tzanetakis, N., Suzzi, G. & Lombardi, A.** (2000). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Letters in Applied Microbiology*, **30**:5–9.

**Antal, N., Fiedler, H. P., Stackebrandt, E., Beil, W., Ströch, K. & Zeeck, A.** (2005). Retymicin, galtamycin B, saquayamycin Z and ribofuranosyllumichrome, novel secondary metabolites from *Micromonospora* sp. Tü 6368. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)*, **58**(2):95-102.

**Ara, I. & Kudo, T.** (2007). Two new species of the genus *Micromonospora*: *Micromonospora chokoriensis* sp. nov. and *Micromonospora coxensis* sp. nov., isolated from sandy soil. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **53**:29–37.

**Asano, K., Masunaga, I., Kawamoto, I.** (1989). *Catellatospora matsumotoense* sp. nov. and *C. tsunoense* sp. nov., *Actinomycetes* found in woodland soils. *Int. J. Syst. Bacteriol*, **39**:309-313.

**Azevedo, K. L., Maccheroni, J. R. & Pereira, J. O.** (2000). Endophytic microorganisms, a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic. J. Biotech*, **3**:41-67.

**Baik, K. S., Park, S. C., Kim, E. M., Bae, K. S., Ann, J. H., Ka, J.O., Chun, J. & Seong, C. N.** (2008). Diversity of bacterial community in freshwater of Woopo wetland. *J Microbiol*. **46**(6):647-55.

- Berdoulay, M. & Salvado, J. C.** (2009). Genetic characterization of microbial communities living at the surface of building stones. *Lett Appl Microbiol*, **49**(3):311-316.
- Berry, A. M.** (1994). Recent developments in the actinorhizal symbioses. *Plant. Soil*, **161**:135-145.
- Bishop, C. J., Aanensen, D. M., Jordan, G. E., Kilian, M., Hanage1 W. P. & Spratt B. G.** (2009). Assigning strains to bacterial species via the internet. *BMC Biology*, **7**:3.
- Blackwood, K. S., He, C., Gunton, J., Turenne, C. Y., Wolfe, J. & Kabani1, A. M.** (2000). Evaluation of *recA* Sequences for Identification of *Mycobacterium* Species. *Journal Of Clinical Microbiology*, **38**(8):2846–2852.
- Bray, R. H. & Kurtz, I. T.** (1945). Determination of total organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci*, **59**:39-45.
- Bremner, J. M. & Malvaney, C. S.** (1982). Nitrogen total. Methods of soil analysis Part 2, chemical and microbiological properties. Second edition. American Society of Agronomy, Wisconsin. A.L. Page, R.H. Miller (editors). 621-622.
- Brenner, S. E.** (1995). BLAST, Blitz, BLOCKS and BEAUTY : sequence comparison on the net. *Trends. Genet*, **11**(8): 330-331.
- Bruijn F. J., Rademaker, J., Schenider, M., Rossbach, U. and Louws, F. J.** (1996). Rep-PCR Genomic Fingerprinting of Plant-Associated Bacteria and Computer-Assisted Phylogenetic Analyses. Biology of Plant-Microbe Interaction. *APS Press*, 497-502.
- Buyer, J. S.** (2002). Rapid sample processing and fast gas chromatography for identification on bacteria by fatty acid analysis. *J. Microbiol. Methods*, **51**:209-215.
- Buyer, J. S.** (2003) Improved fast chromatography for FAME analysis of bacteria. *J. Microbiol. Methods*, **54**:117-120.
- Caetano-Anolles, G., Bassam, B. J. y Gresshoff, P. P.** (1991). DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology*. **9**:553-6.
- Carro, L., Martínez-Molina, E., Trujillo, M. E.** (2009). *Micromonospora pisi* sp. nov., isolated from root nodules of *Pisum sativum*. *Int J Syst Evol Microbiol*. In press.
- Cashion, P., Hodler-Franklin, M. A., McCully, J. & Franklin, M.** (1977). A rapid method for base ratio determination of bacterial DNA. *Anal Biochem*, **81**:461-466.
- Castroviejo, S.** Coord.(1999) Flora Ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol VII. Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid. Pag. 482-486.



- Cerda, M. E.** (2008). Aislamiento de *Micromonospora* de nódulos de leguminosas tropicales y análisis de su interés como promotor del crecimiento vegetal. Universidad de Salamanca. Trabajo de Tesis Doctoral.
- Chun, J., Lee, J. H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K., & Lim, Y. W.** (2007). EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**:2259-2261.
- Collins, M. D. & Jones, D.** (1981). Distribution of isoprenoid quinon structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microbiolo. Review*, **45**:316-354.
- Colonna, P. & Mercier C.** (1979). *Lebensm-Wiss. u. Technol.*, **12**, 1-12.
- Conn, V. M. and Franco, C. M.** (2004). Analysis of the Endophytic Actinobacterial Population in the Roots of Wheat (*Triticum aestivum* L.) by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism and Sequencing of 16S rRNA Clones. *Applied and environmental microbiology*, **70**:1787–1794.
- Conn, V. M., Walker, A. R. & Franco, C. M.** (2008). Endophytic actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact*, **21**(2):208-18.
- Coombs, J. & Franco, C.** (2003a). Visualization of an Endophytic Streptomyces Species in Wheat Seed. *Appl. Environ. Microbiol*, **69**(7):4260–4262.
- Coombs, J. & Franco, C.** (2003b). Isolation and Identification of actinobacteria from surface sterilized wheat roots. *Appl. Environ. Microbiol*, **69**:5603-5608.
- Corich, V., Giacomini, A., Carlot, M., Simon, R., Tichy, H. V., Squartini, A. & Nuti, M. P.** (2001). Comparative strain typing of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* natural populations. *Can J Microbiol*, **47**:580-584.
- Cummins, C. S. & Harris, H.** (1956). The chemical composition of the cell wall in some gram-positive bacteria and its possible value as a taxonomic character. *J. Gen. Microbiol*, **14**:583-600.
- Darwin, C.** (1859). *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. London.
- Davies, D. R.** (1976). Peas. En: *Evolution of Crop Plants*. N.W. Simmonds. Ed. Longman. London. 172-174.
- De Ley, J., Cattoir, H. & Reynaerts, A.** (1970). The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur J Biochem*, **12**:133-142.
- Destailats, F. & Cruz-Hernandez, C.** (2007) Fast analysis by gas-liquid chromatography. Perspective on the resolution of complex fatty acid compositions. *J. Chromatogr. A.*, **1169**(1-2):175-178.
- Dherbécourt, J., Thierry, A., Madec, M. N. & Lortal, S.** (2007) Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, peptidoglycan hydrolase and biochemical

profiles for rapid dairy propionibacteria species identification. *Res Microbiol.* **157**(10):905-913.

**Doetsch, R. N.** (1981). Determinative methods of light microscopy. In *Manual of Methods for General Bacteriology*, pp. 21-33. Edited by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg & G. B. Phillips. Washington, DC: American Society for Microbiology.

**El-Tarabily, K.** (1997). The potential for the biological control of cavity-spot disease of carrots, caused by *Pythium coloratum*, by streptomycete and non-streptomycete actinomycetes. *New Phytol.* **137**:495-507.

**Encinar del Dedo, J.** (2004). Diversidad microbiana en el reactor biológico secuencial de una E.D.A.R. Salamanca. Tesina.

**Fani, R., Damiani, G., Di Serio, C., Gallori, E., Grifoni, A. & Bazzicalupo, M.** (1993). Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for generating specific DNA probes for microorganisms. *Mol Ecol.* **2**(4):243-50.

**Fernandez-Linares, L. C.** (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Publicado por Instituto Nacional de Ecología. Editorial del Deporte Mexicano. México.

**Fernández-Molinero, C. R.** (2005). Análisis de la diversidad de Actinomicetos asociados a raíces de *Lupinus angustifolius*. Salamanca. Tesina.

**Fiedler, H. P., Bruntner, C., Bull, A. T., Ward, A. C., Goodfellow, M., Potterat, O., Puder, C. & Mihm, G.** (2005). Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie van Leeuwenhoek*, **87**:37-42.

**Foulerton, A. G. R.** (1905). New species of *Streptothrix* isolated from the air. *Lancet* **1**:1199-1200.

**Fox, G. E., Wisotzkey, J. S. & Jurkshuk, P.** (1992). How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **42**:166-170.

**Franco, F. & Ramos, A.**, Coord. (1996). El Cultivo de las Leguminosas de Grano de Castilla y León. Junta de Castilla y León. Ed. Consejería de Agricultura y Ganadería. Valladolid.

**García-Fraile, P.** (2008). Identificación y caracterización de bacterias que nodulan *Phaseolus* en diferentes regiones de España. Universidad de Salamanca. Trabajo de Tesis Doctoral.

**Gaunt, M. W., Turner, S. L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S. A. y Young, J. P. W.** (2001). Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int J Syst Evol Microbiol*, **51**, 2037-2048.

- Goodfellow, M. & Minnikin, D. E.** (1985). Chemical Methods in Bacterial Systematics. Introduction to chemosystematics. Academic Press. Londres.
- Goodfellow, W.** (1989). Suprageneric classification of actinomycetes. En "Bergey's manual of systematic bacteriology". Editado por S. T. Williams, M. E. Sharpe y J. G. Holt. Williams & Wilkins, Baltimore. 2333-2339.
- Gomila, M., Ramirez, A. & Lalucat, J.** (2007). Diversity of environmental *Mycobacterium* isolates from hemodialysis water as shown by a multigene sequencing approach. *Appl Environ Microbiol*, **73**(12):3787-97.
- Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P. & Tiedje, J. M.** (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence. *Int J Syst Evol Microbiol*, **57**:81-91.
- Gu, Q., Liu, N., Qiu, D. H., Liu, Z. H. & Huang, Y.** (2006). Isolation, classification and antimicrobial activity of endophytic actinomycetes from plant leaves. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, **46**(5):778-82.
- Guo, Y., Zheng, W., Rong, X. & Huang, Y.** (2008). A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. *Int J Syst Evol Microbiol*, **58**:149-159.¶
- Gräfe, U.** (1988). Autoregulatory secondary metabolism in actinomycetes. En "Regulation of secondary metabolism in actinomycetes" pp. 75-126. Ed. S. Saphiro. CRC Press, Inc. (Florida).
- Hatano, K., Nishii, T. & Kasai, H.** (2003). Taxonomic re-evaluation of whorl forming *Streptomyces* (formerly *Streptoverticillium*) species by using phenotypes, DNA-DNA hybridization and sequences of *gyrB*, and proposal of *Streptomyces luteireticuli* (ex Kato and Arai 1957) corrig., sp. Nov., nom. Rev. *Int J Syst Evol Microbiol*, **53**:1519-1529.¶
- Hedrick, U. P., Hall, F. H., Hawthorn, L. R. & Berger, A.** (1928). "Vegetables of New York. Vol I; Peas of New York". Report of the New York State Agricultural Experiment Station.
- Hiltner, L. y Störmer, K.** (1903). Neue Untersuchungen über die Wurzelknöllchen der Leguminosen und deren Erreger. Arbeiten aus der Biologischen Abteilung für Land- und Forstwirtschaft, Kaiserlichen Gesundheitsamte, Berlin **3**:151-307.
- Hirsch, A. M.** (1992). Development biology of legume nodulation. *New Phytol.*, **122**:211-237.
- Hirsch, P., Mevs, U., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P. & Stackebrandt, E.** (2004). Cryptoendolithic Actinomycetes from Antarctic Sandstone Rock Samples: *Micromonospora endolithica* sp. nov. and two Isolates Related to *Micromonospora coerulea* Jensen 1932. *Systematic and Applied Microbiology*, **27**:166-174.

**Hong, K., Gao, A., Xie, Q., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H., Yu, H., Li, J., Yao, X., Goodfellow, M. & Ruan, J.** (2009). Actinomycetes for Marine Drug Discovery Isolated from Mangrove Soils and Plants in China. *Mar. Drugs*, **7**:24-44.

**Horan, A. C. & Brodsky, B. C.** (1986). *Micromonospora Rosaria* sp. nov. nom. rev., the rosaramicin producer. *Int J Syst Bacteriol*, **36**:478-80.

**Huang, H., Lv, J., Hu, Y., Fang, Z., Zhang, K. & Bao, S.** (2008). *Micromonospora rifamycinica* sp. nov., a novel actinomycete from mangrove sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **58**:17–20.

**Huey, B. & Hall, J.** (1989). Hypervariable DNA Fingerprinting in *Escherichia coli*: Minisatellite Probe from Bacteriophage M13. *Journal Of Bacteriology*, **171**(5): 2528.

**Hungate, R. E.** (1946). Studies on cellulose fermentation. II. An anaerobic cellulose decomposing actinomycete, *Micromonospora propionici* n. sp. *J. Bacteriol*, **51**:51-56.

**Huss, V. A. R., Festl, H. & Schleifer, K. H.** (1983). Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Syst Appl Microbiol*, **4**:184-192.

**Huss-Danell, K.** (1997). Actinorhizal symbioses and their N<sub>2</sub> Fixation. Tansley Review No. 93. *New Phytologist*, **136**:375-405.

**Igarashi, Y., Trujillo, M.E., Martínez-Molina, E., Yanase, S., Miyanaga, S., Obata, T., Sakurai, H., Saiki, I., Fujita, T. & Furumai, T.** (2007). Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov. *Bioorg Med Chem Lett.*, **17**(13):3702-3705.

**Iglesias, O., Rivas, R., García-Fraile, P., Abril, A., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. & Velázquez, E.** (2007). Genetic characterization of fast-growing rhizobia able to nodulate *Prosopis alba* in North Spain. *FEMS Microbiol Lett*, **277**:210-216.

**Igual, J. M., Valverde, A., Rivas, R., Mateos, P. F., Rodríguez-Barrueco, C., Martínez-Molina, E., Cervantes, E. & Velázquez, E.** (2003). Genomic fingerprinting of *Frankia* strains by PCR-based techniques. Assessment of a primer base on the sequence of 16S rRNA gene of *Escherichia coli*. *Plant Soil*, **254**:115-123.

**Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D.G. & Gibson, T. J.** (1998). Multiple sequence alignment with ClustalX. *Trends. Biochem. Sci.*, **23**(10):403-405.

**Jensen, H. L.** (1932). Contributions to our knowledge of the actinomycetes. III. Further observations on the genus *Micromonospora*. *Proc. Linnean Soc. N.S.W.*, **57**:173-180.

**Johnson, J. L.** (1994). Similarity análisis of DNAs. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*, pp. 655-682. Edited by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington, DC: American Society for Microbiology.

**Jones, K. L.** (1949). Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. *J of Bacteriolog*, **57**: 141–145.

- Jongrungruangchok, S., Tanasupawat, S. & Kudo, T.** (2008a) *Micromonospora chaiyaphumensis* sp. nov., isolated from Thai soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **58**:924–928.
- Jongrungruangchok, S., Tanasupawat, S. & Kudo, T.** (2008b) *Micromonospora krabiensis* sp. nov., isolated from marine soils in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**:127–133.
- Kalpole, J. S., Templeton, K. E., Horrevorts, A. M., Endtz, H. P., Kuijper, E. J., Bernards, A. T. & Klaassen, C. H. W.** (2007). Molecular Typing of a Suspected Cluster of *Nocardia farcinica* Infections by Use of Randomly Amplified Polymorphic DNA, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Amplified Fragment Length Polymorphism Analyses. *Journal Of Clinical Microbiology*, **45**(12):4048–4050.
- Kasai, H., Tamura, T. & Harayama, S.** (2000). Intrageneric relationships among *Micromonospora* species deduced from *gyrB*-based phylogeny and DNA relatedness. *Int J Syst Evol Microbiol*, **50**:127-34.
- Kawamoto, I., Okachi, R., Kato, H., Yamamoto, S., Takahashi, I., Takasawa, S. & Nara, T.** (1974). The antibiotic XK-41 complex. I. Production, isolation and characterization. *Journal J. Antibiot.* (Tokyo), **27**:493-501.
- Kawamoto, I., Oka, T., & Nara, T.** (1982). Spore resistance of *Micromonospora olivasterospora*, *Micromonospora sagamiensis*, and related organisms. *Agric. Biol. Chem.*, **46**:221-231.
- Kawamoto, I. Yamamoto, M. & Nara, T.** (1983). *Micromonospora olivasterospora* sp. Nov. *Int J Syst Bacteriol*, **33**:107-112.
- Kawamoto, I.** (1989). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 4. Section 28: actinoplanetes. Genus *Micromonospora*, 2442-2450.
- Kawano, M., Yaguchi, K. & Osawa, R.** (2006). Genotypic analyses of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis and apparently healthy chickens in Japan. *Microbiol. Immunol.*, **50**(12):961-966.
- Kim, B. J., Lee, S. H., Lyu, M. A., Kim, S. J., Bai, G. H., Kim, S. J., Chae, G. T., Kim, E. C., Cha, C. Y. & Kook, Y. H.** (1999). Identification of Mycobacterial Species by Comparative Sequence Analysis of the RNA Polymerase Gene (*rpoB*). *Journal Of Clinical Microbiology*, **37**(6):1714–1720.
- Kim, B. J., Kim, C. J. & Chun, J.** (2004). Phylogenetic analysis of the genera *Streptomyces* and *Kitasatospora* based on partial RNA polymerase b-subunit gene (*rpoB*) sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**: 593–598.
- Kirby, B. M. & Meyers, P. R.** (2009) *Micromonospora tulbaghiaie* sp. nov., isolated from the leaves of wild garlic, *Tulbaghia violacea*. *Int J Syst Evol Microbiol* (In press).

- Koch, C., Kroppenstedt, R. M. & Stackebrandt, E.** (1996). Intrageneric Relationships of the Actinomycete Genus *Micromonospora*. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, **46**(2):383-387.
- Komagata, K. & Suzuki, K.** (1987). Lipid and Cell-Wall Analysis in Bacterial Systematics. Methods in Microbiology. Volume 19. Current methods for Classification and Identification of Microorganisms. Edited by R.R. Colwell and R. Grigorova. Academic Press Limited. London.
- Kovacs, N.** (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, **178**(4535):703.
- Kroppenstedt, R. M. & Kutzner, H.J.** (1976). Biochemical markers in the taxonomy of the Actinomycetales. *Experientia*, **32**(3):318-9.
- Kroppenstedt, R. M.** (1982). Chemotaxonomy of bacteria. Classification and identification methods for bacteria. Braunschweig, 9-22.
- Kroppenstedt, R. M., Mayilraj, S., Wink, J. M., Kallow, W., Schumann, P., Secondini, C. & Stackebrandt, E.** (2005). Eight new species of the genus *Micromonospora*, *Micromonospora citrea* sp. nov., *Micromonospora echinaurantiaca* sp. nov., *Micromonospora echinofusca* sp. nov., *Micromonospora fulviviridis* sp. nov., sp. nov., *Micromonospora peucetia* sp. nov., *Micromonospora sagamiensis* sp. nov., and *Micromonospora viridifaciens* sp. nov. *Syst Appl Microbiol*, **28**: 328-39.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B. & Nei, M.** (2001). MEGA 2, moléculas evolutionary genetics análisis software. *Bioinformatics*, **17**:1244-1245.
- Kurtböke, D. I. & French, J. R.** (2007) Use of phage battery to investigate the actinofloral layers of termite gut microflora. *J Appl Microbiol.*, **103**(3):722-34.
- Küster, E.** (1959). Outline of a comparative study of criteria used in the characterisation of the actinomycetes. *International Bulletin of Bacteriology Nomenclature and Taxonomy*, **9**: 94-104.
- Lanoot, B., Vancanneyt, M., Dawyndt, P., Cnockaert, M., Zhang, J., Huang, Y., Liu, Z. & Jean S.** (2004). BOX-PCR fingerprinting as a powerful tool to reveal synonymous names in the genus *Streptomyces*. Emended descriptions are proposed for the species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. phaeopurpureus*. *Systematic and Applied Microbiology*, **27**:84-92.
- Lanoot, B., Vancanneyt, M., Hostea, B., Vandemeulebroecke, K., Cnockaert, M. C., Dawyndt, P., Liu, Z., Huang, Y. & Swings, J.** (2005). Grouping of streptomycetes using 16S-ITS RFLP fingerprinting. *Research in Microbiology*, **156**:755–762.
- Larsen, N., Olsen, G. J., Maidak, M. J., Mc Caughey, M. J., Overbeek, R., et al.** (1993). The database project. *Nucleic Acids Research.*, **21**:3021-3023.

- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G. & Marinelli, F.** (2000) Rare genera of Actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*, **78**:399-405.
- Lechevalier, H. A.** (1964). Principles and application in aquatic microbiology. In Heukelekan and Dondero (Editors). *The Actinomycetes*, John Wiley & Sons, New York, 230-250.
- Lechevalier, H. A. and Lechevalier, M. P.** (1970a). A critical evaluation of the genera of aerobic actinomycetes. In Prauser (Editor), *Tje Actinomycetales*, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 393-405.
- Lechevalier, M. P. and Lechevalier, H. A.** (1970b). Chemical composition as a criterion in the clasification of aerobic actinomycetes. In Prauser (Editor), *The Actinomycetales*, VeB Gustav Fischer Verlag, Jena, 311-316.
- Lechevalier, H. A.** (1989). A practical guide to generic identification of actinomycetes. En "Bergey's manual of systematic bacteriology" pp.2344-2347. Editado por S.T. Williams, M.E. Sharpe y J.G. Holt. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Lechevalier, M. P., De Bievre, C. & Lechevalier, H. A.** (1977). Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochemical Systematics and Ecology*, **5**:249-260.
- Lee, M. D., Dunne, T.S., Siegel, M. M., Chang, C. C., Morton, G. O. & Borders, D. B.** (1987). Calichemicins, a novel family of antitumor antibiotics. 1. Chermistry and partial structure of calichemicin (gamma II). *J Am Chem Soc*, **109**:3464-3466.
- Lee, S. D., Goodfellow, M. & Hah, Y. C.** (1999). A phylogenetic analysis of the genus *Catellatospora* based on 16S ribosomal DNA sequences, including transfer of *Catellatospora matsumotoense* to the genus *Micromonospora* as *Micromonospora matsumotoense* comb. Nov. *FEMS Microbiol Lett.*, **178**:349-354.
- Lee, S. D. & Hah, Y. C.** (2002). Proposal to transfer *Catellatospora feruginea* and "Catellatospora ishikariense" to *Asanoa* gen. nov. as *Asanoa ferruginea* comb. nov and *Asanoa ishikariensis* sp. nov., with emended description of the genus *Catellatospora*. *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**:967-972.
- Lee, B. H., Kim, H., Kim, H. J., Lim, Y. K., Byun, K. H., Hutchinson, B., Kim, C. J., Ko, Y. H., Lee, K. H., Cha, C. Y., Kook, Y. H., Kim, B. J.** (2005). Molecular taxonomy of a soil actinomycete isolate, KCCM10454 showing neuroprotective activity by 16S rRNA and *rpoB* gene analysis. *J Microbiol*, **43**(2):213-218.
- Leiva, S., Yañez, M. & Zaror, L.** (2004). Actividad antimicrobiana de actinomycetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Rev Med Chile*, **132**:151-159.
- Libkind, D., Brizzio, S., Ruffini, A., Gadanho, M., Van Broock, M. & Sampaio, J. P.** (2003). Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek*, **84**:313-322.

- Lloret, L. y Martínez-Romero, E.** (2005). Evolución y filogenia de *Rhizobium*. Review. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, **47**(1-2):43-60.
- Ludwig, W. & Schleifer, K. H.** (1994). Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Rev*, **15**: 155-173.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lüßmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A. & Schleifer, K. H.** (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research*, **32**(4):1363-1371.
- Luedemann, G. M., Brodsky, B. C.** (1964a). Taxonomy of gentamycin-producing *Micromonospora*. *Journal Antimicrob. Agents Chemother.*, **1963**:116-124.
- Luedemann, G. M., Brodsky, B. C.** (1964b). *Micromonospora carbonacea* sp. nov., an everninomicin-producing organism. *Journal Antimicrob. Agents Chemother.*, **1964**:47-52.
- Luedemann, G. M.** (1971). *Micromonospora purpureochromogenes* (Waksman and Curtis, 1916) comb. nov. (subjective synonym: *Micromonospora fusca* Jensen, 1932). *Journal Int. J. Syst. Bacteriol.*, **21**:240-247.
- Luedemann, G. M. & Casmer, C. J.** (1973). Electron microscope study of whole mounts and thin section of *Micromonospora chalcea* ATCC 12452. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **23**:243-255.
- Luo, H. L., Huang, Y., Wang, L. M., Liu, Z. H., Xie, J. P. & Hu, C. H.** (2005). Study on population diversity and antimicrobial activity of actinomycete from acidic soil in Xizang area. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, **45**(5):724-727.
- Maiese, W., Lechevalier, M. P., Lechevalier, H. A., Korshalla, J., Kuck, N., Fantini, A., Wildey, M.J., Thomas, J. & Greenstei, M.** (1989). Calicheamicins, a novel family of antitumor antibiotics, taxonomy, fermentation and biological properties. *J Antibiot* (Tokyo), **42**:558-563.
- Maldonado, L. A., Stach, J. E., Ward, A.C., Bull, A. T. & Goodfellow, M.** (2008). Characterisation of micromonosporae from aquatic environments using molecular taxonomic methods. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **94**(2):289-98.
- Malkawi, H. I., Saadoun, I., Moumani, F. A. & Meqdam, M. M.** (1999). Use of RAPD-PCR fingerprinting to detect genetic diversity of soil *Streptomyces* isolates. *New Microbiol.*, **22**(1):53-8.
- Maluszynska, G.M. & Janota-Bassalik, L.** (1974). A cellulolytic rumen bacterium, *Micromonospora ruminantium* sp. Nov. *J. Gen. Microbiol.* **82**:57-65.



- Marchand, S., Heylen, K., Messens, W., Coudijzer, K., De Vos, P., Dewettinck, K., Herman, L., De Block, J. & Heyndrickx, M.** (2009). Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples. *Environ Microbiol*, **11**(2):467-82.
- Marechal, J., Clement, B., Nalin, R., Gandon, C., Orso, S., Cvejic, J. H., Bruneteau, M., Berry, A. & Normand, P.** (2000). A *recA* gene phylogenetic analysis confirms the close proximity of *Frankia* to *Acidothermus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**:781–785
- Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Grenzi, E., Walker, J., Mtichell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, H., Hakenbeck, R., Morrison, D.A., Boulnois, G. J. & Claverys, J. P.** (1992). A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic acids research*, **20**:3479-3483.
- Mattarelli, P., Bonaparte, C., Pot, B. & Biavati, B.** (2008). Proposal to reclassify the three biotypes of *Bifidobacterium longum* as three subspecies: *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* subsp. nov., *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* comb. nov. and *Bifidobacterium longum* subsp. *suis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*, **58** (4):767-772.
- Mehling, A., Wehmeier, U. F. & Piepersberg, W.** (1995). Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays in identifying conserved regions of actinomycete genomes. *FEMS Microbiol Lett.*, **128**(2):119-25.
- Menezes, A. B., Lockhart, R. J., Cox, M. J., Allison, H.E. & McCarthy, A.J.** (2008). Cellulose degradation by Micromonosporas recovered from freshwater lakes and classification of these actinomycetes by DNA gyrase B gene sequencing. *Appl Environ Microbiol*, **74**(22):7080-4.
- Miyoshi-Saitoh, M., Morisaki, N., Tokiwa, Y., Iwasaki, S., Koishi, M., Sayito, K. & Oki T.** (1991). Dynemicins O, P and Q, novel antibiotics related to dynemicin A, isolation, characterization and biological activity. *JAntibiot* (Tokyo), **44**: 1037-4.
- Mollet, C., Drancourt, M. & Raoult, D.** (1998). Determination of *Coxiella burnetii* *rpoB* sequence and its use for phylogenetic analysis. *Gene*, **207**:97–103.
- Mora, R.** (1998). Estudios de la diversidad de las poblaciones de géneros minoritarios de actinomycetes. Desarrollo de técnicas moleculares para su detección, aislamiento e identificación. Universidad de Salamanca. Trabajo de Tesis Doctoral.
- Moreno, D. R.** (1978). Clasificación de pH del suelo, contenido de sales y nutrientes asimilables. *INIA-SARH*. México D.F.
- Moreno, M. T.**, (1983). Las leguminosas de grano: una visión de conjunto. En: leguminosas de grano. J.I. Cubero; M.T. Moreno. Ed. Mundi-Prensa.

- Ninawe, S., Lal, R. & Kuhad, R.C.** (2006). Isolation of three xylanase-producing strains of actinomycetes and their identification using molecular methods. *Curr Microbiology*, **53**:178-82.
- Niner, M., Brandt, J.P., Villegas, M., Marshall, C.R., Hirsch, A.M. & Valdés, M.** (1996). Analysis of Partial Sequences of Genes Coding for 16S rRNA of Actinomycetes Isolated from *Casuarina equisetifolia* Nodules in Mexico. *Applied and environmental microbiology*, **62**:3034-3036.
- Normand P., Simonet P., & Bardin R.** (1988). Conservation of *nif* sequences in *Frankia*. *Mol. Gen. Genet*, **213**:238-246.
- Ohta, K., Yamane, T., Hino, M., Koch, K. R., Nakao, T., Akahori, M., Kanashima, H. Sakamoto, E., Hagihara. K., Takubo, T. & Tatsumi, N.** (2001). Evaluation of polymerase chain reaction method for monitorin of fungal infection in compromised hosts. *Jpn J Antiot.*, **54**:103-111.
- Ørskov, J.** (1923). Investigations into the Morfology of the Ray Fungi. Copenhagen: Levin & Munksgaard.
- Parkinson, N., Cowie, C., Heeney, J. & Stead, D.** (2009). Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*, **59**:264-74.
- Pascual, J., Macián, M. C., Arahal, D. R., Garay. E. & Pujalte, J.** (2009). Multilocus sequence análisis of the cetral clade of the genus *Vibrio* by using 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes. *Int J Syst Evol Microbiol* (In press).
- Pate, J. S.** (1975). Pea. En: Crop Physiology. L.T. Evans (ed). University Press, Cambridge, 374 pp.
- Paulowsky, K. & Bisseling T.** (1996). Rhizobial and actinorhizal symbioses: what are the shared features?. *Plant Cell*, **8**:1899-1913.
- Piret, J. M. & Demain, A. L.** (1988). Actinomycetes in Biotechnology: an overview. En: "Actinomycetes in Biotechnology". Editado por M. Goodfellow, M. Mordarski y S.T. Williams. Academic Press Inc., San Diego. 461-482.
- Polhill, R. M. & P. H. Raven** (eds.). (1981). Advances in legume systematics. Kew.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. & Kleins, D. A.** (2004). Microbiologia. McGraw-Hill Interamericana. Madrid.
- Qiu, G. Z., Wan, M. X., Qian, L., Huang, Z. Y., Liu, K., Liu, X. D., Shi, W. Y. & Yang, Y.** (2008). Archaeal diversity in acid mine drainage from Dabaoshan Mine, China. *J Basic Microbiol.*, **48**(5):401-409.
- Ramírez-Bahena, M. H., García-Fraile, P., Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J. M., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. & Velázquez, E.** (2008). Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL,

*Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* **58**: 2484-90.

**Ribeiro, A., Bochenek B. & Hirsch A.M.** (1995). A nodule-specific gene encoding a subtilisine-like protease is expressed in early stages of actinorhizal nodule development. *Plant Cell*, **7**:785-794.

**Richert, K., Brambilla, E. & Stackebrandt, E.** (2005). Development of PCR primers specific for the amplification and direct sequencing of *gyrB* genes from *Microbacteria*, order Actinomycetales. *Journal of Microbiological methods*, **60**:115-123.

**Richert, K., Brambilla, E. & Stackebrandt, E.** (2007). The phylogenetic significance of peptidoglycan types: Molecular analysis of the genera *Microbacterium* and *Aureobacterium* based upon sequence comparison of *gyrB*, *rpoB*, *recA* and *ppk* and 16SrRNA genes. *Syst Appl Microbiol.*, **30**(2):102-108.

**Rincón, J. J., Gallardo, Y., Leal, M. & Rojas, Y.** (2004). Efectos de diferentes relaciones de calcio y fósforo en el suelo sobre la nodulación de *Acacia mangium* (Willd) y *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit., en condiciones de vivero. *Zootecnia Tropical*, **22**(2):167-173.

**Rivas, R., Velázquez, E., Valverde, A., Mateos, P. F. y Martínez-Molina, E.** (2001). A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis*, **22**:1086-1089.

**Rivas, R., Velázquez, E., Palomo, J. L., Mateos, P. F., García-Benavides, P. y Martínez-Molina, E.** (2002). Rapid identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* using two primers random amplified polymorphic DNA (TP-RAPD) fingerprints. *Europ J Plant Patol*, **108**:179-184.

**Rivas, R., Martens, M., de Lajudie, P. & Willems, A.** (2009). Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Syst Appl Microbiol*, **32**(2):101-10.

**Rodríguez, R.** (2008). Análisis de la población bacteriana endofita presente en nódulos de lupinus: interacción y localización in situ. Universidad de Salamanca. Trabajo de Tesis Doctoral.

**Rosello-Mora, R. & Amann, R.** (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, **25**:39-67.

**Rossi, F., Dellaglio, F. & Torriani, S.** (2006). Evaluation of *recA* gene as a phylogenetic marker in the classification of dairy propionibacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, **29**:463-469

**Ruiz-Díez, B., Fajardo, S., Puertas-Mejía, M. A., de Felipe, M. del R., Fernández-Pascual, M.** (2009). Stress tolerance, genetic analysis and symbiotic properties of root-nodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central Spain. *Arch Microbiol.*, **191**(1):35-46.

- Saitou, N. & Nei, M.** (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4**:406-425.
- Sallam A, & Steinbüchel A.** (2009). Cyanophycin-degrading bacteria in digestive tracts of mammals, birds and fish and consequences for possible applications of cyanophycin and its dipeptides in nutrition and therapy. *J Appl Microbiol.*, **107**(2):474-484.
- Salter, P.J. & Drew, D.H.** (1965). Root growth as a factor in the response of *Pisum sativum* L. to irrigation. *Nature*, **206**:1063-1064.
- Santillana, N., Ramírez-Bahena, M. H., García-Fraile, P., Velázquez, E. & Zúñiga, D.** (2008). Phylogenetic diversity based on *rrs*, *atpD*, *recA* genes and 16S-23S intergenic sequence analyses of rhizobial strains isolated from *Vicia faba* and *Pisum sativum* in Peru. *Arch Microbiol*, **189**:239-247.
- Sardi, P., Saracchi, M., Quaroni, Q., Petrolini, B. Borgonovi, G. E., & Merli, S.** (1992). Isolation of Endophytic *Streptomyces* Strains from Surface-Sterilized Roots. *Applied Environmental Microbiology*, **58**(8):2691-2693.
- Sebald, M. & Prevot, A.R.** (1962). Étude d'une nouvelle espèce anaérobie stricte *Micromonospora acetofornici* n. sp. isolée de l'intestin postérieur de *Reticulitermes lucifugus* var. *saintonnensis*. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, **102**:199-214.
- Scheuerbrandt, G. & Bloch, K.** (1961). Unsaturated fatty acids in microorganisms. *Journal of Biological Chemistry*, **237**:2064-2068.
- Schleifer, K. H. & Kandler, O.** (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implication. *Bact. Rev.*, **36**:407-477.
- Selvin, J., Shanmugha, P. S., Seghal, K. G., Thangavelu, T. & Sapna, B. N.** (2009). Sponge-associated marine bacteria as indicators of heavy metal pollution. *Microbiol Res.*, **164**(3):352-63.
- Sierra, G.** (1975). A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of contact between Cells and Fatty acid substrates. *Ant van Leeuwenhoek J of Microbiol.*, **23**:15-22.
- Shen, F. T., Lu, H. L., Lin, J. L., Huang, W. S., Arun, A. B. & Young, C. C.** (2006). Phylogenetic analysis of members of the metabolically diverse genus *Gordonia* based on proteins encoding the *gyrB* gene. *Research in Microbiology*, **157**:367-375.
- Skerman, V. B. D., Mc Gowan, V. & Sneath, P. H. A.** (1980). Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol*, **30**: 225-340.
- Sklarz, M. Y., Angel, R., Gillor, O. & Soares, M. I.** (2009). Evaluating amplified rDNA restriction analysis assay for identification of bacterial communities. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **96**(4):659-664.

- Sneath, P.H. A. & Socal, R. R.** (1973). Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. San Francisco: W. H. Freeman.
- Solovieva, N.K.** (1972). Actinomycetes of littoral and sub. Littoral zones of the White Sea. *Antibiotiki*, **17**: 778-781.
- Solovieva, N.K. & Singal, E.M.** (1972). Some data on ecology of *Micromonospora*. *Antiotiki.*, **17**: 387-392.
- Stackebrandt, E. & Liesack, W.** (1993). Nucleic acids and classification. En: Handbook of new bacterial systematics. Goodfellow, M. and O'Donell, A. G., eds.. Academic Press Ltd., London. Pg:151.
- Stackebrandt, E., Goebel, B. M.** (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44**:946-849.
- Stackebrandt, E., Rainey, A. & Ward-Rainey, N.L.** (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Bacteriol.*, **47**:479-91.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M. Patrick, Grimont, P. A. D., Kämpfer, P., Maiden, M. C. J., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Trüper, H. G. Vauterin, L., Ward, A. C. & Whitman, W. B.** (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1043-1047.
- Stackebrandt, E. & Ebers, J.** (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology today*, 152-155.
- Stackebrandt, E., Paüker, O., Steiner, U., Schumann, P., Straübler, B., Hebei, S. & Lang, E.** (2007). Taxonomic characterization of members of the genus *Coralloccoccus*: Molecular divergence versus phenotypic coherency. *Systematic and Applied Microbiology*, **30**:109–118.
- Stackebrandt, E., Brambilla, E. & Richert, K.** (2007). Gene Sequence Phylogenies of the Family *Microbacteriaceae*. *Current Microbiology*, **55**:42-46.
- Stahl, D. A.** (1995). Application of phylogenetically based hybridization probes to microbial ecology. *Molecular Ecology.*, **4**:535-542.
- Sutcliffe, J. F. & Pate, J. S.** (eds). (1977). "The Physiology of the Garden Pea". London Academic Press.
- Suarez, J., Barbes, C. & Hardisson, C.** (1980). Germination of spores of *Micromonospora chalcea*: Physiological and biochemical changes. *J. Gen. Microbiol.*, **121**:159-167.
- Sveshnikova, M. A., Maksimova, T. S., Kudrina, E. S.** (1969). The species of the *Micromonospora* Orskov, 1923 and their taxonomy. *Mikrobiologiya*, **38**:883-893.

- Szabó, Z. & Fernández, C.** (1984). *Micromonospora brunnea* Sveshnikova, Madsimova, and Kudrina 1969 is a junior subjective synonym of *Micromonospora purpureochromogenes* (Waksman and Curtis 1916) Luedemann 1971. *Int J Syst Bacteriol*, **34**:463-464.
- Taechowisan, T., Peberdy, J. F. & Lumyong, S.** (2003). Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*., **19**:381-385.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S.** (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**:1596-1599.
- Tamura, T., Hatano, K. & Suzuki, K.** (2006). A new genus of the family *Micromonosporaceae*, *Polymorphospora* gen. nov., with description of *Polymorphospora rubra* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2006), **56**:1959–1964
- Tanasupawat, S., Jongrungruangchok, S. & Kudo T.** (2009). *Micromonospora marina* sp. nov., isolated from sea sand in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol*. Aug 5. In press.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K. & Kudo, T.** (2004). *Micromonospora aurantionigra* sp. nov., isolated from a peat swamp forest in Thailand. *Actinomycetologica*, **18**: 8–14.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K. & Kudo, T.** (2005). *Micromonospora eburnea* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest. *Int J Syst Bacteriol.*, **55**:417-422.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K. & Kudo, T.** (2006). *Micromonospora siamensis* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **51**:229-234.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Suwanborirux, K., Itoh, T. & Kudo, T.** (2007). *Micromonospora narathiwatensis* sp. nov., from Thai peat swamp forest soils. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **53**:287–293.
- Thawai, C., Tanasupawat, S. & Kudo, T.** (2008). *Micromonospora pattaloongensis* sp. nov., isolated from a Thai mangrove forest. *Int J Syst Evol Microbiol.*, **58**(7):1516-1521.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G.** (1997). The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Res.*, **24**:4876.
- Tindall, B. J., Rosselló-Mora, R., Busse, H. J., Ludwig, W. & Kämpfer, P.** (2009). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol.*, (Epub ahead of print).

- Tomita, F., Tamaoki, T., Shirahata, K., Kasai, M., Morimoto, M., Ohkubo, S., Mineura, K. & Ishii, S. (1980). Novel antitumor antibiotics, tetrocarcins. *J. Antibiot.*, **33**:668–670.
- Tomita, K., Hoshino Y., Ohkusa, N., Miyaki, T. (1992). *Micromonospora chersina* sp. Nov. *Actinomycetol.*, **6**: 21-8.
- Tokala, R. K., Strap, J. L., Jung C. M., Crawford, D. L, Salove, M. H., Deobald, L. A., J., Bailey, J. F. & Morra, M. J. (2005). Novel Plant-Microbe Rhizosphere Interaction Involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the Pea Plant (*Pisum sativum*). *Applied and environmental microbiology*, **68**:2161-2171.
- Trujillo, M. E., Fernandez-Molinero, C., Velazquez, E., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P., Mateos, P. F. & Martínez-Molina, E. (2005). *Micromonospora mirobrigensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbio*, **55**: 877-880.
- Trujillo, M. E., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P., Carro, L. & Martínez-Molina, E. (2006). *Micromonospora coriariae* sp. nov., isolated from root nodules of *Coriaria myrtifolia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**:2381-2385.
- Trujillo, M. E., Kroppenstedt, R. M., Fernández-Molinero, C., Schumann, P. & Martínez-Molina, E. (2007). *Micromonospora lupini* sp. nov. and *Micromonospora saelicesensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Lupinus angustifolius*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**:2799–2804
- Trujillo, M. E. (2008). Actinobacteria in Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ud: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.90020366.
- Valdés, M., Pérez, N., Estrada-de los Santos, P., Caballero-Mellado, J., Peña-Cabriales, J. J., Normand, P. & Hirschs, A. M. (2005). Non-*Frankia* Actinomycetes Isolated from Surface-Sterilized Roots of *Casuarina equisetifolia* Fix Nitrogen. *Applied and environmental microbiology*, **71**:460-466.
- Van Elsas, V., Mäntynen & Wolters, A. C. (1997). Soil DNA extraction and assessment of the fate of *Mycobacterium chlorophenolicum* strain PCP-1 in different soils by 16S ribosomal RNA gene sequence based most-probable-number PCR and immunofluorescence. *Biol. Fertil. Soils*, **24**:188–195.
- Vandamme, P., Pot. B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J. (1996). Polyphasid taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.*, **60**:407-438.
- Velázquez, E., Rojas, M., Lorite, M. J., Rivas, R., Zurdo-Piñeiro, J. L., Heydrich, M. & Bedmar, E. J. (2008). Genetic diversity of endophytic bacteria which could be find in the apoplastic sap of the medullary parenchym of the stem of healthy sugarcane plants. *J Basic Microbiol*, **48**(2):118-24.

- Ventura, M., Canchaya, C., van Sinderen, D., Fitzgerald, G. F. & Zink, R.** (2004). *Bifidobacterium lactis* DSM 10140: Identification of the atp (*atpBEFHAGDC*) Operon and Analysis of Its Genetic Structure, Characteristics, and Phylogeny. *Applied And Environmental Microbiology*, **70**(5):3110–3121.
- Versalovic, J., Koeuth, T. & Lupski, J. R.** (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.*, **19**:6823-6831.
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J. & Lupski, J. R.** (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular and cellular biology*, **5**:25-40.
- Vincent, J. M.** (1970). The cultivation, isolation and maintenance of rhizobia. In a Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Edited by J. M. Vincent. Oxford: Blackwell Scientific. 1-13.
- Vinuesa, P., Silva, C., Lorite, M. J., Izaguirre-Mayoral, M. L., Bedmar, E. J. & Martínez-Romero, E.** (2005). Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania microsymbionts* from Venezuelan wetlands. *Systematic and Applied Microbiology*, **28**(8):702-716.
- Wagman, G. H., J. A. Waitz, J. Marquez, A. Murawski, E. M. Oden, R. T. Testa, & M. J. Weinstein.** (1972). A new *Micromonospora*-produced macrolide antibiotic, rosamycin. *J. Antibiot.* **25**:641-646.
- Waksman, S. A.** (1961). The Actinomycetes. Vol. 2. Classification, identification and descriptions of genera and species. 259-263 .The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Waksman, S. A. & Curtis, R. E.** (1916). The actinomyces of the soil. *Soil Sci*, **1**:99-134.
- Walkey, A.** (1947). A critical examination of rapid method for determining organic carbon soil-effect of variations in digestion condition and inorganic soil constituents. *Soil Sci.*, **63**:251-264.
- Wall, L.G., Hellsten, A. & Huss-Danell, K.** (2000). Nitrogen, phosphorus, and the ratio between them affect nodulation in *Alnus incana* and *Trifolium pratense*. *Symbiosis*, **29**:91-105.
- Watson, E. T. & Williams, S. T.** (1974). Studies on the ecology of actinomycetes in soil. VII. Actinomycetes in a coastal sand belt. *Soil Biol. Biochem.*, **6**: 43-52.
- Wawrik, B., Kutliev, D., Abdivasievna, U. A., Kukor, J. J., Zylstra, G. J. & Kerkhof, L.** (2007). Biogeography of Actinomycete Communities and Type II Polyketide Synthase Genes in Soils Collected in New Jersey and Central Asia. *Applied environmental microbiology*. **73**(9):2982-2989.



- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. & Trüper, H. G. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol*, **37**:463-464.
- Weinstein, M. J., Luedemann, G. M., Oden, E. M. & Wagman, G. H. (1968). Halomicin, a new *Micromonospora*-produced antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother*, **1967**:435-441.
- Welsh, J. & Mc Clelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, **18**:7213-8.
- Weyland, H. (1969). Actinomycetes in north sea and Atlantic ocean sediments. *Nature*, Lond. 223: 858.
- Willems, A., Fernández-López, M., Muñoz-Adelantado, E., Goris, J., De Vos, P. & Gillis, M. (2001). DNA-DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains. *Int J Syst Microbiol*, **51**:1315-1322.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**(22):6531-6535.
- Williams, S. T., Lanning, S. & Wellington, E. M. H. (1983). Ecology of Actinomycetes. In *The biology of actinomycetes*. Edited by M. Goodfellow, M. Mordarsdi & S. T. Williams. London: Academic Press Inc. 481-528.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, **51**:221-271.
- Woese, C.R. & Olsen, G.J. (1986). Archaeobacterial phylogeny: perspectives on the urkingdoms. *Systematic Applied Microbiology*, **7**:161-77.
- Yamamoto, S. & Harayama, S. (1995). PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**(3):1104-1109.
- Yamamoto, S. & Harayama, S. (1996). Phylogenetic Analysis of *Acinetobacter* Strains Based on the Nucleotide Sequences of *gyrB* Genes and on the Amino Acid Sequences of Their Products. *Int J Syst Bacteriol*, **46**(2):506-511.
- Zeigler, R. D. (2003). Gener sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol*, **53**:1893-1900.
- Zhang, H., Kyung Lee, Y. & Zhang, W. (2006). Culturable actinobacterias from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*: isolation and phylogenetic diversity by 16S rRNA gene-RFLP analysis. *Antonie van Leewenhoek*, **90**:159-169.
- Zhao, H., Kassama, Y., Young, M., Kell, D.B. & Goodacre, R. (2004). Differentiation of *Micromonospora* isolates from a coastal sediment in Wales on the

basis of fourier transform infrared spectroscopy, 16S rRNA sequence analysis, and the amplified fragment length polymorphism technique. *Applied and environmental microbiology*, 6619-6627.

**Zhi, X. Y., Li, W. J. & Stackebrandt, E.** (2009). An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol.*, **59**(3):589-608.

## *APÉNDICE*

## APÉNDICE

### 1. Medios de cultivo

#### 1.1- Medio Ácido Húmico I

Ácido húmico	1,0* g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,50 g
KCl	1,70 g
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,05 g
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,01 g
CaCO <sub>3</sub>	0,02 g
Agar	18,00 g

Se lleva hasta un litro con agua destilada. Se esteriliza en autoclave durante 20 min. a 15 psi de presión (121°C).

\* Disolver en 10ml de NaOH 0,2N.

- Añadir una solución de B vitaminas, 0,5 mg. de cada una de las siguientes, tiamina\*HCl, riboflavina, niacina, piridoxin\*HCl, inositol, Ca-pantotenato, ácido p-aminobenzoico, y 0,25mg de biotina.

- Añadir cicloheximida 50 mg/l, esto y la solución se filtran posteriormente a la esterilización en autoclave para añadirlo.

#### 1.2- Medio Ácido Húmico II

Extracto de levadura	1,0 g
Ácido húmico	0,2 g
Agar	18,0 g

Se lleva hasta un litro con agua destilada. Se esteriliza en autoclave durante 20 min. a 15 psi de presión (121°C).

Añadir cicloheximida 50 mg/l, se filtra posteriormente a la esterilización en autoclave para añadirlo.

#### 1.3- Medio Avena

- Se pone la avena a ebullición durante 20' al 2%, posteriormente se filtra mediante una gasa de algodón y se ajusta de nuevo al volumen inicial para recuperar el agua evaporada y se añade agar al 1,8% y una solución de sales (1ml/l).

- Se lleva hasta un litro con agua destilada. Se esteriliza en autoclave durante 20 min. a 15 psi de presión (121°C).

Solución de sales:

FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,1 g
MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	0,1 g
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,1 g

Se lleva a un litro con agua destilada.

#### 1.4- Medio Basal (SA1)

Glucosa	10,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Triptona	5,0 g
Almidón	2,0 g
Triptosa	2,0 g
CaCO <sub>3</sub>	0,1 g
CoCl <sub>2</sub>	trazas g
Citrato de hierro	trazas g
Agar	18,0 g

Se lleva hasta un litro con agua destilada. Se esteriliza en autoclave durante 20 min. a 15 psi de presión (121°C).

#### 1.5- Medio Base (Medio de Stevenson)

- Se disuelve el azúcar o aminoácido en agua destilada esterilizada tres veces por tinalización a 100 °C durante 20 minutos.

- Se preparan 6.7 g/L de una base de nitrógeno (Disco®) en agua destilada estéril, y se añade esterilizando por filtración.

- Se prepara una disolución de sales:

KH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g
Agar	18,0 g

Se lleva hasta un litro con agua destilada. Se esteriliza en autoclave durante 20 min. a 15 psi de presión (121°C).

La disolución de cada fuente de carbono se une a las otras dos alícuotas en campana de flujo laminar.

### 1.6- Medio Bennett's

Extracto de carne	10,0 g
Extracto de levadura	2,0 g
Glucosa	10,0 g
Almidón	0,1 g
Triptosa	2,0 g
CaCO <sub>3</sub>	0,1 g
CoCl <sub>2</sub>	trazas g
Citrato de hierro amónico	trazas g
Agar	18,0 g

Se lleva hasta un litro con agua destilada. Se esteriliza en autoclave durante 20 min. a 15 psi de presión (121°C).

### 1.7- Medio Caseína-Almidón

Almidón soluble	10,00 g
Caseína	0,30 g
KNO <sub>3</sub>	2,00 g
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,05 g
CaCO <sub>3</sub>	0,02 g
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,01 g
Agar	18,00 g

Se lleva hasta un litro con agua destilada. Se esteriliza en autoclave durante 20 min. a 15 psi de presión (121°C). Se añade:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (solución 20%)	10 ml/l
Cicloheximida	50 mg/l
Rifampicina	50 mg/l

**1.8- Medio TSA (Trypticase Soy Agar)**

Triptona	17,00 g
Peptona de soja	3,00 g
Bacto-Dextrosa	2,50 g
NaCl	5,00 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,50 g
Agar	18,00 g

Se lleva hasta un litro con agua destilada. Se esteriliza en autoclave durante 20 min. a 15 psi de presión (121°C).

**1.9- Medio YMA (Yeast Manitol Agar)**

Manitol	10,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g
Agar	20,0 g

Se lleva hasta un litro con agua destilada. Se esteriliza en autoclave durante 20 min. a 15 psi de presión (121°C).

**1.10- Medio 65 o ISP 2**

Glucosa	4,0 g
Extracto de levadura	4,0 g
Extracto de malta	10,0 g
CaCO <sub>3</sub>	2,0 g
Agar	18,0 g

Se lleva hasta un litro con agua destilada. El pH se ajusta a  $7,2 \pm 0,2$  a 25°C con KOH antes de añadir el agar. Se esteriliza en autoclave durante 20 min. a 15 psi de presión (121°C).

En el caso de preparar medio líquido no añadiremos el CaCO<sub>3</sub>.

En la preparación de medio líquido no añadiremos el agar en ninguno de los medios.

## 2. Medios de degradación

### 2.1- Medio almidón

Se prepara de igual modo que el medio SA1, pero cambiando la cantidad de almidón a añadir, en este caso 10 g/l.

### 2.2- Pruebas arbutina y esculina

Medio control:

Citrato amónico-férrico	0,5 g
Extracto de levadura	3,0 g
Agar	7,5 g

Se lleva hasta un litro con agua destilada y se ajusta a un pH de 7,2.

Medio test:

Medio control + esculina (1g) o arbutina (1g) / 1l

Alicuotar en tubos con 2 ml y autoclavar.

### 2.3- Medio caseína

Se autoclavan 100 ml de leche desnatada al 10% (p/v) a 110°C durante 10' por un lado y medio SA1 durante 20 min. a 15 psi de presión (121°C) por otro. Se añade la leche estéril para una concentración final de 1% (p/v).

### 2.4- Medio de gelatina

Se prepara medio SA1, al que añadimos gelatina en cantidad de 4 g/l.

Para revelar las placas se utiliza una solución de revelado con la que cubrimos la placa durante 15'.

Solución de revelado:

Cl <sub>2</sub> Hg	12,50 g
HCl	16,80 ml
Agua destilada	83,20 ml



Solución de sales:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g/l
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g/l

### 2.5- Medio de Tween

Bacto peptona	10,0 g
Cloruro de calcio	5,0 g
Cloruro de sodio	0,1 g
Agar	15,0 g

Se lleva hasta un litro con agua destilada. Se esteriliza en autoclave durante 15 min. a 15 psi de presión (121°C).

El Tween se autoclava por separado mezclando después.

### 2.6- Medio de urea (urea broth –fluka-)

Disolver 3,8 g de medio en 100 ml de agua destilada estéril. Esterilizar por filtración y alicuotar en tubos de ensayo con 2 ml.

Extracto de levadura	0,10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9,50 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9,10 g
Urea	20,00 g
Rojo fenol	0,01 g

### 2.7- Medio xilano

Se prepara medio SA1, al que añadimos xilano en cantidad de 4 g/l.

## 3. Tampones

### 3.1- Bromuro de etidio

Se añadió una solución de 10 mg/ml para una concentración final de 0,5µg/ml.

**3.2- Tampón ácido cítrico - hidrogenofosfato disodio.**

Las soluciones de ácido cítrico 0,2M (monohidratado) y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,4M (deshidratado), se autoclavaron durante 15' a 121°C. Posteriormente se mezclaron en las cantidades a continuación indicadas según el pH deseado, y la mezcla se vierte sobre 100 ml de medio estéril de SA1 a doble concentración.

pH	X ml de ácido cítrico	Y ml de $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
4,5	54,6	45,4
5,5	43,1	56,9
6,5	29	71

**3.3- Tampón de carga**

Reactivos	Concentración
Sacarosa	40,00 %
Azul de bromofenol	0,05 %

**3.4- Tampón de EDTA para bolsas de diálisis**

EDTA	2,23 g
------	--------

Completar hasta 1200 ml y guardar a 8°C (máximo 6 meses).

**3.5- Tampón de EDTA salino**

NaCl (0,15 M)	2,19 g
EDTA (0,01 M)	0,93 g

Completar hasta 250 ml y ajustar a pH 8.

**3.6- Tampón de fosfato de sodio (PB1) 7mM**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,24 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,96 g

Completar hasta un litro con agua milli-Q y ajustar el pH a 6,8.

**3.7- Tampón de fosfato de sodio (PB2) 0,2 M**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	35,6 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	27,6 g

Completar hasta un litro con agua milli-Q y ajustar el pH a 6,8.

**3.8- Ninhidrina**

1-butanol	233 ml
H <sub>2</sub> O saturada glacial	17 ml
ninhidrina	1,25 g

**3.9- Tampón de SSC (20X)**

NaCl	175,3 g
Tri-citrato de sodio dihidrato	88,2 g

Completar hasta un litro con agua milli-Q y ajustar a pH 7.

**3.10- Tampón de Rhuland**

Metanol	320 ml
Piridina	40 ml
Agua	70 ml
HCl	10 ml

**3.11- Tampón TAE**

Tris-Acetato	0,040 M
EDTA	0,001 M

**3.12- Tampón TBE**

	Concentración	Cantidades
Tris (Fluka)	100 mM	12,11 g
H3BO3 (Fluka)	83 mM	5,13 g
EDTA (Fluka)	1 mM	0,37 g
Agua destilada		1,00 l

**3.13- Tampón de Tris (hidroximetil) aminometano**

Las soluciones de Tris 0,2M y HCl 0,2M se autoclavaron durante 15' a 121°C. Cincuenta mililitros de Tris se añadieron a los ml indicados de HCl según el pH deseado, se diluye hasta 100 ml con agua esteril, se mezcla y se vierte sobre 100 ml de medio estéril de SA1 a doble concentración.

pH	X ml HCl
8	29,2
9	0,2

**3.14- Tampón de Urea (MUP) 8M**

Urea	480,48 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	21,36 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	16,56 g

Completar hasta un litro con agua milli-Q y ajustar el pH a 6,8.

*ANEXO I*

## ANEXO I

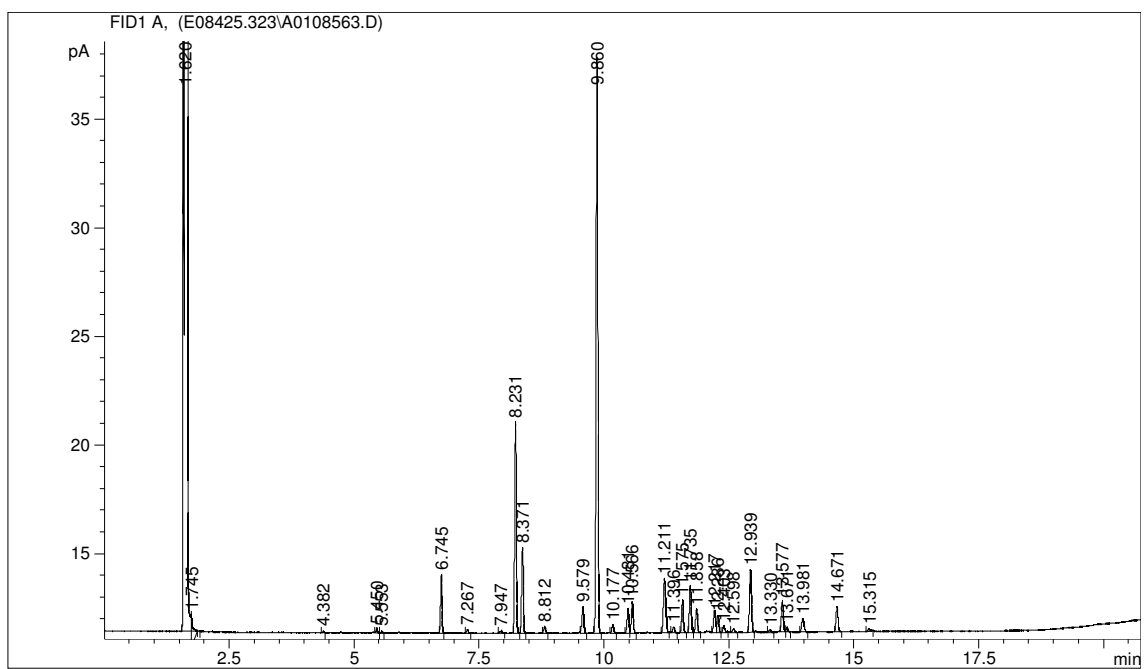
## GUI 2

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.620	3,47E+11	SOLVENT PEAK	----	1.618	3,60E+11
	----	1.745	9345		----	1.724	3772
12:0 ISO	0.12	4.382	326		----	2.525	547
13:0 ISO	0.27	5.450	760	12:0 ISO	0.04	4.379	322
13:0 ANTEISO	0.12	5.553	330	13:0 ISO	0.47	5.447	4123
14:0 ISO	3.91	6.745	11525	13:0 ANTEISO	0.10	5.550	868
14:00	0.24	7.267	729	13:00	0.10	5.893	880
15:1 ISO G	0.21	7.947	642	14:0 ISO	3.11	6.741	28477
15:0 ISO	14.70	8.231	44692	14:00	0.13	7.263	1161
15:0 ANTEISO	6.08	8.371	18545	15:1 ISO G	0.16	7.944	1539
15:00	0.46	8.812	1402	Sum In Feature 1	0.09	8.004	850
16:1 ISO H	2.14	9.579	6655	15:0 ISO	26.77	8.230	252481
16:0 ISO	41.64	9.860	130005	15:0 ANTEISO	7.04	8.367	66554
Sum In Feature 3	0.64	10.177	2012	15:1 w8c	0.06	8.491	527
16:00	1.81	10.481	5709	15:1 w6c	0.13	8.586	1230
	----	10.566	7168	15:00	2.62	8.808	24959
ISO 17:1 w9c	5.12	11.211	16272		----	8.896	228
ANTEISO 17:1 w9c	0.42	11.396	1323	16:1 ISO H	1.23	9.575	11872
17:0 ISO	2.50	11.575	7967	16:0 ISO	20.30	9.859	196772
17:0 ANTEISO	3.51	11.735	11208	Sum In Feature 3	0.56	10.173	5428
17:1 w8c	1.81	11.858	5786	16:00	1.12	10.475	10962
17:00	1.64	12.217	5278		----	10.563	7554
16:1 2OH	1.27	12.286	4078	ISO 17:1 w9c	5.47	11.205	54043
	----	12.403	1730	ANTEISO 17:1 w9c	0.39	11.390	3877
	----	12.598	929	17:0 ISO	2.84	11.571	28207
17:0 10 methyl	4.86	12.939	15706	17:0 ANTEISO	2.68	11.733	26617
18:0 ISO	0.21	13.330	675	17:1 w8c	8.91	11.857	88669
18:1 w9c	2.44	13.577	7927	17:1 w6c	0.08	11.974	833
18:1 w7c	0.35	13.671	1125		----	12.051	788
18:00	1.28	13.981	4179	17:00	4.78	12.214	47780
TBSA 10Me18:0	1.98	14.671	6470	16:1 2OH	0.61	12.282	6062
Sum In Feature 6	0.28	15.315	917		----	12.398	2845
Summed Feature 3	0.64	----	2012		----	12.597	1357
Summed Feature 6	0.28	----	917	17:0 10 methyl	6.35	12.938	63873
				18:0 ISO	0.17	13.327	1718
				18:1 w9c	1.31	13.572	13272
				18:1 w7c	0.17	13.665	1695
				18:00	0.77	13.979	7803
				TBSA 10Me18:0	1.18	14.667	12077
				Sum In Feature 6	0.19	15.308	1902
					----	15.377	1398
				19:00	0.08	15.736	838
				Summed Feature 1	0.09	----	850
				Summed Feature 3	0.56	----	5428
				Summed Feature 6	0.19	----	1902

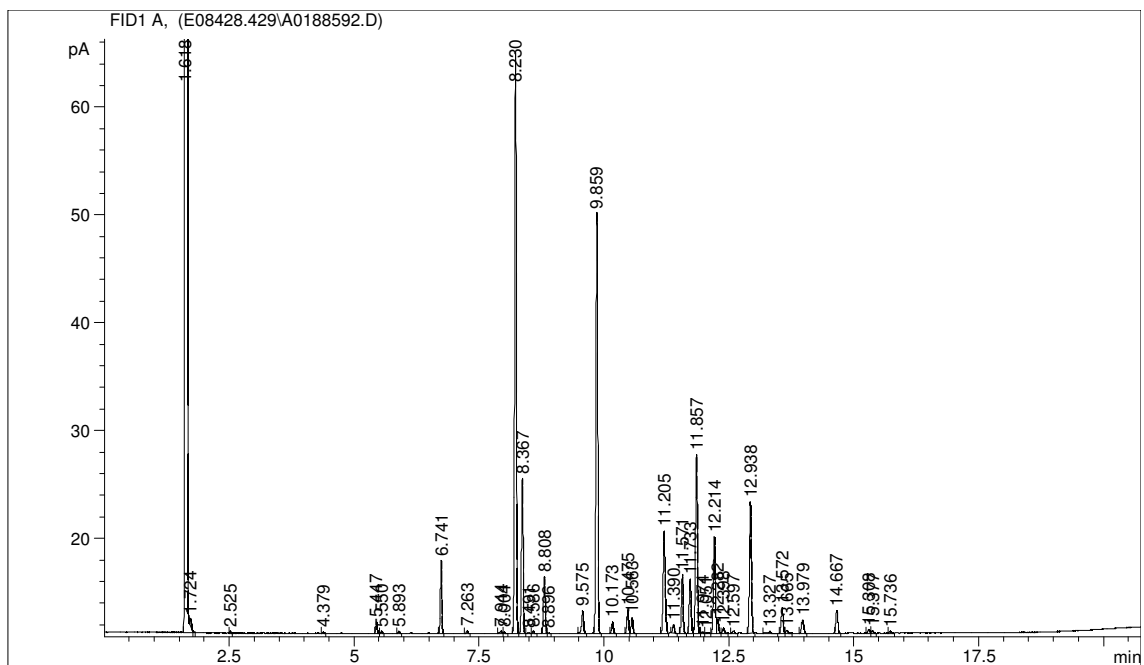
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa GUI 2.

M65



TSA



## GUI 3

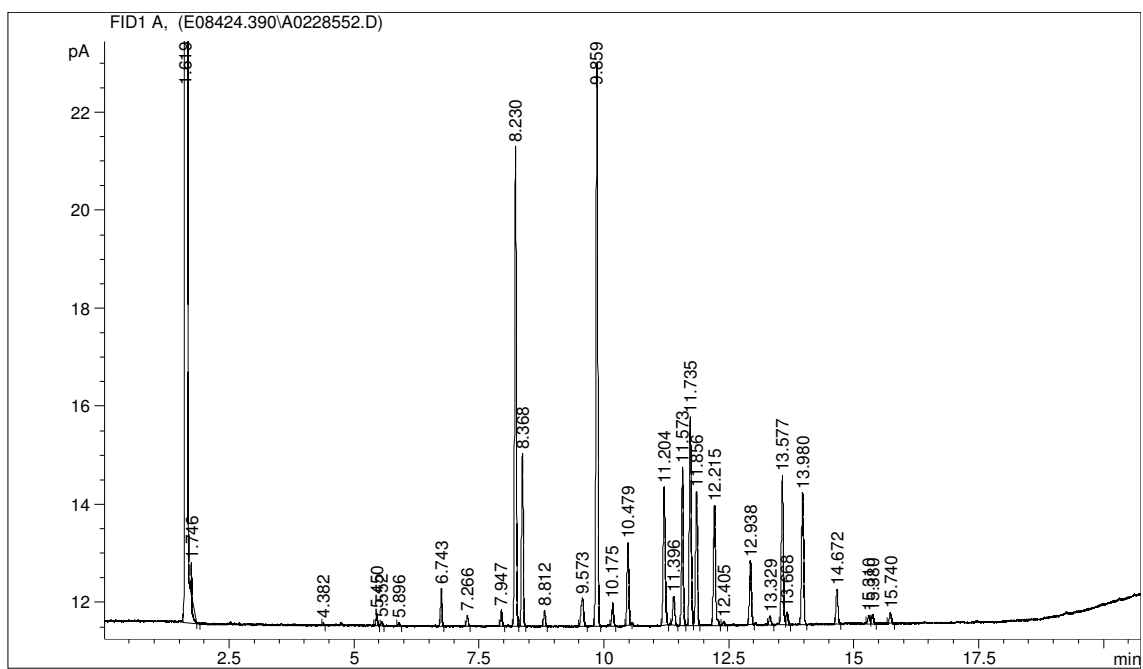
M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.619	3.599E+8	SOLVENT PEAK	----	1.618	3.60E+11
	----	1.746	-----		----	1.724	3772
12:0 ISO	0.09	4.382	211		----	2.525	547
13:0 ISO	0.39	5.450	964		----	4.379	322
13:0 ANTEISO	0.12	5.552	299	13:0 ISO	0.34	5.447	4123
13:0	0.10	5.896	242	14:0 ISO	0.33	5.550	868
14:0 ISO	1.26	6.743	3256	14:0	0.09	5.893	880
14:0	0.39	7.266	1007	15:1 ISO G	0.59	6.741	28477
15:1 ISO G	0.60	7.947	1576	15:0 ISO	43.44	7.263	1161
15:0 ISO	16.98	8.230	45134	15:0 ANTEISO	5.03	7.944	1539
15:0 ANTEISO	6.20	8.368	16513	15:0	0.49	8.004	850
15:0	0.53	8.812	1410	16:1 ISO H	0.27	8.230	252481
16:1 ISO H	1.48	9.573	4031	16:0 ISO	6.33	8.367	66554
16:0 ISO	20.71	9.859	56482	Sum In Feature 3	0.19	8.491	527
Sum In Feature 3	0.85	10.175	2341	16:0	1.36	8.586	1230
16:0	3.07	10.479	8453	ISO 17:1 w9c	8.74	8.808	24959
ISO 17:1 w9c	5.72	11.204	15872	ANTEISO 17:1 w9c	0.45	8.896	228
ANTEISO 17:1 w9c	1.14	11.396	3184	17:0 ISO	12.68	9.575	11872
17:0 ISO	5.83	11.573	16244	17:0 ANTEISO	5.24	9.859	196772
17:0 ANTEISO	7.98	11.735	22295	17:1 w8c	4.06	10.173	5428
17:1 w8c	5.10	11.856	14262	17:0	5.76	10.475	10962
17:0	4.92	12.215	13801	16:1 2OH	0.23	10.563	7554
	----	12.405	398		----	11.205	54043
17:0 10 methyl	2.37	12.938	6714		----	11.390	3877
18:0 ISO	0.34	13.329	962	17:0 10 methyl	1.55	11.571	28207
18:1 w9c	5.89	13.577	16740	18:0 ISO	0.08	11.733	26617
18:1 w7c	0.55	13.668	1572	18:1 w9c	0.81	11.857	88669
18:0	5.29	13.980	15089	18:0	1.28	11.974	833
TBSA 10Me18:0	1.36	14.672	3908	TBSA 10Me18:0	0.34	12.051	788
Sum In Feature 6	0.34	15.310	992	Sum In Feature 6	0.19	12.214	47780
	----	15.380	1118		----	12.282	6062
19:0	0.41	15.740	1169	19:0	0.14	12.398	2845
Summed Feature 3	0.85	----	2341	Summed Feature 3	0.19	12.597	1357
Summed Feature 6	0.34	----	992	Summed Feature 6	0.19	12.938	63873

TR: Tiempo de retención

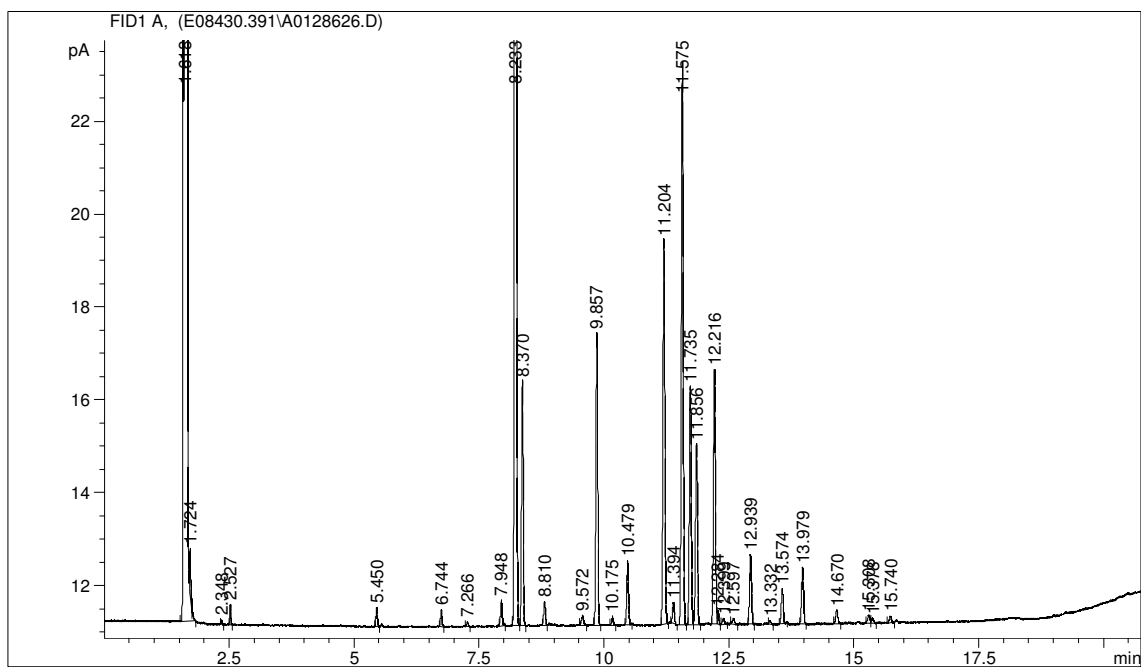


Perfiles obtenidos para la cepa GUI 3.

M65



TSA



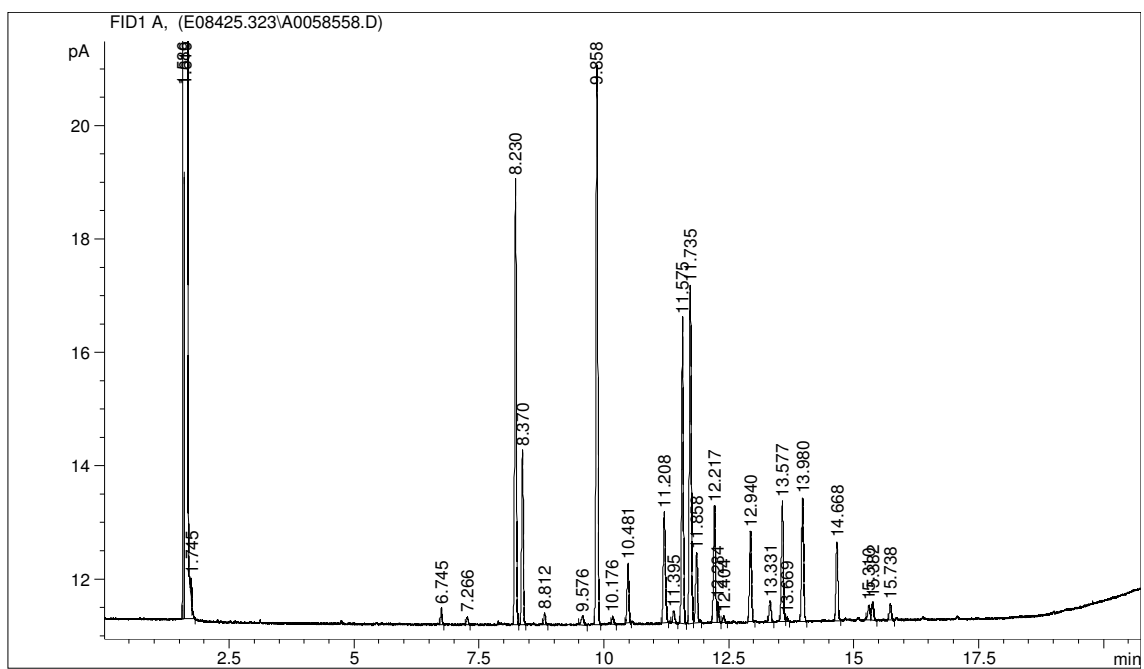
## GUI 12

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
	----	1.586	63405	SOLVENT PEAK	----	1.618	3.569E+8
SOLVENT PEAK	----	1.619	3.472E+8		----	1.725	8858
	----	1.745	860		----	1.984	581
14:0 ISO	0.55	6.745	1249		----	2.347	222
14:0	0.25	7.266	574		----	2.526	4097
15:0 ISO	15.26	8.230	35864		----	3.180	168
15:0 ANTEISO	5.98	8.370	14089	11:0 ISO	0.03	3.546	155
15:0	0.38	8.812	905	13:0 ISO	0.22	5.448	1398
16:1 ISO H	0.47	9.576	1141	13:0 ANTEISO	0.12	5.550	790
16:0 ISO	19.74	9.858	47642	14:0 ISO	0.20	6.741	1300
Sum In Feature 3	0.29	10.176	704	14:0	0.04	7.262	271
16:0	2.10	10.481	5101	15:1 ISO F	0.19	7.908	1305
ISO 17:1 w9c	4.61	11.208	11321	Sum In Feature 1	0.07	8.006	499
ANTEISO 17:1 w9c	0.45	11.395	1103	15:0 ISO	16.11	8.229	109447
17:0 ISO	11.27	11.575	27781	15:0 ANTEISO	5.52	8.366	37628
17:0 ANTEISO	12.91	11.735	31897	15:0	0.09	8.810	629
17:1 w8c	2.78	11.858	6868		----	8.897	757
17:0	4.31	12.217	10710	16:1 ISO H	0.26	9.574	1785
16:1 2OH	0.67	12.284	1661	16:0 ISO	7.40	9.855	51602
	----	12.404	572	Sum In Feature 3	0.10	10.173	695
17:0 10 methyl	3.43	12.940	8581	16:0	0.35	10.475	2457
18:0 ISO	0.78	13.331	1950		----	10.563	839
18:1 w9c	4.62	13.577	11591	ISO 17:1 w9c	9.73	11.202	69099
18:1 w7c	0.15	13.669	379	Sum In Feature 4	0.20	11.299	1410
18:0	4.78	13.980	12043	ANTEISO 17:1 w9c	1.47	11.393	10451
TBSA 10Me18:0	3.00	14.668	7587	17:0 ISO	14.08	11.574	100335
Sum In Feature 6	0.61	15.310	1553	17:0 ANTEISO	24.41	11.736	174327
	----	15.382	1933	17:1 w8c	1.26	11.856	9039
19:0	0.62	15.738	1565		----	12.048	914
Summed Feature 3	0.29	----	704		----	12.106	803
Summed Feature 6	0.61	----	1553	17:0	0.89	12.214	6422
				16:1 2OH	5.30	12.284	38046
					----	12.398	12848
					----	12.597	3077
				17:0 10 methyl	3.71	12.937	26829
				18:0 ISO	0.40	13.328	2878
				18:1 w9c	1.77	13.574	12833
				18:1 w7c	0.07	13.667	511
				18:0	1.23	13.978	8980
				TBSA 10Me18:0	2.98	14.667	21773
					----	14.836	3284
				17:0 3OH	0.21	14.917	1573
				19:0 ISO	0.24	15.090	1767
				Sum In Feature 6	0.74	15.307	5412
					----	15.378	4188
				19:0	0.40	15.739	2918
				19:0 10 methyl	0.19	16.391	1399
				Summed Feature 1	0.07	----	499
				Summed Feature 3	0.10	----	695
				Summed Feature 4	0.20	----	1410
				Summed Feature 6	0.74	----	5412
				Summed Feature 3	0.10	----	695

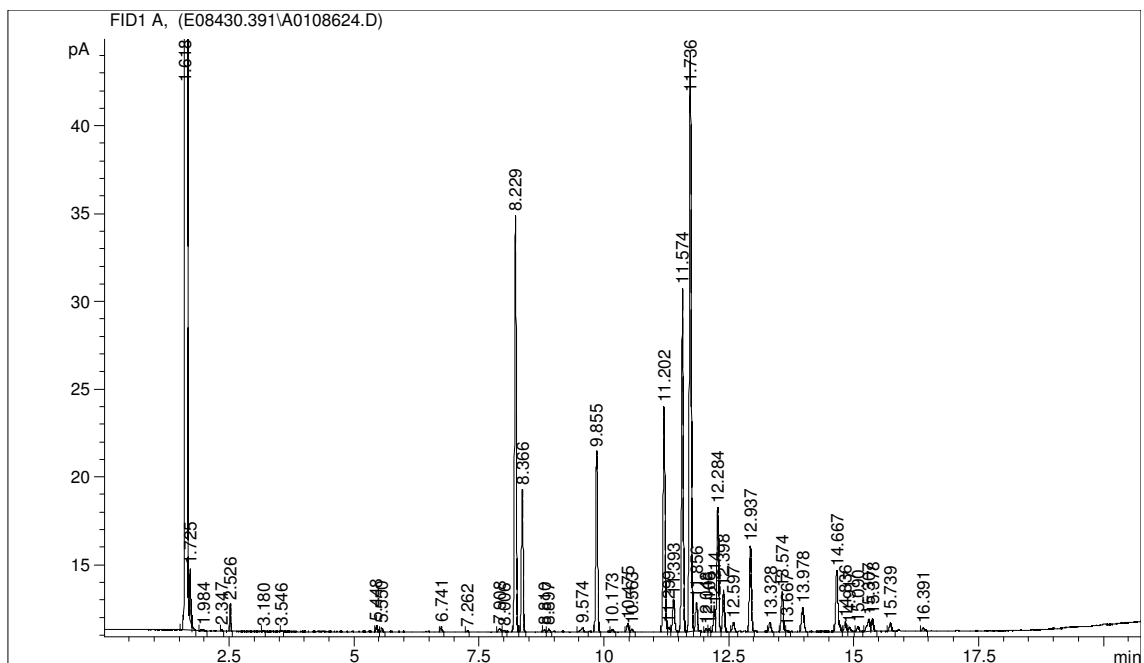
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa GUI 12.

M65



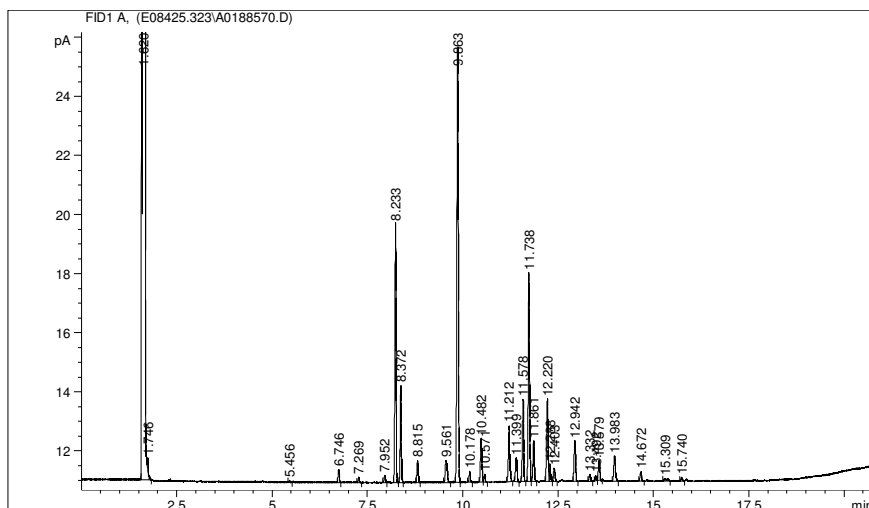
TSA



GUI 13

M65			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.620	3.447E+8
	----	1.746	976
13:0 ISO	0.08	5.456	202
14:0 ISO	0.75	6.746	1849
14:0	0.30	7.269	747
15:1 ISO G	0.45	7.952	1140
15:0 ISO	15.69	8.233	39891
15:0 ANTEISO	5.92	8.372	15095
15:0	1.34	8.815	3455
16:1 ISO G	2.04	9.561	5313
16:0 ISO	27.48	9.863	71737
Sum In Feature 3	0.73	10.178	1914
16:0	2.82	10.482	7413
	----	10.571	1373
ISO 17:1 w9c	4.11	11.212	10920
ANTEISO 17:1 w9c	1.66	11.399	4420
17:0 ISO	5.33	11.578	14225
17:0 ANTEISO	14.24	11.738	38040
17:1 w8c	2.69	11.861	7207
17:0	5.52	12.220	14828
16:1 2OH	1.08	12.288	2898
	----	12.403	2471
17:0 10 methyl	2.71	12.942	7316
18:0 ISO	0.48	13.332	1297
Sum In Feature 5	0.29	13.492	782
18:1 w9c	1.24	13.579	3355
18:0	1.81	13.983	4933
TBSA 10Me18:0	0.66	14.672	1806
Sum In Feature 6	0.34	15.309	942
19:0	0.21	15.740	564
Summed Feature 3	0.73	----	1914
Summed Feature 5	0.29	----	782
Summed Feature 6	0.34	----	942

TR: Tiempo de retención



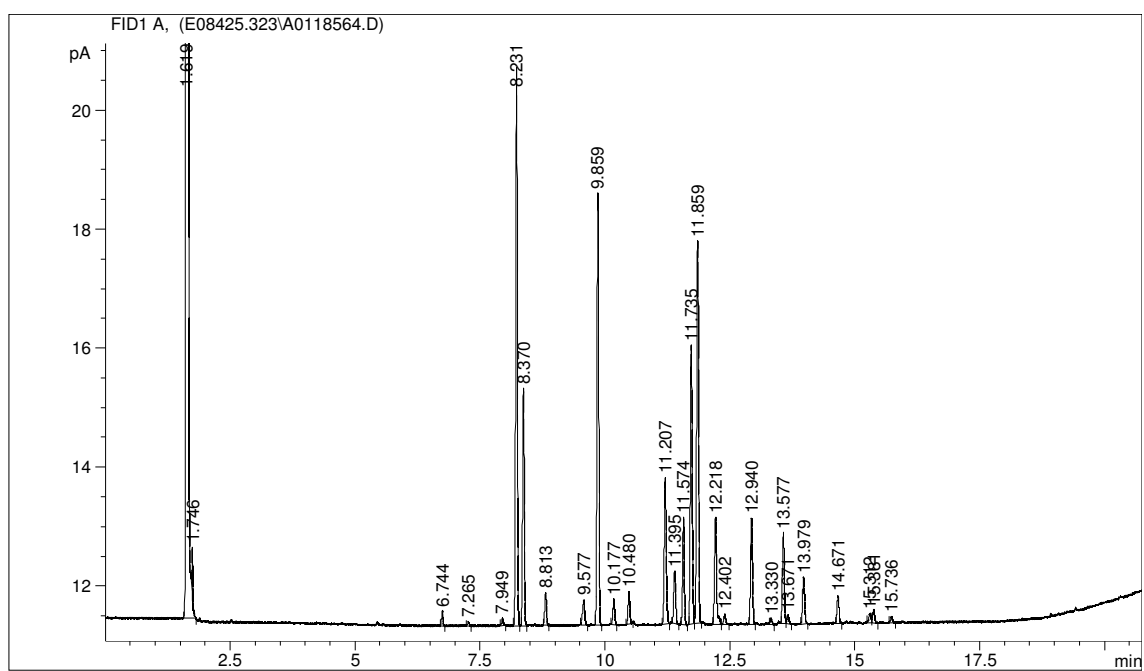
## GUI 14

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.619	3.608E+8	SOLVENT PEAK	----	1.618	3.657E+8
	----	1.746	2014		----	1.723	1292
14:0 ISO	0.48	6.744	1058		----	1.744	2850
14:0	0.13	7.265	280		----	1.786	716
15:1 ISO G	0.26	7.949	585		----	1.865	298
15:0 ISO	18.87	8.231	42487		----	2.017	377
15:0 ANTEISO	8.10	8.370	18290		----	2.221	2894
15:0	1.12	8.813	2543		----	2.272	1271
16:1 ISO H	1.10	9.577	2543		----	2.325	355
16:0 ISO	15.58	9.859	36029		----	2.526	697
Sum In Feature 3	0.94	10.177	2183	13:0 ISO	0.11	5.447	564
16:0	1.19	10.480	2781	12:0 2OH	0.05	6.133	250
ISO 17:1 w9c	5.74	11.207	13500	14:0 ISO	0.34	6.741	1895
ANTEISO 17:1 w9c	2.01	11.395	4747	14:0	0.06	7.262	337
17:0 ISO	3.96	11.574	9361	15:1 ISO G	0.19	7.943	1063
17:0 ANTEISO	10.24	11.735	24237	15:0 ISO	23.78	8.228	135020
17:1 w8c	14.62	11.859	34631	15:0 ANTEISO	5.35	8.365	30434
17:0	4.22	12.218	10030	15:0	0.33	8.807	1907
	----	12.402	914		----	8.901	266
17:0 10 methyl	3.92	12.940	9380	16:1 ISO H	1.03	9.572	5974
18:0 ISO	0.21	13.330	507	16:0 ISO	13.53	9.855	78977
18:1 w9c	3.44	13.577	8266	Sum In Feature 3	0.99	10.174	5804
18:1 w7c	0.35	13.671	850	16:0	0.78	10.477	4584
18:0	1.82	13.979	4378		----	10.561	1523
TBSA 10Me18:0	1.07	14.671	2601	ISO 17:1 w9c	11.06	11.204	65719
Sum In Feature 6	0.38	15.312	924	ANTEISO 17:1 w9c	2.41	11.391	14374
	----	15.381	1309	17:0 ISO	5.94	11.569	35448
19:0	0.23	15.736	569	17:0 ANTEISO	9.17	11.732	54840
Summed Feature 3	0.94	----	2183	17:1 w8c	11.23	11.856	67287
Summed Feature 6	0.38	----	924	17:0	3.14	12.212	18855
				16:1 2OH	0.51	12.280	3083
					----	12.399	1348
				17:0 10 methyl	2.34	12.934	14150
				18:0 ISO	0.18	13.327	1077
				18:1 w9c	3.76	3.76	13.573
				18:1 w7c	0.30	13.665	1822
				18:0	1.31	13.979	8006
				TBSA 10Me18:0	1.63	14.665	10009
				Sum In Feature 6	0.31	15.306	1892
					----	15.378	2112
				19:0	0.19	15.735	1192
				Summed Feature 3	0.99	----	5804
				Summed Feature 6	0.31	----	1892

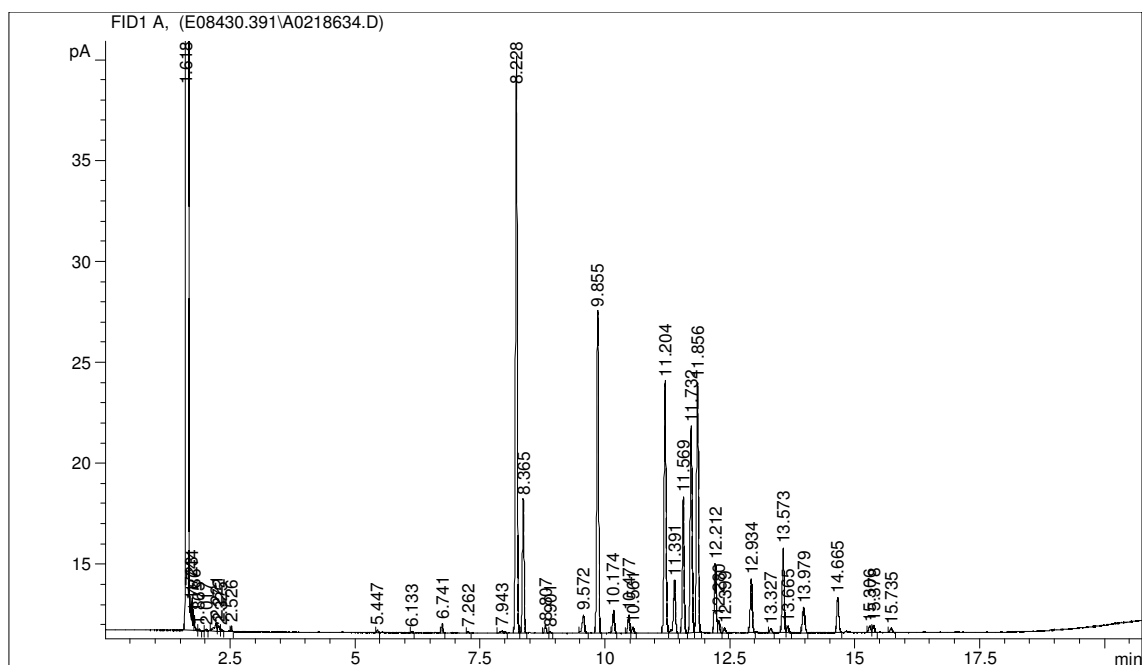
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa GUI 14.

M65



TSA



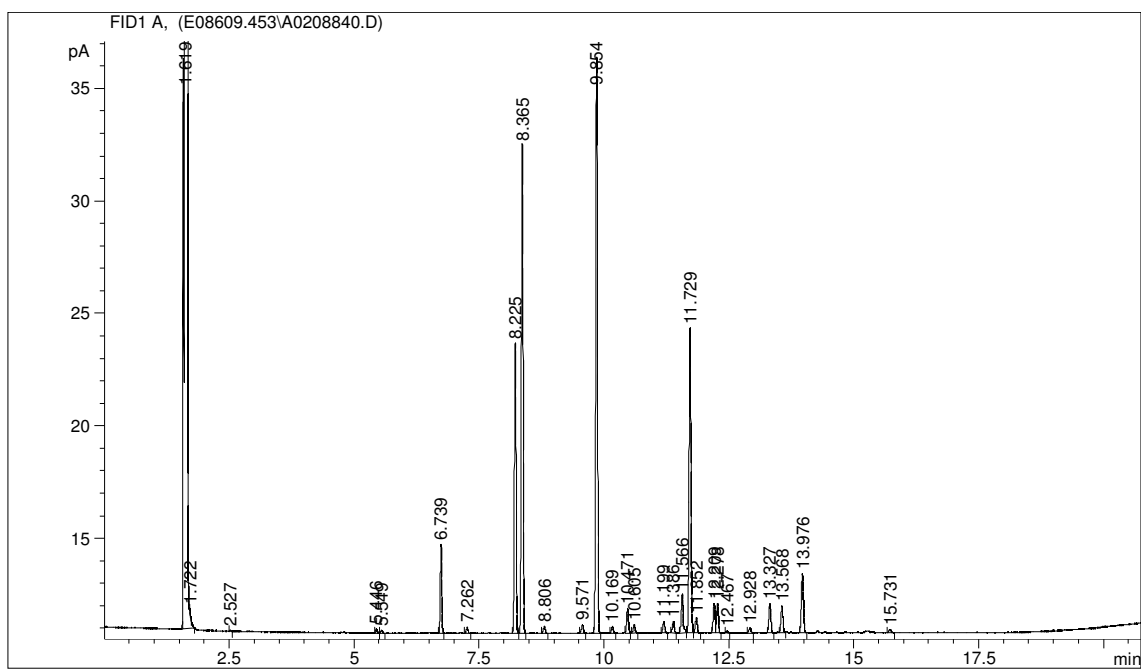
## GUI 15

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.619	3.441E+8	SOLVENT PEAK	----	1.618	3,60E+11
	----	1.722	778		----	1.724	3772
	----	2.527	158		----	2.525	547
13:0 ISO	0.16	5.446	676		----	4.379	322
13:0 ANTEISO	0.13	5.549	522	13:0 ISO	0.28	5.447	4123
14:0 ISO	3.85	6.739	16567	13:0 ANTEISO	0.13	5.550	868
14:0	0.26	7.262	1137	14:0 ISO	4.70	5.893	880
15:0 ISO	13.74	8.225	60799	14:0	0.13	6.741	28477
15:0 ANTEISO	22.95	8.365	101782	15:0 ISO	14.17	7.263	1161
15:0	0.33	8.806	1453	15:0 ANTEISO	25.21	7.944	1539
16:1 ISO H	0.45	9.571	2047	15:0	0.33	8.004	850
16:0 ISO	27.38	9.854	123813	16:1 ISO H	1.23	8.230	252481
Sum In Feature 3	0.34	10.169	1544	16:0 ISO	26.54	8.367	66554
16:0	1.24	10.471	5623	Sum In Feature 3	0.39	8.491	527
	----	10.605	1887	16:0	0.35	8.586	1230
ISO 17:1 w9c	0.57	11.199	2599	ISO 17:1 w9c	1.11	8.808	24959
ANTEISO 17:1 w9c	0.58	11.386	2645	ANTEISO 17:1 w9c	1.60	8.896	228
17:0 ISO	2.13	11.566	9768	17:0 ISO	1.55	9.575	11872
17:0 ANTEISO	15.43	11.729	70909	17:0 ANTEISO	13.60	9.859	196772
17:1 w8c	0.78	11.852	3593	17:1 w8c	2.84	10.173	5428
17:0	1.50	12.209	6931	17:0	1.41	10.475	10962
16:1 2OH	1.46	12.278	6716	16:1 2OH	0.41	10.563	7554
16:0 ISO 3OH	0.08	12.467	390	17:0 10 methyl	1.53	11.205	54043
17:0 10 methyl	0.29	12.928	1321	18:0 ISO	0.82	11.390	3877
18:0 ISO	1.49	13.327	6903	18:1 w9c	1.14	11.571	28207
18:1 w9c	1.39	13.568	6453	18:0	0.39	11.733	26617
18:0	3.29	13.976	15231		----	11.857	88669
19:0	0.18	15.731	836		----	11.974	833
Summed Feature 3	0.34	----	1544	19:0	0.13	12.051	788
				Summed Feature 3	0.39	12.214	47780

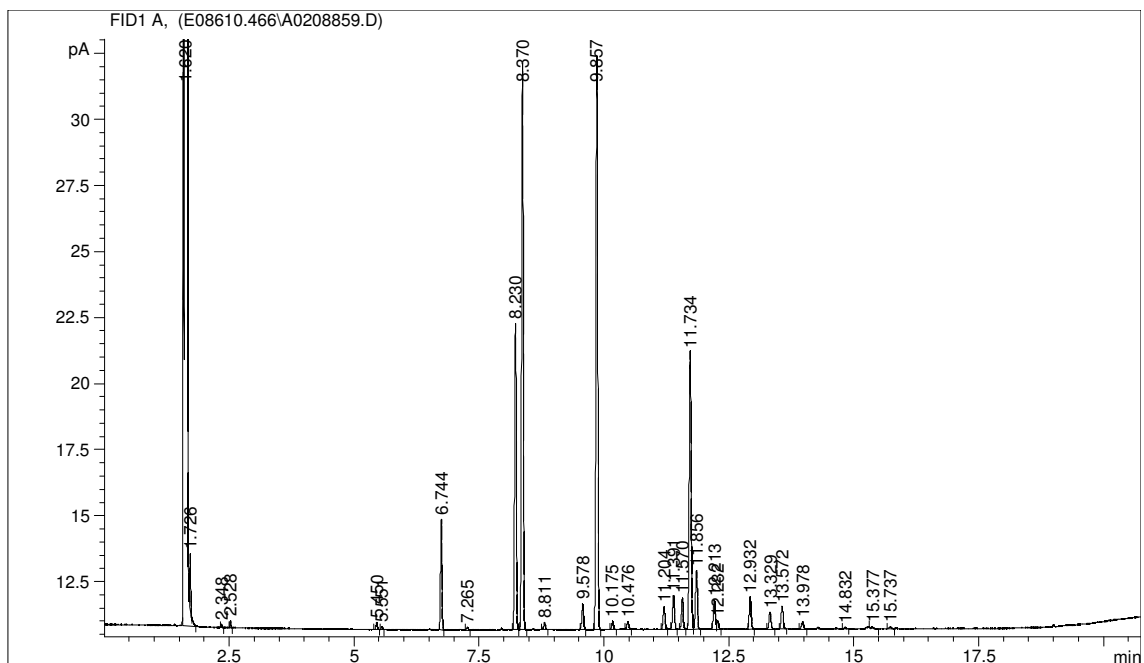
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa GUI 15.

M65



TSA





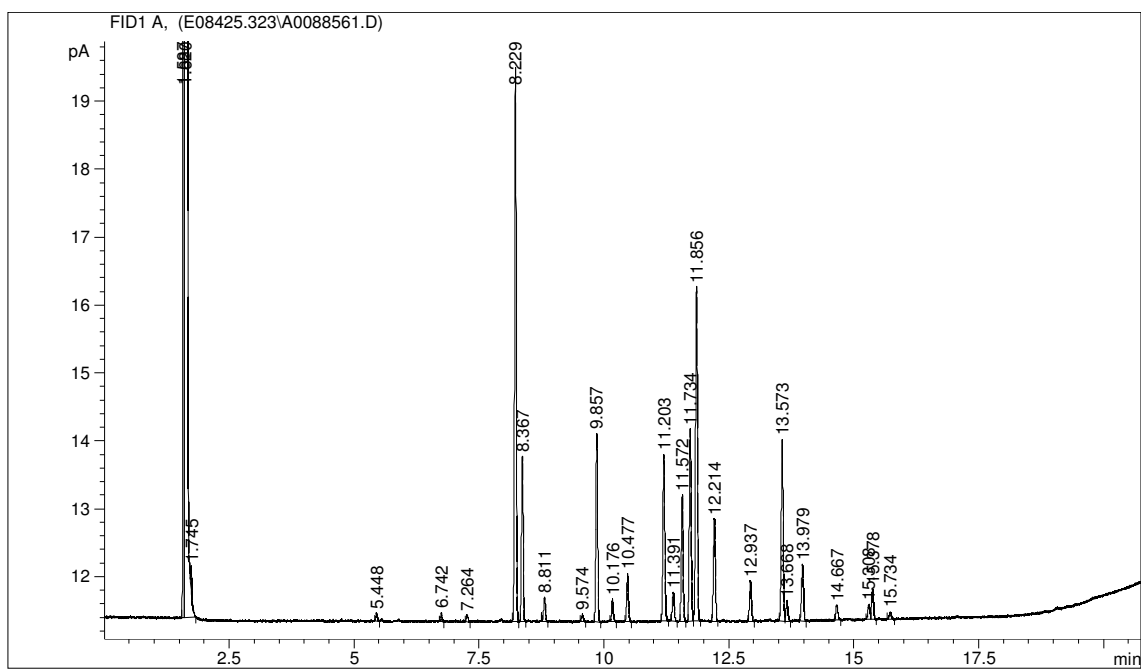
## GUI 16

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
	----	1.587	75993	SOLVENT PEAK	----	1.618	3.607E+8
SOLVENT PEAK	----	1.620	3.479E+8		----	1.743	3865
	----	1.745	923		----	2.346	175
13:0 ISO	0.30	5.448	461		----	2.480	226
14:0 ISO	0.34	6.742	551		----	2.526	1993
14:0	0.28	7.264	450	11:0 ISO	0.02	3.546	193
15:0 ISO	22.54	8.229	37335		----	5.198	341
15:0 ANTEISO	6.80	8.367	11297	13:0 ISO	0.26	5.450	2275
15:0	1.00	8.811	1666	13:0 ANTEISO	0.06	5.551	545
16:1 ISO H	0.35	9.574	588	13:0	0.04	5.895	355
16:0 ISO	8.00	9.857	13609	14:0 ISO	0.16	6.743	1436
Sum In Feature 3	1.00	10.176	1707	14:0	0.12	7.267	1092
16:0	2.09	10.477	3582	15:1 ISO G	0.37	7.947	3471
ISO 17:1 w9c	7.45	11.203	12887	15:0 ISO	33.42	8.233	317721
ANTEISO 17:1 w9c	1.27	11.391	2196	15:0 ANTEISO	4.51	8.369	42969
17:0 ISO	5.46	11.572	9483	15:0	0.64	8.812	6113
17:0 ANTEISO	8.53	11.734	14846		----	8.901	346
17:1 w8c	14.70	11.856	25616		----	9.513	1164
17:0	4.64	12.214	8122	16:1 ISO H	0.12	9.575	1189
17:0 10 methyl	1.79	12.937	3155	16:0 ISO	3.63	9.858	35469
18:1 w9c	8.20	13.573	14509	Sum In Feature 3	0.27	10.174	2628
18:1 w7c	0.95	13.668	1685	16:0	1.21	10.479	11953
18:0	2.59	13.979	4596	ISO 17:1 w9c	10.16	11.206	100948
TBSA 10Me18:0	0.72	14.667	1283	Sum In Feature 4	0.10	11.317	984
Sum In Feature 6	0.65	15.308	1161	ANTEISO 17:1 w9c	0.76	11.393	7563
	----	15.378	2533	17:0 ISO	14.53	11.576	144904
19:0	0.34	15.734	608	17:0 ANTEISO	8.23	11.736	82193
Summed Feature 3	1.00	----	1707	17:1 w8c	5.56	11.859	55650
Summed Feature 6	0.65	----	1161		----	12.113	500
				17:0	6.15	12.216	61726
					----	12.283	2558
					----	12.401	1681
					----	12.601	1581
				17:0 10 methyl	3.58	12.940	36202
				18:0 ISO	18:0 ISO	0.15	13.330
				18:1 w9c	2.11	13.576	21441
				18:1 w7c	0.13	13.668	1312
				18:0	2.13	13.978	21647
				TBSA 10Me18:0	0.81	14.667	8317
				19:0 ISO	0.11	15.096	1080
				Sum In Feature 6	0.32	15.309	3263
					----	15.380	2512
				19:0	0.35	15.737	3627
				Summed Feature 3	0.27	----	2628
				Summed Feature 4	0.10	----	984
				Summed Feature 6	0.32	----	3263

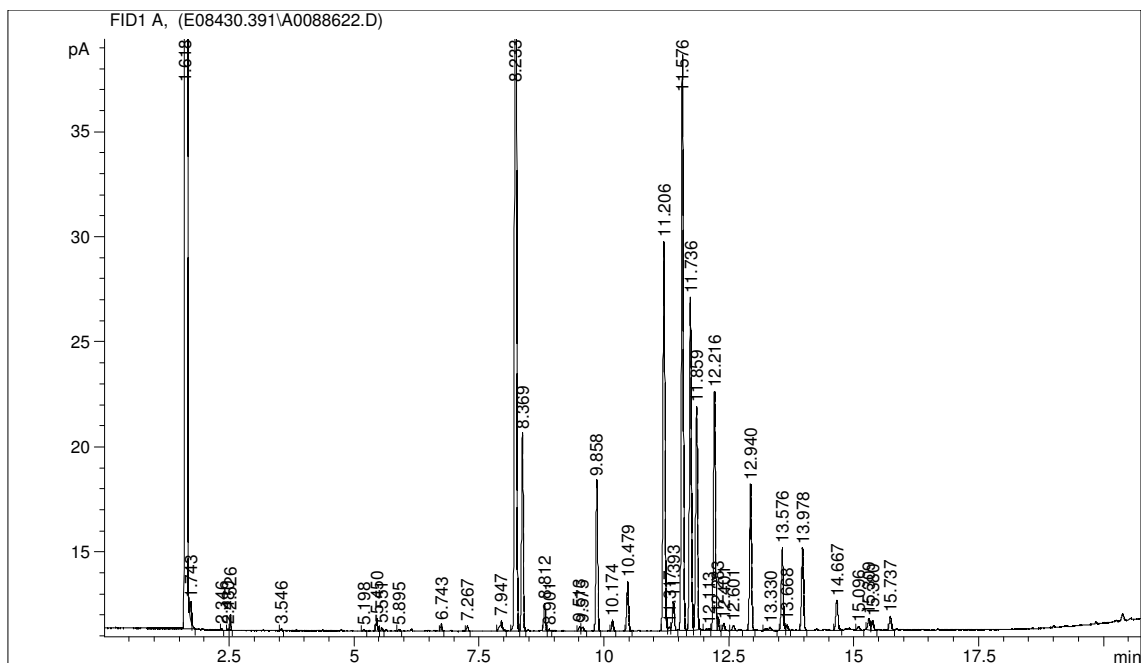
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa GUI 16.

M65



TSA



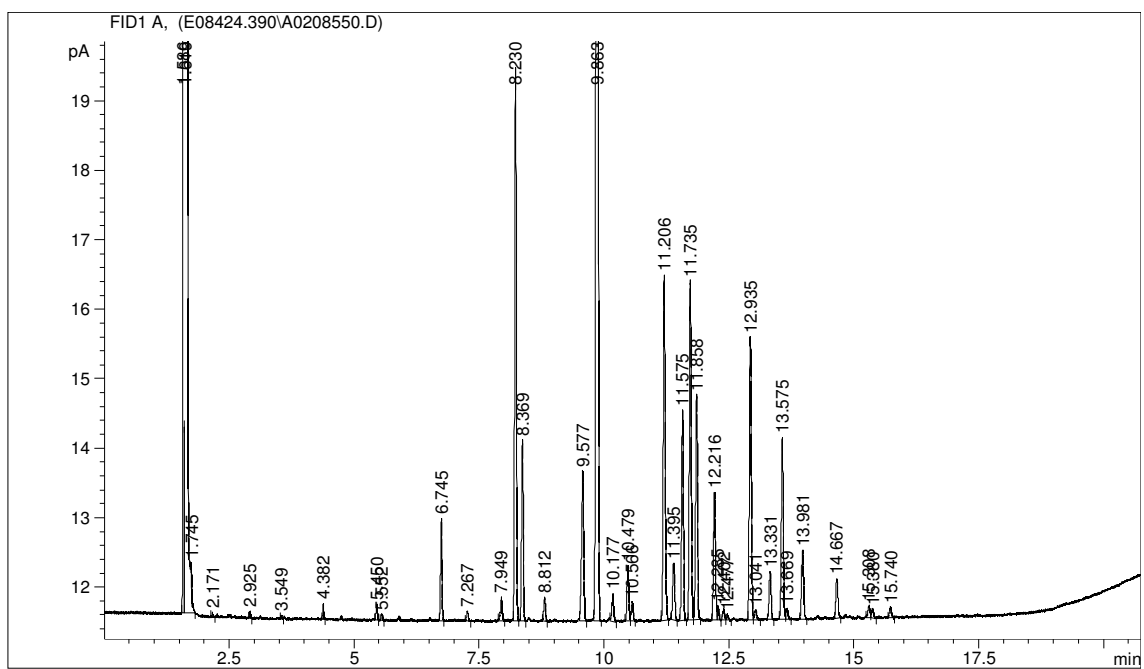
## GUI 19

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
	----	1.586	51691	SOLVENT PEAK	----	1.622	3.461E+8
SOLVENT PEAK	----	1.619	3.452E+8		----	1.728	-----
	----	1.745	745		----	2.531	527
	----	2.171	118	13:0 ISO	0.18	5.455	965
10:0 ISO	0.07	2.925	257	13:0 ANTEISO	0.05	5.558	257
11:0 ISO	0.04	3.549	150	14:0 ISO	0.79	6.749	4395
12:0 ISO	0.20	4.382	735	14:0	0.07	7.272	407
13:0 ISO	0.21	5.450	823	15:1 ISO G	0.40	7.954	2290
13:0 ANTEISO	0.09	5.552	333	15:0 ISO	25.25	8.237	144964
14:0 ISO	1.52	6.745	6117	15:0 ANTEISO	5.27	8.374	30362
14:0	0.15	7.267	606	15:0	0.79	8.816	4568
15:1 ISO G	0.43	7.949	1767		----	8.909	475
15:0 ISO	8.85	8.230	36664	16:1 ISO H	1.53	9.582	8964
15:0 ANTEISO	2.87	8.369	11930	16:0 ISO	24.18	9.864	142754
15:0	0.36	8.812	1509	Sum In Feature 3	0.30	10.179	1751
16:1 ISO H	3.07	9.577	13014	16:0	0.64	10.482	3818
16:0 ISO	45.57	9.863	193726		----	10.570	2552
Sum In Feature 3	0.50	10.177	2154	ISO 17:1 w9c	6.18	11.210	37143
16:0	0.94	10.479	4028	ANTEISO 17:1 w9c	0.82	11.399	4954
	----	10.566	1427	17:0 ISO	5.99	11.577	36167
ISO 17:1 w9c	6.07	11.206	26273	17:0 ANTEISO	6.82	11.739	41243
ANTEISO 17:1 w9c	1.07	11.395	4632	17:1 w8c	5.06	11.861	30674
17:0 ISO	3.72	11.575	16164		----	12.112	1055
17:0 ANTEISO	5.85	11.735	25464	17:0	5.64	12.220	34281
17:1 w8c	3.87	11.858	16890	16:1 2OH	0.73	12.288	4439
17:0	2.24	12.216	9805		----	12.404	2169
16:1 2OH	0.21	12.285	914		----	12.603	2784
	----	12.402	829	17:0 10 methyl	5.49	12.942	33653
16:0 ISO 3OH	0.10	12.477	435	18:1 ISO H	0.09	13.042	530
17:0 10 methyl	5.13	12.935	22586	18:0 ISO	0.41	13.334	2546
18:1 ISO H	0.19	13.041	822	18:1 w9c	1.20	13.577	7402
18:0 ISO	0.83	13.331	3659	18:1 w7c	0.10	13.673	603
18:1 w9c	3.24	13.575	14350	18:0	0.71	13.982	4394
18:1 w7c	0.19	13.669	831	TBSA 10Me18:0	0.72	14.670	4468
18:0	1.27	13.981	5.658	Sum In Feature 6	0.37	15.311	2319
TBSA 10Me18:0	0.74	14.667	3289		----	15.379	1104
Sum In Feature 6	0.22	15.308	987	19:0	0.22	15.739	1386
	----	15.380	755	Summed Feature 3	0.30	----	1751
19:0	0.19	15.740	848	Summed Feature 6	0.37	----	2319
Summed Feature 3	0.50	----	2154				
Summed Feature 6	0.22	----	987				

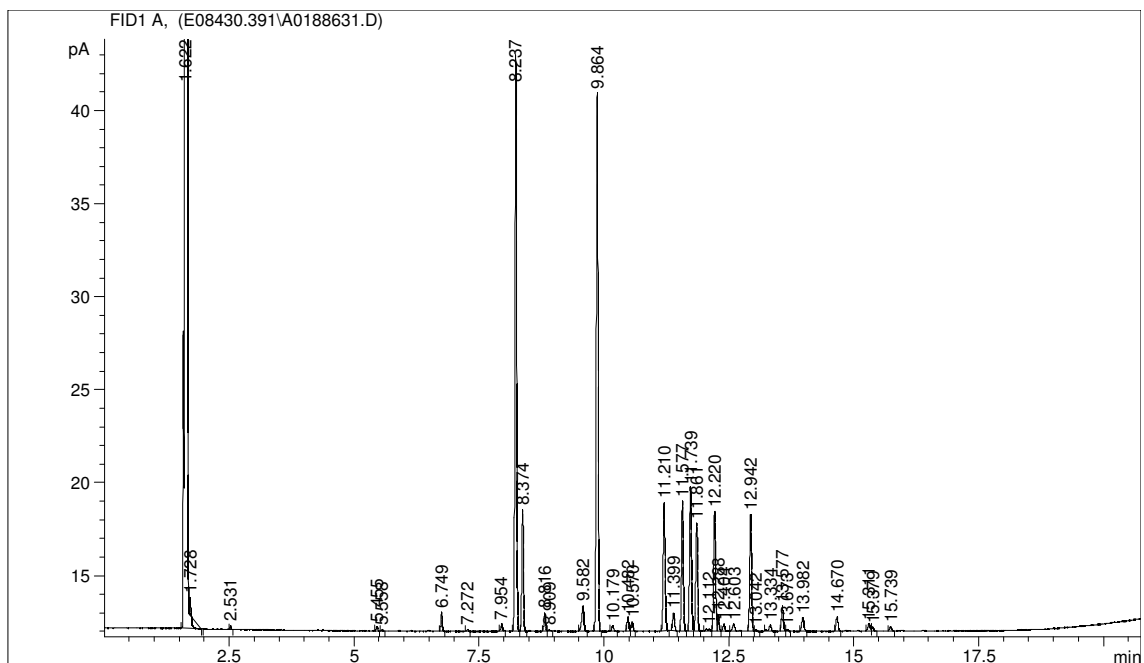
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa GUI 19.

M65



TSA



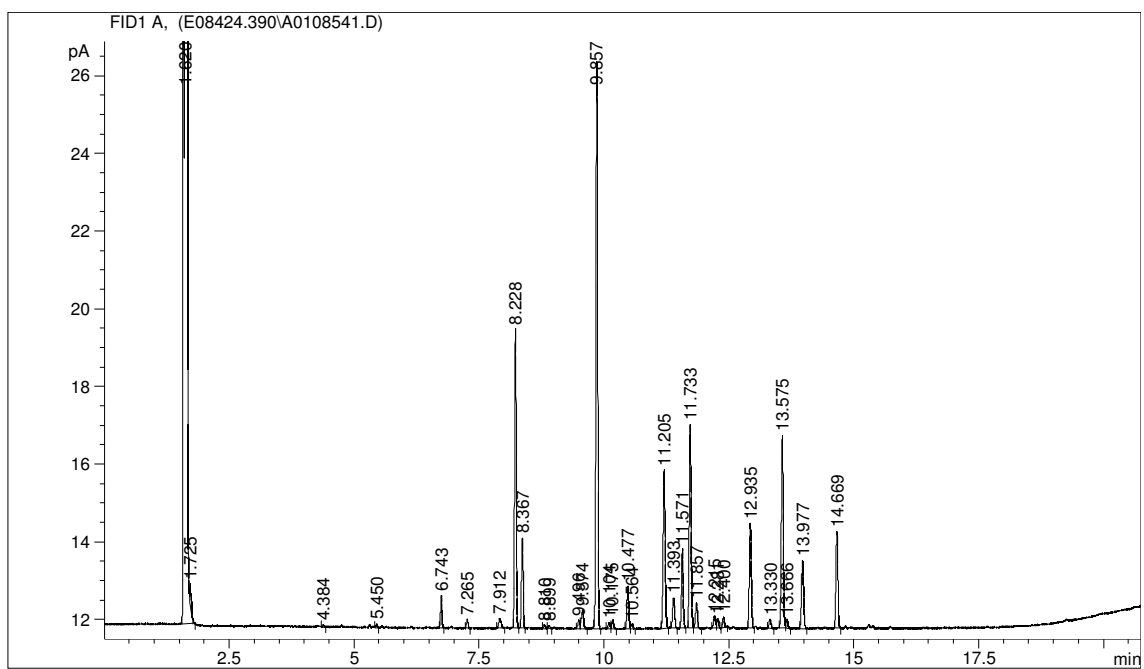
## GUI 23

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.620	3.456E+8	SOLVENT PEAK	----	1.619	3.577E+8
	----	1.725	2277		----	1.725	7115
12:0 ISO	0.11	4.384	266		----	2.347	194
13:0 ISO	0.16	5.450	396		----	2.527	3053
14:0 ISO	1.34	6.743	3435		----	3.183	219
14:0	0.38	7.265	994	unknown 12.484	0.04	5.306	354
15:1 ISO F	0.61	7.912	1601	13:0 ISO	0.09	5.450	915
15:0 ISO	13.27	8.228	35086	12:0 2OH	0.03	6.147	344
15:0 ANTEISO	4.00	8.367	10597	14:0 ISO	0.15	6.743	1516
15:0	0.15	8.810	395	14:0	0.14	7.265	1465
	----	8.899	297	15:1 ISO F	0.21	7.913	2234
	----	9.496	1086	15:1 ISO G	0.25	7.945	2679
16:1 ISO H	1.14	9.574	3068	15:0 ISO	29.70	8.235	316443
16:0 ISO	26.35	9.857	71497	15:0 ANTEISO	3.43	8.370	36646
16:1 w9c	0.31	10.104	842	15:0	0.18	8.811	1922
Sum In Feature 3	0.46	10.175	1248		----	8.904	443
16:0	2.06	10.477	5645	16:1 ISO G	0.50	9.554	5448
	----	10.564	616	16:0 ISO	5.39	9.859	59048
ISO 17:1 w9c	8.20	11.205	22645	16:1 w9c	0.07	10.104	771
ANTEISO 17:1 w9c	1.58	11.393	4363	Sum In Feature 3	0.53	10.176	5841
17:0 ISO	3.88	11.571	10753	16:0	1.69	10.479	18715
17:0 ANTEISO	9.77	11.733	27156		----	10.565	499
17:1 w8c	1.24	11.857	3451	ISO 17:1 w9c	14.48	11.210	161507
17:0	0.58	12.215	1617	ANTEISO 17:1 w9c	1.21	11.396	13525
16:1 2OH	0.44	12.281	1239	17:0 ISO	11.91	11.577	133397
	----	12.400	1473	17:0 ANTEISO	7.73	11.737	86799
17:0 10 methyl	5.19	12.935	14597	17:1 w8c	3.12	11.859	35061
18:0 ISO	0.45	13.330	1257		----	12.051	1161
18:1 w9c	9.53	13.575	26970	17:0	2.07	12.218	23411
18:1 w7c	0.45	13.666	1285	16:1 2OH	0.37	12.284	4184
18:0	3.54	13.977	10054		----	12.403	2360
TBSA 10Me18:0	4.82	14.669	13754		----	12.599	2321
Summed Feature 3	0.46	----	1248	17:0 10 methyl	1.66	12.940	18923
				18:0 ISO	0.08	13.331	939
				18:0 ISO	18:1 w9c	6.85	13.576
				18:1 w7c	0.55	13.669	6249
				18:0	3.57	13.981	40968
				TBSA 10Me18:0	3.36	14.672	38758
					----	14.837	379
				19:0 ISO	0.09	15.092	1042
				Sum In Feature 6	0.34	15.309	3923
					----	15.381	3512
				19:0	0.20	15.737	2280
				Summed Feature 3	0.53	----	5841
				Summed Feature 6	0.34	----	3923

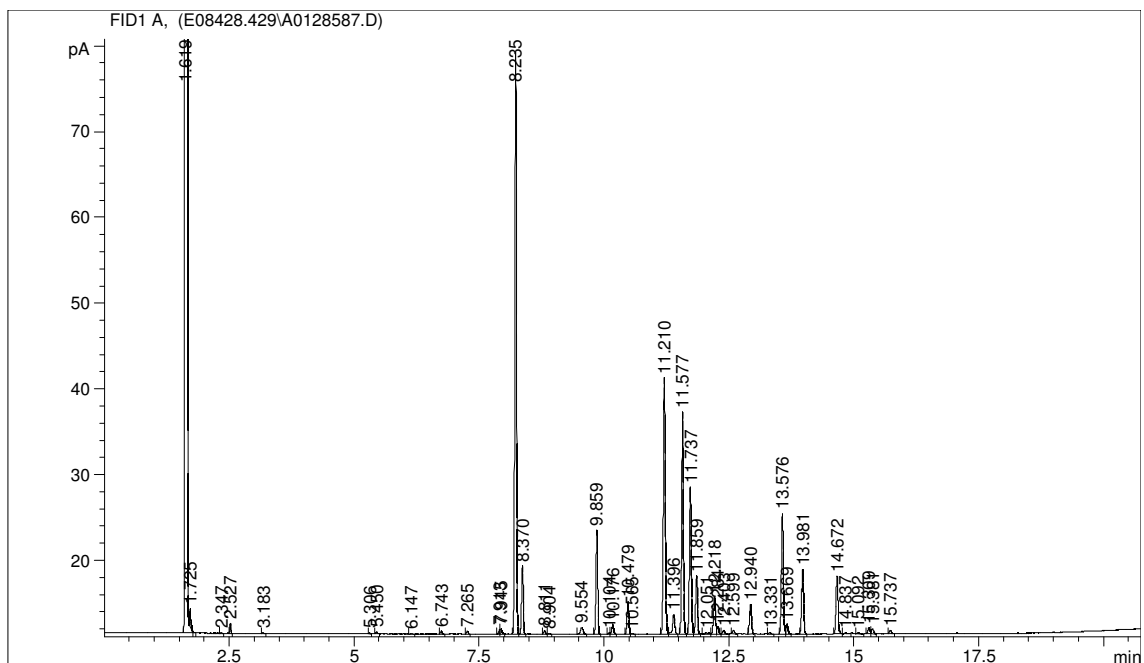
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa GUI 23.

M65



TSA



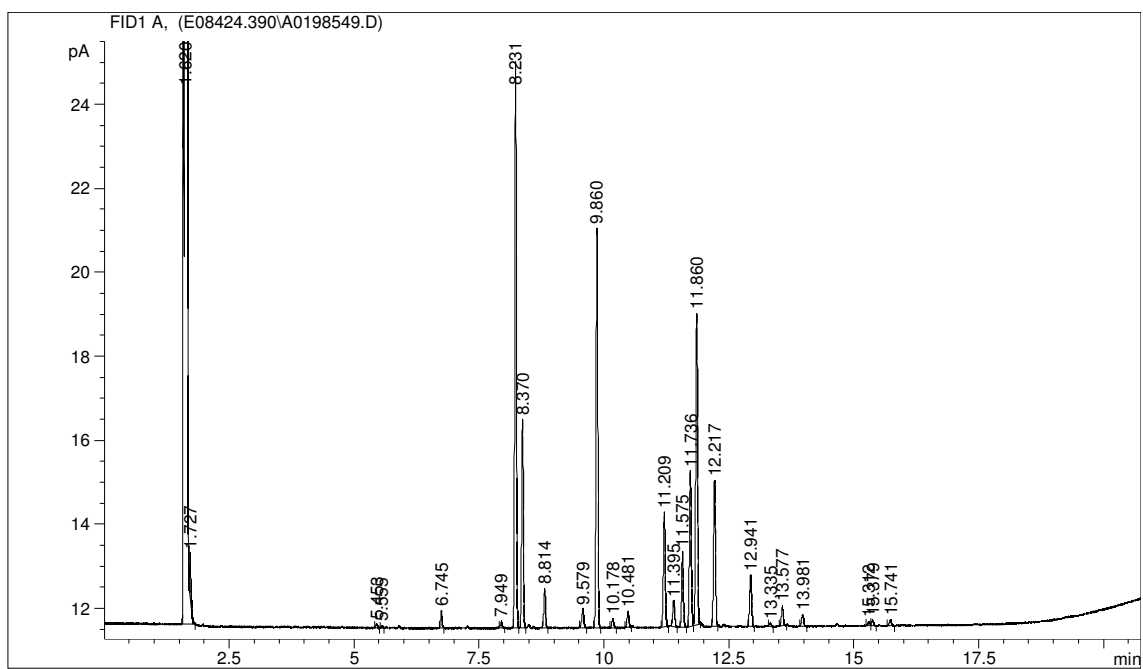
## GUI 27

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.620	3.459E+8	SOLVENT PEAK	----	1.619	3.428E+8
	----	1.727	3784		----	1.726	6963
13:0 ISO	0.17	5.453	401		----	2.347	135
13:0 ANTEISO	0.09	5.555	213		----	2.527	1513
14:0 ISO	0.71	6.745	1744	13:0 ISO	0.16	5.449	400
15:1 ISO G	0.30	7.949	741	14:0 ISO	0.37	6.744	982
15:0 ISO	24.52	8.231	61830	15:1 ISO G	0.46	7.947	1250
15:0 ANTEISO	9.05	8.370	22863	15:0 ISO	27.58	8.229	75781
15:0	1.67	8.814	4246	15:0 ANTEISO	7.53	8.369	20760
16:1 ISO H	1.01	9.579	2613	15:0	0.93	8.810	2575
16:0 ISO	18.24	9.860	47187	16:1 ISO H	0.47	9.573	1330
Sum In Feature 3	0.43	10.178	1117	16:0 ISO	12.38	9.857	34946
16:0	0.71	10.481	1855	16:0	0.70	10.478	1988
ISO 17:1 w9c	5.30	11.209	13964		----	10.567	577
ANTEISO 17:1 w9c	1.21	11.395	3200	ISO 17:1 w9c	5.25	11.204	15109
17:0 ISO	3.57	11.575	9431	ANTEISO 17:1 w9c	0.66	11.393	1898
17:0 ANTEISO	7.14	11.736	18913	17:0 ISO	8.86	11.573	25607
17:1 w8c	14.50	11.860	38465	17:0 ANTEISO	9.92	11.733	28728
17:0	6.80	12.217	18107	17:1 w8c	5.26	11.856	15255
17:0 10 methyl	2.48	12.941	6646		----	11.933	1004
18:0 ISO	0.15	13.335	396	17:0	12.39	12.215	36062
18:1 w9c	0.87	13.577	2344		----	12.400	1183
18:0	0.59	13.981	1594		----	12.597	1080
Sum In Feature 6	0.22	15.312	591	17:0 10 methyl	4.03	12.939	11825
	----	15.379	727	18:0 ISO	0.23	13.329	679
19:0	0.29	15.741	784	18:1 w9c	0.37	13.575	1084
Summed Feature 3	0.43	----	1117	18:0	1.15	13.978	3400
Summed Feature 6	0.22	----	591	TBSA 10Me18:0	0.23	14.666	692
				Sum In Feature 6	0.46	15.308	1370
				19:0	0.62	15.736	1848
				Summed Feature 6	0.46	----	1370

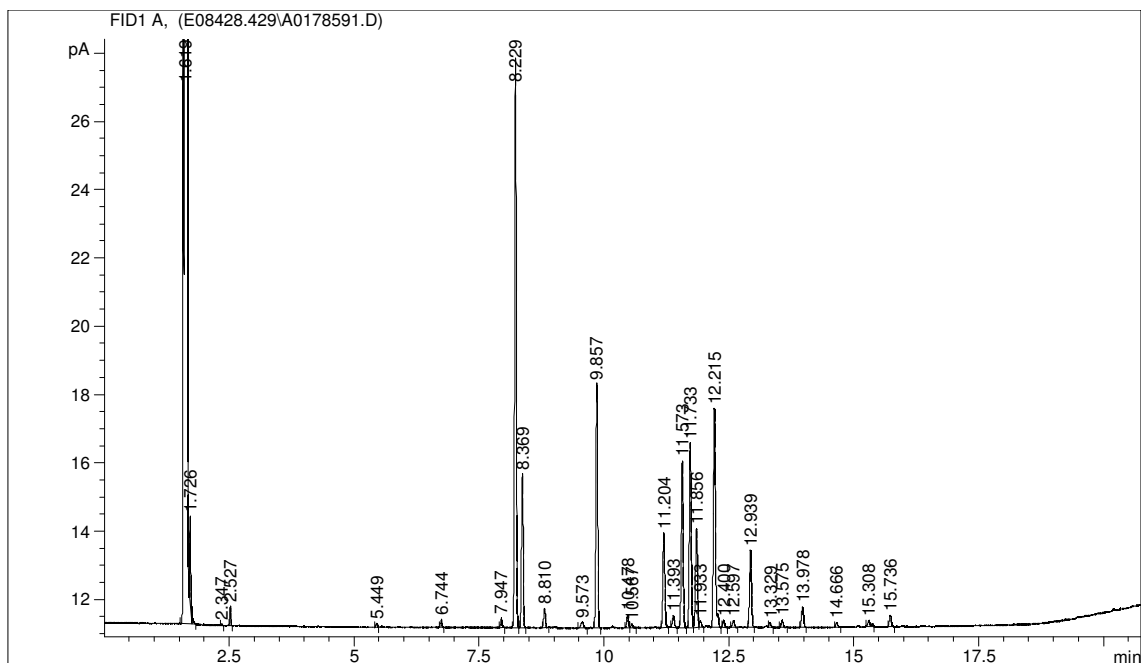
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa GUI 27.

M65



TSA





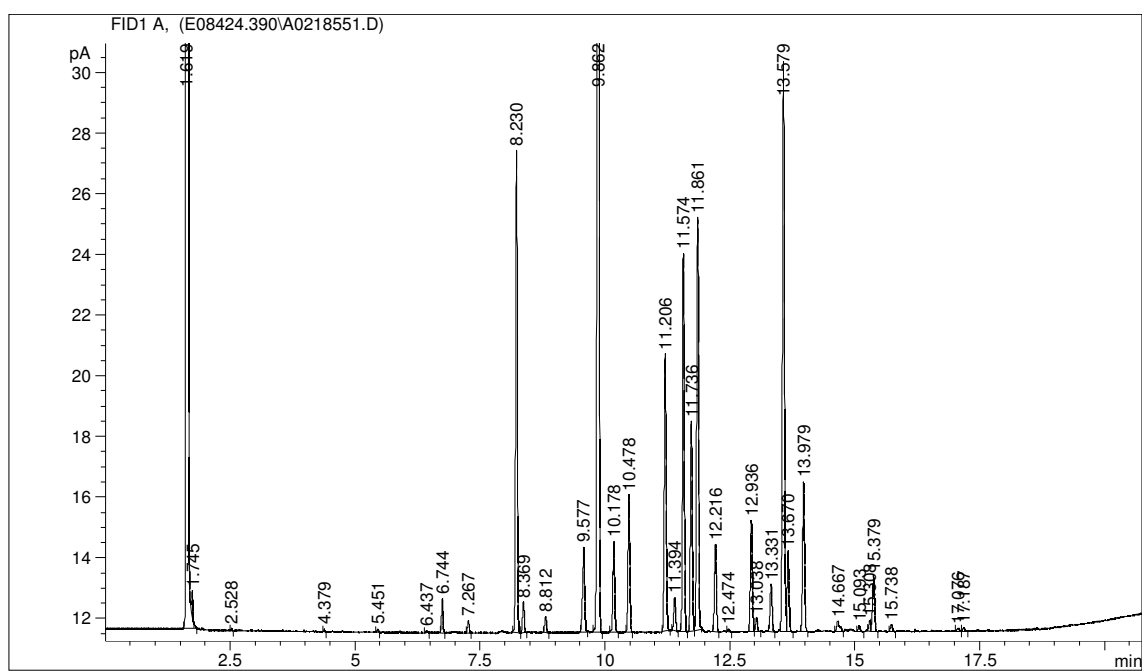
## GUI 28

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.619	3.578E+8	SOLVENT PEAK	----	1.618	3.434E+8
	----	1.745	2392		----	1.724	2408
	----	2.528	177		----	2.526	593
12:0 ISO	0.04	4.379	318	14:0 ISO	0.62	6.741	2109
13:0 ISO	0.05	5.451	396	15:0 ISO	7.64	8.226	26947
	----	6.437	259	15:0 ANTEISO	0.92	8.365	3264
14:0 ISO	0.63	6.744	4845	15:0	1.38	8.808	4907
14:0	0.23	7.267	1771	16:1 ISO H	1.34	9.573	4832
15:0 ISO	9.32	8.230	74419	16:0 ISO	32.72	9.857	118586
15:0 ANTEISO	0.57	8.369	4591	Sum In Feature 3	0.46	10.172	1662
15:0	0.31	8.812	2536	16:0	0.98	10.474	3601
16:1 ISO H	1.96	9.577	16000	ISO 17:1 w9c	2.67	11.202	9850
16:0 ISO	31.59	9.862	258783	ANTEISO 17:1 w9c	0.46	11.390	1702
Sum In Feature 3	1.92	10.178	15775	17:0 ISO	4.71	11.571	17454
16:0	2.71	10.478	22363	17:0 ANTEISO	4.58	11.733	17008
ISO 17:1 w9c	5.83	11.206	48616	17:1 w8c	26.21	11.856	97347
ANTEISO 17:1 w9c	0.65	11.394	5428	17:0	6.13	12.213	22869
17:0 ISO	7.92	11.574	66325	17:0 10 methyl	1.99	12.932	7461
17:0 ANTEISO	4.24	11.736	35534	18:1 ISO H	0.32	13.039	1191
17:1 w8c	8.58	11.861	72066	18:0 ISO	0.91	13.328	3416
17:0	1.81	12.216	15290	18:1 w9c	3.33	13.573	12569
16:0 ISO 3OH	0.05	12.474	444	18:1 w7c	0.59	13.666	2230
17:0 10 methyl	2.42	12.936	20507	18:0	1.45	13.977	5495
18:1 ISO H	0.27	13.038	2331	Sum In Feature 6	0.31	15.309	1190
18:0 ISO	1.00	13.331	8529		----	15.379	13394
18:1 w9c	12.24	13.579	104484	19:0	0.27	15.737	1033
18:1 w7c	1.65	13.670	14077	Summed Feature 3	0.46	----	1662
18:0	3.06	13.979	26212	Summed Feature 6	0.31	----	1190
TBSA 10Me18:0	0.31	14.667	2694				
19:0 ISO	0.12	15.093	1013				
Sum In Feature 6	0.22	15.308	1861				
	----	15.379	10719				
19:0	0.16	15.738	1354				
20:1 w9c	0.07	17.076	610				
20:1 w7c	0.07	17.187	651				
Summed Feature 3	1.92	----	15775				
Summed Feature 6	0.22	----	1861				

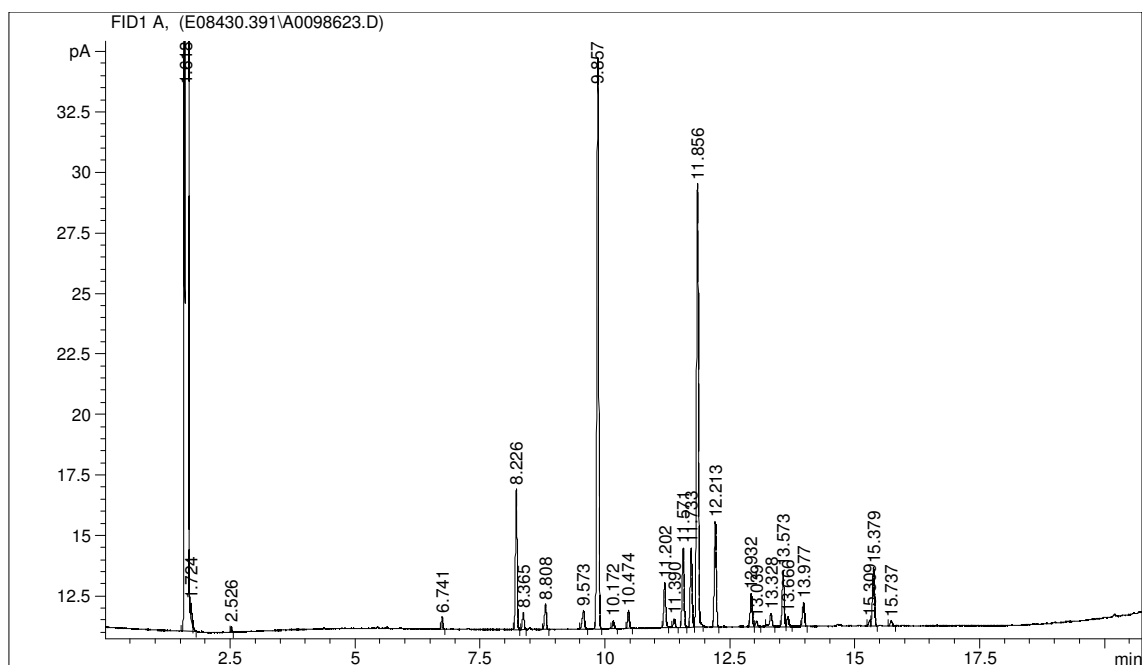
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa GUI 28.

M65



TSA



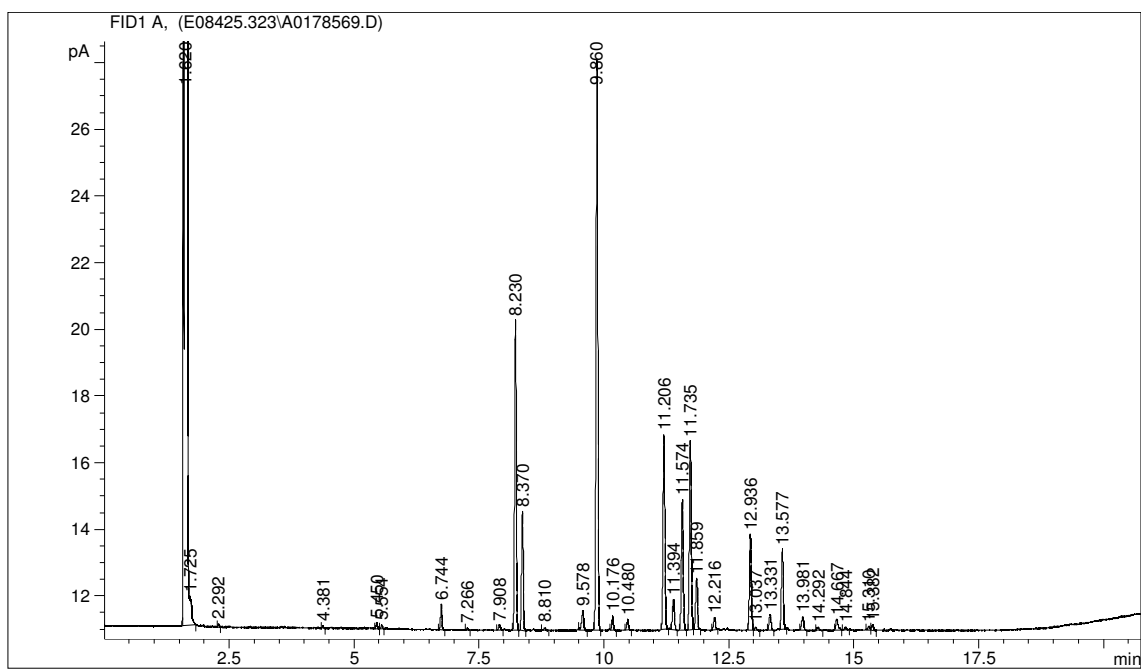
## GUI 34

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.620	3.471E+8	SOLVENT PEAK	----	1.619	3.438E+8
	----	1.725	174		----	1.725	5125
	----	2.292	261		----	1.957	843
12:0 ISO	0.10	4.381	253		----	2.348	195
13:0 ISO	0.27	5.450	710		----	2.526	2334
13:0 ANTEISO	0.17	5.554	463	13:0 ISO	0.34	5.447	936
14:0 ISO	1.19	6.744	3256	13:0 ANTEISO	0.14	5.549	386
14:0	0.11	7.266	311	14:0 ISO	0.29	6.741	829
15:1 ISO F	0.30	7.908	838	15:1 ISO F	0.43	7.907	1284
15:0 ISO	15.24	8.230	42893	15:0 ISO	20.27	8.228	60554
15:0 ANTEISO	5.81	8.370	16397	15:0 ANTEISO	4.35	8.367	13026
15:0	0.14	8.810	392		----	8.901	512
16:1 ISO H	1.31	9.578	3764	16:1 ISO H	0.46	9.577	1394
16:0 ISO	29.31	9.860	84677	16:0 ISO	10.15	9.856	31163
Sum In Feature 3	0.75	10.176	2183	Sum In Feature 3	0.11	10.174	340
16:0	0.52	10.480	1514	16:0	0.25	10.476	770
ISO 17:1 w9c	10.49	11.206	30821		----	10.561	470
ANTEISO 17:1 w9c	1.66	11.394	4881	ISO 17:1 w9c	16.35	11.204	51133
17:0 ISO	6.98	11.574	20590	Sum In Feature 4	0.21	11.306	651
17:0 ANTEISO	10.05	11.735	29708	ANTEISO 17:1 w9c	1.59	11.393	4985
17:1 w8c	2.70	11.859	8006	17:0 ISO	13.81	11.574	43364
17:0	0.68	12.216	2006	17:0 ANTEISO	15.85	11.732	49870
17:0 10 methyl	5.15	12.936	15402	17:1 w8c	2.66	11.857	8370
18:1 ISO H	0.21	13.037	632	17:1 w5c	0.26	12.056	830
18:0 ISO	0.84	13.331	2505	17:0	0.99	12.216	3116
18:1 w9c	4.24	13.577	12724	16:1 2OH	1.65	12.283	5228
18:0	0.78	13.981	2335		----	12.400	1955
	----	14.292	609		----	12.600	1632
TBSA 10Me18:0	0.74	14.667	2231	17:0 10 methyl	4.41	12.936	14045
	----	14.844	439	18:1 ISO H	0.15	13.035	466
Sum In Feature 6	0.26	15.310	786	18:0 ISO	0.41	13.328	1306
	----	15.382	1055	18:1 w9c	1.71	13.574	5472
Summed Feature 3	0.75	----	2183	18:0	0.74	13.982	2390
Summed Feature 6	0.26	----	786	TBSA 10Me18:0	1.68	14.667	5412
				18:0 ISO		----	14.836
				Sum In Feature 6	0.59	15.309	1908
					----	15.379	2251
				19:0	0.18	15.743	584
				Summed Feature 3	0.11	----	340
				Summed Feature 4	0.21	----	651
				Summed Feature 6	0.59	----	1908

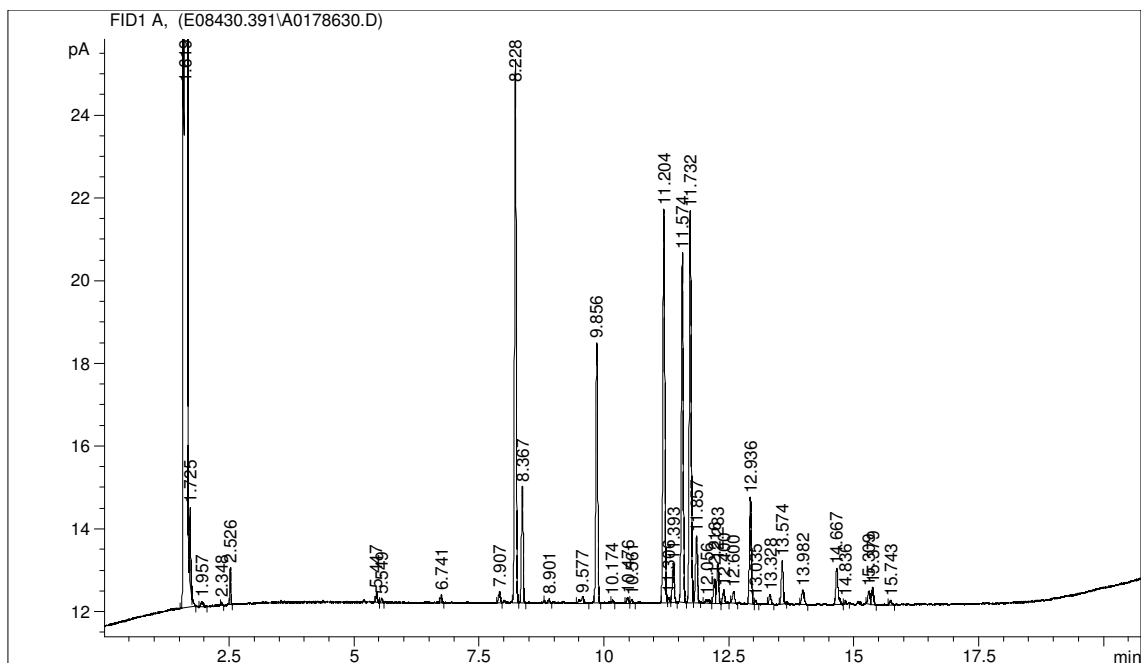
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa GUI 34.

M65



TSA



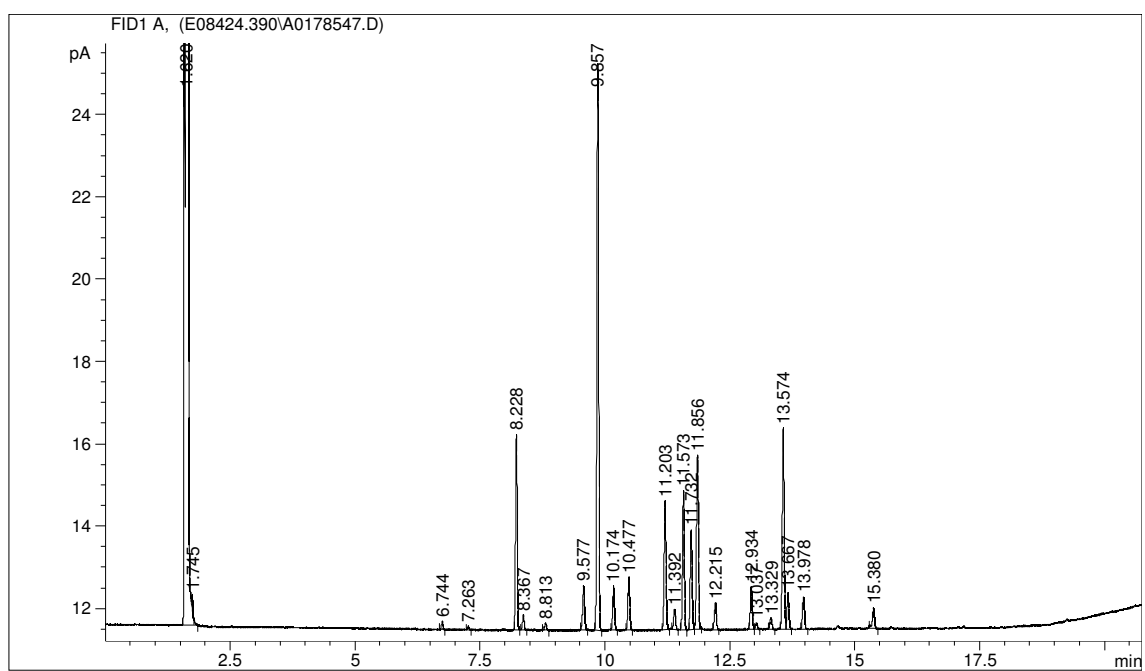
## GUI 37

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.620	3.473E+8	SOLVENT PEAK	----	1.618	3.429E+8
	----	1.745	946		----	1.725	3981
14:0 ISO	0.39	6.744	840		----	2.526	768
14:0	0.17	7.263	377	13:0 ISO	0.06	5.448	314
15:0 ISO	10.03	8.228	22138		----	5.639	215
15:0 ANTEISO	0.70	8.367	1553	14:0 ISO	0.49	6.741	2490
15:0	0.36	8.813	812	14:0	0.05	7.260	277
16:1 ISO H	2.59	9.577	5838	15:0 ISO	12.37	8.227	64769
16:0 ISO	29.94	9.857	67802	15:0 ANTEISO	1.27	8.366	6655
Sum In Feature 3	2.39	10.174	5437	15:0	2.20	8.807	11668
16:0	2.86	10.477	6544	16:1 ISO H	1.47	9.573	7899
ISO 17:1 w9c	7.05	11.203	16244	16:0 ISO	25.45	9.857	136948
ANTEISO 17:1 w9c	1.08	11.392	2499	Sum In Feature 3	0.69	10.173	3713
17:0 ISO	7.45	11.573	17245	16:0	0.99	10.476	5394
17:0 ANTEISO	5.51	11.732	12776	ISO 17:1 w9c	4.80	11.202	26324
17:1 w8c	9.79	11.856	22737	ANTEISO 17:1 w9c	0.87	11.391	4772
17:0	1.48	12.215	3457	17:0 ISO	5.93	11.572	32625
17:0 10 methyl	2.34	12.934	5488	17:0 ANTEISO	4.92	11.733	27115
18:1 ISO H	0.32	13.037	761	17:1 w8c	25.32	11.858	139858
18:0 ISO	0.62	13.329	1463	17:1 w6c	0.21	11.972	1161
18:1 w9c	11.10	13.574	26193	17:0	5.70	12.214	31623
18:1 w7c	2.00	13.667	4722	17:0 10 methyl	1.80	12.934	10043
18:0	1.82	13.978	4300	18:1 ISO H	0.37	13.037	2064
	----	15.380	3130	18:0 ISO	0.48	13.328	2687
Summed Feature 3	2.39	----	5437	18:1 w9c	3.18	13.573	17863
				17:0 ANTEISO	2.68	18:1 w7c	0.73
				17:1 w8c	8.91	18:0	0.53
					----	14.717	613
					----	15.380	20957
				19:0	0.11	15.736	610
				Summed Feature 3	0.69	----	3713

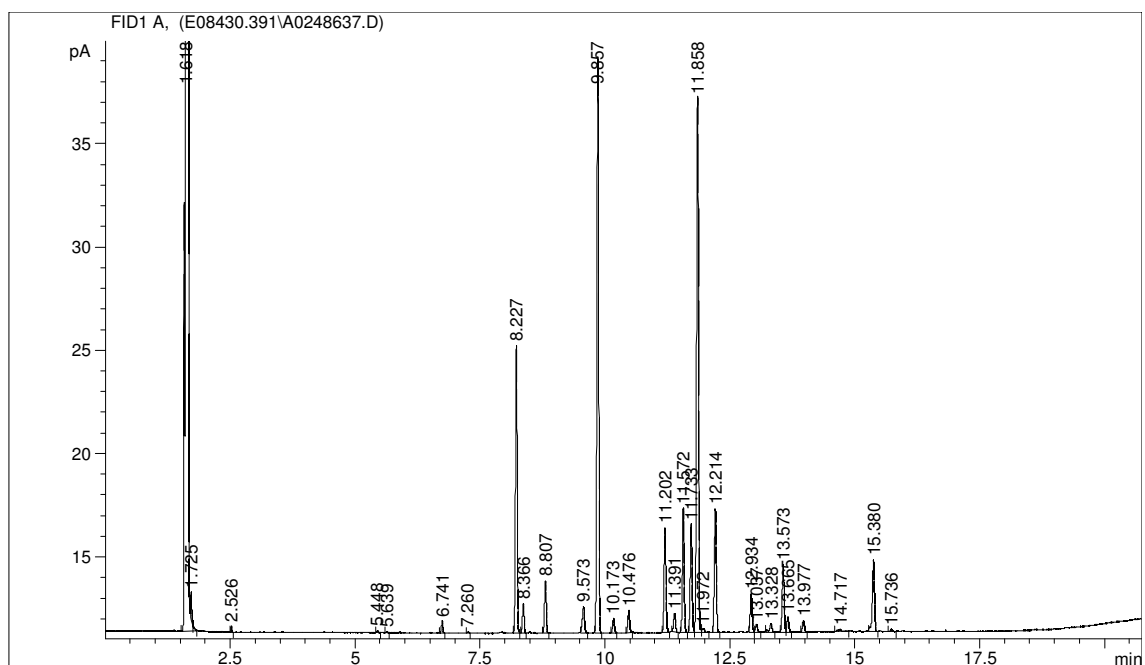
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa GUI 37.

M65



TSA



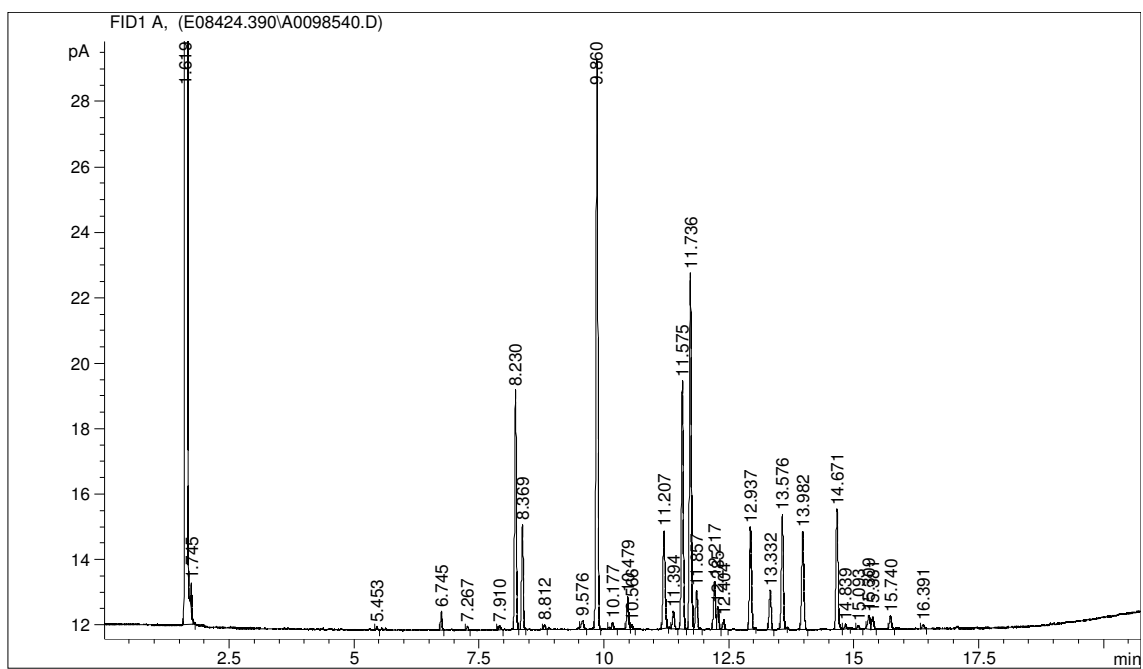
## GUI 40

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.619	3.582E+8		----	1.586	59774
	----	1.745	1978	SOLVENT PEAK	----	1.619	3.442E+8
13:0 ISO	0.09	5.453	290		----	1.726	4662
14:0 ISO	0.69	6.745	2355		----	1.939	864
14:0	0.14	7.267	472		----	2.348	243
15:1 ISO F	0.20	7.910	695		----	2.480	148
15:0 ISO	9.68	8.230	34280		----	2.528	1947
15:0 ANTEISO	4.13	8.369	14660	11:0 ISO	0.06	3.547	242
15:0	0.18	8.812	651	13:0 ISO	0.32	5.449	1435
16:1 ISO H	0.52	9.576	1891	13:0 ANTEISO	0.10	5.554	445
16:0 ISO	24.03	9.860	87347	14:0 ISO	0.25	6.744	1174
Sum In Feature 3	0.40	10.177	1451	15:1 ISO F	0.26	7.908	1215
16:0	1.38	10.479	5051	Sum In Feature 1	0.18	8.006	849
	----	10.566	625	15:0 ISO	28.24	8.232	134585
ISO 17:1 w9c	4.79	11.207	17737	15:0 ANTEISO	6.17	8.368	29460
ANTEISO 17:1 w9c	0.72	11.394	2653	15:0	0.12	8.810	593
17:0 ISO	10.66	11.575	39605		----	8.900	428
17:0 ANTEISO	14.92	11.736	55547	16:1 ISO H	0.40	9.577	1963
17:1 w8c	1.72	11.857	6423	16:0 ISO	9.36	9.858	45817
17:0	2.06	12.217	7703	Sum In Feature 3	0.19	10.177	959
16:1 2OH	0.95	12.285	3550	16:0	0.26	10.477	1270
	----	12.404	1540		----	10.561	592
17:0 10 methyl	4.48	12.937	16879	ISO 17:1 w9c	14.78	11.207	73709
18:0 ISO	1.75	13.332	6620	Sum In Feature 4	0.25	11.303	1241
18:1 w9c	5.00	13.576	18934	ANTEISO 17:1 w9c	1.45	11.394	7267
18:0	4.48	13.982	17034	17:0 ISO	11.38	11.575	57004
TBSA 10Me18:0	5.40	14.671	20633	17:0 ANTEISO	13.34	11.735	66977
	----	14.839	705	17:1 w8c	3.16	11.858	15887
19:0 ISO	0.14	15.093	552	17:1 w5c	0.25	12.056	1275
Sum In Feature 6	0.71	15.309	2727	17:0	1.10	12.216	5547
	----	15.381	2151	16:1 2OH	1.39	12.284	7024
19:0	0.58	15.740	2220		----	12.401	2605
19:0 10 methyl	0.21	16.391	816		----	12.600	2995
Summed Feature 3	0.40	----	1451	17:0 10 methyl	3.23	12.939	16440
Summed Feature 6	0.71	----	2727	18:1 ISO H	0.13	13.036	674
				18:0 ISO	0.22	13.331	1098
				18:1 w9c	1.30	13.576	6656
				18:0	0.53	13.984	2717
				TBSA 10Me18:0	0.94	14.669	4861
					----	14.840	481
				Sum In Feature 6	0.53	15.310	2731
					----	15.383	2049
				19:0	0.10	15.739	527
				Summed Feature 1	0.18	----	849
					----	----	-----
				Summed Feature 3	0.19	----	959
				Summed Feature 4	0.25	----	1241
				Summed Feature 6	0.53	----	2731

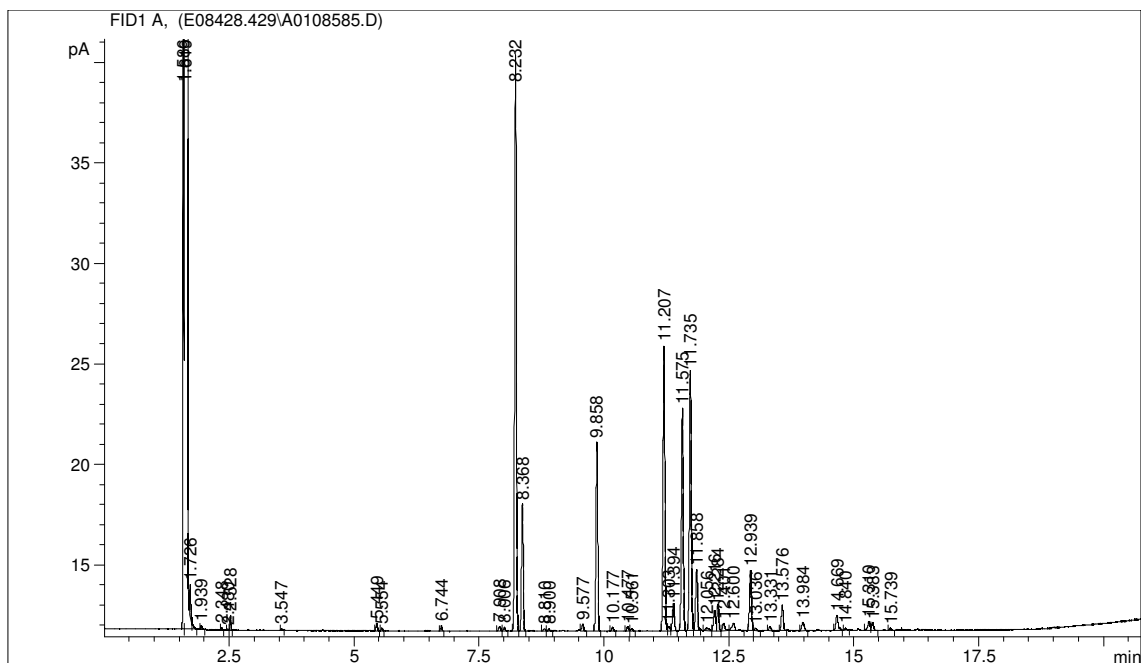
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa GUI 40.

M65



TSA

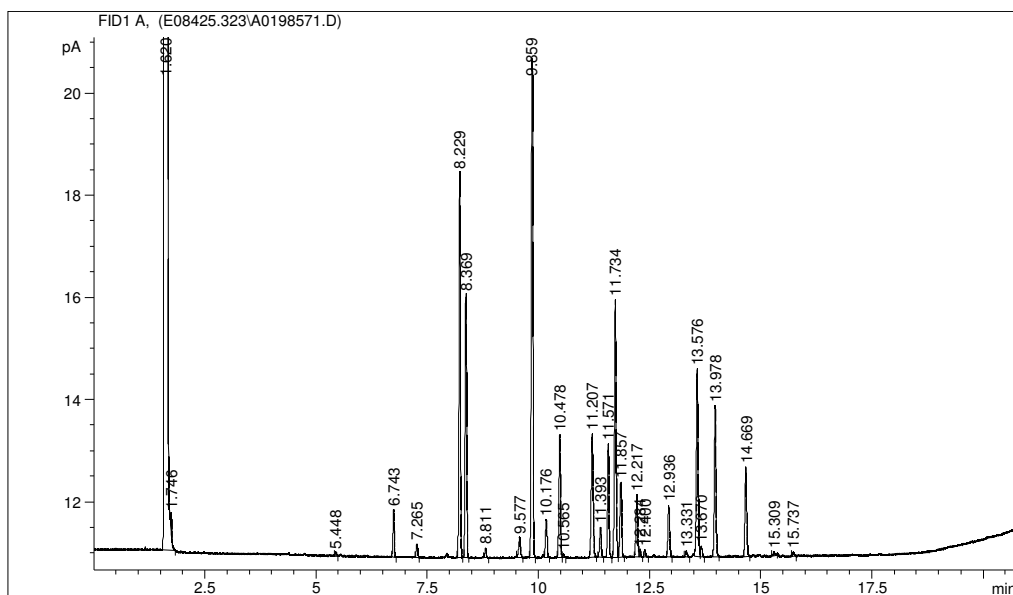




GUI 41

M65			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.620	3.476E+8
	----	1.746	976
13:0 ISO	0.11	5.448	265
14:0 ISO	1.62	6.743	3899
14:0	0.44	7.265	1073
15:0 ISO	13.83	8.229	34272
15:0 ANTEISO	9.61	8.369	23880
15:0	0.34	8.811	842
16:1 ISO H	0.90	9.577	2279
16:0 ISO	19.18	9.859	48788
Sum In Feature 3	1.48	10.176	3787
16:0	4.79	10.478	12282
	----	10.565	313
ISO 17:1 w9c	5.61	11.207	14520
ANTEISO 17:1 w9c	1.21	11.393	3145
17:0 ISO	4.54	11.571	11806
17:0 ANTEISO	10.29	11.734	26796
17:1 w8c	2.93	11.857	7626
17:0	2.53	12.217	6612
16:1 2OH	0.25	12.284	655
	----	12.400	680
17:0 10 methyl	2.03	12.936	5335
18:0 ISO	0.22	13.331	569
18:1 w9c	7.72	13.576	20432
18:1 w7c	0.42	13.670	1117
18:0	6.04	13.978	16027
TBSA 10Me18:0	3.58	14.669	9530
Sum In Feature 6	0.17	15.309	463
19:0	0.15	15.737	403
Summed Feature 3	1.48	----	3787
Summed Feature 6	0.17	----	463

TR: Tiempo de retención



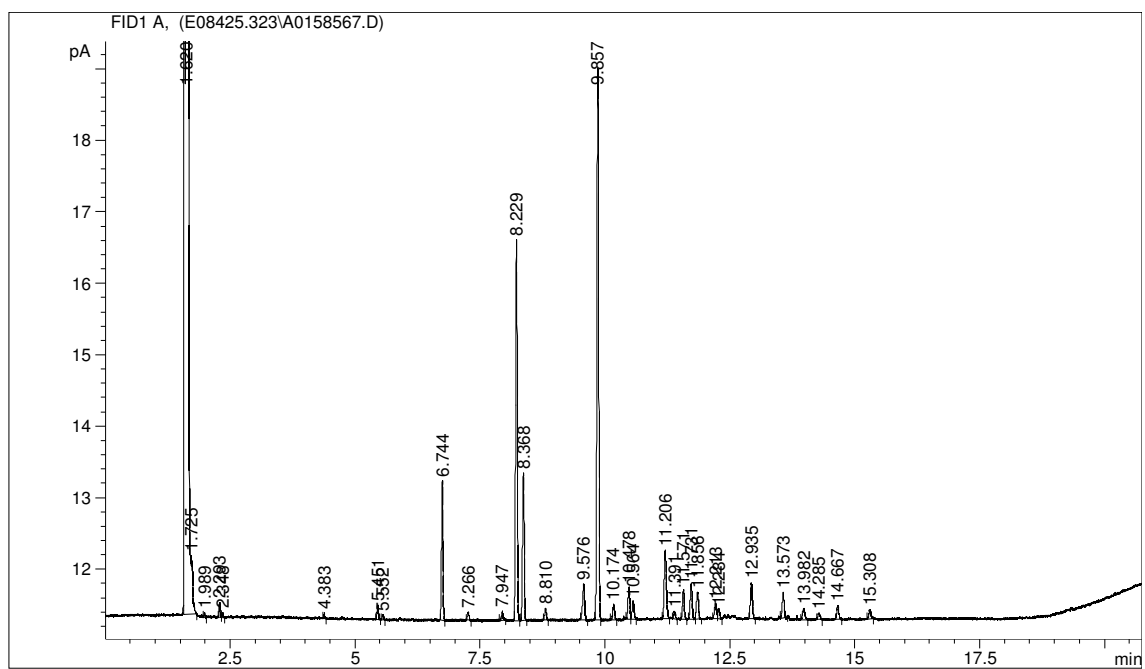
## GUI 42

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.620	3.456E+8	SOLVENT PEAK	----	1.619	3.439E+8
	----	1.725	171		----	1.724	1973
	----	1.989	157		----	2.528	219
	----	2.293	530	13:0 ISO	0.28	5.450	785
	----	2.348	172	14:0 ISO	2.94	6.745	8473
12:0 ISO	0.20	4.383	198	14:0	0.13	7.266	372
13:0 ISO	0.72	5.451	734	15:1 ISO G	0.19	7.946	569
13:0 ANTEISO	0.28	5.552	282	15:0 ISO	21.95	8.232	65220
14:0 ISO	7.78	6.744	8244	15:0 ANTEISO	5.98	8.370	17808
14:0	0.45	7.266	483	15:0	0.93	8.812	2785
15:1 ISO G	0.58	7.947	631	16:1 ISO H	1.85	9.578	5638
15:0 ISO	22.24	8.229	24297	16:0 ISO	28.57	9.859	87250
15:0 ANTEISO	8.63	8.368	9456	Sum In Feature 3	0.70	10.177	2157
15:0	0.66	8.810	734	16:0	1.49	10.479	4585
16:1 ISO H	2.62	9.576	2923		----	10.566	2535
16:0 ISO	33.95	9.857	38082	ISO 17:1 w9c	7.17	11.206	22308
Sum In Feature 3	0.99	10.174	1114	ANTEISO 17:1 w9c	0.56	11.394	1731
16:0	2.03	10.478	2291	17:0 ISO	3.64	11.573	11388
	----	10.564	1283	17:0 ANTEISO	3.49	11.735	10912
ISO 17:1 w9c	4.96	11.206	5656	17:1 w8c	6.48	11.859	20321
ANTEISO 17:1 w9c	0.38	11.391	435	17:0	3.10	12.216	9750
17:0 ISO	1.89	11.571	2161	16:1 2OH	0.53	12.285	1656
17:0 ANTEISO	2.24	11.731	2568		----	12.401	882
17:1 w8c	1.78	11.856	2051		----	12.602	661
17:0	0.97	12.213	1116	17:0 10 methyl	4.84	12.939	15326
	----	12.284	697	18:1 w9c	1.98	13.575	6303
17:0 10 methyl	2.33	12.935	2703	18:1 w7c	0.21	13.668	655
18:1 w9c	1.53	13.573	1790	18:0	1.14	13.979	3640
18:0	0.87	13.982	1019	TBSA 10Me18:0	1.59	14.672	5110
17:0 ISO 3OH	0.44	14.285	512	Sum In Feature 6	0.26	15.310	850
TBSA 10Me18:0	0.89	14.667	1046	Summed Feature 3	0.70	----	2157
Sum In Feature 6	0.60	15.308	707	Summed Feature 6	0.26	----	850
Summed Feature 3	0.99	----	1114				
Summed Feature 6	0.60	----	707				

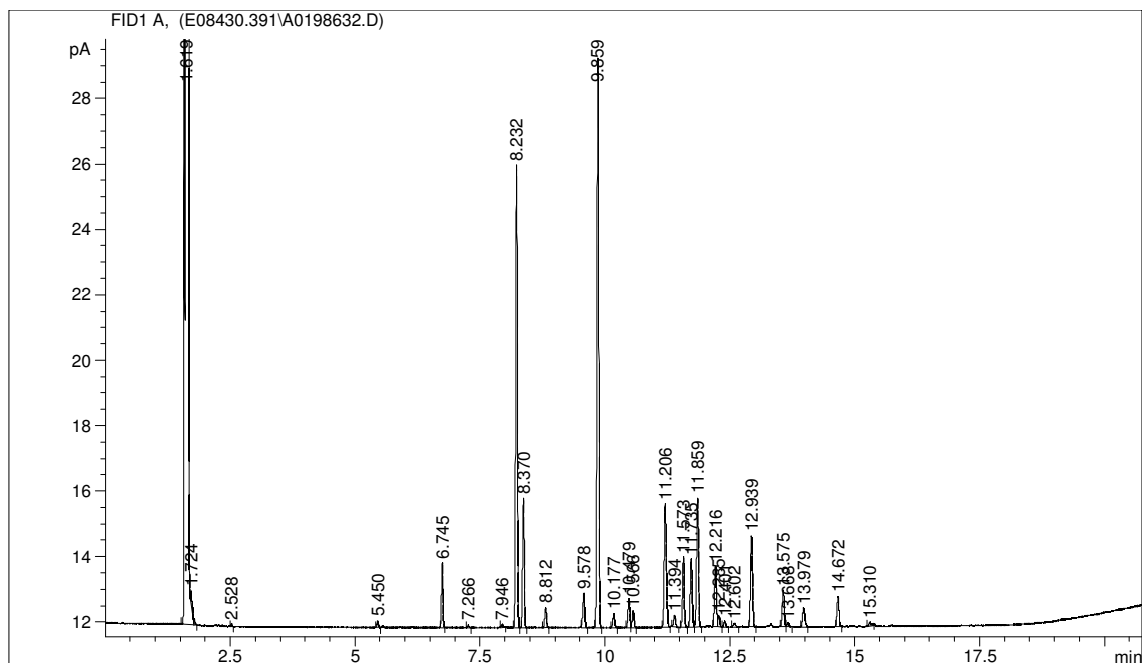
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa GUI 42.

M65



TSA



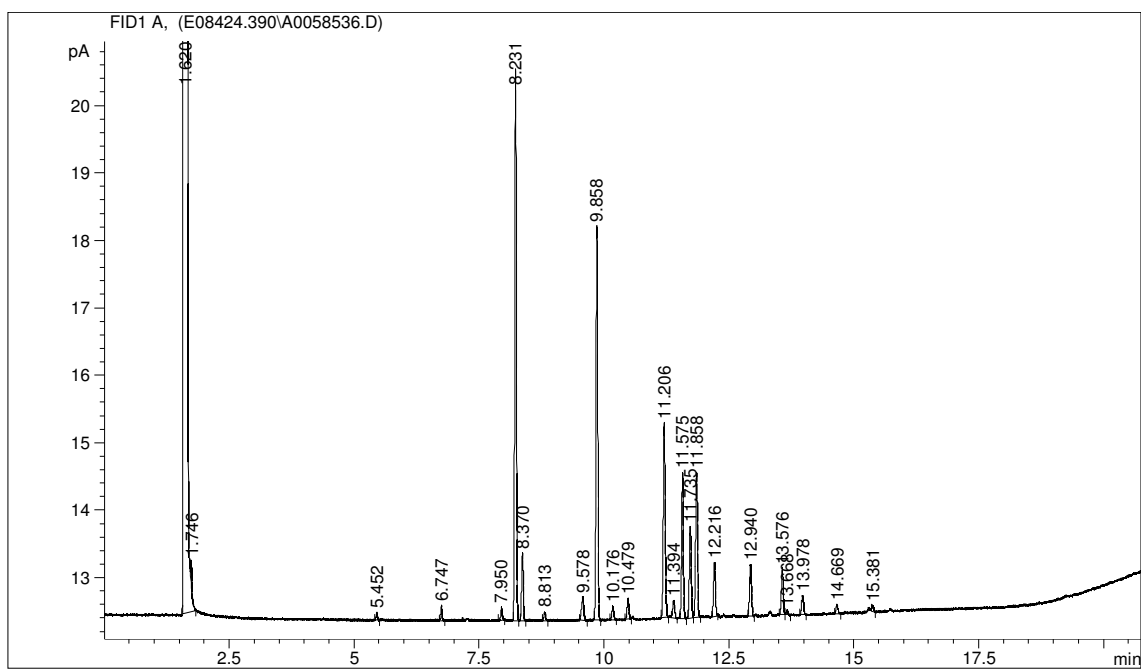
## GUI 43

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.620	3.466E+8	SOLVENT PEAK	----	1.619	3.453E+8
	----	1.746	930		----	1.726	3096
13:0 ISO	0.29	5.452	365		----	2.528	1007
14:0 ISO	0.75	6.747	990	12:0 ISO	0.15	4.382	235
15:1 ISO G	0.68	7.950	914	13:0 ISO	0.58	5.449	942
15:0 ISO	27.60	8.231	37381	14:0 ISO	0.95	6.742	1596
15:0 ANTEISO	3.39	8.370	4603	15:1 ISO G	0.24	7.943	415
15:0	0.43	8.813	587	15:0 ISO	34.34	8.228	59449
16:1 ISO H	1.59	9.578	2200	15:0 ANTEISO	3.30	8.368	5724
16:0 ISO	20.44	9.858	28422	15:0	0.42	8.810	743
Sum In Feature 3	0.74	10.176	1031	16:1 ISO H	0.59	9.572	1037
16:0	1.06	10.479	1493	16:0 ISO	10.33	9.857	18374
ISO 17:1 w9c	10.88	11.206	15393	Sum In Feature 3	0.23	10.175	414
ANTEISO 17:1 w9c	0.89	11.394	1268	16:0	0.82	10.477	1470
17:0 ISO	8.01	11.575	11393	ISO 17:1 w9c	10.61	11.205	19220
17:0 ANTEISO	4.99	11.735	7113	ANTEISO 17:1 w9c	0.58	11.394	1060
17:1 w8c	8.08	11.858	11517	17:0 ISO	11.75	11.572	21395
17:0	2.97	12.216	4252	17:0 ANTEISO	5.64	11.734	10292
17:0 10 methyl	2.86	12.940	4123	17:1 w8c	5.29	11.857	9659
18:1 w9c	2.53	13.576	3675	17:0	5.10	12.214	9351
18:1 w7c	0.24	13.668	344	16:1 2OH	0.62	12.283	1143
18:0	1.07	13.978	1555		----	12.402	439
TBSA 10Me18:0	0.51	14.669	747	17:0 10 methyl	4.32	12.940	7988
	----	15.381	456	18:1 w9c	1.41	13.576	2624
Summed Feature 3	0.74	----	1031	18:0	1.22	13.979	2282
				TBSA 10Me18:0	0.97	14.669	1813
				Sum In Feature 6	0.53	15.311	997
				Summed Feature 3	0.23	----	414
				Summed Feature 6	0.53	----	997

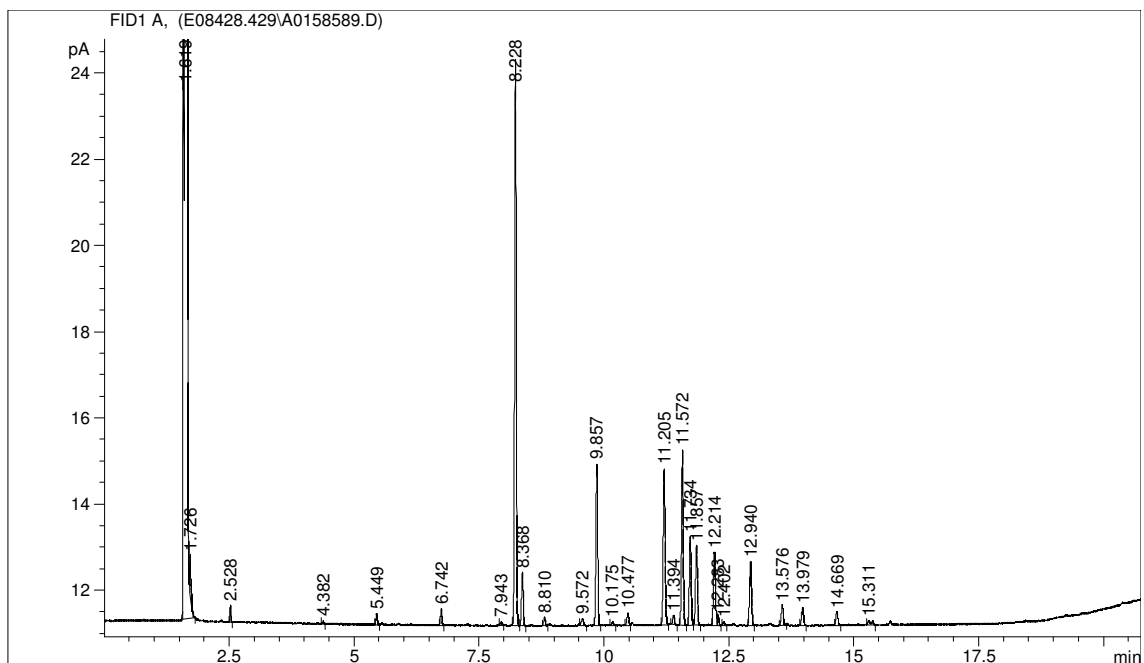
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa GUI 43.

M65



TSA



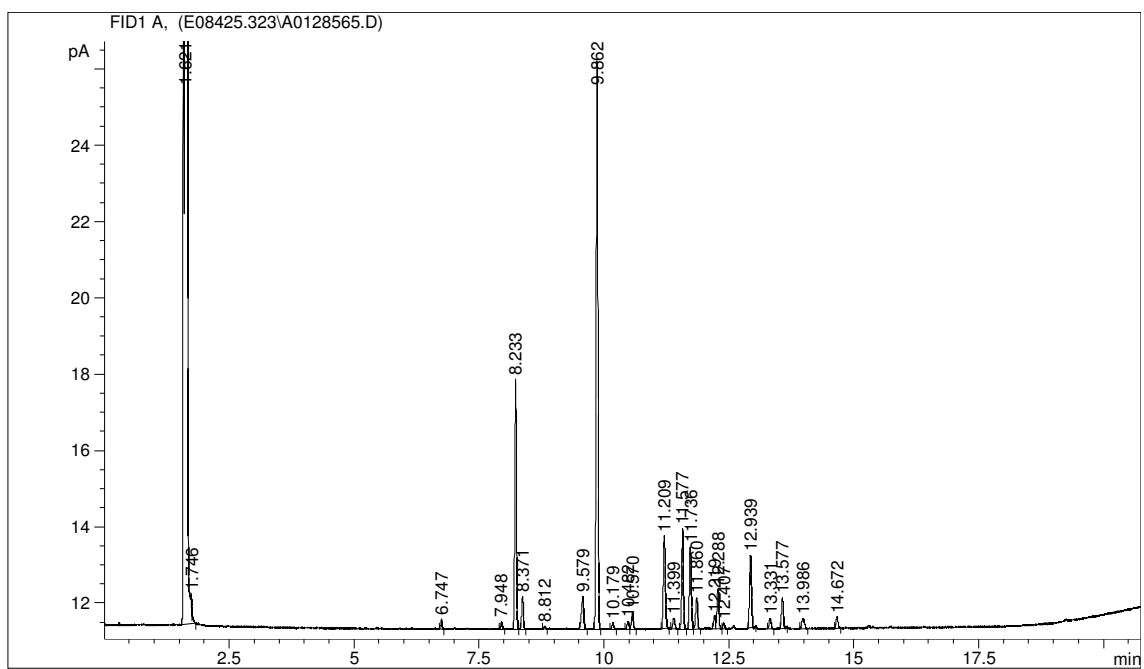
## GUI 61

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.621	3.453E+8	SOLVENT PEAK	----	1.618	3.658E+8
	----	1.746	758		----	1.725	6617
14:0 ISO	0.61	6.747	1074		----	2.348	148
15:1 ISO G	0.54	7.948	968		----	2.526	1445
15:0 ISO	16.31	8.233	29608		----	3.183	470
15:0 ANTEISO	2.23	8.371	4054	12:0 ISO	0.02	4.381	209
15:0	0.16	8.812	291	13:0 ISO	0.15	5.447	1617
16:1 ISO H	2.94	9.579	5459	13:0 ANTEISO	0.03	5.548	354
16:0 ISO	39.23	9.862	73127	13:0	0.04	5.893	459
Sum In Feature 3	0.44	10.179	830	12:0 2OH	0.04	6.140	488
16:0	0.54	10.482	1012		----	6.488	410
	----	10.570	2107	14:0 ISO	0.78	6.742	8960
ISO 17:1 w9c	6.98	11.209	13240	14:0	0.05	7.264	582
ANTEISO 17:1 w9c	0.77	11.399	1471	15:1 ISO G	0.79	7.946	9368
17:0 ISO	7.09	11.577	13504	15:0 ISO	22.78	8.233	270887
17:0 ANTEISO	6.02	11.736	11492	15:0 ANTEISO	4.42	8.368	52686
17:1 w8c	2.33	11.860	4446	15:0	0.84	8.809	10090
17:0	0.87	12.219	1668		----	8.900	779
16:1 2OH	2.86	12.288	5488	16:1 ISO G	1.78	9.555	21694
	----	12.407	713	16:0 ISO	27.30	9.863	333323
17:0 10 methyl	5.18	12.939	9998	Sum In Feature 3	0.14	10.174	1747
18:0 ISO	0.76	13.331	1476	16:0	0.68	10.477	8382
18:1 w9c	2.24	13.577	4341		----	10.563	8746
18:0	1.05	13.986	2050	ISO 17:1 w9c	4.49	11.204	55851
TBSA 10Me18:0	0.83	14.672	1618	ANTEISO 17:1	0.58	11.396	7234
Summed Feature 3	0.44	----	830	17:0 ISO	8.03	11.574	100255
				17:0 ANTEISO	6.53	11.734	81591
				17:1 w8c	8.91	11.857	46558
				17:0 CYCLO	0.11	12.048	1434
					----	12.108	1461
				17:0	7.18	12.216	90211
					----	12.285	16626
					----	12.401	4492
					----	12.598	6362
				17:0 10 methyl	5.62	5.62	12.939
				18:1 ISO H	0.06	13.037	815
				18:0 ISO	0.65	13.329	8203
				18:1 w9c	0.59	13.574	7470
				18:1 w7c	0.05	13.668	670
					----	13.758	389
				18:0	1.03	13.980	13154
				TBSA 10Me18:0	0.75	14.668	9543
				19:0 ISO	0.07	15.091	917
				Sum In Feature 6	0.35	15.308	4461
					----	15.378	1507
				19:0	0.29	15.738	3713
				19:0 10 methyl	0.05	16.392	589
				Summed Feature 3	0.14	----	1747
				Summed Feature 6	0.35	----	4461

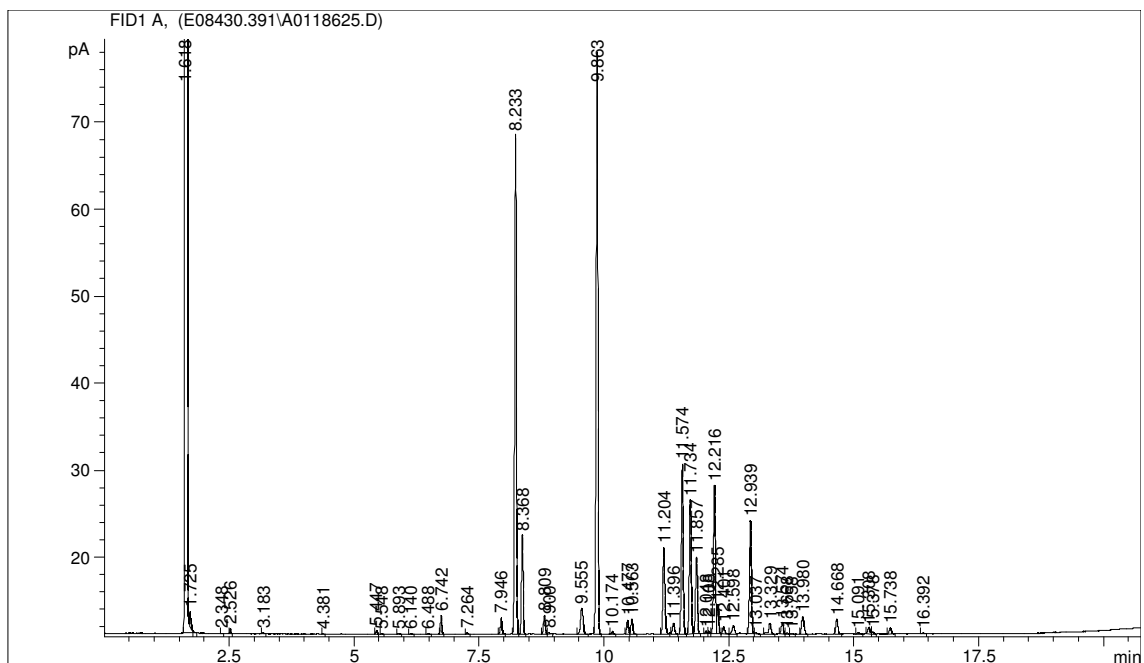
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa GUI 61.

M65



TSA



## GUI 63

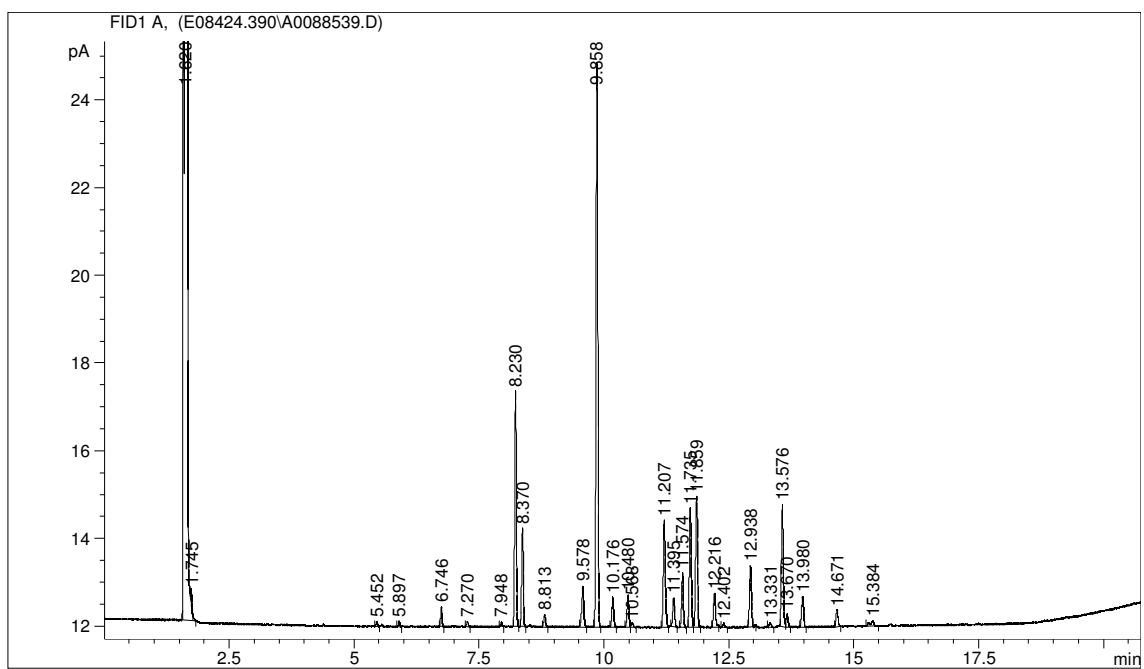
M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.620	3.457E+8		----	1.586	77228
	----	1.745	911	SOLVENT PEAK	----	1.619	3.444E+8
13:0 ISO	0.19	5.452	349		----	1.726	3719
13:0	0.26	5.897	486		----	2.349	252
14:0 ISO	0.99	6.746	1903		----	2.528	1175
14:0	0.27	7.270	523	13:0 ISO	0.19	5.453	972
15:1 ISO G	0.25	7.948	497	13:0	0.12	5.899	605
15:0 ISO	12.34	8.230	24516	14:0 ISO	0.78	6.746	4098
15:0 ANTEISO	5.19	8.370	10344	14:0	0.10	7.268	514
15:0	0.66	8.813	1317	15:1 ISO G	0.14	7.949	757
16:1 ISO H	2.59	9.578	5250	15:0 ISO	25.33	8.234	137262
16:0 ISO	31.55	9.858	64332	15:0 ANTEISO	5.80	8.372	31515
Sum In Feature 3	1.67	10.176	3423	15:0	0.98	8.814	5342
16:0	1.75	10.480	3599	16:1 ISO H	1.15	9.580	6364
	----	10.568	450	16:0 ISO	23.16	9.863	128948
ISO 17:1 w9c	6.40	11.207	13286	Sum In Feature 3	0.31	10.179	1738
ANTEISO 17:1 w9c	1.62	11.395	3373	16:0	1.22	10.481	6835
17:0 ISO	3.12	11.574	6513		----	10.568	1496
17:0 ANTEISO	6.94	11.735	14487	ISO 17:1 w9c	6.20	11.209	35131
17:1 w8c	7.74	11.859	16190	ANTEISO 17:1 w9c	0.72	11.396	4111
17:0	2.03	12.216	4269	17:0 ISO	5.81	11.576	33100
	----	12.402	414	17:0 ANTEISO	5.50	11.738	31407
17:0 10 methyl	3.51	12.938	7412	17:1 w8c	7.52	11.862	42962
18:0 ISO	0.24	13.331	511	17:0	7.72	12.219	44288
18:1 w9c	7.15	13.576	15205		----	12.403	904
18:1 w7c	0.77	13.670	1630		----	12.607	364
18:0	1.79	13.980	3811	17:0 10 methyl	3.51	12.942	20282
TBSA 10Me18:0	0.99	14.671	2117	18:0 ISO	0.23	13.332	1312
	----	15.384	1068	18:1 w9c	1.41	13.577	8192
Summed Feature 3	1.67	----	3423	18:1 w7c	0.10	13.674	609
				18:0	1.17	13.981	6834
				TBSA 10Me18:0	0.41	14.673	2391
				Sum In Feature 6	0.23	15.309	1374
					----	15.381	1078
				19:0	0.19	15.739	1141
					----	15.866	481
				Summed Feature 3	0.31	----	1738
				Summed Feature 6	0.23	----	1374

TR: Tiempo de retención

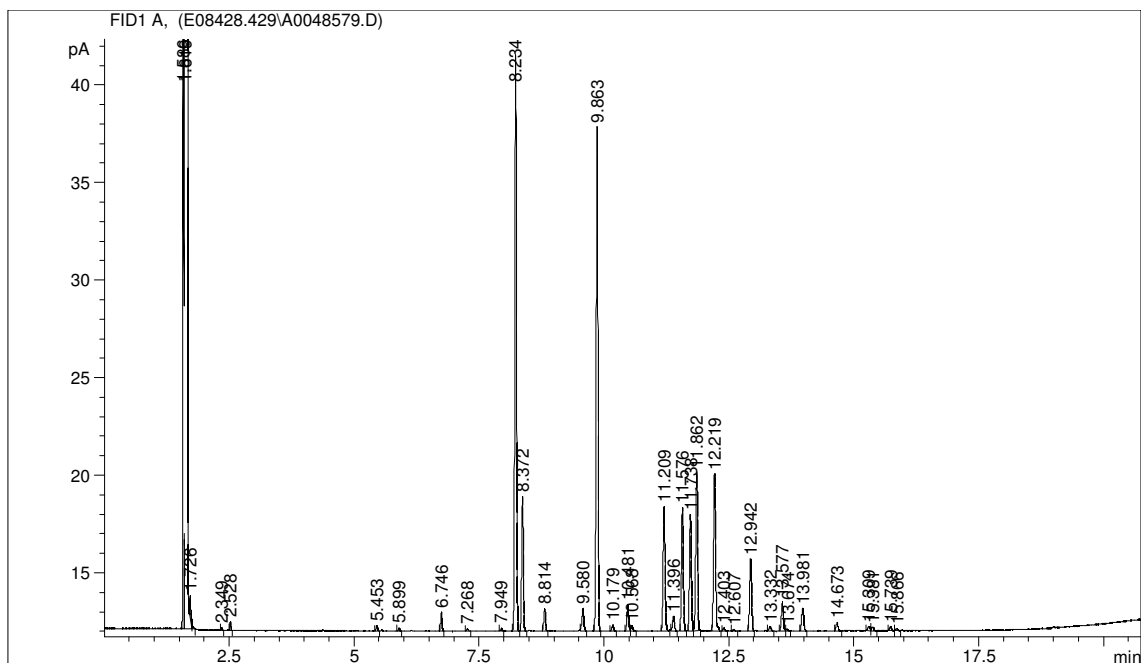


Perfiles obtenidos para la cepa GUI 63.

M65



TSA



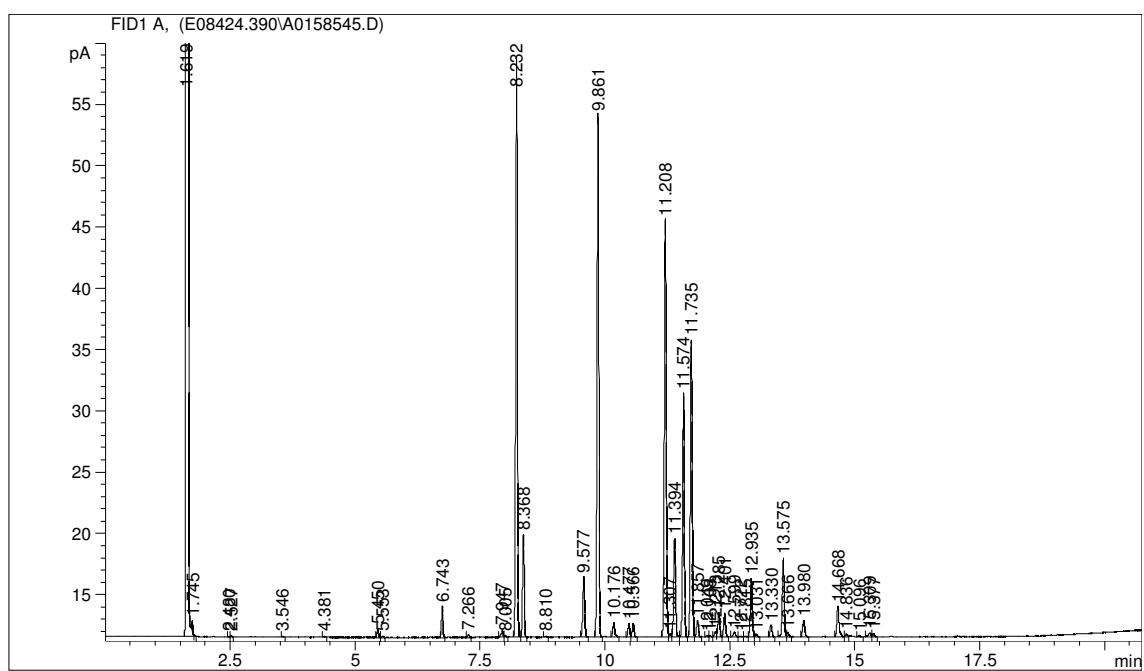
CR 18

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.619	3.56E+8	SOLVENT PEAK	----	1.618	3.43E+8
	----	1.745	2161		----	1.725	2743
	----	2.480	170		----	2.526	680
	----	2.527	435	13:0 ISO	0.12	5.448	389
11:0 ISO	0.03	3.546	239	14:0 ISO	0.72	6.741	2324
12:0 ISO	0.04	4.381	424	14:0	0.10	7.262	340
13:0 ISO	0.29	5.450	2921	15:1 ISO G	0.62	7.946	2058
13:0 ANTEISO	0.05	5.553	477	15:0 ISO	18.94	8.227	63397
14:0 ISO	1.05	6.743	10787	15:0 ANTEISO	5.17	8.366	17341
14:0	0.09	7.266	942	15:0	0.89	8.809	3008
15:1 ISO G	0.29	7.947	3099	16:1 ISO H	3.42	9.568	11708
Sum In Feature 1	0.05	8.005	517	16:0 ISO	22.80	9.856	78382
15:0 ISO	20.58	8.232	218399	Sum In Feature 3	1.19	10.173	4099
15:0 ANTEISO	3.63	8.368	38590	16:0	0.61	10.476	2119
15:0	0.05	8.810	484	ISO 17:1 w9c	7.25	11.202	25370
16:1 ISO H	2.41	9.577	26169	ANTEISO 17:1 w9c	1.76	11.394	6182
16:0 ISO	19.31	9.861	210282	17:0 ISO	3.11	11.571	10924
Sum In Feature 3	0.59	10.176	6446	17:0 ANTEISO	5.12	11.733	18023
16:0	0.50	10.477	5459	17:1 w8c	17.37	11.856	61210
	----	10.566	5724	17:0	3.29	12.214	11622
ISO 17:1 w9c	16.30	11.208	180697	17:0 10 methyl	1.68	12.934	5974
Sum In Feature 4	0.12	11.307	1360	18:0 ISO	0.14	13.330	482
ANTEISO 17:1 w9c	3.86	11.394	42828	18:1 w9c	3.78	13.572	13532
17:0 ISO	9.25	11.574	103004	18:1 w7c	0.32	13.666	1133
17:0 ANTEISO	11.25	11.735	125507	18:0	0.68	13.977	2447
17:1 w8c	0.64	11.857	7180	TBSA 10Me18:0	0.67	14.667	2408
17:0 CYCLO	0.06	12.049	719	Sum In Feature 6	0.24	15.305	876
	----	12.108	591		----	15.378	1240
17:0	0.21	12.213	2321	Summed Feature 3	1.19	----	4099
16:1 2OH	0.93	12.285	10425	Summed Feature 6	0.24	----	876
	----	12.401	10101				
	----	12.599	2536				
	----	12.722	423				
	----	12.815	416				
17:0 10 methyl	2.26	12.935	25539				
18:1 ISO H	0.12	13.031	1325				
18:0 ISO	0.45	13.330	5119				
18:1 w9c	3.11	13.575	35311				
18:1 w7c	0.18	13.666	2098				
18:0	0.72	13.980	8146				
TBSA 10Me18:0	1.32	14.668	15110				
	----	14.836	1473				
19:0 ISO	0.05	15.096	579				
Sum In Feature 6	0.20	15.309	2335				
	----	15.377	1483				
Summed Feature 1	0.05	----	517				
	----	----	----				
Summed Feature 3	0.59	----	6446				
Summed Feature 4	0.12	----	1360				
Summed Feature 6	0.20	----	2335				

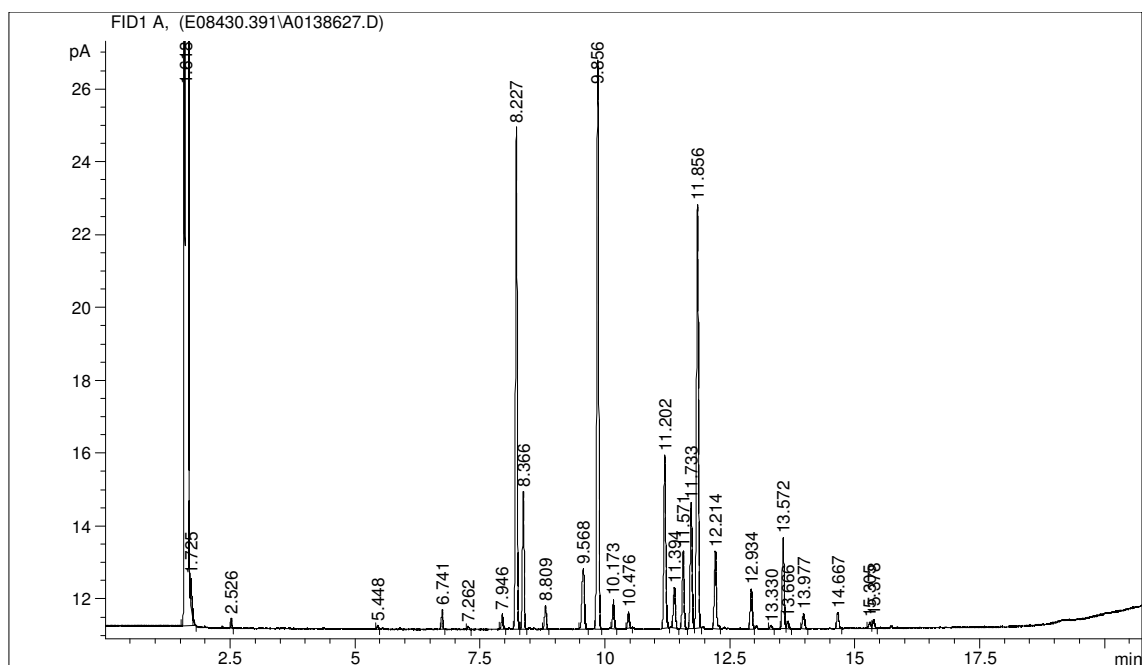
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa CR 18.

M65



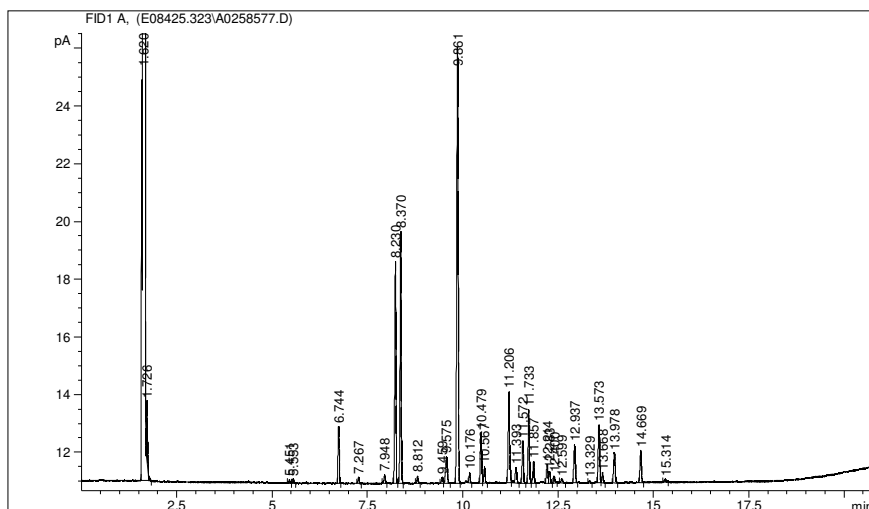
TSA



CR 21

M65			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.620	3.481E+8
	----	1.726	5931
13:0 ISO	0.20	5.451	479
13:0 ANTEISO	0.22	5.553	541
14:0 ISO	3.31	6.744	8304
14:0	0.35	7.267	895
15:1 ISO G	0.58	7.948	1502
15:0 ISO	13.63	8.230	35235
15:0 ANTEISO	15.71	8.370	40719
15:0	0.44	8.812	1147
16:1 w7c alcohol	0.40	9.459	1063
16:1 ISO H	2.32	9.575	6138
16:0 ISO	27.73	9.861	73602
Sum In Feature 3	0.65	10.176	1724
16:0	3.21	10.479	8597
	----	10.567	2863
ISO 17:1 w9c	6.96	11.206	18787
ANTEISO 17:1 w9c	1.25	11.393	3375
17:0 ISO	2.81	11.572	7617
17:0 ANTEISO	4.83	11.733	13129
17:1 w8c	1.38	11.857	3740
17:0	1.25	12.214	3420
16:1 2OH	0.74	12.283	2034
	----	12.400	1150
	----	12.599	764
17:0 10 methyl	2.58	12.937	7099
18:0 ISO	0.16	13.329	435
18:1 w9c	3.98	13.573	10979
18:1 w7c	0.70	13.668	1922
18:0	2.13	13.978	5897
TBSA 10Me18:0	2.22	14.669	6177
Sum In Feature 6	0.24	15.314	669
Summed Feature 3	0.65	----	1724
Summed Feature 6	0.24	----	669

TR: Tiempo de retención



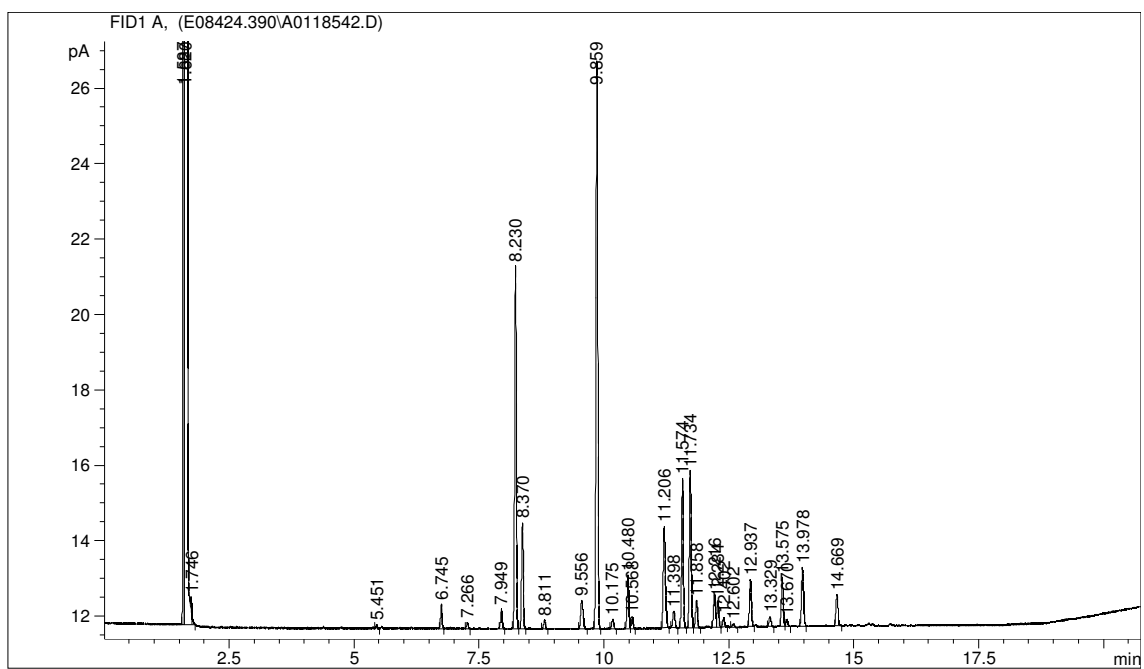
## CR 30

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
	----	1.587	73958	SOLVENT PEAK	----	1.619	3.447E+8
SOLVENT PEAK	----	1.620	3.466E+8		----	1.725	5353
	----	1.746	850		----	2.528	660
13:0 ISO	0.15	5.451	344	13:0 ISO	0.28	5.450	1805
14:0 ISO	1.12	6.745	2699	13:0 ANTEISO	0.08	5.553	519
14:0	0.30	7.266	736	13:0	0.04	5.897	280
15:1 ISO G	1.03	7.949	2546	14:0 ISO	0.87	6.745	5824
15:0 ISO	17.87	8.230	44404	14:0	0.08	7.268	545
15:0 ANTEISO	5.30	8.370	13212	15:1 ISO G	0.40	7.949	2768
15:0	0.44	8.811	1117	15:0 ISO	33.97	8.234	233589
16:1 ISO G	2.03	9.556	5165	15:0 ANTEISO	9.24	8.370	63727
16:0 ISO	29.33	9.859	74812	15:0	1.48	8.813	10299
Sum In Feature 3	0.51	10.175	1307		----	8.906	325
16:0	2.81	10.480	7225	16:1 ISO H	0.89	9.578	6260
	----	10.568	1471	16:0 ISO	16.32	9.860	115300
ISO 17:1 w9c	6.19	11.206	16074	Sum In Feature 3	0.28	10.177	1970
ANTEISO 17:1 w9c	0.98	11.398	2541	16:0	1.18	10.480	8398
17:0 ISO	7.85	11.574	20468		----	10.568	2519
17:0 ANTEISO	8.38	11.734	21887	ISO 17:1 w9c	4.82	11.207	34691
17:1 w8c	1.46	11.858	3815	ANTEISO 17:1 w9c	0.86	11.394	6213
17:0	1.73	12.216	4551	17:0 ISO	4.89	11.576	35326
16:1 2OH	1.39	12.284	3660	17:0 ANTEISO	6.03	11.736	43663
	----	12.402	1252	17:1 w8c	5.54	11.860	40142
	----	12.602	440	17:1 w5c	0.07	12.055	516
17:0 10 methyl	2.47	12.937	6540	17:0	5.73	12.218	41708
18:0 ISO	0.55	13.329	1463	16:1 2OH	0.47	12.285	3443
18:1 w9c	2.67	13.575	7089		----	12.402	2754
18:1 w7c	0.37	13.670	993		----	12.603	2657
18:0	3.26	13.978	8699	17:0 10 methyl	4.33	12.942	31796
TBSA 10Me18:0	1.80	14.669	4834	18:0 ISO	0.21	13.329	1581
Summed Feature 3	0.51	----	1307	18:1 w9c	0.53	13.577	3921
				18:1 w7c	0.11	13.671	778
				18:0	0.60	13.983	4470
				TBSA 10Me18:0	0.39	14.672	2931
				Sum In Feature 6	0.22	15.313	1632
					----	15.379	1121
				19:0	0.07	15.739	512
				Summed Feature 3	0.28	----	1970
				Summed Feature 6	0.22	----	1632

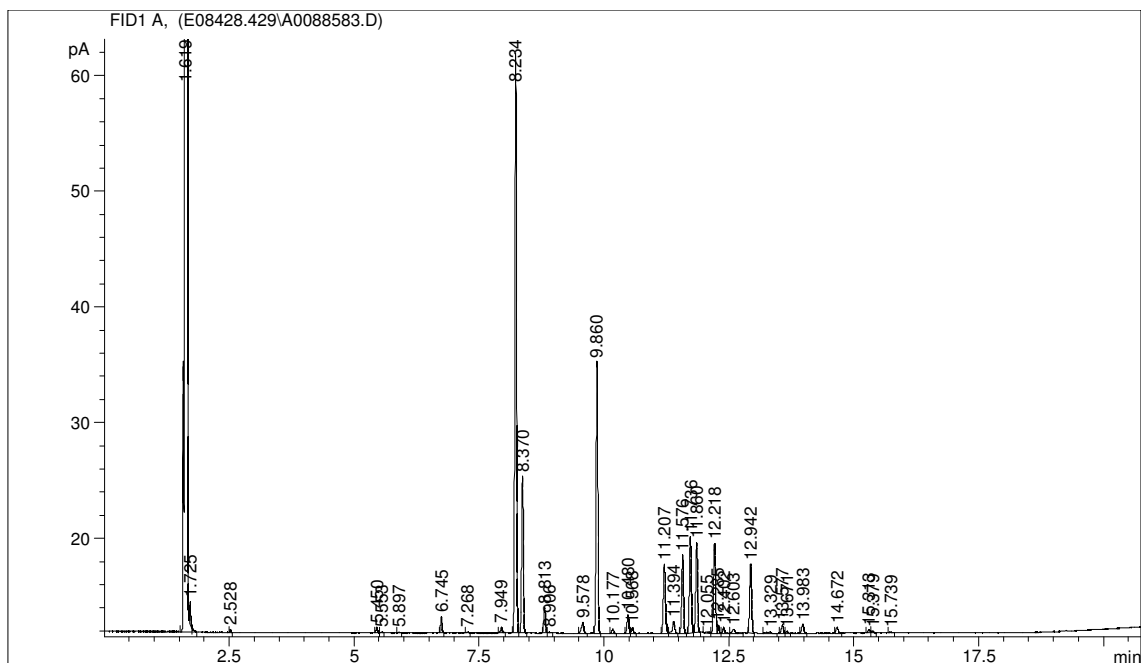
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa CR 30.

M65



TSA



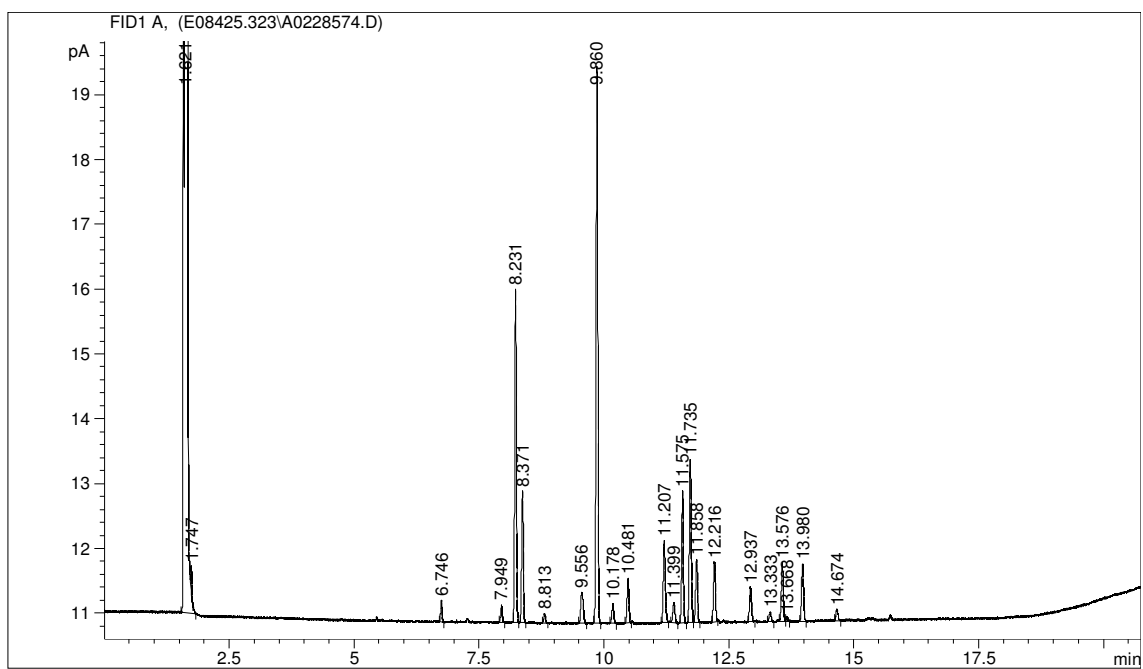
CR 36

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.621	3.48E+8	SOLVENT PEAK	----	1.619	3.424E+8
	----	1.747	1065		----	1.725	2543
14:0 ISO	1.06	6.746	1435		----	2.528	448
15:1 ISO G	0.91	7.949	1265	13:0 ISO	0.25	5.450	531
15:0 ISO	16.89	8.231	23598	14:0 ISO	1.42	6.744	3177
15:0 ANTEISO	6.70	8.371	9389	14:0	0.17	7.266	394
15:0	0.47	8.813	666	15:1 ISO G	0.30	7.948	689
16:1 ISO G	2.31	9.556	3299	15:0 ISO	21.81	8.231	50471
16:0 ISO	29.48	9.860	42287	15:0 ANTEISO	5.92	8.370	13729
Sum In Feature 3	1.10	10.178	1587	15:0	0.69	8.814	1626
16:0	2.34	10.481	3387	16:1 ISO G	2.20	9.563	5210
ISO 17:1 w9c	4.73	11.207	6901	16:0 ISO	31.20	9.861	74238
ANTEISO 17:1 w9c	1.17	11.399	1709	Sum In Feature 3	0.62	10.179	1488
17:0 ISO	7.09	11.575	10394	16:0	1.26	10.482	3024
17:0 ANTEISO	9.02	11.735	13239		----	10.570	1110
17:1 w8c	3.47	11.858	5105	ISO 17:1 w9c	5.20	11.211	12590
17:0	3.34	12.216	4921	ANTEISO 17:1 w9c	1.09	11.401	2655
17:0 10 methyl	1.88	12.937	2792	17:0 ISO	4.53	11.577	11035
18:0 ISO	0.55	13.333	815	17:0 ANTEISO	7.49	11.738	18276
18:1 w9c	3.33	13.576	4971	17:1 w8c	5.72	11.861	13964
18:1 w7c	0.26	13.668	386	17:0	3.30	12.220	8102
18:0	3.26	13.980	4872	16:1 2OH	0.54	12.288	1326
TBSA 10Me18:0	0.64	14.674	966		----	12.402	505
Summed Feature 3	1.10	----	1587	17:0 10 methyl	2.27	12.941	5606
				18:0 ISO	0.25	13.333	622
				18:1 w9c	1.75	13.579	4353
				18:0	0.84	13.983	2098
				TBSA 10Me18:0	1.16	14.675	2914
				Summed Feature 3	0.62	----	1488

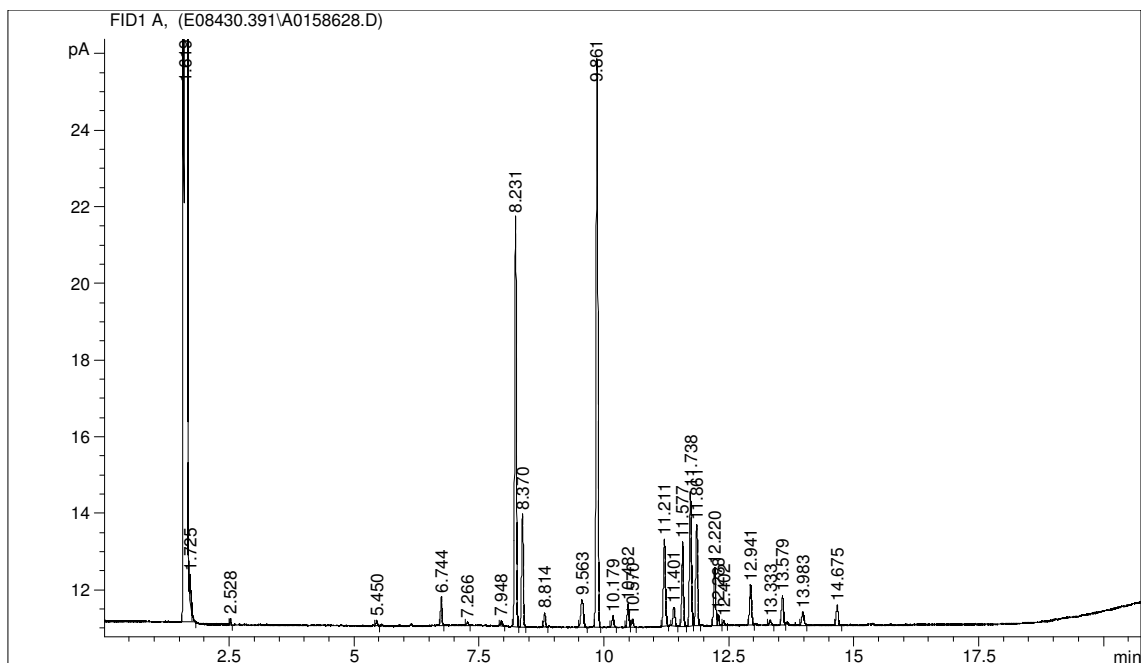
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa CR 36.

M65



TSA





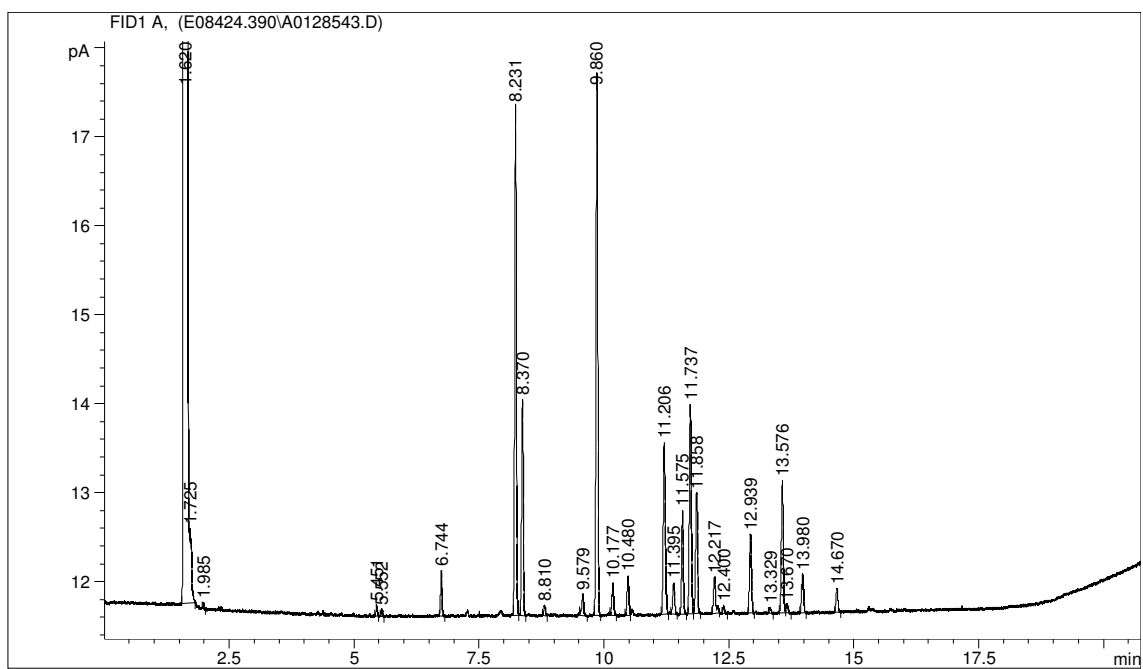
CR 38

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.620	3.45E+8	SOLVENT PEAK	----	1.620	3.458E+8
	----	1.725	235		----	1.727	5337
	----	1.985	142		----	2.350	384
13:0 ISO	0.36	5.451	440		----	2.528	3431
13:0 ANTEISO	0.26	5.552	320	13:0 ISO	0.28	5.451	783
14:0 ISO	1.69	6.744	2149	13:0 ANTEISO	0.13	5.554	358
15:0 ISO	20.01	8.231	26303	14:0 ISO	0.24	6.743	691
15:0 ANTEISO	8.61	8.370	11351	15:0 ISO	31.20	8.232	94342
15:0	0.40	8.810	534	15:0 ANTEISO	10.49	8.369	31792
16:1 ISO H	1.02	9.579	1370	15:1 w8c	0.14	8.492	434
16:0 ISO	22.15	9.860	29880	15:1 w6c	0.21	8.588	630
Sum In Feature 3	1.32	10.177	1790	15:0	1.76	8.812	5392
16:0	1.65	10.480	2249	16:1 ISO H	0.19	9.580	598
ISO 17:1 w9c	7.96	11.206	10934	16:0 ISO	4.87	9.858	15142
ANTEISO 17:1 w9c	1.28	11.395	1756	Sum In Feature 3	0.52	10.178	1609
17:0 ISO	4.47	11.575	6167	16:0	0.51	10.479	1598
17:0 ANTEISO	9.11	11.737	12582	ISO 17:1 w9c	3.94	11.208	12468
17:1 w8c	5.36	11.858	7423	ANTEISO 17:1 w9c	0.73	11.394	2303
17:0	1.81	12.217	2509	17:0 ISO	5.15	11.575	16357
	----	12.400	364	17:0 ANTEISO	8.02	11.736	25532
17:0 10 methyl	3.38	12.939	4729	17:1 w8c	18.93	11.859	60375
18:0 ISO	0.21	13.329	298	17:0	5.45	12.218	17464
18:1 w9c	5.86	13.576	8239		----	12.405	424
18:1 w7c	0.43	13.670	603	17:0 10 methyl	5.39	12.941	17386
18:0	1.67	13.980	2353	18:1 w9c	0.89	13.575	2880
TBSA 10Me18:0	1.00	14.670	1421	18:0	0.37	13.979	1211
Summed Feature 3	1.32	----	1790	TBSA 10Me18:0	0.29	14.666	956
				Sum In Feature 6	0.17	15.306	562
				19:0	0.14	15.739	468
				Summed Feature 3	0.52	----	1609
				Summed Feature 6	0.17	----	562

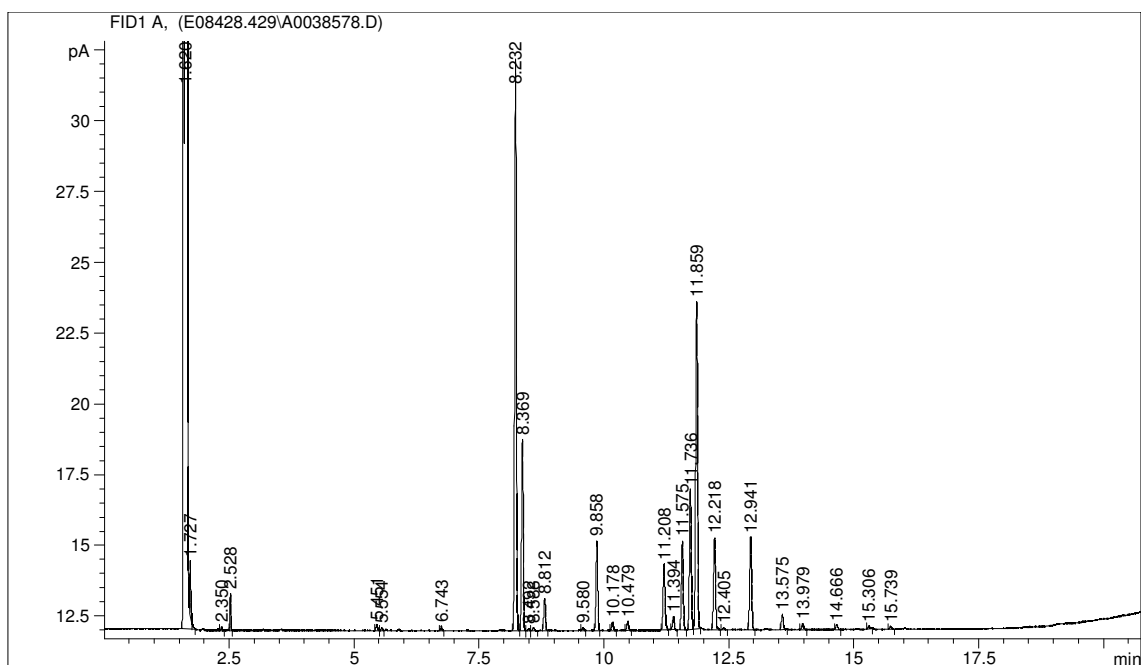
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa CR 38.

M65



TSA



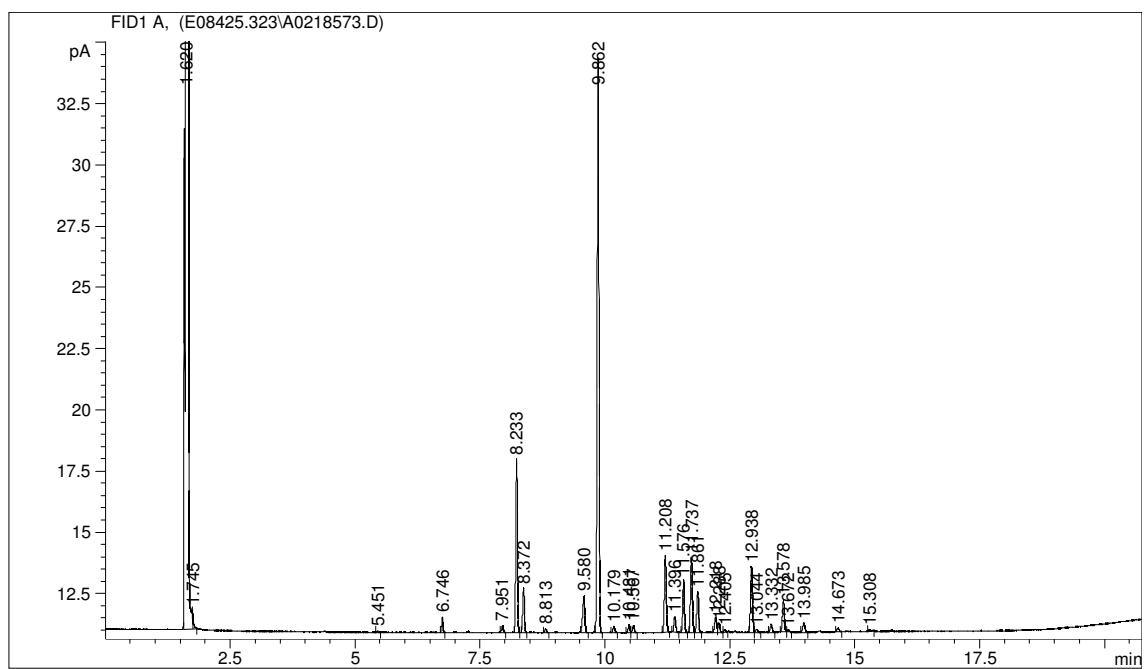
CR 39

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.620	3.474E+8	SOLVENT PEAK	----	1.619	3.423E+8
	----	1.745	797		----	1.725	9562
13:0 ISO	0.09	5.451	218		----	2.349	172
14:0 ISO	1.06	6.746	2617		----	2.527	2271
15:1 ISO G	0.58	7.951	1472	13:0 ISO	0.29	5.449	1295
15:0 ISO	12.69	8.233	32450	13:0 ANTEISO	0.05	5.551	244
15:0 ANTEISO	3.31	8.372	8481	13:0	0.06	5.894	294
15:0	0.30	8.813	769	14:0 ISO	0.75	6.743	3528
16:1 ISO H	3.50	9.580	9156	15:1 ISO G	1.03	7.947	4969
16:0 ISO	44.12	9.862	115820	15:0 ISO	31.46	8.231	152898
Sum In Feature 3	0.51	10.179	1351	15:0 ANTEISO	5.93	8.369	28882
16:0	0.62	10.481	1629	15:0	1.08	8.811	5309
	----	10.567	1538		----	8.902	903
ISO 17:1 w9c	6.17	11.208	16478	14:0 ISO 3OH	0.10	9.012	486
ANTEISO 17:1 w9c	1.19	11.396	3198	16:1 ISO G	1.40	9.560	6946
17:0 ISO	4.18	11.576	11196	16:0 ISO	19.83	9.859	99046
17:0 ANTEISO	6.00	11.737	16123	Sum In Feature 3	0.13	10.173	640
17:1 w8c	3.23	11.861	8693	16:0	0.58	10.477	2944
17:0	1.18	12.218	3174		----	10.565	2543
16:1 2OH	0.77	12.288	2074	ISO 17:1 w9c	5.51	11.205	28060
	----	12.405	434	ANTEISO 17:1 w9c	0.62	11.396	3160
17:0 10 methyl	5.42	12.938	14721	17:0 ISO	5.88	11.574	30043
18:1 ISO H	0.27	13.044	724	17:0 ANTEISO	5.84	11.735	29893
18:0 ISO	0.62	13.332	1690	17:1 w8c	5.13	11.856	26325
18:1 w9c	2.68	13.578	7327		----	12.048	612
18:1 w7c	0.17	13.672	460		----	12.110	591
18:0	0.83	13.985	2283	17:0	6.10	12.217	31408
TBSA 10Me18:0	0.37	14.673	1013	16:1 2OH	1.13	12.283	5819
Sum In Feature 6	0.14	15.308	394		----	12.400	2033
Summed Feature 3	0.51	----	1351		----	12.597	3098
Summed Feature 6	0.14	----	394	17:0 10 methyl	4.93	12.938	25540
				18:0 ISO	0.30	13.329	1547
				18:1 w9c	0.39	13.574	2023
				18:0	0.50	13.979	2620
				TBSA 10Me18:0	0.33	14.668	1726
				Sum In Feature 6	0.49	15.308	2588
					----	15.378	1018
				19:0	0.16	15.737	861
				Summed Feature 3	0.13	----	640
				Summed Feature 6	0.49	----	2588

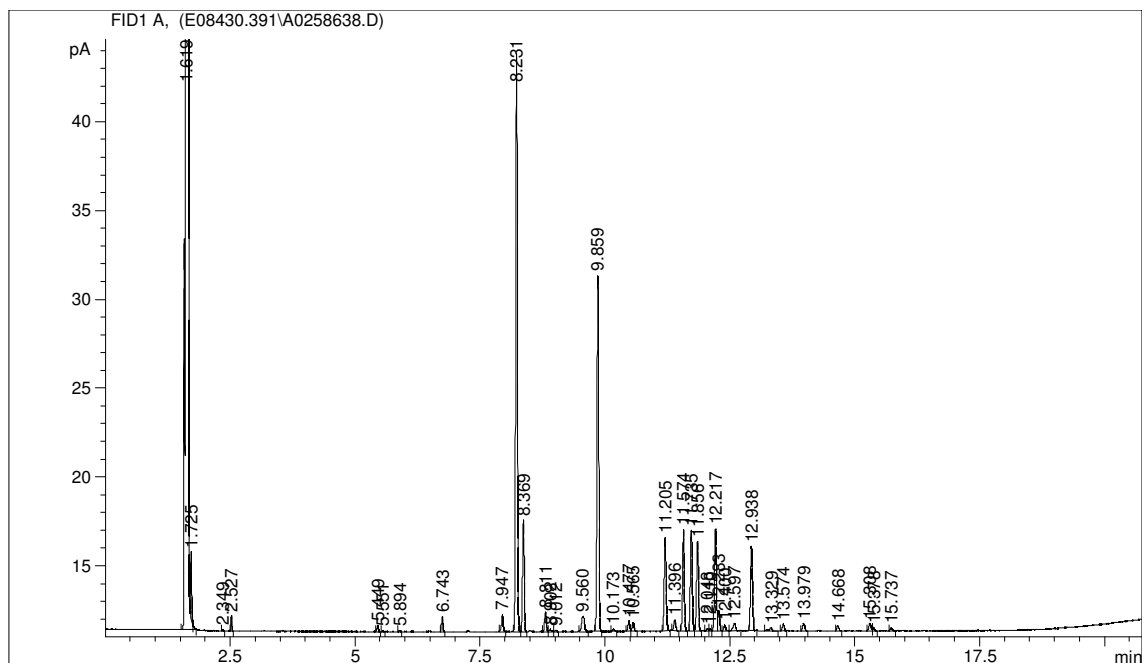
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa CR 39.

M65



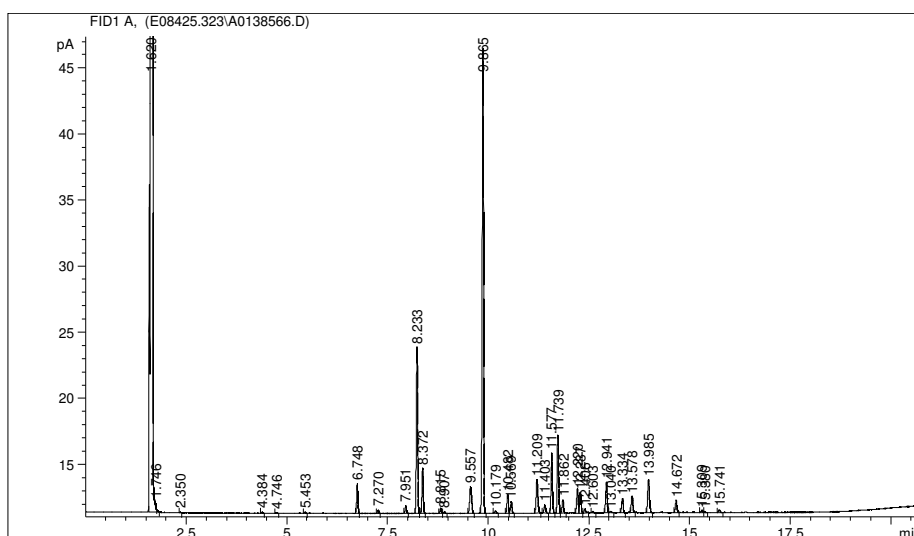
TSA



SG 2

M65			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.620	3.454E+8
	----	1.746	974
	----	2.350	166
12:0 ISO	0.09	4.384	355
12:0	0.05	4.746	208
13:0 ISO	0.12	5.453	472
14:0 ISO	2.37	6.748	9627
14:0	0.30	7.270	1218
15:1 ISO G	0.66	7.951	2766
15:0 ISO	13.83	8.233	57917
15:0 ANTEISO	3.79	8.372	15913
15:0	0.45	8.815	1911
	----	8.907	632
16:1 ISO G	3.17	9.557	13577
16:0 ISO	40.54	9.865	174332
Sum In Feature 3	0.24	10.179	1027
16:0	1.64	10.482	7100
	----	10.569	4492
ISO 17:1 w9c	3.37	11.209	14757
ANTEISO 17:1 w9c	0.76	11.403	3323
17:0 ISO	5.38	11.577	23624
17:0 ANTEISO	7.22	11.739	31796
17:1 w8c	1.12	11.862	4939
17:0	2.24	12.220	9890
16:1 2OH	1.79	12.287	7938
	----	12.406	1760
	----	12.603	715
17:0 10 methyl	2.83	12.941	12615
18:1 ISO H	0.14	13.040	602
18:0 ISO	1.32	13.334	5901
18:1 w9c	1.53	13.578	6823
18:0	3.45	13.985	15467
TBSA 10Me18:0	1.13	14.672	5070
Sum In Feature 6	0.22	15.309	1001
	----	15.380	518
19:0	0.24	15.741	1099
Summed Feature 3	0.24	----	1027
Summed Feature 6	0.22	----	1001

TR: Tiempo de retención



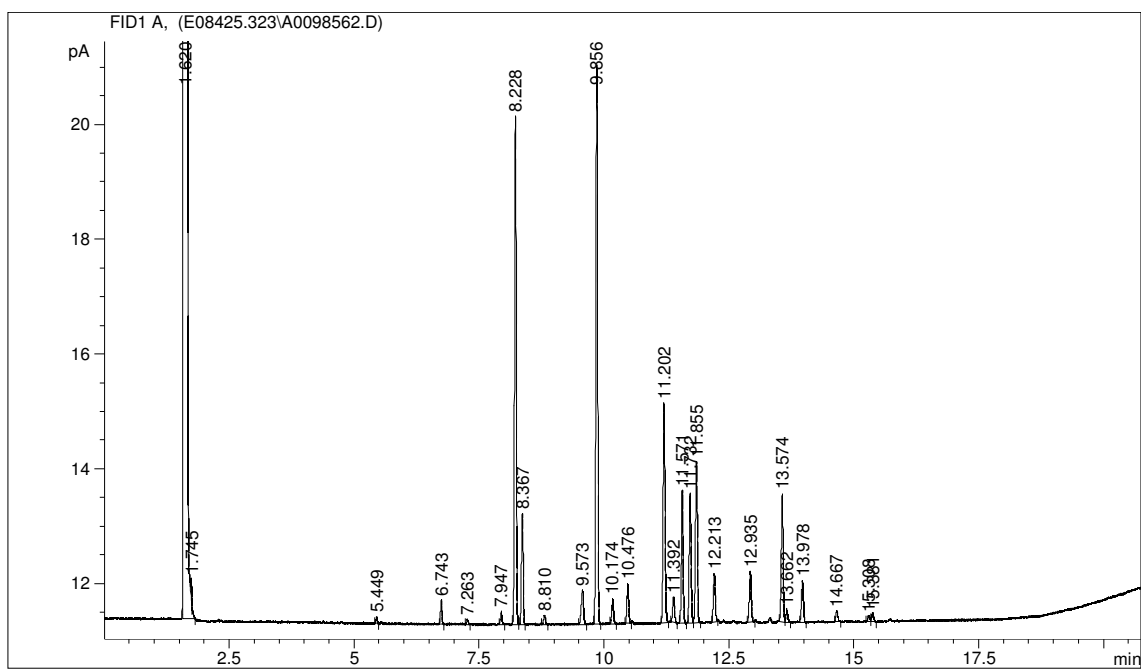
## SG 8

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.620	3.453E+8		----	1.586	49684
	----	1.745	824	SOLVENT PEAK	----	1.619	3.45E+8
13:0 ISO	0.22	5.449	405		----	1.726	11273
14:0 ISO	0.95	6.743	1799		----	1.986	416
14:0	0.20	7.263	385		----	2.348	459
15:1 ISO G	0.53	7.947	1027		----	2.528	2213
15:0 ISO	21.41	8.228	41814	11:0 ISO	0.04	3.548	219
15:0 ANTEISO	4.63	8.367	9063	13:0 ISO	0.40	5.450	2208
15:0	0.40	8.810	789	13:0 ANTEISO	0.07	5.552	366
16:1 ISO H	1.89	9.573	3780	14:0 ISO	0.38	6.744	2209
16:0 ISO	23.97	9.856	48055	14:0	0.10	7.266	575
Sum In Feature 3	1.09	10.174	2200	15:1 ISO G	0.28	7.949	1690
16:0	1.65	10.476	3344	15:0 ISO	43.79	8.233	261062
ISO 17:1 w9c	10.01	11.202	20424	15:0 ANTEISO	4.75	8.369	28398
ANTEISO 17:1 w9c	1.09	11.392	2230	15:0	0.87	8.811	5262
17:0 ISO	5.84	11.571	11970		----	8.898	494
17:0 ANTEISO	5.67	11.732	11643	16:1 ISO H	0.42	9.577	2582
17:1 w8c	7.23	11.855	14849	16:0 ISO	6.64	9.858	40687
17:0	2.19	12.213	4508	Sum In Feature 3	0.23	10.177	1439
17:0 10 methyl	2.24	12.935	4641	16:0	0.85	10.478	5284
18:1 w9c	5.63	13.574	11734		----	10.566	460
18:1 w7c	0.53	13.662	1112	ISO 17:1 w9c	8.73	11.206	54500
18:0	1.85	13.978	3864	ANTEISO 17:1 w9c	0.58	11.391	3638
TBSA 10Me18:0	0.50	14.667	1041	17:0 ISO	8.50	11.574	53288
Sum In Feature 6	0.27	15.308	574	17:0 ANTEISO	3.99	11.735	25082
	----	15.381	893	17:1 w8c	7.77	11.859	48857
Summed Feature 3	1.09	----	2200	17:0	5.60	12.216	35365
Summed Feature 6	0.27	----	574	16:1 2OH	0.33	12.284	2108
					----		----
				17:00	4.78		----
				17:0 10 methyl	3.14	12.940	19955
				18:1 w9c	0.91	13.574	5799
				18:1 w7c	0.09	13.671	572
				18:0	0.71	13.979	4550
				TBSA 10Me18:0	0.38	14.669	2445
				Sum In Feature 6	0.30	15.311	1948
					----	15.380	1404
				19:0	0.14	15.739	929
				Summed Feature 3	0.23	----	1439
				Summed Feature 6	0.30	----	1948

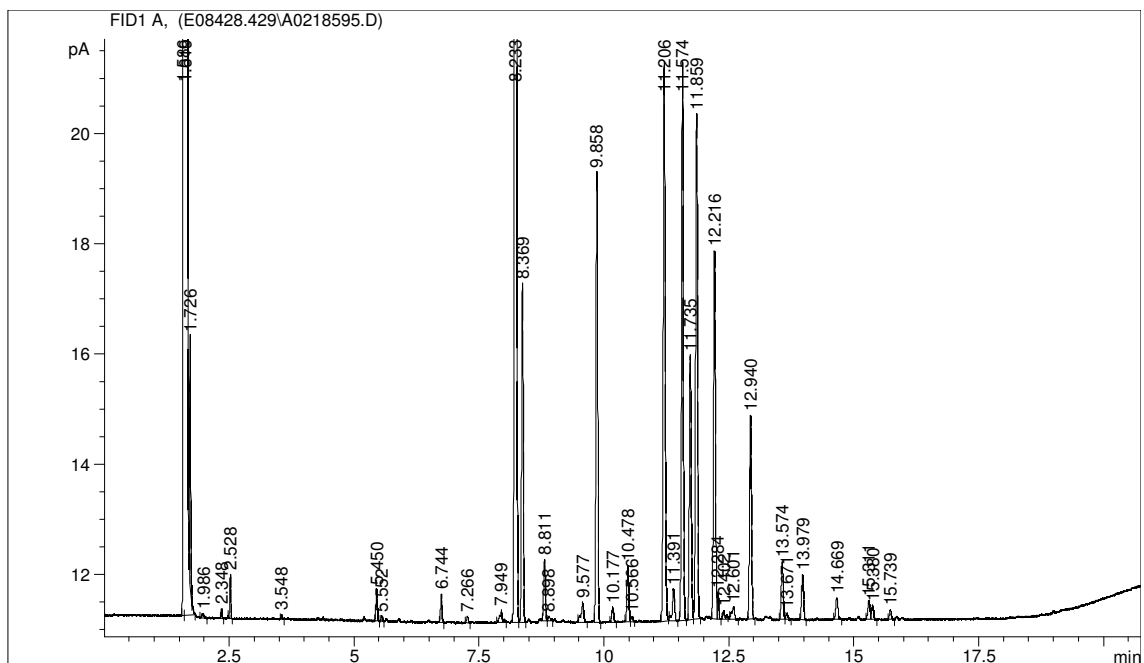
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa SG 8.

M65



TSA



## SG 10

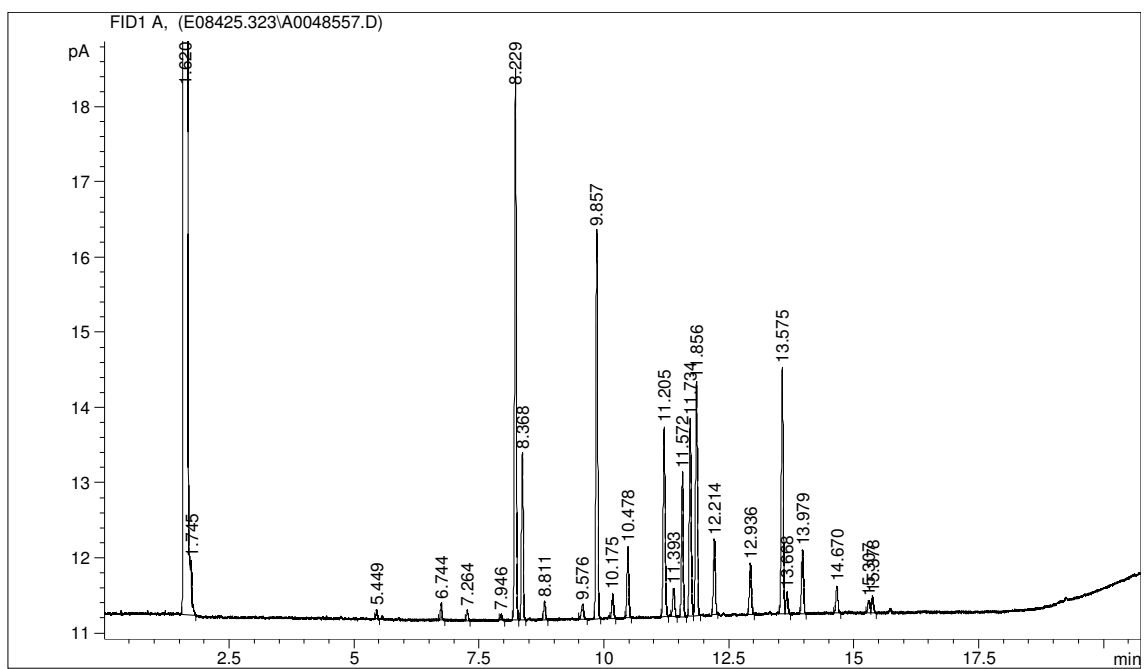
M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.620	3.459E+8	SOLVENT PEAK	----	1.618	3.588E+8
	----	1.745	797		----	1.724	5453
13:0 ISO	0.25	5.449	395		----	1.984	450
14:0 ISO	0.58	6.744	936		----	2.345	459
14:0	0.39	7.264	628		----	2.525	8264
15:1 ISO G	0.24	7.946	393	12:0 ISO	0.03	4.379	225
15:0 ISO	20.12	8.229	33380	12:0	0.04	4.741	327
15:0 ANTEISO	6.28	8.368	10449	13:0 ISO	0.27	5.447	2502
15:0	0.69	8.811	1156	13:0 ANTEISO	0.05	5.547	447
16:1 ISO H	0.73	9.576	1247	13:0	0.04	5.891	353
16:0 ISO	14.84	9.857	25274	14:0 ISO	0.34	6.740	3331
Sum In Feature 3	0.97	10.175	1654	14:0	0.22	7.262	2167
16:0	2.71	10.478	4655	15:1 ISO G	0.39	7.944	3856
ISO 17:1 w9c	7.81	11.205	13538	15:0 ISO	36.27	8.233	361848
ANTEISO 17:1 w9c	1.11	11.393	1932	15:0 ANTEISO	4.56	8.367	45662
17:0 ISO	5.73	11.572	9972	15:0	0.46	8.808	4628
17:0 ANTEISO	7.86	11.734	13695	16:1 ISO G	0.25	9.556	2592
17:1 w8c	9.29	11.856	16209	16:0 ISO	4.28	9.855	43875
17:0	2.96	12.214	5178	Sum In Feature 3	0.35	10.173	3600
17:0 10 methyl	2.09	12.936	3677	16:0	1.43	10.476	14788
18:1 w9c	10.17	13.575	18010	ISO 17:1 w9c	10.30	11.204	107579
18:1 w7c	0.87	13.668	1551	Sum In Feature 4	0.09	11.325	891
18:0	2.63	13.979	4675	ANTEISO 17:1 w9c	0.78	11.391	8152
TBSA 10Me18:0	1.15	14.670	2043	17:0 ISO	12.55	11.573	131727
Sum In Feature 6	0.54	15.307	969	17:0 ANTEISO	6.74	11.735	70802
	----	15.378	1218	17:1 w8c	5.95	11.857	62590
Summed Feature 3	0.97	----	1654		----	12.046	665
Summed Feature 6	0.54	----	969		----	12.109	662
				17:0	5.46	12.214	57688
				16:1 2OH	0.30	12.280	3158
					----	12.400	1748
					----	12.595	2952
				17:0 10 methyl	2.51	12.936	26728
				18:0 ISO	0.14	13.326	1449
				18:1 w9c	2.34	13.573	24997
				18:1 w7c	0.15	13.667	1559
				18:0	2.30	13.976	24718
				TBSA 10Me18:0	0.77	14.666	8297
				19:0 ISO	0.08	15.094	882
				Sum In Feature 6	0.33	15.307	3592
					----	15.376	2042
				19:0	0.26	15.737	2782
					----	15.864	318
				Summed Feature 3	0.35	----	3600
				Summed Feature 4	0.09	----	891
				Summed Feature 6	0.33	----	3592

TR: Tiempo de retención

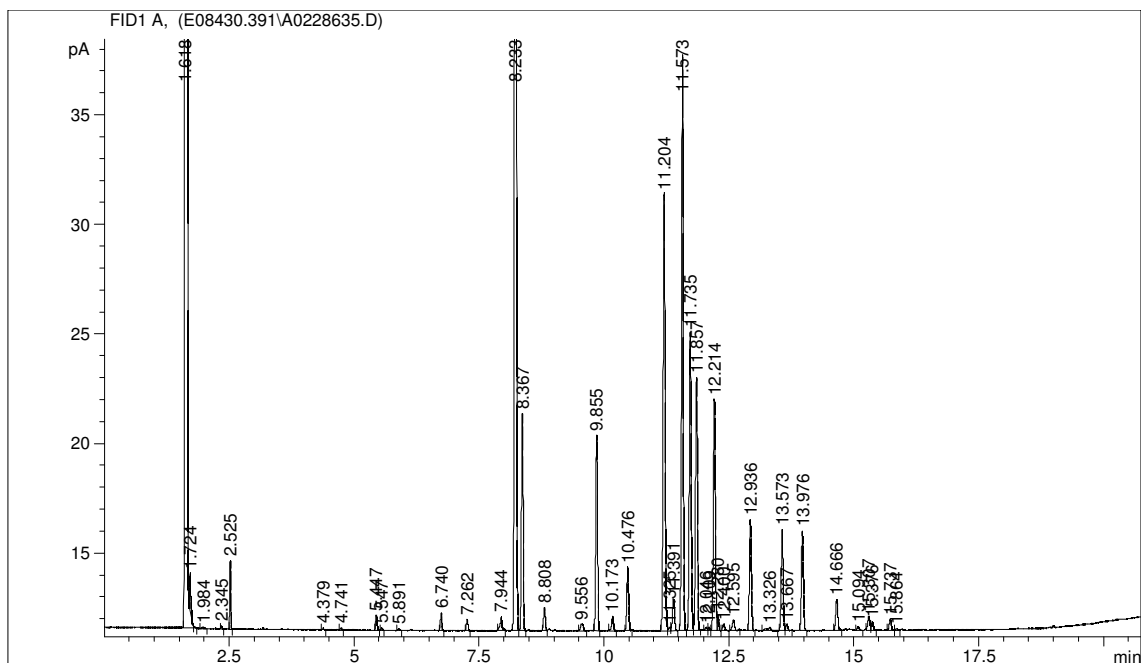


Perfiles obtenidos para la cepa SG 10.

M65



TSA



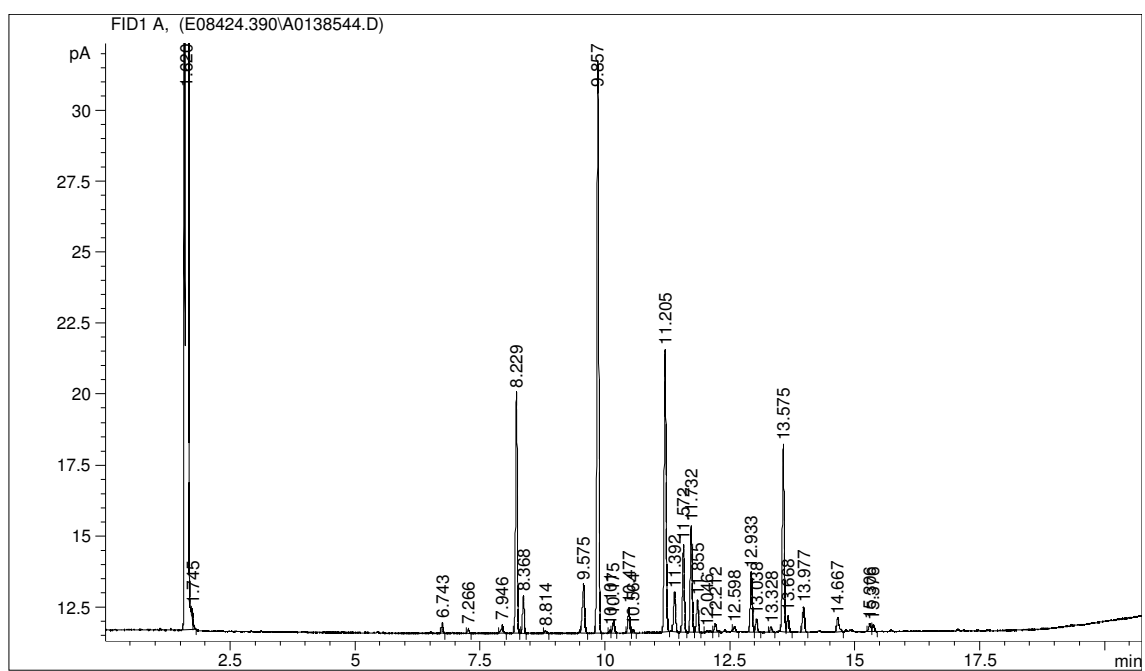
## SG 15

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.620	3,47E+11	SOLVENT PEAK	----	1.619	3.44E+8
	----	1.745	9345		----	1.726	2371
14:0 ISO	0.51	4.382	326		----	2.528	486
14:0	0.23	5.450	760	13:0 ISO	0.08	5.450	249
15:1 ISO G	0.57	5.553	330	14:0 ISO	0.34	6.745	1063
15:0 ISO	12.31	6.745	11525	15:1 ISO G	0.34	7.944	1070
15:0 ANTEISO	1.88	7.267	729	15:0 ISO	17.96	8.232	57534
15:0	0.15	7.947	642	15:0 ANTEISO	1.69	8.370	5433
16:1 ISO H	3.26	8.231	44692	15:0	1.00	8.813	3253
16:0 ISO	30.12	8.371	18545	16:1 ISO H	2.57	9.579	8432
16:1 w9c	0.15	8.812	1402	16:0 ISO	22.28	9.860	73337
Sum In Feature 3	0.73	9.579	6655	Sum In Feature 3	0.22	10.178	714
16:0	1.33	9.860	130005	16:0	0.52	10.479	1729
	----	10.177	2012		----	10.568	1243
ISO 17:1 w9c	15.58	10.481	5709	ISO 17:1 w9c	16.92	11.207	56734
ANTEISO 17:1 w9c	2.19	10.566	7168	ANTEISO 17:1 w9c	1.76	11.396	5899
17:0 ISO	4.63	11.211	16272	17:0 ISO	5.54	11.574	18665
17:0 ANTEISO	5.75	11.396	1323	17:0 ANTEISO	4.08	11.735	13752
17:1 w8c	1.74	11.575	7967	17:1 w8c	9.78	11.860	33036
17:0 CYCLO	0.17	11.735	11208	17:0	3.35	12.217	11373
17:0	0.50	11.858	5786		----	12.282	1188
	----	12.217	5278		----	12.403	740
17:0 10 methyl	3.28	12.286	4078		----	12.603	1380
18:1 ISO H	0.70	12.403	1730	17:0 10 methyl	5.21	12.940	17795
18:0 ISO	0.29	12.598	929	18:1 ISO H	0.92	13.042	3133
18:1 w9c	10.23	12.939	15706	18:0 ISO	0.32	13.332	1087
18:1 w7c	0.88	13.330	675	18:1 w9c	2.04	13.578	7004
18:0	1.42	13.577	7927	18:1 w7c	0.57	13.669	1955
TBSA 10Me18:0	0.94	13.671	1125	18:0	0.80	13.982	2755
Sum In Feature 6	0.46	13.981	4179	TBSA 10Me18:0	0.90	14.671	3126
	----	14.671	6470	Sum In Feature 6	0.56	15.312	1944
Summed Feature 3	0.73	15.315	917		----	15.382	9931
Summed Feature 6	0.46	----	2012	19:0	0.26	15.742	905
				Summed Feature 3	0.22	----	714
				Summed Feature 6	0.56	----	1944

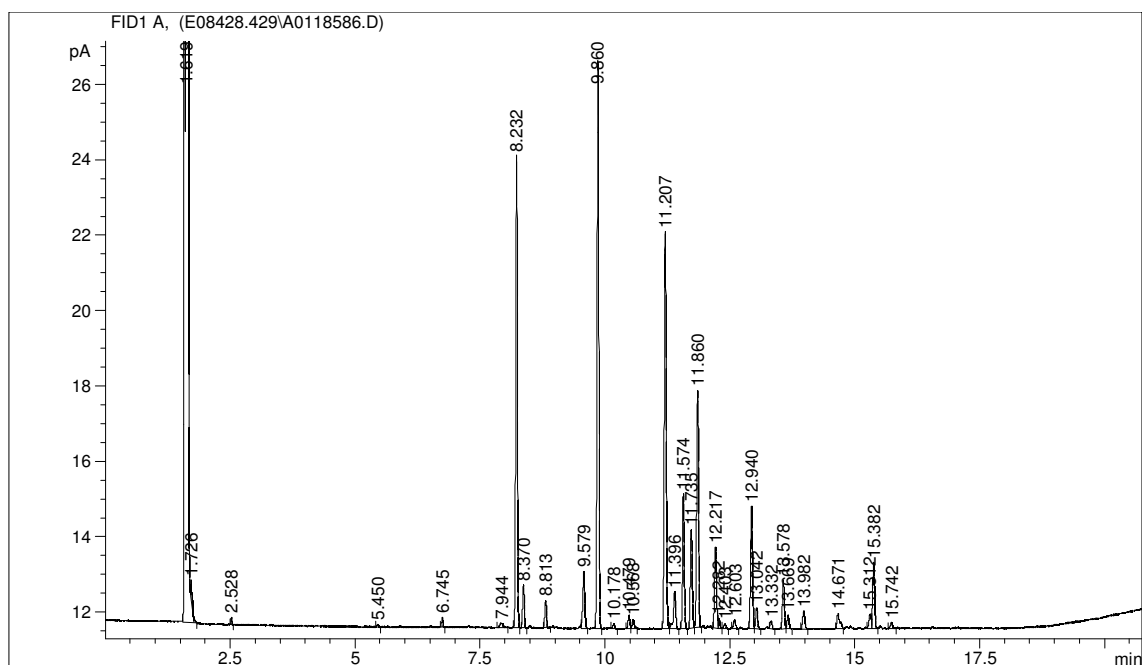
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa SG 15.

M65



TSA



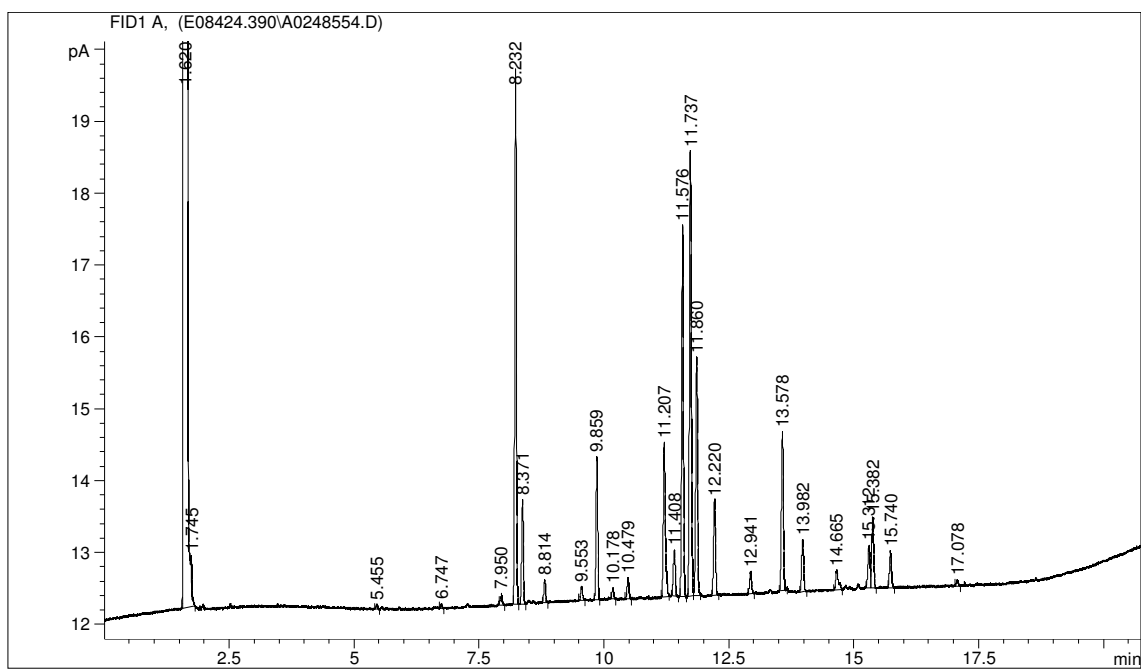
## SG 16

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.620	3.452E+8	SOLVENT PEAK	----	1.619	3.638E+8
	----	1.745	809		----	1.745	3716
13:0 ISO	0.15	5.455	246		----	1.890	166
14:0 ISO	0.14	6.747	234		----	2.528	1166
15:1 ISO G	0.46	7.950	812	14:0 ISO	0.14	6.746	377
15:0 ISO	19.13	8.232	33645	14:0	0.14	7.263	382
15:0 ANTEISO	3.84	8.371	6771	15:1 ISO G	0.42	7.949	1208
15:0	0.84	8.814	1494	15:0 ISO	25.48	8.231	73250
16:1 ISO G	0.56	9.553	1011	15:0 ANTEISO	2.24	8.370	6467
16:0 ISO	5.35	9.859	9660	15:0	0.45	8.813	1315
Sum In Feature 3	0.43	10.178	772	16:1 ISO G	0.41	9.551	1211
16:0	0.85	10.479	1541	16:0 ISO	3.33	9.859	9842
ISO 17:1 w9c	6.72	11.207	12350	Sum In Feature 3	0.33	10.177	970
17:1 ANTEISO A	1.93	11.408	3558	16:0	0.64	10.479	1919
17:0 ISO	14.90	11.576	27497	ISO 17:1 w9c	14.14	11.207	42554
17:0 ANTEISO	17.47	11.737	32296	ANTEISO 17:1 w9c	1.79	11.404	5384
17:1 w8c	9.29	11.860	17190	17:0 ISO	18.10	11.577	54705
17:0	3.87	12.220	7182	17:0 ANTEISO	13.47	11.737	40769
17:0 10 methyl	0.84	12.941	1576	17:1 w8c	5.08	11.858	15414
18:1 w9c	6.57	13.578	12358	17:0	2.54	12.216	7746
18:0	2.13	13.982	4011	17:0 10 methyl	0.88	12.940	2700
TBSA 10Me18:0	1.10	14.665	2095	18:1 w9c	4.92	13.578	15161
Sum In Feature 6	1.75	15.312	3331	18:1 w7c	0.15	13.669	478
	----	15.382	5611	18:0	1.75	13.982	5412
19:0	1.44	15.740	2756	TBSA 10Me18:0	1.47	14.668	4558
20:1 w9c	0.23	17.078	448	19:0 ISO	0.19	15.094	589
Summed Feature 3	0.43	----	772	Sum In Feature 6	0.99	15.309	3086
Summed Feature 6	1.75	----	3331		----	15.379	5449
				19:0	0.95	15.740	970
				Summed Feature 3	0.33	----	3086
				Summed Feature 6	0.99	----	3086

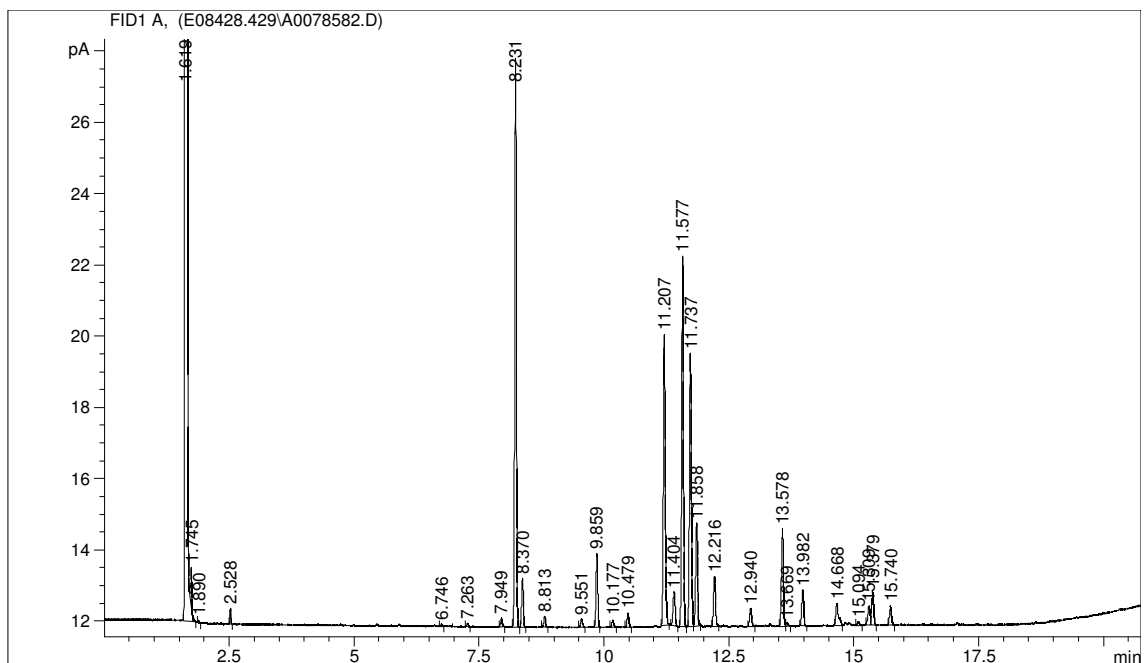
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa SG 16.

M65



TSA



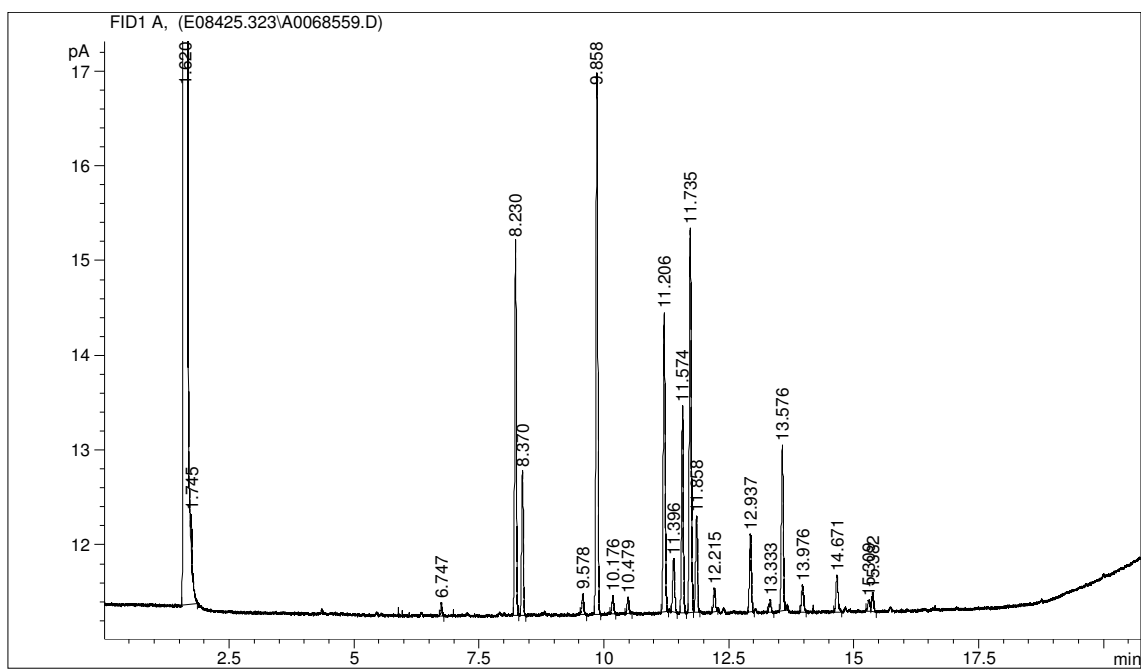
## SGA 3

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.620	3.466E+8	SOLVENT PEAK	----	1.619	3.449E+8
	----	1.745	858		----	1.725	6634
14:0 ISO	0.48	6.747	603		----	1.956	760
15:0 ISO	13.89	8.230	18093		----	2.527	2406
15:0 ANTEISO	5.41	8.370	7067	13:0 ISO	0.27	5.449	601
16:1 ISO H	0.90	9.578	1201	13:0 ANTEISO	0.11	5.552	239
16:0 ISO	21.15	9.858	28283	14:0 ISO	0.26	6.742	603
Sum In Feature 3	0.71	10.176	958	15:1 ISO F	0.55	7.908	1309
16:0	0.67	10.479	909	15:0 ISO	17.96	8.229	42803
ISO 17:1 w9c	12.07	11.206	16420	15:0 ANTEISO	5.21	8.368	12447
ANTEISO 17:1 w9c	2.22	11.396	3020	16:1 ISO H	0.22	9.578	527
17:0 ISO	8.35	11.574	11407	16:0 ISO	7.65	9.857	18723
17:0 ANTEISO	15.48	11.735	21185	16:0	0.19	10.476	479
17:1 w8c	3.90	11.858	5338	ISO 17:1 w9c	17.30	11.205	43153
17:0	0.98	12.215	1344	ANTEISO 17:1 w9c	2.61	11.391	6518
17:0 10 methyl	3.10	12.937	4295	17:0 ISO	12.60	11.573	31570
18:0 ISO	0.51	13.333	702	17:0 ANTEISO	20.76	11.735	52129
18:1 w9c	6.82	13.576	9478	17:1 w8c	2.57	11.857	6465
18:0	1.19	13.976	1657	17:1 w5c	0.36	12.055	905
TBSA 10Me18:0	1.65	14.671	2316	17:0	1.12	12.214	2816
Sum In Feature 6	0.52	15.309	731	16:1 2OH	1.02	12.284	2584
	----	15.382	1116		----	12.402	2035
Summed Feature 3	0.71	----	958		----	12.599	1427
Summed Feature 6	0.52	----	731	17:0 10 methyl	3.04	12.936	7744
				18:0 ISO	0.18	13.330	446
				18:1 w9c	2.46	13.575	6292
				18:0	0.55	13.978	1417
				TBSA 10Me18:0	2.37	14.668	6118
					----	14.836	716
				Sum In Feature 6	0.64	15.306	1660
					----	15.377	2592
				Summed Feature 6	0.64	----	1660

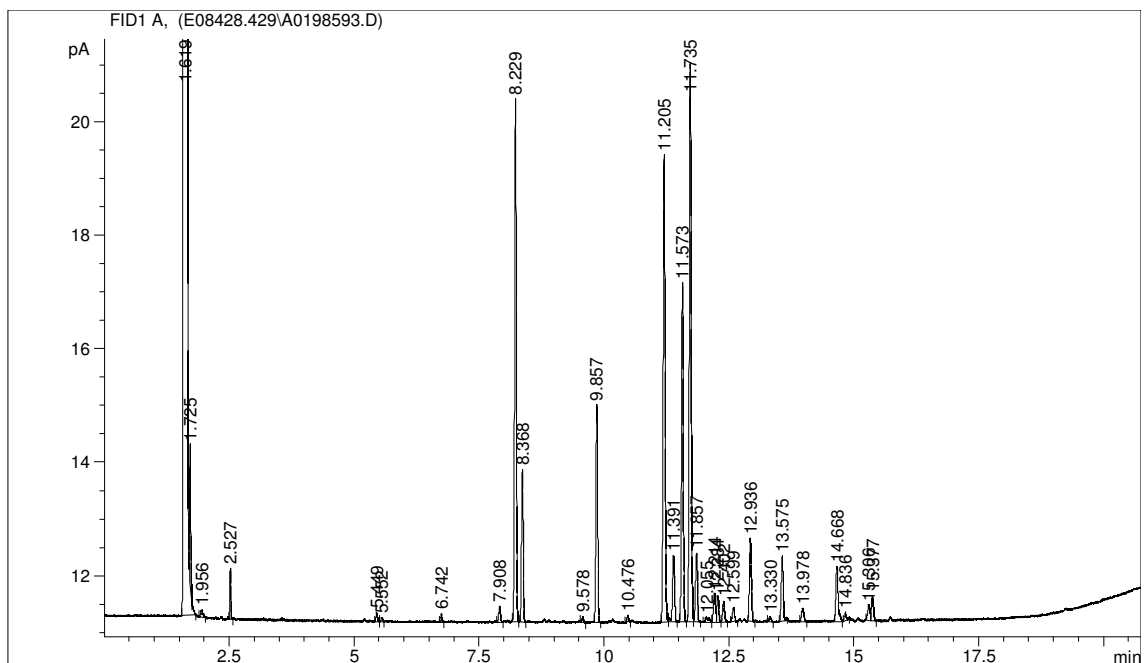
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa SGA 3.

M65



TSA



## SGA 5

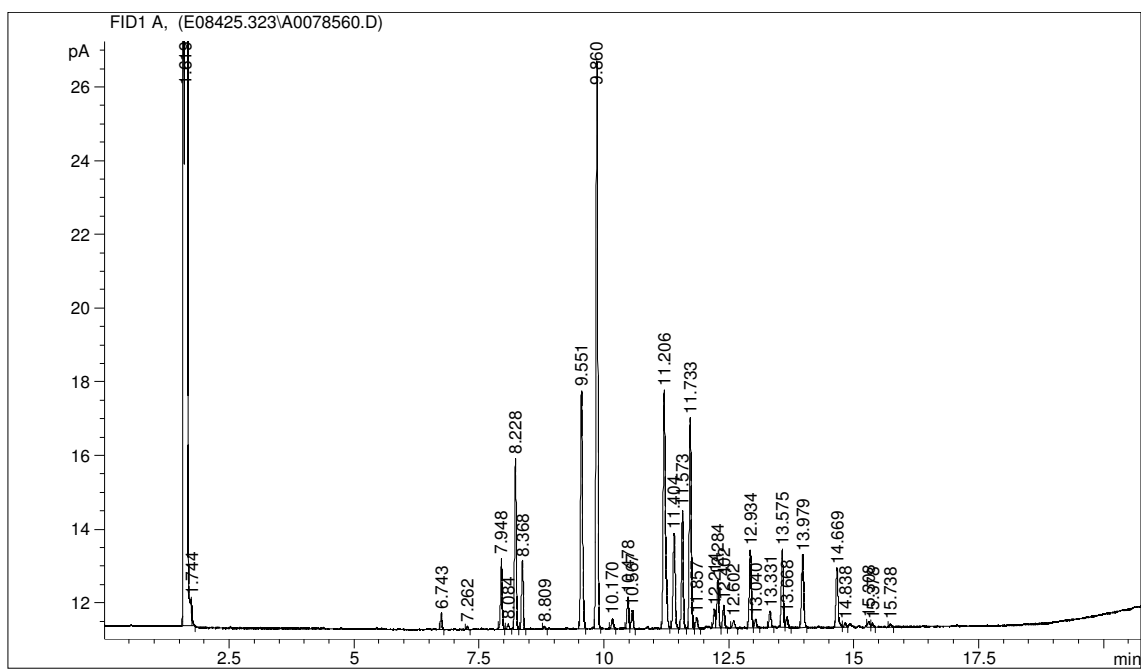
M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.619	3.465E+8	SOLVENT PEAK	----	1.619	3.564E+8
	----	1.744	764		----	1.725	5303
14:0 ISO	0.61	6.743	1839		----	1.867	136
14:0	0.12	7.262	356		----	1.995	160
15:1 ISO G	2.93	7.948	9128		----	2.348	323
15:1 ANTEISO A	0.24	8.084	755		----	2.527	1616
15:0 ISO	6.77	8.228	21214		----	2.731	1647
15:0 ANTEISO	2.83	8.368	8879	12:0 ISO	0.07	4.383	452
15:0	0.09	8.809	287	12:0	0.09	4.738	611
16:1 ISO G	11.22	9.551	35907		----	5.203	351
16:0 ISO	24.01	9.860	77223	13:0 ISO	0.14	5.449	953
Sum In Feature 3	0.45	10.170	1452	13:0 ANTEISO	0.03	5.553	221
16:0	1.32	10.478	4277	13:0	0.03	5.897	237
	----	10.567	2616	12:0 3OH	0.04	6.515	312
ISO 17:1 w9c	12.34	11.206	40389	14:0 ISO	0.57	6.743	4011
17:1 ANTEISO A	4.51	11.404	14802	14:0	0.09	7.264	658
17:0 ISO	5.11	11.573	16774	15:1 ISO G	2.04	7.946	14583
17:0 ANTEISO	9.14	11.733	30087	15:1 ANTEISO A	0.09	8.076	642
17:1 w8c	0.48	11.857	1586	15:0 ISO	17.17	8.231	123672
17:0	0.79	12.214	2598	15:0 ANTEISO	2.59	8.369	18730
16:1 2OH	2.09	12.284	6907	15:1 w8c	0.18	8.494	1292
	----	12.402	3290	15:0	0.69	8.812	4991
	----	12.602	1158		----	8.902	650
17:0 10 methyl	3.48	12.934	11567	16:1 ISO G	5.09	9.556	37471
18:1 ISO H	0.37	13.040	1244	16:0 ISO	16.33	9.860	120855
18:0 ISO	0.67	13.331	2247	Sum In Feature 3	0.31	10.173	2310
18:1 w9c	3.42	13.575	11433	16:0	0.57	10.478	4224
18:1 w7c	0.45	13.668	1492		----	10.565	3013
18:0	3.37	13.979	11291	ISO 17:1 w9c	19.89	11.209	149924
TBSA 10Me18:0	2.81	14.669	9472	ANTEISO 17:1 w9c	3.39	11.397	25624
	----	14.838	707	17:0 ISO	4.46	11.574	33746
Sum In Feature 6	0.26	15.308	891	17:0 ANTEISO	5.99	11.736	45408
	----	15.378	470	17:1 w8c	8.10	11.858	61567
19:0	0.13	15.738	447	17:1 w5c	0.06	12.054	473
Summed Feature 3	0.45	----	1452	17:0	1.67	12.216	12701
Summed Feature 6	0.26	----	891	16:1 2OH	0.53	12.283	4072
					----	12.401	2823
					----	12.597	2251
				17:0 10 methyl	3.86	12.936	29623
				18:1 ISO H	0.37	13.041	2844
				18:0 ISO	0.23	13.330	1770
				18:1 w9c	2.23	13.576	17198
				18:1 w7c	0.22	13.668	1683
				18:0	0.81	13.979	6283
				TBSA 10Me18:0	1.08	14.667	8441
					----	14.838	1236
				17:0 3OH	0.15	14.925	1177
				Sum In Feature 6	0.68	15.308	5302
					----	15.382	7856
				19:0	0.17	15.739	1324
					----	15.866	537
				Summed Feature 3	0.31	----	2310
				Summed Feature 6	0.68	----	5302

TR: Tiempo de retención

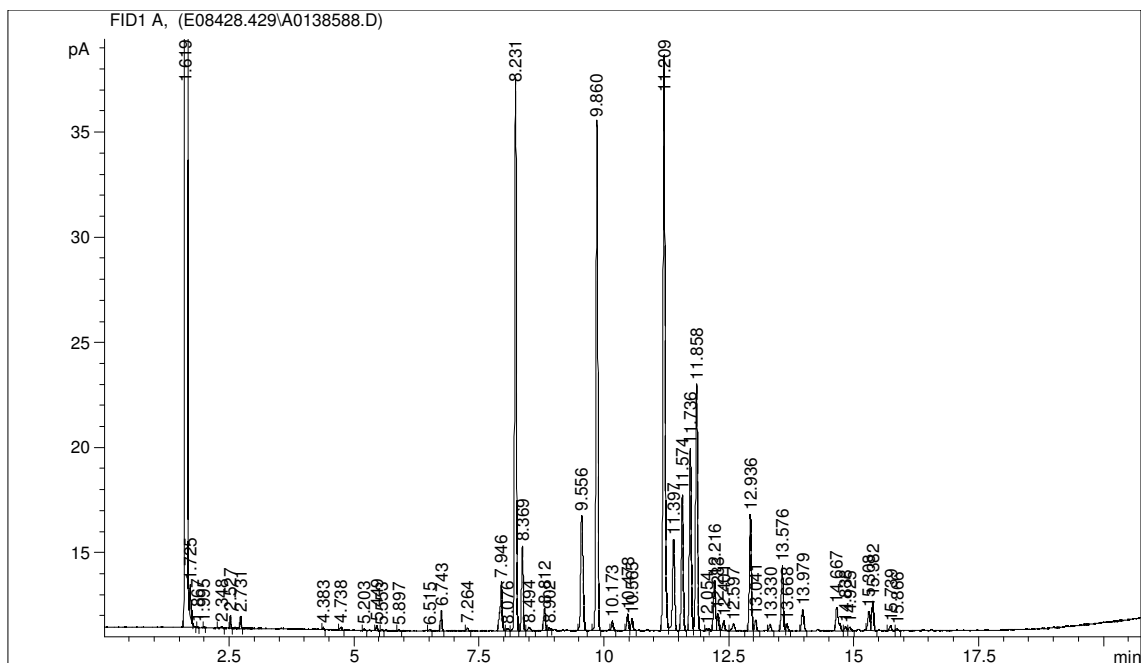


Perfiles obtenidos para la cepa SGA 5.

M65



TSA



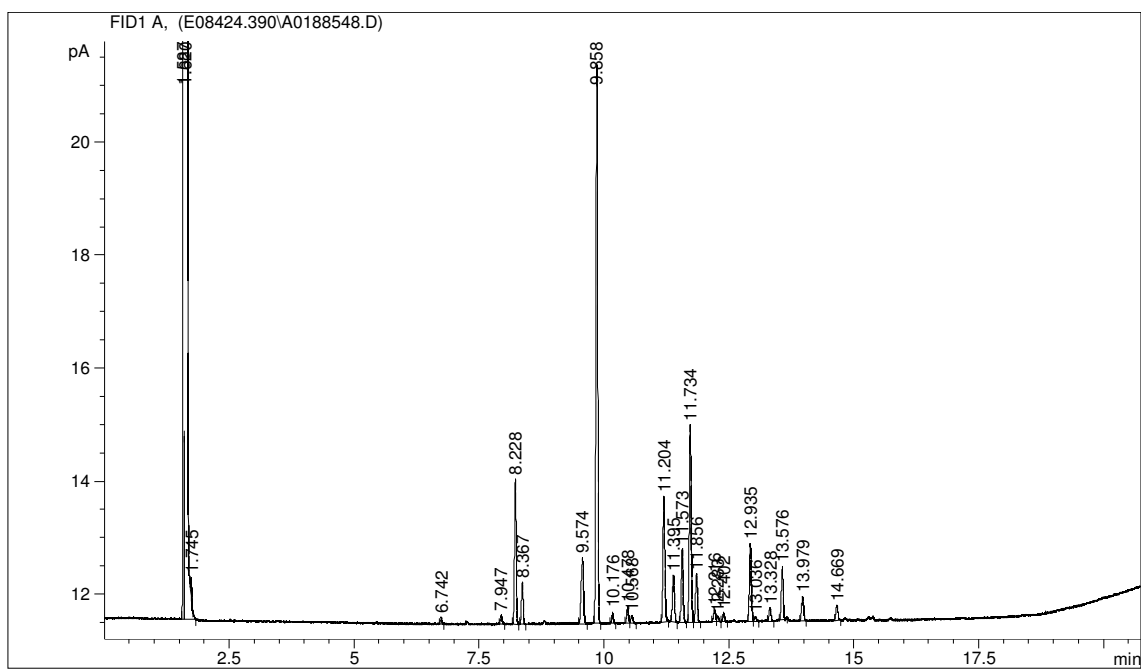
## SGA 9

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
	----	1.587	48771	SOLVENT PEAK	----	1.619	3.594E+8
SOLVENT PEAK	----	1.620	3.459E+8		----	1.745	2714
	----	1.745	907		----	2.527	501
14:0 ISO	0.38	6.742	498	13:0 ISO	0.05	5.453	287
15:1 ISO G	0.58	7.947	783	14:0 ISO	0.34	6.744	1967
15:0 ISO	8.75	8.228	11932	14:0	0.10	7.267	599
15:0 ANTEISO	2.51	8.367	3426	15:1 ISO G	0.53	7.949	3115
16:1 ISO H	5.67	9.574	7897	15:0 ISO	17.69	8.231	104976
16:0 ISO	34.69	9.858	48544	15:0 ANTEISO	3.29	8.370	19559
Sum In Feature 3	0.67	10.176	947	15:0	0.40	8.812	2372
16:0	1.01	10.478	1421	16:1 ISO H	2.75	9.574	16684
	----	10.568	697	16:0 ISO	24.70	9.863	150579
ISO 17:1 w9c	8.33	11.204	11871	Sum In Feature 3	0.46	10.178	2809
ANTEISO 17:1 w9c	3.17	11.395	4527	16:0	1.24	10.480	7616
17:0 ISO	4.76	11.573	6814		----	10.567	2099
17:0 ANTEISO	12.84	11.734	18397	ISO 17:1 w9c	8.14	11.209	50530
17:1 w8c	3.12	11.856	4479	ANTEISO 17:1 w9c	2.43	11.397	15119
17:0	0.81	12.216	1160	17:0 ISO	7.43	11.577	46330
16:1 2OH	0.36	12.283	522	17:0 ANTEISO	13.28	11.738	83036
	----	12.402	824	17:1 w8c	4.28	11.861	26804
17:0 10 methyl	5.12	12.935	7420	17:0	2.51	12.218	15786
18:1 ISO H	0.30	13.036	441		----	12.285	1634
18:0 ISO	0.90	13.328	1313		----	12.403	2626
18:1 w9c	3.31	13.576	4825		----	12.596	531
18:0	1.68	13.979	2461	17:0 10 methyl	4.07	12.940	25766
TBSA 10Me18:0	1.05	14.669	1544	18:1 ISO H	0.14	13.040	863
Summed Feature 3	0.67	----	947	18:0 ISO	0.64	13.333	4064
	----	1.587	48771	18:1 w9c	2.12	13.577	13486
				18:1 w7c	0.16	13.669	1011
				18:0	1.92	13.981	12303
				TBSA 10Me18:0	0.85	14.672	5434
				19:0 ISO	0.09	15.097	564
				Sum In Feature 6	0.25	15.308	1616
					----	15.381	1624
				19:0	0.17	15.741	1071
				Summed Feature 3	0.46	----	2809
				Summed Feature 6	0.25	----	1616

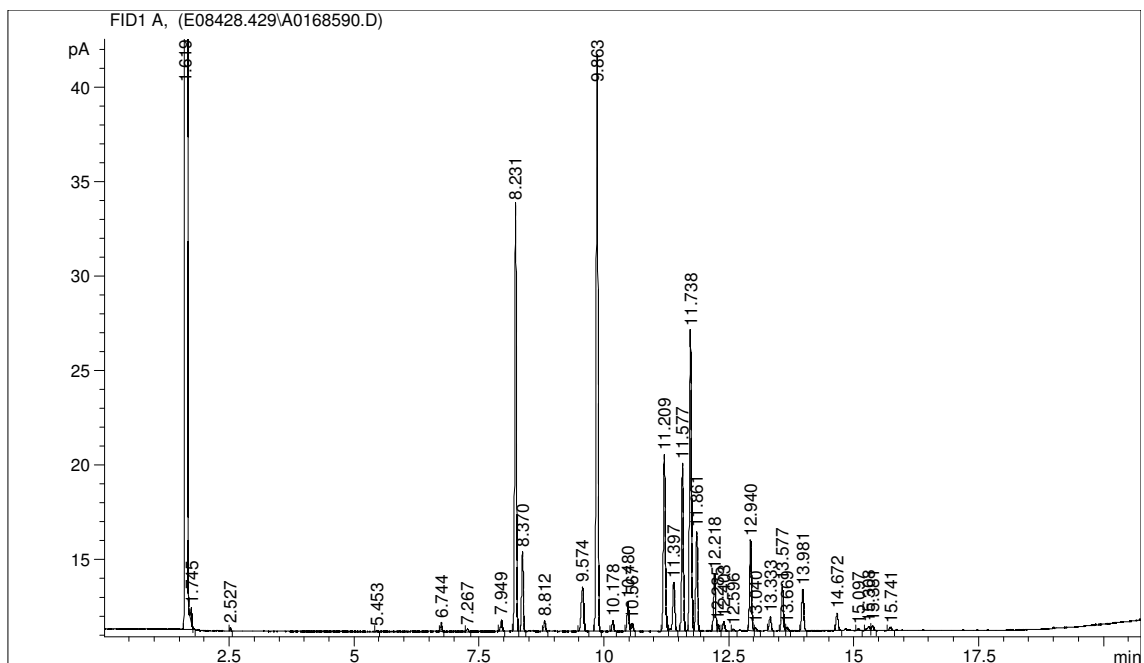
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa SGA 9.

M65



TSA



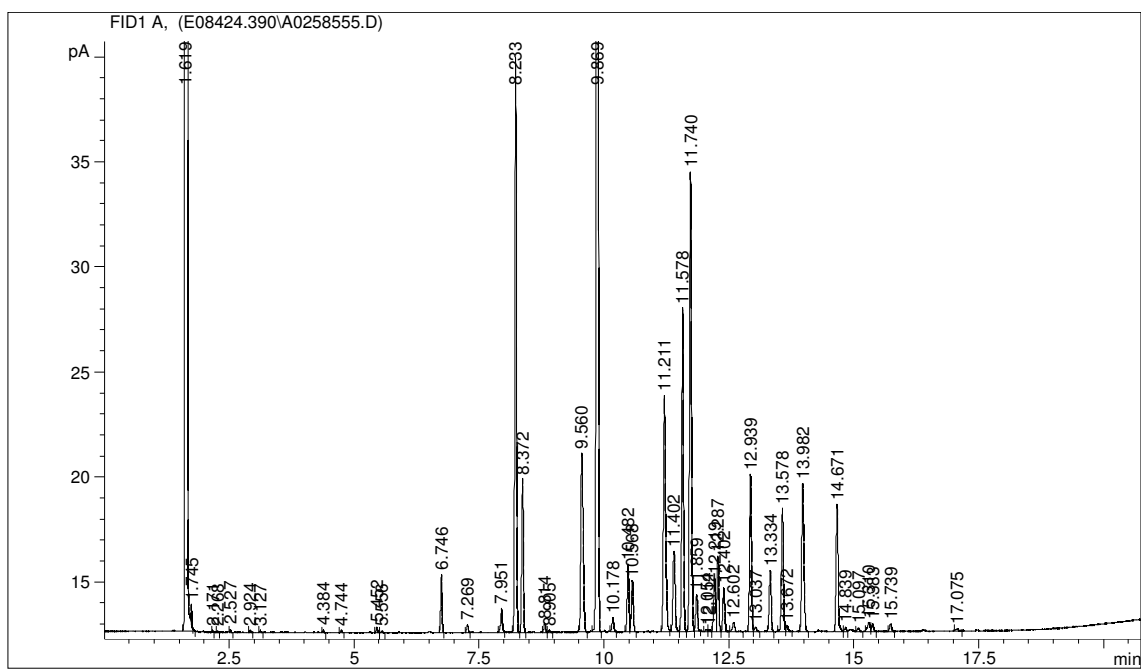
## SGA 16

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.619	3.611E+8	SOLVENT PEAK	----	1.618	3,60E+11
	----	1.745	2230		----	1.724	3772
	----	2.171	209		----	2.525	547
	----	2.268	174	11:0 ISO	0.03	4.379	322
	----	2.527	531	13:0 ISO	0.20	5.447	4123
10:0 ISO	0.03	2.924	298	13:0 ANTEISO	0.05	5.550	868
10:0	0.02	3.127	225	14:0 ISO	0.46	5.893	880
12:0 ISO	0.05	4.384	533	15:1 ISO F	0.16	6.741	28477
12:0	0.04	4.744	388	15:0 ISO	27.82	7.263	1161
13:0 ISO	0.10	5.452	1050	15:0 ANTEISO	4.35	7.944	1539
13:0 ANTEISO	0.03	5.556	349	15:0	0.38	8.004	850
14:0 ISO	1.07	6.746	11532		----	8.230	252481
14:0	0.15	7.269	1634	16:1 ISO H	1.28	8.367	66554
15:1 ISO G	0.52	7.951	5682	16:0 ISO	19.81	8.491	527
15:0 ISO	11.17	8.233	123716	Sum In Feature 3	0.14	8.586	1230
15:0 ANTEISO	3.06	8.372	33923	16:0	0.42	8.808	24959
15:0	0.18	8.814	2001		----	8.896	228
	----	8.905	422	ISO 17:1 w9c	7.98	9.575	11872
16:1 ISO G	4.98	9.560	56335	ANTEISO 17:1 w9c	1.71	9.859	196772
16:0 ISO	33.75	9.869	383592	17:0 ISO	9.82	10.173	5428
Sum In Feature 3	0.30	10.178	3419	17:0 ANTEISO	11.80	10.475	10962
16:0	1.41	10.482	16142	17:1 w8c	2.78	10.563	7554
	----	10.568	12565	17:1 w5c	0.18	11.205	54043
ISO 17:1 w9c	5.93	11.211	68582	17:0	2.80	11.390	3877
ANTEISO 17:1 w9c	2.00	11.402	23194	16:1 2OH	1.64	11.571	28207
17:0 ISO	6.94	11.578	80575		----	11.733	26617
17:0 ANTEISO	9.97	11.740	115981		----	11.857	88669
17:1 w8c	0.81	11.859	9387	17:0 10 methyl	3.54	11.974	833
	----	12.054	649	18:0 ISO	0.45	12.051	788
	----	12.112	560	18:1 w9c	0.57	12.214	47780
17:0	1.15	12.219	13464	18:0	0.59	12.282	6062
16:1 2OH	1.63	12.287	19135	TBSA 10Me18:0	0.54	12.398	2845
	----	12.402	11489	Sum In Feature 6	0.33	12.597	1357
	----	12.602	2980		----	12.938	63873
17:0 10 methyl	3.36	12.939	39554	19:0	0.14	13.327	1718
18:1 ISO H	0.11	13.037	1341	Summed Feature 3	0.14	13.572	13272
18:0 ISO	1.33	13.334	15666	Summed Feature 6	0.33	13.665	1695
18:1 w9c	2.78	13.578	32987				
18:1 w7c	0.14	13.672	1628				
18:0	3.55	13.982	42199				
TBSA 10Me18:0	2.86	14.671	34117				
	----	14.839	1109				
19:0 ISO	0.09	15.097	1101				
Sum In Feature 6	0.27	15.310	3214				
	----	15.383	2110				
19:0	0.18	15.739	2204				
20:1 w9c	0.05	17.075	550				
Summed Feature 3	0.30	----	3419				
Summed Feature 6	0.27	----	3214				

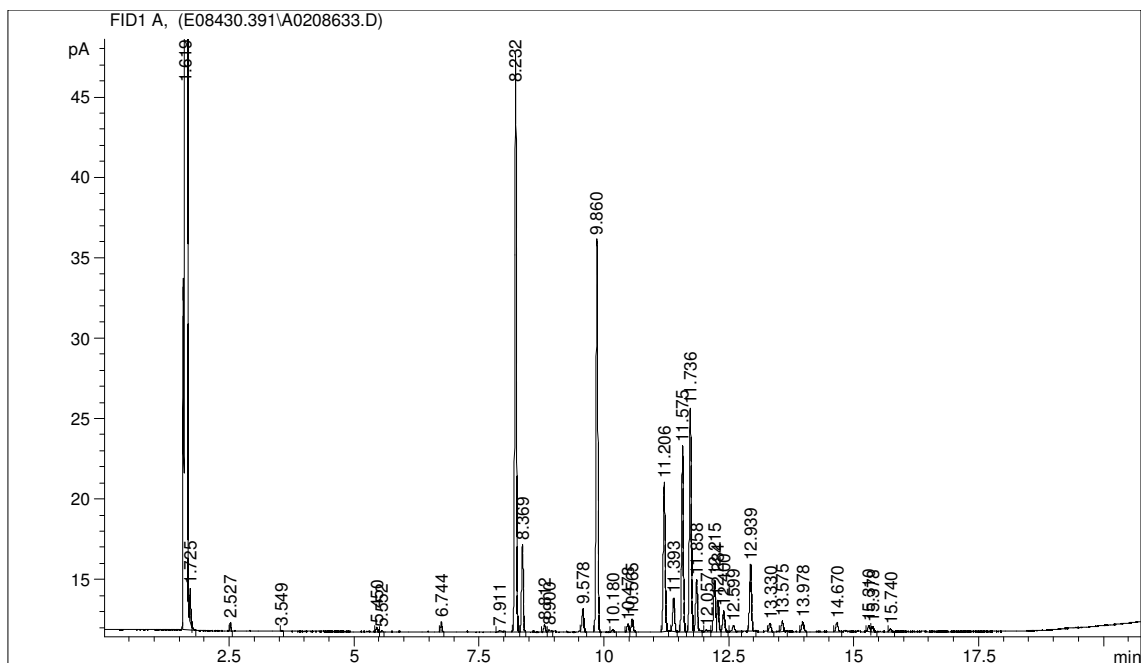
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa SGA 16.

M65



TSA



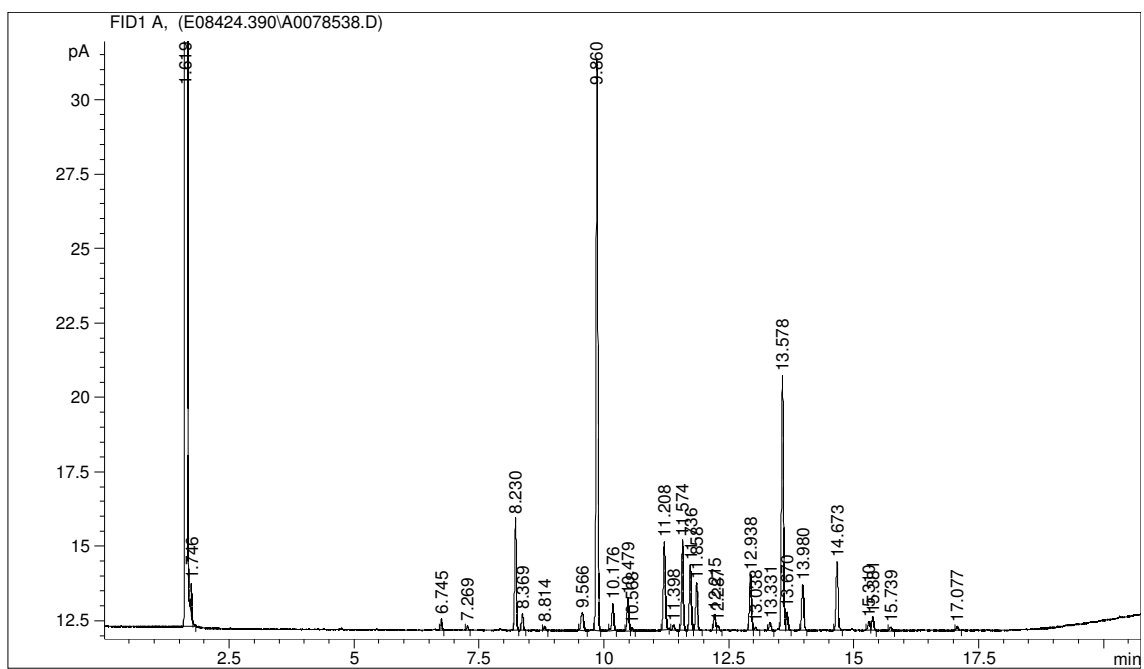
## SGA 18

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.619	3.647E+8		----	1.587	84350
	----	1.746	2512	SOLVENT PEAK	----	1.619	3.441E+8
14:0 ISO	0.63	6.745	1610		----	1.726	6402
14:0	0.26	7.269	675		----	2.349	230
15:0 ISO	6.52	8.230	17203		----	2.528	1690
15:0 ANTEISO	0.97	8.369	2569	12:0 ISO	0.10	4.380	314
15:0	0.26	8.814	685	13:0 ISO	0.12	5.449	382
16:1 ISO H	1.69	9.566	4572	14:0 ISO	0.71	6.744	2438
16:0 ISO	34.14	9.860	92496	14:0	0.08	7.267	286
Sum In Feature 3	1.82	10.176	4966	15:1 ISO F	0.16	7.911	555
16:0	1.96	10.479	5365	15:0 ISO	10.18	8.229	35997
	----	10.568	437	15:0 ANTEISO	1.32	8.367	4677
ISO 17:1 w9c	5.93	11.208	16342	15:0	1.05	8.811	3753
ANTEISO 17:1 w9c	0.29	11.398	808		----	9.499	1458
17:0 ISO	5.61	11.574	15552	16:1 ISO H	1.57	9.571	5684
17:0 ANTEISO	4.18	11.736	11609	16:0 ISO	36.55	9.860	132833
17:1 w8c	3.09	11.858	8591	Sum In Feature 3	0.34	10.175	1224
17:0	1.01	12.215	2817	16:0	0.60	10.478	2206
16:1 2OH	0.31	12.287	854		----	10.562	980
17:0 10 methyl	3.66	12.938	10281		----	10.623	567
18:1 ISO H	0.22	13.038	628	ISO 17:1 w9c	5.93	11.205	21946
18:0 ISO	0.53	13.331	1489	ANTEISO 17:1 w9c	0.38	11.393	1402
18:1 w9c	16.93	13.578	47839	17:0 ISO	4.57	11.573	16977
18:1 w7c	1.15	13.670	3263	17:0 ANTEISO	3.90	11.733	14545
18:0	3.11	13.980	8815	17:1 w8c	9.54	11.859	35574
TBSA 10Me18:0	4.64	14.673	13214	17:0	2.07	12.212	7735
Sum In Feature 6	0.58	15.310	1646	16:1 2OH	0.24	12.284	908
	----	15.381	2581		----	12.598	818
19:0	0.26	15.739	744	17:0 10 methyl	12.54	12.938	47321
20:1 w9c	0.24	17.077	699	18:1 ISO H	0.31	13.039	1170
Summed Feature 3	1.82	----	4966	18:0 ISO	0.80	13.330	3043
Summed Feature 6	0.58	----	1646	18:1 w9c	3.49	13.573	13245
				18:1 w7c	0.26	13.668	988
				18:0	0.67	13.979	2537
				TBSA 10Me18:0	13.979	14.670	6887
				Sum In Feature 6	0.64	15.310	2455
					----	15.380	5391
				19:0	0.11	15.739	425
					----	16.449	400
				Summed Feature 3	0.34	----	1224
				Summed Feature 6	0.64	----	2455

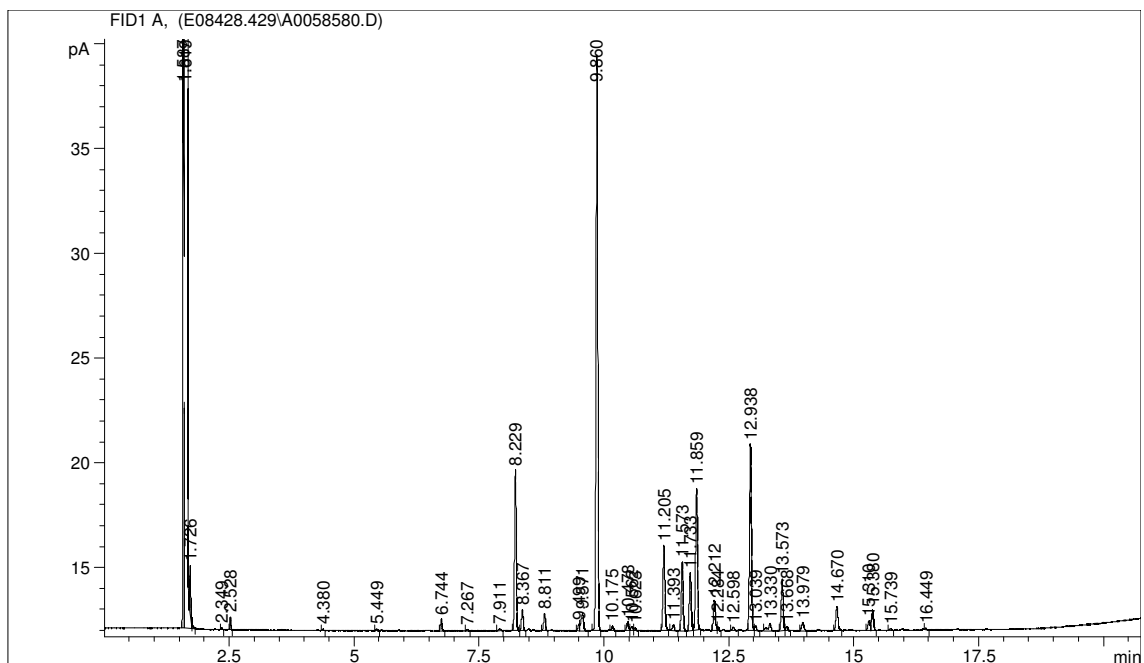
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa SGA 18.

M65



TSA



## SGA 18

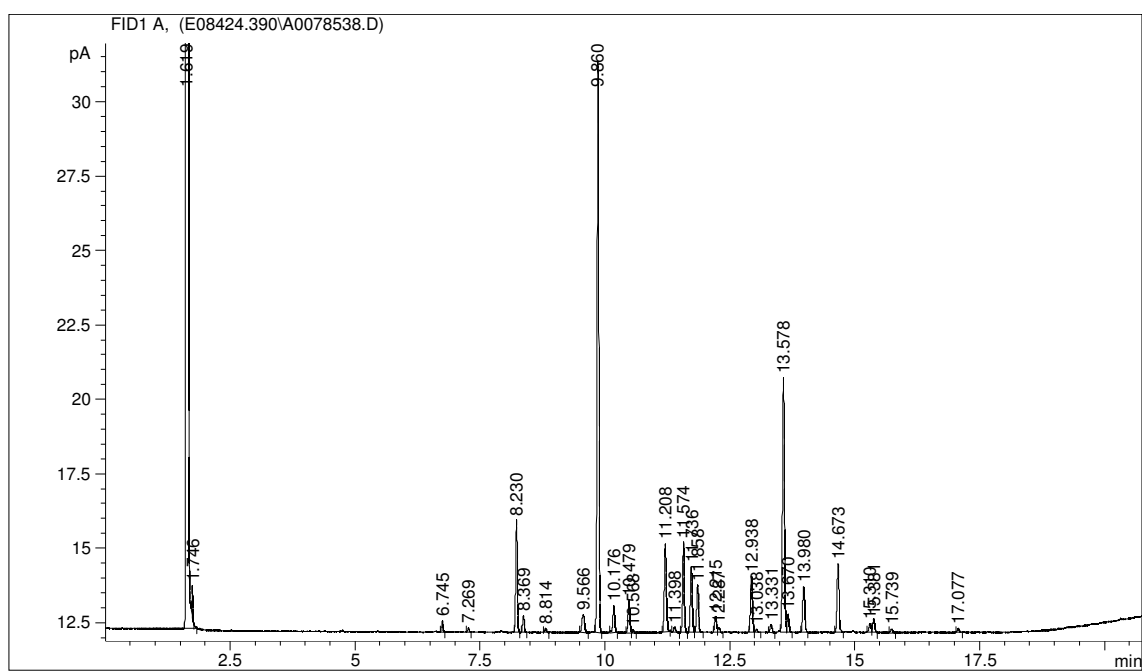
M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.619	3.647E+8		----	1.587	84350
	----	1.746	2512	SOLVENT PEAK	----	1.619	3.441E+8
14:0 ISO	0.63	6.745	1610		----	1.726	6402
14:0	0.26	7.269	675		----	2.349	230
15:0 ISO	6.52	8.230	17203		----	2.528	1690
15:0 ANTEISO	0.97	8.369	2569	12:0 ISO	0.10	4.380	314
15:0	0.26	8.814	685	13:0 ISO	0.12	5.449	382
16:1 ISO H	1.69	9.566	4572	14:0 ISO	0.71	6.744	2438
16:0 ISO	34.14	9.860	92496	14:0	0.08	7.267	286
Sum In Feature 3	1.82	10.176	4966	15:1 ISO F	0.16	7.911	555
16:0	1.96	10.479	5365	15:0 ISO	10.18	8.229	35997
	----	10.568	437	15:0 ANTEISO	1.32	8.367	4677
ISO 17:1 w9c	5.93	11.208	16342	15:0	1.05	8.811	3753
ANTEISO 17:1 w9c	0.29	11.398	808		----	9.499	1458
17:0 ISO	5.61	11.574	15552	16:1 ISO H	1.57	9.571	5684
17:0 ANTEISO	4.18	11.736	11609	16:0 ISO	36.55	9.860	132833
17:1 w8c	3.09	11.858	8591	Sum In Feature 3	0.34	10.175	1224
17:0	1.01	12.215	2817	16:0	0.60	10.478	2206
16:1 2OH	0.31	12.287	854		----	10.562	980
17:0 10 methyl	3.66	12.938	10281		----	10.623	567
18:1 ISO H	0.22	13.038	628	ISO 17:1 w9c	5.93	11.205	21946
18:0 ISO	0.53	13.331	1489	ANTEISO 17:1 w9c	0.38	11.393	1402
18:1 w9c	16.93	13.578	47839	17:0 ISO	4.57	11.573	16977
18:1 w7c	1.15	13.670	3263	17:0 ANTEISO	3.90	11.733	14545
18:0	3.11	13.980	8815	17:1 w8c	9.54	11.859	35574
TBSA 10Me18:0	4.64	14.673	13214	17:0	2.07	12.212	7735
Sum In Feature 6	0.58	15.310	1646	16:1 2OH	0.24	12.284	908
	----	15.381	2581		----	12.598	818
19:0	0.26	15.739	744	17:0 10 methyl	12.54	12.938	47321
20:1 w9c	0.24	17.077	699	18:1 ISO H	0.31	13.039	1170
Summed Feature 3	1.82	----	4966	18:0 ISO	0.80	13.330	3043
Summed Feature 6	0.58	----	1646	18:1 w9c	3.49	13.573	13245
				18:1 w7c	0.26	13.668	988
				18:0	0.67	13.979	2537
				TBSA 10Me18:0	1.80	14.670	6887
				Sum In Feature 6	0.64	15.310	2455
					----	15.380	5391
				19:0	0.11	15.739	425
					----	16.449	400
				Summed Feature 3	0.34	----	1224
				Summed Feature 6	0.64	----	2455

TR: Tiempo de retención

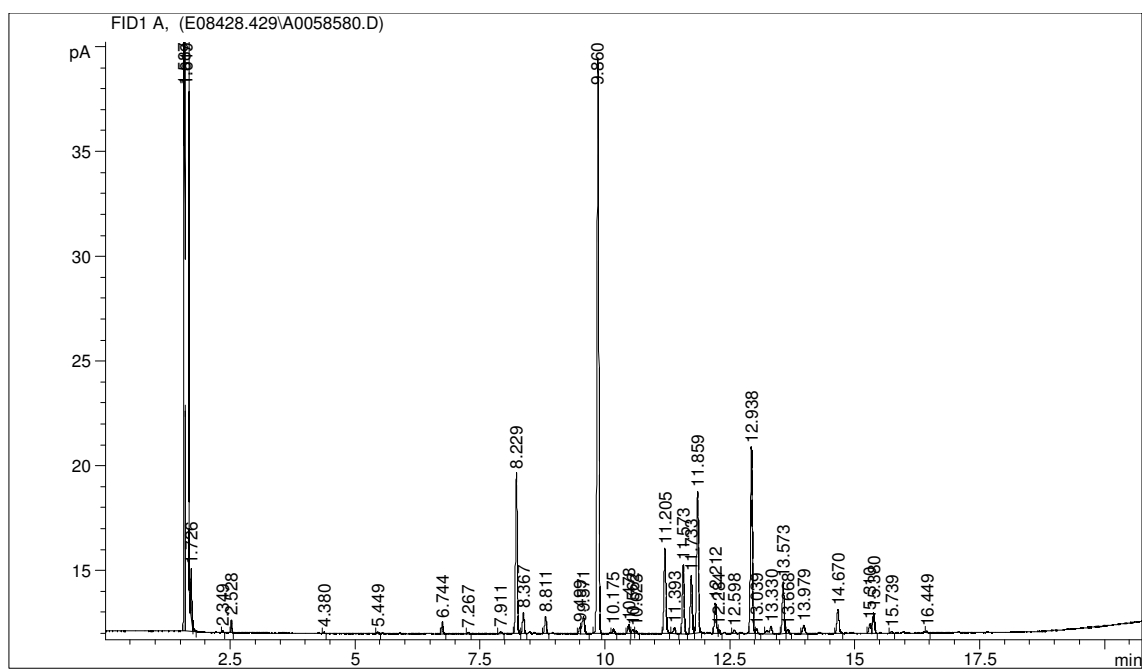


Perfiles obtenidos para la cepa SGA 18.

M65



TSA



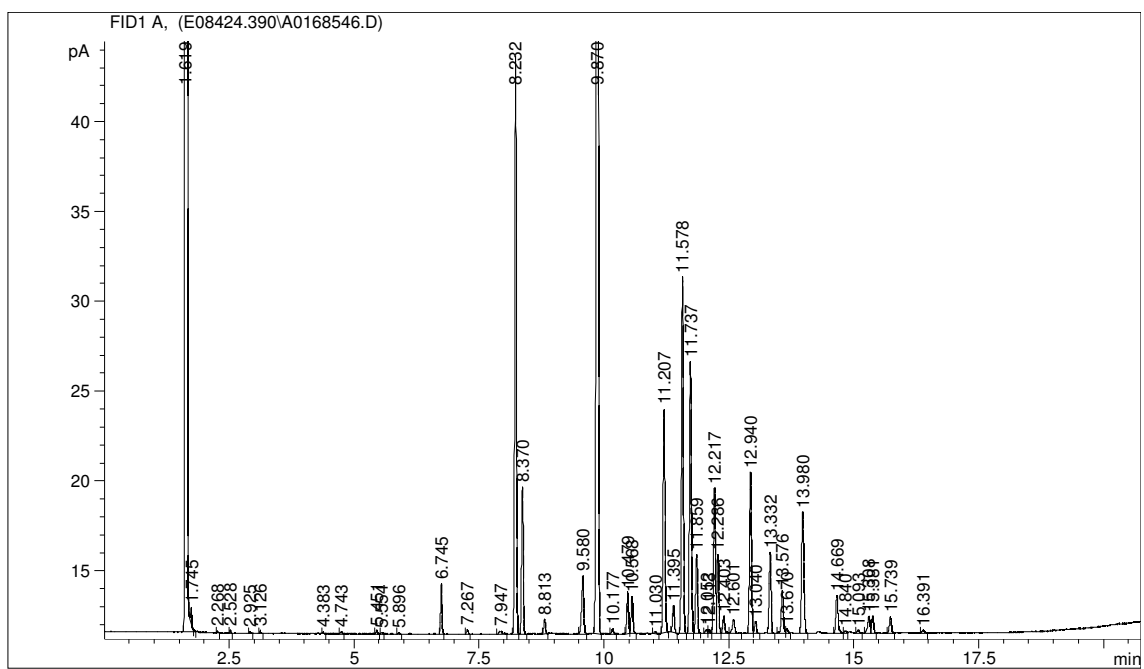
## SGA 21

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.619	3.616E+8	SOLVENT PEAK	----	1.618	3.411E+8
	----	1.745	2344		----	1.725	2449
	----	2.268	192		----	2.346	184
	----	2.528	450		----	2.526	998
10:0 ISO	0.04	2.925	233	13:0 ISO	0.09	5.446	369
10:0	0.06	3.126	396	12:0 3OH	0.11	6.511	448
12:0 ISO	0.06	4.383	386	14:0 ISO	0.93	6.741	3944
12:0	0.07	4.743	448	15:1 ISO F	0.40	7.905	1757
13:0 ISO	0.11	5.451	713	15:0 ISO	14.30	8.227	62743
13:0 ANTEISO	0.05	5.554	315	15:0 ANTEISO	1.77	8.366	7765
13:0	0.04	5.896	288	15:0	0.26	8.809	1142
14:0 ISO	1.64	6.745	11449		----	8.897	640
14:0	0.16	7.267	1137	16:1 ISO H	6.38	9.573	28622
15:1 ISO G	0.21	7.947	1486	16:0 ISO	31.06	9.858	140025
15:0 ISO	20.67	8.232	148988	Sum In Feature 3	0.25	10.173	1118
15:0 ANTEISO	5.35	8.370	38648	16:0	0.22	10.473	1014
15:0	0.49	8.813	3535		----	10.562	3436
16:1 ISO H	2.62	9.580	19273	ISO 17:1 w9c	18.04	11.205	82827
16:0 ISO	----	9.870	523669	ANTEISO 17:1 w9c	2.34	11.392	10751
Sum In Feature 3	0.20	10.177	1521	17:0 ISO	3.54	11.571	16328
16:0	1.53	10.479	11452	17:0 ANTEISO	2.83	11.732	13083
	----	10.568	10539	17:1 w8c	6.64	11.855	30728
	----	11.030	632	17:0	1.30	12.213	6046
ISO 17:1 w9c	9.04	11.207	68062		----	12.281	2656
ANTEISO 17:1 w9c	1.03	11.395	7738		----	12.402	708
17:0 ISO	13.50	11.578	102067	17:0 10 methyl	4.31	12.934	20165
17:0 ANTEISO	10.71	11.737	81106	18:1 ISO H	1.03	13.037	4810
17:1 w8c	3.04	11.859	23020	18:0 ISO	0.56	13.328	2635
	----	12.052	1191	18:1 w9c	1.75	13.572	8225
	----	12.113	1101	18:1 w7c	0.17	13.669	784
17:0	5.67	12.217	43135	18:0	0.80	14.002	3789
16:1 2OH	3.05	12.286	23222	TBSA 10Me18:0	0.61	14.664	2890
	----	12.403	5493	Sum In Feature 6	0.33	15.306	1587
	----	12.601	5275		----	15.378	5791
17:0 10 methyl	6.39	12.940	48971	Summed Feature 3	0.25	----	1118
18:1 ISO H	0.49	13.040	3730	Summed Feature 6	0.33	----	1587
18:0 ISO	3.13	13.332	24088				
18:1 w9c	1.84	13.576	14171				
18:1 w7c	0.16	13.670	1268				
18:0	5.42	13.980	41908				
TBSA 10Me18:0	1.61	14.669	12497				
	----	14.840	754				
19:0 ISO	0.11	15.093	887				
Sum In Feature 6	0.76	15.308	5937				
	----	15.381	5475				
19:0	0.65	15.739	5049				
Summed Feature 3	0.20	16.391	1095				
Summed Feature 6	0.76	----	1521				

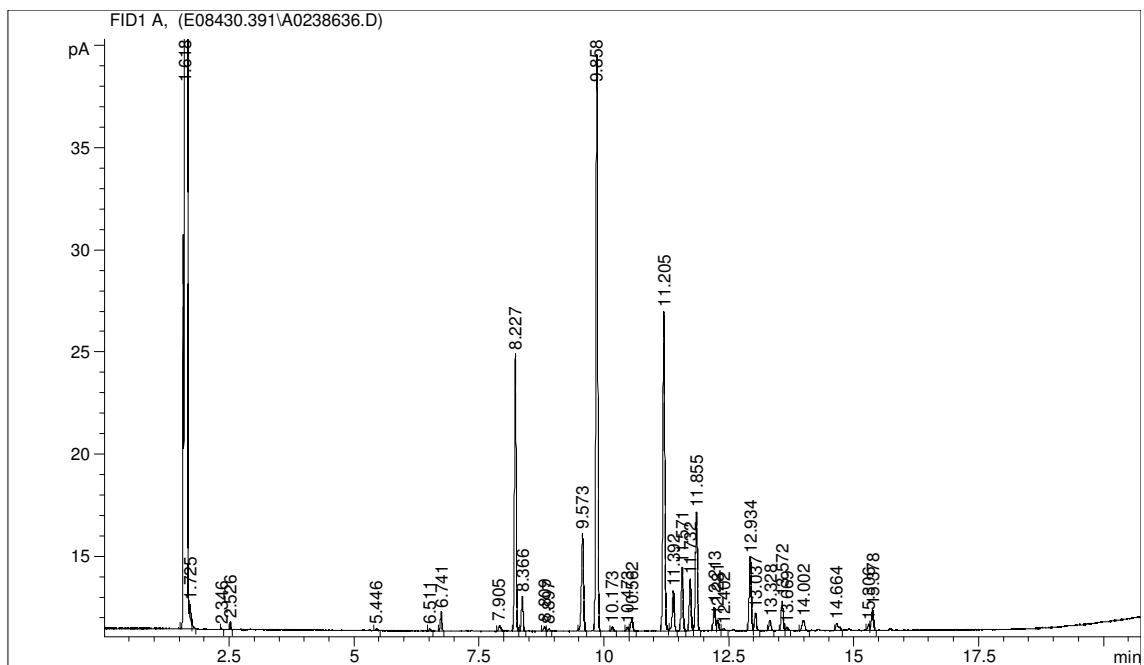
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa SGA 21.

M65



TSA



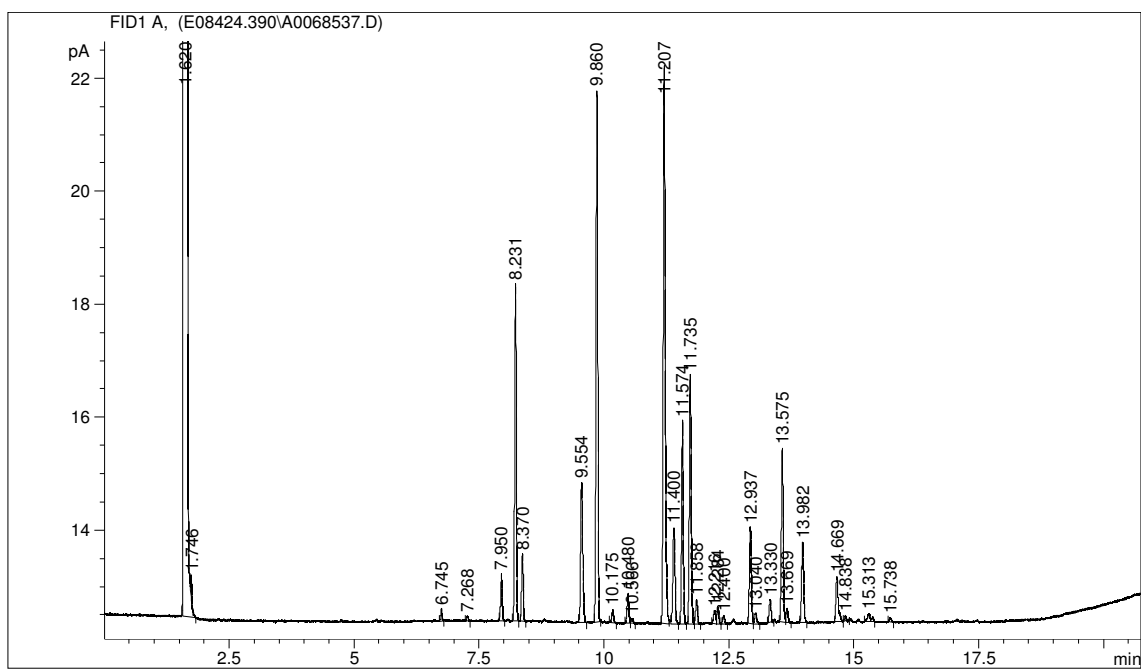
## SGB 14

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	1.620	3.479E+8	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.746	1022	SOLVENT PEAK	----	1.586	56825
	----	6.745	921		----	1.619	3.452E+8
14:0 ISO	0.38	7.268	371		----	1.726	4516
14:0	0.15	7.950	3938		----	2.348	199
15:1 ISO G	1.59	8.231	26833		----	2.528	1371
15:0 ISO	10.76	8.370	5417	13:0 ISO	0.19	5.451	524
15:0 ANTEISO	2.17	9.554	14991	14:0 ISO	0.34	6.745	991
16:1 ISO G	5.88	9.860	46721	15:1 ISO G	1.93	7.948	5797
16:0 ISO	18.25	10.175	1199	15:0 ISO	17.31	8.231	52223
Sum In Feature 3	0.47	10.480	2593	15:0 ANTEISO	1.83	8.371	5543
16:0	1.00	10.566	415	15:0	0.64	8.813	1966
	----	11.207	54715		----	8.956	280
ISO 17:1 w9c	20.99	11.400	9763	16:1 ISO G	3.13	9.563	9649
ANTEISO 17:1 w9c	3.74	11.574	18659	16:0 ISO	14.27	9.860	44232
17:0 ISO	7.13	11.735	22686	Sum In Feature 3	0.25	10.177	781
17:0 ANTEISO	8.65	11.858	2280	16:0	0.39	10.482	1216
17:1 w8c	0.87	12.216	1198		----	10.564	586
17:0	0.45	12.284	1548	ISO 17:1 w9c	23.40	11.210	73887
16:1 2OH	0.59	12.400	757	ANTEISO 17:1 w9c	2.07	11.398	6554
	----	12.937	9335	17:0 ISO	5.41	11.575	17155
17:0 10 methyl	3.52	13.040	1126	17:0 ANTEISO	5.38	11.737	17099
18:1 ISO H	0.42	13.330	1969	17:1 w8c	10.04	11.859	31952
18:0 ISO	0.74	13.575	16384	17:0	1.82	12.217	5808
18:1 w9c	6.14	13.669	1331	16:1 2OH	0.29	12.284	935
18:1 w7c	0.50	13.982	8005		----	12.603	631
18:0	2.99	14.669	5153	17:0 10 methyl	4.07	12.938	13114
TBSA 10Me18:0	1.91	14.838	301	18:1 ISO H	0.51	13.041	1653
	----	15.313	1520	18:0 ISO	0.37	13.333	1208
Sum In Feature 6	0.56	15.738	412	18:1 w9c	2.85	13.577	9236
19:0	0.15	----	1199	18:1 w7c	0.34	13.671	1102
Summed Feature 3	0.47	----	1520	18:0	0.81	13.981	2636
Summed Feature 6	0.56	1.620	3.479E+8	TBSA 10Me18:0	1.08	14.671	3537
					----	14.921	337
				17:0 3OH	0.10	14.921	337
				Sum In Feature 6	0.93	15.311	3065
					----	15.383	6797
				19:0	0.21	15.741	704
				Summed Feature 3	0.25	----	781
				Summed Feature 6	0.93	----	3065

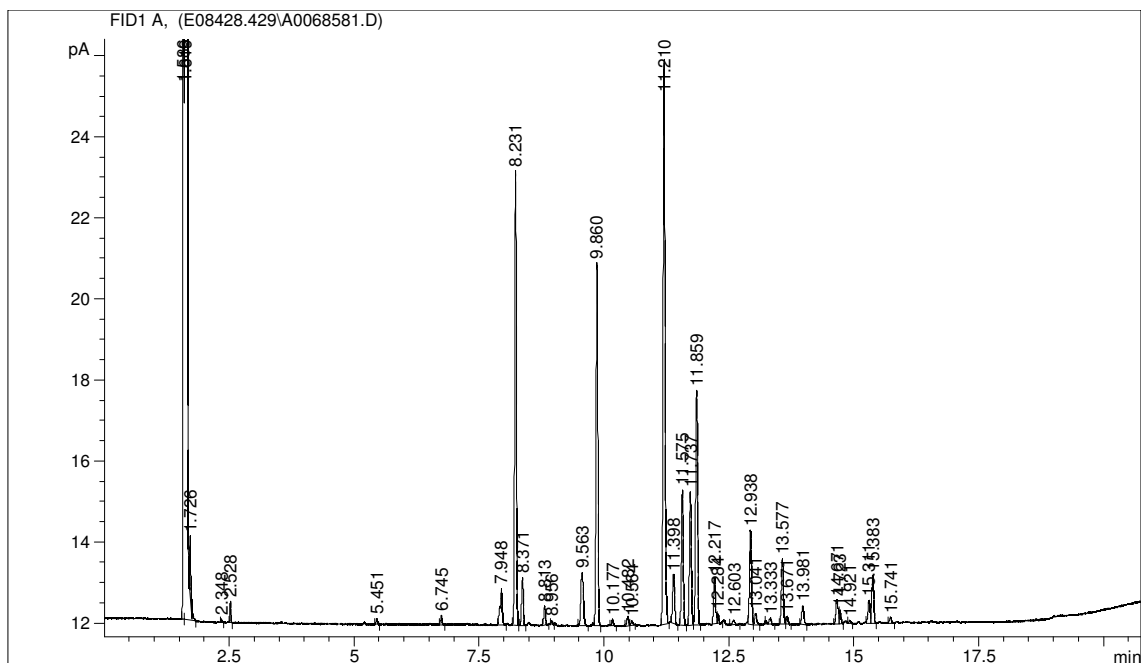
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa SGB 14.

M65



TSA



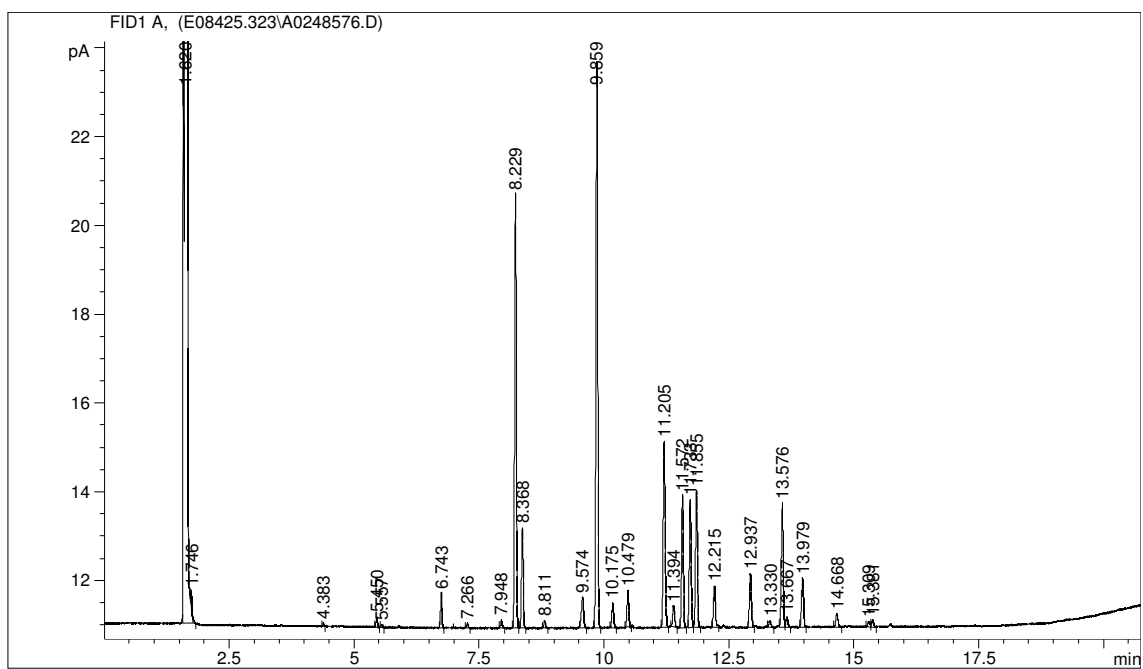
## SR 1

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.620	3.481E+8	SOLVENT PEAK	----	1.620	3.449E+8
	----	1.746	970		----	1.727	6331
12:0 ISO	0.11	4.383	244		----	2.349	327
13:0 ISO	0.41	5.450	911		----	2.529	2432
13:0 ANTEISO	0.13	5.557	294	12:0 ISO	0.08	4.384	298
14:0 ISO	1.42	6.743	3263	13:0 ISO	0.31	5.452	1252
14:0	0.19	7.266	441	14:0 ISO	0.87	6.745	3586
15:1 ISO G	0.36	7.948	861	14:0	0.12	7.267	510
15:0 ISO	19.23	8.229	45609	15:1 ISO G	0.15	7.951	637
15:0 ANTEISO	4.41	8.368	10495	15:0 ISO	34.25	8.233	145608
15:0	0.32	8.811	768	15:0 ANTEISO	5.12	8.371	21831
16:1 ISO H	1.80	9.574	4362	15:0	1.17	8.813	5046
16:0 ISO	25.52	9.859	62120	16:1 ISO H	0.43	9.574	1882
Sum In Feature 3	1.19	10.175	2911	16:0 ISO	8.86	9.860	38729
16:0	1.60	10.479	3940	Sum In Feature 3	0.29	10.179	1285
ISO 17:1 w9c	9.16	11.205	22692	16:0	1.14	10.480	5007
ANTEISO 17:1 w9c	1.03	11.394	2555	ISO 17:1 w9c	6.62	11.208	29462
17:0 ISO	6.21	11.572	15447	ANTEISO 17:1 w9c	0.43	11.396	1910
17:0 ANTEISO	5.98	11.733	14887	17:0 ISO	7.90	11.576	35330
17:1 w8c	6.35	11.855	15840	17:0 ANTEISO	5.06	11.737	22673
17:0	2.00	12.215	5013	17:1 w8c	10.02	11.859	44926
17:0 10 methyl	2.54	12.937	6407	17:0	8.20	12.219	36920
18:0 ISO	0.32	13.330	798		----	12.404	632
18:1 w9c	5.93	13.576	15009		----	12.601	870
18:1 w7c	0.48	13.667	1218	17:0 10 methyl	5.04	12.940	22851
18:0	2.37	13.979	6014	18:0 ISO	0.12	13.331	535
TBSA 10Me18:0	0.68	14.668	1729	18:1 w9c	1.44	13.577	6569
Sum In Feature 6	0.25	15.309	630	18:1 w7c	0.12	13.672	526
	----	15.381	882	18:0	1.21	13.981	5543
Summed Feature 3	1.19	----	2911	TBSA 10Me18:0	0.49	14.672	2275
Summed Feature 6	0.25	----	630	Sum In Feature 6	0.35	15.311	1634
					----	15.381	1884
				19:0	0.20	15.742	936
				Summed Feature 3	0.29	----	1285
				Summed Feature 6	0.35	----	1634

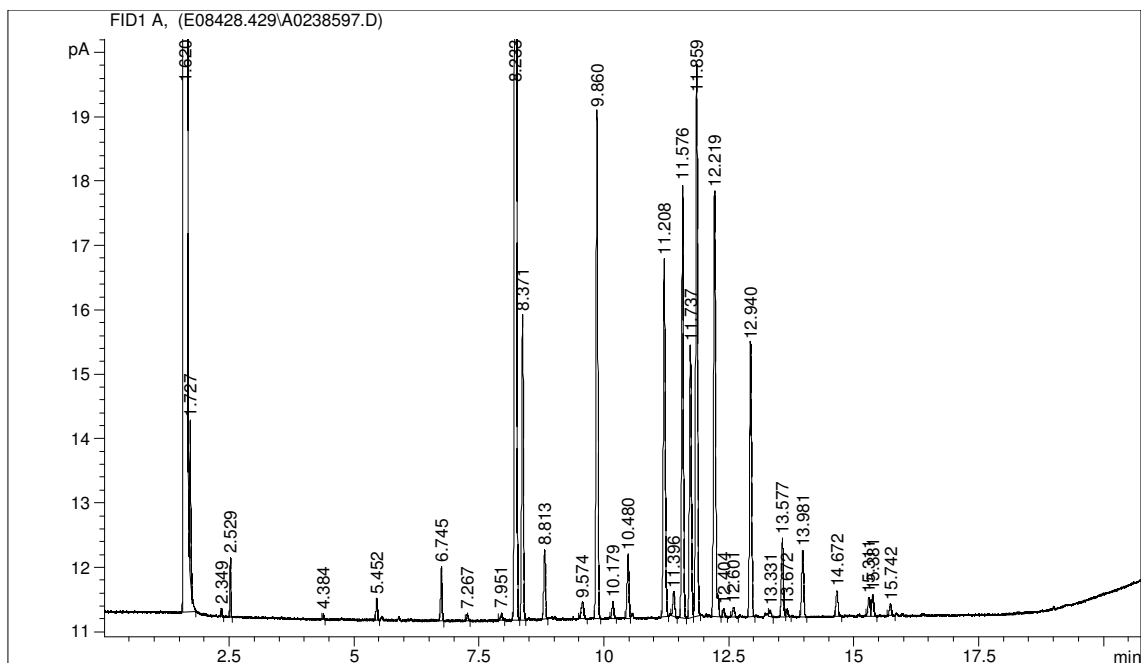
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa SR 1.

M65



TSA



## SR 2

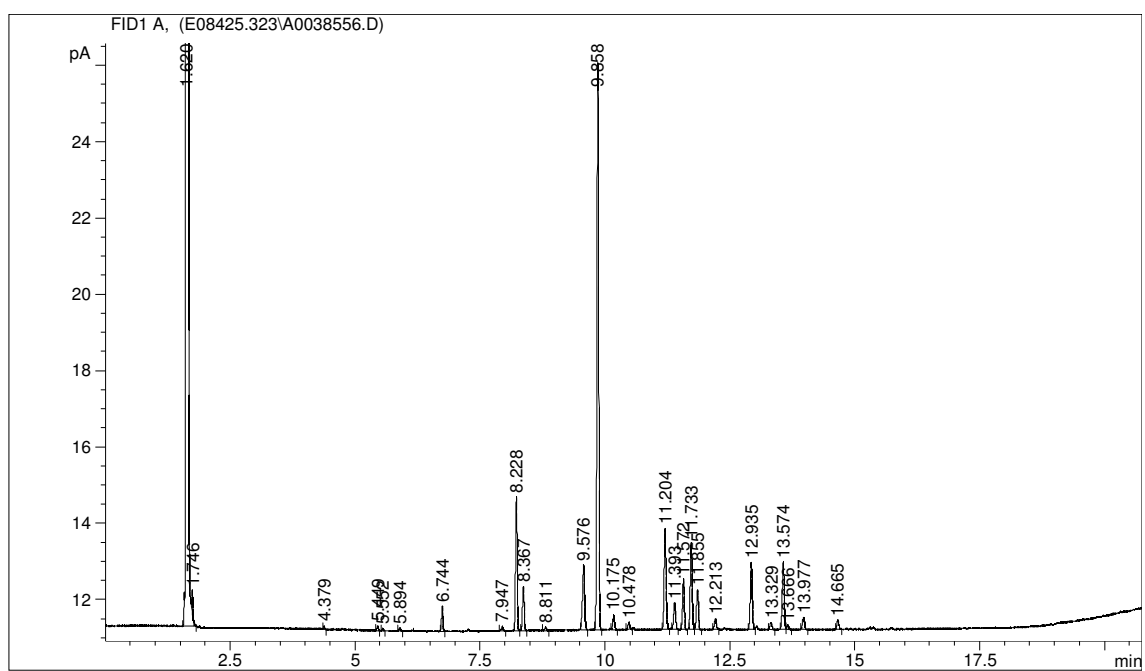
M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.620	3.568E+8	SOLVENT PEAK	----	1.618	3.603E+8
	----	1.746	1436		----	1.724	6905
12:0 ISO	0.15	4.379	227		----	2.345	411
13:0 ISO	0.26	5.449	425		----	2.525	2056
13:0 ANTEISO	0.13	5.552	219	12:0 ISO	0.07	4.379	664
13:0	0.19	5.894	312	12:0	0.02	4.739	220
14:0 ISO	1.65	6.744	2770	13:0 ISO	0.18	5.446	1891
15:1 ISO G	0.35	7.947	600	13:0 ANTEISO	0.07	5.549	691
15:0 ISO	9.21	8.228	15930	13:0	0.13	5.892	1431
15:0 ANTEISO	3.09	8.367	5358	14:0 ISO	0.83	6.740	9029
15:0	0.24	8.811	412	14:0	0.10	7.261	1051
16:1 ISO H	5.81	9.576	10283	15:1 ISO G	0.09	7.943	969
16:0 ISO	40.55	9.858	72011	15:0 ISO	23.33	8.230	261485
Sum In Feature 3	1.10	10.175	1958	15:0 ANTEISO	5.99	8.366	67308
16:0	0.45	10.478	798	15:0	2.28	8.809	25856
ISO 17:1 w9c	7.83	11.204	14141	16:1 ISO H	1.07	9.574	12317
ANTEISO 17:1 w9c	1.94	11.393	3513	16:0 ISO	16.86	9.857	194211
17:0 ISO	3.69	11.572	6695	Sum In Feature 3	0.27	10.173	3168
17:0 ANTEISO	6.52	11.733	11855	16:0	0.68	10.475	7921
17:1 w8c	2.94	11.855	5353		----	10.562	2650
17:0	0.82	12.213	1500	ISO 17:1 w9c	5.67	11.204	66473
17:0 10 methyl	5.11	12.935	9389	ANTEISO 17:1 w9c	0.75	11.390	8874
18:0 ISO	0.53	13.329	984	17:0 ISO	4.45	11.572	52446
18:1 w9c	5.40	13.574	9979	17:0 ANTEISO	5.16	11.733	60888
18:1 w7c	0.35	13.666	652	17:1 w8c	13.14	11.858	155358
18:0	0.99	13.977	1841	17:0	8.87	12.216	105198
TBSA 10Me18:0	0.68	14.665	1262		----	12.399	1994
Summed Feature 3	1.10	----	1958		----	12.598	1464
					----	12.724	1230
				17:0 10 methyl	6.40	12.936	76513
				18:1 ISO H	0.06	13.035	666
				18:0 ISO	0.33	13.327	3900
				18:1 w9c	1.31	13.572	15742
				18:1 w7c	0.09	13.665	1094
				18:0	0.77	13.975	9335
				TBSA 10Me18:0	0.45	14.666	5403
				Sum In Feature 6	0.36	15.307	4426
					----	15.377	4271
				19:0	0.22	15.734	2678
					----	15.862	515
					----	15.968	750
				Summed Feature 3	0.27	----	3168
				Summed Feature 6	0.36	----	4426

TR: Tiempo de retención

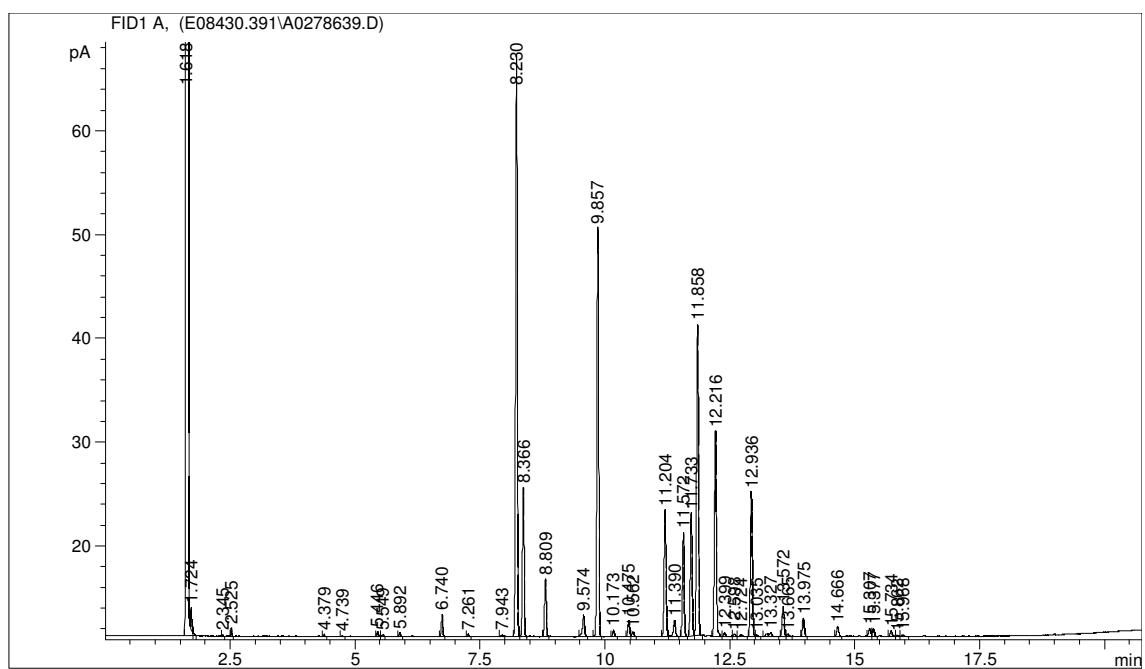


Perfiles obtenidos para la cepa SR 2.

M65



TSA



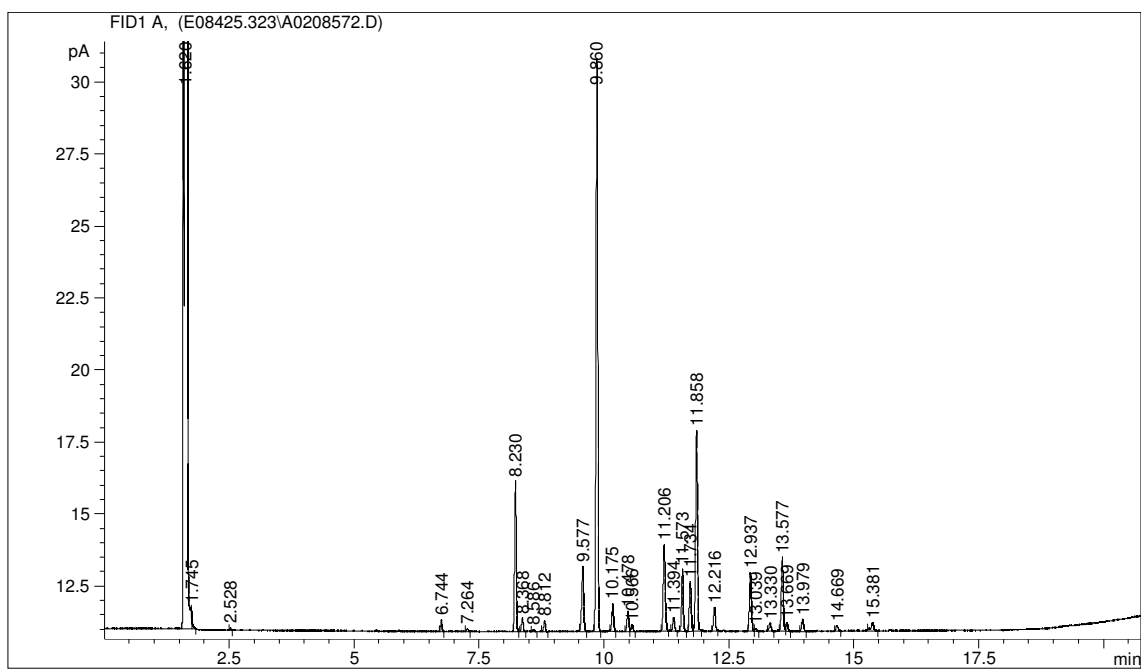
## SR 4

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.620	3.463E+8	SOLVENT PEAK	----	1.619	3.441E+8
	----	1.745	780		----	1.725	4317
	----	2.528	188		----	2.527	1323
14:0 ISO	0.69	6.744	1703	13:0	0.09	5.895	243
14:0	0.18	7.264	448	14:0 ISO	0.59	6.744	1539
15:0 ISO	9.31	8.230	23669	14:0	0.14	7.268	372
15:0 ANTEISO	0.85	8.368	2163	15:0 ISO	15.91	8.230	43014
15:1 w6c	0.15	8.586	386	15:0 ANTEISO	0.91	8.368	2476
15:0	0.68	8.812	1737	15:0	4.87	8.813	13307
16:1 ISO H	4.83	9.577	12560	16:1 ISO H	1.13	9.575	3136
16:0 ISO	37.92	9.860	99014	16:0 ISO	18.58	9.858	51635
Sum In Feature 3	1.87	10.175	4896	Sum In Feature 3	0.66	10.178	1835
16:0	1.36	10.478	3576	16:0	1.17	10.480	3291
	----	10.566	1122	ISO 17:1 w9c	3.25	11.207	9212
ISO 17:1 w9c	6.26	11.206	16636	ANTEISO 17:1 w9c	0.25	11.392	721
ANTEISO 17:1 w9c	0.88	11.394	2330	17:0 ISO	4.47	11.574	12713
17:0 ISO	4.26	11.573	11366	17:0 ANTEISO	2.06	11.734	5864
17:0 ANTEISO	3.43	11.734	9165	17:1 w8c	33.65	11.861	95978
17:1 w8c	13.75	11.858	36801	17:1 w6c	0.28	11.977	813
17:0	1.65	12.216	4439	17:0	7.19	12.217	20578
17:0 10 methyl	4.13	12.937	11161	17:0 10 methyl	1.23	12.938	3543
18:1 ISO H	0.19	13.039	525	18:0 ISO	0.18	13.331	525
18:0 ISO	0.57	13.330	1555	18:1 w9c	2.06	13.576	5984
18:1 w9c	5.18	13.577	14052	18:1 w7c	0.32	13.670	919
18:1 w7c	0.62	13.669	1684	18:0	0.76	13.980	2210
18:0	0.86	13.979	2332	TBSA 10Me18:0	0.22	14.672	646
TBSA 10Me18:0	0.39	14.669	1070		----	15.381	5618
	----	15.381	2280	Summed Feature 3	0.66	----	1835
Summed Feature 3	1.87	----	4896				

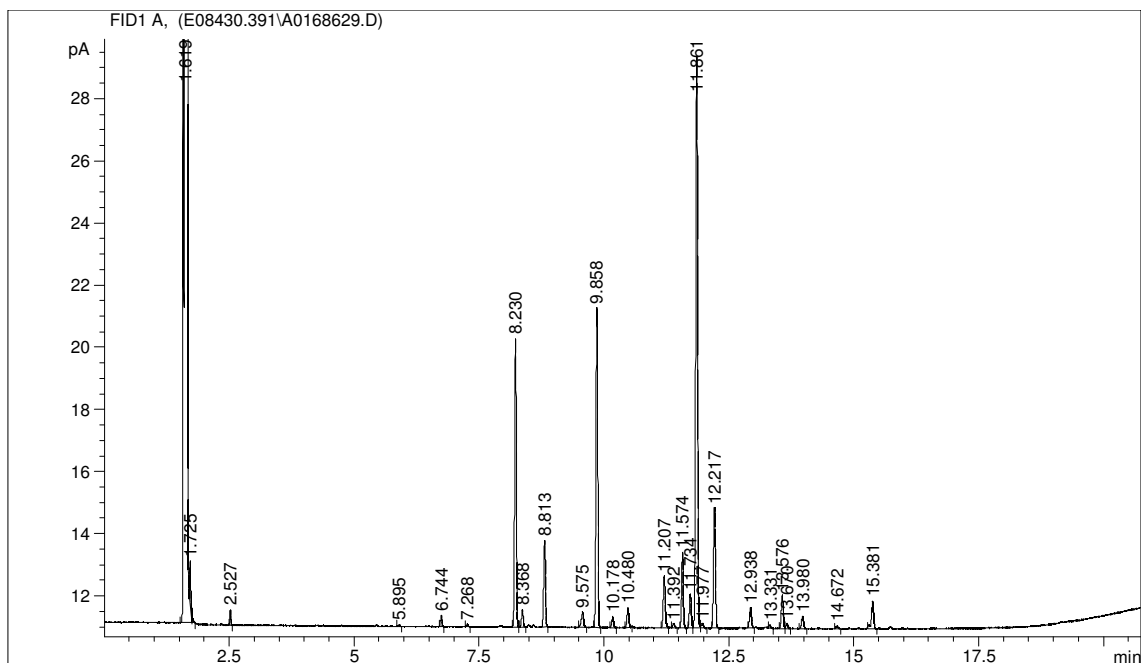
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa SR 4.

M65



TSA



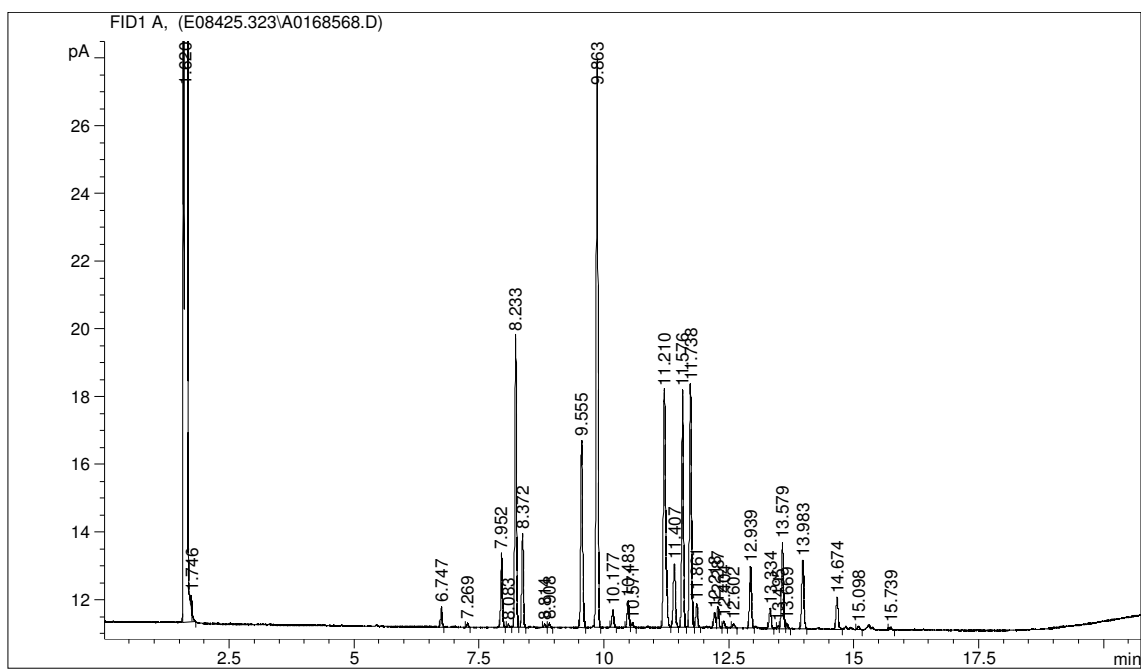
## SR 6

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.620	3.465E+8	SOLVENT PEAK	----	1.619	3.545E+8
	----	1.746	830		----	1.725	5849
14:0 ISO	0.71	6.747	2497		----	2.527	2304
14:0	0.13	7.269	478	13:0 ISO	0.08	5.445	336
15:1 ISO G	2.82	7.952	10149	14:0 ISO	0.45	6.741	2077
15:1 ANTEISO A	0.11	8.083	411	15:1 ISO G	1.13	7.944	5342
15:0 ISO	10.92	8.233	39473	15:0 ISO	8.29	8.228	39564
15:0 ANTEISO	3.55	8.372	12857	15:0 ANTEISO	1.34	8.365	6398
15:0	0.12	8.814	425	15:0	0.22	8.809	1053
	----	8.908	579	16:1 ISO G	4.29	9.552	20944
16:1 ISO G	8.06	9.555	29784	16:0 ISO	21.20	9.857	103935
16:0 ISO	22.71	9.863	84278	Sum In Feature 3	0.15	10.172	736
Sum In Feature 3	0.72	10.177	2668	16:0	0.28	10.477	1402
16:0	1.09	10.483	4074		----	10.564	726
	----	10.571	738	ISO 17:1 w9c	20.23	11.204	101024
ISO 17:1 w9c	11.97	11.210	45178	ANTEISO 17:1 w9c	2.95	11.397	14742
17:1 ANTEISO A	2.96	11.407	11211	17:0 ISO	7.21	11.572	36157
17:0 ISO	9.68	11.576	36681	17:0 ANTEISO	8.09	11.734	40652
17:0 ANTEISO	10.00	11.738	37979	17:1 w8c	4.71	11.857	23694
17:1 w8c	0.94	11.861	3576	17:0	1.46	12.213	7365
17:0	0.58	12.218	2216	16:1 2OH	0.39	12.282	1978
16:1 2OH	0.84	12.287	3196		----	12.399	975
	----	12.404	935		----	12.596	696
	----	12.602	649	17:0 10 methyl	6.94	12.935	35331
17:0 10 methyl	2.50	12.939	9597	18:1 ISO H	0.53	13.039	2677
18:0 ISO	0.85	13.334	3269	18:0 ISO	1.07	13.328	5492
Sum In Feature 5	0.10	13.495	402	18:1 w9c	2.98	13.573	15252
18:1 w9c	3.67	13.579	14157	18:1 w7c	0.08	13.667	426
18:1 w7c	0.21	13.669	793	18:0	1.41	13.978	7248
18:0	3.07	13.983	11864	TBSA 10Me18:0	1.51	14.664	7785
TBSA 10Me18:0	1.42	14.674	5498		----	14.722	2606
19:0 ISO	0.16	15.098	623		----	14.837	1961
19:0	0.12	15.739	453	17:0 3OH	0.22	14.920	1147
Summed Feature 3	0.72	----	2668	19:0 ISO	0.19	15.091	1001
Summed Feature 5	0.10	----	402	Sum In Feature 6	1.89	15.307	9816
					----	15.379	7426
				19:0	0.73	15.735	3795
				Summed Feature 3	0.15	----	736
				Summed Feature 6	1.89	----	9816

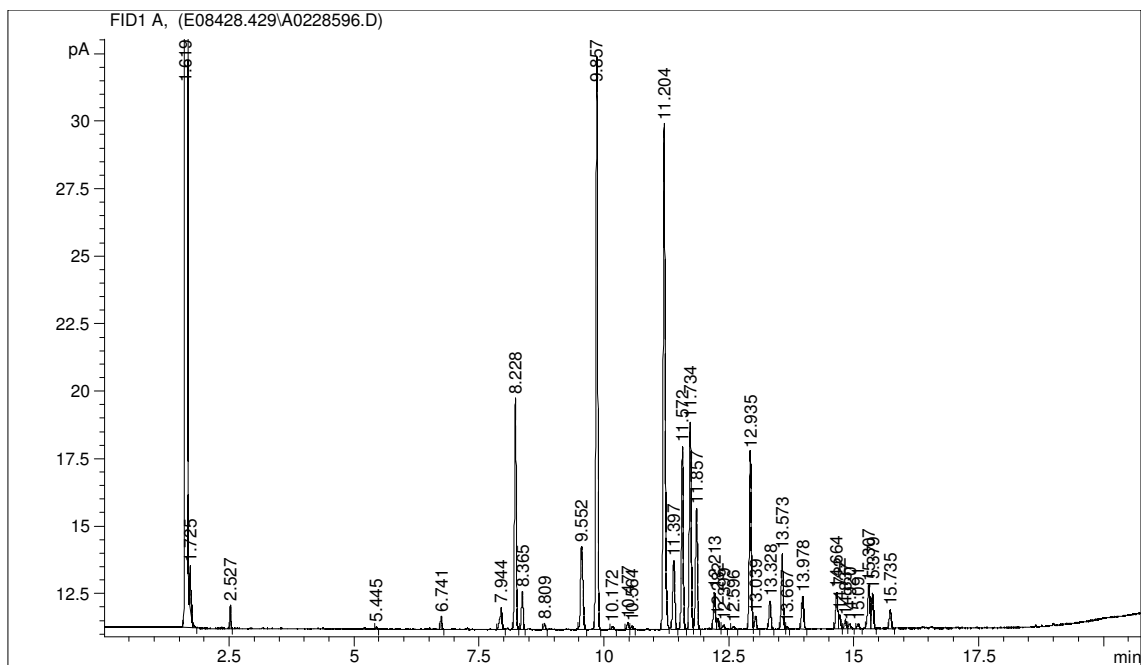
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa SR 6.

M65



TSA



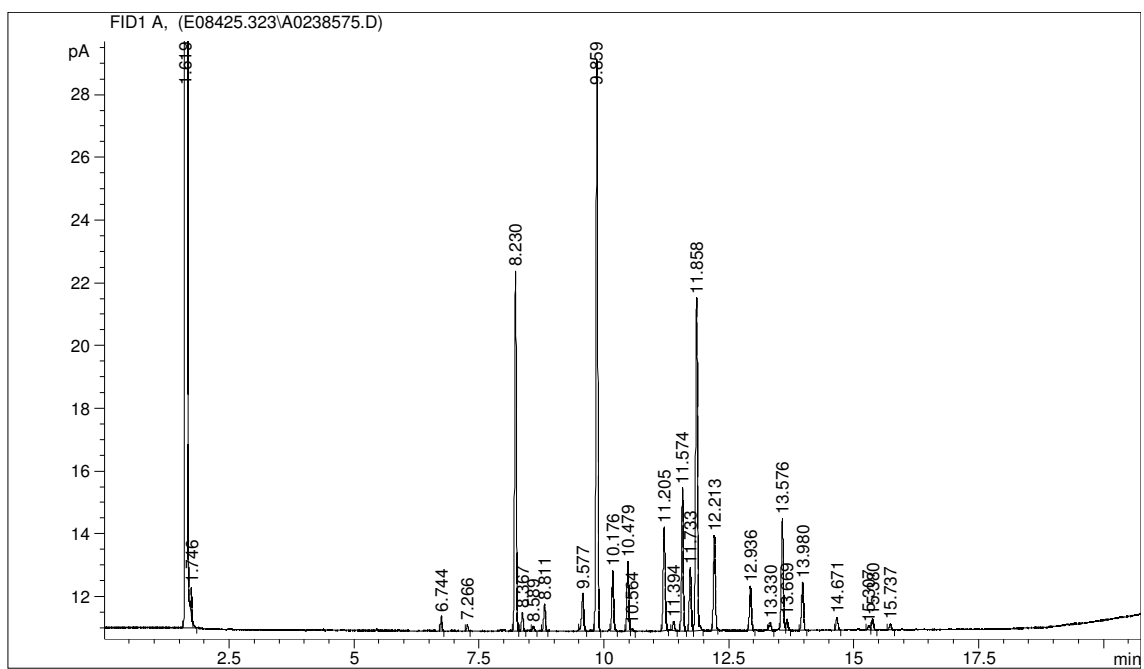
## SR 15

M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
SOLVENT PEAK	----	1.620	3,47E+11	SOLVENT PEAK	----	1.619	3.616E+8
	----	1.745	9345		----	1.746	2271
14:0 ISO	0.59	4.382	326		----	1.867	327
14:0	0.25	5.450	760	14:0 ISO	1.97	6.744	1120
15:0 ISO	15.79	5.553	330	15:0 ISO	9.92	8.228	5801
15:0 ANTEISO	0.78	6.745	11525	15:0 ANTEISO	0.92	8.369	537
15:1 w6c	0.19	7.267	729	15:0	0.58	8.812	346
15:0	1.17	7.947	642	16:1 ISO H	4.30	9.571	2571
16:1 ISO H	2.02	8.231	44692	16:0 ISO	32.46	9.857	19509
16:0 ISO	25.47	8.371	18545	Sum In Feature 3	1.03	10.175	622
Sum In Feature 3	2.81	8.812	1402	16:0	1.46	10.478	888
16:0	3.24	9.579	6655		----	10.565	712
	----	9.860	130005	ISO 17:1 w9c	7.98	11.207	4886
ISO 17:1 w9c	5.11	10.177	2012	ANTEISO 17:1 w9c	0.73	11.397	451
ANTEISO 17:1 w9c	0.43	10.481	5709	17:0 ISO	4.69	11.573	2883
17:0 ISO	6.59	10.566	7168	17:0 ANTEISO	3.58	11.733	2206
17:0 ANTEISO	3.01	11.211	16272	17:1 w8c	7.47	11.857	4606
17:1 w8c	16.31	11.396	1323	17:0	1.65	12.214	1022
17:0	4.45	11.575	7967	16:1 2OH	0.91	12.283	564
17:0 10 methyl	2.04	11.735	11208	17:0 10 methyl	9.41	12.940	5869
18:0 ISO	0.42	11.858	5786	18:1 w9c	5.12	13.577	3210
18:1 w9c	5.52	12.217	5278	18:0	1.62	13.981	1021
18:1 w7c	0.51	12.286	4078	TBSA 10Me18:0	4.21	14.670	2665
18:0	2.24	12.403	1730	Summed Feature 3	1.03	----	622
TBSA 10Me18:0	0.61	12.598	929				
Sum In Feature 6	0.19	12.939	15706				
	----	13.330	675				
19:0	0.27	13.577	7927				
Summed Feature 3	2.81	13.671	1125				
Summed Feature 6	0.19	13.981	4179				

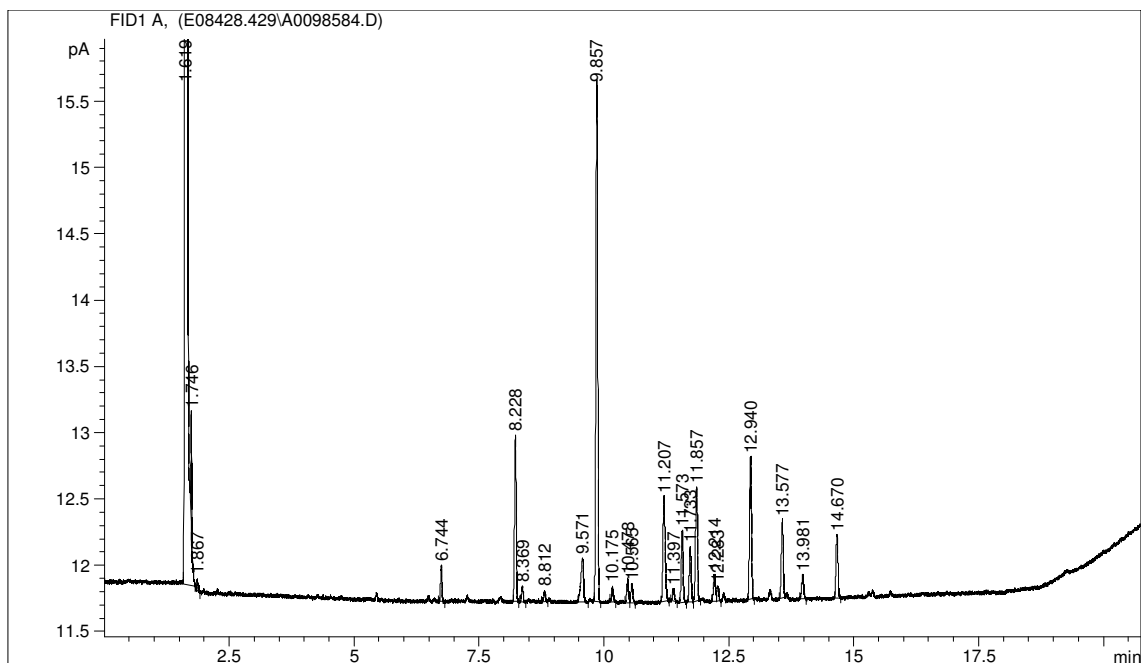
TR: Tiempo de retención

Perfiles obtenidos para la cepa SR 15.

M65



TSA



*Polymorphospora rubra*

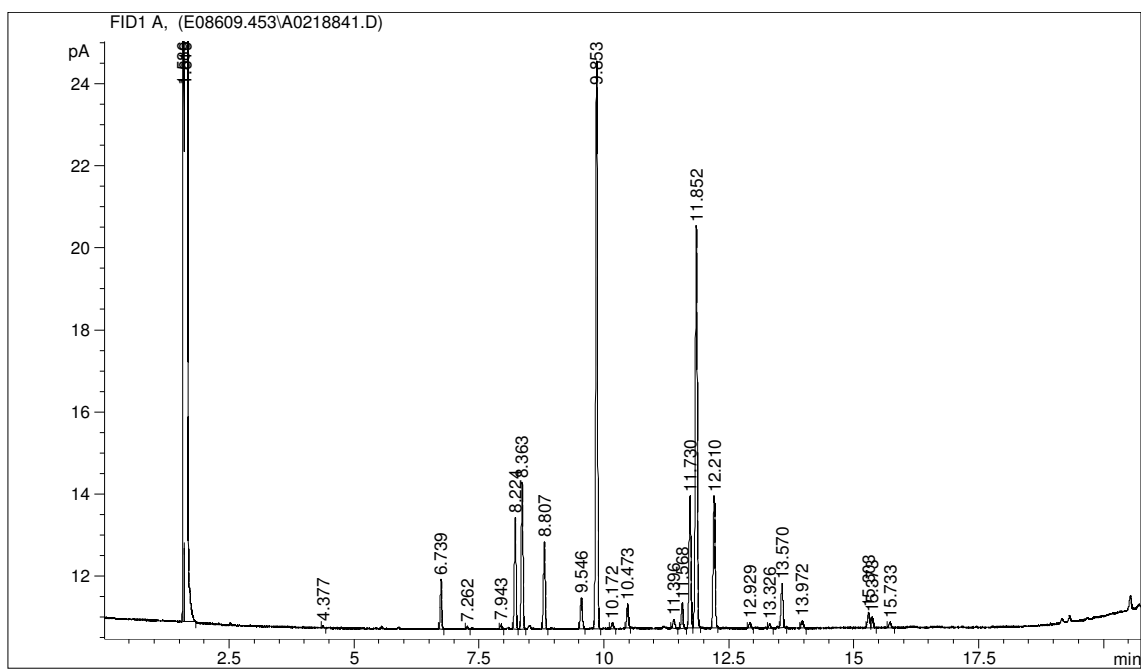
M65				TSA			
Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta	Nombre del Pico	Porcentaje	TR	Respuesta
	----	1.586	49061	SOLVENT PEAK	----	1.620	3.588E+8
SOLVENT PEAK	----	1.619	3.436E+8		----	1.868	232
12:0 ISO	0.08	4.377	165		----	2.528	571
14:0 ISO	2.38	6.739	5035	14:0 ISO	0.88	6.742	1185
14:0	0.14	7.262	294	15:1 ISO G	0.74	7.946	1019
15:1 ISO G	0.25	7.943	539	15:0 ISO	18.15	8.227	25148
15:0 ISO	5.77	8.224	12583	15:0 ANTEISO	3.28	8.368	4553
15:0 ANTEISO	7.70	8.363	16824	15:0	1.45	8.810	2037
15:0	4.51	8.807	9915	16:1 ISO G	1.57	9.546	2222
16:1 ISO G	1.91	9.546	4233	16:0 ISO	23.04	9.857	32837
16:0 ISO	30.37	9.853	67641	Sum In Feature 3	0.30	10.171	423
Sum In Feature 3	0.35	10.172	774	16:0	1.02	10.476	1465
16:0	1.27	10.473	2839	ISO 17:1 w9c	2.02	11.203	2935
ANTEISO 17:1 w9c	0.54	11.396	1209	ANTEISO 17:1 w9c	0.41	11.400	600
17:0 ISO	1.43	11.568	3241	17:0 ISO	12.05	11.570	17558
17:0 ANTEISO	7.58	11.730	17158	17:0 ANTEISO	7.30	11.733	10662
17:1 w8c	23.25	11.852	52672	17:1 w8c	16.57	11.855	24217
17:0	7.68	12.210	17435	17:0	4.39	12.213	6434
17:0 10 methyl	0.31	12.929	703	17:0 10 methyl	0.67	12.933	986
18:0 ISO	0.24	13.326	554	18:0 ISO	0.37	13.328	543
18:1 w9c	2.54	13.570	5801	18:1 w9c	4.04	13.572	5987
18:0	0.43	13.972	985	18:0	0.34	13.977	504
Sum In Feature 6	0.94	15.303	2144	Sum In Feature 6	1.17	15.306	1745
	----	15.373	1493		----	15.378	1163
19:0	0.33	15.733	748	19:0	0.27	15.738	396
Summed Feature 3	0.35	----	774	Summed Feature 3	0.30	----	423
Summed Feature 6	0.94	----	2144	Summed Feature 6	1.17	----	1745

TR: Tiempo de retención

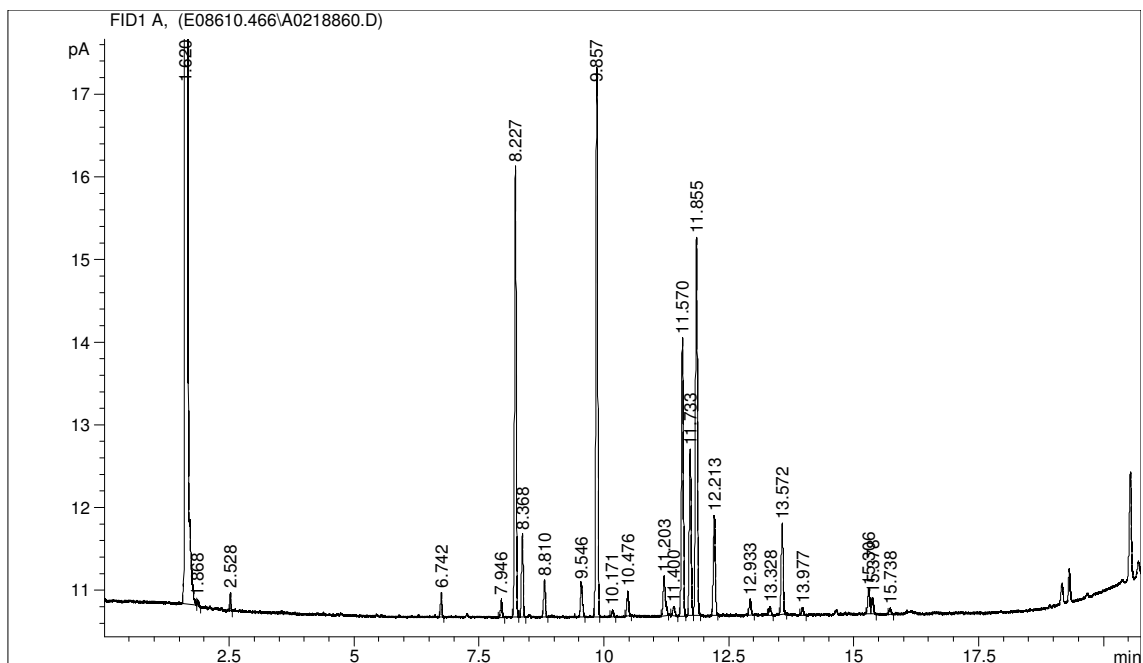


Perfiles obtenidos para la cepa *Polymorphospora rubra* TT 97-42<sup>T</sup>.

M65



TSA



*ANEXO II*

## **ANEXO II**