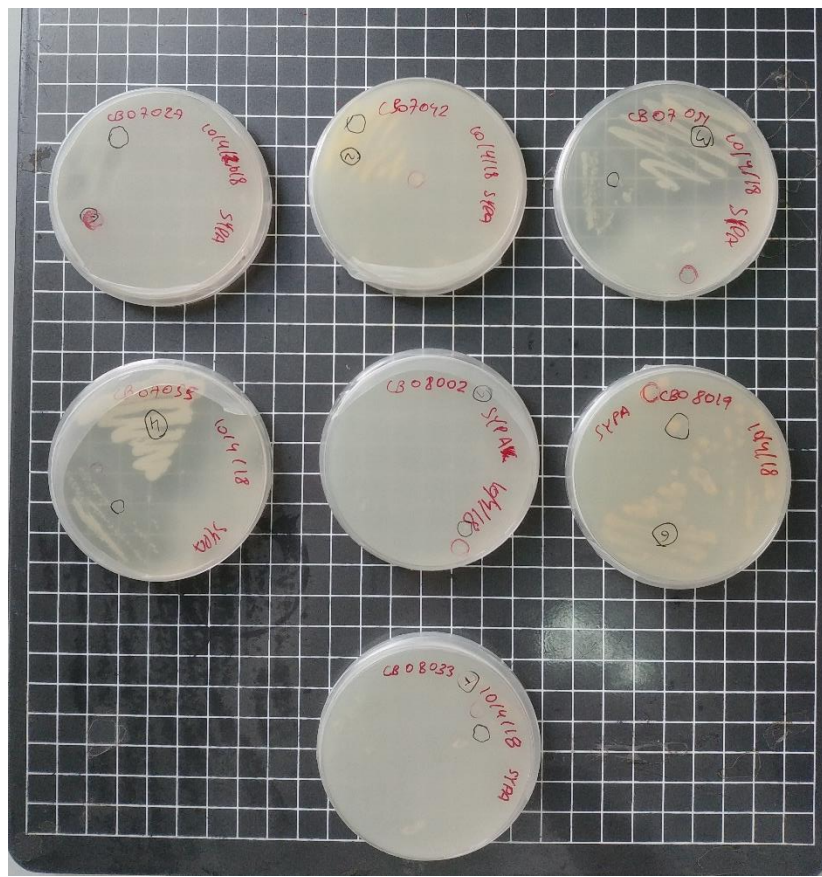


Aislamiento e identificación de bacterias de origen marino

Isolation and identification of marine bacteria



Trabajo de Fin de Grado

SERGIO IVÁN SANTOS CONCEPCIÓN

Grado en Biología. Septiembre 2018.

Universidad de La Laguna

Tutorizado por: Ángel M. Gutiérrez Navarro y José Manuel Pérez de la Lastra.

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2017/2018	ENTRADA Fecha: Núm:
--	--------------------------------------

Datos Personales



Nº DNI o pasaporte: 43385030S	Nombre y Apellidos: SERGIO IVÁN SANTOS CONCEPCIÓN
Teléfono: 695310345	Dirección de correo electrónico: alu0100904925@ull.edu.es

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DE ORIGEN MARINO
--

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D./Dña. ÁNGEL M. GUTIÉRREZ NAVARRO	
Profesor/a del Departamento de MICROBIOLOGÍA Y BIOLOGÍA CELULAR	
y D./Dña. JOSÉ MANUEL. PÉREZ DE LA LASTRA PÉREZ DE LA LASTRA	
Científico Titular CSIC del IPNA	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
Fdo. 	Fdo.: 



Firma del interesado/a

La Laguna, a 18 de JULIO de 2018

SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA SECCIÓN DE BIOLOGÍA

Documentación a adjuntar:

- Un ejemplar en formato electrónico de la Memoria conforme a las normas de presentación establecidas en el Anexo I del Reglamento para la elaboración y defensa del TFG.
- Informe-evaluación de los tutores en sobre cerrado y firmado.

ÍNDICE

1. Resumen	4
1.1. Abstract.....	4
2. Introducción	6
3. Objetivos	9
4. Material y métodos	10
4.1. Bacterias.....	10
4.2. Medios de cultivo.....	11
4.2.1. Cultivo en medio sólido.....	11
4.2.2. Cultivo en medio líquido.....	12
4.3. Obtención de ADN de las cepas.....	13
4.4. Realización de PCR.....	14
4.5. Electroforesis.....	17
4.6. Purificación de muestras y secuenciación.....	17
4.7. Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas.....	18
5. Resultados y discusión	19
5.1. Crecimiento de cepas en medio sólido y líquido.....	19
5.2. Resolución de electroforesis.....	20
5.3. Identificación de especies.....	21
5.4. Árbol filogenético.....	26
6. Conclusiones	28
7. Bibliografía	29
8. Agradecimientos	31
9. Material suplementario	32

1. RESUMEN

El océano es un gran reservorio de microorganismos, muchos de los cuales son aún prácticamente desconocidos para el ser humano. Además de encontrarse en una elevada concentración, los microorganismos marinos han sufrido una infinidad de adaptaciones tanto fisiológicas como genéticas durante el transcurso de millones de años, las cuales les han permitido sobrevivir en múltiples hábitats, llegando incluso a colonizar los ambientes más inhóspitos de las profundidades, logrando así perpetuar su código genético en la línea del tiempo de la vida. Es por ello que despierta una enorme curiosidad en el ser humano la variabilidad genética existente, así como las diferentes rutas metabólicas y sus productos, lo que convierte a los microorganismos marinos en elementos de gran interés en múltiples campos clave, como la industria farmacéutica y la biotecnología.

El propósito de este trabajo fue el aislamiento de bacterias marinas (procedentes de diferentes localizaciones) y el análisis de la diversidad filogenética (mediante la secuenciación del ARNr 16S), con el objetivo de lograr la identificación de éstas para, posteriormente, realizar árboles filogenéticos y establecer relaciones de parentesco con otras cepas e, incluso, pudiendo llegar a catalogar una nueva especie aún no registrada. En los resultados obtuvimos la identificación de cinco especies de organismos procariotas ya conocidos, que son *Bacillus megaterium*, *Cobetia marina*, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, *Bacillus licheniformis* y *Synechococcus elongatus*.

Palabras clave: Bacterias obligadamente marinas, ARNr 16S, bioinformática.

1.1. Abstract

The ocean is a large reservoir of microorganisms, many of which are still practically unknown to humans. In addition to being in high concentration, marine microorganisms have undergone an infinite number of physiological and genetic adaptations over the course of millions of years, which have allowed them to survive in multiple habitats, even colonizing the most inhospitable environments of the deep, thus perpetuating their genetic code in the timeline of life. That is the reason why awakens a great curiosity in humans because of the existing genetic variability, as well as the different metabolic pathways and their products, which turns marine microorganisms into elements of high interest in multiple key fields, such as the pharmaceutical industry and biotechnology.

The purpose of this work was the isolation of marine bacteria (from different locations) and the analyses of phylogenetic diversity (by means of the 16S rRNA sequencing), with the aim of achieving the identification of these bacterias, to later make phylogenetic trees and establish relations of kinship with other strains and, even, being able to catalog new species not yet registered. In the results we obtained the identification of five known species of prokaryotic organisms, which are *Bacillus megaterium*, *Cobetia marine*, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, *Bacillus licheniformis* and *Synechococcus elongatus*.

Keywords: Obligated marine bacteria, ARNr 16S, bioinformatics.

2. INTRODUCCIÓN

Los océanos, esas grandes masas de agua que ocupan 2/3 de la superficie del planeta, albergan una gran cantidad de vida y, por tanto, constituyen el sistema ecológico más extenso del globo terráqueo. Contienen, aproximadamente, 3.6×10^{28} microorganismos a una densidad media de 5×10^5 células por mL^{-1} (Cock *et al.* 2010).

Las comunidades de microbios presentes en el mar no son sólo abundantes, además presentan una gran diversidad, ya que, a lo largo de millones de años, los microorganismos han ido evolucionando y adquiriendo adaptaciones fisiológicas exitosas, que les han permitido sobrevivir a lo largo del tiempo (Hellweger *et al.* 2014).

Estudiar la composición y dinámica de las poblaciones microbianas marinas es muy relevante, puesto que en los océanos los microorganismos se encuentran por encima del resto de seres vivos, tanto en términos de actividad metabólica, como de biomasa (Fuhrman *et al.* 2015).

Desempeñan un papel muy importante y crucial en el ecosistema marino. Entre sus funciones, constituyen la base de la cadena trófica mediante la captación de energía solar y posterior bioconversión a energía química. También contribuyen en la regulación de los gases de efecto invernadero. Catalizan reacciones biogeoquímicas, clave de los nutrientes para sostener la productividad oceánica, y son un importante reservorio desde el punto de vista genético altamente variado (Karl 2007, Karl y Church 2014).

Con el objetivo de tener una herramienta con la que poder identificar los organismos existentes, se sugirieron diversas regiones del ácido desoxirribonucleico (ADN) o genes. Para que dicha región de ADN sea considerada como un marcador molecular para estudios de código de barra (Hebert *et al.* 2003) y/o en cualquier estudio taxonómico o de evolución, deberá poseer las siguientes características: albergar variabilidad y divergencia genética significativa a nivel de especie; tener sitios conservados adyacentes, que permitan el diseño de iniciadores universales, para su amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR); y poseer una longitud adecuada que permita la extracción y secuenciación de manera sencilla, precisa y reproducible (Kress y Erickson 2012).

De entre todas las propuestas, el ácido ribonucleico ribosomal 16S (ARNr 16S), que fue sugerido originalmente por Pace *et al.* (1986), fue presentado como una buena opción para la clasificación de bacterias. Dicha idea fue bien vista por la comunidad científica y la secuencia de ARNr 16S fue incorporada de inmediato para ir construyendo bases de datos especializadas. Esta aceptación ha

permitido la remodelación y construcción de relaciones filogenéticas; y a constituir el proyecto árbol de la vida universal (All-Species Living Tree Project), que sirve como una referencia de relación de procariotas, organizada en bases de datos dinámicas que compilan y actualizan los datos de todas las secuencias accesibles del gen ARNr 16S (Yarza *et al.* 2008, 2010).

La molécula de ARNr 16S, pues, se trata de un poderoso marcador universal debido a que está presente en todos y cada uno de los organismos que se conocen actualmente.

Posee, además, un alto grado de conservación, puesto que, al parecer, su estructura se mantiene durante periodos de tiempo relativamente largos y, probablemente, los cambios que se producen en la secuencia son aleatorios, ya que su función no ha cambiado.

Debido a ello, el ARNr 16S se sitúa como la técnica más utilizada para el estudio de la taxonomía y filogenia bacteriana. Dicho conjunto de características nos permite asegurar que cepas con un valor de semejanza inferior al 97% conforman una nueva especie (Janda, M.J, *et al.*, 2007).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) desarrollada por Kary Mullis (1983) es una técnica de biología molecular muy extendida y ampliamente utilizada en el campo de la medicina forense, investigación en biología molecular e incluso en algunas ramas de la ecología. Su función se basa en obtener un gran número de copias de un ADN en concreto, es decir, da lugar a la amplificación de un fragmento de ADN, que posteriormente se puede visualizar por electroforesis en gel, secuenciar, o clonar en un plásmido.

Como ocurre en el caso de la replicación del ADN, para que funcione la PCR requiere de una enzima ADN polimerasa que dé lugar a nuevas cadenas de ADN empleando las cadenas existentes como molde. Taq polimerasa es la ADN polimerasa más utilizada para realizar PCR. Su nombre proviene de *Thermus aquaticus*, una bacteria termoestable de la cual se aisló. *T. aquaticus*, que habita en aguas termales y en los volcanes submarinos, tiene una actividad óptima a los 70°C, puesto que su ADN presenta una gran estabilidad térmica.

Debido a esta característica la Taq polimerasa es ideal para realizar PCR, por lo que ha sido adoptada rápidamente por la comunidad científica.

En los últimos años, ha ido aumentando el interés en el sedimento del medio marino como un importante reservorio de nuevas cepas de actinobacterias con actividad biológica (Mincer *et al.* 2002, Bull *et al.* 2005, Maldonado *et al.* 2005b). Las actinobacterias son bacterias Gram-positivas, filamentosas, pertenecientes al orden *Actinomycetales*, y presentan como virtud la producción de compuestos bioactivos (Fenical y Jensen 2006). Se trata de un grupo ampliamente distribuido,

gracias a la producción de diversos tipos de esporas, que les permite dispersarse con facilidad y sobrevivir. Además, son capaces de formar un micelio radial, que les otorga la capacidad de colonizar un sustrato que se encuentra distante de su centro de crecimiento. Estas cualidades les permiten competir de forma exitosa con otros microorganismos saprofíticos (Maier *et al.* 2000, Prieto- Davó *et al.* 2008).

Los metabolitos secundarios que producen las bacterias marinas son de gran importancia para la industria farmacéutica y biotecnológica, ya que han demostrado ser efectivos frente a agentes patógenos (Davies 2006, Surajit-Das *et al.* 2006). Es más, dos tercios de los antibióticos que se utilizan en la actualidad proceden de actinobacterias terrestres, concretamente del género *Streptomyces*, como son la estreptomicina, la tetraciclina, el cloranfenicol y la eritromicina. (Challis y Hopwood 2003, Magarvey *et al.* 2004, Fenical y Jensen 2006). *Streptomycetaceae* y *Micromonosporaceae* son las dos familias más importantes en cuanto a producción de metabolitos de interés (Magarvey *et al.* 2004, Fenical y Jensen 2006). El primer género, estrictamente marino, es *Salinispora*, el cual pertenece a la familia *Micromonosporaceae* (Mincer *et al.* 2002, Maldonado *et al.* 2005).

3. OBJETIVOS

1. Aislamiento de bacterias a partir de una colección de microorganismos obligadamente marinos (MOM).
2. Identificación de las colonias obtenidas mediante la amplificación y secuenciación de una región de 16S rRNA.
3. Realizar un análisis filogenético de las secuencias obtenidas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Bacterias

Las cepas que usamos en nuestro trabajo, cuya categorización filogenética era desconocida, me fueron dadas por la Dra. Mercedes Cueto, perteneciente al Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (IPNA), del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Dichas bacterias se encontraban ya crecidas en placas con medio sólido *Salt Yeast Peptone Agar* (SYPA) y conservadas en el frigorífico a 4°C.

CB07027	CB07042	CB07044
CB07051	CB07055	CB08002
CB08007	CB08019	CB08033

Tabla 4.1.1. Tabla que recoge las cepas y el medio en el que se encontraban cultivadas.

Además, también contamos con diversas cepas de actinobacterias, procedentes de Egipto, año 2007, conservadas a -80°C en crioviales con una solución de glicerol al 20%.

CB08073	CB08122	CB08128
---------	---------	---------

Tabla 4.1.2. Tabla que recoge las cepas de actinobacterias.

Con el propósito de aislarlas y obtener su crecimiento, se procedió a sembrar las bacterias en diferentes medios de cultivo sólido. Cada cepa se sembró en dos placas: una con medio *Salt Yeast Peptone Agar* (SYPA) y otra con *Actinomyccete Isolation Agar* (AIA), para así evaluar en qué medio crecerían mejor. Las actinobacterias se sembraron en medio SCA y AIA.

Y, además, las bacterias también fueron sembradas en medio líquido *Salt Yeast Peptone* (SYP).

4.2. Medios de cultivo

4.2.1. Cultivo en medio sólido

Los medios de cultivo de este trabajo fueron preparados con componentes de la casa comercial Sigma-Aldrich. La composición de dichos medios fue la siguiente:

Medios actinos	6,6 g
Glicerol 20%	7,5 mL
Agua de mar	1000 mL

Tabla 4.2.1.1. Medio *Actinomycete Isolation Agar* (AIA)

Extracto de levadura	1,2 g
Peptona de pescado	0,6 g
Almidón	3,0 g
Agar	4,5 g
Agua de mar	1000 mL

Tabla 4.2.1.2. Medio *Salt Yeast Peptone Agar* (SYPA)

Caseína	0,3 g
Almidón	3 g
Agar	4,5 g
Agua de mar	1000 mL

Tabla 4.2.1.3. Medio *Starch Casein Agar* (SCA)

Todos los medios fueron esterilizados mediante autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Una vez rellenas las placas de Petri con los diversos medios de cultivo en caliente, se dejaron enfriar para su solidificación.

Posteriormente, se efectuó una siembra por agotamiento en 4 áreas divididas de la placa, descargando las bacterias con el asa de siembra. Durante el proceso de preparación de las placas, así como de la siembra de bacterias, se trabajó en condiciones de esterilidad, mediante una campana de bioseguridad (Telstar Bio-II-AG/G).

Las placas ya sembradas se incubaron en una cámara de cultivo a una temperatura estable de 27°C, para minimizar las variaciones térmicas y así lograr el crecimiento de microorganismos con unos parámetros definidos.

Las actinobacterias, dado que presentan un crecimiento más lento y que podrían encontrarse debilitadas al haber estado congeladas durante un largo periodo de tiempo, permanecieron en la cámara de cultivo hasta la observación de su crecimiento.

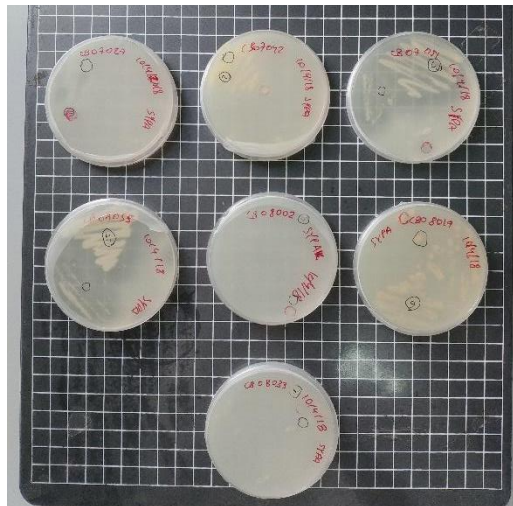


Figura 4.2.1. Cultivos en medio sólido SYPA

4.2.2. Cultivo en medio líquido

Se preparó medio de cultivo líquido, de la misma casa comercial Sigma-Aldrich.

El medio elegido se denominó *Salt Yeast Peptone* (SYP), debido a que se trata del medio SYPA, pero sin agar, para que pueda ser líquido a temperatura ambiente.

Se prepararon 0,5 L de medio SYP, cuyos componentes fueron:

Extracto de levadura	0,6 g
Peptona de pescado	0,3 g
Almidón	1,5 g
Agua de mar	500 mL

Tabla 4.2.2. Medio *Salt Yeast Peptone* (SYP)

Luego se autoclavó a 121°C durante 20 minutos, para trabajar en condiciones estériles.

Cuando se hubo enfriado, añadimos 3 mL del medio SYP a cada tubo Falcon de 15 mL y se cultivaron 3 colonias individuales de cada cepa mediante asas de siembra. En total fueron 21 tubos Falcon. Con ello se aseguraba la obtención de colonias viables.

Todo el proceso se llevó a cabo en condiciones de esterilidad, en una campana de flujo laminar.

Además, se añadió medio SYP a un nuevo tubo Falcon, denominado tubo control, para que nos sirviese de referencia y para permitirnos comprobar si se producía una contaminación de nuestro cultivo. Se puso junto a los 21 tubos de nuestras muestras.

Los cultivos líquidos se incubaron durante 2-3 días en un agitador-incubador orbital con agitación suave, a 28°C, con los tubos inclinados para favorecer el crecimiento de los microbios.

El crecimiento de los microorganismos se evaluó mediante el uso de un densitómetro, de la marca Biosan, que mide la densidad óptica en la escala de McFarland (es decir, la turbidez del medio).

Cuando ésta tuviese un valor superior a 6 unidades de McFarland, podríamos considerar óptimo el crecimiento.

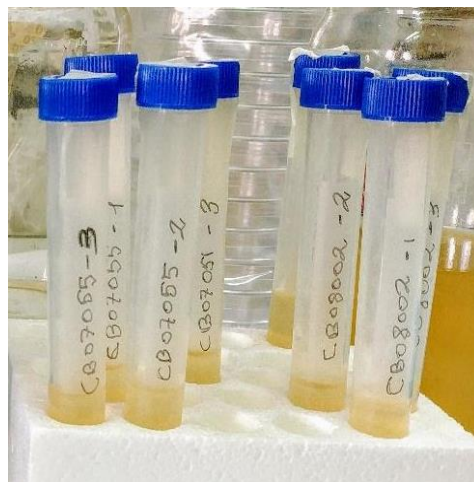


Figura 4.2.2. Cultivos en medio líquido

4.3. Obtención de ADN de las cepas

El ADN de las cepas cultivadas en medio sólido se obtuvo al resuspender una colonia en 12 μ L de H₂O destilada en un tubo de PCR, haciendo uso de un asa de siembra o una punta de pipeta. Una vez resuspendidas se tomaron 2 μ L de cada muestra, que se sembraron en forma de gota en una nueva placa de medio sólido, con objeto de obtener una réplica de respaldo de cada colonia. Posteriormente, las bacterias del tubo de PCR se romperán con la temperatura de inicio, al realizar la PCR, liberando todo el contenido de su citoplasma, incluido el ADN.

Para obtener el ADN de las cepas cultivadas en medio líquido, se tomaron 50 µl del medio de cultivo en un Eppendorf y se centrifugó para retirar el sobrenadante. Con el pellet obtenido realizamos una técnica de extracción y purificación del ADN bacteriano con un kit de purificación de ADN, denominado E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit – Omega Bio-tek, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez obtenido el ADN de cada una de las muestras, lo conservamos en tubos de Eppendorf rotulados con el número correspondiente de cada cepa a -20°C en el congelador.

Además, también purificamos ADN de la cianobacteria, *Synechococcus elongatus*, que se encontraba crecida en medio BG11, empleando el mismo kit que utilizamos anteriormente.

El objetivo de incluir estas cianobacterias fue servirnos de referencia, desempeñando éstas el papel de control positivo de todos los pasos realizados, para así poder comprobar la eficacia del método una vez nos llegasen los resultados de la secuenciación.

4.4. Realización de PCR

En una reacción de PCR, la región de ADN que será copiada, o amplificada, se determina por los cebadores utilizados.

En nuestro caso se emplearon los primers 8F de carácter universal localizados en una región conservada que amplifican una región hipervariable de unos 1200-1500 pares de bases del gen que codifica para la subunidad 16S rRNA del ribosoma bacteriano (Turner *et al.* 1999):

Forward (Fw): 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3'

Reverse (Rv): 5'- AAG GAG GTG ATC CAG CC -3'

Los primers se diluyeron en agua destilada a una concentración de stock de 100 µM, que se conservó a -20°C.

Tras añadir el H₂O a cada primer se agitó en vórtex para homogeneizar el contenido.

Por último, se realizó una dilución de trabajo de cada primer 1:10 en agua destilada y se conservaron en nevera a 4°C hasta su uso.

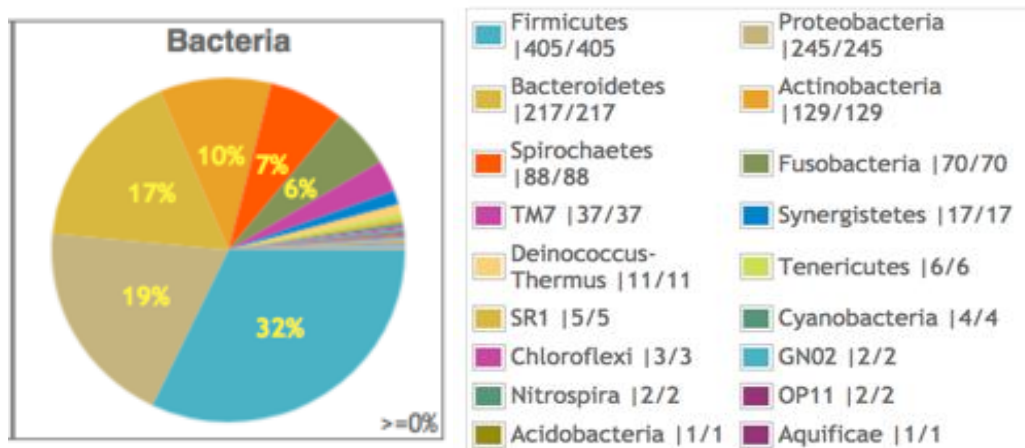


Figura 4.4.1. Gráfico que representa la amplia diversidad de procariotas que se pueden secuenciar mediante los primers utilizados en nuestro trabajo. Fuente: www.ibi.vu.nl

A la hora de realizar la PCR, empleamos dos kits distintos, uno que contenía la enzima Taq, de la casa comercial Thermo Fisher, y otro que contenía la enzima Phire Hot Start II, también de Thermo Fisher.

Por tanto, realizamos dos Máster MIX, siguiendo las recomendaciones del fabricante, para efectuar la PCR. Como teníamos 7 muestras, multiplicamos la cantidad de cada reactivo por 8 (incluimos una más para el Control -; y por si hubiese error de pipeteo).

H ₂ O	254 µL
Buffer NH ₄ ⁺	40 µL
dNTPs	8 µL
Primer Fw	8 µL
Primer Rv	8 µL
Taq	2 µL
Total MIX: 40 µL + (ADN + 10 µL H ₂ O) = 50 µL	

Tabla 4.4.1. MIX usando kit de Taq polimerasa

H ₂ O	57,6 µL
Buffer NH ₄ ⁺	32 µL
dNTPs	3,2 µL
Primers (Fw + Rv)	48 µL
Phire	3,2 µL
Total MIX por muestra: 18 µL + (2 µL de ADN purificado) = 20 µL	

Tabla 4.4.2. MIX usando kit de Phire Hot Start II

Seguimos este orden a la hora de preparar la MIX para que, en caso de equivocarnos, poder reiniciar el proceso, desde el reactivo más barato al más caro. La Taq polimerasa, así como la Phire Hot Start II, junto con los demás reactivos (excepto el H₂O) se conservan a -20°C en el congelador y se manipulan en termobloques para mantener dicha temperatura.

Para una organización más fácil, cada una de las cepas fue nombrada con los últimos dos dígitos de su código original. Dichos números fueron rotulados tanto en las placas de Petri como en los tubos de PCR.

CB07027 →	CB07042 →	CB07051 →	CB07055 →	CB08002 →	CB08019 →	CB08033 →
27	42	51	55	02	19	33

Tabla 4.4.3. Cepas renombradas

Se añadió a cada uno de los 7 tubos de PCR 40 µL de MIX, y se añadió posteriormente los 10 µL de ADN suspendido (ADN + 10 µL de H₂O) de cada muestra a cada tubo; hicimos, además, un tubo de PCR control con los 20-30 µL que sobraron de la MIX, al que denominamos C-.

En el caso del ADN purificado, lo que hicimos fue añadir 2 µL de dicho ADN a 18 µL de la MIX, para que los cálculos estuvieran ajustados, y resultase un total de 20 µL.

Fuimos cambiando la punta de la pipeta al pasar de un tubo a otro para evitar posibles contaminaciones que nos pudiesen emascarar los resultados, debido a que la técnica de PCR es muy sensible.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador LabNet MultiGene OptiMax, utilizando los parámetros de ciclado siguientes:

	Temperatura	Tiempo	Programa
Desnaturalización	95°C	4 minutos	5
30 ciclos	94°C	30 segundos	14
	52°C	40 segundos	
	72°C	1,5 minutos	
Extensión final	72°C	10 minutos	13
Hold	4°C	∞	4

Tabla 4.4.4. Parámetros establecidos en la PCR

4.5. Electroforesis

Los productos de la amplificación fueron resueltos en una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (2,25 g Agarosa + 150 mL TAE 1x) y teñido con Gel Green (5 μ L), de la casa comercial Thermo Fisher.

A cada muestra de PCR (de 10 μ l) se le añaden 5 μ L de cargador Green Buffer, también de Thermo Fisher. Tras mezclar con la punta de pipeta, añadimos al pocillo del gel 10 μ L (muestra + cargador).

Se utilizó un marcador de 1kb como marcador de peso molecular (O' GeneRuler 1kb DNA Ladder), del cual se añadieron 10 μ L al primer pocillo del gel.

La electroforesis se dejó correr a 100V durante unos 30-35 minutos.

4.6. Purificación de las muestras y secuenciación

Previo a la secuenciación, empleamos el kit ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent, de Thermo Fisher, siguiendo las instrucciones del fabricante, para realizar la digestión enzimática y limpiar nuestras muestras de PCR.

Nuestros resultados se enviaron a secuenciar a Secugen, en Madrid. Enviamos 10 μ L de cada tubo de PCR. Para secuenciar las dos cadenas, y empezar por cada extremo 5', tuvimos que dividir cada muestra a su vez en dos tubos de Eppendorf, cada uno de las cuales tendría 0,5 μ L de uno de los primers a la dilución de trabajo, es decir, uno contendría el primer Fw y, el otro, el primer Rv. Además, recortamos cada banda del gel con sumo cuidado haciendo uso de un bisturí, y las conservamos en tubos de Eppendorf, por si acaso fuesen necesarias. Aunque al final no hicieron falta.

En la secuenciación, la técnica empleada es la denominada método Sanger, desarrollada por Frederick Sanger (1975). La secuenciación por el método de Sanger que más se utiliza en la actualidad es la electroforesis capilar, lo que permite su automatización.

Una vez revisados y corregidos los cromatogramas que nos llegaron de la secuenciación, se ensamblaron las secuencias obtenidas de ambas cadenas, identificando las regiones solapantes, haciendo uso del programa bioinformático SnapGen Viewer.

4.7. Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas

Con objeto de identificar las cepas, las secuencias obtenidas se sometieron a una búsqueda de homología mediante el algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), del National Center for Biotechnology Information (NCBI), que consiste en un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o de proteínas. Dicho programa compara una secuencia problema frente a una gran cantidad de secuencias que se hallen recopiladas en una base de datos. El algoritmo encuentra las secuencias de la base de datos que tienen mayor parecido a la secuencia problema y le asigna un valor E, correspondiente a una estimación matemática que refleja la probabilidad de que nuestra secuencia fuese alineada por azar con la de referencia.

Posteriormente, para averiguar la posible relación filogenética que podría existir entre las secuencias obtenidas se realizó un alineamiento de las secuencias mediante el programa *on line* CLUSTALW (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>), usando los parámetros por defecto. Con ello se identificaron las regiones homólogas dentro de las secuencias correspondientes a las regiones hipervariables del gen 16S rRNA.

Una vez obtenido el alineamiento de las secuencias, se obtuvo un árbol filogenético, usando el programa *on line* TaxMan, con los parámetros por defecto (<http://www.ibi.vu.nl/programs/taxmanwww/>)

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Crecimiento de cepas en medio sólido y líquido

Una vez se produjo el crecimiento de las placas, pudimos obtener colonias aisladas en el medio sólido SYPA. A medida que se fue observando el crecimiento de microorganismos en medio sólido, transcurridas aproximadamente dos semanas, procedimos a separar e ir guardando en nevera a 4°C aquellas placas en las que el crecimiento era el adecuado para trabajar con ellas. El objetivo de dicha refrigeración era ralentizar el crecimiento de los microorganismos para conservar los cultivos durante un periodo de tiempo más largo.

En general se observó un crecimiento más favorable en las placas de medio SYPA.

Finalmente, las cepas que obtuvimos crecidas todas en medio sólido SYPA, fueron las siguientes: CB07027, CB07042, CB07051, CB07055, CB08002, CB08019, CB08033.

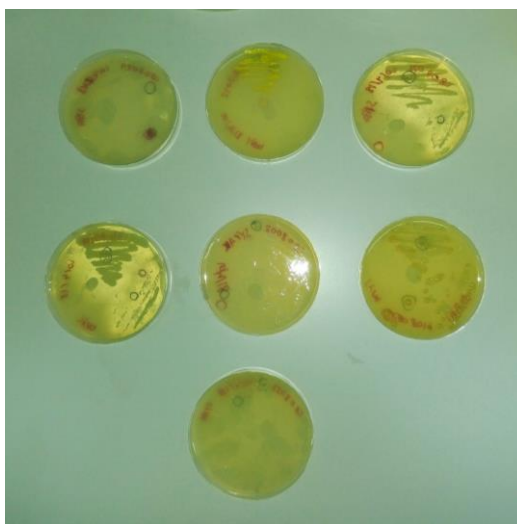


Figura 5.1.1 Bacterias crecidas en medio SYPA

Las cepas CB07044, CB08007, CB08073, CB08122, CB08128 permanecieron en la cámara de incubación a 28°C. Sin embargo, transcurridos 2-3 meses de cultivo en medio sólido, no se llegó a observar crecimiento y no pudieron ser incluidas en este trabajo.

En los cultivos en medio líquido comprobamos que el crecimiento se dio a los 2-3 días fijándonos en la turbidez del medio, con un valor de McFarland de más de 6. Comparado con las 2-3 semanas que tardaron inicialmente las cepas en crecer en las placas en medio sólido, podríamos decir que las bacterias cultivadas crecieron mejor en medio líquido que en medio sólido. Posiblemente

debido a que dichos organismos, al estar acostumbrados a vivir en el medio marino, se desarrollan mejor en un medio similar como es el SYP y, donde, además, junto con la agitación constante a la que estaban sometidos, se dispersan de manera más favorable, lo que les permite un mejor acceso a los nutrientes.

A partir de ese momento trabajamos con las cepas ya crecidas que se encontraban en medio líquido, las cuales eran: CB08019, CB08033, CB07051, CB07027.

En las cepas CB07055 y CB08002, cultivadas en medio líquido, no se observó crecimiento y no fueron procesadas.

5.2. Resolución de electroforesis

Tras realizar la electroforesis de las PCRs, haciendo uso de la enzima Phire Hot Start II, para las muestras cultivadas en medio líquido, cuyo ADN fue purificado, observamos los resultados mediante un transiluminador de luz azul, de la marca Maestrogen. Aparecieron bandas para 5 muestras del total de 6, con un tamaño aproximado de 1200-1500 pares de bases (pb), excepto para la muestra CB07042. Por tanto, purificamos estas 5 muestras y las enviamos a secuenciar.

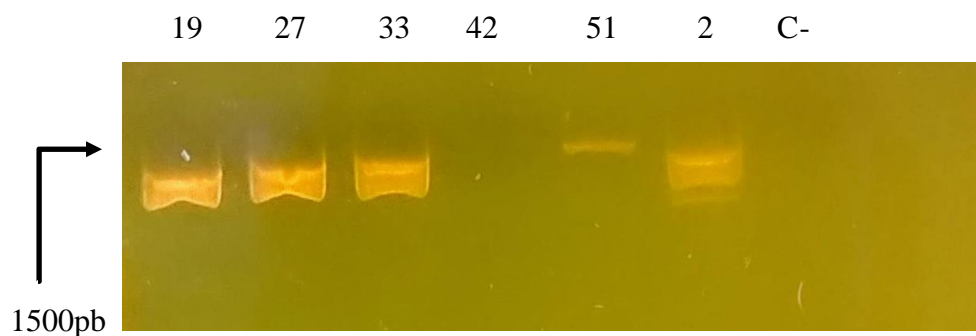


Figura 5.2. Bandas de ADN en gel de agarosa al 1,5%

Para las muestras cultivadas en medio sólido, nunca llegamos a obtener buenos resultados usando la Taq Polimerasa, es decir, no aparecían bandas en el gel y, cuando aparecían, no era de forma nítida y definida, sino difusa. Posiblemente fuese porque al no estar bien purificado ADN, puede que hubiese inhibidores de la polimerasa durante la electroforesis, lo que generaba una mancha borrosa en donde deberían de aparecer las bandas y, además, en ocasiones, no coincidía con el tamaño de la banda que estábamos buscando y podía deberse a los dímeros que forman los primers, que son de menor tamaño.

Incluso probamos a trabajar con la enzima Taq Polimerasa usando ADN purificado, pero, aun así, no aparecían bandas. También adquirimos primers nuevos durante el proceso, así como probamos distintas configuraciones de MIX, o añadiendo más Magnesio a la misma. Adquirimos posteriormente un nuevo kit de de Taq polimerasa, por si el error se encontraba en éste, pero el resultado era el mismo. Seguían sin aparecernos las bandas.

Es por ello que tuvimos que emplear una enzima más robusta en la PCR, como fue la Phire Hot Start II, compatible con inhibidores de la polimerasa (Hall *et al.* 2013) que finalmente sí nos dio buenos resultados.

5.3. Identificación de especies

Una vez obtenidas las secuencias utilizamos la herramienta bioinformática SnapGene Viewer, que nos permitió editar el cromatograma, eliminar ruido de fondo, y ensamblar las secuencias obtenidas de cada cadena desde ambos extremos 5'. Una vez ensambladas, las convertimos en formato FASTA para así realizar la búsqueda de secuencias homólogas y los alineamientos.

Realizado el BLAST, concluimos que los géneros y/o especies a los que pertenecían nuestras muestras eran:

Cepa	Género y/o especie	Rango de identidad	E-valor	Porcentaje de identidad
CB07051	<i>Bacillus sp.</i>	69%	0,0	100%
CB08019	<i>Cobetia marina</i>	100%	0,0	99%
CB08033	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	98%	0,0	99%
CB07027	<i>Bacillus licheniformis</i>	99%	0,0	100%
2	<i>Synechococcus elongatus</i>	100%	0,0	99%

Tabla 5.3.1. Tabla que recoge cada cepa junto con el género y/o especie, el rango de identidad, el E-valor y el porcentaje de identidad obtenido en el BLAST.

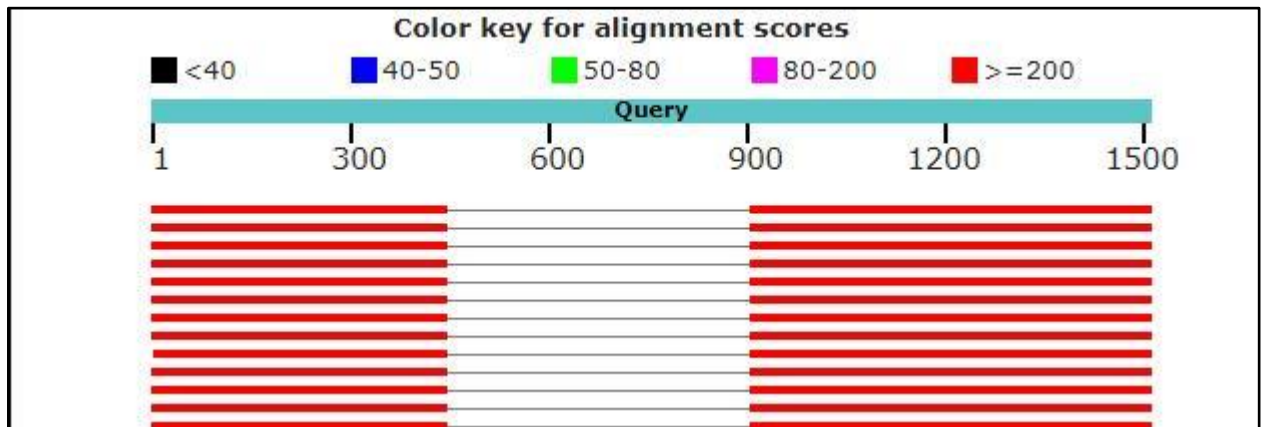


Figura 5.3.1. Resultados del BLAST de la cepa 51.

La cepa CB07051 fue asignada al género *Bacillus* sp.

Bacillus (Cohn 1872) es un género de bacterias en forma de bastón y Gram-positiva, son aerobias estrictas o anaerobias facultativas. En condiciones estresantes forman una endospora de situación central, que no deforma la estructura de la célula a diferencia de las endosporas clostridiales. Dicha forma esporulada es resistente a las altas temperaturas y a los desinfectantes químicos corrientes.

Solamente pudimos llegar hasta la clasificación del género en esta cepa, puesto que los resultados que nos llegaron de la secuencia no fueron óptimos y, la región central, de unas 450 pares de bases en total, fue considerada como genérica, o neutra. Por lo que la asignación más específica a la que pudimos llegar fue a la del género *Bacillus*, perteneciente al filo *Firmicutes*.

Para una mayor precisión en el análisis posterior de dicha cepa deberíamos de diseñar nuevos primers flanqueando la región cuya secuencia no se pudo determinar.

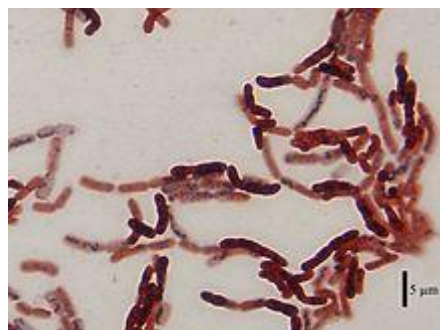


Figura 5.3.2. Células de *Bacillus* sp. teñidas con Sudán negro y safranina.

Fuente: Wikipedia.

La cepa CB08019 fue asignada a la especie *Cobetia marina*

Cobetia marina (DSMZ 4741), anteriormente descrita como *Arthobacter marinus*, *Pseudomonas marina*, *Pseudomonas halodurans*, *Deleya marina*, *Halomonas halodurans* así como *Halomonas marina* (Arahal *et al.* 2002) fue aislada por primera vez del agua del mar litoral en Woodshole (Estados Unidos) en 1970 (Cobet *et al.* 1971). Se trata de una bacteria aeróbica Gram-negativa, ligeramente halófila. Esta bacteria está comúnmente relacionada con el medio ambiente de las macroalgas (Ivanova *et al.* 2002, Ivanova *et al.* 2005, Kraiwattanapong *et al.* 1999).

C. marina también es capaz de formar una biopelícula que puede influir en la colonización secundaria de invertebrados y algas en el medio marino (Shea *et al.* 1995) y fue estudiada como modelo biológico en el fenómeno del biofouling (Maréchal *et al.* 2004). Su capacidad para sintetizar y excretar exopolisacáridos y acumular poli- β -hidroxialcanoato intracelular ya se describieron en una cepa diferente a DSMZ 4741 (Kokoulin *et al.* 2014, Shea *et al.* 1991).

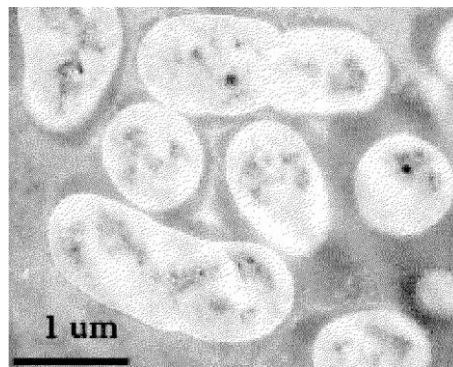


Figura 5.3.3. *Cobetia marina* al microscopio.

Fuente: Universidad de Valparaíso.

La cepa CB08033 fue asignada a la especie *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

Marinobacter hydrocarbonoclasticus se trata de una bacteria marina Gram-negativa, con forma de varilla, que no presenta capacidad de esporulación. Fue aislada por primera vez cerca de una refinería de petróleo en el mar Mediterráneo (Gauthier *et al.* 1992).

Las células tienen un flagelo polar descentrado que les permite tener capacidad de movimiento en el ambiente marino. Además, son extremadamente halotolerantes y en cierto modo halófilas (Larsen 1986).

Pueden crecer en un ambiente con un rango de concentración de cloruro sódico (NaCl) de 0,08-3,5 M, con una concentración óptima de NaCl de unos 0,6 M.

Dichas bacterias generalmente crecen y viven en un ambiente con una temperatura de 10-45°C y un pH relativamente neutro, tirando a básico, entre 6-9,5.

El contenido de NaCl es fundamental para *M. hydrocarbonoclasticus*, ya que la concentración de NaCl tiene la capacidad de afectar tanto en la forma como en la flagelación de estas células. Esta bacteria puede degradar diferentes tipos de hidrocarburos, como el petróleo, y usarlos como únicas fuentes de carbono y energía (Rehm y Reiff 1981).

En general, *M. hydrocarbonoclasticus* tiene la capacidad de habitar y crecer en una amplia gama de entornos en el ecosistema marino, tanto de forma aeróbica como anaeróbica. Estas características pueden ser beneficiosas como biorremediación para los científicos que buscan nuevas técnicas basadas en bacterias para la limpieza del vertido de petróleo en los océanos.



Figura 5.3.4. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* bajo el microscopio electrónico.

Fuente: Barnes and Nobel

La cepa CB07027 asignada a la especie *Bacillus licheniformis*

Bacillus licheniformis (Weigmann 1898) es una bacteria de tipo Gram-positiva, que habita normalmente en el agua, en las plumas de los pájaros y en el suelo, lugar donde produce esporas como mecanismo de conservación y para la proliferación. Es un bacilo de tipo anaerobio facultativo, lo cual permite su crecimiento tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Representa una bacteria de importancia industrial debido al uso comercial y agrícola de algunos de sus productos extracelulares, que son utilizados para la producción de enzimas, antibióticos y diversos productos químicos.

Entre las enzimas que secreta este microorganismo se encuentran las proteasas alcalinas, también conocidas como subtilisinas, las cuales tienen usos como aditivos para detergentes domésticos. Además, a partir de diferentes cepas de *Bacillus licheniformis* se obtienen diferentes productos de fermentación, como las amilasas, en particular la α -amilasa, que muestra una actividad estable a

niveles elevados de pH y temperatura; y además se emplea en la obtención del antibiótico bacitracina, que actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular de bacterias Gram-positivas (Snoke y Cornell 1965).

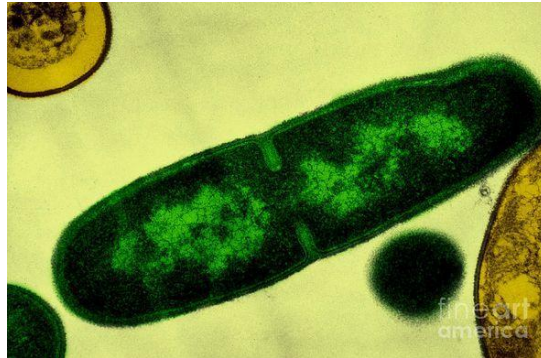


Figura 5.3.5. *Bacillus licheniformis*. Fuente: Lee D. Simon.

La cepa 2 fue asignada a la especie *Synechococcus elongatus*

Synechococcus elongatus (Frenkel *et al.* 1950) se trata de una cianobacteria unicelular muy extendida en el medio marino. Su tamaño varía de 0,8 a 1,5 μm . Estas células con morfología cocoide, y fotosintéticas, se encuentran principalmente en las aguas superficiales bañadas por la luz del sol, donde pueden ser muy abundantes (por norma general se suelen encontrar entre 1.000 y 200.000 células por mililitro de agua). Son responsables del 25% de la producción primaria en el medio marino, lo que las convierte en una de las bacterias fotosintéticas más importantes (Scanlan y Nyree 2002). Además, presentan un gran interés en el campo de la biotecnología debido a su alta capacidad para producir proteínas recombinantes.

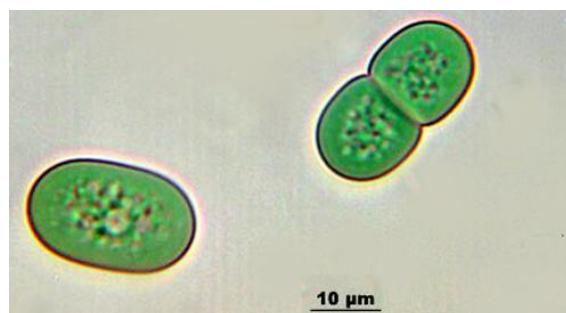


Figura 5.3.6. Fotografía de *Synechococcus* sp. en fisión binaria.

Fuente: <http://protist.i.hosei.ac.jp>

5.4. Árbol filogenético

Para establecer posibles relaciones filogenéticas entre las colonias identificadas de la colección, se realizó un alineamiento de las secuencias obtenidas y su posterior árbol filogenético.

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

19      ACA--CATGC-AGTCGAGCGGAACGA-TCCTAGCTTGCTAGGA-GGCGTC
2       CA-----TGC-AGTCGAACGGG-----CT--CT--TC-GGAG-C
27      CTATACATGCAAGTCGAGCGGACCGA-CGGGAGCTTGCTCCCT-TAGG-T
33      TG-----C-AGTCGAGCGGTAACAGGGGTAGCTTGCTACCC-GCTGAC
51      AG-----TGCAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACG-T
                ****  **                **  **                *
```

Figura 5.4.1. Fragmento del alineamiento obtenido mediante CLUSTALW.

Las dos cepas que guardaban una relación más estrecha entre sí del trabajo fueron *Bacillus sp.* y *Bacillus licheniformis*, pertenecientes al filo *Firmicutes*. La siguiente especie más próxima a las anteriores se encontraba dentro de la misma rama del árbol y es *Synechococcus elongatus*, perteneciente al filo *Cyanobacteria*. Por último, se encontraban *Cobetia marina* y *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, que se corresponden con las cepas más alejadas, ambas pertenecientes al filo *Proteobacteria*.

Realizamos un árbol filogenético mediante páginas web que nos permitieron establecer relaciones en las secuencias de nuestras 5 cepas. El árbol obtenido fue el siguiente:

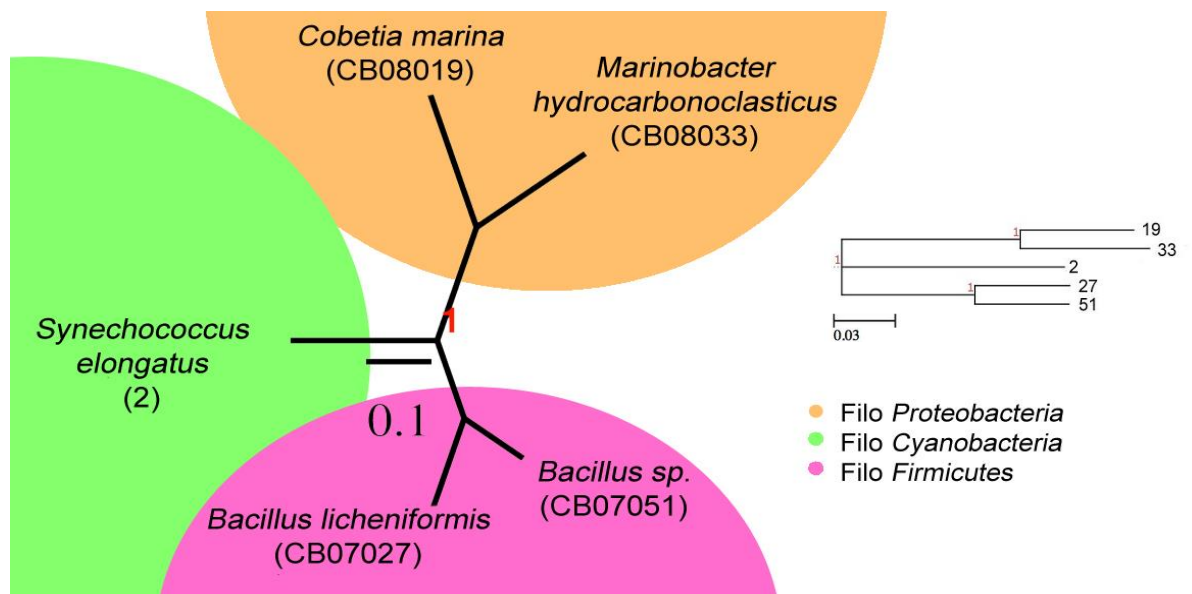


Figura 5.4.2. Árbol filogenético que relaciona las 5 cepas del trabajo y el filo al que pertenecen.

Fuente: <http://www.ibi.vu.nl/programs/taxmanww>

Al final del trabajo se encuentra adjunto como material suplementario tanto la secuencia obtenida en formato FASTA, como el alineamiento de los nucleótidos usando la herramienta bioinformática CLUSTALW.

6. CONCLUSIONES

- De la colección inicial de 12 MOM, se lograron crecer un total de 7 cepas.
- En cinco de estas cepas, conseguimos amplificar una región hipervariable del gen que codifica para la subunidad 16S rRNA del ribosoma bacteriano.
- El análisis bioinformático de las secuencias correspondientes a las bandas amplificadas nos permitió asignar estas colonias a su correspondiente género, entre los que se encontraban *Bacillus*, *Cobetia*, *Marinobacter* y *Synechococcus*.
- El alineamiento de estas secuencias nos permitió establecer las distancias filogenéticas entre los géneros encontrados, siendo las más relacionadas los géneros *Bacillus*, y *Cobetia* y *Marinobacter*.

6.1. Conclusions

- From the initial collection of 12 obligated marine microorganisms, a total of 7 strains were grown.
- In five of these strains, we were able to amplify a hypervariable region of the gene that encodes for the 16S rRNA subunit of the bacterial ribosome.
- El análisis bioinformático de las secuencias correspondientes a las bandas amplificadas nos permitió asignar estas colonias a su correspondiente género, entre los que se encontraban *Bacillus*, *Cobetia*, *Marinobacter* y *Synechococcus*.
- The alignment of these sequences allowed us to establish phylogenetic distances between the genera found, being the most related genera was *Bacillus*, and *Cobetia* and *Marinobacter*.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Arahal, D. R., Castillo, A. M., Ludwig, W., Schleifer, K. H., & Ventosa, A. 2002. Proposal of *Cobetia marina* gen. nov., comb. nov., within the family Halomonadaceae, to include the species *Halomonas marina*. *Systematic and applied microbiology*, 25(2), 207.
- Cobet, A. B., Wirsén, C., & Jones, G. E. 1971. The effect of nickel on a marine bacterium, *Arthrobacter marinus* sp. nov. *Microbiology*, 62(2), 159-169.
- Cobet, A. B., Jones, G. E., Albright, J., Simon, Helen, Wirsén, C. 1971. The Effect of Nickel on a Marine Bacterium: Fine Structure of *Arthrobacter marinus*. 01 May 1971, *Microbiology* 66: pp 185-196, doi: 10.1099/00221287-66-2-185.
- Cock, J. M., Tessmar-Raible, K., Boyen, C., & Viard, F. (Eds.). 2010. *Introduction to marine genomics* (Vol. 1). Springer Science & Business Media.
- Fenical, W., & Jensen, P. R. 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nature chemical biology*, 2(12), 666.
- Frenkel, Albert et al. 1950. Photosynthesis and photoreduction by the blue green alga, *Synechococcus elongatus*, *Nag. Biology Bulletin*. Volume 99. p. 157-162.
- Fuhrman, J. A., Cram, J. A., & Needham, D. M. 2015. Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation. *Nature Reviews Microbiology*, 13(3), 133.
- Gauthier, M. J., B. Lafay, R. Christen, L. Fernandez, M. Acquaviva, P. Bonin, and J.-C. Bertrand. 1992. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. Nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon degrading marine bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1992, DOI: 10.1099/00207713-42-4-568.
- Hall, A. T., Zovanyi, A. M., Christensen, D. R., Koehler, J. W., & Minogue, T. D. (2013). Evaluation of inhibitor-resistant real-time PCR methods for diagnostics in clinical and environmental samples. *PloS one*, 8(9), e73845.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., & Ball, S. L. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
- Hellweger, F. L., van Sebille, E., & Fredrick, N. D. 2014. Biogeographic patterns in ocean microbes emerge in a neutral agent-based model. *Science*, 345(6202), 1346-1349.
- Ivanova, E. P., Bakunina, I. Y., Sawabe, T., Hayashi, K., Alexeeva, Y. V., Zhukova, N. V., ... & Mikhailov, V. V. 2002. Two species of culturable bacteria associated with degradation of brown algae *Fucus evanescens*. *Microbial ecology*, 43(2), 242-249.
- Ivanova, E. P., Christen, R., Sawabe, T., Alexeeva, Y. V., Lysenko, A. M., Chelomin, V. P., & Mikhailov, V. V. 2005. Presence of ecophysiologically diverse populations within *Cobetia marina* strains isolated from marine invertebrate, algae and the environments. *Microbes and environments*, 20(4), 200-207.
- Janda JM, Sharon L. Abbott. 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of clinical microbiology*, September 2007 vol. 45 no. 9 2761-2764.
- Jed A. Fuhrman, Jacob A. Cram & David M. Needham. 2015. Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation. *Nature Reviews Microbiology* volume 13, pages 133–146.
- Karl, D. M. 2007. Microbial oceanography: paradigms, processes and promise. *Nature Reviews Microbiology*, 5(10), 759.
- Karl, D. M., & Church, M. J. 2014. Microbial oceanography and the Hawaii Ocean Time-series programme. *Nature Reviews Microbiology*, 12(10), 699.
- Kraiwananpong, J., Tsuruga, H., Ooi, T., & Kinoshita, S. 1999. Cloning and sequencing of a *Deleya marina* gene encoding for alginate lyase. *Biotechnology letters*, 21(2), 169-174.
- Kress WJ, Erickson DL. 2012. *DNA Barcodes: Methods and Protocols*. *Methods in Molecular Biology* 858. Humana Press/Springer, New York, 470pp.
- Larsen, H. 1986. Halophilic and halotolerant microorganisms: an overview and historical perspectives." *FEMS. Microbiol. Rev.*, 1986, DOI: 10.1111/j.1574-6968.1986.tb01835.x
- Maldonado, L. A., Stach, J. E., Pathom-aree, W., Ward, A. C., Bull, A. T., & Goodfellow, M. 2005. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87(1), 11-18.
- Maldonado, L. A., Fenical, W., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Mincer, T. J., Ward, A. C., ... & Goodfellow, M. 2005. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes

belonging to the family Micromonosporaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5), 1759-1766.

Maréchal, J. P., Culioli, G., Hellio, C., Thomas-Guyon, H., Callow, M. E., Clare, A. S., & Ortalo-Magné, A. 2004. Seasonal variation in antifouling activity of crude extracts of the brown alga *Bifurcaria bifurcata* (Cystoseiraceae) against cyprids of *Balanus amphitrite* and the marine bacteria *Cobetia marina* and *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 313(1), 47-62.

Mincer, T. J., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., & Fenical, W. 2002. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied and environmental microbiology*, 68(10), 5005-5011.

Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J., & Olsen, G. J. (1986). The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. In *Advances in microbial ecology* (pp. 1-55). Springer, Boston, MA.

Rehm, H.J., and Reiff, I. 1981. Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long-chain alkanes. *Adv. Biochem. Eng.*, 1981, DOI: 10.1007/3-540-10464-X_18

Romanenko, L. A., Tanaka, N., Svetashev, V. I., & Falsen, E. 2013. Description of *Cobetia amphilecti* sp. nov., *Cobetia litoralis* sp. nov. and *Cobetia pacifica* sp. nov., classification of *Halomonas halodurans* as a later heterotypic synonym of *Cobetia marina* and emended descriptions of the genus *Cobetia* and *Cobetia marina*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(1), 288-297.

Scanlan, D. J. and Nyree, J. W. 2002. Molecular ecology of the marine cyanobacterial genera *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *FEMS Microbiology Ecology*. Volume 40. p. 1-12.

Shea, C., Nunley, J. W., Williamson, J. C., & Smith-Somerville, H. E. 1991. Comparison of the adhesion properties of *Deleya marina* and the exopolysaccharide-defective mutant strain DMR. *Applied and environmental microbiology*, 57(11), 3107-3113.

Shea C, Lovelace L. J, Smith-Somerville H. E. 1995. *Deleya marina* as a model organism for studies of bacterial colonization and biofilm formation. *Journal of Industrial Microbiology*, 15 (4): pp 290–296.

Snoke, J. E., & Cornell, N. 1965. Protoplast lysis and inhibition of growth of *Bacillus licheniformis* by bacitracin. *Journal of bacteriology*, 89(2), 415-420.

Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P., & Palmer, J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis 1. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), 327-338.

Weigmann, H. 1898. Über zwei an der Käsereifung beteiligte Bakterien. *Zentralbl. Bakteriol. Hyg. II*, 4, 820-834.

Yarza, P., Richter, M., Peplies, J., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K. H., ... & Rosselló-Móra, R. 2008. The All-Species Living Tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Systematic and applied microbiology*, 31(4), 241-250.

Yarza, P., Ludwig, W., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K. H., Glöckner, F. O., & Rosselló-Móra, R. 2010. Update of the All-Species Living Tree Project based on 16S and 23S rRNA sequence analyses. *Systematic and applied microbiology*, 33(6), 291-299.

Agradecimientos

Este trabajo de fin de grado se ha desarrollado conjuntamente en el Grupo de Química de Productos Marinos del Departamento de Fitoquímica Aplicada y Ecología Química del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), y en el Laboratorio de Biotecnología de Macromoléculas, también del IPNA- CSIC.

Agradecimientos especiales a José Manuel Pérez de la Lastra, por ser mi director de Trabajo de Fin de Grado, por aconsejarme y siempre enseñarme cosas nuevas, así como por su dedicación e implicación en el proyecto; a Mercedes Cueto, por proporcionarme las bacterias inicialmente, por ayudarme y resolver mis dudas en todo momento, y por prestarme su laboratorio y sus medios; a José de la Rosa, por proporcionarme los primers que usamos en los inicios del trabajo; a Javier García Machado, por implicarse y resolver con nosotros los problemas surgidos durante la PCR, y por enseñarme; a Patricia Ascencio, por prestarme útiles del laboratorio, y por ayudarme; a Andrés Borges, por su ayuda e implicación en el proyecto; a Ángel M. Gutiérrez Navarro, por tutelar mi trabajo y resolver mis dudas en la mejor medida de lo posible.

33 GGGTGAGTAATGCTTAGG-AATCTGCCCA-GTAGTGGGGGATAGCCCGGGAAACCCGGA
51 GGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTA-AGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAG
2 GGGTGAGTAACGCGTGAG-AATCTGCCTACATGGACGGGGACAACAGTTGGAAACGACTG
19 GGGTGAGTAATGCATGGG-AATCTGCCCG-ATAGTGGGGGACAACCTGGGGAAACTCAGG
27 GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTA-AGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGG
***** * * * * * * * * * * * * * * *

33 TTAATACCGCATAAC-----GTCCTACGGGAGAA----AGCAGGGGATCTTCGGACCT
51 CTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATG-ATTGAAAGATGGTTTCGG--CT
2 CTAATACCGCATGT-----GCC-----GAGA----GGTGAAACATTTATGG--CC
19 CTAATACCGCATAAC-----GTCCTACGGGAGAA----AGCAGGGGATCTTCGGACCT
27 CTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATCATAAAAAGGTGGCTTTTAG--CT
***** ** * * *

33 TGCGCTATTGGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGG
51 ATCACTTACAGATGGGCCCCGCGTGCATTAGCTAGTTGGTGGGTAACGGCTCACCAAGG
2 TG-----TAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGG
19 TGCGCTATCGGATGAGCCCATGTCGGATTAGCTTGTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGG
27 ACCACTTACAGATGGACCCGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGTAACGGCTCACCAAGG
***** * * * * * * * * * * * * * * *

33 CGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGACTGAGACACGGCCCCG
51 CAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCA
2 CGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCA
19 CGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCA
27 CGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCA
* *

33 AACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCC
51 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCA
2 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCA
19 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCC
27 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCA
* *

33 ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTTGTAAAGC-----
51 ACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAGACTCTGTGTTAGGGAAGAACAAG
2 ACGCCGCGTGGGGAGGAAGGTTTTTGGACTGTAAACC-----
19 ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTTGTAAAGC-----
27 ACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAGAAC-----
* *

33 -----ACTTTCAGTAGG
51 TACAAGAGTAACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGGCCNNNNNNNNNNNNNN
2 -----CCTTTTCTCAGG
19 -----ACTTTCAGCGAG
27 -----TCTGTTGTTAGG

33 GAGGAAAACCTTATGGCT-AATACCCATGAGGCTTGACGTTACCTACAGAAGAAGCACCG
51 NNN
2 GAAGAAGA-----AAGTGACGGTACCTGAGGAATAAGCCTCG
19 GAAGAACGCCTTGGGATT-AATACTCCCGAGGAAAGACATCACTCGCAGAAGAAGCACCG
27 GAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG

33 GCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAAATTACT
51 NNN
2 GCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATT
19 GCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAAATTACT
27 GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATT

33 GGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGGTAAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTTAACCT
51 NNN
2 GGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGTTAATCAAGTCTGTTGTCAAAGCGTGGGGCTCAACCT
19 GGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGCTAAGTCAGCCAGGTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCT
27 GGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCG

33 GGAACGGCATTTCGAACTGTCAGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGTGAATTTCCCTGTG
51 NNN
2 CATAAGGCAATGAAACTGATTGACTAGAGTATGGTAGGGGTAGCGGGAATTCAGGTG
19 GGAACGGCATCTGAACTGCTTGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTAGAATTCACGGTG
27 GGGAGGGTCATTGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACCGTG

33 TAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGACC
51 NNN
2 TAGCGGTGAAATGCGTAGATATCTGGAAGAACACCAGCGCGAAAGCGCGCTACTGGGCC
19 TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCTTCTGGACT
27 TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCT

33 AACACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
51 NNN
2 ATAAGTACGCTCATGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCTGTAGTC
19 GACACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
27 GTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC

33 CACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGACTCTTGAAGT-CTTAGTGGCGCAGCTA
51 NNN
2 CTAGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTTGCGTGAATCGACCCGCGCAGTGCCGTAGCCA
19 CACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGTCCCTTGAGGA-CTTAGTGGCGCAGCTA
27 CACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAA

33 ACGCACTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACG-GCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGA
51 NNN
2 ACGCGTTAAGTGTTCGCGCTGGGGAGTACGCACCGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGA
19 ACGCAATAAGTTGACCGCTGGGGAGTACG-GCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGA
27 ACGCATTAAAGCACTCCGCGCTGGGGAGTACG-GTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGA

33 CGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCCTTA
51 CGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTA
2 CGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTA
19 CGGGG-CCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTA
27 CGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTA

33 CCTGGCCTTGACATCCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTC--GGAACTCTG
51 CCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACTCTAGAGATAGAGCGTTCCCTTCGGGGGACAGAG
2 CCAGGGTTTGACATCCCCGAATCTCTTGAAACGAGAGAGTGCCTTC--GGGAGCGGGG
19 CCTACCCTTGACATCCAGAGGACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTC--GGAACTCTG
27 CCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTAGAGATAGGGCTTCCCTTC--GGGGCAGAG
** ***** *

33 AGACAGGTGCTGCATGGCCGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTA
51 TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
2 AGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
19 AGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGTA

