

VNIVERSITAT D VALÈNCIA



Departamento de Microbiología y Ecología

Colección Española de Cultivos Tipo

Doctorado en Biotecnología

**Autenticación de cepas
de la CECT mediante
MALDI-TOF MS y GC FAME**

Director de Tesis

David Ruiz Arahal

María Desamparados Ruvira Garrigues

Tesis Doctoral

Valencia, 2013

Dr. David Ruiz Arahall, Profesor Titular del Departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICA:

Que María Desamparados Ruvira Garrigues, Licenciada en Bioquímica por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Autenticación de cepas de la CECT mediante MALDI-TOF MS y GC FAME”, que presenta para optar al grado de Doctor en Biotecnología por la Universidad de Valencia.

Y para que conste, en el cumplimiento de la legislación vigente, firma el presente certificado en Valencia, a

David Ruiz Arahall

Agradecimientos

Este trabajo de tesis no se podría haber realizado sin el esfuerzo de muchas personas. Me gustaría agradecer a todas ellas su apoyo.

En primer lugar, a mi director de tesis, el Dr. David R. Arahal, por su dedicación, paciencia y apoyo. Por transmitirme su perfeccionamiento y meticulosidad. Y por su gran calidad humana.

A mis compañeras de investigación Mari Carmen, por su paciencia y apoyo tanto en lo personal como en lo profesional. María Jesús, por su ayuda y por transmitirme su enorme entusiasmo por la Microbiología. Teresa, por ser mi compañera, mi cómplice, mi consejera y en definitiva mi amiga. Eva, por su apoyo en el día a día, por su buen humor y por traer tanta frescura al equipo.

A todos mis compañeros de la Colección Bea, Rosa, Adrián, Bego, Aurora, Mari Jou, Jordi, Chemi, Laura, Ana y Nicolás gracias por el buen ambiente que se respira, por vuestros ánimos y por esos almuerzos tan divertidos. En especial, quiero agradecer a Adrián y Bea las fotos de la portada, gracias por vuestra maña al sembrar y al fotografiar. También quiero agradecer a Noelia su esfuerzo por mantenerlo todo reluciente, a pesar de que a menudo es difícil encontrar mi mesa debajo de todos esos papeles.

A Esperanza Garay y a la actual directora Rosa Aznar por su labor realizada al frente de la CECT.

A mis compañeros de departamento Paco, Amparo, Javi, David, Alberto y Eva por sus consejos y por los momentos pasados.

También quisiera dar las gracias a mis compañeros en ciencia de una etapa anterior: Chiqui, Joel, Nica, María, Julia, Migue, Ximo, Eli, Antonio, Dani, Bea y Samuel. Con cada uno de vosotros he tenido vivencias que de una manera u otra me ha ayudado a tener perspectiva y a crecer. A Ángela, por ser la primera en enseñarme a manejar en un laboratorio, por ser un ejemplo de persona a seguir y por ser mi mamá pato.

Y a mis preciadas compis de piso Carol, Mari y Laura, por los buenos y malos momentos que hemos vivido juntas, por nuestras sesiones de terapia, por vuestras risas y por vuestro apoyo, siempre me acordaré de vosotras.

A mis amigos Trini, Siro, Estrella, Vane, Carlos, Carol (por partida doble o triple, ya que has estado en casi todos los episodios de mi vida) y Rafa, por vuestros consejos, por vuestros ánimos, por los buenos momentos que pasamos juntos y por los que nos quedan.

Por último, quiero agradecer a mi familia Papá, Mamá, Paco, Paula, Raquel, peques (Javier, Vega y Bruno), Marga, Damián y Elena por vuestro cariño, apoyo, ánimo y por los *tuppers* con comida. Y sobre todo a Jorge, por su apoyo incondicional, su paciencia, su buen humor y por estar siempre de mi lado.

Gracias a todos.

INTRODUCCIÓN	1
1. Las colecciones de cultivos microbianos.....	1
1.1 Definición	1
1.2 Historia.....	6
1.3 De Colección de Cultivos a Centro de Recursos Biológicos (BRC).....	11
1.4 La Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).....	13
2. Control de Calidad en las CC/BRC	17
2.1 Autenticación de cepas microbianas.....	19
2.2 Métodos de autenticación bacteriana.....	27
3. MALDI-TOF MS	34
4. GC FAME.....	39
OBJETIVOS	47
MATERIAL Y MÉTODOS	49
1. Material biológico: Cepas bacterianas.....	49
2. MALDI-TOF MS	59
3. GC FAME.....	81
4. Caracterización genotípica.....	92
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	95
1. MALDI-TOF MS	95
1.1 Análisis interlaboratorio de cepas del género <i>Lactobacillus</i> ...	95
1.2 Análisis interlaboratorio de cepas de la familia <i>Leuconostocaceae</i>	117
1.3 Análisis interlaboratorio de cepas de otros géneros de Bacterias Lácticas	124
1.4 Análisis de cepas del género <i>Pseudomonas</i>	127
1.5 Análisis de cepas de la familia <i>Vibrionaceae</i>	139

Indice

1.6	Análisis de cepas del género <i>Aeromonas</i>	143
1.7	Análisis de cepas de la clase <i>Alphaproteobacteria</i>	150
1.8	Análisis de cepas del filo <i>Bacteroidetes</i>	154
2.	GC FAME.....	156
2.1	Análisis de cepas del género <i>Pseudomonas</i>	156
2.2	Análisis de cepas de la familia <i>Vibrionaceae</i>	168
2.3	Análisis de cepas del género <i>Aeromonas</i>	188
2.4	Análisis de otras cepas de la clase <i>Gammaproteobacteria</i> ...	206
2.5	Análisis de cepas de la familia <i>Rhodobacteraceae</i>	211
2.6	Análisis de cepas del filo <i>Bacteroidetes</i>	226
2.7	Análisis de cepas del género <i>Lactobacillus</i>	234
3.	BALANCE PRÁCTICO.....	238
	CONCLUSIONES	245
	BIBLIOGRAFÍA	247
	ANEXO	259

ABS	<i>Access and Benefit-Sharing</i>
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
α -HCCA	alfa-ciano-4-hidroxicinámico
AN	Anaerobiosis
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCCM/LMG	<i>Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms/ Laboratorium voor Microbiologie</i>
BRC	Centro de Recursos Biológicos
CABRI	<i>Common Access to Biological Resources and Information</i>
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
CC/BRC	Colección de Cultivos/ Centro de Recursos Biológicos
CCM	<i>Czech Collection of Microorganisms</i>
CDB	Convenio sobre la Diversidad Biológica
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CIP	<i>Collection de l'Institut Pasteur</i>
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
d	Día
Da	Daltons
DHB	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico
DMA	Dimetilacetal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>

Abreviaturas

EBRCN	<i>European Biological Resource Centre Network</i>
ECCO	Organización Europea de Colecciones de Cultivo
ECL	Longitud de Cadena Equivalente
EMbaRC	<i>European Consortium of Microbial Resource Centres</i>
ESFRI	<i>European Strategy Forum for Research Infrastructures</i>
FAME	<i>Fatty acid methyl ester</i>
FerA	Ácido ferúlico
FID	<i>Flame ionization detector</i>
G-	Gram negativo
G+	Gram positivo
GBRCN	<i>Global Biological Resource Centre Network</i>
GBRCN	<i>Good Laboratory Practices</i>
h	Hora
I+D	Investigación y Desarrollo
IAMS	<i>International Association of Microbiological Societies</i>
ICCC	<i>International Conference on Culture Collections</i>
ICNB	<i>International Code of Nomenclature of Bacteria</i>
ICSP	<i>International Committee on Systematics of Prokaryotes</i>
IDA	<i>International Depository Authority</i>
IMCAS	<i>Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences</i>
IFO	<i>Institute for Fermentation Osaka</i>
IUBS	<i>International Union of Biological Sciences</i>
IUMS	<i>International Union of Microbiological Societies</i>

JCM	<i>Japan Collection of Microorganisms</i>
KV	Kilovatio
LTP	<i>Living Tree Project</i>
m	Metro
MA	Agar Marino
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight</i>
µg	Microgramo
mg	Miligramo
MIRCENs	<i>Microbial Resource Centres</i>
MIRRI	<i>Microbial Resource Research Infrastructure</i>
µl	Microlitro
ml	Mililitro
MLSA	<i>Multi-locus sequence analysis</i>
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MOSAICC	<i>Micro- Organisms Sustainable use and Access regulation International Code of Conduct</i>
MRS	Medio Man, Rogosa, Sharpe
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina-resistentes
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MSP	<i>Mainspectra</i>
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina-sensibles
MTA	Acuerdo de Transferencia de Materiales
MUCL	<i>Mycothèque de l'Université catholique de Louvain</i>
m/z	Masa/Carga

Abreviaturas

N	Normal
NA	Agar nutritivo I
NA*	Agar nutritivo II
NBIMCC	<i>National Bank for Industrial Microorganisms and Cell Cultures</i>
NBRC	<i>NITE Biological Resource Center</i>
NCDO	<i>National Collection of Dairy Organisms</i>
NCFB	<i>National Collection of Food Bacteria</i>
NCIB	<i>National Collection of Industrial Bacteria</i>
NCIMB	<i>National Collection of Industrial and Marine Bacteria</i>
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
ND	No detectado
NIG	<i>National Institute of Genetics</i>
NRRL	<i>Agricultural Research Service Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research</i>
nm	Nanómetro
O/F	Oxidación/ Fermentación
°C	Grado Centígrado
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>
PFN	Punto Focal Nacional
PIC	<i>Prior Informed Consent</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>

rep-PCR	<i>Repetitive extragenic palindromic PCR</i>
RFPL	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RIB	<i>National Research Institute of Brewing</i>
RIKEN	<i>Institute of physical and Chemical Research</i>
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico
RT	Tiempo de retención
SCSIE	Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (Universidad de Valencia)
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SF	<i>Summed in Feature</i>
SI	Índice de Similitud
SSU	Subunidad pequeña
T	Cepa Tipo
t	Tiempo
T ^a	Temperatura
TBE	Tris-borato-EDTA
TFBRC	<i>Task Force on Biological Resource Centres</i>
TSA	<i>Tryptone Soy Agar</i>
UE	Unión Europea
UNESCO	<i>United Nations Educational Scientific and Cultural Organisation</i>
UV	Ultravioleta
Vol.	Volumen

Abreviaturas

WDCM *World Data Centre for Culture Collections of
Microorganisms*

WFCC *World Federation for Culture Collections*

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. Las colecciones de cultivos microbianos

1.1 Definición

Las colecciones de cultivos microbianos son organizaciones, en su sentido más amplio, cuya principal misión es conservar a largo plazo cepas de microorganismos, y suministrarlas, previa petición, a laboratorios, empresas y centros que requieran microorganismos para investigación, controles de calidad, docencia o para numerosas aplicaciones biotecnológicas. Además, las colecciones de cultivo, para ser consideradas como tal, deben cumplir ciertas normas relacionadas con la recolección, la autenticación, el mantenimiento y la distribución de los cultivos de microorganismos, así como la catalogación y los sistemas de información. En la práctica, y a nivel mundial, las colecciones de cultivos microbianos son de diferente naturaleza y tamaño. Aunque la mayoría dependen de instituciones públicas, también hay un buen número de ellas privadas, funcionando como empresa, y otras que dependen de fundaciones sin ánimo de lucro. También difieren en su especialización, siendo algunas muy generalistas y otras altamente especializadas.

Los principales servicios que ofrecen las colecciones de cultivos son los siguientes (Garay, 2008; Uruburu, 2003):

- I. **Depósito de cepas:** Las colecciones de cultivos conservan cepas que reciben de los depositantes. Es una forma de mantener la biodiversidad *ex situ*. De forma general, se aceptan tres tipos de depósito de cepas microbianas:
 - a. Depósito público, mediante el cual los microorganismos depositados se incorporan al catálogo de la colección y la cepa, tras pasar por un proceso de autenticación, queda a disposición de los usuarios, sean investigadores, empresas u otras instituciones públicas o privadas. Esta modalidad está formada en muchos casos de cepas procedentes de

Estudios taxonómicos, ya que en Taxonomía Bacteriana, las descripciones de especies (y en última instancia también de los taxones superiores) se realizan a partir de aislados (cepas), y con el fin de garantizar su disponibilidad para ser estudiada por cualquier investigador, el nuevo taxón debe ser depositado en al menos dos colecciones de cultivos reconocidas internacionalmente y en dos países diferentes (Labeda, 2005).

- b. Depósito restringido, en cuyo caso la colección se hace cargo de la conservación y el mantenimiento del microorganismo, cobrando una tasa anual al depositante, pero ni el microorganismo ni la información sobre el mismo se encuentra a disposición de otros usuarios y no se incorpora al catálogo público de la colección. La finalidad de este tipo de depósito es el mantenimiento de la cepa a largo plazo sin que sea de dominio público.
- c. Depósito para fines de patente, regulado por el tratado de Budapest. El Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos (1972) es una norma de propiedad intelectual, que se aplica al depósito de microorganismos con fines de patentes. Según esta norma, el Estado contratante que permite o exige el depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes debe reconocer, a ese efecto, el depósito de un microorganismo en una *International Depository Authority* (IDA) con independencia de que dicha autoridad se encuentre dentro o fuera del territorio de dicho Estado. Sólo a las colecciones de cultivos que cumplen determinados requisitos se les otorga la categoría de IDA, de modo que aceptan los depósitos obligados previos a la

petición de una patente de tipo microbiológico o biotecnológico, para garantizar la descripción suficiente y la reproducción del proceso patentado. Una vez conseguida la patente, la cepa puede suministrarse previa autorización escrita del propietario de la patente, aunque no figura en el catálogo de la colección y el depositante debe pagar una tasa por su mantenimiento.

- II. **Suministro de microorganismos:** Las colecciones de cultivo suministran las cepas microbianas, previa petición, cumpliendo en sus envíos con las normas internacionales (IATA 650) y nacionales (Ministerio correspondiente) expresamente destinadas a las muestras de material biológico. Las cepas pueden enviarse en cultivo activo o liofilizado para investigación, docencia, como material de referencia en control de calidad, para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas, etc.
- III. **Conservación:** Existen distintos métodos de conservación de cepas microbianas aplicados por las colecciones, cuya finalidad es mantener la cepa en estado puro y genéticamente estable.
- IV. **Identificación de microorganismos,** mediante técnicas genético-moleculares y fenotípicas, y personal experto en taxonomía.
- V. **Proporcionar a los usuarios información sobre los microorganismos depositados:** Facilitar a los usuarios información relevante acerca de las cepas microbianas, especialmente sobre su origen, tipo de muestra de la que proceden, fecha de depósito, condiciones de cultivo, e incluso características determinadas.
- VI. **Asesoramiento en conservación y taxonomía:** Las colecciones de cultivos ofrecen a sus usuarios

asesoramiento sobre aspectos relacionados con el manejo de microorganismos.

- VII. **Investigación:** La mayoría de las colecciones también tienen una labor investigadora, participan en proyectos de investigación y de esta manera contribuyen a aumentar el número de cepas microbianas descritas, estudian propiedades concretas de ciertos microorganismos, desarrollan nuevos métodos de conservación, identificación y autenticación, etc.
- VIII. **Organización de cursos:** Orientados a enseñar las principales técnicas empleadas en la conservación, el control y la identificación de cepas microbianas.
- IX. **Otros servicios.** Algunas colecciones ofrecen la posibilidad de relizar otros servicios como la liofilización de cepas por encargo, el suministro de DNA de cepas determinadas, el suministro de una preparación de esporas, la preparación de un medio de cultivo determinado, etc.

Las colecciones de cultivos, como cualquiera de las instituciones que trabajen con organismos vivos, están sujetas a normas y convenios internacionales con el fin de conservar los recursos biológicos. Asimismo, todas las colecciones deben implementar el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) (<http://www.cbd.int/convention/text/>), derivado de los acuerdos alcanzados en la Conferencia de las Naciones Unidas sobre medio Ambiente y Desarrollo (Río de Janeiro, 1992). El CDB tiene como objetivo la conservación de la diversidad biológica, la utilización sostenible de sus componentes, y un reparto justo y equitativo de los beneficios derivados de la explotación de los recursos genéticos (*access and benefit-sharing*, ABS) (Janssens y col., 2010). Además, se reconocen los derechos soberanos de los estados sobre sus recursos naturales, así como que la autoridad que determina el acceso a dichos recursos reside en los respectivos gobiernos nacionales, está sujeta a la legislación nacional y se articula desde los llamados puntos focales

nacionales. De este modo, se deben establecer términos de acuerdo mutuo entre dicha autoridad y sus usuarios, y para asistir en este punto se desarrollaron:

- Las Directrices de Bonn (2002): Que tenían como objetivo ayudar a los países, como proveedores y usuarios de recursos genéticos, a implementar los procesos de acceso y participación en los beneficios (ABS). Sin embargo, al ser de carácter voluntario no prosperaron de la forma esperada.
- El Protocolo de Nagoya (2010): Que es de carácter obligatorio para los países que lo ratifiquen. Proporciona la base para el desarrollo correcto de los artículos relacionados con el uso de recursos biológicos, incluidos los microbianos (<http://www.cbd.int/abs/>). Trata, entre otras las siguientes obligaciones:
 - Asegurar el cumplimiento de la legislación a favor de de la parte que proporciona los recursos genéticos.
 - Cumplir las condiciones de cooperación acordadas mutuamente.
 - Designar un punto focal nacional (PFN).
 - Complimentar cada vez que sea necesario un informe de consentimiento previo (PIC). Este documento identifica oficialmente el origen geográfico de los recursos genéticos y autoriza el acceso a los mismos.

Además incluye, entre otros elementos, centros de intercambio de información sobre ABS, la posibilidad de un mecanismo mundial multilateral de participación en los beneficios, etc. y alienta el desarrollo de cláusulas contractuales modelo, códigos de conducta, prácticas óptimas, etc.

Otros aspectos importantes son los derechos de propiedad y transferencia de los recursos desde y hacia las colecciones, así como los derechos y obligaciones de las diferentes partes que intervienen en la cadena que va desde el aislamiento del microorganismo en su medio natural, pasando por el estudio de sus propiedades hasta su posible explotación comercial. Así como el papel de las colecciones como conservadores de dicha diversidad a largo plazo, y la garantía que ofrecen al asegurar la pureza y la autenticidad de dichos recursos.

Todo ello ha conducido al desarrollo de Acuerdos de Transferencia de Material (MTA) que regulan el tránsito de los recursos microbianos desde y hasta dichos centros y es de vital importancia para garantizar el respeto a los acuerdos de Río sobre el medio ambiente, la protección de la biodiversidad y el desarrollo sostenible, y que además vela por el uso correcto de los microorganismos, su autenticidad y trazabilidad (Janssens y col., 2010).

Por otro lado, para garantizar el buen funcionamiento del servicio muchas colecciones han implantado sistemas de gestión de calidad, obteniendo acreditación para alguna de las normas aplicables a laboratorios de microbiología como la ISO 9001 “Sistemas de Gestión de la calidad”, la ISO 17025 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”, la Guía ISO 34 “Requisitos generales para la competencia de productores de materiales de referencia” o las GLP “Buenas prácticas del laboratorio” (Smith y col., 2012).

1.2 Historia

La primera colección de cultivos establecida específicamente para preservar y distribuir cepas de/a otros investigadores se fundó en la Universidad Germana de Praga (República Checa) en el año 1890 y fue dirigida por el doctor Frantisek Král, quien en 1900 publicó el primer catálogo de cepas de una colección de cultivos.

Tras la muerte del doctor Král en 1911, la colección pasó a manos del doctor Ernst Pribram quien la transfirió a la Universidad de

Viena. Parte de esta colección fue vendida a la Universidad de Loyola en Chicago en el año 1930, y tras la muerte de Pribram muchas de estas cepas fueron transferidas a la Colección de Cultivos Tipo Americana (*American Type Culture Collection*, ATCC), creada en 1925 en Manassas, Virginia. Desafortunadamente, la parte de la colección que permaneció en Viena desapareció durante la Segunda Guerra Mundial (Labeda, 2005).

Poco después a la colección de cultivos fundada por el doctor Král, surgieron otras colecciones que afortunadamente siguen activas en la actualidad como la Colección del Instituto Pasteur (CIP), que fue fundada en el año 1891 por el Dr. Binot; la Micoteca de la Universidad Católica de Lovaina (*Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain*, MUCL) instituida en Bélgica en el año 1894 y la CBS (*Centraalbureau voor Schimmelcultures*) que fue creada en 1906 en Utrecht, Países Bajos. Desde entonces, se crearon muchas otras colecciones, algunas de ellas se han especializado en ciertas clases de microorganismos, o son específicas de determinados sectores de la microbiología, por ejemplo en microorganismos de interés para la alimentación, o microorganismos patógenos, mientras que otras colecciones están orientadas a microorganismos en general y a ofertar servicios (Labeda, 2005; Uruburu, 2003).

La primera relación internacional entre colecciones tuvo lugar en el año 1946, cuando el doctor P. Hauduroy estableció en la Universidad de Lausana, Suiza, un centro donde se proporcionaba información de cepas mantenidas en diferentes colecciones y se publicaba un boletín informativo de forma periódica. Este centro llegó a vincularse con la Asociación Internacional de Sociedades Microbiológicas (*International Association of Microbiological Societies*, IAMS), ahora llamada Unión Internacional de Sociedades Microbiológicas (*International Union of Microbiological Societies*, IUMS), y en cooperación generaron la Federación Internacional de Cultivos Tipo que se originó con el fin de reparar el daño causado en las colecciones de cultivos durante la Segunda Guerra Mundial (Uruburu, 2003).

En el año 1962 se celebró una Conferencia de Colecciones de Cultivos en Ottawa, Canadá, donde surgió la idea de que la IAMS formara en sucesivas reuniones una Sección de Colecciones de Cultivos, celebrándose la primera de ellas en 1963. Más tarde, en 1970 hubo una reorganización de la IAMS, y la mencionada sección se convirtió en la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (*World Federation for Culture Collections*, WFCC), que fue la primera en crear una red mundial de información con la finalidad de promover y apoyar la creación a largo plazo de colecciones de cultivos y servicios conexos.

La WFCC (<http://www.wfcc.info>) funciona como una federación que trata de reforzar las relaciones entre las colecciones y sus usuarios, organizando cursos y reuniones, publicando artículos y boletines informativos, y trabajando para garantizar la supervivencia de las colecciones en riesgo de desaparecer (Smith, 2003; Uruburu, 2003).

Las colecciones que son miembros de la WFCC están registradas en el Centro Mundial de Datos sobre Microorganismos (*World Data Center for Microorganisms*, WDCM), que es la base de datos operacional de la Federación. La WDCM tiene inscritas actualmente 622 colecciones de cultivos nacionales e internacionales procedentes de 71 países, y que suman 2.033.334 recursos microbianos, de los cuales 959.732 de ellos son bacterias, 546.297 hongos y el resto engloba a virus, algas microscópicas, protozoos, células desdiferenciadas de plantas y líneas celulares humanas y de animales (<http://www.wfcc.info/ccinfo/>), además ofrece un listado de cepas microbiológicas destinadas a servir como material de referencia y catalogadas con el acrónimo de la colección seguido de su número identificativo y sus equivalencias incluyendo una con un identificador de la WDCM. La primera compilación de datos sobre colecciones de cultivo del mundo se publicó en la primera edición del *World Directory of Culture Collections*, en 1972, bajo la dirección del profesor U.B.D Skerman (Universidad de Queensland, Australia). Después de la segunda edición, de 1982, se mantiene una versión

computarizada de esta información en la WDCM, cuya sede pasó de Australia a Japón (al *Institute of Physical and Chemical Research*, RIKEN, y en 1997 al *National Institute of Genetics*, NIG) y finalmente a China en 2011 (*Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences*, IMCAS). Además, desde 1986, sirve de base de datos para la WFCC y para el Centro de Recursos Microbiológicos (*Microbial Resource Centres*, MIRCENS). El MIRCENS es una red mundial creada en el año 1974 por la UNESCO (*United Nations Educational Scientific and Cultural Organisation*) cuyo objetivo era la preservación y explotación de genes microbianos con el fin de hacerlos accesibles para la investigación y para el desarrollo en microbiología ambiental y biotecnología (Stackebrandt, 2010; Smith, 2001, 2003).

Pocos años después de constituirse la WFCC, se fundó la Organización Europea de Colecciones de Cultivo (*European Culture Collections' Organization*, ECCO). La idea de crear esta nueva organización surgió en el año 1981, en el Congreso Internacional de Colecciones de Cultivo (*International Congress of Culture Collections*, ICC) organizado por la WFCC, y la primera reunión tuvo lugar en Göttingen, Alemania, en 1982.

Actualmente la ECCO cuenta con 64 miembros, englobados en 25 países. Las reuniones de sus miembros se celebran anualmente, y en estas reuniones se promueve la colaboración y el intercambio de ideas e información que repercuten en la actividad de las colecciones de cultivos. Así como aportar enfoques prácticos a las normas internacionales, que les afectan, y a su regulación, como por ejemplo, gracias a las iniciativas del Consorcio de Colecciones Belga (*Belgian Coordinated Collections of Microorganisms*, BCCM) se generó un código de funcionamiento para colecciones que permite operar dentro del Tratado de Budapest (1983) (Smith, 2003).

Asimismo, otra de las iniciativas de ECCO fue generar el Código de Conducta Internacional para el Acceso y Uso Sostenible de Microorganismos (*Microorganisms, Sustainable Access and Use, International Code of Conduct*, MOSAICC, 1997), el cual fue una

herramienta de apoyo a la implementación de la CDB (Convenio sobre la Diversidad Biológica, 1992) a nivel microbiológico y otras normas aplicables de leyes nacionales e internacionales [<http://www.belspo.be/bccm/mosaicc>] (Smith, 2003).

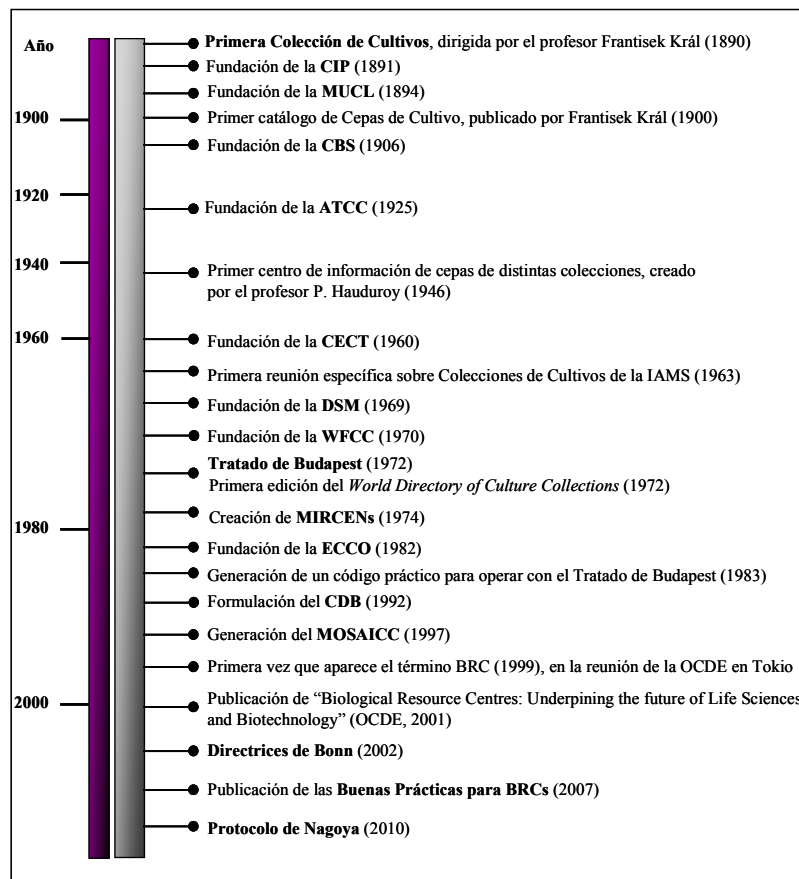


Figura 1. Diacronía sobre las colecciones de cultivos.

Además, se han realizado varios proyectos en común entre distintas colecciones europeas que son miembros de ECCO, como el proyecto *European Biological Resource Centre Network* (EBRCN), el proyecto *Common Access to Biological Resources and Information* (CABRI), el proyecto *Demonstration Project for a Global Biological Resource Centre Network* (GBRCN) o el proyecto *European Consortium of Microbial Resource Centres* (EMbaRC).

1.3 De Colección de Cultivos a Centro de Recursos Biológicos (BRC)

Los recursos biológicos (organismos vivos, células, genes y la información que contienen) constituyen la materia prima para el avance biotecnológico, la salud humana, y la investigación y desarrollo de las ciencias de la vida. La revolución experimentada en Biología Molecular ha incrementado notablemente la capacidad de obtener y modificar estos recursos para beneficio de la humanidad (OCDE, 2001).

El acceso a los recursos biológicos requiere la existencia de centros de depósito y nodos de distribución, lo que se llamó Centros de Recursos Biológicos (BRCs), que se responsabilicen de la debida explotación de los recursos, y de preservar y distribuir la materia biológica y su información, de una manera que se garantice la accesibilidad y la transparencia del suministro, tal y como exige la CDB.

La primera vez que apareció el término BRC fue en el año 1999 en la reunión de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) celebrada en Tokio, donde expertos de los países miembros se reunieron para estudiar y trazar unas directrices sobre la recolección, el manejo/conservación, y la distribución de los recursos biológicos. En esta reunión se definieron los BRCs como: “Una parte esencial de la infraestructura que sostiene a las ciencias de la vida y a la biotecnología, que funcionan como servicios para el depósito y suministro de células vivas, genomas de organismos y su información genética, y funciones de sistemas biológicos. Los BRCs contienen colecciones de organismos cultivables (microorganismos, células de plantas, animales y humanos), partes replicables de éstas (genomas, plásmidos, virus, cDNAs), organismos viables no cultivables, células y tejidos, así como bases de datos que contengan información molecular, fisiológica y estructural relevante de esas colecciones y las relacionadas con la bioinformática”. Se definieron los diversos “dominios” dentro de los recursos biológicos, uno de ellos

correspondiente a los microorganismos. Se creó un grupo de trabajo, *Task Force on Biological Resource Centres* (TFBRC), cuya misión fue definir la naturaleza de la futura sostenibilidad de las colecciones de cultivos, así como los servicios a ellas asociados y sus obligaciones de proveer acceso a recursos biológicos de alta calidad (Garay, 2008).

Tras la primera reunión y las del TFBRC en París en 2000 y 2001, la OCDE publicó las principales conclusiones sobre la necesidad de crear los BRCs y las principales líneas de actuación en el documento “*Biological Resource Centres: underpinning the future of Life Sciences and Biotechnology*” (OCDE, 2001). Se estableció que una colección de cultivos que alcance el estatus de BRC debe cumplir unos estándares de calidad y experiencia, llevar a cabo actividades de I+D, y actuar como depósito de la biodiversidad y de los recursos biológicos preservando la propiedad intelectual (Garay, 2008).

En su decimoctava reunión en octubre de 2005, la TFBRC acordó llevar a cabo un estudio piloto sobre estándares de calidad para los BRCs, de forma que aquellas colecciones de cultivo que los cumplieran podían ser consideradas BRC e integrarse en un *Global Biological Resource Centre Network* (GBRCN) (Garay, 2008).

Posteriormente, la OCDE publicó en el año 2007 un documento llamado *Best Practice Guidelines for BRCs* que proporcionó las directrices para los BRC que se quieran acreditar, y que contempla “las buenas prácticas” en la preservación de recursos, la gestión de calidad, la bioseguridad, la gestión de datos y las infraestructuras, siendo un paso previo hasta que se desarrollen las normas ISO 9001 específicas para BRC (OCDE, 2007).

Por tanto, se tiende a sustituir el concepto tradicional de colección de cultivo por el de BRC, que engloba el suministro de productos y servicios y supone la provisión y reposición de células vivas, genomas de organismos y de la información relacionada con la heredabilidad y funciones de los sistemas biológicos. Los BRCs juegan un papel crucial como herramientas que proporcionan servicios esenciales a la comunidad científica y a las empresas y otros

organismos relacionados con la salud pública para la investigación básica o aplicada. Las funciones adscritas a los BRCs son (Garay, 2009; Janssens y col., 2010) :

- Conservar la Biodiversidad.
- Realizar actividades de I+D sobre dichos recursos biológicos.
- Actuar como depositarios de recursos biológicos para la protección de la propiedad intelectual.
- Preservar y proveer recursos biológicos para actividades de I+D de carácter científico, industrial, agrícola, ambiental, médico, y sus aplicaciones.
- Contener la información y los medios para hacerla llegar al público y para el desarrollo de líneas de actuación.
- Funcionar con criterios de calidad internacionales.

1.4 La Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)

La Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) se fundó en Madrid en el año 1960, en el Instituto Jaime Ferrán del Microbiología del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) por el profesor Julio Rodríguez Villanueva, catedrático de Microbiología, fusionando dos colecciones de investigación de científicos españoles con cepas procedentes de la estación de Fitopatología de Oeiras (Portugal) (Uruburu, 2003).

Posteriormente, la CECT fue trasladada primero a la Universidad de Salamanca (1968), y después a la Universidad del País Vasco (1974), siendo el profesor Federico Uruburu su nuevo Director mientras que el mantenimiento de las cepas quedaba a cargo de la Dra. María Dolores García (Garay, 2008).

Durante esta etapa se publicó el primer Catálogo de Cepas de la CECT (1976), el cual incluía 436 cepas entre bacterias, hongos filamentosos y levaduras, y un año después la CECT ingresó en la WFCC, con el número de registro WDCM412 (Garay, 2008).

En el año 1980 el profesor Uruburu fue trasladado a Valencia para ocupar la Cátedra de Microbiología en la facultad de Biología, de modo que Valencia pasó a ser desde este momento y hasta la actualidad su nueva ubicación. En 1983, la CECT pasó a formar parte de la recién creada ECCO, consolidando así su internalización.

Otro hito de gran importancia tuvo lugar en 1991, al ser reconocida la CECT como servicio de la Universitat de València, que a su vez fue decisivo para que en el año 1992 se le reconociera la categoría de IDA (Autoridad Internacional de Depósito para fines de Patentes), ya que el tratado de Budapest exige la conservación de los microorganismos durante un mínimo de 30 años, y gracias a ser considerada la CECT como un servicio de la Universidad se garantizaba su continuidad (Garay, 2008; Uruburu, 2003).

Durante el año 2000 la CECT desarrolló un catálogo on-line que originalmente contenía la misma información que los catálogos impresos, pero que se actualiza constantemente con los nuevos depósitos públicos y en el que se recogen las variaciones en el estatus taxonómico de las cepas (Garay, 2008).

Tras el repentino fallecimiento del profesor Uruburu en el año 2003 mientras asistía a una reunión ECCO en Portugal, fue nombrada como directora Esperanza Garay Aubán, Catedrática de Microbiología de la Universitat de València.

En 2004, se implantó en la CECT el Sistema de Gestión de la Calidad, y se obtuvo la certificación para la norma ISO 9001:2000 con el alcance “Preparación, venta y distribución de cultivos microbianos (bacterias, hongos filamentosos y levaduras)”, que se ha seguido renovando hasta la fecha. Además, en este mismo año, se elaboró un Acuerdo de Transferencias de Materiales (MTA), siguiendo las directrices del CDB, el cual regula las condiciones de transferencia de los microorganismos entre la CECT y sus usuarios en ambos sentidos.

En septiembre de 2012 le fue concedido un año sabático a la Catedrática Esperanza Garay Aubán, y la dirección de la CECT pasó a

manos de Rosa Aznar Novella, Catedrática de Microbiología de la Universitat de València.

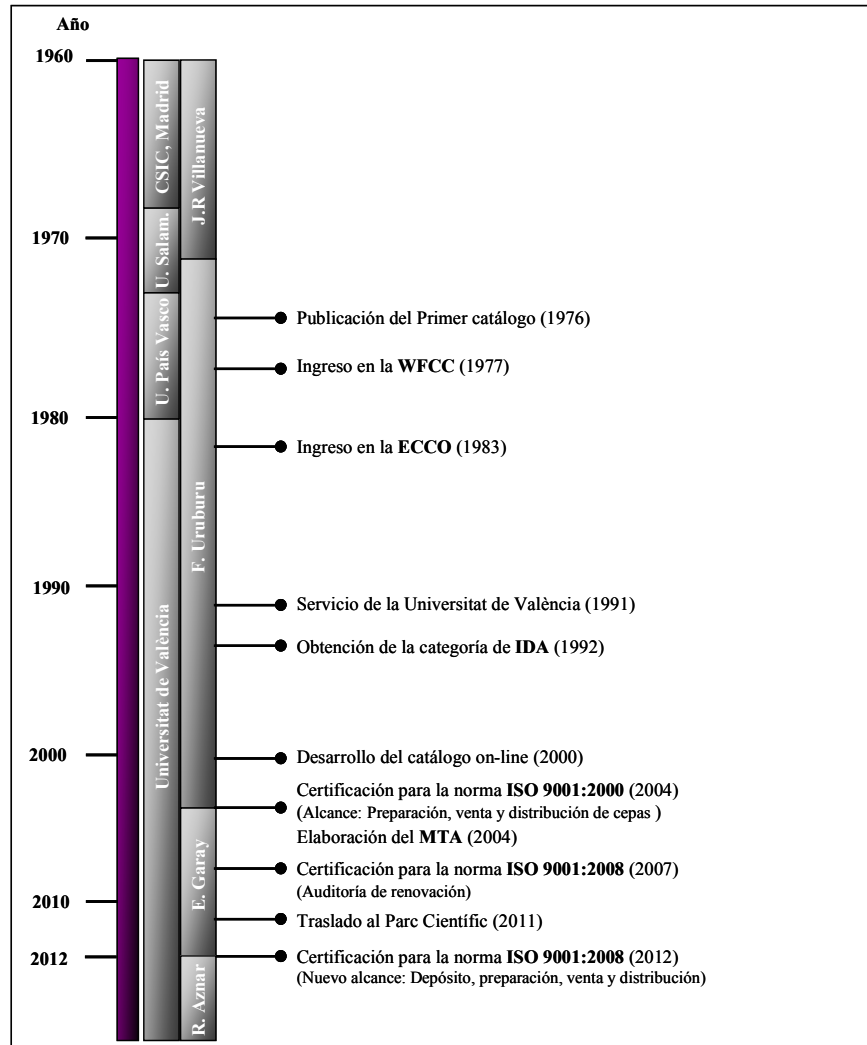


Figura 2. Diacronía sobre la CECT. Entre las fechas y los hitos se muestran los centros que han albergado a la colección y los directores que ha tenido.

Un aspecto importante en una infraestructura de investigación como son las CC/BRCs, es la propia instalación: espacios que ocupa, acondicionamiento de los mismos, etc. Cuando la CECT se trasladó en Universitat de València, ocupó en primer lugar espacios de la Facultad de Ciencias Biológicas, luego se mudó al Edificio de Investigación sito en el mismo campus universitario (1996), y en enero de 2011 se trasladó al Parque Científico de la UVEG a un espacio que se amplió posteriormente en el año 2012, lo que supuso una mejora sustancial, ya que posibilitó la separación de los espacios en un laboratorio destinado al trabajo con células eucariotas; otro destinado al trabajo con células procariotas; una cocina compartimentada en una zona “limpia”, otra “sucia” y otra para la liofilización y estrechado de liófilos; un laboratorio de técnicas moleculares; otro de investigación y otro acondicionado para impartir cursos; una sala de documentación; una sala donde se localiza el servidor; un almacén; una sala refrigerada que contiene los ultracongeladores; varias cámaras frías destinados al almacenamiento de las cepas de la colección, de medios de cultivo y de las cepas recepcionadas; dos salas administrativas y varios despachos. Sin embargo, la CECT mantuvo parte de sus antiguas instalaciones en el Edificio de Investigación, con el fin de mantener un duplicado de la colección en éstas, tal y como recomienda la OCDE en el documento *Best Practice Guidelines for BRCs* (OCDE, 2007).

A nivel de recursos humanos la CECT ha ampliado en los últimos tiempos la cantidad de personal dedicado a su actividad, así pues cuenta con una persona en la Dirección, un Responsable de la Calidad, una persona dedicada a la Contabilidad, un Curador de Procariotas y otro de Eucariotas, cuatro técnicos (uno de los cuales es Responsable de Compras), un Responsable de Pedidos, un Responsable de Informática y de Patentes, dos técnicos de Cocina, dos Responsables de Investigación, dos Investigadores y un Investigador en formación.

Actualmente, la CECT está considerada como un BRC (Centro de Recursos Biológicos Microbianos), y ha intervenido en

diferentes iniciativas internacionales como el GBRCN (*Demonstration Project for a Global Biological Resource Centre Network*), auspiciado e impulsado por la OCDE que fue llevado a cabo en el periodo 2008-2011, EMbaRC (*European Consortium of Microbial Resource Centres*), un proyecto de actividades integradas financiado por el Séptimo Programa Marco, y que se desarrolló entre los años 2009-2012, y MIRRI (*Microbial Resource Research Infrastructure*) (www.mirri.org) que es una nueva iniciativa desarrollada por el observatorio europeo para infraestructuras de investigación (ESFRI, *European Strategy Forum for Research Infrastructures*) que difiere de los anteriores en que por primera vez se contempla la operatividad de una infraestructura que no sea efímera, sino sostenible. MIRRI cuenta con una fase preparatoria que comenzó en noviembre de 2012, una fase de implementación y una fase de operación.

2. Control de Calidad en las CC/BRC

En concordancia con las recomendaciones de la OCDE y la WFCC, los microorganismos deben conservarse preferentemente mediante dos métodos diferentes, uno de los cuales, al menos, permita la conservación a largo plazo (liofilización, criocongelación, etc).

Para garantizar la correcta conservación de las cepas microbianas las CC/BRC deben controlar fundamentalmente tres parámetros: la viabilidad, la pureza y la autenticidad.

Estos controles deben realizarse, al menos, en tres circunstancias (Janssens y col., 2010):

- Cuando se recibe el material original.
- Después de la primera conservación, donde se genera un lote de reserva que sirve para generar lotes sucesivos y otro de suministro.
- Después de cada nuevo lote generado.

La viabilidad es un parámetro indicador de la supervivencia de la cepa microbiana tras su conservación, observada en el medio de

cultivo recomendado por el depositante y/o en otro medio si se considera oportuno. Cualquier método de conservación conlleva una pérdida de viabilidad, en algunos casos esta pérdida es debida incluso a los crioprotectores y ocurre antes de la conservación, por lo que es importante encontrar el método de conservación más adecuado para la cepa. Para ser considerado como un buen método de conservación se deben mantener valores de supervivencia de alrededor del 80%, sin embargo en algunas cepas no llegan a conseguirse estos valores.

Otro de los controles necesario en la conservación de cepas es la pureza. Es necesario cerciorarse de que no hay contaminantes en el cultivo a conservar. Esto puede comprobarse mediante observación de las colonias en un medio de cultivo sólido, para lo cual se necesita información previa de la morfología de la cepa, aunque en muchos casos la apariencia homogénea de las colonias no garantiza su pureza, por lo que se recurre a la observación al microscopio y/o hacer incubaciones prolongadas para detectar contaminantes de crecimiento lento. Además, es conveniente comprobar la pureza en un medio no selectivo, ya que pueden estar presentes contaminantes que pasen inadvertidos por la incapacidad de formar colonias en el medio selectivo. En aquellas bacterias que tienen un crecimiento expansivo o que crecen formando redes o filamentos los contaminantes pueden quedar embebidos en la matriz dificultando su detección. También hay que tener en cuenta que en el caso de algunas cepas bacterianas la morfología colonial puede variar dependiendo del medio de cultivo en el que crezca, la temperatura, el tiempo de incubación, etc. Asimismo, una misma cepa observada al microscopio puede presentar variaciones morfológicas como la formación de esporas, la formación de cistos, el pleomorfismo, etc. (Krieg, 2005).

La autenticidad define la correcta identidad de la cepa. Se trata de verificar que la cepa conservada mantiene las mismas características genéticas, bioquímicas y fisiológicas que el material original. De los tres parámetros es el más complejo de determinar. Además, de alguna manera engloba también a los otros dos (viabilidad

y pureza). Por eso se trata de forma independiente en el siguiente apartado.

2.1 Autenticación de cepas microbianas

Una de las tareas más importantes para una buena colección de cultivos es conseguir que el material conservado no se desvíe del material original depositado, que a su vez debería ser lo más fiel posible al aislado original. Sin embargo, pueden ocurrir cambios en la cepa debido a un error humano (por ejemplo, un etiquetado cruzado) o contaminaciones accidentales a lo largo de toda la cadena de manipulación y transferencia de la cepa. En estos casos hay una sustitución o alteración real del material biológico que puede ser muy evidente si el cambio es burdo pero no tanto cuando la cepa que desplaza a la original es muy cercana en términos filogenéticos y/o fisiológicos. Además, hay que considerar también los cambios por deriva genética, cambios en el material genético microbiano debido a mutaciones aleatorias tras repetidas divisiones. Especialmente en microorganismos la detección de estos últimos puede suponer un reto por los cortos tiempos de generación que presentan y por su alta tasa de mutación, lo que da lugar a la formación de cultivos heterogéneos. La diversificación ocurre a nivel genético y epigenético durante el crecimiento tras repetidos subcultivos y es más problemática cuando afecta a las propiedades que motivaron su depósito. Para asegurar lo máximo posible la fidelidad de los cultivos respecto al material recibido para depósito en una Colección de Cultivos, las cepas deben ser preservadas con el menor número posible de pases. Además, de forma rutinaria se procede a su autenticación con el fin de garantizar o al menos sustentar que no se desvían del material original (Smith, 2012).

El objetivo de la autenticación, por tanto, es verificar la identidad de un microorganismo conocido, estudiando sus características morfológicas, genéticas, bioquímicas y/o fisiológicas (figura 3). Conviene diferenciarlo de la identificación, la cual permite situar a un microorganismo desconocido dentro de un taxón, haciendo

uso también del estudio de sus características morfológicas, genéticas, bioquímicas y/o fisiológicas (figura 4).

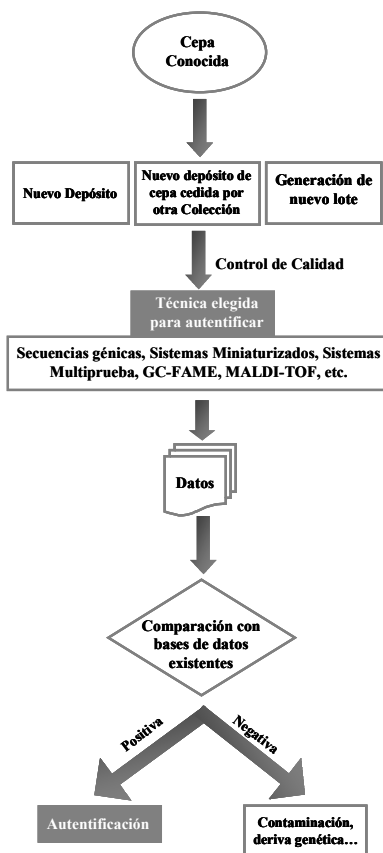


Figura 3. Diagrama de flujo de la autenticación de cepas microbianas.

Para la identificación de una cepa microbiana, es necesario contar con un esquema de clasificación previo. En Biología no existe un esquema universal, de modo que según el tipo de organismo que se esté considerando habrá que tener en cuenta diferentes conceptos sobre qué es lo que constituye la especie y demás taxones, reglas de nomenclatura, o métodos que son útiles para caracterizar y delimitar los taxones. Por la gran extensión que tiene el mundo microbiano, a la Microbiología le aplican todos los códigos de nomenclatura: el *International Code of Zoological Nomenclature* para los protistas, el

International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants para algas y hongos microscópicos, que sustituye desde julio de 2011 al *International Code of Botanical Nomenclature*, el *International Code of Nomenclature of Prokaryotes* para Arqueas y Bacterias, y las reglas del *International Committee on Taxonomy of Viruses* para los virus.



Figura 4. Diagrama de flujo de la identificación de cepas microbianas.

Teniendo en cuenta que en la presente Tesis Doctoral las cepas estudiadas son bacterianas, los párrafos que siguen se centran en la sistemática de procariotas. Además, en la CECT no se mantienen virus, ni algas, ni protistas. Tampoco líneas celulares como en otras colecciones. Así que el único otro grupo de microorganismo que se

podría haber contemplado es el de los hongos microscópicos (ya sean unicelulares, es decir levaduras, o filamentosos).

La clasificación actual de procariontes se basa principalmente en el análisis de secuencias del gen 16S rRNA u otros genes conservados, en estudios de hibridación DNA-DNA para delimitar la especie y, además, requiere la descripción de un mínimo de características de morfología celular y colonial, genéticas, fisiológicas, bioquímicas, metabólicas y ecológicas (Krieg, 2005; Trüper y Schleifer, 2006; Schleifer, 2009), de modo que estas características definan al taxón (especie u otro) como único y diferenciable de otros al mismo nivel (figura 5).

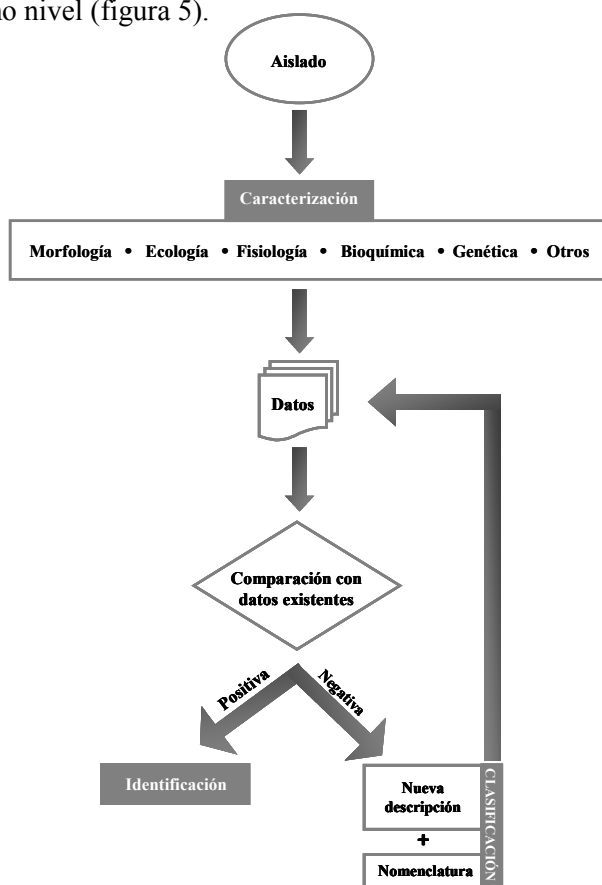


Figura 5. Diagrama de flujo de la caracterización de cepas en sistemática bacteriana.

En Bacteriología, entendida en su sentido amplio que incluye tanto a bacterias como a arqueas, un concepto importante es el tipo nomenclatural o simplemente tipo: dentro de cada taxón que recibe un nombre debe designarse como tipo un elemento al cual quedará ligado ese nombre. El tipo no tiene por qué ser el elemento más típico (más representativo) del taxón. Las reglas 16 a 22 del Código Bacteriológico tratan esta cuestión (Lapage y col., 1992). Así, en la clase el tipo es uno de los órdenes que contiene; en el orden y en la familia es un género con el que comparten raíz etimológica (por ejemplo, *Vibrio* es el tipo de la familia *Vibrionaceae* y del orden *Vibrionales*); en el género es una especie y en la especie (y la subespecie) es una cepa designada a tal efecto por los autores que la describen. Aun siendo el concepto de tipo sumamente importante por garantizar un referente nomenclatural, es en su escalón más bajo, es decir la cepa tipo, cuando mayor importancia cobra ya que se trata de especímenes vivos que pueden usarse como material de referencia en estudios posteriores. No en vano se exige como requisito formal para validar nombres de especies (y subespecies) que la cepa tipo esté disponible en al menos dos colecciones de cultivo de países diferentes.

Indudablemente, existen en la naturaleza un gran número de bacterias que no han sido clasificadas y que, por tanto, no pueden ser identificadas, sino que son susceptibles de ser propuestas y descritas como nuevos taxones (Krieg, 2005). Las descripciones deben ser extensas y abarcar datos de distinta índole o naturaleza (taxonomía polifásica) mientras que a menudo las identificaciones se realizan con datos procedentes de una o algunas pocas técnicas, tratando de economizar en tiempo y dinero sin comprometer la precisión.

Esto último puede decirse también de la autenticación. Sin embargo, lo que más distingue a la autenticación es el hecho de contar de partida con la identidad de la cepa y por tanto lo que se desea es confirmarla recurriendo a esquemas que pueden diferir de los que se aplicarían en una identificación. También los resultados son vistos con otro prisma ya que en una identificación no se pondría en duda por ejemplo que un aislado de agua de mar se identifique como

Vibrio harveyi, pero esto mismo daría pie a más averiguaciones si la cepa procesada está etiquetada como otra especie de *Vibrio*. Además, las identificaciones se suelen dar por concluidas una vez que se alcanza un nombre de especie, mientras que las autentificaciones son continuas y procede repetirlas tras la preparación de un nuevo lote de conservación o ampliarlas si se ha recibido una reclamación, etc.

Desde una perspectiva histórica, antes de ponerse a punto las técnicas moleculares, la autentificación se llevaba a cabo mediante observación al microscopio de la morfología celular, mediante el estudio de características del cultivo (pigmentación, morfología colonial, etc.) y de pruebas fisiológicas básicas, por lo que, debido al tiempo de crecimiento y de incubación de las pruebas, eran necesarios varios días hasta la obtención del resultado.

Actualmente, el desarrollo de nuevas técnicas automatizadas han permitido acortar los tiempos de autentificación, sobre todo para aquellos taxones de interés en la industria alimentaria y farmacéutica, y en taxones de interés clínico, donde se dispone de bases de datos realizadas con un número elevado de cepas. Sin embargo, en muchos casos estas bases de datos no son adecuadas para el estudio de nuevas especies o de otros taxones que no son de interés alimentario, farmacéutico o clínico. Además, la descripción de una nueva especie suele abarcar, en los últimos años y cada vez con más frecuencia, una única cepa, la cepa tipo, por lo que el conjunto de caracteres descritos para ésta suelen ser demasiado restrictivos creando ambigüedad al compararse con otra cepa adicional de la misma especie que presente una desviación en alguna característica fisiológica (Smith, 2012). Es por esto que en las CC/BRC existe un elevado interés en desarrollar técnicas de autentificación, que permitan su aplicación a un gran número de cepas y que resulten rápidas, reproducibles y que supongan un bajo coste económico.

Otro aspecto de interés es la autentificación de cepas equivalentes en distintas colecciones. Conviene definir previamente la distinta terminología aplicada en referencia a las cepas microbianas, así pues distinguimos entre:

- Cepas de colección: Microorganismos definidos por lo menos a nivel de género y especie, depositados y mantenidos en una CC/BRC reconocida, catalogados con el acrónimo de la CC/BRC seguido de un número identificativo. En dicho catálogo se reseña el origen de la cepa, sus condiciones de cultivo y, en muchas ocasiones, algunas de sus características, así como la equivalencia, si la hay, con otras colecciones. Para los usuarios, las cepas de colección son cepas de referencia o material de referencia microbiológico.
- Cepas equivalentes: Son cepas que proceden del mismo material original y que están depositadas en más de una colección de cultivos.
- Cepas de reserva: cepas idénticas obtenidas mediante un único subcultivo de una cepa de referencia suministrada por el proveedor, o que proceden directamente del proveedor como tales.
- Cepas de trabajo: subcultivos primarios obtenidos de una cepa de reserva.
- Cepas comerciales: cepas suministradas por casas comerciales diferentes de las CC/BRC, y que pueden o no proceder de una CC/BRC.
- Cepas salvajes: no proceden de CC/BRC.

Tradicionalmente, la equivalencia de las cepas depositadas en diferentes colecciones de cultivos estaba basada solamente en la historia de depósito de dicha cepa, que no estaba exenta de omisiones o imprecisiones en muchos casos. Hoy en día, la trazabilidad de las cepas equivalentes en las colecciones puede estudiarse de forma más cómoda y completa a través del bioportal StrainInfo de la Universidad de Gent (www.straininfo.ugent.be) (Dawyndt y col., 2005). Normalmente, el material original es depositado en una o dos colecciones de cultivos, pero otras colecciones pueden adquirirla después, ya que

es frecuente la cesión en intercambio por otras (Figura 6). Es posible que en el trasiego de la cepa de una colección a otra se arrastren errores de manipulación de la cepa, como contaminaciones, fallos de etiquetación o cruces de datos que den lugar en último término a que dos cepas equivalentes depositadas en distintas colecciones no sean realmente la misma cepa. Por esta razón la autenticidad puede aplicarse no sólo a las cepas dentro de una colección, sino también a las cepas equivalentes depositadas en varias colecciones. En la actualidad existen varios estudios destinados a comprobar la correcta identidad de las cepas equivalentes depositadas en distintas colecciones, como es el caso de una de las tareas del proyecto europeo EMbaRC, del cual es partícipe la CECT.

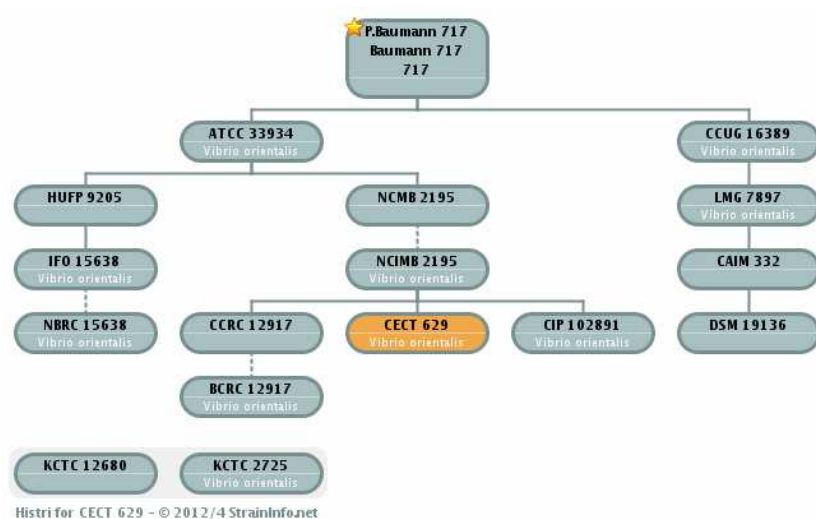


Figura 6. Historia de depósito de *Vibrio orientalis* recopilada en el bioportal StrainInfo de la Universidad de Gent. Las conexiones se hacen de forma automática usando la información que muestra la cepa en diferentes catálogos públicos y los diagramas pueden ser corregidos por los científicos que colaboran con el proyecto. Las designaciones no resueltas aparecen en la base sin conectar con el esquema (Verslyppe y col., 2011).

2.2 Métodos de autenticación bacteriana

Para la autenticación de procariotas pueden emplearse multitud de métodos, basados en caracteres fenotípicos y/o genéticos. El uso de una técnica u otra dentro de una colección de cultivos dependerá de la cepa que se esté estudiando y de multitud de factores como el estado de puesta a punto y el dominio de la técnica por parte del personal técnico, el tiempo necesario para obtener resultados, la reproducibilidad intra- e interlaboratorio, su poder de resolución, puesto que algunas técnicas no permiten discriminar más allá del género, mientras que otras son capaces de tipificar, es decir, discriminar cepas por debajo del nivel de especie y, naturalmente, de su coste económico.

Tradicionalmente, la caracterización morfológica es el primer paso que se realiza a la hora de autenticar cepas, engloba el estudio de la morfología colonial de la cepa (homogeneidad, tamaño, forma, color, opacidad y textura de las colonias) y su observación al microscopio (forma y tamaño celular, movilidad, etc.).

Otras pruebas de caracterización fenotípica empleadas son el test del KOH al 3%, que permite diferenciar entre bacterias Gram positivas y Gram negativas, por la viscosidad producida por las segundas al liberarse el DNA tras la lisis celular que provoca una solución alcalina débil, la prueba de detección de la enzima catalasa, que interviene en el proceso de detoxificación de las células expuestas a condiciones aerobias, por lo que se encuentra en muchas de las bacterias capaces de desarrollarse en presencia de oxígeno, y que se detecta por la producción de burbujas al depositar una gota de H₂O₂ de 10 vol. en un portaobjetos sobre el cual se emulsiona una pequeña cantidad de biomasa bacteriana (Cowan y Steel, 1982); y la prueba de la oxidasa, que permite detectar la presencia del enzima citocromo c oxidasa debido a la coloración azul-violácea que adquiere un papel humedecido con tetrametil-p-fenilendiamina al 1% al ser extendida una cantidad de biomasa bacteriana sobre él (Smibert y Krieg, 1994).

A pesar de que estas técnicas están muy lejos de permitir por sí solas la autenticación de cepas, resultan muy útiles para la detección temprana de contaminaciones o errores de procesado. Además, son económicas, rápidas y reproducibles.

Otro conjunto de técnicas ampliamente utilizadas son los métodos de identificación bioquímica, cuyos orígenes se remontan a principios del siglo XX. Actualmente existen sistemas miniaturizados comerciales que permiten la estandarización y facilitan el manejo, permitiendo además la obtención del resultado en un periodo de tiempo relativamente corto. Sin embargo, la limitación más generalizada viene determinada por la base de datos frente a la cual se comparan los resultados, ya que suele representar principalmente a microorganismos de interés clínico y/o alimentario. Además, en la mayoría de los casos estos sistemas no tienen en cuenta requerimientos salinos, de pH, de factores de crecimiento, etc. En el caso de ser utilizado con cepas que no están incluidas en dicha base de datos es importante estandarizar la metodología para conseguir una reproducibilidad óptima en futuros análisis.

Uno de los sistemas comerciales más habituales en la autenticación de cepas son las galerías API de Biomérieux que permiten la identificación de microorganismos a través de la realización de diversas pruebas bioquímicas como la fermentación de carbohidratos, la determinación de H₂S, la hidrólisis de la gelatina, etc. Para la utilización de estos sistemas es necesario conocer previamente algunas características básicas del microorganismo como su morfología celular, si es Gram positivo o negativo, la reacción de la prueba de la oxidasa o del O/F. Así pues existen distintas galerías según el microorganismo a estudiar como la API 20E que permite la identificación de microorganismos pertenecientes al grupo de las enterobacterias y de otros bacilos Gram negativos, la API 20NE que permite la identificación de bacilos Gram negativos no pertenecientes al grupo de las enterobacterias como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas* y otros, la API 20A que permite la identificación de bacterias anaerobias, la API 50CH

que permite el estudio metabólico de carbohidratos y permite la identificación de *Bacillus* (CHB), *Lactobacillus* (CHL) y *Enterobacteriaceae* (CHE), etc.

Otros sistemas miniaturizados utilizados basados en pruebas bioquímicas son el sistema Remel RapID™, que es similar al API de Biomerieux pero permitiendo la inoculación simultánea de todos los pocillos, el sistema BBL Cristal de BD que tiene la particularidad de que los resultados son interpretados automatizadamente por un programa informático, el Sensititre y el Vitek®2 de Biomérieux que permiten además determinar la susceptibilidad frente a antibióticos, y que también tiene una lectura automatizada, y en el caso de este último también realiza la inoculación y la incubación de forma automática.

Asimismo, existen sistemas informáticos que permiten la interpretación de los resultados de distintos sistemas miniaturizados con el fin de eliminar el sesgo producido por la subjetividad del personal técnico, como es el caso del BIOMIC®V3 System.

Otro sistema ampliamente utilizado en taxonomía y que puede ser útil para la autenticación de cepas es el Biolog, que analiza la capacidad de los microorganismos para oxidar un total de 95 sustratos, de modo que cuando un sustrato es oxidado se detecta mediante una reacción colorimétrica producida por una sal de tetrazolio, que actúa como aceptor de electrones virando hacia una coloración púrpura, los datos son recogidos por un sistema informático (Bochner, 2006).

Este tipo de sistemas miniaturizados basados en pruebas bioquímicas tienen a su favor aspectos como la estandarización, la facilidad de manejo y un coste moderado (aunque no se puede generalizar). Aunque sus bases de datos son muy limitadas cabe la posibilidad de emplearlos con otras cepas, si es necesario haciendo modificaciones en el protocolo. Esta práctica es bastante habitual en taxonomía procariota y por ello existen muchos datos generados en diversos artículos de descripción de especies. En el seno de una colección de cultivos pueden utilizarse los datos referidos en conjunto

con los datos propios. A parte de la falta de universalidad, tiene otras limitaciones como un poder discriminatorio bajo y problemas de interpretación y reproducibilidad en muchos casos.

En los últimos tiempos el avance tecnológico y científico ha dado lugar al desarrollo de diversas técnicas moleculares. Muchas de estas técnicas se aplican en las CC/BRC para la autenticación de cepas procarionas, como es el caso de técnicas que analizan patrones de bandas (ribotipado, PCR-RFLP, AFLP, rep-PCR, análisis de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE, PFGE, RAPD, etc.).

El ribotipado es una técnica basada en el método RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) por la cual se analizan patrones específicos de bandas obtenidos al digerir con enzimas de restricción el DNA de un microorganismo, estos fragmentos separados mediante una electroforesis, son transferidos a una membrana de nylon, y se hibridan con una sonda marcada de rRNA. Las diferencias en la secuencia del 16S rRNA de los distintos microorganismos se traduce en la presencia o ausencia de sitios de corte reconocidos por los distintos enzimas de restricción. El patrón de bandas generado se digitaliza, y se lleva a cabo una comparación por ordenador de dicho patrón con los patrones de referencia de otros microorganismos disponibles en las bases de datos. Esta técnica permite discriminar entre especies, e incluso entre cepas distintas de una misma especie, siempre y cuando haya diferencias entre las secuencias de sus correspondientes genes de SSU rRNA (Madigan y col., 2009). Además, existen sistemas automatizados para la realización de esta técnica, como el *RiboPrinter® microbial characterization system* de DuPont, que contiene una extensa base de datos de microorganismos caracterizados mediante este método.

La técnica PCR-RFLP consiste en la amplificación de determinados genes (16S rRNA, *gyrB*, *rpoD*, etc.) por PCR y su posterior fraccionamiento mediante enzimas de restricción, generando un patrón de bandas tras ser sometida a electroforesis. Es una técnica reproducible cuyo poder de resolución puede variar según el gen

amplificado (Chun y col., 2002; Madigan, 2009; Urakawa y col., 1997).

A diferencia del ribotipado, que se centra en un solo gen, el AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) y la rep-PCR (*repetitive extragenic palindromic PCR*) analizan las variaciones en la secuencia de DNA en el genoma completo.

El AFLP se basa en la digestión de DNA genómico con uno o dos enzimas de restricción y la amplificación selectiva de los fragmentos resultantes, que posteriormente se separan por electroforesis en gel de agarosa. De este modo se generan patrones de bandas específicos de cepa (De Vos y col., 1995; Madigan y col., 2009).

La rep-PCR se basa en la existencia de elementos muy conservados de DNA repetitivo distribuidos aleatoriamente en el cromosoma bacteriano. El número y la posición de dichos elementos difiere entre cepas de especies cuyas secuencias han divergido. Usando cebadores oligonucleotídicos diseñados para que sean complementarios a la secuencia de dichos elementos repetitivos es posible la amplificación por PCR de distintos fragmentos genómicos, generando un patrón de bandas de DNA genómico. Este patrón es diferente en distintas cepas, produciendo una huella de DNA específica para cada cepa (Madigan y col., 2009). La casa Biomérieux dispone de un kit, *DiversiLab® System*, para la obtención de estos patrones. Este sistema consiste en la aplicación de un kit de extracción de DNA, seguido de un kit de amplificación por rep-PCR, y la separación de las bandas generadas mediante electroforesis capilar. Por último, el sistema compara los datos obtenidos frente a su base de datos y da un resultado de identificación.

El análisis de proteínas mediante SDS-PAGE permite la separación de las proteínas celulares de acuerdo con su movilidad electroforética. Para ello, se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida con un agente desnaturizante como el SDS, que permite que la mayoría de las proteínas adquieran una relación

carga/masa idéntica, por lo que las proteínas se separan según su tamaño. Esto genera un patrón de bandas que es específico de especie.

En la técnica de electroforesis de campo pulsante (PFGE, *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), los aislados bacterianos crecidos en medio líquido o sólido, se mezclan con agarosa fundida y se reparten en pequeños moldes. La bacteria embebida en el molde de agarosa es luego sometida a lisis y a enzimas de restricción, posteriormente el dado de agarosa con la bacteria embebida es insertado en otro gel de agarosa sometido a dos campos eléctricos de distinta orientación que son aplicados alternativamente a intervalos de tiempo constantes, lo que permite la separación de fragmentos grandes de DNA. Los patrones de bandas son digitalizados y pueden compararse con bases de datos existentes utilizando diferentes programas informáticos como el Applied Maths, Bio-Rad, BioSystematics, etc. Esta técnica permite discriminar a nivel de cepa, aunque el tiempo necesario para llevarla a cabo suele ser de entre 2-3 días, lo que reduce la capacidad de analizar un número alto de muestras (Olive y Bean, 1999).

La técnica RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) se basa en la amplificación de fragmentos de DNA al azar mediante PCR, para ello se utilizan cebadores de poca longitud (9-10 nucleótidos) y una baja temperatura de anillamiento, de modo que se consigue que los cebadores se unan a diversos sitios del DNA, generando un número de fragmentos amplificados elevado. Estos fragmentos de DNA son sometidos posteriormente a electroforesis dando lugar a un patrón de bandas específico de cepa (Olive y Bean, 1999). Esta técnica tiene mayor poder de resolución que el ribotipado, pero menos que la rep-PCR (Vila y col., 1996).

Los patrones de bandas obtenidos tras aplicar estas técnicas deben ser analizados. El análisis puede realizarse de forma manual, en el caso de perfiles electroforéticos sencillos, o mediante programas informáticos como el BioNumerics o el GelCompar, ambos de Applied Maths.

Las técnicas basadas en patrones de bandas o de *fingerprinting*, en general, tienen un poder de resolución alto permitiendo tipificar cepas, pero carecen de alta reproducibilidad y resultan en algunos casos tediosas.

En la actualidad prácticamente todas las colecciones de cultivo incluyen en la autenticación de sus cepas la secuenciación parcial del gen 16S rRNA. Las ventajas principales frente a otras técnicas son que los datos pueden estar en bases de datos públicas (GenBank/EMBL/DDBJ) a disposición de la comunidad científica, que a diferencia de la mayoría de las técnicas de tipificación molecular los resultados obtenidos son reproducibles intra- e interlaboratorio y que el análisis de datos es escalable, pudiendo comparar secuencias de estudios independientes. El análisis posterior de la secuencia se puede hacer aprovechando las ventajas de algunas herramientas y recursos disponibles en la red (BLAST, LeBibi, EzTaxon, RPD, SILVA, etc.).

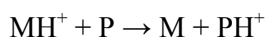
El gen 16S rRNA se ha utilizado ampliamente para el análisis evolutivo basado en secuencias porque está distribuido universalmente, su función es estable, presenta una tasa de evolución lenta y tiene una longitud adecuada (Madigan, 2009). Sin embargo, el hecho de que presente una tasa de evolución lenta implica que en muchas ocasiones resulta difícil establecer relaciones filogenéticas entre taxones cuya divergencia es reciente. Por esta razón se utiliza como marcador en rangos taxonómicos por encima de la especie (Stackebrandt y Goebel, 1994; Stackebrandt y Ebers, 2006).

Por tanto, la elección de la técnica o combinación de técnicas más adecuada para la autenticación de cepas no es tarea fácil, y ello justifica que exista un creciente interés en el desarrollo o estudio de técnicas que resulten rápidas, reproducibles, de fácil manejo y bajo coste para ser aplicadas como método de rutina dentro de una colección de cultivos. Tal es el caso de la obtención del perfil de ácidos grasos celulares de un microorganismo, técnica ampliamente utilizada para descripción taxonómica y para identificación, y del estudio de proteínas por MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight*).

3. MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*) es una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas para el análisis de biomoléculas.

En taxonomía se utiliza tanto para la clasificación como para la identificación de cepas microbianas. La técnica persigue la obtención de un perfil proteico característico de cepa. Para ello, una pequeña cantidad de biomasa microbiana (*smear*) o de extracto proteico (extracción etanol/ácido fórmico) se deposita sobre una placa de acero y se recubre con una matriz. La matriz suele estar disuelta en una mezcla de solventes que son una combinación de agua, etanol, metanol, acetonitrilo y un ácido fuerte, como el TFA (trifluoracético). Los solventes de la matriz penetran en la pared celular permitiendo que las proteínas sean accesibles al análisis. Cuando los solventes se evaporan de la suspensión celular, la matriz comienza a formar cristales, y también co-cristalizan las moléculas proteicas y otros componentes celulares que quedan embebidos en ella. Las matrices más comúnmente utilizadas son: α -ciano (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico), DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) ácido sinápico (ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico) y ácido ferúlico (FerA, ácido (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil) propil-2-enoico) (Welter y Moore, 2011). Una vez ha tenido lugar la co-cristalización de la muestra con la matriz, la placa se introduce en un espectrómetro de masas, y la placa es irradiada con un láser UV (usualmente un láser de N₂, 337 nm) lo que produce la ionización de la matriz cristalizada (M), y ésta a su vez genera la ionización de las moléculas pépticas (P) de la muestra por la cesión de protones.



Las moléculas peptídicas ionizadas migran a través de una región que posee un campo eléctrico constante, de manera que llegan al detector con un tiempo de vuelo que depende de su masa molecular y de su carga (m/z), y el detector interpreta la señal en forma de espectro.

Previamente al análisis, el espectrómetro de masas requiere una calibración externa que puede realizarse con una solución de siete polipéptidos de masa molecular conocida (bradicinina, angiotensina, Glu-fibrinopéptido B, sustrato tetradecapéptido de renina, hormona adrenocorticotropa (ACTH), insulina bovina y ubiquitina bovina). También puede utilizarse como control la cepa *Escherichia coli* DH5alpha (CECT 7619), cuyo perfil proteico es conocido, o su versión comercial *Bacterial Test Standard* (Bruker Daltonics ref. 255343).

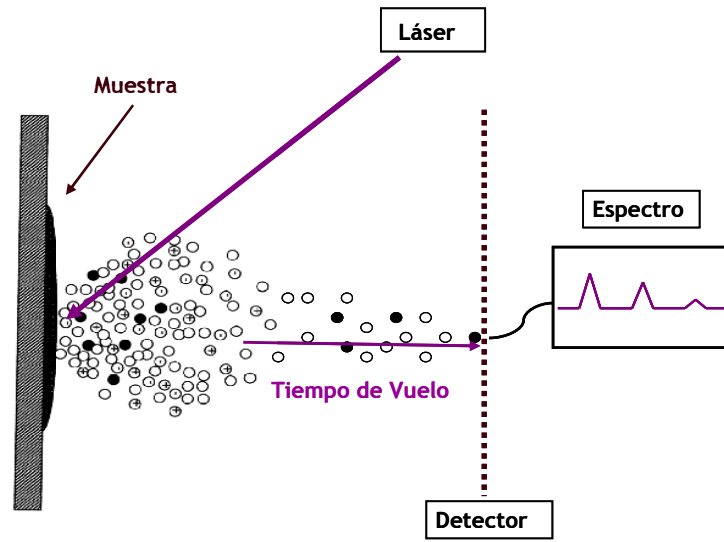


Figura 7. Esquema del proceso de adquisición de espectros en MALDI-TOF MS.

Existen varios tipos y fabricantes de espectrómetros de masas, pero no todos ellos indicados especialmente para esta finalidad. Actualmente hay tres que proporcionan la base de datos y el programa para la identificación y análisis de procariontas: Bruker Daltonics cuyo programa de análisis es el Biotyper; Applied Biosystem con el sistema Saramis; y Shimadzu que utiliza como programa de análisis el Axima-iD^{plus}.

Una de las ventajas de esta técnica es que el perfil proteico obtenido no se ve afectado por las condiciones de cultivo de la cepa

(medio, temperatura, tipo de atmósfera, y tiempo de incubación), ni por la fase de crecimiento en la que es recogida la biomasa. Asimismo, se ha visto que los perfiles obtenidos en diferentes instrumentos de MALDI-TOF con modo de adquisición compatible son altamente comparables (Arnold y col., 1999; Jarman y col., 1999, 2000; Pineda y col. 2000; Wunschel y col., 2005; Maier y col., 2006; Mellmann y col., 2008). Por otro lado, cuando el rango de masas aplicado es de 2 a 20 KDa (m/z), quedan representadas mayoritariamente las proteínas ribosómicas (Ryzhov y Fenselau, 2001), y también se expresan otras proteínas que forman parte constitutivamente de la estructura y regulación celular, como factores de modulación de los ribosomas, proteínas reguladoras del almacenamiento de carbono, proteínas del choque térmico, proteínas de unión al DNA y chaperonas. El hecho de que las proteínas ribosómicas, junto con otras proteínas estructurales y reguladoras, representen la mayoría de los picos obtenidos en el espectro de masas de las células microbianas (Welker y col., 2011) implica que:

- Los patrones de masa espectral son estables, debido a que las proteínas ribosómicas y las proteínas esenciales son componentes ubicuos y abundantes de la célula microbiana.
- La señal espectral generada por las proteínas esenciales puede ser analizada como marcador filogenético, del mismo modo que se analizan los genes esenciales en el análisis génico o multi-lócico.
- Cuanta más similitud exista entre los patrones espectrales comparados más cercana será la relación filogenética entre los microorganismos.

Para la clasificación o identificación de una cepa se compara el perfil proteico obtenido de la cepa a estudiar con los datos de referencia o las librerías almacenadas en las bases de datos, estos datos de referencia se obtienen a partir de la lista de picos que contiene los valores de carga/masa (m/z) y sus intensidades respectivas, también llamadas huellas peptídicas (*mass fingerprints*), y

pueden ser datos de referencia de una única huella peptídica, de un compendio de huellas peptídicas de una misma cepa analizada repetidas veces o una huella peptídica obtenida a partir del análisis de múltiples aislados de la misma especie. Como resultado de la comparación del perfil proteico de una cepa se genera una lista de las especies con las que se identifica con un valor de similitud. En el caso de dos de los sistemas de identificación comerciales disponibles el valor de similitud se da en forma de *score value* (MALDI Biotyper, Bruker) o *confidence value* (SARAMIS, Anagnostec/BioMérieux). El valor umbral para la identificación a nivel de especie es empírico, teniendo en cuenta la comparación entre cepas y correlacionándolo con otras caracterizaciones fenotípicas y genotípicas. De modo que, este valor umbral varía entre taxones. La comparación de los espectros de masas puede estar basada en diferentes criterios, por ejemplo, puede utilizarse como único parámetro la presencia/ausencia de picos del espectro o puede tenerse en cuenta también la altura de los picos. Por otro lado, aunque pueden aplicarse varios rangos de masas, para la identificación microbiana es aconsejable utilizar el rango 2-20 KDa. Los picos pueden ser filtrados para seleccionar un pico que sirva de marcador para un determinado taxón o para eliminar ruido de fondo. Esta estrategia es la utilizada por el sistema SARAMIS, donde utiliza el *SuperSpectra* para la identificación de aislados. *SuperSpectra* es el espectro consenso de una determinada especie calculado a partir del espectro de varias cepas o clones de una especie seleccionando los picos más representativos de dicha especie (Welker y Moore, 2011). En el análisis realizado por el sistema Biotyper (Bruker) se compara el espectro de la cepa a estudiar con las librerías o datos de referencia generados. Estas librerías contienen los patrones de bandas característicos de cada especie, teniendo en cuenta la lista de picos que forman parte del espectro, su frecuencia y sus intensidades. El programa calcula y compara mediante un algoritmo tres parámetros individuales. En primer lugar, compara el número de señales o picos que comparte la cepa a estudiar con respecto a la cepa de referencia. Posteriormente, compara el número de picos que comparte la cepa de referencia con respecto a la cepa a estudiar. Por último, se calcula la

simetría de los pares coincidentes. Si los picos de más intensidad de la cepa a estudiar coinciden con los picos de más intensidad de la cepa de referencia, y los de menos intensidad también coinciden, el resultado generado tendrá un alto valor de simetría. El valor individual de cada parámetro es 1. Se multiplica el valor de los tres parámetros calculados, y además, se multiplica por un factor de 1000, generando el *score value*. El resultado se muestra normalmente como el *log(score) value*, de modo que el valor máximo de *log(score)* es 3 ($\log_{10}(1000)=3$). Un *log(score)* comprendido entre un valor menor de 2 y mayor o igual a 1,7 indica una predicción a nivel de género, un *log(score)* mayor de 2 indica predicción a nivel de especie (Vasileuskaya-Schulz y col., 2011; Maier y col., 2006). El resultado también puede mostrarse en forma de dendrograma, donde se muestran los agrupamientos de las cepas, y la relación existente entre ellas según el nivel de distancia que las separa. El nivel de distancia necesario para distinguir dos cepas como especies diferentes varía en función del taxón estudiado.

El perfil generado por MALDI-TOF MS permite discriminar entre especies cercanamente relacionadas pudiendo clasificarse algunos géneros a nivel de especie, como es el caso de *Acinetobacter* (Sedo y col., 2011), *Legionella* (Gaia y col., 2011), *Leuconostoc* (De Bruyne y col., 2011), *Staphylococcus* (Decristophoris y col., 2011), *Stenotrophomonas* (Vasileuskaya-Schulz y col., 2011), *Streptococcus* (Hinse y col., 2011), *Yersinia* (Wittwer y col., 2011). Otros autores demuestran la capacidad de MALDI-TOF MS para diferenciar cepas a nivel de subespecie como ocurre con *Burkholderia cepacia* (Mellmann y col., 2008) o con *Salmonella enterica* (Dieckmann y col., 2008) e, incluso, a nivel de cepa como es el caso de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) que son diferenciadas por MALDI-TOF MS de las cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles a meticilina (MSSA) (Shah y col., 2011). Estudios que comparan MALDI-TOF MS con otras técnicas demuestran que existe una concordancia entre los resultados obtenidos por MALDI-TOF MS y por MLSA (*Multi-locus Sequence Analysis*) en el género

Stenotrophomonas (Vasileuskaya-Schulz y col., 2011). Asimismo, algunos autores han estudiado su alta capacidad discriminatoria en comparación con el análisis de secuencia del gen 16S rRNA, sugiriendo que MALDI-TOF MS posee una mayor precisión para la identificación de determinadas especies microbianas (Albesharat y col., 2011; Mellmann y col., 2008). Sin embargo, también se ha descrito la incapacidad de la técnica para diferenciar entre *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus mitis* (Seng y col., 2009) o para diferenciar aislados enterohemorrágicos de *E. coli* y *Shigella* spp. (He y col., 2010). De modo que, como ocurre con otras técnicas, el poder de resolución de MALDI-TOF MS depende del género estudiado. Por esta razón resulta imposible concretar un valor de similitud para aislados co-específicos, o un umbral que separe dos cepas pertenecientes a distintas especies. No obstante, la mejora en los protocolos y en los programas de análisis puede contribuir a un aumento en el poder de resolución y en los campos de aplicación de la técnica para la identificación y caracterización de procariotas (Dridi y col., 2011).

La técnica MALDI-TOF MS presenta muchas ventajas como su reproducibilidad, fácil manejo y bajo coste, pero contrariamente a lo que sucede con las bases de datos de secuencias génicas, donde las más relevantes son de dominio público, en el caso de las bases de datos de perfiles proteicos existen pocas que no sean comerciales, una de las bases de datos pública, aunque con un enfoque amplio es la *Proteome Commons database* (<http://proteomecommons.org/>) donde pueden ser depositados dichos perfiles proteicos (Dridi y col., 2011).

4. GC FAME

Hasta la actualidad han sido descritos más de 300 tipos diferentes de ácidos grasos en bacterias, que incluyen ácidos grasos de cadena simple saturados e insaturados, ácidos grasos con ramificaciones iso y anteiso, ácidos grasos con ramificaciones internas, ácidos grasos con grupos hidroxilo, ácidos grasos

cyclopropano, ácidos grasos ω -cíclicos, ácidos grasos dicarboxílicos, entre otros (Da Costa y col., 2011).

Las diferencias encontradas en el tamaño de la cadena, la posición de los dobles enlaces, y la unión de distintos grupos funcionales hace que los ácidos grasos celulares puedan ser considerados como marcadores taxonómicos. Como es el caso de los ácidos grasos poliinsaturados, que a pesar de ser poco frecuentes en microorganismos, se ha descrito que forman parte de la composición de ácidos grasos de bacterias que crecen a bajas temperaturas y de cianobacterias (Yano y col., 1997; Russell y Nichols., 1999; Da Costa y col., 2011). Asimismo, algunos ácidos grasos están ampliamente distribuidos en grupos bacterianos, mientras que otros parecen ser restrictivos de un pequeño grupo de microorganismos, como los ácidos grasos ciclohexano y cicloheptano de algunas de las especies de los géneros *Alicyclobacillus*, *Sulfobacillus* y *Curtobacterium*, o como los ácidos grasos con ramificaciones internas que presentan especies del género *Rubrobacter* y *Gaiella oculata* (Carreto y col., 1996; Albuquerque y col., 2011).

Cualitativamente, la composición de ácidos grasos en especies bacterianas es, por lo común, altamente conservada. Cuantitativamente, el perfil de ácidos grasos obtenido para una cepa determinada es estable en condiciones de cultivo estandarizadas (Slabbinck y col., 2009). De modo que, *a priori* cada grupo microbiano se caracteriza por la presencia y abundancia relativa de determinados ácidos grasos (tabla 1).

Grupo Microbiano	
Bacterias G-	Presencia de 10:0 3OH
Bacterias G+	Alto % de Iso y Anteiso
Bacterias Anaerobias	Presencia de DMA's
Bacterias Microaerófilas	Contenido de 18:1 ω 9c > 70%
Levaduras	Contenido de 18:2 ω 6,9c > 65%
Bacteria Lácticas	Presencia de 19:0 cyclo ω 8c y/o ω 10c
Actinomicetos	Presencia de 17:0 10-Metil; Iso H
<i>Bacillus</i>	Presencia de 16:1 ω 7c Alcohol; Iso 17:1 ω 10c; alto % de 15:0 Iso y Anteiso
<i>Bordetella</i>	Presencia de 20:4 ω 6,9,12,15c
<i>Burkholderia</i>	Presencia de 16:0 2OH; 16:1 2OH; 16:0 3OH
<i>Cytophaga</i>	Presencia de 15:0 Iso 3OH; 17:0 Iso 3OH
<i>Flavobacterium</i>	Presencia de 15:0 Iso 3OH; 17:0 Iso 3OH
<i>Kocuria</i>	Alto % de 15:0 Iso y Anteiso
<i>Methylobacterium</i>	Contenido de 18:1 ω 7c > 65%
<i>Micrococcus</i>	Alto % de 15:0 Iso y Anteiso
<i>Moraxella</i>	Presencia de 20:4 ω 6,9,12,15c
<i>Pasteurella</i>	Presencia de 20:4 ω 6,9,12,15c
<i>Staphylococcus</i>	Presencia de 20:0
<i>Streptococcus</i>	Presencia de 12:0; 13:0; 14:0; 15:0
<i>Weeksella</i>	Presencia de 15:0 Iso 3OH; 17:0 Iso 3OH

Tabla 1. Representación de los ácidos grasos más característicos de determinados géneros y grupos microbianos (MIDI, 2004).

Sin embargo, en algunos casos no existe una composición de ácidos grasos uniforme que permita la identificación y clasificación. Como es el caso del género *Thermus*, donde *T. oshimai* y *T. scotoductus*, presentan una composición de ácidos grasos uniforme, mientras que cepas de las especies *T. thermophilus* y *T. filiformis* presentan un perfil de ácidos grasos extremadamente dispar. La cepa tipo de *T. filiformis* posee ácidos grasos 3OH, mientras que otras cepas de la misma especie no. La presencia/ausencia de estos ácidos grasos hidroxilados está relacionado con los grupos polares de los glucolípidos que posee la cepa (Nobre y col., 1996). Por otro lado,

también se ha descrito que en el género *Meiothermus*, que generalmente presenta una composición estable de ácidos grasos en la que destaca la presencia de ácidos grasos 3OH, las especies *M. granaticius* y *M. rufus* presentan ácidos grasos 2OH y 3OH (Nobre y col., 1996; Albuquerque y col., 2009, 2010).

El análisis de ácidos grasos ésteres metilados (*fatty acid methyl ester*, FAME) se realiza mediante cromatografía de gases, y el perfil resultante puede obtenerse de forma automatizada utilizando un sistema comercial como el *Sherlock Microbial Identification System* (MIS, Microbial ID Inc. (MIDI), Newark, EEUU). Este sistema, además, permite la identificación de microorganismos por la comparación de los nuevos perfiles obtenidos con los contenidos en su base de datos.

Para el estudio de la composición de ácidos grasos de una cepa es muy importante definir las condiciones de cultivo. Cambios en la temperatura, medio de cultivo y tiempo de incubación, pueden traducirse en una variación cuantitativa e incluso cualitativa de algunos ácidos grasos, generando en último término un perfil diferente. Asimismo, la biomasa debe ser recogida de un cultivo sólido en la fase tardía de crecimiento exponencial, donde es más estable la composición de ácidos grasos, y según algunos estudios la cantidad de biomasa también puede afectar al perfil (Peltroche-Llacsahuanga y col., 2000).

La biomasa es sometida a un protocolo de cuatro pasos: (1) saponificación, (2) metilación, (3) extracción y (4) lavado.

Una pequeña cantidad del extracto obtenido (2 μ l) es inyectado en el cromatógrafo de gases atravesando una junta de goma denominada septum hasta el *port liner* o también llamado *split liner*. El *liner* permite la adecuada mezcla y vaporización de la muestra antes de entrar en la columna cromatográfica, consiste en un tubo de cristal de 10 cm de longitud y 4 mm de diámetro que contiene fibras de cristal silanizadas y que se encuentra a una temperatura de 250°C. La columna cromatográfica tiene una longitud de 25 m y un grosor 0,2

mm, es de sílice fundido y está cubierta por una fina capa de polisiloxano modificado (5% fenil, 95% metil) que es la fase estacionaria. Está situada dentro del horno, donde se genera una rampa de temperatura que comienza con 170°C y aumenta a razón de 5°C/minuto hasta alcanzar los 310°C. Dicha columna está conectada a un detector de ionización de llama (*flame ionization detector*, FID), de modo que los analitos eluidos de ésta se queman en el detector generando iones positivos que son detectados como una corriente por un electrómetro. La fase móvil es un gas, en este caso el gas portador es el hidrógeno, que permite una mayor resolución. El sistema también requiere de otros gases como el aire sintético, que es utilizado para generar la llama del detector, y el nitrógeno, que es utilizado como sistema de arrastre para ayudar a los analitos a llegar al detector. La señal producida por los analitos en el detector es registrada junto con el tiempo que tardan en salir (tiempo de retención, RT) por un programa que mediante un algoritmo representa el cromatograma, calculando el área del pico e identificando según el tiempo de retención el ácido graso correspondiente (figura 8) (MIDI, 2008).

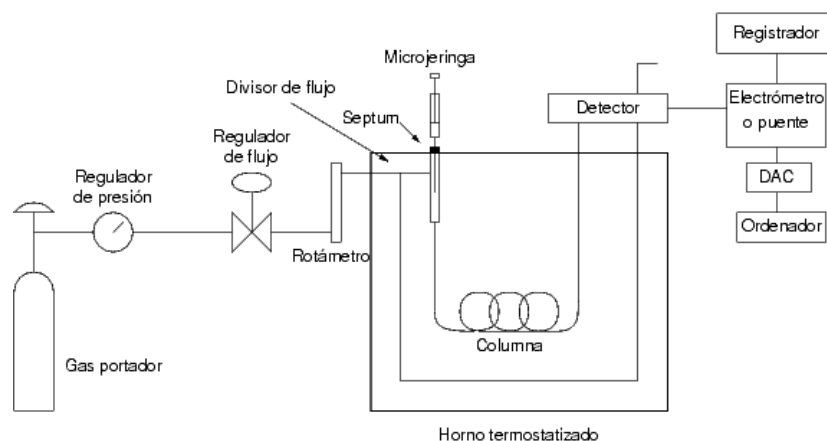


Figura 8. Esquema del proceso de análisis de FAME por cromatografía de gases.

Un parámetro importante en el análisis del perfil cromatográfico es el ECL (Longitud de Cadena Equivalente). El ECL permite comparar un cromatograma con otro aunque los tiempos de retención sean distintos. Representa el lugar en el que eluye un determinado FAME con respecto a una serie de FAMEs saturados de cadena sencilla en unas condiciones dadas. Para determinar su valor, se utiliza un calibrante que contiene cantidades conocidas de una mezcla de ésteres metilados de ácidos grasos saturados de cadena sencilla de entre 9 a 20 carbonos (9:0-20:0) y cinco ésteres metilados de ácidos grasos hidroxilados. Los ésteres metilados de ácidos grasos hidroxilados son especialmente sensibles a los cambios de temperatura/presión y a contaminantes del *port liner*, por lo que se utilizan como punto de control en la calibración. A partir de los valores del tiempo de retención (RT) de los ésteres metilados de ácidos grasos del calibrante se calcula el ECL. Para ello se le da un valor teórico de ECL a cada FAME saturado de cadena simple, que corresponde al número de carbonos que posea, de modo que el valor de ECL del 14:0 es de 14.000, el del 15:0 es de 15.000, etc. (Millar y Berger, 1985; Sasser, 1990). Y el valor del resto de FAMEs se calcula mediante el tiempo de retención (RT) medido en el punto más alto del pico, siguiendo la fórmula:

$$ECL_x = ECL_n + (RT_x - RT_n) / (RT_{(n+1)} - RT_n)$$

Donde RT_x es el tiempo de retención de X; RT_n es el tiempo de retención del ácido graso saturado metil éster que precede a X; $RT_{(n+1)}$ es el tiempo de retención del ácido graso saturado metil éster que eluye después de X.

Cada FAME tiene asignado un valor teórico de ECL, calculado a partir de la calibración, con una desviación de entre 0,010 y 0,020 según el ácido graso. Así, por ejemplo si el ECL del ácido graso 16:1 ω 5c tiene un valor teórico de 15.909 y una desviación de 0,010, un pico cuyo ECL calculado a partir de su RT tenga un valor comprendido entre 15.899 y 15.919 será reconocido como 16:1 ω 5c (MIDI, 2008).

En ocasiones un pico determinado puede quedar sin identificar, esto puede ser debido a que se trate de un nuevo ácido graso sin catalogar. Otras veces el sistema es incapaz de discernir entre dos FAMES distintos, por tener tiempos de retención muy próximos entre sí, de modo que la posible desviación del valor teórico del ECL de ambos se solapa, en estos casos el sistema lo reconoce como *summed feature*. A veces es posible identificar tentativamente de qué ácido graso se trata (Da Costa y col., 2011). Por ejemplo, en el perfil de FAMES de *Meiothermus* spp., uno de los picos fue catalogado como *summed feature*, que corresponde al 15:0 iso 2OH y al 16:1 ω 7c. Como el microorganismo posee otros ácidos grasos 2OH, pero no ácidos grasos de cadena simple monoinsaturados, es muy probable que el *summed feature* corresponda sólo al ácido graso 15:0 iso 2OH (Nobre y col., 1996).

Además del cromatograma, y el perfil de ácidos grasos dónde se detalla qué tipo de FAMES han sido detectados y en qué proporción relativa, el sistema comercial *Sherlock Microbial Identification System*, proporciona un Índice de Similitud (SI) de la identificación realizada con respecto a su base de datos. El SI es un valor numérico que expresa cómo de relacionada está una composición de ácidos grasos de una cepa determinada con respecto a otra de la base de datos del sistema. Es un cálculo de distancias, en un espacio multidimensional, entre el perfil de la cepa a estudiar y el perfil de la librería más cercanamente relacionada. EL SI asume que las especies de microorganismos tiene una distribución Gaussiana y que la media de la población en una serie de rasgos, en este caso composición de ácidos grasos, caracteriza el grupo. Una determinada cepa que presente exactamente el mismo perfil que la media tendrá un SI de 1,000, y a medida que vaya variando en la composición de ácidos grasos y/o en la cantidad relativa de éstos, el SI irá decreciendo. Muestras con un SI de 0,500 o superior con una distancia de 0,100 entre la primera identificación y la segunda son consideradas buenas identificaciones. Si el SI está entre 0,300 y 0,500 y existe una buena separación entre la primera identificación y la segunda (mayor a

0,100), se considera que es una buena identificación pero puede tratarse de una cepa atípica. Valores inferiores a 0,300 sugieren que la cepa estudiada no se encuentra en la librería, pero el programa indicará la especie más cercanamente relacionada (MIDI, 2008).

El análisis de la composición de ácidos grasos es una técnica ampliamente utilizada en taxonomía de procariotas como parámetro quimiotaxonómico, junto con la composición de lípidos polares y el análisis de quinonas respiratorias para distinguir especies cercanamente relacionadas y para la descripción de nuevos taxones (Tindall y col., 2010). Otra de las aplicaciones de esta técnica es su utilización para el estudio de comunidades microbianas o microorganismos no cultivables (Quezada y col., 2007). También resulta una herramienta fácil y económica para la identificación de microorganismos, aunque en este caso el factor limitante es la base de datos disponible, y además, para llegar a una correcta identificación deben cultivarse los microorganismos en las mismas condiciones que las utilizadas para obtener esta base de datos.

El poder de resolución del análisis de la composición de ácidos grasos depende del género estudiado. En algunos casos, permite la clasificación de microorganismos a nivel de especie, como en el caso de *Legionella* spp., lo cual es importante ya que este género posee otros rasgos fenotípicos que no permite discernir entre especies cercanamente relacionadas (Diogo y col., 1999). En otros casos, ha sido descrito que esta técnica es capaz de discernir a nivel de cepa, como en el caso de *Pseudomonas cepacia* (Mukwaya y col., 1989). Sin embargo, algunos autores defienden que diferentes estudios numéricos sobre la resolución de FAME para la discriminación de especies indican que el perfil de FAME no puede ser utilizado para discriminar todas la especies de otras (Slabbinck y col., 2010).

Objetivos

OBJETIVOS

La financiación del presente proyecto de Tesis Doctoral ha sido posible gracias al proyecto que lleva por título *European Consortium of Microbial Resource Centres – EMbaRC* (FP7-228310), vigente desde el 1 de febrero de 2009 al 30 de septiembre de 2012.

Además, el diseño del trabajo ha mantenido una estrecha relación bidireccional con las funciones y servicios que presta la CECT.

En concreto los objetivos propuestos han sido:

1. Analizar la adecuación de la técnica de análisis de perfiles proteicos MALDI-TOF MS como técnica de autenticación de cepas dentro de una Colección de Cultivos, para las cepas depositadas en la CECT pertenecientes al género *Lactobacillus*, a la familia *Leuconostocaceae* (*Leuconostoc*, *Fructobacillus*, *Oenococcus* y *Weissella*), al grupo de otras Bacterias Lácticas (*Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Pediococcus*), al género *Pseudomonas*, a la familia *Vibrionaceae*, al género *Aeromonas*, a un grupo de cepas pertenecientes a la familia *Rhodobacteraceae* y a un grupo de cepas perteneciente al filo *Bacteroidetes*.
2. Analizar la adecuación de la técnica de análisis de ácidos grasos MIDI como técnica de autenticación de cepas dentro de una Colección de Cultivos, para las cepas depositadas en la CECT pertenecientes al género *Pseudomonas*, al género *Vibrio*, al género *Aeromonas*, a un grupo de cepas pertenecientes a la

familia *Rhodobacteraceae* y a un grupo de cepas perteneciente al filo *Bacteroidetes*.

Material y Métodos

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material biológico: Cepas bacterianas

Las cepas utilizadas en el presente trabajo son cepas de referencia procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (Tabla 2). La elección de cepas utilizadas en la presente tesis doctoral en el análisis mediante MALDI-TOF MS obedece por un lado a los objetivos del proyecto EMbaRC, ya que una de las tareas de dicho proyecto consistió en el análisis de cepas de la familia *Leuconostocaceae* y de los géneros *Acetobacter*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium* y *Pseudomonas*, y por otro lado al interés particular de la CECT en el análisis de cepas pertenecientes al filo *Bacteroidetes*, a las familias *Rhodobacteraceae* y *Vibrionaceae*, y al género *Aeromonas*. La elección de cepas utilizadas en la presente tesis doctoral en el análisis mediante GC-FAME obedece al interés particular de la CECT en las cepas estudiadas.

Las distintas metodologías aplicadas se realizaron empleando los cultivos activos obtenidos tras la apertura del liófilo correspondiente en el medio y temperatura recomendados por la CECT (www.cect.org).

La composición de los medios de cultivo utilizados en este trabajo se detalla en el Anexo.

Tabla 2. Cepas de referencia utilizadas en el estudio. [†]Cepas analizadas mediante MALDI-TOF MS. [‡]Cepas analizadas mediante análisis de ácidos grasos (GC FAME).

Especie	Cepa
<i>Filo Firmicutes</i>	
<i>Carnobacterium alterfunditum</i> [†]	CECT 5892 [†]
<i>Carnobacterium divergens</i> [†]	CECT 4016 [†]
<i>Carnobacterium funditum</i> [†]	CECT 5893 [†]
<i>Carnobacterium gallinarum</i> [†]	CECT 5958 [†]
<i>Carnobacterium mobile</i> [†]	CECT 5959 [†]
<i>Carnobacterium viridans</i> [†]	CECT 5758 [†]
<i>Fructobacillus durionis</i> [†]	CECT 7089 [†]

Especie	Cepa
<i>Fructobacillus ficulneus</i> [†]	CECT 5747 [†]
<i>Fructobacillus fructosus</i> [†]	CECT 7088 [†]
<i>Fructobacillus pseudoficulneus</i> [†]	CECT 5759 [†]
<i>Lactobacillus acetotolerans</i> [†]	CECT 4019 [†]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ^{†‡}	CECT 903 [†]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> [†]	CECT 362
<i>Lactobacillus acidophilus</i> [†]	CECT 4179
<i>Lactobacillus agilis</i> ^{†‡}	CECT 4131 [†]
<i>Lactobacillus alimentarius</i> [†]	CECT 570 [†]
<i>Lactobacillus amylophilus</i> [†]	CECT 4133 [†]
<i>Lactobacillus amylovorus</i> [†]	CECT 4132 [†]
<i>Lactobacillus animalis</i> [†]	CECT 4060 [†]
<i>Lactobacillus aquaticus</i> [†]	CECT 7355 [†]
<i>Lactobacillus bobalius</i> [†]	CECT 7310 [†]
<i>Lactobacillus brevis</i> [†]	CECT 4121 [†]
<i>Lactobacillus brevis</i> [†]	CECT 216
<i>Lactobacillus brevis</i> [†]	CECT 4669
<i>Lactobacillus brevis</i> [†]	CECT 5172
<i>Lactobacillus brevis</i> [†]	CECT 5354
<i>Lactobacillus brevis</i> [†]	CECT 5918
<i>Lactobacillus buchneri</i> ^{†‡}	CECT 4111 [†]
<i>Lactobacillus casei</i> [†]	CECT 4180
<i>Lactobacillus casei</i> [†]	CECT 5276
<i>Lactobacillus casei</i> ^{†‡}	CECT 475 [†]
<i>Lactobacillus catenaformis</i> [†]	CECT 4140 [†]
<i>Lactobacillus ceti</i> [†]	CECT 7185 [†]
<i>Lactobacillus collinoides</i> ^{†‡}	CECT 922 [†]
<i>Lactobacillus coryniformis</i> ^{†‡}	CECT 982 [†]
<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> [†]	CECT 4129 [†]
<i>Lactobacillus crispatus</i> [†]	CECT 4840 [†]
<i>Lactobacillus curvatus</i> [†]	CECT 904 [†]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ^{†‡}	CECT 4005 [†]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> [†]	CECT 4684
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> [†]	CECT 5035
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> [†]	CECT 286 [†]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> [†]	CECT 282
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> [†]	CECT 287
<i>Lactobacillus dextrinicus</i> [†]	CECT 4791 [†]
<i>Lactobacillus farciminis</i> [†]	CECT 571 [†]
<i>Lactobacillus fermentum</i> [†]	CECT 562
<i>Lactobacillus fermentum</i> [†]	CECT 285

Especie	Cepa
<i>Lactobacillus fermentum</i> ^{†‡}	CECT 4007 [†]
<i>Lactobacillus fructivorans</i> [†]	CECT 4785 [†]
<i>Lactobacillus gasseri</i> ^{†‡}	CECT 4479 [†]
<i>Lactobacillus graminis</i> [†]	CECT 4017 [†]
<i>Lactobacillus helveticus</i> [†]	CECT 800
<i>Lactobacillus helveticus</i> [†]	CECT 403
<i>Lactobacillus helveticus</i> [†]	CECT 4305 [†]
<i>Lactobacillus hilgardii</i> ^{†‡}	CECT 4786 [†]
<i>Lactobacillus homohiochii</i> [†]	CECT 983
<i>Lactobacillus homohiochii</i> [†]	CECT 4136 [†]
<i>Lactobacillus jensenii</i> [†]	CECT 4306 [†]
<i>Lactobacillus johnsonii</i> [†]	CECT 289
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> [†]	CECT 5954 [†]
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i> [†]	CECT 5919 [†]
<i>Lactobacillus lindneri</i> [†]	CECT 5957 [†]
<i>Lactobacillus malefermentans</i> ^{†‡}	CECT 5928 [†]
<i>Lactobacillus malefermentans</i> [†]	CECT 5956
<i>Lactobacillus malefermentans</i> [†]	CECT 7875
<i>Lactobacillus mali</i> [†]	CECT 4149
<i>Lactobacillus murinus</i> [†]	CECT 4135 [†]
<i>Lactobacillus nagelii</i> [†]	CECT 5983 [†]
<i>Lactobacillus oeni</i> [†]	CECT 7334 [†]
<i>Lactobacillus oris</i> ^{†‡}	CECT 4021 [†]
<i>Lactobacillus parabuchneri</i> ^{†‡}	CECT 5740 [†]
<i>Lactobacillus paracasei</i> [†]	CECT 4022 [†]
<i>Lactobacillus paracasei</i> [†]	CECT 277
<i>Lactobacillus paracasei</i> [†]	CECT 981
<i>Lactobacillus paracasei</i> ^{†‡}	CECT 4583
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> [†]	CECT 4175 [†]
<i>Lactobacillus paraplantarum</i> [†]	CECT 5787
<i>Lactobacillus paraplantarum</i> [†]	CECT 5783
<i>Lactobacillus pentosus</i> [†]	CECT 4023 [†]
<i>Lactobacillus perolens</i> [†]	CECT 5955 [†]
<i>Lactobacillus plantarum</i> [†]	CECT 748 [†]
<i>Lactobacillus plantarum</i> [†]	CECT 220
<i>Lactobacillus plantarum</i> [†]	CECT 749
<i>Lactobacillus plantarum</i> ^{†‡}	CECT 4528
<i>Lactobacillus rennini</i> [†]	CECT 5923
<i>Lactobacillus rennini</i> [†]	CECT 5922 [†]
<i>Lactobacillus reuteri</i> [†]	CECT 925 [†]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> [†]	CECT 278 [†]

Especie	Cepa
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ^{†‡}	CECT 288
<i>Lactobacillus ruminis</i> [†]	CECT 4061 [†]
<i>Lactobacillus ruminis</i> [†]	CECT 7785 [†]
<i>Lactobacillus sakei</i> [†]	CECT 906 [†]
<i>Lactobacillus sakei</i> [†]	CECT 4591
<i>Lactobacillus sakei</i> [†]	CECT 5926
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carnosus</i> [†]	CECT 5766 [†]
<i>Lactobacillus salivarius</i> [†]	CECT 4063 [†]
<i>Lactobacillus salivarius</i> [†]	CECT 4062
<i>Lactobacillus</i> sp. [†]	CECT 5927
<i>Lactobacillus suebicus</i> [†]	CECT 5917 [†]
<i>Lactobacillus tuceti</i> [†]	CECT 5920 [†]
<i>Lactobacillus uvarum</i> [†]	CECT 7335 [†]
<i>Lactobacillus vaccिनosterculus</i> [†]	CECT 5925 [†]
<i>Lactobacillus vaginalis</i> [†]	CECT 4089 [†]
<i>Lactobacillus versmoldensis</i> [†]	CECT 5773 [†]
<i>Lactobacillus vini</i> [†]	CECT 5924 [†]
<i>Lactococcus garvieae</i>	CECT 4531 [†]
<i>Lactococcus lactis</i> [†]	CECT 185 [†]
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> [†]	CECT 7100 [†]
<i>Lactococcus piscium</i> [†]	CECT 4493 [†]
<i>Lactococcus raffinolactis</i> [†]	CECT 988 [†]
<i>Leuconostoc carnosum</i> [†]	CECT 4024 [†]
<i>Leuconostoc citreum</i> [†]	CECT 4025 [†]
<i>Leuconostoc fallax</i> [†]	CECT 7087 [†]
<i>Leuconostoc gasicomitatum</i> [†]	CECT 5767 [†]
<i>Leuconostoc gelidum</i> [†]	CECT 4026 [†]
<i>Leuconostoc inhae</i> [†]	CECT 7026 [†]
<i>Leuconostoc lactis</i> [†]	CECT 4173 [†]
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> [†]	CECT 219 [†]
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> [†]	CECT 872 [†]
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> [†]	CECT 912 [†]
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> [†]	CECT 4027 [†]
<i>Oenococcus oeni</i> [†]	CECT 217 [†]
<i>Pediococcus acidilactici</i> [†]	CECT 5765 [†]
<i>Pediococcus claussenii</i> [†]	CECT 7027 [†]
<i>Pediococcus damnosus</i> [†]	CECT 793 [†]
<i>Pediococcus parvulus</i> [†]	CECT 7350 [†]
<i>Pediococcus pentosaceus</i> [†]	CECT 4695 [†]
<i>Staphylococcus epidermis</i> [‡]	CECT 231 [†]
<i>Weissella cibaria</i> [†]	CECT 7032 [†]

Especie	Cepa
<i>Weissella confusa</i> [†]	CECT 4707 ¹
<i>Weissella halotolerans</i> [†]	CECT 573 ¹
<i>Weissella hellenica</i> [†]	CECT 7033 ¹
<i>Weissella kandleri</i> [†]	CECT 4307 ¹
<i>Weissella minor</i> [†]	CECT 572 ¹
<i>Weissella paramesenteroides</i> [†]	CECT 4268 ¹
<i>Weissella soli</i> [†]	CECT 7031 ¹
<i>Weissella thailandensis</i> [†]	CECT 7052 ¹
<i>Weissella viridescens</i> [†]	CECT 283 ¹
Clase Alphaproteobacteria	
<i>Acetobacter aceti</i> [†]	CECT 298 ¹
<i>Acetobacter oeni</i> [†]	CECT 5830 ¹
<i>Actibacterium mucosus</i> ^{†‡}	CECT 7668 ¹
<i>Antarctobacter heliothermus</i> ^{†‡}	CECT 7783 ¹
<i>Jannaschia donghaensis</i> ^{†‡}	CECT 7802 ¹
<i>Jannaschia rubra</i> ^{†‡}	CECT 5088 ¹
<i>Jannaschia seosinensis</i> ^{†‡}	CECT 7799 ¹
<i>Maribius pelagius</i> ^{†‡}	CECT 7801 ¹
<i>Maribius salinus</i> ^{†‡}	CECT 7800 ¹
<i>Marinovum algicola</i> ^{†‡}	CECT 5396 ¹
<i>Nautella italica</i> ^{†‡}	CECT 7645 ¹
<i>Oceanicola batsensis</i> ^{†‡}	CECT 7860 ¹
<i>Oceanicola granulosus</i> ^{†‡}	CECT 7859 ¹
<i>Oceanicola marinus</i> ^{†‡}	CECT 7751 ¹
<i>Oceanicola nanhaiensis</i> ^{†‡}	CECT 7831 ¹
<i>Oceanicola pacificus</i> ^{†‡}	CECT 7832 ¹
<i>Oceanicola</i> sp. ^{†‡}	CECT 7852 ¹
<i>Palleronia marisminoris</i> ^{†‡}	CECT 7066 ¹
<i>Phaeobacter daeponensis</i> ^{†‡}	CECT 7309 ¹
<i>Phaeobacter gallaeciensis</i> ^{†‡}	CECT 7277 ¹
<i>Phaeobacter inhibens</i> ^{†‡}	CECT 7251 ¹
<i>Phaeobacter</i> sp. ^{†‡}	CECT 7735
<i>Phaeomarinomonas litorea</i> ^{†‡}	CECT 7639 ¹
<i>Phaeomarinomonas mediterranea</i> ^{†‡}	CECT 7615 ¹
<i>Phaeomarinomonas mediterranea</i> ^{†‡}	CECT 5090
<i>Phaeomarinomonas mediterranea</i> ^{†‡}	CECT 7616
<i>Phaeomarinomonas mediterranea</i> ^{†‡}	CECT 7637
<i>Phaeomarinomonas mediterranea</i> ^{†‡}	CECT 7638
<i>Ponticoccus litoralis</i> ^{†‡}	CECT 7786 ¹
<i>Pseudoruegeria aquimaris</i> [†]	CECT 7680 ¹
<i>Roseobacter denitrificans</i> [†]	CECT 5011 ¹

Especie	Cepa
<i>Roseobacter litoralis</i> [†]	CECT 5395 [†]
<i>Roseovarius aestuarii</i> ^{†‡}	CECT 7745 [†]
<i>Roseovarius crassostreae</i> [†]	CECT 7676 [†]
<i>Roseovarius halotolerans</i> ^{†‡}	CECT 8110 [†]
<i>Roseovarius litoralis</i> ^{†‡}	CECT 7450 [†]
<i>Roseovarius marinus</i> ^{†‡}	CECT 7971 [†]
<i>Roseovarius mucosus</i> ^{†‡}	CECT 7973 [†]
<i>Roseovarius nubinhibens</i> ^{†‡}	CECT 7750 [†]
<i>Roseovarius tolerans</i> ^{†‡}	CECT 7738 [†]
<i>Ruegeria atlantica</i> ^{†‡}	CECT 4292 [†]
<i>Ruegeria lacuscaerulensis</i> ^{†‡}	CECT 5319 [†]
<i>Ruegeria pomeyori</i> ^{†‡}	CECT 7647 [†]
<i>Sagittula stellata</i> ^{†‡}	CECT 7782 [†]
<i>Shimia marina</i> ^{†‡}	CECT 7688 [†]
<i>Thalassobacter stenotrophicus</i> [†]	CECT 5294 [†]
<i>Thalassobius</i> sp. [†]	CECT 5113
<i>Tropicibacter multivorans</i> ^{†‡}	CECT 7557 [†]
<i>Tropicibacter naphthalenivorans</i> ^{†‡}	CECT 7648 [†]
<i>Tropicibacter</i> sp. [†]	CECT 7637
Clase Gammaproteobacteria	
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> ^{†‡}	CECT 4220
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> ^{†‡}	CECT 4911
<i>Aeromonas aquariorum</i> ^{†‡}	CECT 7289 [†]
<i>Aeromonas bestiarum</i> ^{†‡}	CECT 4227 [†]
<i>Aeromonas bestiarum</i> ^{†‡}	CECT 5219
<i>Aeromonas bestiarum</i> ^{†‡}	CECT 7451
<i>Aeromonas bivalvium</i> ^{†‡}	CECT 7112
<i>Aeromonas bivalvium</i> ^{†‡}	CECT 7113 [†]
<i>Aeromonas caviae</i> ^{†‡}	CECT 838 [†]
<i>Aeromonas caviae</i> ^{†‡}	CECT 4226
<i>Aeromonas diversa</i> ^{†‡}	CECT 4254 [†]
<i>Aeromonas encheleia</i> ^{†‡}	CECT 4342 [†]
<i>Aeromonas encheleia</i> ^{†‡}	CECT 4985
<i>Aeromonas encheleia</i> ^{†‡}	CECT 5027
<i>Aeromonas enteropelogenes</i> ^{†‡}	CECT 4487 [†]
<i>Aeromonas enteropelogenes</i> ^{†‡}	CECT 4255
<i>Aeromonas enteropelogenes</i> ^{†‡}	CECT 4935
<i>Aeromonas enteropelogenes</i> ^{†‡}	CECT 4937
<i>Aeromonas eucrenophila</i> ^{†‡}	CECT 4224 [†]
<i>Aeromonas eucrenophila</i> ^{†‡}	CECT 4827
<i>Aeromonas eucrenophila</i> ^{†‡}	CECT 4855

Especie	Cepa
<i>Aeromonas fluvialis</i> ^{†‡}	CECT 7401 [†]
<i>Aeromonas hydrophila</i> [‡]	CECT 398
<i>Aeromonas hydrophila</i> [‡]	CECT 4330
<i>Aeromonas hydrophila</i> [‡]	CECT 839 [†]
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>anaerogenes</i> ^{†‡}	CECT 4221 [†]
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>anaerogenes</i> ^{†‡}	CECT 4588
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> ^{†‡}	CECT 5744 [†]
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> ^{†‡}	CECT 5743
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> ^{†‡}	CECT 5745
<i>Aeromonas ichthiosmia</i> ^{†‡}	CECT 4486 [†]
<i>Aeromonas jandaei</i> ^{†‡}	CECT 4228 [†]
<i>Aeromonas jandaei</i> ^{†‡}	CECT 4229
<i>Aeromonas jandaei</i> ^{†‡}	CECT 4231
<i>Aeromonas jandaei</i> ^{†‡}	CECT 4335
<i>Aeromonas media</i> ^{†‡}	CECT 4232 [†]
<i>Aeromonas molluscorum</i> ^{†‡}	CECT 5864 [†]
<i>Aeromonas molluscorum</i> [†]	CECT 5865
<i>Aeromonas molluscorum</i> [†]	CECT 5868
<i>Aeromonas piscicola</i> ^{†‡}	CECT 7443 [†]
<i>Aeromonas piscicola</i> ^{†‡}	CECT 7444
<i>Aeromonas popoffii</i> ^{†‡}	CECT 5176 [†]
<i>Aeromonas popoffii</i> ^{†‡}	CECT 4995
<i>Aeromonas popoffii</i> ^{†‡}	CECT 5250
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> ^{†‡}	CECT 895 [†]
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> ^{†‡}	CECT 4238
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> ^{†‡}	CECT 4239
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> ^{†‡}	CECT 896 [†]
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>pectinolytica</i> ^{†‡}	CECT 5752 [†]
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>pectinolytica</i> ^{†‡}	CECT 5753
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>smithia</i> ^{†‡}	CECT 5179 [†]
<i>Aeromonas salmonicida</i> ^{†‡}	CECT 894 [†]
<i>Aeromonas salmonicida</i> ^{†‡}	CECT 5209
<i>Aeromonas schubertii</i> ^{†‡}	CECT 4240 [†]
<i>Aeromonas schubertii</i> ^{†‡}	CECT 4241
<i>Aeromonas schubertii</i> ^{†‡}	CECT 4934
<i>Aeromonas sobria</i> ^{†‡}	CECT 4245 [†]
<i>Aeromonas sobria</i> ^{†‡}	CECT 4835
<i>Aeromonas tecta</i> ^{†‡}	CECT 7082 [†]
<i>Aeromonas tecta</i> ^{†‡}	CECT 7080
<i>Aeromonas tecta</i> ^{†‡}	CECT 7081
<i>Aeromonas tecta</i> ^{†‡}	CECT 7083

Especie	Cepa
<i>Aeromonas tecta</i> [‡]	CECT 7084
<i>Aeromonas veronii</i> ^{†‡}	CECT 4257 [†]
<i>Aeromonas veronii</i> [‡]	CECT 4199
<i>Aeromonas veronii</i> ^{†‡}	CECT 4819
<i>Aeromonas veronii</i> ^{†‡}	CECT 4910
<i>Aeromonas veronii</i> ^{†‡}	CECT 5761
<i>Aeromonas veronii</i> ^{†‡}	CECT 7060
<i>Aliivibrio finisterrensis</i> ^{†‡}	CECT 7228 [†]
<i>Aliivibrio fischeri</i> ^{†‡}	CECT 524 [†]
<i>Aliivibrio logei</i> ^{†‡}	CECT 5009 [†]
<i>Enterovibrio calviensis</i> ^{†‡}	CECT 7414 [†]
<i>Enterovibrio coralii</i> ^{†‡}	CECT 7249 [†]
<i>Enterovibrio nigricans</i> ^{†‡}	CECT 7320 [†]
<i>Enterovibrio norvegicus</i> ^{†‡}	CECT 7288 [†]
<i>Grimontia hollisae</i> ^{†‡}	CECT 5069 [†]
<i>Halaea mediterranea</i> [‡]	CECT 7447 [†]
<i>Halomonas marroquensis</i> [‡]	CECT 7698 [†]
<i>Marinomonas alcarazii</i> [‡]	CECT 7730 [†]
<i>Marinomonas aquaplantarum</i> [‡]	CECT 7731 [†]
<i>Marinomonas foliarum</i> [‡]	CECT 7732 [†]
<i>Marinomonas mediterranea</i> ^{†‡}	CECT 4803 [†]
<i>Photobacterium angustum</i> ^{†‡}	CECT 5690 [†]
<i>Photobacterium aphoticum</i> ^{†‡}	CECT 7614 [†]
<i>Photobacterium damsela</i> ^{†‡}	CECT 626 [†]
<i>Photobacterium ganghwense</i> ^{†‡}	CECT 7641 [†]
<i>Photobacterium halotolerans</i> ^{†‡}	CECT 5860 [†]
<i>Photobacterium leiognathi</i> ^{†‡}	CECT 4191 [†]
<i>Photobacterium lutimaris</i> ^{†‡}	CECT 7642 [†]
<i>Photobacterium phosphoreum</i> [‡]	CECT 4192 [†]
<i>Photobacterium rosenbergii</i> ^{†‡}	CECT 7644 [†]
<i>Photobacterium</i> sp. ^{†‡}	CECT 7580
<i>Photobacterium swingsii</i> ^{†‡}	CECT 7576 [†]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^{†‡}	CECT 110 [†]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [‡]	CECT 4407
<i>Pseudomonas agarici</i> ^{†‡}	CECT 4467 [†]
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> [‡]	CECT 929 [†]
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> [‡]	CECT 7784 [†]
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i> [‡]	CECT 899 [†]
<i>Pseudomonas argentinensis</i> ^{†‡}	CECT 7010 [†]
<i>Pseudomonas asplenii</i> ^{†‡}	CECT 4468 [†]
<i>Pseudomonas caeni</i> [‡]	CECT 7778 [†]

Especie	Cepa
<i>Pseudomonas baetica</i> [†]	CECT 7720 [†]
<i>Pseudomonas baetica</i> [†]	CECT 7721
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> ^{†‡}	CECT 4470 [†]
<i>Pseudomonas cichorii</i> ^{†‡}	CECT 4471 [†]
<i>Pseudomonas corrugata</i> ^{†‡}	CECT 124 [†]
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ^{†‡}	CECT 378 [†]
<i>Pseudomonas fragi</i> ^{†‡}	CECT 446 [†]
<i>Pseudomonas guineae</i> [†]	CECT 7231 [†]
<i>Pseudomonas halophila</i> [†]	CECT 5286 [†]
<i>Pseudomonas litoralis</i> ^{†‡}	CECT 7670 [†]
<i>Pseudomonas litoralis</i> ^{†‡}	CECT 7669
<i>Pseudomonas lutea</i> ^{†‡}	CECT 5822 [†]
<i>Pseudomonas marginalis</i> ^{†‡}	CECT 229 [†]
<i>Pseudomonas mendocina</i> ^{†‡}	CECT 320 [†]
<i>Pseudomonas oleovorans</i> ^{†‡}	CECT 4079 [†]
<i>Pseudomonas pelagia</i> ^{†‡}	CECT 7689 [†]
<i>Pseudomonas pertucinogena</i> ^{†‡}	CECT 7776 [†]
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> ^{†‡}	CECT 318 [†]
<i>Pseudomonas putida</i> ^{†‡}	CECT 324 [†]
<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> ^{†‡}	CECT 5726 [†]
<i>Pseudomonas sabulinigri</i> ^{†‡}	CECT 7679 [†]
<i>Pseudomonas simiae</i> [†]	CECT 7078 [†]
<i>Pseudomonas stutzeri</i> ^{†‡}	CECT 930 [†]
<i>Pseudomonas syringae</i> ^{†‡}	CECT 4429 [†]
<i>Pseudomonas tolaasii</i> ^{†‡}	CECT 4472 [†]
<i>Pseudomonas viridiflava</i> ^{†‡}	CECT 458 [†]
<i>Salinivibrio costicola</i> [†]	CECT 4059 [†]
<i>Serratia marcescens</i> [†]	CECT 846 [†]
<i>Shewanella</i> sp. ^{†‡}	CECT 5130
<i>Shigella dysenteriae</i> [†]	CECT 584 [†]
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ^{†‡}	CECT 115 [†]
<i>Vibrio aerogenes</i> ^{†‡}	CECT 7868 [†]
<i>Vibrio aestivus</i> ^{†‡}	CECT 7558 [†]
<i>Vibrio aestivus</i> ^{†‡}	CECT 7559
<i>Vibrio agarivorans</i> ^{†‡}	CECT 5085 [†]
<i>Vibrio alginolyticus</i> ^{†‡}	CECT 521 [†]
<i>Vibrio anguillarum</i> ^{†‡}	CECT 522 [†]
<i>Vibrio artabrorum</i> ^{†‡}	CECT 7226 [†]
<i>Vibrio atlanticus</i> ^{†‡}	CECT 7223 [†]
<i>Vibrio breoganii</i> ^{†‡}	CECT 7222 [†]
<i>Vibrio campbellii</i> ^{†‡}	CECT 523 [†]

Especie	Cepa
<i>Vibrio celticus</i> ^{†‡}	CECT 7224 [†]
<i>Vibrio cholerae</i> ^{†‡}	CECT 514 [†]
<i>Vibrio cincinnatiensis</i> ^{†‡}	CECT 4216 [†]
<i>Vibrio diazotrophicus</i> ^{†‡}	CECT 627 [†]
<i>Vibrio fluvialis</i> ^{†‡}	CECT 4217 [†]
<i>Vibrio furnissii</i> ^{†‡}	CECT 4203 [†]
<i>Vibrio gallaecicus</i> ^{†‡}	CECT 7244 [†]
<i>Vibrio gazogenes</i> ^{†‡}	CECT 5068 [†]
<i>Vibrio harveyi</i> ^{†‡}	CECT 525 [†]
<i>Vibrio ichthyoenteri</i> ^{†‡}	CECT 5675 [†]
<i>Vibrio inhibens</i> ^{†‡}	CECT 7692 [†]
<i>Vibrio lentus</i> ^{†‡}	CECT 5110 [†]
<i>Vibrio mangrovi</i> ^{†‡}	CECT 7927 [†]
<i>Vibrio marisflavi</i> ^{†‡}	CECT 7928 [†]
<i>Vibrio mediterranei</i> ^{†‡}	CECT 621 [†]
<i>Vibrio mediterranei</i> ^{†‡}	CECT 623
<i>Vibrio mediterranei</i> [†]	CECT 7870
<i>Vibrio mimicus</i> ^{†‡}	CECT 4218 [†]
<i>Vibrio mytili</i> ^{†‡}	CECT 632 [†]
<i>Vibrio natriegens</i> ^{†‡}	CECT 526 [†]
<i>Vibrio nereis</i> ^{†‡}	CECT 595 [†]
<i>Vibrio nigripulchritudo</i> ^{†‡}	CECT 628 [†]
<i>Vibrio ordalii</i> ^{†‡}	CECT 582 [†]
<i>Vibrio orientalis</i> ^{†‡}	CECT 629 [†]
<i>Vibrio ostreicida</i> ^{†‡}	CECT 7398
<i>Vibrio ostreicida</i> ^{†‡}	CECT 7399
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ^{†‡}	CECT 511 [†]
<i>Vibrio pelagius</i> ^{†‡}	CECT 4202 [†]
<i>Vibrio ponticus</i> ^{†‡}	CECT 5869 [†]
<i>Vibrio quintilis</i> ^{†‡}	CECT 7734 [†]
<i>Vibrio rhizosphaerae</i> ^{†‡}	CECT 7877 [†]
<i>Vibrio ruber</i> ^{†‡}	CECT 7878 [†]
<i>Vibrio scophthalmi</i> ^{†‡}	CECT 4638 [†]
<i>Vibrio sinaloensis</i> ^{†‡}	CECT 7298 [†]
<i>Vibrio splendidus</i> ^{†‡}	CECT 528 [†]
<i>Vibrio stylophorae</i> ^{†‡}	CECT 7929 [†]
<i>Vibrio tapetis</i> ^{†‡}	CECT 4600 [†]
<i>Vibrio tubiashii</i> ^{†‡}	CECT 4196 [†]
<i>Vibrio vulnificus</i> ^{†‡}	CECT 529 [†]
<i>Vibrio vulnificus</i> ^{†‡}	CECT 4608
<i>Vibrio vulnificus</i> ^{†‡}	CECT 5763

Especie	Cepa
<i>Filo Bacteroidetes</i>	
<i>Cyclobacterium</i> sp. [†]	CECT 7706
<i>Cyclobacterium</i> sp. [†]	CECT 7709
<i>Cytophaga fermentans</i> ^{†‡}	CECT 7602 [†]
<i>Euzebyella saccharophila</i> [†]	CECT 7477 [†]
<i>Marinifilum flexuosus</i> ^{†‡}	CECT 7448 [†]
<i>Marinifilum fragile</i> ^{†‡}	CECT 7942 [†]
<i>Mesonia algae</i> ^{†‡}	CECT 7520 [†]
<i>Pontibacter</i> sp. [†]	CECT 7705
<i>Pontibacter</i> sp. [‡]	CECT 7711
<i>Pontibacter</i> sp. ^{†‡}	CECT 7713
<i>Winogradskyella arenosi</i> ^{†‡}	CECT 7958 [†]
<i>Winogradskyella echinorum</i> ^{†‡}	CECT 7944 [†]
<i>Winogradskyella epiphytica</i> ^{†‡}	CECT 7945 [†]
<i>Winogradskyella eximia</i> ^{†‡}	CECT 7946 [†]
<i>Winogradskyella lutea</i> ^{†‡}	CECT 7947 [†]
<i>Winogradskyella pacifica</i> ^{†‡}	CECT 7948 [†]
<i>Winogradskyella rapida</i> ^{†‡}	CECT 7392 [†]
<i>Winogradskyella</i> sp. ^{†‡}	CECT 7476
<i>Winogradskyella thalassocola</i> ^{†‡}	CECT 7943 [†]

2. MALDI-TOF MS

La preparación de la muestra para el análisis de proteínas por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) se realizó en la CECT siguiendo el protocolo de extracción etanol/ácido fórmico recomendado por Bruker Daltonics (<http://www.bdal.de>), donde aproximadamente entre 5 y 10 mg de biomasa de cada cepa se resuspendió en 300 µl de agua y se mezcló con 900 µl de etanol absoluto. La mezcla se centrifugó a máxima velocidad durante 2 minutos y se eliminó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 50 µl de ácido fórmico al 70%. La suspensión se mezcló cuidadosamente con acetonitrilo y se centrifugó de nuevo a máxima velocidad durante 2 minutos. Inmediatamente después de la centrifugación, se extrajo el sobrenadante, se depositó en la placa de acero inoxidable en alícuotas de 1 µl y tras su secado se depositó 2 µl de matriz (solución saturada

de ácido α -HCCA (α -ciano-4-hidroxicinámico) en una solución de 50% Acetonitrilo/2,5% trifluoracético).

MALDI-TOF MS se llevó a cabo usando un espectrómetro de masas Reflex IV (Bruker Daltonics) equipado con un láser de N₂. Todos los espectros fueron obtenidos en modo ion lineal positivo. El voltaje de aceleración fue 20 kV. Los espectros se obtuvieron como la suma de 240 disparos por diana, haciendo dos adquisiciones por spot y preparando ocho spots por cada cepa. El rango de masa utilizado para el análisis fue de 2.000-20.000 Da.

Como calibrante se utilizó la cepa *E. coli* CECT 7619 (=DSM 498 =ATCC 23716 =IMG 1711; K-12 wildtype) cuyas proteínas ribosomales se muestran en la tabla 3.

La sustracción de la línea base, el arreglo (*smoothing*) del espectro y el etiquetado de la masa de los picos se realizó mediante el programa Flexanálisis (Bruker) por la Unidad de Proteómica del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE). Los espectros con una intensidad máxima de 2.000 o menos fueron eliminados.

Proteína ribosomal	m/z (Da)
RL36	4364,33
RS32	5095,82
RS34	5380,39
RS33m	6254,39
RL32	6315,19
RL30	6410,60
RL35	7157,74
RL29	7273,45
RS21	8368,76
RS15	10137,57
RS19	10299,09

Tabla 3: Proteínas ribosomales de la cepa *E. coli* CECT 7619 (=DSM 498 =ATCC 23716 =IMG 1711; K-12 wildtype) utilizadas como calibrante.

Para el análisis de los datos se utilizaron además de los espectros adquiridos en la CECT, espectros de cepas de referencia de la DSMZ adquiridos en la DSMZ, espectros de cepas de referencia de

la CIP adquiridos en la CIP y en la DSMZ, y espectros de cepas de referencia de la LMG adquiridos en la DSMZ, obtenidos gracias al proyecto EMbaRC (tabla 4).

Los espectros se obtuvieron mediante un espectrómetro de masas Microflex L20 (Bruker Daltonics) en el caso de la DSMZ y un Autoflex speed (Bruker Daltonics) en el caso de la CIP. La preparación de la muestra y el método de adquisición de los espectros se realizó de la misma forma que en la CECT, excepto la suma de disparos por diana que en el caso de la DSMZ y CIP se realizaron 250.

Tabla 4. Cepas de referencia de la DSMZ, CIP y LMG cuyos espectros fueron utilizados para el análisis de datos de MALDI-TOF MS.

Especie	Cepa
<i>Filo Firmicutes</i>	
<i>Carnobacterium alterfunditum</i>	DSM 5972 ^T
<i>Carnobacterium alterfunditum</i>	DSM 5973
<i>Carnobacterium divergens</i>	DSM 20623 ^T
<i>Carnobacterium divergens</i>	DSM 20589
<i>Carnobacterium divergens</i>	DSM 20625
<i>Carnobacterium funditum</i>	DSM 5970
<i>Carnobacterium funditum</i>	DSM 5971
<i>Carnobacterium gallinarum</i>	DSM 4847
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	DSM 20342
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	DSM 20344
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	DSM 20590
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	DSM 20624
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	DSM 20722
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	DSM 20730
<i>Carnobacterium mobile</i>	DSM 4848 ^T
<i>Carnobacterium mobile</i>	DSM 4849
<i>Carnobacterium pleistocenium</i>	DSM 17715 ^T
<i>Carnobacterium viridans</i>	DSM 14451 ^T
<i>Fructobacillus durionis</i>	CIP 108761 ^T
<i>Fructobacillus durionis</i>	DSM 19113 ^T
<i>Fructobacillus ficulneus</i>	CIP 107593 ^T
<i>Fructobacillus ficulneus</i>	DSM 13613 ^T
<i>Fructobacillus fructosus</i>	DSM 20349 ^T
<i>Fructobacillus pseudoficulneus</i>	CIP 109309 ^T
<i>Fructobacillus pseudoficulneus</i>	DSM 15468 ^T
<i>Lactobacillus acetotolerans</i>	CIP 103180 ^T

Especie	Cepa
<i>Lactobacillus acetotolerans</i>	DSM 20749 ^T
<i>Lactobacillus acetotolerans</i>	LMG 10751 ^T
<i>Lactobacillus acidifarinae</i>	CIP 108702 ^T
<i>Lactobacillus acidifarinae</i>	DSM 19394 ^T
<i>Lactobacillus acidifarinae</i>	LMG 22200 ^T
<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	DSM 15353
<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	DSM 15836 ^T
<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	LMG 19820 ^T
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CIP 76.13 ^T
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CIP 103595
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CIP 103597
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	DSM 20079 ^T
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	DSM 20242
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	DSM 9126
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LMG 9433 ^T
<i>Lactobacillus agilis</i>	CIP 101264 ^T
<i>Lactobacillus agilis</i>	DSM 20509 ^T
<i>Lactobacillus agilis</i>	LMG 9186 ^T
<i>Lactobacillus algidus</i>	DSM 15638 ^T
<i>Lactobacillus algidus</i>	LMG 19872 ^T
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	DSM 20181
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	DSM 20249 ^T
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	LMG 9187 ^T
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	CIP 102986 ^T
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	CIP 105163
<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	DSM 11664 ^T
<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	LMG 18796 ^T
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	CIP 102988 ^T
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	DSM 20533 ^T
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	LMG 6900 ^T
<i>Lactobacillus amylotrophicus</i>	DSM 20534
<i>Lactobacillus amylotrophicus</i>	LMG 11400 ^T
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	CIP 109151
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	DSM 16698
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	DSM 20531 ^T
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	LMG 9496 ^T
<i>Lactobacillus animalis</i>	CIP 103152 ^T
<i>Lactobacillus animalis</i>	DSM 20602 ^T
<i>Lactobacillus animalis</i>	LMG 9843 ^T
<i>Lactobacillus apodemi</i>	CIP 108913 ^T
<i>Lactobacillus apodemi</i>	DSM 16634 ^T

Especie	Cepa
<i>Lactobacillus aquaticus</i>	DSM 21051 ^T
<i>Lactobacillus aviarius</i>	CIP 103144 ^T
<i>Lactobacillus aviarius</i>	DSM 20655 ^T
<i>Lactobacillus aviarius</i>	LMG 10753 ^T
<i>Lactobacillus aviarius</i> subsp. <i>araffinosus</i>	CIP 103145 ^T
<i>Lactobacillus aviarius</i> subsp. <i>araffinosus</i>	DSM 20653 ^T
<i>Lactobacillus aviarius</i> subsp. <i>araffinosus</i>	LMG 23560 ^T
<i>Lactobacillus bifermentans</i>	DSM 20003 ^T
<i>Lactobacillus bifermentans</i>	LMG 9845 ^T
<i>Lactobacillus bobalius</i>	CIP 109926 ^T
<i>Lactobacillus bobalius</i>	DSM 19674 ^T
<i>Lactobacillus brevis</i>	CIP 102806 ^T
<i>Lactobacillus brevis</i>	CIP 103474
<i>Lactobacillus brevis</i>	CIP 105137
<i>Lactobacillus brevis</i>	DSM 1267
<i>Lactobacillus brevis</i>	DSM 1268
<i>Lactobacillus brevis</i>	DSM 20054 ^T
<i>Lactobacillus brevis</i>	DSM 6235
<i>Lactobacillus brevis</i>	LMG 6906 ^T
<i>Lactobacillus buchneri</i>	CIP 103023 ^T
<i>Lactobacillus buchneri</i>	DSM 20057 ^T
<i>Lactobacillus buchneri</i>	DSM 5987
<i>Lactobacillus buchneri</i>	LMG 6892 ^T
<i>Lactobacillus cacaonum</i>	DSM 21116 ^T
<i>Lactobacillus cacaonum</i>	LMG 24285 ^T
<i>Lactobacillus camelliae</i>	CIP 109883 ^T
<i>Lactobacillus camelliae</i>	DSM 22697 ^T
<i>Lactobacillus capillatus</i>	DSM 19910
<i>Lactobacillus casei</i>	CIP 103137 ^T
<i>Lactobacillus casei</i>	DSM 20011 ^T
<i>Lactobacillus casei</i>	LMG 6904 ^T
<i>Lactobacillus catenaformis</i>	CIP 104817 ^T
<i>Lactobacillus catenaformis</i>	DSM 20559 ^T
<i>Lactobacillus catenaformis</i>	LMG 23559 ^T
<i>Lactobacillus ceti</i>	CIP 109847 ^T
<i>Lactobacillus ceti</i>	DSM 22408 ^T
<i>Lactobacillus coleohominis</i>	CIP 106820 ^T
<i>Lactobacillus coleohominis</i>	DSM 22408 ^T
<i>Lactobacillus coleohominis</i>	LMG 21591 ^T
<i>Lactobacillus collinoides</i>	CIP 103008 ^T
<i>Lactobacillus collinoides</i>	DSM 20515 ^T

Especie	Cepa
<i>Lactobacillus collinoides</i>	LMG 9194 [†]
<i>Lactobacillus concavus</i>	DSM 17758 [†]
<i>Lactobacillus concavus</i>	LMG 22739 [†]
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	CIP 103133 [†]
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	DSM 20001 [†]
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	LMG 9196 [†]
<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i>	CIP 103134 [†]
<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i>	DSM 20004 [†]
<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i>	LMG 9197 [†]
<i>Lactobacillus crispatus</i>	CIP 102990 [†]
<i>Lactobacillus crispatus</i>	DSM 20584 [†]
<i>Lactobacillus crispatus</i>	LMG 9479 [†]
<i>Lactobacillus curvatus</i>	CIP 102992 [†]
<i>Lactobacillus curvatus</i>	DSM 20019 [†]
<i>Lactobacillus curvatus</i>	LMG 9198 [†]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	CIP 57.8 [†]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	DSM 20074 [†]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	LMG 6412 [†]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	CIP 101027 [†]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	DSM 20081 [†]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	DSM 20080
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	LMG 6901 [†]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	CIP 101028 [†]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	CIP 53.61
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	CIP 54.4
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	DSM 20072 [†]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	DSM 20355
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	LMG 7942 [†]
<i>Lactobacillus dextrinicus</i>	CIP 103407 [†]
<i>Lactobacillus dextrinicus</i>	DSM 20335 [†]
<i>Lactobacillus dextrinicus</i>	LMG 11485 [†]
<i>Lactobacillus diolivorans</i>	CIP 107499 [†]
<i>Lactobacillus diolivorans</i>	DSM 14421 [†]
<i>Lactobacillus diolivorans</i>	LMG 19667 [†]
<i>Lactobacillus equi</i>	DSM 15833 [†]
<i>Lactobacillus equi</i>	LMG 21748 [†]
<i>Lactobacillus equicursoris</i>	DSM 19284 [†]
<i>Lactobacillus equigenerosi</i>	CIP 109834 [†]
<i>Lactobacillus equigenerosi</i>	DSM 18793 [†]
<i>Lactobacillus fabifermentans</i>	DSM 21115 [†]
<i>Lactobacillus fabifermentans</i>	LMG 24284 [†]

Espece	Cepa
<i>Lactobacillus farciminis</i>	DSM 20184 ^T
<i>Lactobacillus farciminis</i>	LMG 9200 ^T
<i>Lactobacillus farciminis</i>	CIP 103136 ^T
<i>Lactobacillus farraginis</i>	CIP 109567 ^T
<i>Lactobacillus farraginis</i>	DSM 18382 ^T
<i>Lactobacillus farraginis</i>	LMG 24140 ^T
<i>Lactobacillus fermentum</i>	CIP 102980 ^T
<i>Lactobacillus fermentum</i>	CIP 53.163
<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSM 20052
<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSM 20055
<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSM 20391
<i>Lactobacillus fermentum</i>	LMG 6902 ^T
<i>Lactobacillus fermentum</i>	CIP 102981
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	CIP 103042 ^T
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	DSM 20203 ^T
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	LMG 9201 ^T
<i>Lactobacillus frumenti</i>	CIP 106922 ^T
<i>Lactobacillus frumenti</i>	DSM 13145 ^T
<i>Lactobacillus frumenti</i>	LMG 19473 ^T
<i>Lactobacillus fucheunsis</i>	DSM 14340 ^T
<i>Lactobacillus fucheunsis</i>	DSM 14341
<i>Lactobacillus fucheunsis</i>	DSM 14342
<i>Lactobacillus fucheunsis</i>	LMG 21669 ^T
<i>Lactobacillus gallinarum</i>	CIP 103611 ^T
<i>Lactobacillus gallinarum</i>	DSM 10532 ^T
<i>Lactobacillus gallinarum</i>	LMG 9435 ^T
<i>Lactobacillus gasseri</i>	CIP 102991 ^T
<i>Lactobacillus gasseri</i>	CIP 103699
<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSM 20077
<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSM 20243 ^T
<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSM 20243 ^T
<i>Lactobacillus gasseri</i>	LMG 9203 ^T
<i>Lactobacillus ghanensis</i>	CIP 109616 ^T
<i>Lactobacillus ghanensis</i>	DSM 18630 ^T
<i>Lactobacillus graminis</i>	CIP 105164 ^T
<i>Lactobacillus graminis</i>	DSM 20719 ^T
<i>Lactobacillus graminis</i>	DSM 20720
<i>Lactobacillus graminis</i>	DSM 20721
<i>Lactobacillus graminis</i>	LMG 9825 ^T
<i>Lactobacillus hammesii</i>	DSM 16381 ^T
<i>Lactobacillus hammesii</i>	DSM 16382

Espece	Cepa
<i>Lactobacillus hammesii</i>	LMG 23074 ¹
<i>Lactobacillus hamsteri</i>	DSM 05661 ¹
<i>Lactobacillus hamsteri</i>	LMG 10754 ¹
<i>Lactobacillus harbinensis</i>	DSM 16991
<i>Lactobacillus harbinensis</i>	LMG 24040 ¹
<i>Lactobacillus hayakitensis</i>	CIP 109885 ¹
<i>Lactobacillus hayakitensis</i>	DSM 18933 ¹
<i>Lactobacillus hayakitensis</i>	LMG 24490 ¹
<i>Lactobacillus helveticus</i>	CIP 103146 ¹
<i>Lactobacillus helveticus</i>	CIP 104343
<i>Lactobacillus helveticus</i>	DSM 20075 ¹
<i>Lactobacillus helveticus</i>	LMG 6413 ¹
<i>Lactobacillus helveticus</i>	CIP 76.19
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	CIP 103007 ¹
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	DSM 20176 ¹
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	LMG 6895 ¹
<i>Lactobacillus homohiochii</i>	CIP 103141 ¹
<i>Lactobacillus homohiochii</i>	DSM 20351
<i>Lactobacillus homohiochii</i>	DSM 20571 ¹
<i>Lactobacillus hordei</i>	CIP 109892 ¹
<i>Lactobacillus hordei</i>	DSM 19519 ¹
<i>Lactobacillus hordei</i>	LMG 24241 ¹
<i>Lactobacillus iatae</i>	DSM 21414
<i>Lactobacillus iners</i>	CIP 105923 ¹
<i>Lactobacillus iners</i>	DSM 13335 ¹
<i>Lactobacillus iners</i>	LMG 18914 ¹
<i>Lactobacillus ingluviei</i>	DSM 15946 ¹
<i>Lactobacillus ingluviei</i>	LMG 20380 ¹
<i>Lactobacillus intestinalis</i>	CIP 104793
<i>Lactobacillus intestinalis</i>	DSM 6629
<i>Lactobacillus intestinalis</i>	LMG 14196
<i>Lactobacillus jensenii</i>	CIP 69.17 ¹
<i>Lactobacillus jensenii</i>	DSM 20557 ¹
<i>Lactobacillus jensenii</i>	LMG 6414 ¹
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	CIP 103620 ¹
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	DSM 10533 ¹
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	LMG 9436 ¹
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	CIP 103653
<i>Lactobacillus kalixensis</i>	CIP 109909 ¹
<i>Lactobacillus kalixensis</i>	DSM 16043 ¹
<i>Lactobacillus kalixensis</i>	LMG 22115 ¹

Especie	Cepa
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	CIP 103307 ^T
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	DSM 05016 ^T
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	LMG 19149 ^T
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i>	CIP 104241 ^T
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i>	LMG 15132 ^T
<i>Lactobacillus kefiri</i>	DSM 20485
<i>Lactobacillus kefiri</i>	DSM 20587 ^T
<i>Lactobacillus kefiri</i>	DSM 20588
<i>Lactobacillus kefiri</i>	LMG 9480 ^T
<i>Lactobacillus kimchii</i>	CIP 107019 ^T
<i>Lactobacillus kimchii</i>	DSM 13961
<i>Lactobacillus kimchii</i>	LMG 19822 ^T
<i>Lactobacillus kisonensis</i>	DSM 19906
<i>Lactobacillus kitasatonis</i>	DSM 16761 ^T
<i>Lactobacillus kitasatonis</i>	LMG 23133 ^T
<i>Lactobacillus kunkeei</i>	DSM 12361 ^T
<i>Lactobacillus kunkeei</i>	LMG 18925 ^T
<i>Lactobacillus lindneri</i>	CIP 102983 ^T
<i>Lactobacillus lindneri</i>	DSM 20690 ^T
<i>Lactobacillus lindneri</i>	LMG 14528 ^T
<i>Lactobacillus malefermentans</i>	CIP 103367 ^T
<i>Lactobacillus malefermentans</i>	DSM 05705 ^T
<i>Lactobacillus malefermentans</i>	DSM 20177
<i>Lactobacillus malefermentans</i>	LMG 11455 ^T
<i>Lactobacillus mali</i>	DSM 20483 ^T
<i>Lactobacillus mali</i>	CIP 103143 ^T
<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	CIP 105851 ^T
<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	DSM 13343 ^T
<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	LMG 18010 ^T
<i>Lactobacillus mindensis</i>	DSM 14500 ^T
<i>Lactobacillus mindensis</i>	LMG 21932 ^T
<i>Lactobacillus mucosae</i>	CIP 106485 ^T
<i>Lactobacillus mucosae</i>	DSM 13345 ^T
<i>Lactobacillus mucosae</i>	DSM 13346
<i>Lactobacillus mucosae</i>	LMG 19534 ^T
<i>Lactobacillus murinus</i>	CIP 104818 ^T
<i>Lactobacillus murinus</i>	DSM 20452 ^T
<i>Lactobacillus murinus</i>	LMG 14189 ^T
<i>Lactobacillus nagelii</i>	CIP 107647 ^T
<i>Lactobacillus nagelii</i>	DSM 13675 ^T
<i>Lactobacillus nagelii</i>	LMG 21593 ^T

Espece	Cepa
<i>Lactobacillus namurensis</i>	CIP 109498 ^T
<i>Lactobacillus namurensis</i>	DSM 19117 ^T
<i>Lactobacillus namurensis</i>	LMG 23583 ^T
<i>Lactobacillus nantensis</i>	DSM 19908 ^T
<i>Lactobacillus nodensis</i>	DSM 19682
<i>Lactobacillus oeni</i>	CIP 110039 ^T
<i>Lactobacillus oeni</i>	DSM 19972 ^T
<i>Lactobacillus oligofermentans</i>	CIP 10991 ^T
<i>Lactobacillus oligofermentans</i>	DSM 15707 ^T
<i>Lactobacillus oligofermentans</i>	LMG 22743 ^T
<i>Lactobacillus oris</i>	CIP 105162 ^T
<i>Lactobacillus oris</i>	DSM 4864 ^T
<i>Lactobacillus oris</i>	LMG 9848 ^T
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	CIP 103368 ^T
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	DSM 05707 ^T
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	LMG 11457 ^T
<i>Lactobacillus paracasei</i>	DSM 20008
<i>Lactobacillus paracasei</i>	LMG 9192 ^T
<i>Lactobacillus paracasei</i>	CIP 103918 ^T
<i>Lactobacillus paracasei</i>	CIP 107868
<i>Lactobacillus paracasei</i>	DSM 20006
<i>Lactobacillus paracasei</i>	DSM 20020
<i>Lactobacillus paracasei</i>	DSM 20312
<i>Lactobacillus paracasei</i>	DSM 46331
<i>Lactobacillus paracasei</i>	DSM 4905
<i>Lactobacillus paracasei</i>	DSM 5622 ^T
<i>Lactobacillus paracasei</i>	LMG 13087 ^T
<i>Lactobacillus paracasei</i>	LMG 9438
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	CIP 102994 ^T
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	DSM 20258 ^T
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	LMG 9191 ^T
<i>Lactobacillus paracollinoides</i>	CIP 108394 ^T
<i>Lactobacillus paracollinoides</i>	DSM 15502 ^T
<i>Lactobacillus paracollinoides</i>	DSM 20197
<i>Lactobacillus paracollinoides</i>	LMG 22473 ^T
<i>Lactobacillus parafarraginis</i>	CIP 109568 ^T
<i>Lactobacillus parafarraginis</i>	DSM 18930 ^T
<i>Lactobacillus parafarraginis</i>	LMG 24141 ^T
<i>Lactobacillus parakefiri</i>	CIP 104242 ^T
<i>Lactobacillus parakefiri</i>	DSM 10551
<i>Lactobacillus parakefiri</i>	LMG 15133 ^T

Especie	Cepa
<i>Lactobacillus pentosus</i>	CIP 103156 ^T
<i>Lactobacillus pentosus</i>	DSM 20314 ^T
<i>Lactobacillus pentosus</i>	LMG 10755 ^T
<i>Lactobacillus perolens</i>	DSM 12744 ^T
<i>Lactobacillus perolens</i>	LMG 18936 ^T
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CIP 103151 ^T
<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSM 20174 ^T
<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSM 20205
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CIP 71.39
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CIP A159
<i>Lactobacillus plantarum</i>	LMG 6907 ^T
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i>	DSM 16365 ^T
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i>	LMG 9205 ^T
<i>Lactobacillus pontis</i>	DSM 08475 ^T
<i>Lactobacillus pontis</i>	LMG 14187 ^T
<i>Lactobacillus psittaci</i>	DSM 15354
<i>Lactobacillus rapi</i>	DSM 19907 ^T
<i>Lactobacillus rennini</i>	CIP 109172 ^T
<i>Lactobacillus rennini</i>	DSM 20253 ^T
<i>Lactobacillus rennini</i>	DSM 20254
<i>Lactobacillus reuteri</i>	CIP 101887 ^T
<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSM 20016 ^T
<i>Lactobacillus reuteri</i>	LMG 13557 ^T
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CIP A157 ^T
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CIP 57.6
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	DSM 20021
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	DSM 20245
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	DSM 20247
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	LMG 6400 ^T
<i>Lactobacillus rimaе</i>	DSM 15814 ^T
<i>Lactobacillus rimaе</i>	LMG 22972 ^T
<i>Lactobacillus ruminis</i>	CIP 103153 ^T
<i>Lactobacillus ruminis</i>	DSM 20403 ^T
<i>Lactobacillus ruminis</i>	LMG 10756 ^T
<i>Lactobacillus saerimneri</i>	DSM 16027
<i>Lactobacillus saerimneri</i>	DSM 16049 ^T
<i>Lactobacillus saerimneri</i>	LMG 22087 ^T
<i>Lactobacillus sakei</i>	CIP 103139 ^T
<i>Lactobacillus sakei</i>	CIP 104494
<i>Lactobacillus sakei</i>	DSM 20017 ^T
<i>Lactobacillus sakei</i>	DSM 20494

Especie	Cepa
<i>Lactobacillus sakei</i>	LMG 9468
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	CIP 105422 [†]
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	CIP 109872
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	DSM 15740
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	DSM 15831 [†]
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	LMG 17302 [†]
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	LMG 18295
<i>Lactobacillus salivarius</i>	CIP 103140 [†]
<i>Lactobacillus salivarius</i>	DSM 20554 [†]
<i>Lactobacillus salivarius</i>	LMG 9477 [†]
<i>Lactobacillus salivarius</i>	LMG 9476
<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salicinus</i>	CIP 103155 [†]
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	CIP 103252 [†]
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	CIP 102982
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	DSM 20451 [†]
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	DSM 20663
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	LMG 16002 [†]
<i>Lactobacillus secaliphilus</i>	DSM 17896 [†]
<i>Lactobacillus secaliphilus</i>	LMG 24164 [†]
<i>Lactobacillus senmaizukei</i>	CIP 109886 [†]
<i>Lactobacillus senmaizukei</i>	DSM 21775 [†]
<i>Lactobacillus sharpeae</i>	DSM 20505 [†]
<i>Lactobacillus sharpeae</i>	DSM 20504
<i>Lactobacillus sharpeae</i>	DSM 20506
<i>Lactobacillus sharpeae</i>	LMG 9214 [†]
<i>Lactobacillus siliginis</i>	DSM 22696 [†]
<i>Lactobacillus</i> sp.	CIP 102987
<i>Lactobacillus</i> sp.	DSM 20182
<i>Lactobacillus</i> sp.	DSM 6265
<i>Lactobacillus</i> sp.	LMG 14527
<i>Lactobacillus spicheri</i>	DSM 15429 [†]
<i>Lactobacillus spicheri</i>	LMG 21871 [†]
<i>Lactobacillus suebicus</i>	CIP 103411 [†]
<i>Lactobacillus suebicus</i>	DSM 05007 [†]
<i>Lactobacillus suebicus</i>	LMG 11408 [†]
<i>Lactobacillus taiwanensis</i>	DSM 21401 [†]
<i>Lactobacillus thailandensis</i>	DSM 22698 [†]
<i>Lactobacillus thermotolerans</i>	DSM 14792 [†]
<i>Lactobacillus thermotolerans</i>	LMG 22056 [†]
<i>Lactobacillus tuceti</i>	DSM 20183 [†]
<i>Lactobacillus tuceti</i>	CIP 110049 [†]

Especie	Cepa
<i>Lactobacillus ultunensis</i>	DSM 16047
<i>Lactobacillus ultunensis</i>	LMG 22117 ^T
<i>Lactobacillus uvarum</i>	CIP 109959 ^T
<i>Lactobacillus uvarum</i>	DSM 19971 ^T
<i>Lactobacillus vaccinoferus</i>	CIP 102807 ^T
<i>Lactobacillus vaccinoferus</i>	DSM 20634 ^T
<i>Lactobacillus vaccinoferus</i>	LMG 9215 ^T
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	CIP 105932 ^T
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	DSM 05837 ^T
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	LMG 12891 ^T
<i>Lactobacillus versmoldensis</i>	CIP 107931 ^T
<i>Lactobacillus versmoldensis</i>	DSM 14857 ^T
<i>Lactobacillus versmoldensis</i>	LMG 21929 ^T
<i>Lactobacillus vini</i>	CIP 109261 ^T
<i>Lactobacillus vini</i>	DSM 20605 ^T
<i>Lactobacillus vini</i>	LMG 23202 ^T
<i>Lactobacillus vitulinus</i>	DSM 20405 ^T
<i>Lactobacillus zeae</i>	DSM 20178 ^T
<i>Lactobacillus zeae</i>	LMG 17315 ^T
<i>Lactobacillus zymae</i>	CIP 108703 ^T
<i>Lactobacillus zymae</i>	DSM 19395 ^T
<i>Lactobacillus zymae</i>	LMG 22198 ^T
<i>Lactococcus garvieae</i>	DSM 20064
<i>Lactococcus garvieae</i>	DSM 20684 ^T
<i>Lactococcus garvieae</i>	DSM 20685
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 20250
<i>Leuconostoc carnosum</i>	CIP 103319 ^T
<i>Leuconostoc carnosum</i>	DSM 5576 ^T
<i>Leuconostoc citreum</i>	CIP 103405
<i>Leuconostoc citreum</i>	DSM 20188
<i>Leuconostoc citreum</i>	DSM 5577 ^T
<i>Leuconostoc fallax</i>	CIP 104855 ^T
<i>Leuconostoc fallax</i>	DSM 10614
<i>Leuconostoc fallax</i>	DSM 10615
<i>Leuconostoc fallax</i>	DSM 20189 ^T
<i>Leuconostoc fructosus</i>	CIP 102985
<i>Leuconostoc gasicomitatum</i>	DSM 15947 ^T
<i>Leuconostoc gelidum</i>	CIP 103318 ^T
<i>Leuconostoc gelidum</i>	DSM 5578 ^T
<i>Leuconostoc holzapfelii</i>	DSM 21478 ^T
<i>Leuconostoc inhae</i>	CIP 108081 ^T

Especie	Cepa
<i>Leuconostoc inhae</i>	DSM 15101 [†]
<i>Leuconostoc lactis</i>	CIP 102422 [†]
<i>Leuconostoc lactis</i>	CIP 103889
<i>Leuconostoc lactis</i>	DSM 20202 [†]
<i>Leuconostoc lactis</i>	DSM 20192
<i>Leuconostoc lactis</i>	DSM 8581
<i>Leuconostoc lactis</i>	DSM 8582
<i>Leuconostoc lactis</i>	DSM 8583
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	CIP 102305 [†]
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	CIP 78.59
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	DSM 20240
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	DSM 20241
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	DSM 20343 [†]
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	CIP 103009 [†]
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	DSM 20200
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	DSM 20346 [†]
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	CIP 102423 [†]
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	DSM 20187
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	DSM 20484 [†]
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	DSM 46216
<i>Leuconostoc palmae</i>	DSM 21144 [†]
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	CIP 103316 [†]
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	CIP 103325
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	CIP 110051
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	DSM 20193 [†]
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	DSM 5624
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	DSM 5625
<i>Oenococcus kitaharae</i>	CIP 109430 [†]
<i>Oenococcus kitaharae</i>	DSM 17330 [†]
<i>Oenococcus oeni</i>	CIP 106144 [†]
<i>Oenococcus oeni</i>	DSM 10519
<i>Oenococcus oeni</i>	DSM 20252 [†]
<i>Oenococcus oeni</i>	DSM 20255
<i>Oenococcus oeni</i>	DSM 20257
<i>Pediococcus claussenii</i>	DSM 14800 [†]
<i>Pediococcus damnosus</i>	DSM 20291
<i>Pediococcus inopinatus</i>	DSM 20285
<i>Pediococcus inopinatus</i>	DSM 20287
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	DSM 20280
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	DSM 20281
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	DSM 46292

Especie	Cepa
<i>Pediococcus soyae</i>	DSM 20337
<i>Pediococcus soyae</i>	DSM 20338
<i>Pediococcus</i> sp.	DSM 1056
<i>Pediococcus stilesii</i>	DSM 18001 ^T
<i>Weissella cibaria</i>	CIP 107376 ^T
<i>Weissella cibaria</i>	CIP 108011
<i>Weissella cibaria</i>	DSM 15878 ^T
<i>Weissella cibaria</i>	DSM 14295
<i>Weissella confusa</i>	CIP 103172 ^T
<i>Weissella confusa</i>	DSM 20196 ^T
<i>Weissella ghanensis</i>	DSM 19935 ^T
<i>Weissella halotolerans</i>	CIP 103005 ^T
<i>Weissella halotolerans</i>	DSM 20190 ^T
<i>Weissella hellenica</i>	DSM 7378 ^T
<i>Weissella kandleri</i>	CIP 102809 ^T
<i>Weissella kandleri</i>	DSM 20593 ^T
<i>Weissella koreensis</i>	DSM 15830 ^T
<i>Weissella minor</i>	CIP 102978 ^T
<i>Weissella minor</i>	DSM 20014 ^T
<i>Weissella paramesenteroides</i>	DSM 20288 ^T
<i>Weissella paramesenteroides</i>	DSM 5623
<i>Weissella paramesenteroides</i>	CIP 102421 ^T
<i>Weissella soli</i>	DSM 14420 ^T
<i>Weissella thailandensis</i>	DSM 15832 ^T
<i>Weissella thailandensis</i>	CIP 106751 ^T
<i>Weissella viridescens</i>	CIP 102810 ^T
<i>Weissella viridescens</i>	DSM 20410 ^T
<i>Weissella viridescens</i>	DSM 20248
Clase Alphaproteobacteria	
<i>Acetobacter aceti</i>	DSM 2002
<i>Acetobacter cerevisiae</i>	DSM 14362 ^T
<i>Acetobacter cibirongensis</i>	DSM 15549 ^T
<i>Acetobacter estunensis</i>	DSM 04493 ^T
<i>Acetobacter indonesiensis</i>	DSM 15552 ^T
<i>Acetobacter lovaniensis</i>	DSM 04491 ^T
<i>Acetobacter malorum</i>	DSM 14337 ^T
<i>Acetobacter oeni</i>	DSM 23926 ^T
<i>Acetobacter orientalis</i>	DSM 15550 ^T
<i>Acetobacter orleanensis</i>	DSM 04492 ^T
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	DSM 3508 ^T
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	DSM 2324

Especie	Cepa
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	DSM 2347
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	DSM 46617
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	DSM 46618
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	DSM 46619
<i>Acetobacter pomorum</i>	DSM 11825 ¹
<i>Acetobacter senegalensis</i>	DSM 18889 ¹
<i>Acetobacter syzygii</i>	DSM 15548 ¹
<i>Acetobacter tropicalis</i>	DSM 15551 ¹
Clase Gammaproteobacteria	
<i>Pseudomonas abietaniphila</i>	DSM 17554 ¹
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP 100720 ¹
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP 103282
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP 103467
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP 103837
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP 104116
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP 104467
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP 105094
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP 105925
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP 59.33
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP 59.34
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP 59.35
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP 59.36
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP 59.37
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP 59.38
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP 59.39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP 59.40
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP 59.41
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP 59.43
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP 59.44
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP 60.93
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP A22
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 50071 ¹
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1117
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1253
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1299
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1707
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 3227
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 46358
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 50069
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 50073

Especie	Cepa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 939
<i>Pseudomonas agarici</i>	DSM 11810 ^T
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	DSM 50342 ^T
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	DSM 12111 ^T
<i>Pseudomonas argentinensis</i>	DSM 17259 ^T
<i>Pseudomonas asplenii</i>	DSM 17133 ^T
<i>Pseudomonas asplenii</i>	DSM 50254
<i>Pseudomonas atlantica</i>	DSM 6840
<i>Pseudomonas avellanae</i>	DSM 11809 ^T
<i>Pseudomonas borbori</i>	DSM 17834 ^T
<i>Pseudomonas boreopolis</i>	DSM 19620 ^T
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	DSM 13227 ^T
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	DSM 50083 ^T
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i>	DSM 6698 ^T
<i>Pseudomonas cichorii</i>	DSM 50259 ^T
<i>Pseudomonas congelans</i>	DSM 14939 ^T
<i>Pseudomonas corrugata</i>	DSM 7228 ^T
<i>Pseudomonas cremoricolorata</i>	DSM 17059 ^T
<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	DSM 17835 ^T
<i>Pseudomonas ficuserectae</i>	DSM 6929 ^T
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 50090 ^T
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 50108
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 50415
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 50091
<i>Pseudomonas fragi</i>	DSM 3456 ^T
<i>Pseudomonas fulva</i>	DSM 17717 ^T
<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	DSM 7231 ^T
<i>Pseudomonas graminis</i>	DSM 11363 ^T
<i>Pseudomonas halophila</i>	DSM 3050 ^T
<i>Pseudomonas lundensis</i>	DSM 6252 ^T
<i>Pseudomonas lutea</i>	DSM 17257 ^T
<i>Pseudomonas marginalis</i>	DSM 13124 ^T
<i>Pseudomonas marginalis</i>	DSM 50276
<i>Pseudomonas meliae</i>	DSM 6759 ^T
<i>Pseudomonas mendocina</i>	DSM 50017 ^T
<i>Pseudomonas mohnii</i>	DSM 18327 ^T
<i>Pseudomonas moorei</i>	DSM 12647 ^T
<i>Pseudomonas moraviensis</i>	DSM 16007 ^T
<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	DSM 17553
<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	DSM 9128
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	DSM 1045 ^T

Espece	Cepa
<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	DSM 17577 ¹
<i>Pseudomonas panipatensis</i>	DSM 21819 ¹
<i>Pseudomonas peli</i>	DSM 17833 ¹
<i>Pseudomonas pertucinogena</i>	DSM 18268 ¹
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	DSM 50188 ¹
<i>Pseudomonas psychrophila</i>	DSM 17535 ¹
<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	DSM 15758 ¹
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 291 ¹
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 12735
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 50026
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 7314
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 3263
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 3601
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 46608
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 84
<i>Pseudomonas reinekei</i>	DSM 18361
<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	DSM 16299 ¹
<i>Pseudomonas simiae</i>	DSM 18861 ¹
<i>Pseudomonas</i> sp.	DSM 1650
<i>Pseudomonas</i> sp.	DSM 50906 ¹
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	DSM 5190 ¹
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	DSM 13592
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	DSM 13627
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	DSM 50227
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	DSM 6082
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	DSM 7136
<i>Pseudomonas syringae</i>	DSM 10604 ¹
<i>Pseudomonas syringae</i>	DSM 50315
<i>Pseudomonas syringae</i>	DSM 50312
<i>Pseudomonas thermotolerans</i>	DSM 14292 ¹
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	DSM 19342 ¹
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	DSM 11124 ¹
<i>Pseudomonas vranovensis</i>	DSM 16006 ¹
<i>Pseudomonas xiamenensis</i>	DSM 22326 ¹
<i>Pseudomonas xinjiangensis</i>	DSM 23391 ¹

En la presente tesis doctoral se adquirieron un total de 12-16 espectros por muestra mediante el programa Flexanalysis (Bruker) por la Unidad de Proteómica del SCSIE, de modo que cada espectro generado se correspondía a un archivo. Estos archivos fueron

analizados en la CECT mediante el programa Biotyper 1.1 (Bruker Daltonics).

El programa Biotyper 1.1 (Bruker Daltonics) permite el análisis y visualización de los datos de diversas maneras. Permite la visualización del espectro generado tal y como lo obtiene el espectrómetro de masas (figura 9A), así como el espectro normalizado obtenido a partir del MSP (*Mainspectra*) (figura 9B). El MSP se genera a partir de los 12-16 espectros adquiridos para una cepa.

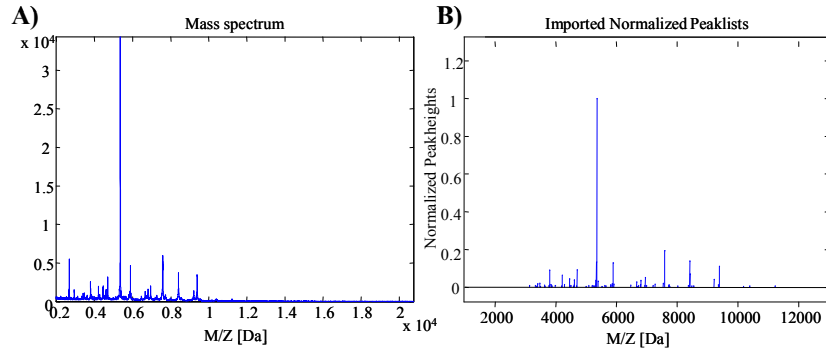


Figura 9. *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CECT 475^T. A) Espectro de masas. B) Espectro normalizado generado a partir del MSP.

También puede visualizarse el listado de picos, con sus correspondientes masas moleculares e intensidades, de un espectro concreto o del MSP (figura 10).

Nr	M/Z(Da)	I	
1	3132,4	0,010857	Nr: Número de pico
2	3331,5	0,011071	M/Z (Da): Masa molecular del pico
3	3367,2	0,005636	I: Intensidad normalizada del pico
4	3403,4	0,019643	
5	3476,1	0,024214	
6	3496,1	0,00525	
7	3627,6	0,013	
8	3638,1	0,006692	
9	3771,8	0,008929	
10	3793,7	0,093357	
11	3808,1	0,016909	
12	3856,3	0,014786	
13	3869,6	0,007545	
14	3984	0,011429	
15	4192,6	0,008111	
16	4207,9	0,067143	
17	4281,4	0,0165	
18	4449,5	0,046429	
19	4463,7	0,009333	
20	4494,6	0,009231	
21	4583,1	0,006545	
22	4597,4	0,013231	
23	4609	0,041429	
24	4679,4	0,007909	
25	4698,7	0,094786	
26	4993,7	0,005769	
27	5091,8	0,009143	
28	5196	0,009929	
29	5223,1	0,008071	
30	5280,4	0,00775	
31	5314,4	0,037182	
32	5338,4	0,135929	
33	5352,3	1	
34	5388,4	0,034357	
35	5523,9	0,0065	
36	5616,6	0,011143	
37	5649,5	0,007786	
38	5808,5	0,014214	
39	5848,9	0,013429	
40	5863,6	0,019643	
41	5891	0,130071	
42	5903,4	0,018333	
43	6465,4	0,013	
44	6661,5	0,03	
45	6702,5	0,006727	
46	6730,4	0,010857	
47	6793,5	0,016857	
48	6805,4	0,038143	
49	6933,5	0,010333	
50	6950,5	0,053143	
51	6990,3	0,008643	
52	7203,2	0,009462	
53	7274,8	0,018643	
54	7537,6	0,021929	
55	7589	0,1965	
56	7722,5	0,0106	
57	7737	0,015214	
58	7752,6	0,006667	
59	8016,4	0,008	
60	8364,6	0,012	
61	8412,8	0,141143	
62	8425,6	0,070833	
63	8482,8	0,0068	
64	8547,9	0,007769	
65	9213,5	0,044071	
66	9357,3	0,0139	
67	9394,1	0,113286	
68	10180,8	0,006154	
69	10388,8	0,007143	
70	11228,9	0,007538	

Figura 10. Relación de picos, masas moleculares e intensidades del MSP de *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CECT 475^T.

Asimismo puede realizarse un análisis de componentes principales (PCA), permitiendo estudiar la dispersión de los espectros obtenidos para una determinada cepa, o comparar diversas cepas entre sí (Figura 11).

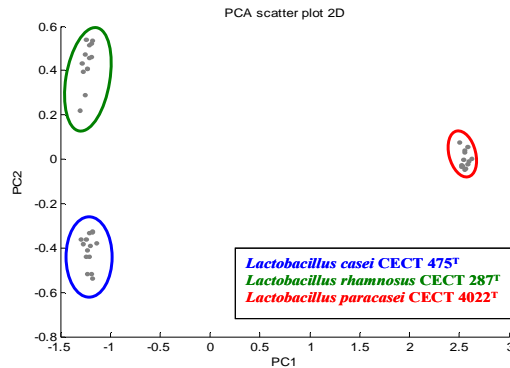


Figura 11. PCA de *Lactobacillus casei* CECT 475^T, *Lactobacillus rhamnosus* CECT 287^T y *Lactobacillus paracasei* CECT 4022^T.

Otras maneras de analizar los datos que permiten la identificación o autenticación de cepas son la obtención del parámetro $\log(\text{score})$ value y la generación de un dendrograma. Mediante el $\log(\text{score})$ value se compara un único espectro o bien el MSP generado para la cepa a estudiar con los MSP o datos de referencia generados en la base de datos del programa (Figura 12). Diversos autores sugieren que un $\log(\text{score})$ comprendido entre 1,7-2 indica una predicción a nivel de género, mientras que un $\log(\text{score})$ comprendido entre 2-3 indica predicción a nivel de especie (Vasileuskaya-Schulz y col., 2011; Maier y col., 2006).

<u>Detected Species</u>	<u>log(score)</u>
<i>Lactobacillus casei</i> CECT 475 ^T	3.000
<i>Lactobacillus paracasei</i> CECT 277	1.582
<i>Lactobacillus sakei</i> CECT 980	1.533
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CECT 288	1.467
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CECT 278 ^T	1.356
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> CECT 4175 ^T	1.298
<i>Lactobacillus paracasei</i> CECT 4022 ^T	1.143
<i>Lactobacillus paracasei</i> CECT 4583	1.092
<i>Lactobacillus paracasei</i> CECT 981	1.005

Figura 12. Identificación de *Lactobacillus casei* CECT 475^T mediante el valor $\log(\text{score})$.

Mediante el dendrograma se comparan los espectros principales o MSP de varias cepas entre sí, de modo que se muestran los agrupamientos de las cepas, y la relación existente entre ellas según el nivel de distancia que las separa. El nivel de distancia necesario para distinguir dos cepas como especies diferentes varía en función del grupo estudiado (Figura 13).

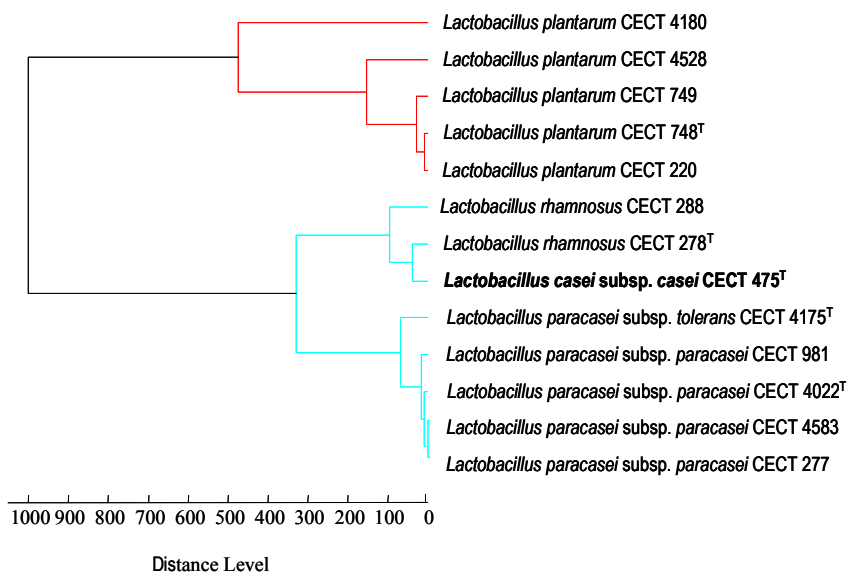


Figura 13. Dendrograma generado a partir de los MSP de *Lactobacillus casei* CECT 475^T, y de diversas cepas de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, y *Lactobacillus paracasei*.

Por razones de espacio y por considerar que es una buena manera de representar los resultados, en la presente tesis doctoral los resultados referidos a la técnica MALDI-TOF MS se mostrarán en forma de dendrograma.

3. GC FAME

El análisis de los ésteres metilados de los ácidos grasos (FAME) se llevó a cabo siguiendo los protocolos estándar descritos por MIDI, *Microbial Identification System* (Sasser, 1990), donde aproximadamente entre 20-40 mg de biomasa por cepa se procesaron en cuatro pasos hasta la obtención de los FAME: saponificación, metilación, extracción y lavado. En la saponificación, tras el lisado de las células, los ácidos grasos se separan del resto de los lípidos celulares formando sales de sodio, para ello se resuspendió la biomasa en 1 ml de reactivo 1 (hidróxido de sodio, metanol y agua) se agitó mediante el vórtex y se incubó durante 5 minutos a 97,5°C, seguidamente la muestra se volvió a agitar con el vórtex y se incubó durante 25 minutos a 97,5°C. A continuación, se procedió a la metilación, donde los ácidos grasos (en forma de sales de sodio) pasan a formar ácidos grasos metil éster, lo cual incrementa la volatilidad de los ácidos grasos haciéndolos más aptos para el análisis en el cromatógrafo de gases (GC), para ello se añadió a la muestra 2 ml de reactivo 2 (ácido clorhídrico 6N y metanol), se agitó con el vórtex y se incubó a 80°C durante 10 minutos. El siguiente paso fue la extracción, donde los FAME se separan de la fase acuosa y se transfieren a una fase orgánica con un procedimiento de extracción líquido-líquido, para lo cual se añade a la mezcla 1,25 ml del reactivo 3 (hexano y metil tert-butil éter), se colocan los tubos en un balancín durante 10 minutos y transcurrido el tiempo la muestra queda fraccionada en dos fases, de modo que la fase inferior (la acuosa) es eliminada. El último paso fue el de lavado, para eliminar agentes residuales, esto se consiguió adicionando a la muestra 3 ml del reactivo 4 (hidróxido de sodio y agua), tras agitarse durante 5 minutos en el balancín se produjo nuevamente la separación en dos fases, la fase superior (fase orgánica) es donde se encuentran los FAME, de modo que se recogieron 2/3 de esta fase, que es lo que se inyectó en el cromatógrafo para su análisis.

El análisis de los ácidos grasos metil éster se realizó mediante Cromatografía de Gases (GC), con el sistema comercial Sherlock Microbial Identification System (MIS, Microbial ID Inc. (MIDI), Newark, EEUU) y la unidad cromatográfica Agilent 6850. La columna cromatográfica utilizada fue de sílice fundido cubierta por

una fina capa de polisiloxano modificado (5% fenil, 95% metil), con una longitud de 25 m y un grosor de 0,2 mm. El gas portador utilizado fue H₂ y la señal fue recogida mediante un detector de ionización de llama (FID).

Como calibrante se utilizó el preparado comercial Microbial ID, Inc. Sherlock Rapid Method (R-805121). Y como control positivo en cada extracción se utilizó la cepa *Stenotrophomonas maltophilia* CECT 115.

Las condiciones de cultivo aplicadas a cada cepa se detallan a continuación (tabla 5).

Tabla 5: Cepas de referencia y condiciones de cultivo utilizadas en el análisis de FAME (MIDI). T^a: temperatura; t: tiempo de incubación; h: horas; d: días.

Especie	Cepa	Medio	T ^a	t
<i>Firmicutes</i>				
<i>Enterococcus faecium</i>	CECT 4931 ^T	TSA	28°C	24h
<i>Enterococcus faecalis</i>	CECT 481 ^T	TSA	28°C	24h
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CECT 903 ^T	MRS	28°C	5d
<i>Lactobacillus agilis</i>	CECT 4131 ^T	MRS	28°C	48h
<i>Lactobacillus buchneri</i>	CECT 4111 ^T	MRS	28°C	24h
<i>Lactobacillus casei</i>	CECT 475 ^T	MRS	28°C	48h
<i>Lactobacillus collinoides</i>	CECT 922 ^T	MRS (AN)	28°C	72h
<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i>	CECT 982 ^T	MRS	28°C	48h
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	CECT 4005 ^T	MRS	28°C	48h
<i>Lactobacillus gasseri</i>	CECT 4479 ^T	MRS (AN)	28°C	48h
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	CECT 4786 ^T	MRS	28°C	72h
<i>Lactobacillus malefermentans</i>	CECT 5928 ^T	MRS	28°C	48h
<i>Lactobacillus oris</i>	CECT 4021 ^T	MRS	28°C	48h
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	CECT 5740 ^T	MRS	28°C	48h
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	CECT 4022 ^T	MRS	28°C	5d
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	CECT 748 ^T	MRS	28°C	48h
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CECT 278 ^T	MRS	28°C	48h
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CECT 231 ^T	TSA	28°C	24h
<i>Alphaproteobacteria</i>				
<i>Actibacterium mucosus</i>	CECT 7668 ^T	MA	28°C	48h
<i>Antarctobacter heliothermus</i>	CECT 7783 ^T	MA	28°C	48h
<i>Jannaschia donghaensis</i>	CECT 7802 ^T	MA	28°C	48h
<i>Jannaschia rubra</i>	CECT 5088 ^T	MA	28°C	48h
<i>Jannaschia seosinensis</i>	CECT 7799 ^T	MA	28°C	48h

Especie	Cepa	Medio	T ^a	t
<i>Maribius pelagius</i>	CECT 7801 ^T	MA	28°C	48h
<i>Maribius salinus</i>	CECT 7800 ^T	MA	28°C	48h
<i>Marinovum algicola</i>	CECT 5396 ^T	MA	28°C	48h
<i>Nautella italica</i>	CECT 7645 ^T	MA	28°C	48h
<i>Oceanicola batsensis</i>	CECT 7860 ^T	MA	28°C	48h
<i>Oceanicola granulosis</i>	CECT 7859 ^T	MA	28°C	48h
<i>Oceanicola marinus</i>	CECT 7751 ^T	MA	28°C	48h
<i>Oceanicola nanhaiensis</i>	CECT 7831 ^T	MA	28°C	48h
<i>Oceanicola pacificus</i>	CECT 7832 ^T	MA	28°C	48h
<i>Oceanicola</i> sp.	CECT 7852 ^T	MA	28°C	48h
<i>Palleronia marisminoris</i>	CECT 7066 ^T	MA	28°C	48h
<i>Phaeobacter daeponensis</i>	CECT 7309 ^T	MA	28°C	48h
<i>Phaeobacter gallaeciensis</i>	CECT 7277 ^T	MA	28°C	48h
<i>Phaeobacter inhibens</i>	CECT 7251 ^T	MA	28°C	24h
<i>Phaeobacter</i> sp.	CECT 7735	MA	28°C	48h
<i>Phaeomarinomonas litorea</i>	CECT 7639 ^T	MA	28°C	48h
<i>Phaeomarinomonas mediterranea</i>	CECT 7615 ^T	MA	28°C	48h
<i>Phaeomarinomonas mediterranea</i>	CECT 5090	MA	28°C	48h
<i>Phaeomarinomonas mediterranea</i>	CECT 7616	MA	26°C	48h
<i>Phaeomarinomonas mediterranea</i>	CECT 7637	MA	28°C	48h
<i>Ponticoccus litoralis</i>	CECT 7786 ^T	MA	28°C	48h
<i>Roseobacter denitrificans</i>	CECT 5011 ^T	MA	26°C	72h
<i>Roseobacter litoralis</i>	CECT 5395 ^T	MA	20°C	6d
<i>Roseovarius aestuarii</i>	CECT 7745 ^T	MA	28°C	48h
<i>Roseovarius crassostreae</i>	CECT 7676 ^T	MA	28°C	48h
<i>Roseovarius halotolerans</i>	CECT 8110 ^T	MA	28°C	48h
<i>Roseovarius litoralis</i>	CECT 7450 ^T	MA	28°C	48h
<i>Roseovarius marinus</i>	CECT 7971 ^T	MA	28°C	48h
<i>Roseovarius mucosus</i>	CECT 7973 ^T	MA	28°C	48h
<i>Roseovarius nubinhibens</i>	CECT 7750 ^T	MA	28°C	48h
<i>Roseovarius tolerans</i>	CECT 7738 ^T	MA	28°C	48h
<i>Ruegeria atlantica</i>	CECT 4292 ^T	MA	20°C	48h
<i>Ruegeria pomeyori</i>	CECT 7647 ^T	MA	28°C	48h
<i>Ruegeria</i> sp.	CECT 7638	MA	28°C	48h
<i>Sagittula stellata</i>	CECT 7782 ^T	MA	28°C	48h
<i>Shimia marina</i>	CECT 7688 ^T	MA	28°C	48h
<i>Tropicibacter multivorans</i>	CECT 7557 ^T	MA	28°C	48h
<i>Tropicibacter naphthalenivorans</i>	CECT 7648 ^T	MA	28°C	48h
<i>Gammaproteobacteria</i>				
<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	CECT 4220	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	CECT 4911	TSA	30°C	24h

Material y Métodos

Especie	Cepa	Medio	Tª	t
<i>Aeromonas aquariorum</i>	CECT 7289 ^T	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas bestiarum</i>	CECT 4227 ^T	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas bestiarum</i>	CECT 5219	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas bestiarum</i>	CECT 7451	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas bivalvium</i>	CECT 7112	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas bivalvium</i>	CECT 7113 ^T	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas caviae</i>	CECT 838 ^T	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas caviae</i>	CECT 4226	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas diversa</i>	CECT 4254 ^T	TSA	37°C	24h
<i>Aeromonas encheleia</i>	CECT 4342 ^T	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas encheleia</i>	CECT 4985	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas encheleia</i>	CECT 5027	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	CECT 4487 ^T	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	CECT 4935	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	CECT 4937	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas eucrenophila</i>	CECT 4224 ^T	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas eucrenophila</i>	CECT 4827	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas eucrenophila</i>	CECT 4855	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas fluvialis</i>	CECT 7401 ^T	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas hydrophila</i>	CECT 839 ^T	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas hydrophila</i>	CECT 398	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas hydrophila</i>	CECT 4330	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>anaerogenes</i>	CECT 4221 ^T	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>anaerogenes</i>	CECT 4588	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i>	CECT 5743	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i>	CECT 5744 ^T	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i>	CECT 5745	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas ichthiosmia</i>	CECT 4486 ^T	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas jandaei</i>	CECT 4228 ^T	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas jandaei</i>	CECT 4229	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas jandaei</i>	CECT 4231	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas jandaei</i>	CECT 4335	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas media</i>	CECT 4232 ^T	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas molluscorum</i>	CECT 5864 ^T	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas piscicola</i>	CECT 7443 ^T	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas popoffii</i>	CECT 4995	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas popoffii</i>	CECT 5176 ^T	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas popoffii</i>	CECT 5250	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas salmonicida</i>	CECT 894 ^T	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas salmonicida</i>	CECT 5209	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>	CECT 895 ^T	TSA	30°C	24h

Especie	Cepa	Medio	Tª	t
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>	CECT 4238	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>	CECT 4239	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>	CECT 896 ^T	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>pectinolytica</i>	CECT 5752 ^T	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>pectinolytica</i>	CECT 5753	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	CECT 894 ^T	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas schubertii</i>	CECT 4240 ^T	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas schubertii</i>	CECT 4241	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas schubertii</i>	CECT 4934	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas sobria</i>	CECT 4245 ^T	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas sobria</i>	CECT 837	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas sobria</i>	CECT 4835	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas</i> sp.	CECT 7080	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas</i> sp.	CECT 7081	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas</i> sp.	CECT 7083	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas</i> sp.	CECT 7084	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas</i> sp.	CECT 7444	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas tecta</i>	CECT 7082 ^T	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas veronii</i>	CECT 4257 ^T	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas veronii</i>	CECT 4819	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas veronii</i>	CECT 4910	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas veronii</i>	CECT 5761	TSA	30°C	24h
<i>Aeromonas veronii</i>	CECT 7060	TSA	30°C	24h
<i>Aliivibrio finisterrensis</i>	CECT 7228 ^T	MA	26°C	48h
<i>Aliivibrio fischeri</i>	CECT 524 ^T	MA	26°C	48h
<i>Aliivibrio logei</i>	CECT 5009 ^T	MA	20°C	48h
<i>Citrobacter freundii</i>	CECT 401 ^T	MA	26°C	48h
<i>Enterovibrio calviensis</i>	CECT 7414 ^T	MA	26°C	48h
<i>Enterovibrio coralii</i>	CECT 7249 ^T	MA	26°C	48h
<i>Enterovibrio nigricans</i>	CECT 7320 ^T	MA	26°C	48h
<i>Enterovibrio norvegicus</i>	CECT 7288 ^T	MA	26°C	48h
<i>Escherichia coli</i>	CECT 101	TSA	28°C	24h
<i>Grimontia hollisae</i>	CECT 5069 ^T	MA	26°C	48h
<i>Haliea mediterranea</i>	CECT 7447 ^T	MA	28°C	48h
<i>Halomonas marroquensis</i>	CECT 7698 ^T	MA	30°C	48h
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CECT 143 ^T	TSA	28°C	24h
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CECT 7787	TSA	28°C	24h
<i>Marinomonas alcarazii</i>	CECT 7730 ^T	MA	26°C	48h
<i>Marinomonas aquaplantarum</i>	CECT 7731 ^T	MA	26°C	48h
<i>Marinomonas foliarum</i>	CECT 7732 ^T	MA	26°C	48h
<i>Marinomonas mediterranea</i>	CECT 4803 ^T	MA	26°C	48h

Material y Métodos

Especie	Cepa	Medio	Tª	t
<i>Photobacterium angustum</i>	CECT 5690 ^T	MA	26°C	48h
<i>Photobacterium aphoticum</i>	CECT 7614 ^T	MA	26°C	48h
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	CECT 626 ^T	MA	26°C	48h
<i>Photobacterium ganghwense</i>	CECT 7641 ^T	MA	26°C	48h
<i>Photobacterium halotolerans</i>	CECT 5860 ^T	MA	26°C	48h
<i>Photobacterium leiognathi</i>	CECT 4191 ^T	MA	26°C	48h
<i>Photobacterium lutimaris</i>	CECT 7642 ^T	MA	26°C	48h
<i>Photobacterium rosenbergii</i>	CECT 7644 ^T	MA	26°C	48h
<i>Photobacterium</i> sp.	CECT 7580	MA	26°C	48h
<i>Photobacterium swingsii</i>	CECT 7576 ^T	MA	26°C	48h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CECT 110 ^T	NA‡	37°C	24h
<i>Pseudomonas agarici</i>	CECT 4467 ^T	NA‡	26°C	24h
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	CECT 4467 ^T	NA	26°C	24h
<i>Pseudomonas argentinensis</i>	CECT 7010 ^T	NA	28°C	48h
<i>Pseudomonas asplenii</i>	CECT 4468 ^T	NA‡	26°C	24h
<i>Pseudomonas baetica</i>	CECT 7720 ^T	MA	22°C	48h
<i>Pseudomonas baetica</i>	CECT 7721	MA	22°C	48h
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	CECT 4470 ^T	NA‡	26°C	24h
<i>Pseudomonas cichorii</i>	CECT 4471 ^T	NA‡	26°C	24h
<i>Pseudomonas corrugata</i>	CECT 124 ^T	NA	26°C	24h
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CECT 378 ^T	NA‡	26°C	24h
<i>Pseudomonas fragi</i>	CECT 446 ^T	NA‡	26°C	24h
<i>Pseudomonas litoralis</i>	CECT 7670 ^T	MA	28°C	48h
		TSA	28°C	48h
<i>Pseudomonas litoralis</i>	CECT 7669	MA	28°C	48h
		TSA	28°C	48h
<i>Pseudomonas lutea</i>	CECT 5822 ^T	NA	30°C	24h
<i>Pseudomonas marginalis</i>	CECT 229 ^T	NA‡	26°C	24h
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	CECT 4079 ^T	NA	28°C	24h
<i>Pseudomonas pelagia</i>	CECT 7689 ^T	NA	28°C	24h
<i>Pseudomonas pertucinogena</i>	CECT 7776 ^T	TSA	28°C	48h
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	CECT 318 ^T	NA‡	26°C	48h
<i>Pseudomonas putida</i>	CECT 324 ^T	NA‡	26°C	24h
<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	CECT 5726 ^T	TSA	28°C	48h
<i>Pseudomonas sabulinigri</i>	CECT 7679 ^T	MA	30°C	24h
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	CECT 930 ^T	NA‡	26°C	24h
<i>Pseudomonas syringae</i>	CECT 4429 ^T	NA‡	26°C	24h
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	CECT 4472 ^T	NA‡	26°C	24h
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	CECT 458 ^T	NA‡	26°C	24h
<i>Salinivibrio costicola</i>	CECT 4059 ^T	MA	26°C	48h
<i>Serratia marcescens</i>	CECT 846 ^T	TSA	28°C	24h

Especie	Cepa	Medio	T ^a	t
<i>Shewanella</i> sp.	CECT 5130	MA	26°C	48h
<i>Shigella dysenteriae</i>	CECT 584 ^T	TSA	28°C	24h
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	CECT 115 ^T	TSA	28°C	24h
<i>Vibrio aerogenes</i>	CECT 7868 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio aestivus</i>	CECT 7558 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio aestivus</i>	CECT 7559	MA	26°C	48h
<i>Vibrio agarivorans</i>	CECT 5085 ^T	MA	26°C	24h
<i>Vibrio alginolyticus</i>	CECT 521 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio anguillarum</i>	CECT 522 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio artabrorum</i>	CECT 7226 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio atlanticus</i>	CECT 7223 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio breoganii</i>	CECT 7222 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio campbellii</i>	CECT 523 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio celticus</i>	CECT 7224 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio cholerae</i>	CECT 514 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio cincinnatiensis</i>	CECT 4216 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio diazotrophicus</i>	CECT 627 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio fluvialis</i>	CECT 4217 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio furnissii</i>	CECT 4203 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio gallaecicus</i>	CECT 7244 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio gazogenes</i>	CECT 5068 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio harveyi</i>	CECT 525 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio ichthyenteri</i>	CECT 5675 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio inhibens</i>	CECT 7692 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio lentus</i>	CECT 5110 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio mangrovi</i>	CECT 7927 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio marisflavi</i>	CECT 7928 ^T	MA	26°C	24h
<i>Vibrio mediterranei</i>	CECT 621 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio mediterranei</i>	CECT 623	MA	26°C	48h
<i>Vibrio mimicus</i>	CECT 4218 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio mytili</i>	CECT 632 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio natriegens</i>	CECT 526 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio nereis</i>	CECT 595 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio nigripulchritudo</i>	CECT 628 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio ordalii</i>	CECT 582 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio orientalis</i>	CECT 629 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio ostreicida</i>	CECT 7398	MA	26°C	48h
<i>Vibrio ostreicida</i>	CECT 7399	MA	26°C	48h
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CECT 511 ^T	MA	26°C	24h
<i>Vibrio pelagius</i>	CECT 4202 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio ponticus</i>	CECT 5869 ^T	MA	26°C	48h

Material y Métodos

Especie	Cepa	Medio	Tª	t
<i>Vibrio quintilis</i>	CECT 7734 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio rhizosphaerae</i>	CECT 7877 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio ruber</i>	CECT 7878 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio scophthalmi</i>	CECT 4638 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio sinaloensis</i>	CECT 7298 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio splendidus</i>	CECT 528 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio stylophorae</i>	CECT 7929 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio tapetis</i>	CECT 4600 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio tubiashii</i>	CECT 4196 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio vulnificus</i>	CECT 529 ^T	MA	26°C	48h
<i>Vibrio vulnificus</i>	CECT 5763	MA	26°C	48h
<i>Vibrio vulnificus</i>	CECT 4608	MA	26°C	48h
<i>Bacteroidetes</i>				
<i>Cytophaga fermentans</i>	CECT 7448 ^T	MA	28°C	48h
<i>Euzeyella saccharophila</i>	CECT 7477 ^T	MA	28°C	48h
<i>Marinifilum flexuosus</i>	CECT 7448 ^T	MA	30°C	72h
<i>Marinifilum fragile</i>	CECT 7942 ^T	MA	30°C	72h
<i>Mesonina algae</i>	CECT 7520 ^T	MA	28°C	24h
<i>Mucilaginibacter platycodoni</i>	CECT 7663 ^T	MA	28°C	48h
<i>Pontibacter</i> sp.	CECT 7705	MA	30°C	72h
<i>Pontibacter</i> sp.	CECT 7713	MA	30°C	72h
<i>Winogradskyella arenosi</i>	CECT 7958 ^T	MA	28°C	48h
<i>Winogradskyella echinorum</i>	CECT 7944 ^T	MA	28°C	48h
<i>Winogradskyella epiphytica</i>	CECT 7945 ^T	MA	28°C	48h
<i>Winogradskyella eximia</i>	CECT 7946 ^T	MA	28°C	48h
<i>Winogradskyella lutea</i>	CECT 7947 ^T	MA	28°C	48h
<i>Winogradskyella pacifica</i>	CECT 7948 ^T	MA	28°C	48h
<i>Winogradskyella rapida</i>	CECT 7392 ^T	MA	28°C	48h
<i>Winogradskyella</i> sp.	CECT 7476	MA	28°C	48h
<i>Winogradskyella thalassocola</i>	CECT 7943 ^T	MA	28°C	48h
<i>Actinobacteria</i>				
<i>Micrococcus luteus</i>	CECT 245 ^T	TSA	28°C	24h
<i>Mycobacterium phlei</i>	CECT 3009 ^T	TSA	28°C	24h

La identificación de los ácidos grasos y el procesamiento de datos se realizaron mediante el paquete informático *Microbial Identification Sherlock*, el cual muestra el cromatograma obtenido (figura 14) y genera un informe detallado sobre qué ácidos grasos se extraen y en qué proporción relativa, además de mostrar los tiempos de retención obtenidos (RT), la respuesta dada por el detector, la relación entre el área y la altura del pico (AR/HT) y el valor de ECL. Asimismo, en el informe también se detalla la identificación generada y el índice de similitud de ésta (figura 15).

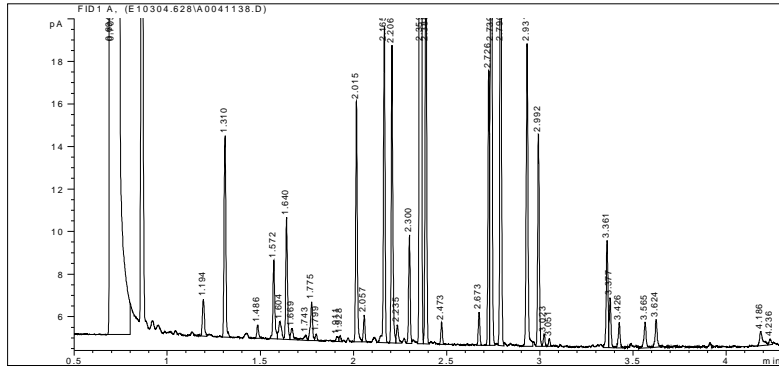


Figura 14. Cromatograma de *Stenotrophomonas maltophilia* CECT 115^T.

Figura 15. Informe del perfil de ácidos grasos de *Stenotrophomonas maltophilia* CECT 115^T generado por el sistema MIDI.

Sample ID: <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> CECT 115 ^T						
RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent
0.6941	519041	0.005	----	6.6164		----
0.7031	1.249E+9	0.018	----	6.6774	SOLVENT PEAK	----
1.1938	2658	0.013	1.146	9.9995	10:0	0.82
1.3101	12742	0.011	1.112	10.6174	11:0 iso	3.83
1.4856	861	0.010	1.072	11.4525	10:0 3OH	0.25
1.5719	5086	0.010	----	11.8296	unknown 11.825	----
1.6403	7350	0.010	1.044	12.1121	11:0 iso 3OH	2.08
1.6690	1077	0.014	----	12.2207		----
1.7434	605	0.015	----	12.5030	unknown 12.502	----
1.7754	2798	0.011	1.025	12.6244	13:0 iso	0.78
1.7995	438	0.010	1.022	12.7157	13:0 anteiso	0.12
1.9106	453	0.012	1.009	13.1246	12:0 iso 3OH	0.12
1.9276	349	0.009	----	13.1831		----
2.0154	13763	0.010	0.998	13.4849	12:0 3OH	3.71
2.0569	1450	0.009	0.994	13.6278	14:0 iso	0.39
2.1649	17448	0.009	0.984	13.9992	14:0	4.64
2.2064	16566	0.009	0.980	14.1343	13:0 iso 3OH	4.39
2.2348	1364	0.012	0.978	14.2267	13:0 2OH	0.36
2.2999	6029	0.009	0.973	14.4387	15:1 iso F	1.59
2.3592	134719	0.009	0.969	14.6317	15:0 iso	35.31
2.3879	24038	0.009	0.967	14.7248	15:0 anteiso	6.29
2.4730	1234	0.010	----	15.0019	15:0	----
2.6735	1838	0.009	0.951	15.6338	16:0 iso	0.47
2.7255	13780	0.008	0.948	15.7979	16:1 w9c	3.53
2.7387	47770	0.009	0.948	15.8393	Sum In Feature 3	12.24
2.7898	29662	0.009	0.945	16.0004	16:0	7.59
2.9313	18679	0.010	0.940	16.4440	Sum In Feature 9	4.75
2.9922	11956	0.009	0.938	16.6349	17:0 iso	3.03
3.0232	713	0.009	0.937	16.7320	17:0 anteiso	0.18
3.0507	458	0.010	0.936	16.8181	17:1 w8c	0.12
3.3609	6706	0.010	0.929	17.7954	18:1 w9c	1.68
3.3769	3063	0.010	0.928	17.8458	Sum In Feature 8	0.77
3.4260	1678	0.010	0.928	18.0007	18:0	0.42
3.5654	2083	0.012	----	18.4492		----
3.6242	2088	0.012	0.925	18.6388	19:0 iso	0.52
4.1860	1673	0.016	----	20.4766		----
4.2358	456	0.011	----	20.6404		----

ECL Deviation: 0.002	Reference ECL Shift: 0.004	
Number Reference Peaks: 14		
Total Response: 386370	Total Named: 381067	
Percent Named: 98.63%	Total Amount: 369731	
Matches:		
Library	Sim Index	Entry Name
RTSBA6 6.10	0.875	Stenotrophomonas-maltophilia

El programa *Microbial Identification Sherlock* también permite la realización de dendrogramas e incluso de árboles de *Neighbor Joining* a partir de los perfiles de ácidos grasos obtenidos (figuras 16 y 17 respectivamente). *Microbial Identification Sherlock* estipula que aquellas muestras cuya distancia euclídea en el dendrograma sea de 10 o menor son cepas que generalmente pertenecen a la misma especie, si es de 6 o menor son generalmente de la misma subespecie o biotipo, y si es de 2,5 o menor son generalmente la misma cepa. De la misma manera, aquellas muestras cuya distancia euclídea en el árbol de *Neighbor Joining* sea de 10 o menor son cepas que generalmente pertenecen a la misma especie, si es de 6 o menor son generalmente de la misma subespecie o biotipo, y si es de 2,5 o menor son generalmente la misma cepa.

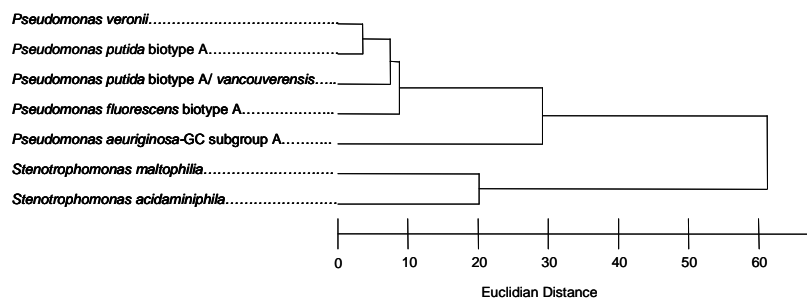


Figura 16. Dendrograma realizado a partir del perfil de ácidos grasos de varias cepas de *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*.

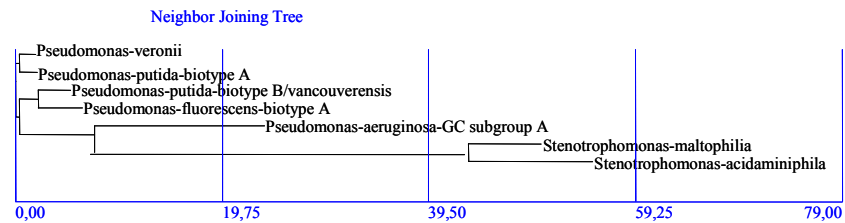


Figura 17. Árbol de Neighbor Joining realizado a partir del perfil de ácidos grasos de varias cepas de *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*.

4. Caracterización genotípica

La caracterización genotípica se realizó en aquellas cepas en las que hubo dudas en su identidad, con el fin de corroborar y/o complementar el resultado obtenido por MALDI-TOF MS o MIDI.

4.1 Extracción de DNA

El DNA se extrajo a partir de células cultivadas en el medio recomendado por la CECT (www.cect.org), con un sistema de extracción por columnas Ultraclean DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, EE.UU) siguiendo las indicaciones del fabricante.

4.2 Secuenciación parcial del gen 16S rRNA

Los cebadores utilizados para amplificar el fragmento de unas 1000 pb del gen ribosómico 16S fueron 616V y 699R. Las posiciones de unión de estos cebadores son 8-25 y 1099-1113, respectivamente (numeración de *Escherichia coli*).

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Genius (Techne, Burlington, EEUU) y el cóctel de amplificación utilizado (50 µl) estaba compuesto por 1 µl (50 pmol/µl) de cada uno de los cebadores directo y reverso; 0,5 µl (2 U/µl) de Taq DNA polimerasa (DFS-Taq DNA polymerase, BIORON, Alemania), 5 µl del tampón de reacción de PCR 10×; 0,75 µl de MgCl₂ 100 mM, 1 µl de dNTP 10 mM (Roche, Basel, Switzerland), 35,75 µl de agua estéril filtrada (Milli-Q, Millipore, Billerica, EEUU) y 5 µl (50 ng/µl) de DNA. Se utilizaron las condiciones de la reacción de PCR descritas por Arahal y col. (2008).

La amplificación de los fragmentos se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón 0,5× TBE durante 25 minutos a 135 V. La visualización de las bandas se hizo mediante tinción con bromuro de etidio e iluminación con luz UV.

Los productos de amplificación fueron purificados mediante el sistema Ultraclean PCR Clean-up Kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, USA) y resuspendidos en 50 µl Tris HCl 10 mM pH 7,5.

La secuenciación de los amplicones se llevó a cabo utilizando el secuenciador automático ABI PRISM 3730 y los reactivos ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready (Applied Biosystems, Foster City, CA; EE.UU) en el Servicio de Secuenciación de ADN y Análisis Molecular del SCSIE de la Universidad de Valencia, empleando los mismos cebadores que en la reacción de amplificación pero diluidos diez veces (5 pmol/ μ l).

4.3 Análisis de las secuencias corregidas

Las secuencias parciales corregidas se compararon mediante las herramientas en línea que se muestran en la tabla 6 frente a sus respectivas bases de datos, con fines identificativos.

Herramienta	Dirección web	Referencia
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Zhang y col., 2000
EzTaxon	http://147.47.212.35:8080/	Chun y col., 2007

Tabla 6. Relación de los programas utilizados en la comparación de las secuencias con las bases de datos públicas.

Resultados y Discusión

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. MALDI-TOF MS

1.1 Análisis interlaboratorio de cepas del género *Lactobacillus*

En esta parte del trabajo se estudiaron 472 cepas, las cuales representan 125 especies y 16 subespecies del género *Lactobacillus* procedentes de la CECT, CIP, DSMZ y LMG mediante MALDI-TOF MS, de modo que fue posible la generación de una base de datos para su utilización en el proceso de autenticación de cepas en los controles rutinarios que deben seguir las Colecciones de Cultivos en los diversos puntos de control del proceso de conservación de cepas. Asimismo, este estudio ha permitido un curado exhaustivo de las cepas depositadas en las Colecciones de Cultivos implicadas.

En su gran mayoría las cepas estudiadas se agrupan de la forma esperada, sin embargo, el nivel de distancia (*distance level*) que las separa varía dependiendo del conjunto estudiado, y además en algunas especies el rango de distancias que se observa es mayor que en otras.

Con el fin de determinar la validez de la técnica en cuanto a su reproducibilidad intra- e interlaboratorio se realizó en primer lugar un estudio en el que se adquirieron espectros de las mismas cepas bajo las mismas condiciones de cultivo y de preparación de la muestra, pero procesado en diferentes momentos, para evaluar de este modo cómo afectaba el procesado de la muestra hasta la obtención del extracto proteico en la reproducibilidad de los espectros (Figura 18). Todos los emparejamientos (marcados con las letras A y B) fueron correctos, lo que indica que la técnica presenta una alta reproducibilidad. En el caso de *L. bobalius* CIP 109926^T B y *L. bobalius* DSM 19674^T A, las réplicas de ambos se entremezclan debido a que ambas cepas son equivalentes, además las dos parejas generadas se unen a un nivel de distancia muy bajo. Sin embargo, en algunos casos se observa un mayor nivel de distancia entre las réplicas como ocurre con *L. parabuchneri* CECT 5740^T (140), *L. suebicus* CECT 5917^T (210), *L.*

vaccinostercus CECT 5925^T (330) y *L. coleohominis* CIP 106820^T (390), esto es debido a la baja calidad de los espectros de una de las dos réplicas, como se ilustra en la figura 19 con *L. vaccinostercus* CECT 5925^T, donde puede observarse que el espectro B presenta una menor intensidad de la señal debido a factores como baja concentración del extracto proteico, pérdida de la señal por un exceso de tiempo transcurrido hasta obtener los espectros, etc., lo que se traduce en un mayor ruido de fondo.

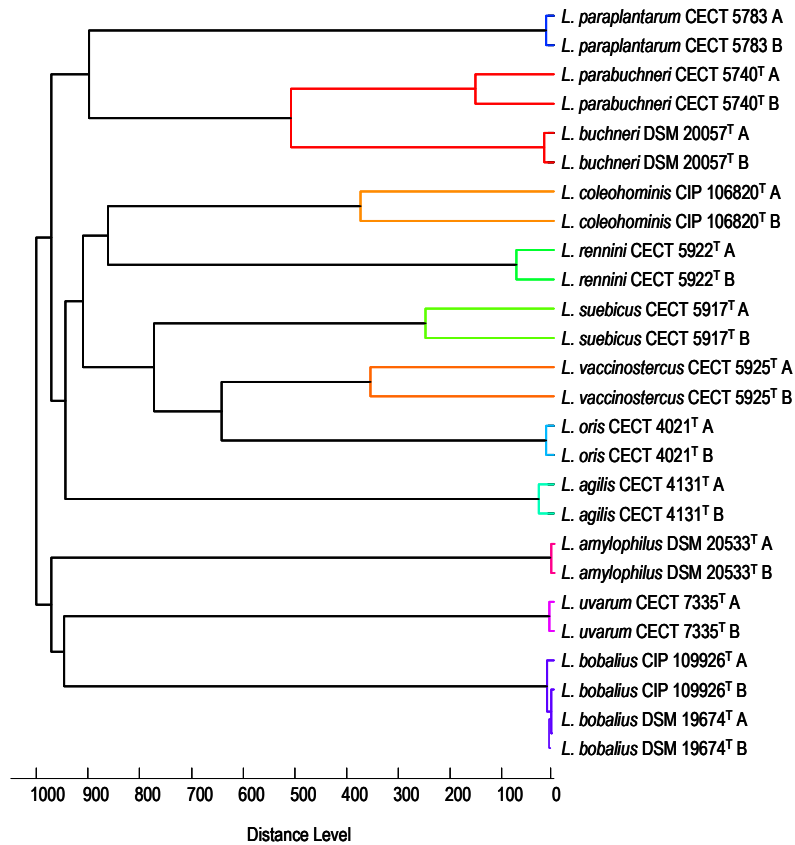


Figura 18. Dendrograma de MALDI-TOF MS de cepas de *Lactobacillus* procesadas en dos momentos distintos (A y B) para validación intralaboratorio.

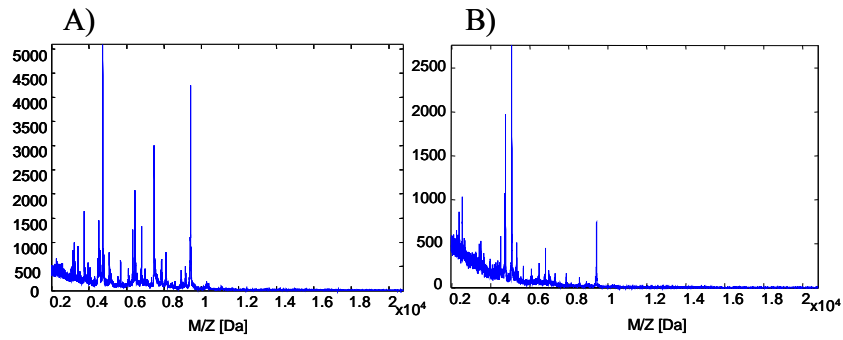


Figura 19. Espectro de masas de la cepa *Lactobacillus vaccinostercus* CECT 5925^T procesada en dos momentos distintos (A y B). La figura B presenta un espectro de peor calidad.

Para determinar la influencia que pudiera tener el espectrómetro de masas empleado para generar los espectros, se adquirieron espectros de diversas cepas de *Lactobacillus* con dos espectrómetros de masas diferentes. Para ello, el material biológico de 19 cepas procedentes de la CIP se envió a la CECT (Reflex IV, Bruker daltonics) y DSMZ (Microflex L20, Bruker daltonics), donde se realizó la extracción proteica para la posterior adquisición de espectros. En la figura 20 se muestra el dendrograma de las 19 cepas de la CIP analizadas en la CECT y DSMZ. El nivel de distancia obtenido entre la misma cepa analizada en la CECT y en la DSMZ fue muy bajo, siendo en todos los casos menor a 100 excepto en el caso de *L. sanfranciscensis* CIP 103252^T obtenido en la DSMZ que presenta un nivel de distancia de 160 con respecto a su homólogo obtenido en la CECT, y con respecto a *L. sanfranciscensis* CIP 102982 obtenido en la CECT y DSMZ. Estos resultados sugieren que la técnica presenta una alta reproducibilidad interlaboratorio, ya que los espectros no están influenciados por el espectrómetro de masas utilizado, ni por la manipulación de la muestra en el proceso de extracción proteica.

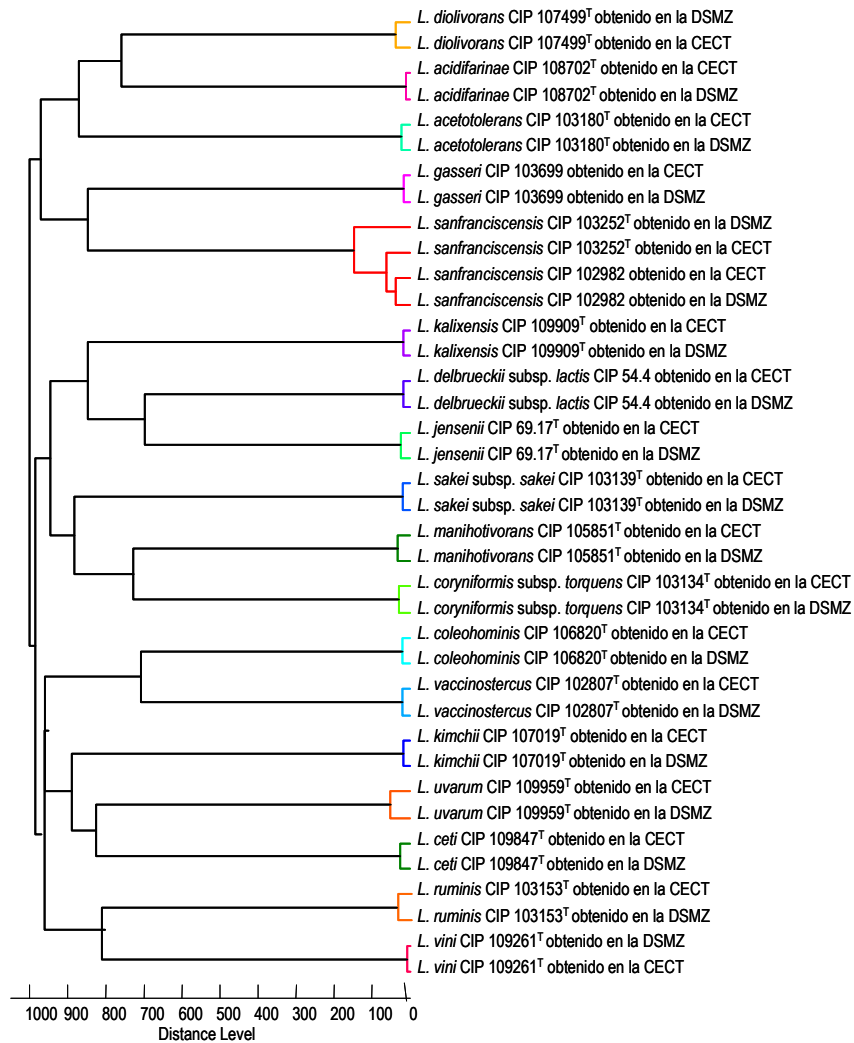


Figura 20. Dendrograma de MALDI-TOF MS de cepas de *Lactobacillus* de la CIP cuyo perfil proteico ha sido obtenido en la CECT y DSMZ, para validación interlaboratorio.

El dendrograma de MALDI-TOF MS generado con cepas equivalentes de *Lactobacillus* depositadas en la CECT, CIP, DSMZ y LMG (figura 21) muestra por un lado que el agrupamiento de la cepa tipo junto con el resto de cepas pertenecientes a la misma especie se produce de la forma esperada, y por otro lado, que las cepas equivalentes depositadas en las distintas colecciones se agrupan correctamente, corroborando de este modo su equivalencia, a excepción de las cepas que se muestran en rojo: *L. kalixensis* LMG 22115^T, *L. rennini* LMG 23902^T, *L. salivarius* LMG 9476, *L. mucosae* LMG 19534^T y *L. aviarius* subsp. *araffinosus* CIP 103145 (Figura 21, en rojo). En el caso de *L. rennini* LMG 23902^T se comprobó que correspondía en realidad a *L. vini* LMG 23202^T, pero hubo un error en el etiquetado de la muestra propiciado por el parecido del número de catálogo de ambos. El resto de cepas discrepantes están siendo revisadas en la actualidad por sus respectivas colecciones.

Diversos estudios han examinado la alta capacidad discriminatoria de MALDI-TOF MS en comparación con la secuenciación del gen 16S rRNA (Wunschel y col., 2005; Suh y col., 2005; Mellmann y col., 2008). En el género *Lactobacillus* diversos clados de especies muestran una similitud interna de secuencia del gen 16S rRNA muy alta, como es el caso de *L. plantarum*, *L. pentosus* y *L. paraplantarum* (99,7-99,9%), *L. kimchii* y *L. paralimentarius* (99,9%), *L. mindensis* y *L. farciminis* (99,9%), y *L. animalis* y *L. murinus* (99,9%) (Ludwig y col., 2005). En base al estudio del 16S rRNA se establecieron en el género *Lactobacillus* siete grupos bien diferenciados en torno a las especies *L. buchneri*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. sakei* y *L. salivarius* (Ludwig y col., 2005; Hammes y col., 2006 a), estos grupos son:

- Grupo de *L. buchneri* que engloba a las especies *L. buchneri* y *L. sanfranciscensis*.
- Grupo de *L. casei* que contiene las especies *L. casei*, *L. paracasei*, *L. zae* y *L. rhamnosus*.

- Grupo de *L. delbrueckii*, que contiene cinco subespecies que no pueden ser diferenciadas por análisis de secuencia del 16S rRNA.
- Grupo de *L. plantarum* que está formado por varias especies que muestran un alto porcentaje de similitud de secuencia del gen 16S rRNA entre sí *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. paraplantarum* (99,7-99,9%), *L. kimchii* y *L. paralimentarius* (99,9%), y *L. mindensis* y *L. farciminis* (99,9%).
- Grupo de *L. reuteri* que comprende a *L. durianis*, *L. rossiae*, *L. suebicus* y *L. vaccinostercus*.
- Grupo de *L. sakei* que contiene a *L. sakei* y *L. curvatus*.
- Grupo de *L. salivarius* que está formado también por *L. animalis*, *L. murinus* y *L. acidipiscis*.

El resultado obtenido por MALDI-TOF MS mostrado en forma de dendrograma (figura 21), presenta las siete agrupaciones observadas en base al gen 16S rRNA previamente descritas, aunque con alguna variación:

- El grupo *L. buchneri* está formado por las especies *L. buchneri*, *L. parabuchneri*, *L. parakefiri*, *L. kefiri*, *L. diolivorans*, *L. rapi*, *L. kisonensis*, *L. nantensis*, sin embargo, *L. sanfranciscensis* queda alejado de este grupo. En el dendrograma se observa, la dificultad para diferenciar entre *L. buchneri* *L. parabuchneri* y *L. parakefiri*. Esto se corrobora atendiendo a los valores de $\log(score)$ descritos previamente en el apartado de materiales y métodos, donde se observa que el valor de $\log(score)$ obtenido al comparar distintas cepas pertenecientes a la misma especie es de entre 1,143-2,229 para *L. buchneri*, de 1,353-2,402 para *L. parabuchneri* y de 1,794-2,397 para *L. parakefiri*, y el valor obtenido al comparar *L. buchneri/L. parabuchneri* es de 1,177-2,272 (casi el mismo rango que el obtenido al comparar cepas de la misma especie) y de 0,983-1,502 para *L. buchneri/L. parakefiri* (cuyo rango es menor, pero sigue habiendo

solapamiento). Sin embargo, el valor de $\log(score)$ obtenido al comparar *L. parabuchneri*/*L. parakefiri* es de 1,024-1,306, que es inferior al valor obtenido al comparar perfiles de estas dos especies consigo mismas, por lo que pueden ser discriminadas entre sí. Estos datos sugieren, por tanto, la incapacidad de la técnica para discriminar entre especies, que viene determinada por el solapamiento en los valores de $\log(score)$ obtenidos al comparar cepas de la misma especie con los valores obtenidos al comparar cepas de distintas especies. Por otro lado, cabe destacar que el valor sugerido por el programa Biotyper 1.1 por el cual dos cepas pertenecen a la misma especie es mayor a 2, sin embargo, se ha visto experimentalmente que este valor es en muchos casos inferior a 2.

- El grupo *L. casei* está formado por *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* y *L. zae*. En el dendrograma se observa que *L. paracasei* forma una rama separada de la rama formada por *L. casei*, *L. rhamnosus* y *L. zae*. Además, se observa la dificultad para diferenciar entre las especies *L. casei*, *L. rhamnosus* y *L. zae*. Asimismo, el valor de $\log(score)$ obtenido al comparar cepas de la misma especie es de 1,375-2,052 para *L. casei*, de 0,961-2,748 para *L. rhamnosus*, y de 0,422-1,528 para *L. zae*. El valor obtenido al comparar *L. casei*/*L. rhamnosus* es de 1,067-2,028, al comparar *L. casei*/*L. zae* de 1,6-2,219 y de 1,246-2,031 al comparar *L. rhamnosus*/*L. zae*, de modo que se observa solapamiento de los valores de $\log(score)$ obtenidos al comparar cepas de la misma especie con el obtenido al comparar cepas de estas tres especies, lo que sugiere que no pueden ser diferenciadas por MALDI-TOF MS.
- El grupo *L. delbrueckii* contiene 3 de las 5 subespecies de esta especie (las otras dos no se incluyeron en el estudio).
- El grupo *L. plantarum* comprende en el caso de MALDI-TOF MS a *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. paraplantarum* siendo también difícil discriminar mediante esta técnica dichas especies. Además, los valores de $\log(score)$ generados al comparar cepas

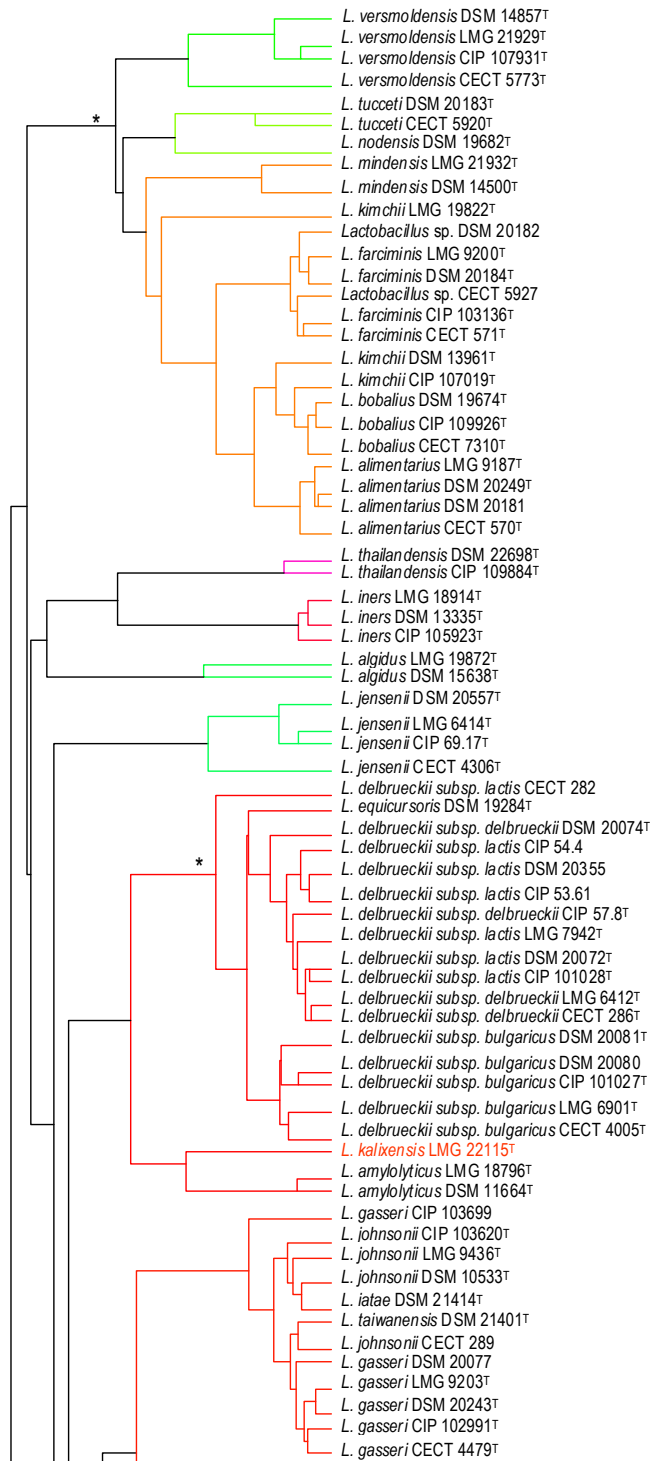
de la misma especie entre sí son 1,525-2,205 para *L. plantarum*, de 0,891-2,089 para *L. pentosus* y 1,200-1,210 para *L. paraplantarum*, mientras que al comparar *L. plantarum/L. pentosus* el valor obtenido es de 0,525-2,438, de 1,260-2,414 para *L. plantarum/L. paraplantarum* y de 0,183-1,830 para *L. pentosus/L. paraplantarum*, de modo que *L. plantarum*, *L. pentosus* y *L. paraplantarum* no pueden ser diferenciadas entre sí. Además, dentro de este grupo se encuentra *L. fabifermentans*, aunque *L. kimchii*, *L. mindensis* y *L. farciminis* se encuentran alejados. Mediante secuencias de 16S rRNA resulta muy difícil diferenciar entre *L. mindensis* y *L. farciminis*, pero mediante MALDI-TOF es posible su discriminación, tal y como se observa en la figura 21 y mediante el valor de $\log(\text{score})$ que en el caso de *L. mindensis* es de 2,231-2,246, para *L. farciminis* de 2,338-2,624 y para *L. farciminis/L. mindensis* de 0,092-0,752.

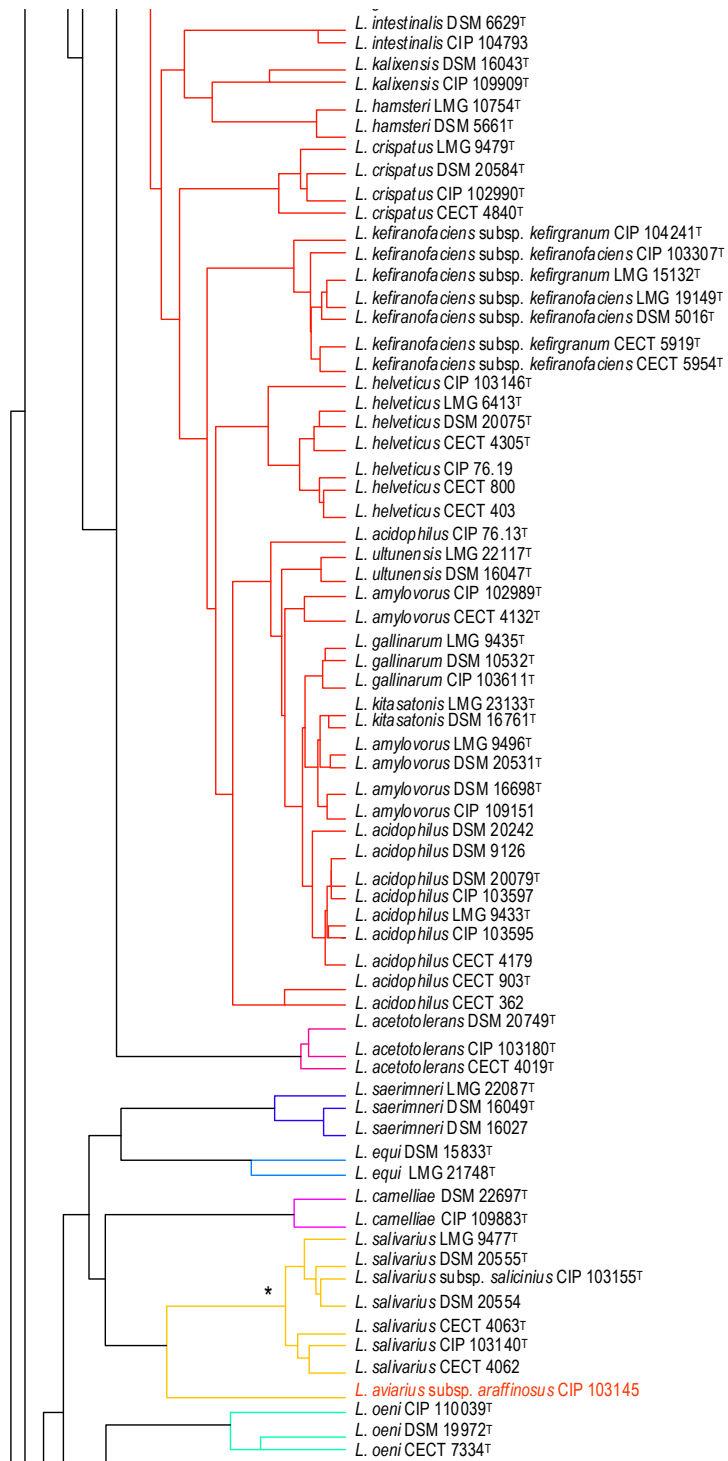
- El grupo de *L. reuteri* en MALDI-TOF está formado por *L. reuteri* y *L. frumenti* bien diferenciados, mientras que quedan alejados de *L. suebicus* y *L. vaccinostercus* que a su vez forman otro grupo. *L. durianis* y *L. rossiae* no han sido incorporadas a este estudio.
- Del grupo de *L. sakei* forman parte *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. graminis* y *L. fucheunsis* del mismo modo que ocurre con el 16S rRNA, y como puede observarse en el dendrograma no es posible diferenciar entre *L. curvatus* y *L. graminis*, además, en este caso los valores de $\log(\text{score})$ obtenidos son de 0,959-2,361 para *L. graminis*, de 1,880-2,335 para *L. curvatus* y de 0,619-1,780 para *L. graminis/L. curvatus*.
- Por último, el grupo de *L. salivarius* por MALDI-TOF MS está formado sólo por *L. salivarius*, mientras que *L. animalis* y *L. murinus* quedan alejados de éste quedando muy cercanos a *L. apodemi*. En este caso MALDI-TOF no permite la discriminación entre *L. murinus* y *L. animalis*. El valor de $\log(\text{score})$ obtenido es de 1,685-2,303 para *L. animalis*, de 1,804-

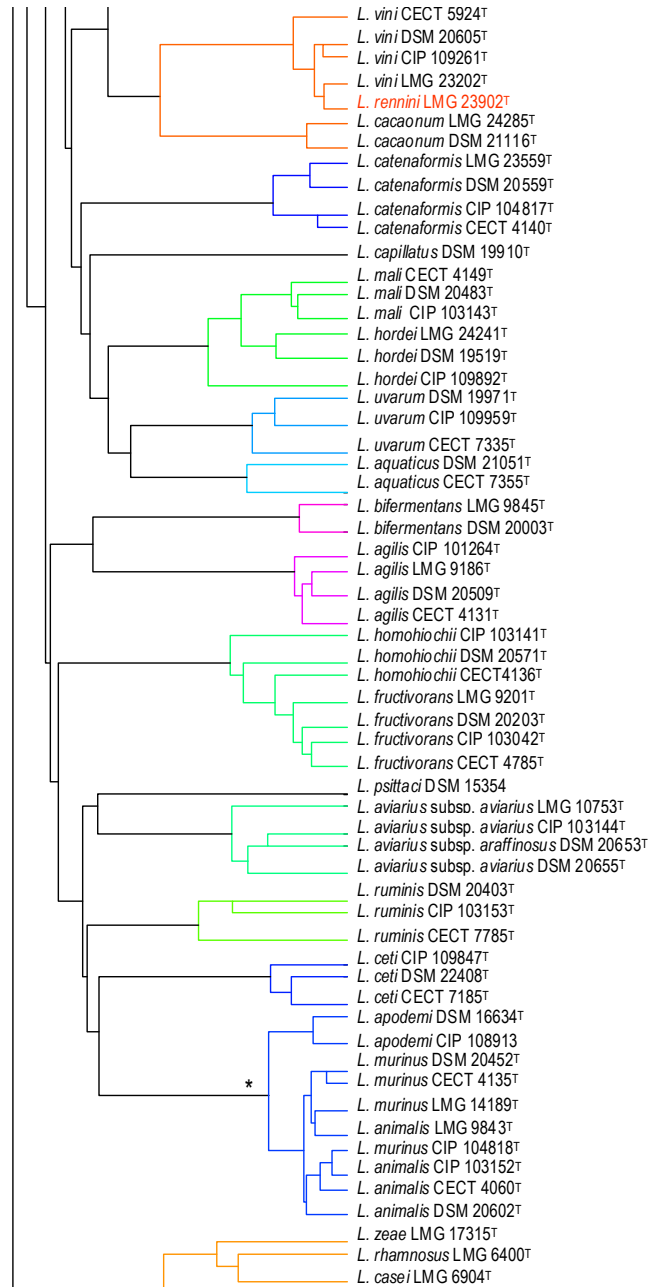
2,308 para *L. murinus* y de 1,441-2,531 para *L. animalis/L. murinus*.

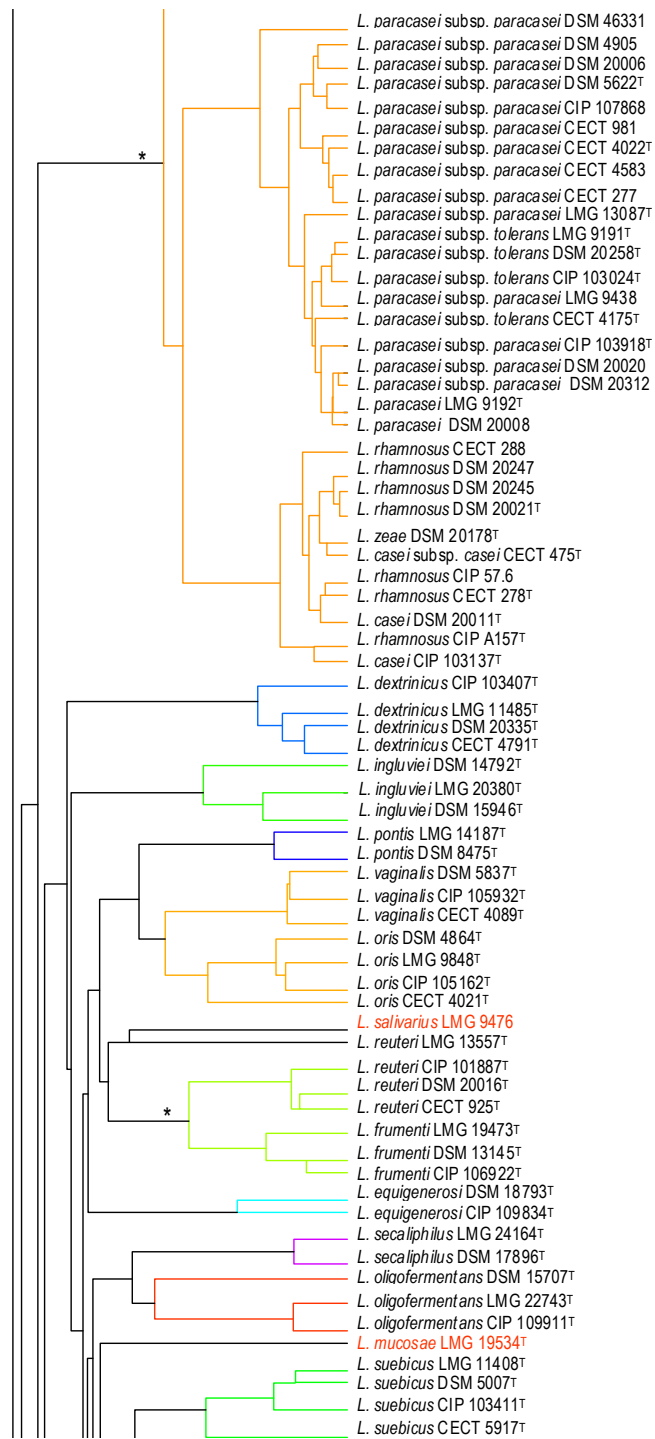
Muchos autores defienden que MALDI-TOF MS es capaz de discriminar entre especies cercanamente relacionadas y clasificar microorganismos a nivel de subespecie e incluso a nivel de cepa (Albesharat y col., 2011; Murria, 2010). En este estudio se demuestra que en el caso del género *Lactobacillus* la resolución taxonómica de MALDI-TOF MS alcanza, en general, hasta el nivel de especie, siendo incapaz de discriminar a nivel de subespecie como puede observarse en: *Lactobacillus delbrueckii* subsp., *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp., *Lactobacillus aviarius* subsp., *Lactobacillus paracasei* subsp., *Lactobacillus plantarum* subsp., *Lactobacillus coryniformis* subsp. y *Lactobacillus sakei* subsp. (figura 21). Además, también se observa un bajo poder de resolución para discriminar entre las siguientes especies: *L. animalis/L. murinus*, *L. rhamnosus/L. casei*, *L. plantarum/L. pentosus*, *L. collinoides/L. paracollinoides*, *L. kefiri/L. parakefiri/L. buchneri/L. parabuchneri*, *L. zymae/L. acidifarinae*, *L. graminis/L. curvatus*, *L. farraginis/L. parafarraginis*, coincidiendo en estos casos también con un poder de resolución bajo para el gen 16S rRNA.

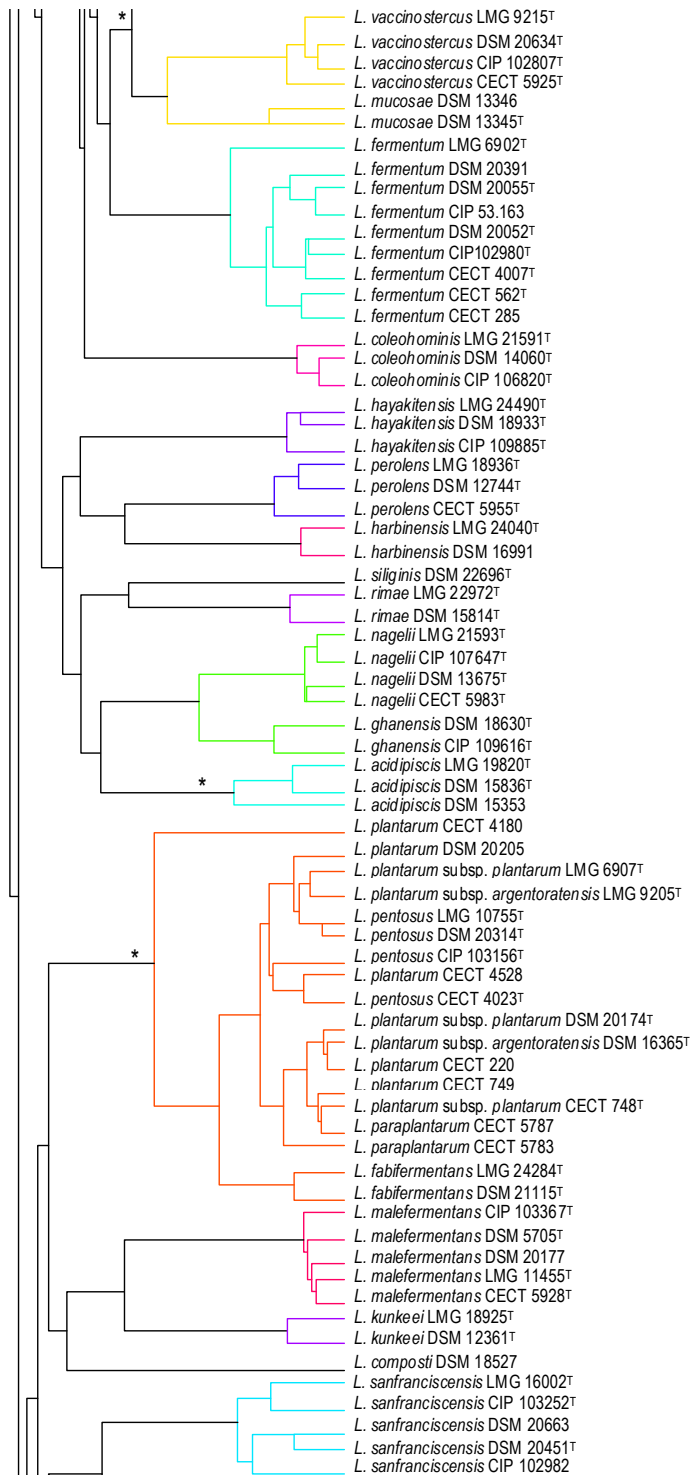
Figura 21. Dendrograma de MALDI-TOF MS de todas las cepas de *Lactobacillus* pertenecientes a la CECT, CIP, DSMZ y LMG. En rojo aquellas cepas en las que se detectó una incorrecta clasificación, una posible contaminación o un error en el etiquetado. Los grupos comentados en el texto están marcados por un asterisco.

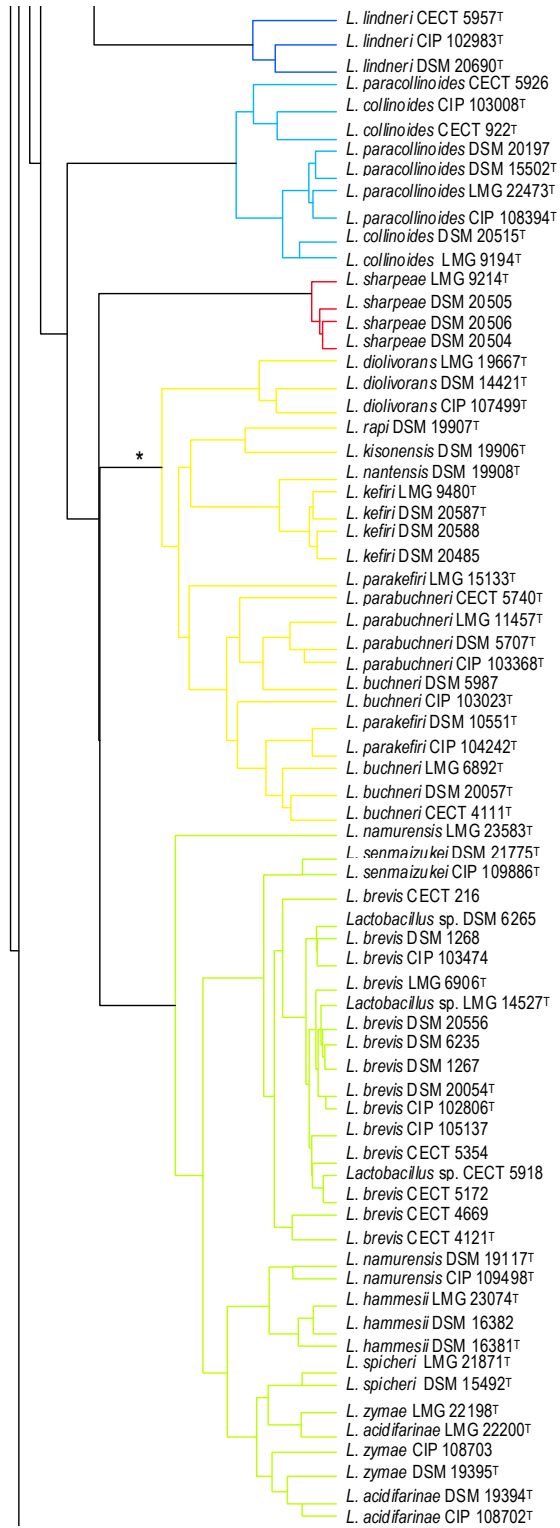


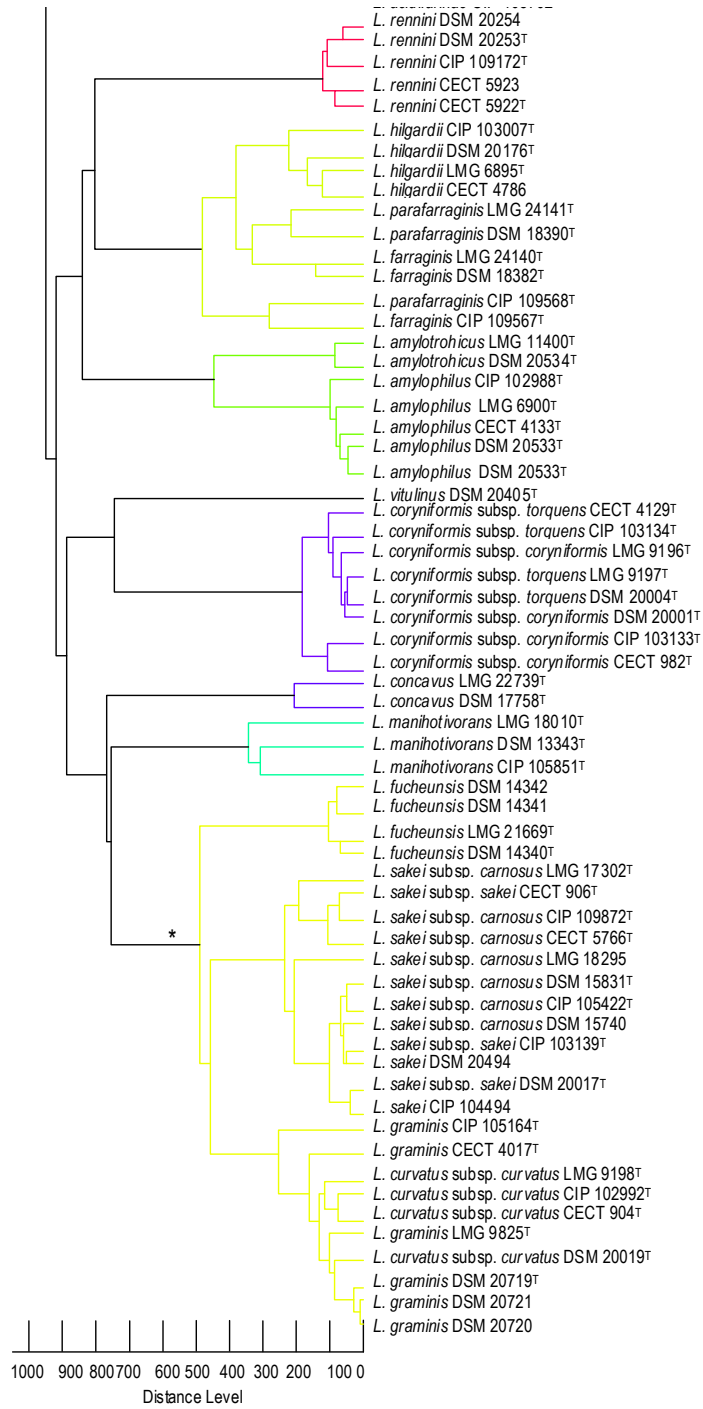












Mediante MALDI-TOF MS, y gracias a la alta sensibilidad y reproducibilidad de la técnica, se detectaron varias incidencias con cepas en las que se había producido una clasificación inadecuada, una contaminación o un error de etiquetado (figura 22), permitiendo un exhaustivo curado de las cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* depositadas en la CECT.

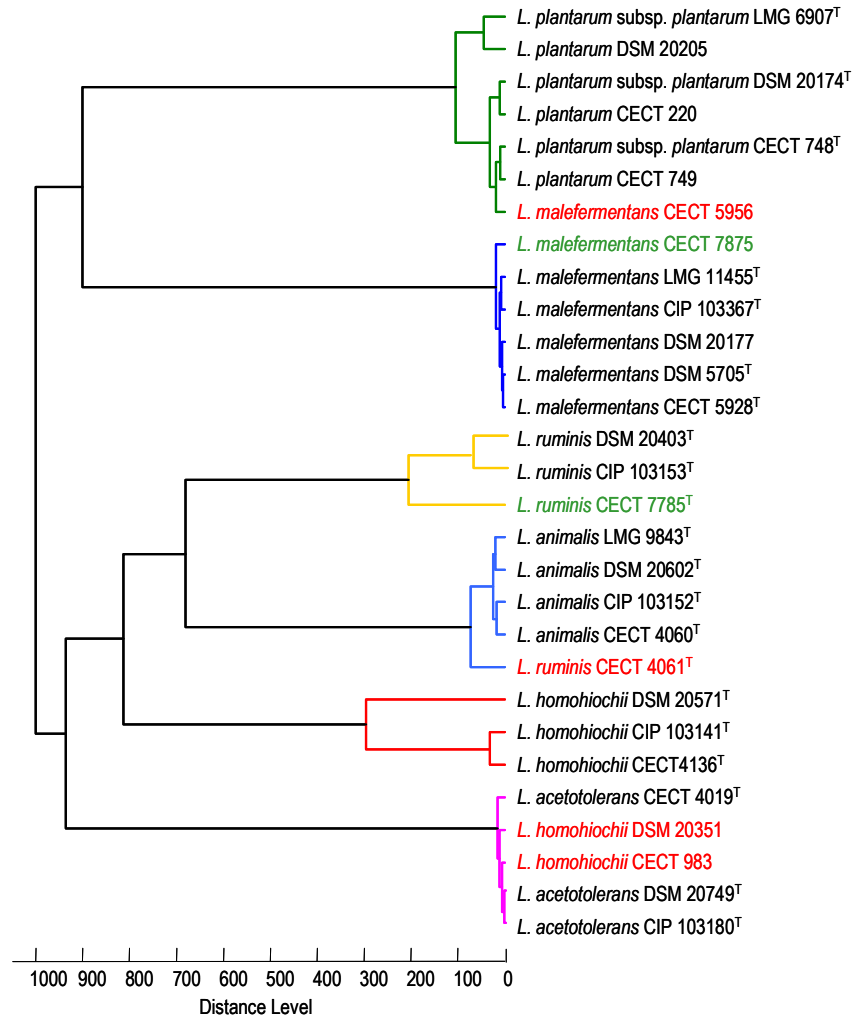


Figura 22. Dendrograma de MALDI-TOF MS de cepas de *Lactobacillus* donde se detectó una clasificación incorrecta de la cepa, una posible contaminación o un error en el etiquetado de la misma (en rojo) y su subsanación (en verde).

Como puede observarse en la figura 22, la cepa *L. malefermentans* CECT 5956 (en rojo) se agrupa con *L. plantarum* y no con *L. malefermentans*, como cabría esperar. Asimismo, atendiendo a los valores de $\log(\text{score})$, *L. malefermentans* CECT 5956 presenta un $\log(\text{score})$ de 2,241 con respecto a *L. plantarum* CECT 748^T y de 0,419 con respecto a *L. malefermentans* CECT 5928^T. Para confirmar los resultados obtenidos por MALDI-TOF MS se analizó el gen 16S rRNA, obteniéndose un 99,9% de similitud con la secuencia de la cepa tipo de *L. plantarum*. La cepa CECT 5956 fue depositada en la CECT en el año 2001 procedente de la cepa *L. malefermentans* DSM 20177, que a su vez procede de la ATCC 11305 y ésta de la NCIMB 8516 (figura 23). Puesto que la cepa DSM 20177 se une al grupo de *L. malefermentans*, y dado que, según su historia de depósito, la cepa 5956 procede de la cepa DSM 20177, hay que asumir que el error se produjo en la CECT durante su procesamiento, ya que de esta cepa sólo existe un lote y se confirmó el resultado en varias unidades del mismo. Por ello, se procedió a su eliminación como cepa suministrable del catálogo de la CECT. Posteriormente, se volvió a solicitar la cepa a la DSMZ, numerándose este nuevo depósito como CECT 7875, y tras ser sometida al control por MALDI-TOF MS, se confirmó que casaba con el grupo *L. malefermentans* tanto por el dendrograma (figura 22, en verde), como por el valor de $\log(\text{score})$ que fue de 2,365 con respecto a *L. malefermentans* CECT 5928^T.

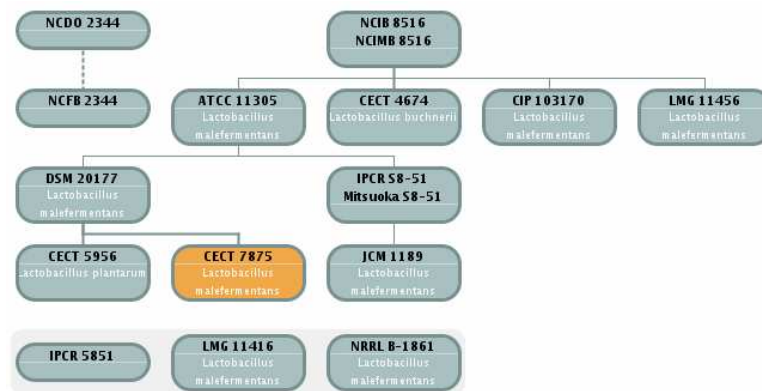


Figura 23. Historia de depósito de las cepas equivalentes de *Lactobacillus malefermentans* CECT 5956. Fuente: StrainInfo.

Del mismo modo, se observó que el perfil de *L. ruminis* CECT 4061^T no casaba con el del grupo de *L. ruminis*, sino que se unía a *L. animalis* (Figura 22, en rojo). El valor de $\log(\text{score})$ de *L. ruminis* CECT 4061^T fue de 2,348 con respecto a *L. animalis* CECT 4060^T y de 0,509 con respecto a *L. ruminis* CIP 103153^T. En este caso la secuenciación del gen 16S rRNA, también confirmó los resultados obtenidos por MALDI-TOF MS, ya que se obtuvo un 99,9% de similitud con la secuencia de la cepa tipo de *L. animalis* y sólo un 93,5% con la de *L. ruminis*. En la historia de depósito de *L. ruminis* CECT 4061^T (figura 24) puede observarse, que la cepa original (RF1) fue depositada por M. J. Lathan, uno de los coautores que describieron la especie, en la NCDO con el número 2029, y por M. E. Sharpe, otro de los coautores, en dos colecciones diferentes, la ATCC (ATCC 27780) y la DSMZ (DSM 20403) (Sharpe y col., 1973). La cepa *L. ruminis* CECT 4061^T procede de la NCDO. Debido a que su equivalente de la CIP (CIP 103153^T) también procede de la NCDO y su identidad es correcta, y sabiendo que el primer lote de liófilos de la cepa CECT 4061^T se obtuvo el 13 de marzo de 1990, fecha que coincide con la obtención del primer lote de la cepa *L. animalis* CECT 4060^T, es probable que hubiera una contaminación o bien una confusión y se etiquetara *L. animalis* como *L. ruminis*. La cepa *L.*

ruminis CECT 4061^T se eliminó del catálogo de cepas suministrables, y se sustituyó por la cepa CECT 7785^T procedente de la DSMZ. *L. ruminis* CECT 7785^T (figura 22, en verde) se agrupa con sus cepas equivalentes de la CIP y DSMZ (CIP 103153^T, DSM 20403^T).

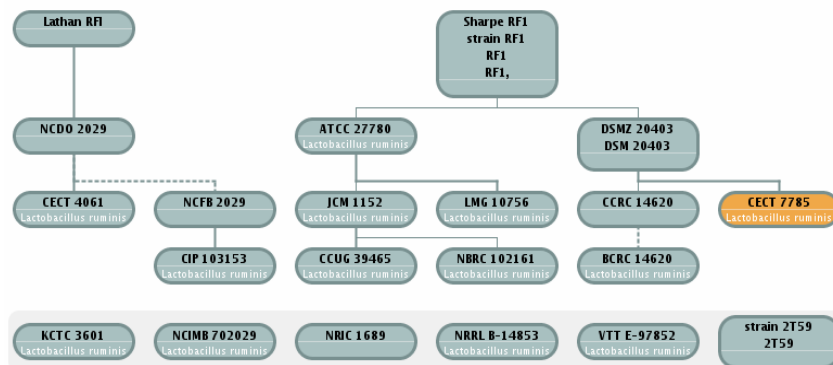


Figura 24. Historia de depósito de las cepas equivalentes *Lactobacillus ruminis* CECT 4061^T. Fuente: StrainInfo.

También se observó que la cepa *L. homohiochii* CECT 983 (figura 22, en rojo) casaba con su equivalente de la DSMZ (*L. homohiochii* DSM 20351), sin embargo, ambas cepas distaban del resto de *L. homohiochii* agrupándose con *L. acetotolerans*. *L. homohiochii* CECT 983 presenta un $\log(\text{score})$ de 2,302 con respecto a *L. acetotolerans* CIP 103180^T y de 0,064 con respecto a *L. homohiochii* CIP 103141^T, y *L. homohiochii* DSM 20351 presenta un $\log(\text{score})$ de 2,141 con respecto a *L. acetotolerans* CIP 103180^T y de 0,347 con respecto a *L. homohiochii* CIP 103141^T. Mediante la secuenciación del gen 16S rRNA se confirmó el resultado obtenido por MALDI-TOF MS, obteniéndose un 100% de similitud con la secuencia de la cepa tipo de *L. acetotolerans*. La historia de depósito de *L. homohiochii* CECT 983 (figura 25) muestra que la cepa original (S34) tiene dos líneas de depósito diferentes, fue depositada en la DSMZ (DSM 20351), más tarde la DSMZ proporcionó la cepa a la NCFB (NCFB 2402), y desde la NCFB llegó a la CECT (CECT 983). Paralelamente, la cepa S34 fue depositada en la RIB, y después en la

NBRC (IFO) donde se suministró a ATCC y JCM. Considerando que la DSMZ recibió la cepa directamente del depositante, se concluyó que probablemente la cepa original depositada no estaba correctamente clasificada, lo que queda ahora reflejado en los catálogos on-line de la CECT y DSM, siendo ambas cepas renombradas como *L. acetotolerans*. En este caso, no se ha considerado necesario el redepósito, puesto que no se trata de una cepa tipo y porque se asume que en su origen estaba mal identificada.

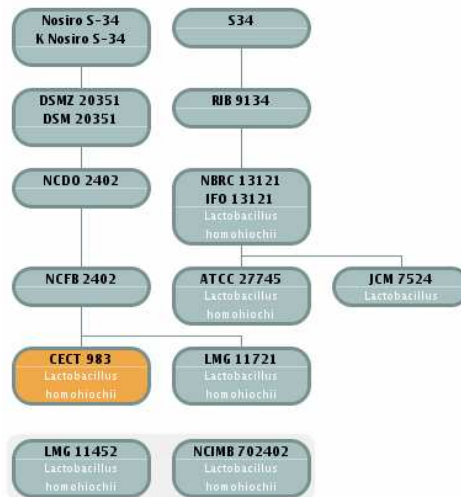


Figura 25. Historia de depósito de las cepas equivalentes de *Lactobacillus homohiochii* CECT 983. Fuente: StrainInfo.

Después de generar una librería curada de MALDI-TOF MS para el género *Lactobacillus*, y una vez se hubo determinado la sensibilidad de la técnica, es decir, su capacidad para discriminar entre especies de dicho género, y conociendo por otro lado sus limitaciones, en este caso su incapacidad para diferenciar entre determinadas especies (*L. animalis*/*L. murinus*, *L. rhamnosus*/*L. casei*, *L. plantarum*/*L. pentosus*, *L. collinoides*/*L. paracollinoides*, *L. kefir*/*L. parakefir*/*L. buchneri*/*L. parabuchneri*, *L. zymae*/*L. acidifarinae*, *L. graminis*/*L. curvatus*, *L. farraginis*/*L. parafarraginis*) y de discriminar a nivel de subespecie, se procedió a utilizar MALDI-TOF MS como herramienta rutinaria en el proceso de autenticación, realizado justo después de la generación de nuevo lote de liófilos. Así pues, a modo

de ejemplo se muestra la figura 26, donde se procedió a la autenticación de cepas comparando los perfiles obtenidos del nuevo lote preparado con los del lote anterior. El dendrograma (figura 26) muestra una correcta autenticación tanto para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CECT 4005^T, como para *L. agilis* CECT 4131^T y *L. acidophilus* CECT 903^T. Los valores de $\log(score)$ obtenidos fueron para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CECT 4005^T lote nuevo de 2,662 con respecto a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CECT 4005^T lote anterior y de 1,574 con respecto a *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* CECT 286^T, para *L. acidophilus* CECT 903^T lote nuevo de 2,455 con respecto a *L. acidophilus* CECT 903^T lote anterior y de 2,348 con respecto a *L. acidophilus* CECT 362, y para *L. agilis* CECT 4131^T lote nuevo de 1,757 con respecto a *L. agilis* CECT 4131^T lote anterior. Como ocurre con otras especies, en el caso de *L. agilis* el valor de $\log(score)$ por encima del cual dos cepas pertenecen a la misma especie (e incluso en este caso a la misma cepa) está por debajo de 2, a pesar de que en el dendrograma aparecen separados por un nivel de distancia muy bajo, lo que indica que no es posible trabajar con valores de corte absolutos y que la interpretación debe hacerse por personal con experiencia y analizando el conjunto de datos.

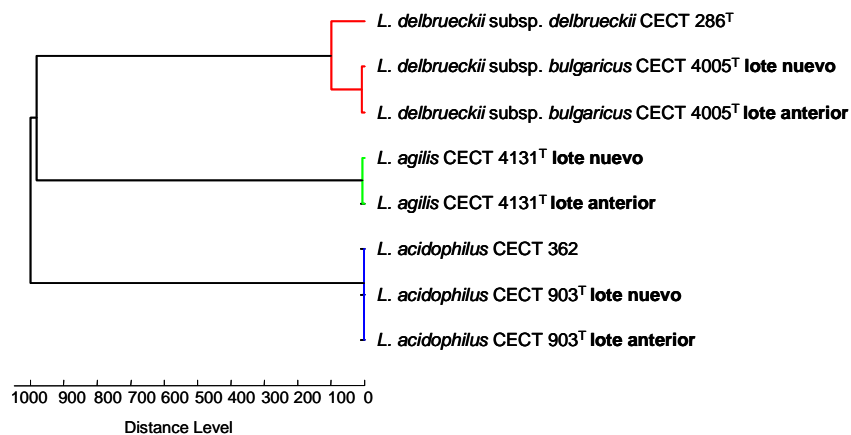


Figura 26. Dendrograma de cepas de *Lactobacillus* autenticadas mediante MALDI-TOF MS

1.2 Análisis interlaboratorio de cepas de la familia *Leuconostocaceae*

Un total de 107 cepas que representan 29 especies de la familia *Leuconostocaceae* (4 *Fructobacillus*, 11 *Leuconostoc*, 12 *Weissella* y 2 *Oenococcus*) pertenecientes a la CECT, CIP y DSMZ fueron analizadas mediante MALDI-TOF MS, con el fin de generar una base de datos curada para su utilización en el proceso de autenticación de las cepas depositadas en las Colecciones de Cultivos.

En el caso de la familia *Leuconostocaceae* la mayoría de las cepas equivalentes estudiadas se agruparon de forma correcta, aunque el nivel de distancia que las separa también dependió de la especie o incluso de la cepa.

En la figura 27 se muestra un dendrograma de MALDI-TOF MS de cepas de la CECT, CIP y DSMZ, donde se observa por un lado que las cepas se agrupan por género y por especie de la forma esperada, y por otro lado que la agrupación generada entre las cepas equivalentes es correcta, corroborando de este modo su equivalencia.

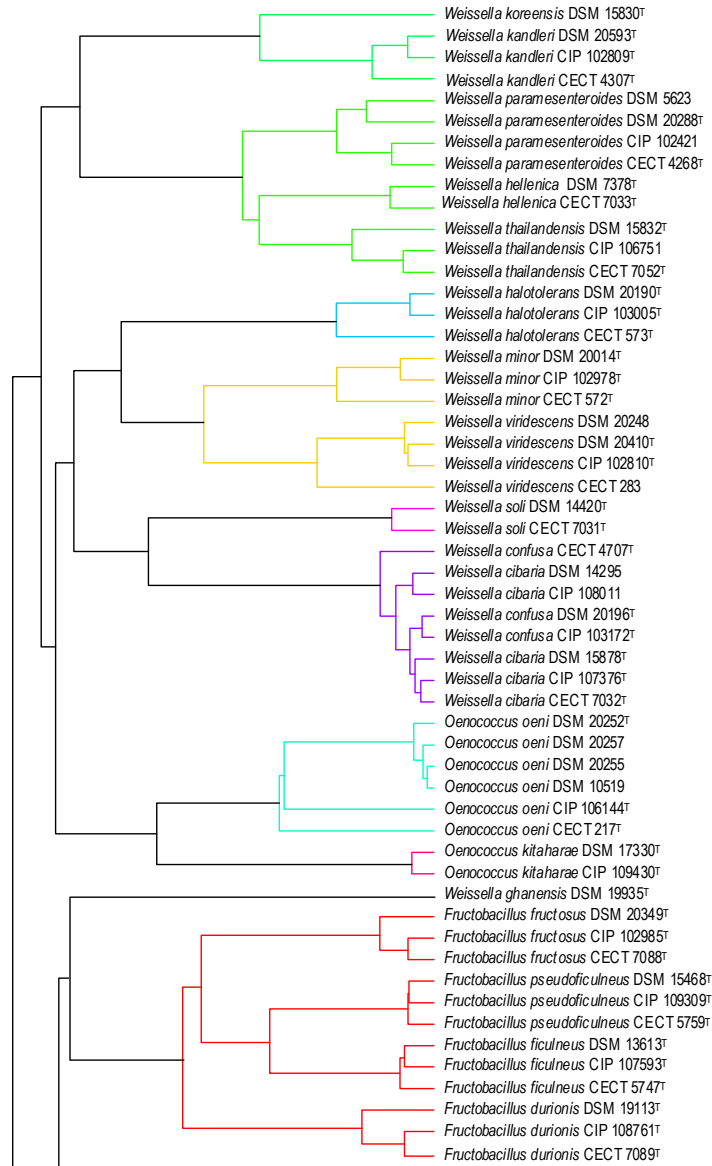
Basándose en el análisis de secuencia del 16S rRNA, el género *Leuconostoc* es relativamente compacto, salvo la especie *L. fallax*. Así las especies *L. argentinum*, *L. carnosum*, *L. citreum*, *L. gasicomitatum*, *L. gelidum*, *L. kimchii*, *L. lactis*, *L. mesenteroides* y *L. pseudomesenteroides* presentan una similitud de secuencia de 97,1-99,5%, mientras que *L. fallax* se queda a 94-95% del resto del género. El género *Oenococcus* contiene dos especies bien diferenciadas *O. oeni* y *O. kitaharae*. En el género *Weissella* se pueden apreciar cuatro grupos, una de las ramas contiene a *W. hellenica*, *W. paramesenteroides* y *W. thailandensis*, cuyas cepas tipo poseen entre 96,8-98,6% de similitud de secuencia del gen 16S rRNA, un segundo linaje que comprende a *W. cibaria* y *W. confusa*, el tercer grupo que engloba a *W. minor*, *W. viridescens* y *W. halotolerans* con una similitud de secuencia del 16S rRNA del 96,8-99,1%, y la cuarta rama está formada por *W. kandleri* y *W. korensi* (Schleifer y col., 2005; Björkroth y col., 2006). El género *Fructobacillus* fue propuesto

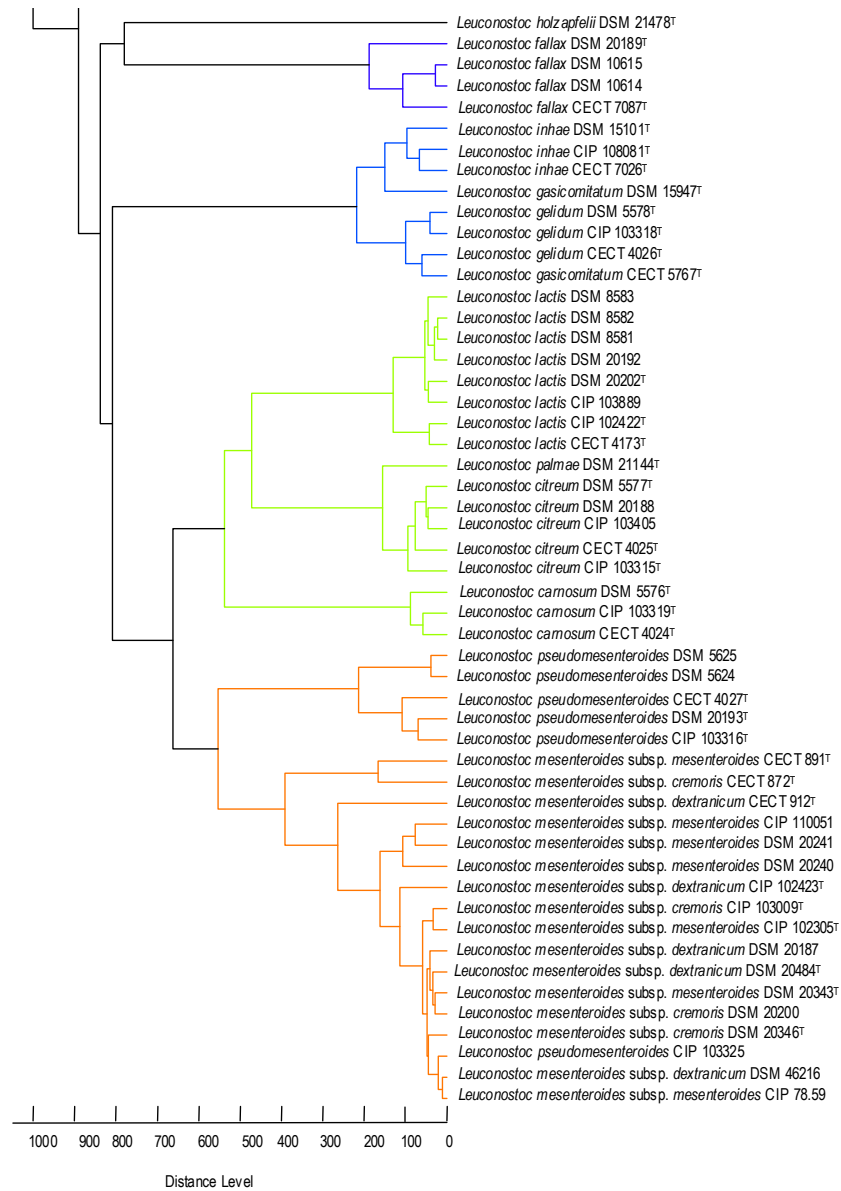
recientemente por Endo y Okada (2008) y engloba a las especies *F. pseudoficulneus*, *F. tropaeoli*, *F. ficulneus*, *F. durionis* y *F. fructosus*.

El agrupamiento generado por MALDI-TOF MS (figura 27) es congruente con el agrupamiento descrito basado en el gen 16S rRNA. Respecto al género *Leuconostoc*, la agrupación interna observada mediante el análisis de secuencia del gen 16S rRNA es la misma que la observada por MALDI-TOF MS, pero tal y como se muestra en el dendrograma (figura 27) la técnica no permite discriminar entre *L. gasicomitatum*/*L. gelidum*/*L. inhae*. Los valores de $\log(\text{score})$ obtenidos al comparar cepas de la misma especie son para *L. gasicomitatum* de 1,840-1,961, para *L. gelidum* de 2,020-2,183, para *L. inhae* de 1,995-2,335, mientras que para *L. gasicomitatum*/*L. gelidum* de 1,675-2,271, *L. gasicomitatum*/*L. inhae* 1,003-1,989, y para *L. inhae*/*L. gelidum* 1,283-2,013. El solapamiento obtenido entre estos valores confirma la falta de capacidad de la técnica para diferenciar entre estas especies. En el caso de *L. mesenteroides* y *L. pseudomesenteroides*, ambas especies pueden ser diferenciadas mediante MALDI-TOF MS, sin embargo, la cepa *L. pseudomesenteroides* CIP 103325, queda dentro del grupo de *L. mesenteroides*, lo cual es de extrañar teniendo en cuenta que su equivalente de la DSMZ (DSM 5624) se agrupa correctamente. En el género *Weissella* se aprecian los cuatro grupos previamente descritos, pero además hay otras dos especies, *W. soli* y *W. ghanensis*, que quedan separadas del resto de los grupos, la última de ellas queda incluso alejada del género *Weissella* (figura 27). Por otra parte, se observa la incapacidad de la técnica para discriminar entre *W. cibaria* y *W. soli*, lo que se corrobora mediante el valor de $\log(\text{score})$ obtenido que es 1,633-2,373 para *W. cibaria*, 1,925-2,385 para *W. confusa* y 1,020-2,033 entre ambas. Por último, tanto el género *Oenococcus* como *Fructobacillus* contienen especies que se separan correctamente mediante MALDI-TOF MS. Además, mediante el valor de $\log(\text{score})$ se observa que *O. oeni* presenta un valor de 0,822-2,433, *O. kitaharae* presenta un valor de 1,990-1,996, mientras que *O. oeni*/*O. kitaharae* tiene un valor de 0,570-0,780, en este caso la técnica permite

discriminar entre ambas especies, puesto que no hay solapamiento en los valores de $\log(score)$ pero de nuevo se incumple la suposición de que el valor mínimo para separar entre dos especies sea 2.

Figura 27. Dendrograma de MALDI-TOF MS de las cepas analizadas de la familia *Leuconostocaceae* pertenecientes a la CECT, CIP y DSMZ.





Este estudio permitió la detección de algunos errores en el etiquetado de las muestras, o incluso contaminaciones, como es el caso de *W. confusa* DSM 20196^T (figura 28, en rojo), que se agrupaba con *W. minor*, mientras que las equivalentes de la CECT y de la CIP se agrupaban correctamente. Por otro lado, *W. minor* DSM 20014^T (figura 28, en rojo) no casaba con el grupo de *W. minor*, sino con *W. confusa*, mientras que sus equivalentes de la CECT y CIP sí lo hacían.

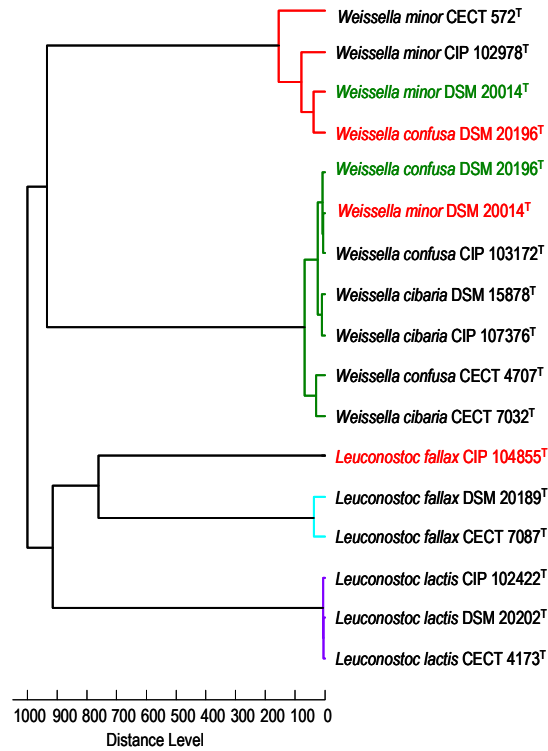


Figura 28. Dendrograma de MALDI-TOF MS de cepas de la familia *Leuconostocaceae* donde se detectó una incorrecta clasificación de la cepa, una posible contaminación o un error en el etiquetado de la misma (en rojo) y su subsanación (en verde).

La historia de depósito de la cepa tipo de *W. confusa* (548-D) muestra que fue depositada en dos colecciones distintas, la ATCC (ATCC 10881) y la NCIB (NCIB B-1064). La DSMZ adquirió la cepa de la ATCC, y las cepas de la CIP y CECT proceden de la NCIB (figura 29). Mientras que la historia de depósito de *W. minor* DSM

20014^T (figura 30), muestra que la cepa original fue depositada en 2 colecciones, en la DSMZ y en la NCIMB. Dado que la cepa *W. minor* CECT 572^T procede de la DSM 20014^T y se agrupa con *W. minor* como cabría esperar, se procedió a abrir un nuevo liófilo de *W. minor* DSM 20014^T y de *W. confusa* DSM 20196^T, para obtener de nuevo los perfiles proteicos mediante MALDI-TOF MS. Estos nuevos perfiles proteicos obtenidos fueron correctos (figura 28, en verde), por lo que se dedujo que simplemente hubo un error en el etiquetado de las muestras durante su primer procesamiento.

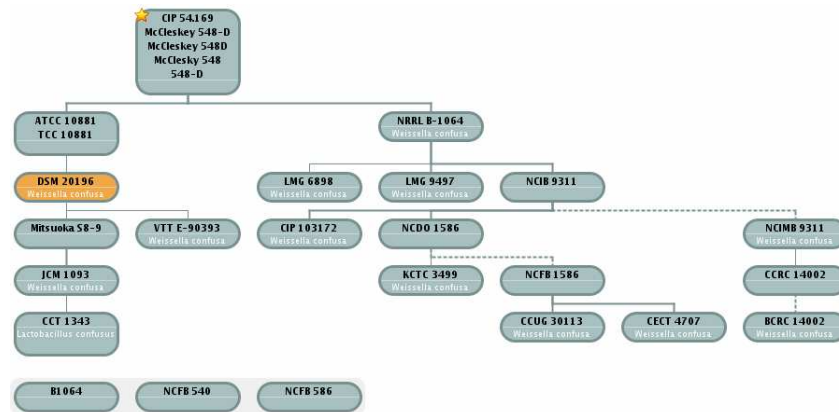


Figura 29. Historia de depósito de las cepas equivalentes de *Weissella confusa* DSM 20196^T. Fuente: StrainInfo.

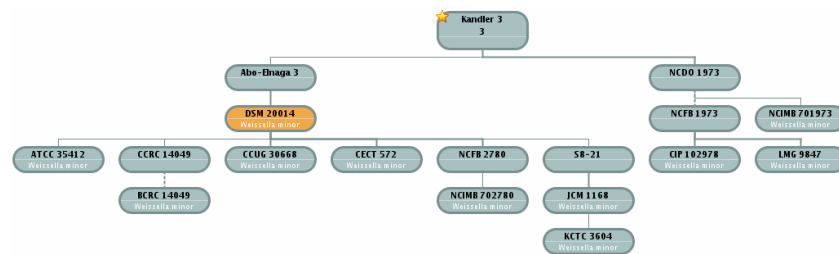


Figura 30. Historia de depósito de cepas equivalentes de *Weissella minor* DSM 20014^T. Fuente: StrainInfo.

Por último, se detectó que *L. fallax* CIP 104855^T no casaba con sus equivalentes de la CECT y DSMZ (*L. fallax* CECT 7087^T y *L. fallax* DSM 20189^T) (figura 28, en rojo). Posteriormente, la CIP confirmó mediante la secuenciación del gen 16S rRNA que la cepa conservada y procesada correspondía a *Lactobacillus hilgardii*, por lo que la eliminaron de su catálogo on-line.

Una vez curada la base de datos de MALDI-TOF MS para la familia *Leuconostocaceae*, y sabiendo que la resolución taxonómica para dicha familia alcanza hasta el nivel de especie, siendo incapaz de discriminar a nivel de subespecie como puede observarse en *L. mesenteroides* subsp., y que la técnica presenta un bajo poder de resolución para discriminar entre las siguientes especies: *L. mesenteroides*/*L. pseudomesenteroides*, *L. inhae*/*L. gasicomitatum*/*L. gelidum* y *W. confusa*/*W. cibaria*, se empleó la técnica como herramienta de autenticación, tal y como muestra la figura 31, donde se observan resultados satisfactorios tanto para *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* como para *O. oeni*, siendo el valor de $\log(\text{score})$ para *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* 1,235-1,533 entre los lotes y 1,525-2,382 para *O. oeni*.

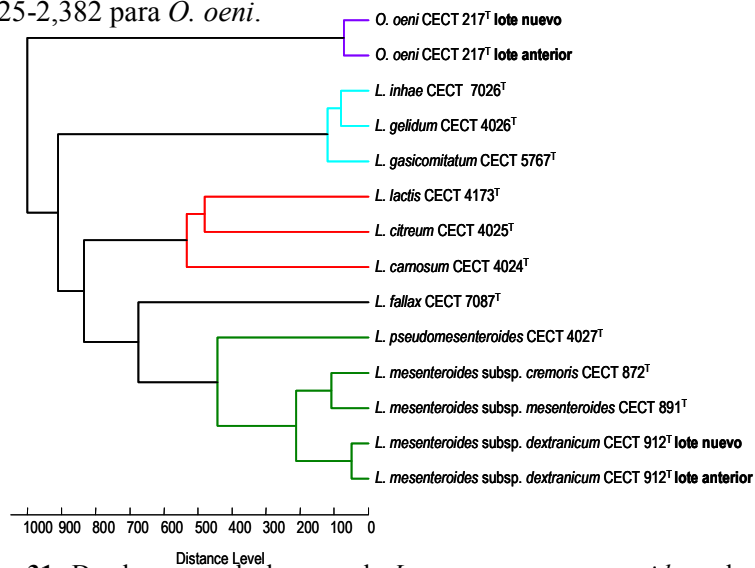


Figura 31. Dendrograma de la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* CECT 912^T y *O. oeni* CECT 217^T autenticadas mediante MALDI-TOF MS.

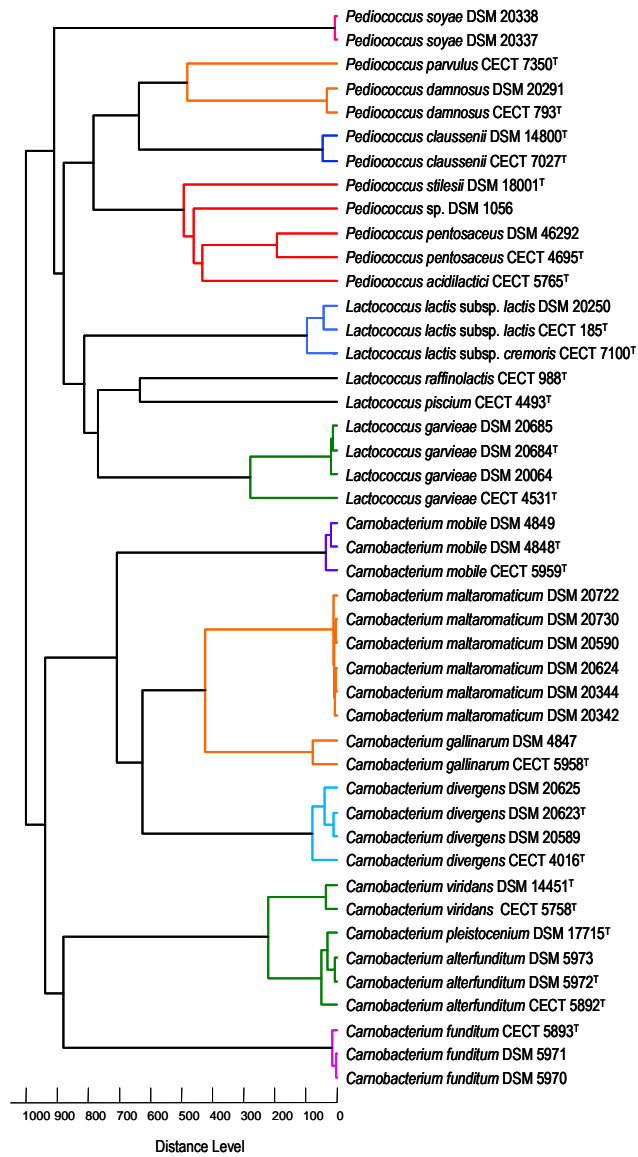
1.3 Análisis interlaboratorio de cepas de otros géneros de Bacterias Lácticas

En este apartado de la presente tesis doctoral se analizaron los perfiles obtenidos por MALDI-TOF MS de 45 cepas pertenecientes a 3 géneros que forman parte del grupo de Bacterias del Ácido Láctico pertenecientes a la CECT y DSMZ: 24 de *Carnobacterium*; 9 de *Lactococcus* y 12 de *Pediococcus*.

Como puede observarse en la figura 32, el dendrograma generado por MALDI-TOF MS muestra que para estas cepas existe una correcta separación a nivel de género y a nivel de especie. Respecto al género *Pediococcus* mediante la secuenciación del gen 16S rRNA se ha descrito la dificultad para separar entre *P. acidilactici* y *P. pentosaceus* (Hammes y col., 2006 b), MALDI-TOF MS permite la separación de ambas especies, tal y como se muestra en el dendrograma de la figura 32. Además, el valor de $\log(score)$ obtenido es 1,927-1,959 para *P. pentosaceus* y 1,102-0,618 para *P. acidilactici/P. pentosaceus*. La falta de solapamiento en estos valores indica una buena discriminación entre ambas especies. Asimismo, mediante secuenciación del gen 16S rRNA es conocida la estrecha relación existente entre *P. damnosus*, *P. parvulus* y *P. inopinatus*. El estudio llevado a cabo en esta tesis doctoral, sólo incluye a las dos primeras especies, las cuales quedan próximas entre sí, pudiendo ser diferenciadas (figura 32), lo que se corrobora también con el valor de $\log(score)$ que es 1,762-1,810 para *P. damnosus* y 0,705-0,816 para *P. damnosus/P. parvulus*.

Igualmente, MALDI-TOF MS permite una correcta separación a nivel de especie en el género *Lactococcus* (figura 32), siendo capaz de discriminar incluso a nivel de subespecie en el caso de *L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*, donde se observa que no hay solapamiento en el valor de $\log(score)$ puesto que dicho valor para *L. lactis* subsp. *lactis* es 2,004-2,043, mientras que para *L. lactis* subsp. *lactis/L. lactis* subsp. *cremoris* es 1,114-2,000.

Figura 32. Dendrograma de MALDI-TOF MS de cepas de Bacterias del Ácido Láctico (*Carnobacterium*, *Lactococcus* y *Pediococcus*) pertenecientes a la CECT y DSMZ.



Para el género *Carnobacterium* también se consigue una correcta agrupación. Además, pese a que en el dendrograma no se observa claramente la distinción entre *C. alterfunditum* y *C. pleistocenium* (figura 32), *C. alterfunditum* presenta un valor de $\log(\text{score})$ 2,331-2,730 mientras que para *C. alterfunditum/C. pleistocenium* es 1,872-2,206, de modo que al no existir solapamiento entre estos valores sería posible la distinción de ambas especies.

Una vez determinada la resolución taxonómica de MALDI-TOF MS para los géneros *Carnobacterium*, *Lactococcus* y *Pediococcus* y obtenida la librería, se procedió a usar la técnica como técnica de autenticación. En la figura 33, se muestra un dendrograma llevado a cabo tras la generación de un nuevo lote de liófilos de la cepa *C. divergens* CECT 4016^T, donde se observa que el perfil de la cepa del lote nuevo casa con el perfil de la cepa del lote anterior. El valor de $\log(\text{score})$ obtenido para estos dos perfiles fue 2,706-2,778.

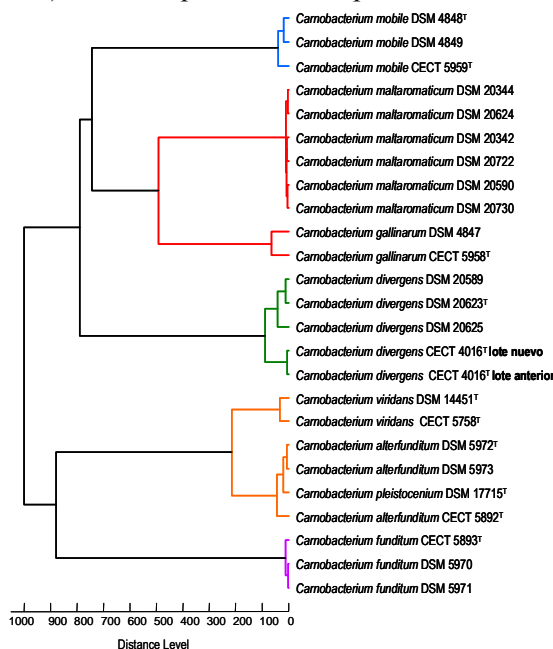


Figura 33. Dendrograma de la cepa de *Carnobacterium divergens* CECT 4016^T autenticada mediante MALDI-TOF MS.

1.4 Análisis de cepas del género *Pseudomonas*

Se analizaron 118 cepas del género *Pseudomonas* pertenecientes a la CECT, CIP y DSMZ mediante MALDI-TOF MS, lo que permitió el curado de las cepas depositadas en las colecciones y la generación de una base de datos para futuras autentificaciones.

En la década de los 90, gracias a la comparación de secuencias del gen 16S rRNA y algunas otras técnicas taxonómicas como la hibridación de ácidos nucleicos, se reevaluó la clasificación de las especies del género *Pseudomonas*. Un buen número de ellas fueron reclasificadas en otros géneros, incluso fuera de las *Gammaproteobacterias* (Moore y col., 1996; Anzai y col., 2000). Sin embargo, el poder de resolución del gen 16S rRNA para las especies que se retuvieron en el género *Pseudomonas* resulta muy bajo, por lo que se realizaron adicionales estudios basándose en las secuencias parciales de cuatro genes esenciales (16S rRNA, *gyrB*, *rpoB* y *rpoD*), de modo que se dividieron las especies del género *Pseudomonas* en dos grupos intragénicos principales, el grupo llamado *P. aeruginosa* y el grupo *P. fluorescens*. El linaje *P. aeruginosa* está a su vez formado por tres grupos (Mulet y col., 2010):

- Grupo de *P. aeruginosa* formado por 11 especies, entre las que se encuentra *P. aeruginosa* y *P. alcaligenes*.
- Grupo de *P. oleovorans*, que engloba a, *P. oleovorans*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. mendocina* y *P. alcaliphila*.
- Grupo de *P. stutzeri*, formado por *P. stutzeri*, *P. azotifigens*, *P. balearica* y *P. xanthomarina*.

El linaje de *P. fluorescens* está formado por tres grupos:

- Grupo de *P. fluorescens*, que a su vez está formado por varios subgrupos:
 - Subgrupo *P. fluorescens* que engloba a 20 especies. Forman parte de este subgrupo las especies: *P. simiae*, *P. tolaasii*, *P. fluorescens* y *P. marginalis*.
 - Subgrupo *P. gessardi* con 5 especies.

- Subgrupo *P. fragi* formado por 5 especies, entre las cuales se encuentran *P. fragi* y *P. psychrophila*.
- Subgrupo *P. mandelii* con 4 especies.
- Subgrupo *P. jessenii*. Formado por *P. jessenii*, *P. monhii*, *P. moorei* y 3 especies más.
- Subgrupo *P. koreensis*, que engloba a *P. koreensis* y *P. moraviensis*.
- Subgrupo *P. corrugata*, que contiene 5 especies.
- Subgrupo *P. chlororaphis*, formado por 3 especies.
- Subgrupo *P. asplenii*, que engloba a *P. asplenii* y *P. fuscovaginae*.
- *P. agarici* también forma parte del grupo de *P. fluorescens*, pero no forma ningún subgrupo.
- Grupo de *P. syringae*, formado por *P. syringae*, *P. cichorii*, *P. viridiflava*, *P. ficuserectae*, *P. avellanae*, *P. congelans*, *P. meliae* y 5 especies más.
- Grupo de *P. lutea* que engloba a 3 especies.
- Grupo de *P. putida* formado por 5 especies además de *P. putida* y *P. fulva*.
- Grupo de *P. anguilliseptica* que engloba a *P. anguilliseptica*, *P. peli*, *P. guineae*, *P. marincola* y *P. borbori*.
- Grupo de *P. straminea* formado por *P. straminea*, *P. argentinensis* y *P. flavescens*.

También se describieron separados de ambos linajes principales, el grupo *P. oryzihabitans* (formado por *P. oryzihabitans* y *P. psychrotolerans*), y las especies *P. luteola*, *P. pertucinogena*, *P. pachastrellae* y *P. rhizosphaerae*.

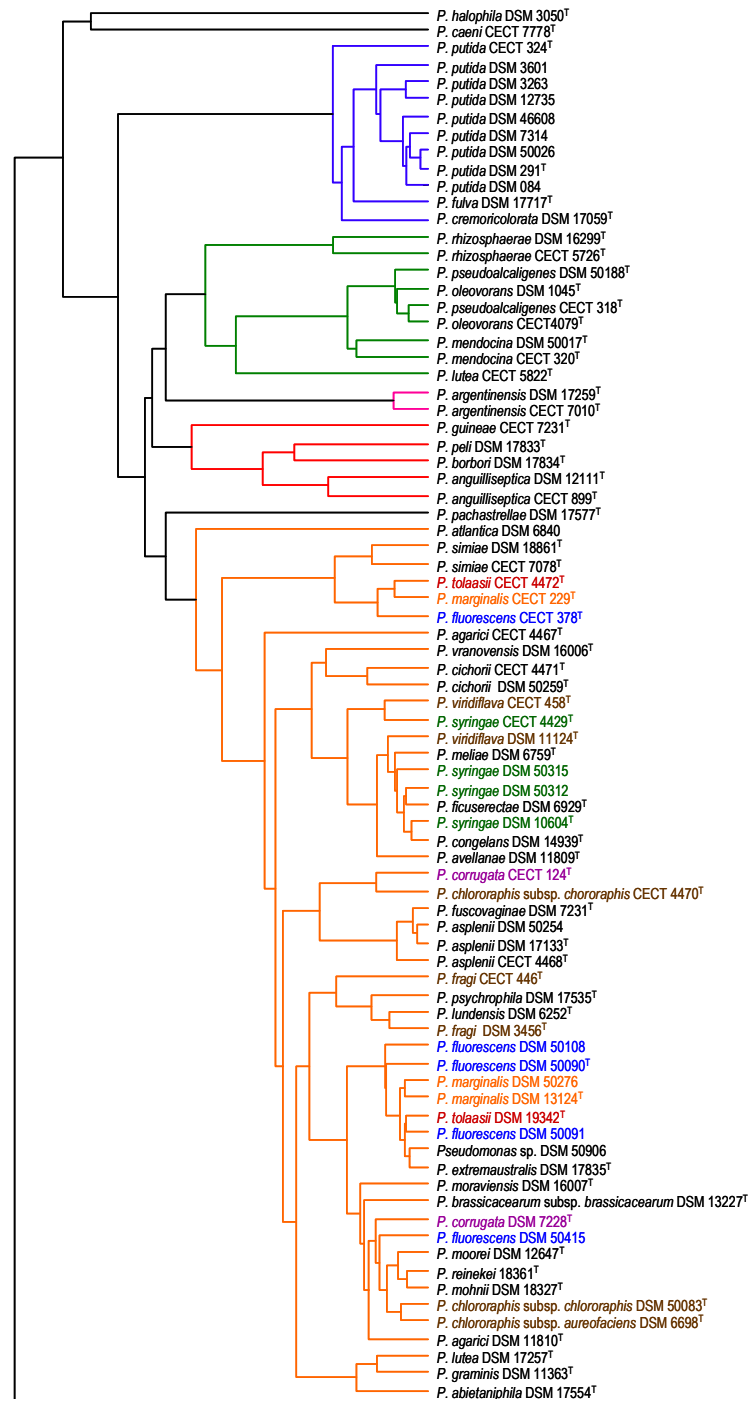
Sin embargo, en este estudio no se incluyeron otras especies descritas más recientes como *P. pelagia* (Hwang y col., 2009), *P. sabulinigri* (Kim y col., 2009), *P. xiamenensis* (Lai and Shao, 2008) y *P. xinjiangensis* (Liu y col., 2009).

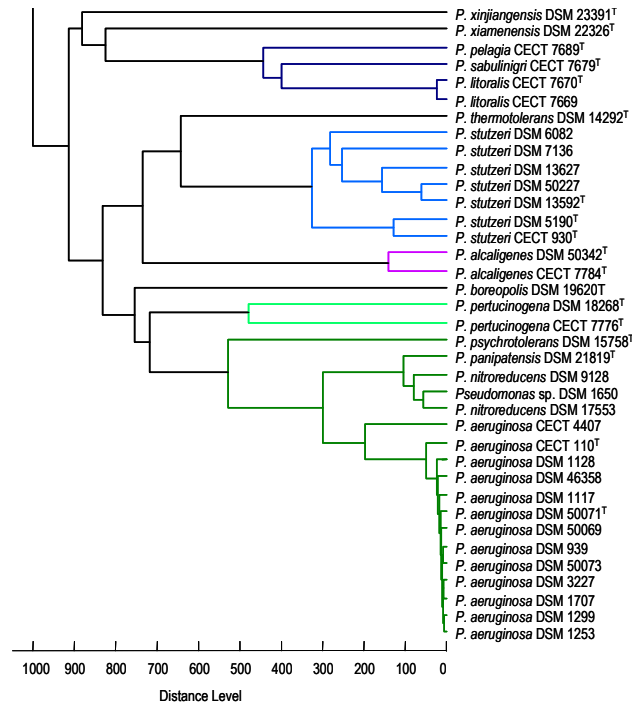
La agrupación generada mediante MALDI-TOF MS dista considerablemente de la descrita arriba en base a secuencias génicas. El dendrograma obtenido por MALDI-TOF MS (figura 34) presenta

dos ramas principales, la primera de ellas puede dividirse en ocho: 1a (*P. halophila*), 2a (*P. caeni*), 3a (*P. putida*, *P. fulva*, *P. cremoricolorata*), 4a (*P. rhizosphaerae*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. oleovorans*, *P. mendocina*, *P. lutea*), 5a (*P. argentinensis*), 6a (*P. guineae*, *P. peli*, *P. borbori*, *P. anquilliseptica*), 7a (*P. pachastrelae*) y 8a (*P. atlantica*, *P. simia*, *P. tolaasii*, *P. marginalis*, *P. fluorescens*, *P. agarici*, *P. vranovensis*, *P. cichorii*, *P. viridiflava*, *P. syringae*, *P. meliae*, *P. ficuserectae*, *P. congelans*, *P. avellanae*, *P. corrugata*, *P. chlororaphis*, *P. fuscovaginae*, *P. asplenii*, *P. fragi*, *P. psychrophila*, *P. lundensis*, *P. extremaustralis*, *P. moraviensis*, *P. brassicacearum*, *P. moorei*, *P. reinekei*, *P. mohnii* y *P. lutea*). La segunda rama puede dividirse en nueve grupos: 1b (*P. xinjiangensis*), 2b (*P. xiamenensis*), 3b (*P. pelagia*, *P. sabulinigri*, *P. litoralis*), 4b (*P. thermotolerans*), grupo 5b (*P. stutzeri*), 6b (*P. alcaligenes*) y el 7b (*P. boreopolis*), 8b (*P. pertucinogena*) y 9b (*P. psychrotolerans*, *P. panipatensis*, *P. nitroreducens* y *P. aeruginosa*).

En general, las cepas se agrupan de la forma esperada, agrupándose por especie, a excepción del grupo 8a donde se observa que las cepas equivalentes o bien cepas pertenecientes a la misma especie quedan dispersas dentro de dicho grupo, y el nivel de distancia que las separa es muy bajo en muchos casos. Cabe destacar también que las dos cepas equivalentes de *P. lutea* (CECT 5822^T y DSM 17257^T) se distribuyen en grupos diferentes, grupo 4a y 8a respectivamente. Se realizó la secuenciación del gen 16S rRNA de la cepa *P. lutea* CECT 5822^T, obteniéndose un 100% de similitud de secuencia con la cepa tipo de *P. lutea*, mientras que su equivalente de la DSMZ está siendo revisada.

Figura 34. Dendrograma de MALDI-TOF MS de cepas de *Pseudomonas* pertenecientes a la CECT, CIP y DSMZ.





La dificultad para discernir entre especies pertenecientes al grupo 8a también queda patente al estudiar el valor de $\log(\text{score})$, como ocurre en el caso de *P. tolaasii*, donde el valor de $\log(\text{score})$ entre cepas de la misma especie de *P. tolaasii* es de 2,059-2,276 (figura 34, en rojo), mientras que el valor observado entre cepas de distintas especies cercanas en el dendrograma es 1,952-2,081 para *P. tolaasii/P. marginalis* y 1,771-2,173 para *P. tolaasii/P. fluorescens*, de modo que existe un solapamiento entre el valor obtenido al comparar cepas de la misma especie con el valor obtenido al comparar cepas que pertenecen a diferentes especies. Igualmente el valor de $\log(\text{score})$ para *P. fluorescens* (figura 34, en azul) es 1,973-2,344, mientras que para *P. fluorescens/P. marginalis* es 2,022-2,431, 1,738-2,018 para *P. fluorescens/P. mohnii* y 1,771-2,173 para *P. fluorescens/P. tolaasii*. Asimismo, el valor de $\log(\text{score})$ para *P. syringae* (figura 34, en verde) es de 2,065-2,212, mientras que para *P. syringae/P. congelans* es 2,092-2,390, para *P. syringae/P. meliae* es 1,919-2,320 y para *P.*

syringae/P. ficuserectae es 1,750-2,308. El valor de $\log(\text{score})$ para *P. marginalis* es 1,966-2,377, mientras que para *P. marginalis/P. fluorescens* 1,889-2,433. Para *P. corrugata* (figura 34, en morado) el valor de $\log(\text{score})$ obtenido para *P. corrugata* es 1,244-1,894, y 1,170-1,458 para *P. corrugata/P. chlororaphis*. Sin embargo, en otros casos a pesar de que no existe un solapamiento en el valor de $\log(\text{score})$ con las especies cercanas en el dendrograma, también resulta difícil diferenciar entre determinadas especies, como ocurre con *P. chlororaphis* (figura 34, en marrón) donde las cepas pertenecientes a esta especie quedan dispersas dentro del dendrograma, pero el valor de $\log(\text{score})$ obtenido para *P. chlororaphis* es 2,267-2,413, mientras que el valor obtenido para la especie más cercana es 1,244-1,894 (*P. chlororaphis/P. corrugata*). Lo mismo ocurre con *P. fragi*, en este caso el valor de $\log(\text{score})$ obtenido para *P. fragi* es 2,246-2,260, mientras que para *P. fragi/P. ludensis* 1,986-2,181 y para *P. fragi/P. psychrophila* 1,306-2,064, y para *P. viridiflava* el valor de $\log(\text{score})$ obtenido es 2,544-2,533, 1,616-1,625 para *P. viridiflava/P. meliae* y 1,621-1,622 para *P. viridiflava/P. ficuserectae*. El hecho de que el resultado obtenido con el $\log(\text{score})$ no coincida en estas especies con la topología puede deberse a que el programa utilizado para realizar estos cálculos (Biotyper 1.1) utilice distintos parámetros para calcular el dendrograma y el valor $\log(\text{score})$.

Las especies pertenecientes al resto de grupos anteriormente descritos se pueden diferenciar entre sí por medio de MALDI-TOF MS, a excepción de *P. pseudoalcaligenes/P. oleovorans* (figura 34). El valor de $\log(\text{score})$ para *P. pseudoalcaligenes* es 2,577-2,589, para *P. oleovorans* 2,459-2,455 y para *P. pseudoalcaligenes/P. oleovorans* 2,133-2,640.

Lo observado anteriormente, se corrobora al representar dendrogramas que incluyen algunas de las especies que sí pueden discriminarse por MALDI-TOF MS con un número reducido de especies que pertenecen al grupo de las que no pueden separarse mediante este método (Figuras 35, 35 y 37).

En la figura 35, se observan que además de las especies *P. stutzeri*, *P. aeruginosa*, *P. putida* y *P. mendocina*, que ya se agrupaban correctamente en el dendrograma total (figura 34), las cepas pertenecientes a *P. pseudoalcaligenes* (CECT 318^T y DSM 50017^T), *P. fragi* (CECT 446^T y DSM 3456^T), *P. marginalis* (CECT 229^T, DSM 13124^T y DSM 50276), y *P. asplenii* (CECT 4468^T, DSM 17133^T y DSM 50254), y todas ellas se agrupan correctamente.

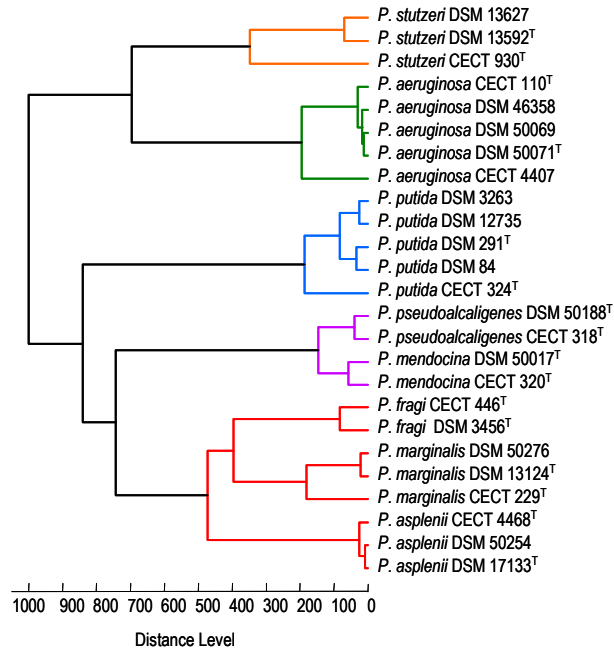


Figura 35. Dendrograma de MALDI-TOF MS de cepas de *Pseudomonas* fácilmente discriminables en el dendrograma general (*P. stutzeri*, *P. aeruginosa*, *P. putida* y *P. mendocina*), con otras que no lo son (*P. pseudoalcaligenes*, *P. fragi*, *P. marginalis* y *P. asplenii*)

Del mismo modo, la figura 36 muestra la correcta agrupación de las cepas equivalentes de *P. agarici* (CECT 4467^T y DSM 11810^T), *P. corrugata* (CECT 124^T y DSM 7728^T), *P. tolaasii* (CECT 4472^T y DSM 19342^T), y *P. viridiflava* (CECT 458^T y DSM 11124^T).

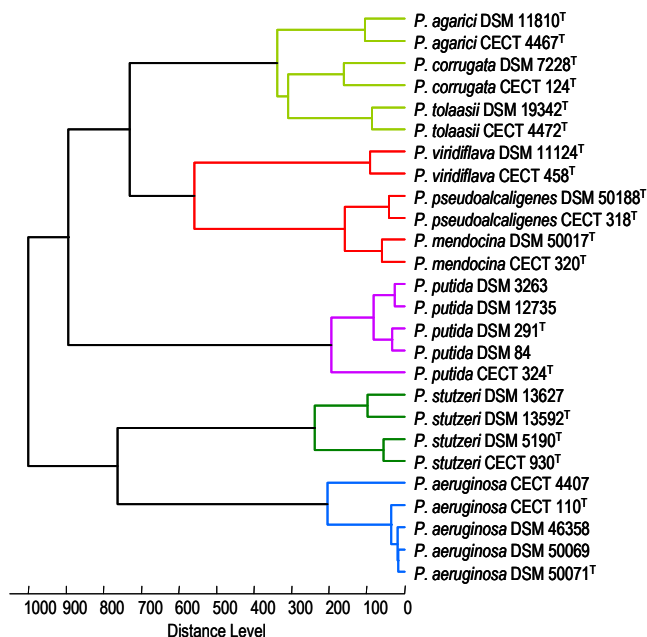


Figura 36. Dendrograma de MALDI-TOF MS de cepas de *Pseudomonas* fácilmente discriminables en el dendrograma general (*P. stutzeri*, *P. aeruginosa*, *P. putida* y *P. mendocina*), con otras que no lo son (*P. agarici*, *P. corrugata*, *P. tolaasii* y *P. viridiflava*).

Igualmente, en la figura 37 se observa el correcto agrupamiento de las cepas *P. syringae* (CECT 4429^T, DSM 10604^T, DSM 50312 y DSM 50315), *P. fluorescens* (CECT 378^T, DSM 50090^T, DSM 50091, DSM 50108), *P. chlororaphis* (CECT 4470^T y DSM 50083^T, DSM 6698^T) y *P. lutea* (CECT 5822^T y DSM 17257^T).

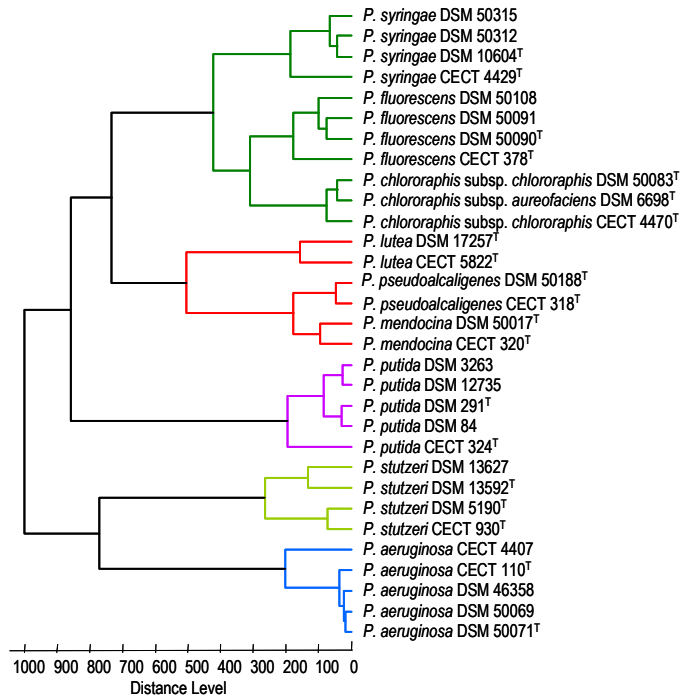


Figura 37. Dendrograma de MALDI-TOF MS de cepas de *Pseudomonas* fácilmente discriminables en el dendrograma general (*P. stutzeri*, *P. aeruginosa*, *P. putida* y *P. mendocina*), con otras que no lo son (*P. syringae*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis* y *P. lutea*).

Por tanto, la discriminación de especies dentro del género *Pseudomonas* mediante MALDI-TOF MS es difícil cuando se trabaja con todo el conjunto de cepas. En estos casos la resolución de la técnica no es muy alta, aunque este resultado mejora trabajando con menos cepas/especies.

Por otro lado, en el proceso de curado de las cepas de la CECT se detectó un error en una de ellas, *Pseudomonas alcaligenes* CECT 929^T. Esta cepa no casaba con su equivalente de la DSMZ (DSM 50342^T) como cabría esperar, sino que se agrupaba con *Stenotrophomonas maltophilia* CECT 115^T (figura 38, en rojo). El $\log(\text{score})$ obtenido al comparar *P. alcaligenes* CECT 929^T con *P. alcaligenes* DSM 50342^T fue 0,000, mientras que al comparar *P. alcaligenes* CECT 929^T con *S. maltophilia* CECT 115^T fue 2,461.

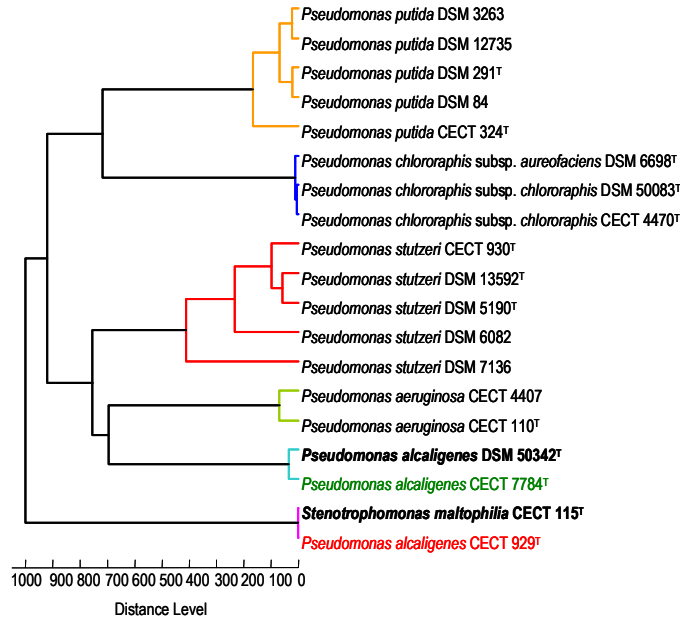


Figura 38. Dendrograma de MALDI-TOF MS de cepas de *Pseudomonas* donde se detectó una posible contaminación de *P. alcaligenes* CECT 929^T (en rojo) y su subsanación (en verde).

La historia de depósito de la cepa (figura 39) muestra que la cepa original 1577, fue depositada en la ATCC catalogada con el número 14909. La CECT adquirió en 1988 la cepa de la NCIMB a partir de la cepa depositada en la ATCC, mientras que la DSMZ recibió su cepa equivalente (DSM 50342^T) directamente de la ATCC. Se secuenció parcialmente el gen del 16S rRNA de *P. alcaligenes* CECT 929^T y se confirmó el resultado generado por MALDI-TOF MS, obteniéndose un 99,9% de similitud de secuencia con la cepa tipo de *Stenotrophomonas maltophilia*, este resultado se confirmó en los dos lotes anteriores, por lo que la cepa *P. alcaligenes* CECT 929^T fue eliminada del catálogo de cepas suministrables de la CECT, y se sustituyó por la cepa *P. alcaligenes* CECT 7784^T (figura 38, en verde) procedente de la CCM. El $\log(score)$ obtenido al comparar *P. alcaligenes* CECT 7784^T con *P. alcaligenes* DSM 50342^T fue 2,400, corroborando el resultado anterior.

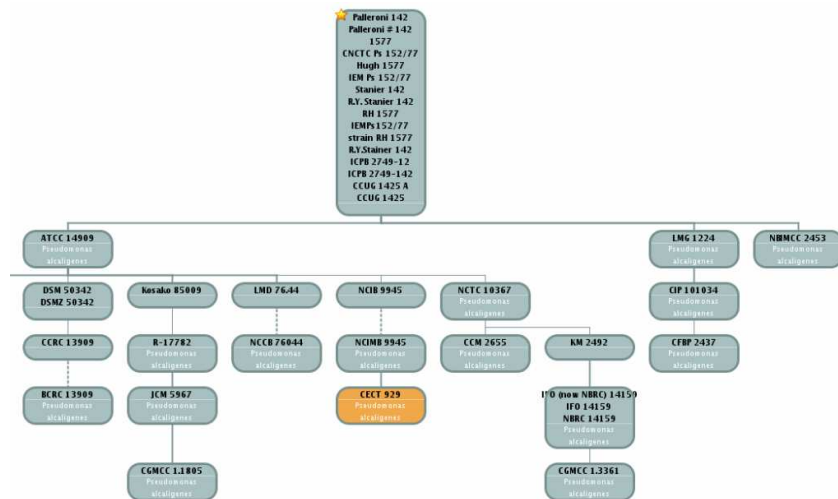


Figura 39. Historia de depósito de las cepas equivalentes de *P. alcaligenes* CECT 929^T. Fuente: StrainInfo.

Una vez curada la base de datos y determinada la resolución taxonómica de MALDI-TOF MS para el género *Pseudomonas*, se procedió a usar la técnica como técnica de autenticación. En la figura 40, se muestra un dendrograma del proceso de autenticación llevado a cabo tras la generación de nuevo lote de liófilos de la cepa *P. pertucinogena* CECT 7776^T, donde se observa que el perfil de la cepa del lote nuevo casa con el perfil de la cepa del lote anterior. El valor de $\log(score)$ obtenido para estos dos perfiles fue 2,538-2,549.

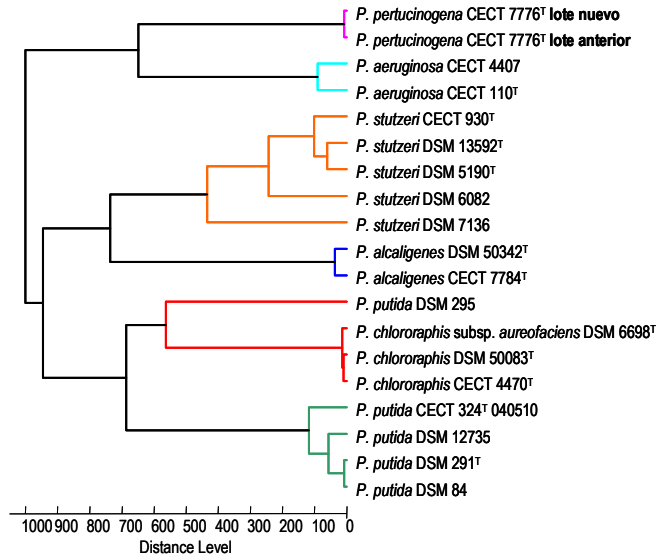


Figura 40. Dendrograma de la cepa de *Pseudomonas pertucinogena* CECT 7776^T autenticada mediante MALDI-TOF MS.

1.5 Análisis de cepas de la familia *Vibrionaceae*

Se analizaron por MALDI-TOF MS 76 cepas pertenecientes a la CECT incluidas en la familia *Vibrionaceae*, 56 del género *Vibrio*, 11 del género *Photobacterium*, 4 del género *Enterovibrio*, 3 del género *Aliivibrio*, 1 del género *Salinivibrio* y 1 del género *Grimontia*.

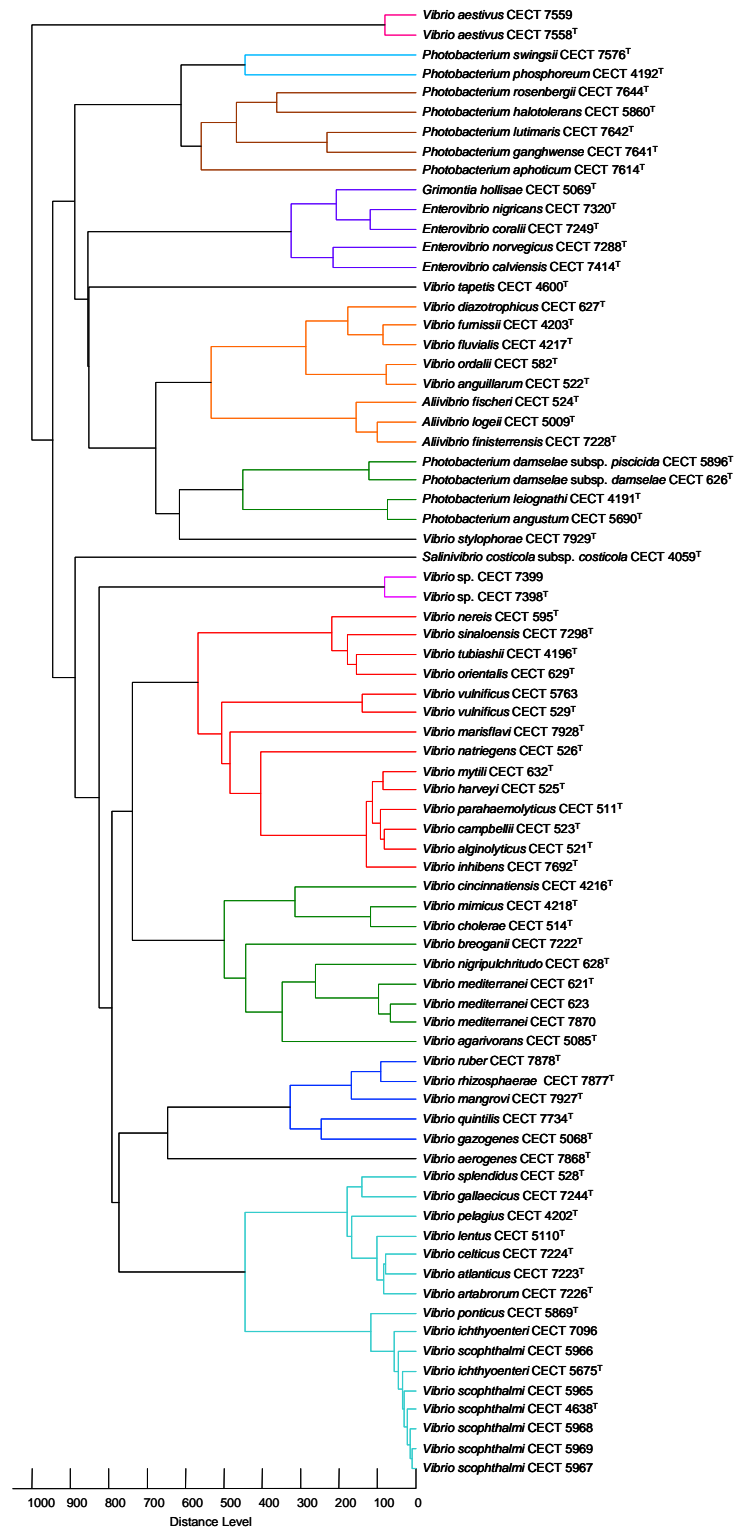
Sawabe y colaboradores (2007) estudiaron la familia *Vibrionaceae* mediante MLSA, basándose en el análisis de secuencias parciales de nueve genes (*ftsZ*, *gapA*, *gyrB*, *mreB*, *pyrH*, *recA*, *rpoA*, *topA* y 16S rRNA), de modo que se describieron 14 clados, 12 de los cuales están formados por especies del género *Vibrio*: el clado *Splendidus* (*V. splendidus*, *V. lentus*, *V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, *V. chagasii*, *V. pelagius*, *V. fortis*, *V. tasmaniensis*), el clado *Nereis* (*V. nereis*, *V. xuii*), el clado *Orientalis* (*V. orientalis*, *V. brasiliensis*, *V. hepatarius*, *V. tubiashii*), el clado *Coralliitycus* (*V. coralliitycus*, *V. neptunis*), el clado *Scophthalmi* (*V. scophthalmi*, *V. ichthyoenteri*), el clado *Diazotrophicus* (*V. diazotrophicus*, *V. hispanicus*), el clado *Cholerae* (*V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. mimicus*, *V. cincinnatiensis*, *V. metschnikovii*), el clado *Anguillarum* (*V. anguillarum*, *V. ordalii*, *V. aestuarianus*), el clado *Vulnificus* (*V. vulnificus*, *V. navarrensis*), el clado *Harveyi* (*V. harveyi*, *V. rotiferianus*, *V. campbellii*, *V. parahaemolyticus*, *V. natriegens*, *V. alginolyticus*, *V. mytili*), el clado *Halioticoli* (*V. halioticoli*, *V. gallicus*, *V. neonatus*, *V. ezurae*), el clado *Fischeri* (*V. fischeri*, *V. wodanis*). Otro formado por el género *Photobacterium*: clado *Photobacterium* (*P. profundum*, *P. angustum*, *P. leiognathi*, *P. phosphoreum*, *P. iliopiscarium*, *P. damsela*). Y otro que engloba a los géneros *Salinivibrio*, *Enterovibrio* y *Grimontia*: clado *Salinivibrio* (*S. costicola*, *G. hollisae*, *E. norvegicus*). Posteriormente a este estudio, se han descrito otros clados, como el clado *Gazogenes* (*V. gazogenes*, *V. ruber*, *V. rhizosphaerae*, *V. mangrovi*, *V. quintilis*) o el clado *Marisflavi* (*V. marisflavi*, *V. stylophorae*, *V. aestivus*) (Lucena y col., 2012) (<http://www.vibriobiology.net/>).

El dendrograma generado por MALDI-TOF MS (figura 41) muestra a nivel general una rama formada por dos cepas de *Vibrio aestivus* que

se separa del resto de cepas, y dos grupos principales, uno de los cuales incluye a la mayoría de las cepas pertenecientes al género *Vibrio* y a la única cepa del género *Salinivibrio* del estudio, y el otro al resto de cepas del género *Vibrio* (*V. stylophorae*, *V. ordalii*, *V. anguillarum*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. diazotrophicus* y *V. tapetis*) y a las cepas pertenecientes a los géneros *Photobacterium*, *Enterovibrio*, *Aliivibrio* y *Grimontia*. Además, el género *Photobacterium* queda fraccionado en dos grupos, uno de los cuales engloba a *P. swingsii*, *P. phosphoreum*, *P. rosenbergii*, *P. halotolerans*, *P. lutimaris*, *P. ganghwense*, *P. aphoticum* y el otro a *P. damsela* subsp. *piscicida*, *P. damsela* subsp. *damsela*, *P. leiognathi* y *P. angustum*. Por otro lado, el género *Grimontia* se une al género *Enterovibrio*.

A nivel de especie la agrupación generada es muy similar a la descrita por MLSA en cuanto a la formación de los clados, excepto *V. fluvialis* y *V. furnissii* que quedan fuera del clado *Cholerae* y, *V. stylophorae* y *V. aestivus* que quedan fuera del clado *Marisflavi*. En general, el nivel de distancia que separa las distintas especies entre sí es lo suficientemente alto como para permitir discernirlas, excepto en el caso de las especies *V. ichthyenteri/V. scopthalmi*, *V. anguillarum/V. ordalii*, *V. ruber/V. rhizosphaerae*, *P. leiognathi/P. angustum*, y de las especies que forman el clado *Harveyi* (*V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. parahaemolyticus*, *V. natriegens*, *V. alginolyticus*, *V. mytili* y *V. inhibens*) y el clado *Splendidus* (*V. splendidus*, *V. lentus*, *V. pelagius*, *V. atlanticus*, *V. artabrorum*, *V. celticus*, *V. gallaecicus*), donde la técnica MALDI-TOF MS presenta limitaciones para diferenciar entre especies. Del mismo modo se observa que el valor de $\log(\text{score})$ obtenido al comparar entre sí estas especies que presentan dificultades para ser diferenciadas es superior a 2, mientras que al comparar el resto de especies entre sí este valor no supera nunca el valor de 2.

Figura 41. Dendrograma de MALDI-TOF MS de cepas de la familia *Vibrionaceae* pertenecientes a la CECT.



En la figura 42, se muestra un dendrograma de cepas de *Vibrio* autenticadas mediante MALDI-TOF MS, después de la generación de nuevos lotes de liófilos a conservar. Como se observa, los nuevos perfiles de *V. diazotrophicus* y *V. harveyi* se agrupan correctamente con su correspondiente perfil del lote anterior, verificando la autenticación. El valor de $\log(\text{score})$ obtenido entre los lotes de *V. diazotrophicus* fue 2,741, y 2,624 en el caso de *V. harveyi*.

Sin embargo, en el caso de *V. furnissii* el perfil del lote nuevo ha quedado representado más próximo a *V. fluvialis* que al lote anterior, pese a que el valor de $\log(\text{score})$ entre lotes es más alto (2,709) que entre *V. furnissii* y *V. fluvialis* (2,449). Algo parecido sucede con las especies del clado *Splendidus* (*V. splendidus*, *V. lentus*, *V. pelagius*, *V. atlanticus*, *V. artabrorum*, *V. celticus*, *V. gallaecicus*), pues el lote nuevo de *V. lentus* se aproxima más a *V. celticus*, pese a que el valor de $\log(\text{score})$ con el lote anterior es 2,449 y algo menos (2,142) con *V. lentus*.

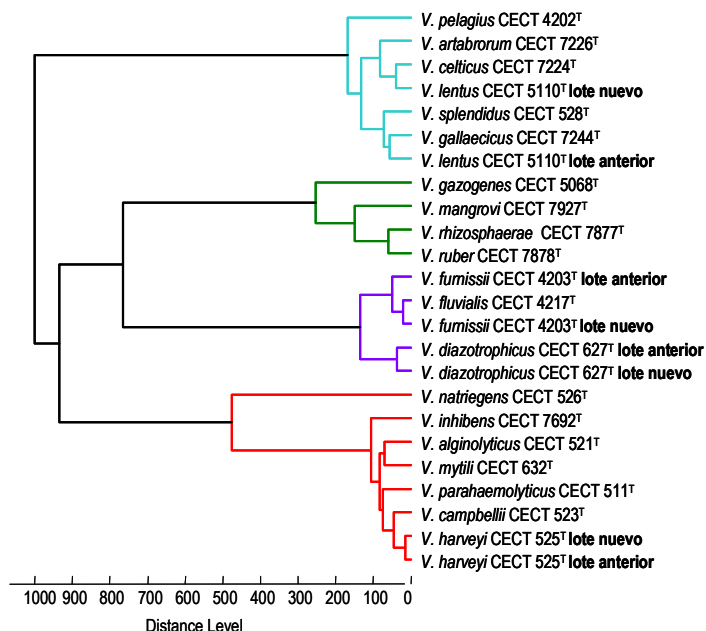


Figura 42. Dendrograma de cepas pertenecientes al género *Vibrio* autenticadas mediante MALDI-TOF MS.

1.6 Análisis de cepas del género *Aeromonas*

En este apartado se analizaron 70 cepas del género *Aeromonas* pertenecientes a la CECT mediante MALDI-TOF MS.

El género *Aeromonas* ha sido tradicionalmente dividido en dos grupos de especies dependiendo de su motilidad y de si son mesófilos o psicrófilos. En la actualidad, se utilizan otras técnicas moleculares para su clasificación como el análisis de secuencia del gen 16S rRNA. Sin embargo, esta técnica no tiene demasiada resolución en el género *Aeromonas*, debido a que dicho género presenta menos del 1% de variabilidad nucleotídica entre especies. Una de las técnicas más aceptada en los últimos tiempos en cuanto a su capacidad de discriminación en este género es el MLSA basado en el análisis de secuencias de genes como *dnaK*, *gtaA*, *gyrB*, *radA*, *rpoB*, *tsf* y *zipA*. Mediante MLSA se han descrito 11 clados del género *Aeromonas*, entre los que destacan tres: el clado *Veronii* (*A. veronii*, *A. allosaccharophila*), el clado *Hydrophila* (*A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida* y *A. popoffi*) y el clado *Caviae* (*A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila*) (Abbott y col., 2003; Martin-Carnahan y Joseph, 2005; Roger y col., 2012).

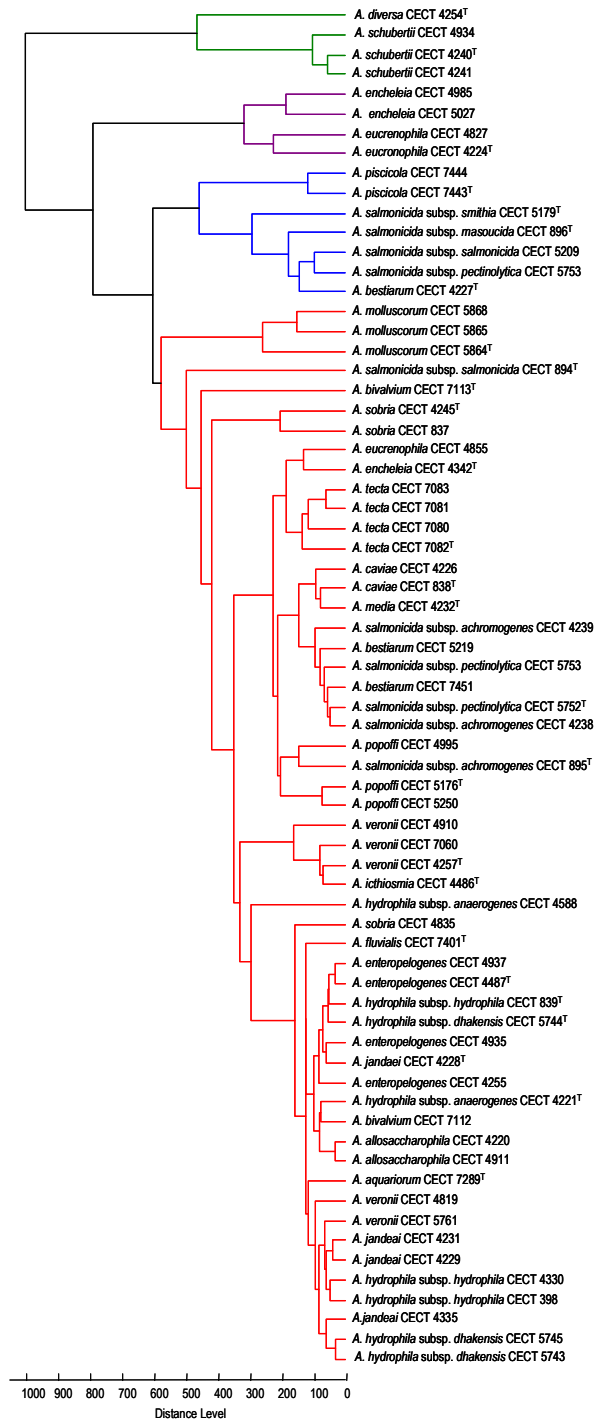
La agrupación generada mediante MALDI-TOF MS no se corresponde con la agrupación por clados mencionada anteriormente. En la figura 43 se muestra el dendrograma correspondiente, donde puede observarse la formación de dos grupos principales. El primero de ellos está formado por la cepa tipo de *A. diversa*, la cepa tipo de *A. schubertii* y dos cepas adicionales pertenecientes también a la especie *A. schubertii*.

El segundo grupo principal, está formado por dos horquillas, una de las cuales contiene a dos cepas pertenecientes a la especie *A. encheleia* (CECT 4985 y CECT 5027) y a la especie *A. eucrenophila* (CECT 4827 y CECT 4224^T). La segunda horquilla engloba a varios grupos bien diferenciados: *A. piscicola* (CECT 7443^T y CECT 7444), *A. molluscorum* (CECT 5864^T, CECT 7865 y CECT 7868), *A. tecta* (CECT 7082^T, CECT 7080, CECT 7081 y CECT 7083) y *A. allosaccharophila* (CECT 4220, CECT 4911). Y a un conjunto de

cepas que se dispersan por todo el ramal sin una agrupación definida: *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. sobria*, *A. popoffi*, *A. veronii*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. media*, *A. enteropelogenes*, *A. jandei*, *A. bivalvium*, sugiriendo una limitación de la técnica para diferenciar entre estas especies. Además, también contiene a la cepa tipo de *A. encheleia* (CECT 4342^T) y a otra cepa de *A. eucrenophila* (CECT 4855), lo que sugiere que estas dos especies tampoco se pueden diferenciar por MALDI-TOF MS.

El valor de $\log(\text{score})$ obtenido para *A. schubertii* fue 2,203-2,658, y para *A. schubertii/A. diversa* 1,347-1,871, del mismo modo para *A. molluscorum* fue de 2,166-2,663, y por debajo de 2,015 al comparar dicha especie con el resto. Estos valores indican la capacidad de la técnica para diferenciar estas especies. Sin embargo, en el resto de especies no se consigue una buena discriminación atendiendo a este valor, ya que en todos los casos el valor obtenido al comparar una especie con otra es igual o mayor que el valor obtenido al comparar esa misma especie con cepas pertenecientes a la misma especie, como por ejemplo ocurre con *A. popoffi* cuyo valor de $\log(\text{score})$ fue 2,216-2,572, *A. salmonicida* 1,739-2,581, mientras que *A. popoffi/A. salmonicida* fue 2,084-2,550, o como ocurre con *A. veronii* (2,285-2,579), y *A. jandei* (2,190-2,677), mientras que para *A. veronii/A. jandei* fue 2,190-2,677, de modo que hay un solapamiento en este valor entre diferentes especies, lo que indica una limitación de la técnica para diferenciarlas.

Figura 43. Dendrograma de MALDI-TOF MS de cepas del género *Aeromonas* pertenecientes a la CECT.



Debido a la aparente baja resolución de la técnica MALDI-TOF MS para diferenciar entre algunas especies de *Aeromonas*, se procedió al análisis de cepas que procedían del mismo lote, pero cuya extracción proteica y espectros habían sido obtenidos en distintos momentos, para estudiar su distribución en el dendrograma (figura 44). Además, se analizaron dos cepas que presentaban dos tipos de morfologías coloniales distintos, separando previamente estos dos tipos de colonias en placas diferentes y procediendo a la extracción proteica de su biomasa y a la obtención de los espectros: *A. poppoffi* CECT 5250 colonias opacas y *A. poppoffi* CECT 5250 colonias translúcidas, y *A. veronii* CECT 4819 colonias amarillas y *A. veronii* CECT 4819 colonias blancas (figura 44).

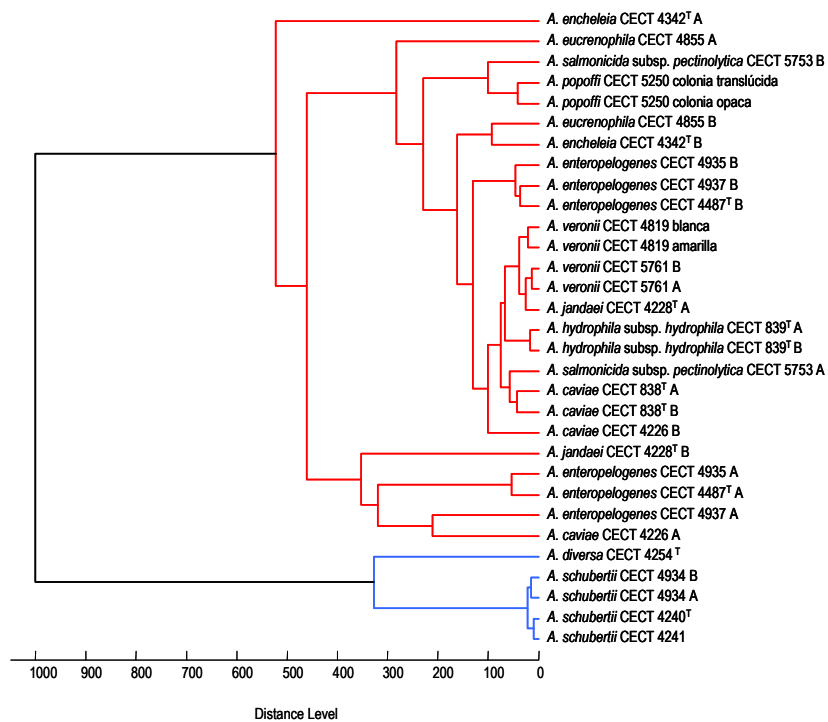


Figura 44. Dendrograma de MALDI-TOF MS de cepas de *Aeromonas* procesadas en dos momentos distintos (A y B), y de cepas que presentan dos morfologías coloniales (translúcido/opaca y blanca/amarilla).

Como se observa en la figura 44, se consigue una correcta agrupación entre las muestras obtenidas a partir del mismo material procesado en distintos días (A y B) para *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* CECT 839^T, *A. veronii* CECT 5761, *A. caviae* CECT 838^T y *A. schubertii* CECT 4934, pero no ocurre lo mismo en el caso de *A. encheleia* CECT 4342^T, *A. eucrenophila* CECT 4855, *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica* CECT 5753, *A. enteropelogenes* CECT 4935, *A. enteropelogenes* CECT 4937, *A. enteropelogenes* CECT 4487, *A. veronii* CECT 5761, *A. caviae* CECT 4226 y *A. jandaei* CECT 4228^T, mostrando de nuevo la poca resolución de la técnica para este género. Por otro lado, las cepas que presentaban dos tipos de morfologías coloniales distintos (*A. poppoffi* CECT 5250 colonias opacas y translúcidas, y *A. veronii* CECT 4819 colonias amarillas y blancas) se agrupan entre sí a baja distancia (figura 44), lo cual indica que no hubo ningún tipo de contaminación, sino que estas cepas presentan dos tipos de morfología colonial.

Se generaron diversos dendrogramas mediante MALDI-TOF MS seleccionando sólo determinadas especies para ver si de este modo podían diferenciarse entre sí, incluyendo en todos los casos dos especies que se pueden diferenciar correctamente por MALDI-TOF MS (*A. diversa* y *A. schubertii*). En las figuras 45, 46 y 47, se muestran algunos de éstos a modo de ejemplo.

En la figura 45 se observa que las cepas pertenecientes a la especie *A. sobria* y *A. enteropelogenes* se agrupan de la forma esperada, pero no ocurre lo mismo en el caso de *A. salmonicida* donde se generan dos grupos diferenciados, uno de los cuales incluye a cepas de las subespecies *smithia*, *salmonicida*, *pectinolytica*, *masoucida* y *achromogenes* y el otro a cepas de las subespecies *pectinolytica* y *achromogenes*.

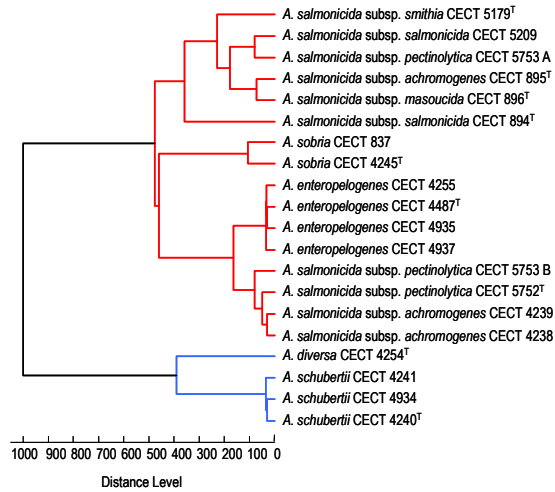


Figura 45. Dendrograma de MALDI-TOF MS generado para estudiar el agrupamiento de cepas de las especies: *A. salmonicida*, *A. enteropelogenes* y *A. sobria*, utilizando como raíz *A. diversa* y *A. schubertii*.

Del mismo modo, la figura 46 muestra que las cepas de *A. sobria*, *A. jandaei* y *A. allosaccharophila* se agrupan de la forma esperada, pero dentro de la especie *A. salmonicida* se genera la misma fragmentación que en la figura 45.

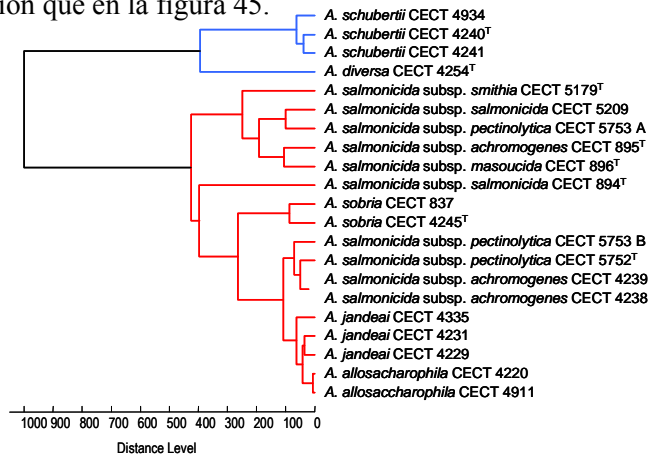


Figura 46. Dendrograma de MALDI-TOF MS generado para estudiar el agrupamiento de cepas de las especies: *A. salmonicida*, *A. sobria*, *A. jandaei* y *A. allosaccharophila*, utilizando como raíz *A. diversa* y *A. schubertii*.

La figura 47 presenta una incorrecta agrupación tanto de la especie *A. salmonicida* como de la especie *A. hydrophila*. La horquilla que contiene a ambas especies forma dos grupos, uno de ellos

contiene cepas de *A. salmonicida* de las subespecies *smithia*, *salmonicida*, *pectinolytica*, *masoucida* y *achromogenes*, y el otro cepas entremezcladas de *A. salmonicida* de las subespecies *salmonicida*, *pectinolytica* y *achromogenes* y de *A. hydrophila* de las subespecies *hydrophila* y *dhakensis*.

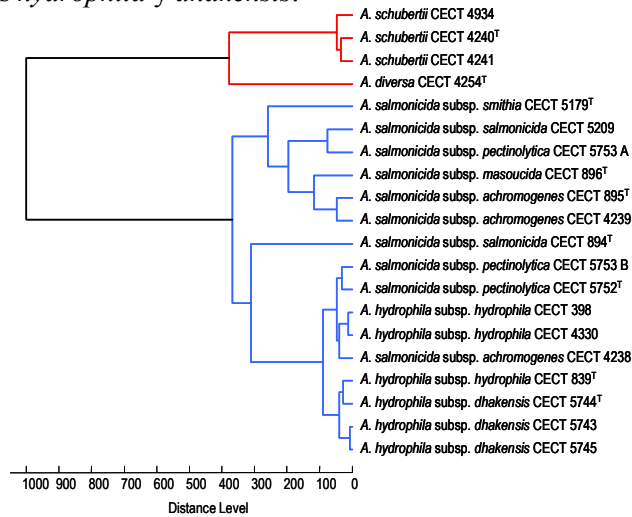


Figura 47. Dendrograma de MALDI-TOF MS generado para estudiar el agrupamiento de cepas de las especies: *A. salmonicida* y *A. hydrophila*, utilizando como raíz *A. diversa* y *A. schubertii*.

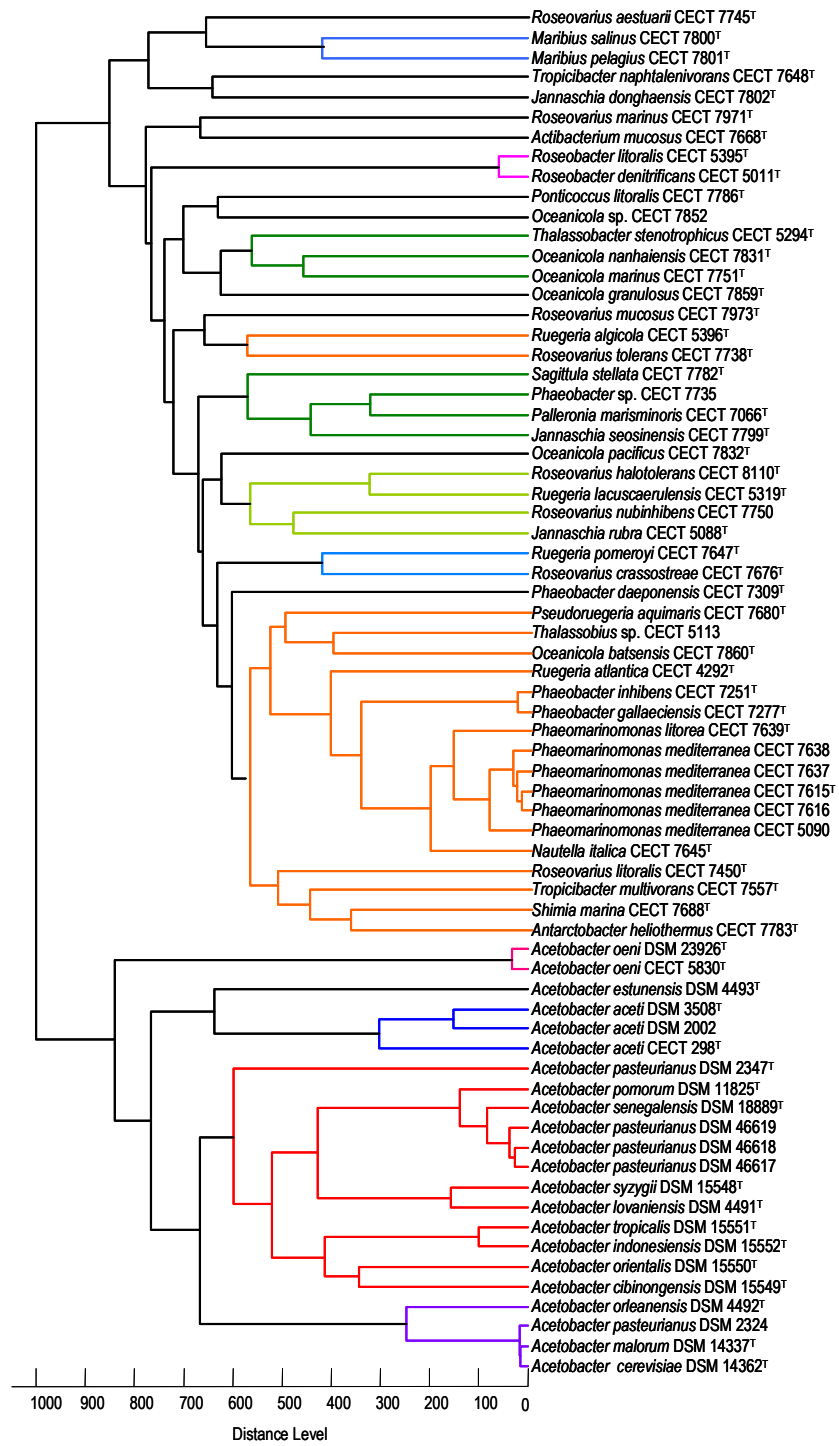
El conjunto de datos obtenidos evidencia que MALDI-TOF MS presenta una baja resolución para el género *Aeromonas*, ya que excepto en el caso de *A. schubertii*, *A. diversa*, *A. piscicola*, *A. molluscorum*, *A. tecta* y *A. allosaccharophila* no puede discriminar cepas a nivel de especie. A pesar de conseguirse una correcta autenticación en algunos casos, e incluso agrupar en la misma horquilla muestras procesadas procedentes de dos tipos de colonias formadas por una misma especie (figura 44), en muchos otros casos no proporciona una correcta autenticación, por lo que no puede ser considerada esta técnica adecuada para autenticar cepas pertenecientes al género *Aeromonas*, al menos a nivel de especie. No obstante, sería posible su utilización para autenticar cepas sólo hasta el nivel de género en caso de sospecha de una contaminación, etc.

1.7 Análisis de cepas de la clase *Alphaproteobacteria*

Se analizaron 47 cepas de la CECT pertenecientes a la familia *Rhodobacteraceae*, en concreto pertenecientes a los géneros: *Actibacterium*, *Antarctobacter*, *Jannaschia*, *Maribius*, *Nautella*, *Oceanicola*, *Palleronia*, *Phaeobacter*, *Phaeomarinomonas*, *Ponticoccus*, *Pseudoruegeria*, *Roseobacter*, *Roseovarius*, *Ruegeria*, *Sagitulla*, *Shimia*, *Thalassobacter* y *Tropicibacter*, y 21 cepas de la familia *Acetobacteraceae* procedentes de la CECT y DSMZ.

La figura 48, muestra el dendrograma de cepas de la familia *Rhodobacteraceae* y *Acetobacteraceae* analizadas por MALDI-TOF MS. Como puede observarse, en la familia *Rhodobacteraceae* a nivel de género no se genera una separación correcta, al menos en aquellos géneros donde hay dos o más especies estudiadas, excepto en el caso del género *Maribius*, donde quedan agrupadas sus dos especies (*M. salinus* y *M. pelagius*), el género *Roseobacter* donde se agrupan dos de sus especies (*R. litorales* y *R. denitrificans*) y el género *Phaeomarinomonas* que agrupa a sus dos especies (*Phaeomarinomonas litorea* y *Phaeomarinomonas mediterranea*). El género *Phaeobacter* agrupa a dos de sus especies (*Phaeobacter inhibens* y *Phaeobacter gallaeciensis*), sin embargo *Phaeobacter daeponensis* queda alejada del resto agrupándose a *Thalassobacter stenotrophicus*, *Oceanicola nanhaiensis* y *Oceanicola marinus*. Por otro lado, las cepas pertenecientes al género *Acetobacter* se agrupan de la forma esperada tanto a nivel de género como a nivel de especie, excepto en el caso de *Acetobacter pasteurianus*.

Figura 48. Dendrograma de MALDI-TOF MS de cepas de la clase *Alphaprotobacteria* pertenecientes a la CECT.



A pesar de la limitación de la técnica en agrupar de forma correcta los géneros en la familia *Rhodobacteraceae*, hay que señalar que las mismas dificultades aparecen cuando se estudian las secuencias del gen 16S rRNA. Por ello, se prestó atención a su validez para autenticar cepas pertenecientes a este grupo. Para lo cual se hicieron réplicas de algunas de las cepas (figura 49).

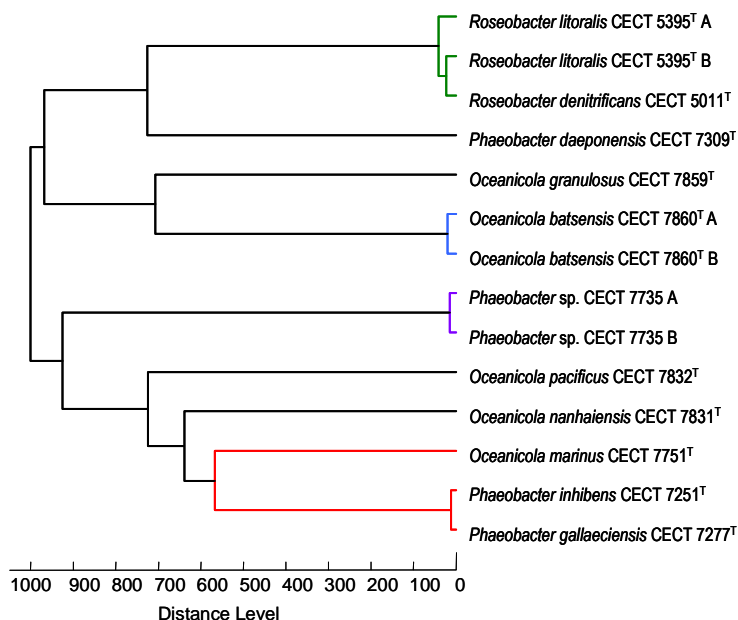


Figura 49. Dendrograma de MALDI-TOF MS de réplicas (A y B) de cepas pertenecientes a la familia *Rhodobacteraceae*.

Como puede observarse en la figura 49, se genera una correcta agrupación de las réplicas, excepto en el caso de *Roseobacter litoralis* CECT 5395^T, que queda más cercana a *Roseobacter denitrificans* CECT 5011^T, lo que sugiere la incapacidad de la técnica para diferenciar ambas especies. Esto podía observarse ya en el dendrograma de la figura 48, por el bajo nivel de distancia que se observa entre ambas cepas, y lo mismo ocurre entre *Phaeobacter inhibens* CECT 7251^T y *Phaeobacter gallaeciensis* CECT 7277^T. El valor de $\log(\text{score})$ obtenido para *Phaeobacter inhibens* CECT 7251^T/*Phaeobacter gallaeciensis* CECT 7277^T fue alto (2,007-2,239)

corroborando la similitud en los perfiles de ambas especies. Sin embargo, el valor de $\log(\text{score})$ para *Roseobacter litoralis* CECT 5395^T fue 2,618-2,624, mientras que para *Roseobacter litoralis* CECT 5395^T/*Roseobacter denitrificans* CECT 5011^T fue 1,441-1,674, pudiéndose discriminar ambas especies por medio del valor $\log(\text{score})$, pero no mediante el dendrograma.

Por lo que el análisis de los datos sugiere que MALDI-TOF MS puede utilizarse como técnica de autenticación en las cepas estudiadas pertenecientes a la clase *Alphaproteobacteria*, ya que es posible su discriminación a nivel de género, y a nivel de especie, excepto para *R. litoralis* y *R. denitrificans*, y probablemente también para *P. gallaeciensis* y *P. inhibens*.

1.8 Análisis de cepas del filo *Bacteroidetes*

Por último, se estudiaron mediante MALDI-TOF MS 17 cepas pertenecientes al filo *Bacteroidetes*, de las cuales 5 pertenecen a la clase *Sphingobacteria* y al orden *Sphingobacteriales* (*Cytophaga*, *Pontibacter*, *Cyclobacterium*), 10 a la clase *Flavobacteria* y al orden *Flavobacteriales* (*Winogradskyella* y *Mesonía*), y 2 del género *Marinifilum*, que aun no está adscrito a clase y orden.

En la figura 50 se muestra el dendrograma generado, donde se observan 2 grupos, uno de ellos incluye a las especies de *Winogradskyella* estudiadas, a *Mesonía algae* y a *Cytophaga fermentans* y el otro a *Pontibacter*, a *Cyclobacterium* y a dos especies del género *Marinifilum*. Como se observa en el dendrograma, MALDI-TOF MS presenta una buena resolución en las cepas estudiadas pertenecientes al filo *Bacteroidetes* a nivel de género. A nivel de especie mediante el valor de $\log(\text{score})$ se observa que las especies pertenecientes al género *Winogradskyella* pueden ser discriminadas entre sí mediante esta técnica, ya que el máximo valor de $\log(\text{score})$ obtenido entre cepas de distinta especie fue 1,544. Asimismo, el valor obtenido para *Marinifilum flexuosus* CECT 7448^T/*Marinifilum fragile* CECT 7942^T fue 1,775-1,777, lo que indica que ambas cepas pueden ser diferenciadas entre sí a pesar del nivel de distancia tan bajo que presentan en el dendrograma de la figura 51. Para *Cyclobacterium* sp. CECT 7706/*Cyclobacterium* sp. CECT 7709 se obtuvo un valor de 1,130-1,267, y para *Pontibacter* sp. CECT 7708/*Pontibacter* sp. CECT 7713 de 0,346-0,695, indicando de la misma manera que pueden ser diferenciadas entre sí, por lo que MALDI-TOF MS puede considerarse una buena herramienta para la autenticación de las cepas estudiadas pertenecientes al filo *Bacteroidetes*.

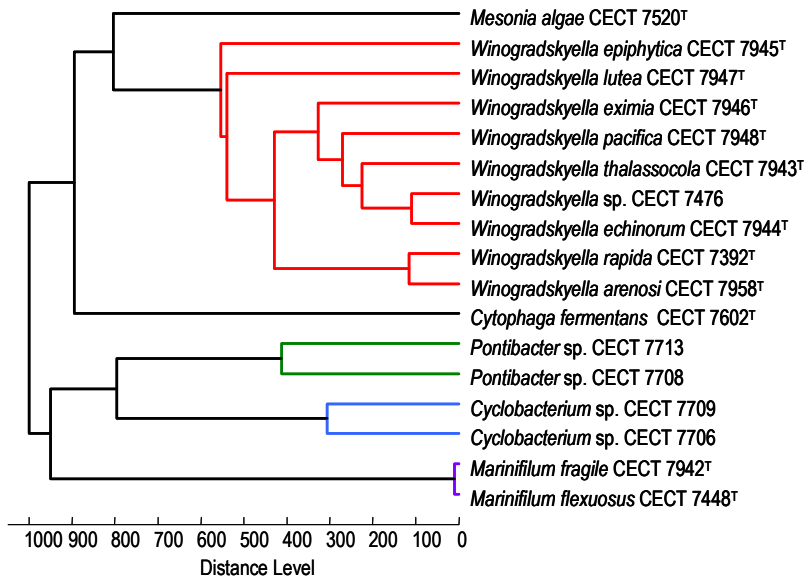


Figura 50. Dendrograma de MALDI-TOF MS de cepas pertenecientes al filo *Bacteroidetes*.

2. GC FAME

2.1 Análisis de cepas del género *Pseudomonas*

En esta parte de la tesis doctoral se estudiaron 27 cepas del género *Pseudomonas* analizando el perfil de ácidos grasos mediante cromatografía de gases (GC FAME, *Gas Chromatography Fatty Acid Methyl Ester*). Tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos, el perfil de ácidos grasos se ve afectado por las condiciones de cultivo aplicadas a la cepa (medio de cultivo, temperatura y tiempo de incubación). Debido a la heterogeneidad en las condiciones de cultivo dentro del género *Pseudomonas*, se obtuvieron los distintos perfiles de ácidos grasos en las condiciones óptimas de cada cepa, condiciones previamente estudiadas en la CECT, con el fin de obtener una base de datos curada para el proceso de autenticación.

Está establecido que los ácidos grasos relevantes en el perfil de una determinada cepa son aquellos cuya cantidad relativa es superior al 1%, considerándose en caso contrario elementos traza (Tindall y col., 2010). Sin embargo, en esta tesis doctoral se detallará el valor de todos los ácidos grasos obtenidos para una mayor profundización del análisis.

En la tabla 6 se muestra el perfil de ácidos grasos y su proporción relativa de cepas tipo de *Pseudomonas* cultivadas en NA II (*Nutrient Agar II*), cuya composición se detalla en el Anexo, a 26°C durante 24 h. Como se observa, todas estas cepas comparten los mismos ácidos grasos mayoritarios: *Summed in Feature 3* (SF 3) (16:1 ω 7c/16:1 ω 6c), 16:0 y *Summed in Feature 8* (SF 8) (18:1 ω 6c/18:1 ω 7c). Sin embargo, la proporción existente entre estos ácidos grasos mayoritarios y entre otros menos abundantes, así como la presencia o ausencia de determinados ácidos grasos permite la diferenciación de cepas a nivel de especie. En las cepas analizadas en la tabla 6, destaca además del amplio rango de valores de cantidad relativa encontrado en los ácidos grasos mayoritarios. El valor obtenido para el 17:0 ciclo, varía desde no detectado hasta 13,5% de la cantidad total, el 12:0 varía entre 1,4 y 8,2% y el 12:0 2OH entre ND-

5,6% indicando que son ácidos grasos determinantes para la discriminación entre especies del género *Pseudomonas*.

Tabla 6. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *P. agarici* CECT 4467^T; 2, *P. asplenii* CECT 4468^T; 3, *P. chlororaphis* CECT 4470^T; 4, *P. cichorii* CECT 4471^T; 5, *P. fluorescens* CECT 378^T; 6, *P. fragi* CECT 446^T; 7, *P. marginalis* CECT 229^T; 8, *P. putida* CECT 324^T; 9, *P. stutzeri* CECT 930^T; 10, *P. syringae* CECT 4429^T; 11, *P. tolaasii* CECT 4472^T; y 12, *P. viridiflava* CECT 458^T cultivados en NA II a 26°C durante 24 h. La columna rango hace referencia al valor mínimo y máximo detectado en un determinado ácido graso. ND: No Detectado. SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 5 (18:0 ante/18:2 ω6,9c), SF 7 (19:1 ω7c/19:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Rango
9:0	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	ND-0,2
10:0 iso	-	-	-	-	-	0,4	-	-	0,2	-	-	-	ND-0,4
10:0	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	ND-0,2
10:0 3OH	4,1	4,3	4,3	2,9	3,7	4,8	4,4	5,0	4,5	4,6	4,0	2,5	2,5-5,0
12:0	1,5	1,4	2,3	4,8	2,1	3,1	3,5	2,3	8,2	5,8	2,0	4,5	1,4-8,2
11:0 iso 3OH	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	ND-0,1
12:0 2OH	5,6	5,6	4,8	2,6	5,1	4,5	4,3	5,5	-	3,3	5,4	2,8	ND-5,6
12:0 3OH	5,5	5,2	5,3	4,7	5,2	5,4	5,2	5,1	4,3	7,1	5,0	4,5	4,3-7,1
14:0	0,8	0,4	0,7	-	0,4	1,1	0,6	0,4	1,4	0,7	0,5	-	ND-1,4
SF 3	25,2	35,3	31,9	36,3	25,0	40,6	33,7	28,6	24,4	37,5	19,2	33,4	19,2-40,6
16:1 ω5c	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	0,1	-	ND-0,2
16:0	38,2	30,2	32,5	26,8	32,4	26,6	28,5	24,4	19,0	18,0	33,4	20,7	18,0-38,2
17:1 iso ω5c	-	-	-	-	-	0,2	-	-	0,1	0,2	-	-	ND-0,2
17:0 iso	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,4	0,3	0,4	ND-0,4
17:1 ω8c	-	-	0,3	-	-	0,2	0,3	0,4	0,1	-	0,4	0,3	ND-0,4
17:0 ciclo	9,7	2,4	4,1	-	7,3	2,0	3,4	7,0	0,1	-	13,5	-	ND-13,5
17:0	0,3	0,4	0,3	-	0,4	0,4	0,4	0,4	-	0,2	0,7	0,4	ND-0,7
16:0 2OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	ND-0,2
18:3 ω6c (6,9,12)	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	ND-0,4
SF 5	0,6	-	0,2	-	0,5	-	0,2	0,5	-	-	0,7	-	ND-0,7
SF 8	7,6	14,1	12,8	20,3	16,8	10,1	15,1	20,0	35,1	20,2	12,4	29,0	7,6-35,1
18:1 ω5c	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	ND-0,2
18:0	0,7	0,7	0,4	1,2	0,9	0,5	0,5	0,5	0,8	1,3	1,1	1,2	0,4-1,3
18:1 ω7c 11-metil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-	0,3	ND-0,6
19:0 iso	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	ND-0,1
SF 7	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	ND-0,3
19:0 ciclo ω8c	-	-	-	-	-	0,3	-	-	0,1	-	-	-	ND-0,3
19:0	0,4	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	ND-0,4

En la tabla 7 se muestra el perfil de ácidos grasos de cepas tipo de *Pseudomonas* cultivadas en TSA (*Trypticase soy agar*) a 28°C durante 48 h. Respecto a las condiciones de cultivo anteriores supone un cambio de medio (TSA por NA II), de tiempo de incubación (48 h en lugar de 24 h) y, aunque muy levemente, también de temperatura. Los perfiles obtenidos muestran rasgos distintivos para cada especie, lo que posibilita su diferenciación, como es el caso del ácido graso 17:0 ciclo, cuya cantidad relativa oscila entre 1,2 y 9%, o el 17:1 ω8c que presenta valores de entre 0,7 y 5,3%. Los ácidos grasos mayoritarios comunes a estas cepas son también el SF 3, el 16:0 y el SF 8. Además, cabe destacar el perfil tan similar obtenido entre cepas pertenecientes a la misma especie, como es el caso de *P. litoralis* CECT 7669 y *P. litoralis* CECT 7670^T, aunque al mismo tiempo sugiere una limitación en su uso para tipificar cepas.

Tabla 7. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *P. litoralis* CECT 7669; 2, *P. litoralis* CECT 7670^T; 3, *P. pelagia* CECT 7689^T; 4, *P. pertucinogena* CECT 7776^T; 5, *P. sabulinigri* CECT 7679^T en TSA a 28°C y durante 48 h. La columna rango hace referencia al valor mínimo y máximo detectado en un determinado ácido graso. ND: No Detectado. SF 1 (13:0 3OH/15:1 iso H), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 5 (18:0 ante/18:2 ω6,9c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c), SF 9 (17:1 iso ω9c/16:0 10-metil).

	1	2	3	4	5	Rango
9:0	-	-	0,2	-	-	ND-0,2
10:0	-	-	0,3	0,2	0,2	ND-0,3
9:0 3OH	-	-	-	0,8	-	ND-0,8
11:0	0,3	-	0,3	1,1	0,2	ND-1,1
10:0 3OH	2,9	3,0	3,1	3,7	2,5	2,5-3,7
12:0	7,5	7,9	8,1	6,1	7,6	6,1-8,1
11:0 iso 3OH	-	-	-	0,6	0,1	ND-0,6
11:0 2OH	-	-	-	-	0,7	ND-0,7
11:0 3OH	0,6	0,3	0,4	1,7	0,2	0,2-1,7
13:0 iso	-	-	-	0,4	0,2	ND-0,4
13:0	0,3	-	0,4	1,3	0,2	ND-1,3
12:0 3OH	3,9	4,2	4,4	3,4	4,0	3,4-4,4
14:0	1,0	0,7	0,8	1,5	1,0	0,7-1,5
SF 1	-	-	-	0,2	-	ND-0,2
15:0 iso	-	-	-	0,3	-	ND-0,3
15:1 ω8c	-	-	-	0,3	-	ND-0,3
15:1 ω6c	0,5	0,2	0,8	1,5	0,2	0,2-1,5
16:0 iso	-	-	0,2	-	0,7	ND-0,7
SF 3	18,3	18,1	24,6	14,3	20,4	14,3-24,6

	1	2	3	4	5	Rango
16:1 ω5c	-	-	0,2	-	-	ND-0,2
16:0	17,4	18,5	11,8	7,9	18,5	7,9-18,5
SF 9	-	-	-	0,2	-	ND-0,2
17:0 iso	0,3	0,2	0,2	1,6	1,2	0,2-1,6
17:0 anteiso	-	-	-	0,2	1,4	ND-1,4
17:1 ω8c	1,6	0,7	1,1	5,3	0,4	0,4-5,3
17:0 ciclo	8,5	8,9	4,4	9,0	1,2	1,2-9,0
17:0	1,8	0,8	0,8	3,3	0,4	0,4-3,3
16:1 2OH	-	-	-	0,7	-	ND-0,7
18:1 iso H	-	-	-	0,7	-	ND-0,7
18:0 iso	-	-	-	-	0,4	ND-0,4
SF 5	0,5	0,6	0,3	0,5	-	ND-0,6
SF 8	31,8	32,6	35,4	25,7	36,8	25,7-36,8
18:0	1,2	1,2	1,0	0,9	1,5	0,9-1,5
18:1 ω7c 11-metil	-	-	-	0,3	-	ND-0,3
19:0 iso	-	-	-	0,2	0,1	ND-0,2
19:0 ciclo ω8c	1,4	1,8	-	3,8	0,2	ND-3,8
19:0	0,3	0,3	-	0,3	-	ND-0,3
18:0 3OH	-	-	-	2,0	-	ND-2,0
20:2 ω6,9c	-	-	-	0,3	-	ND-0,3
20:1 ω7c	-	-	-	-	0,1	ND-0,1

En la tabla 8 se muestra el perfil de ácidos grasos de *P. baetica* CECT 7720^T y *P. baetica* CECT 7721 cultivadas en MA (*Marine Agar*) a 22°C durante 48 h y de *P. aeruginosa* CECT 110^T y *P. mendocina* CECT 320^T cultivadas en NA II (*Nutrient Agar II*) a 37°C durante 24 h. A pesar de estar cultivados en condiciones sustancialmente diferentes a las vistas hasta ahora en cuanto a temperatura (22 y 37°C frente a 26-28°C) y salinidad (como el caso del MA), los ácidos grasos mayoritarios fueron también el SF 3, el 16:0 y el SF 8, presentando un rango bastante amplio. Además, destacan otros ácidos grasos como el 12:0 cuya cantidad relativa presente varía de 1,0 a 9,4% según la especie, el 12:0 2OH que varía entre ND y 6,9% o el 19:0 ciclo ω8c cuyo rango está entre ND y 5,7%. Asimismo, también se observa la similitud existente entre la composición de ácidos grasos de *P. baetica* CECT 7720^T y *P. baetica* CECT 7721, corroborando que ambas cepas pertenecen a la misma especie.

Tabla 8. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *P. baetica* CECT 7720^T; 2, *P. baetica* CECT 7721; 3, *P. aeruginosa* CECT 110^T; 4, *P. mendocina* CECT 320^T cultivados en MA o NA II a 22 ó 37°C y durante 24 ó

Resultados y Discusión

48 h. La columna rango hace referencia al valor mínimo y máximo detectado en un determinado ácido graso. ND: No Detectado. SF 3 (16:1 ω 7c/16:1 ω 6c), SF 5 (18:0 ante/18:2 ω 6,9c), SF 8 (18:1 ω 6c/18:1 ω 7c).

	MA		NA II		Rango
	22°C 48 h		37°C 24 h		
	1	2	3	4	
10:0 iso	0,2	-	-	-	ND-0,2
11:0	-	-	-	0,4	ND-0,4
10:0 3OH	5,3	5,3	2,4	4,1	2,4-5,3
12:0	1,0	1,1	3,7	9,4	1,0-9,4
11:0 3OH	-	-	-	0,8	ND-0,8
13:0	-	-	-	0,4	ND-0,4
12:0 2OH	6,9	6,8	4,7	-	ND-6,9
12:0 3OH	5,4	5,5	5,4	4,2	4,2-5,5
14:0	0,8	0,6	0,7	1,4	0,6-1,4
15:1 ω 6c	-	-	-	0,4	ND-0,4
16:0 iso	-	-	0,2	0,9	ND-0,9
SF 3	37,3	38,5	8,5	16,7	8,5-38,5
16:1 ω 5c	0,1	0,2	-	-	ND-0,2
16:0	23,6	24,1	31,8	19,8	19,8-31,8
17:1 iso ω 5c	0,2	-	0,2	0,4	ND-0,4
17:0 iso	0,2	-	-	-	ND-0,2
17:0 anteiso	0,1	-	-	-	ND-0,1
17:1 ω 8c	0,2	0,2	0,4	3,1	0,2-3,1
17:0 ciclo	2,4	2,3	3,0	2,6	2,3-3
17:0	0,3	0,2	0,5	1,9	0,2-1,9
16:1 2OH	0,3	-	-	-	ND-0,3
18:1 iso H	0,4	-	-	-	ND-0,4
SF 5	0,2	0,2	0,2	-	ND-0,2
SF 8	14,5	14,7	31,7	33,0	14,5-33,0
18:0	0,4	0,3	0,8	0,7	0,3-0,8
19:0 ciclo ω 8c	-	-	5,7	-	ND-5,7
19:0	0,1	-	-	-	ND-0,1

Del mismo modo se analizó la composición de ácidos grasos de *P. argentinensis* CECT 7010^T y *P. rhizosphaerae* CECT 5726^T cultivadas en NA (*Nutrient Agar*) a 28°C durante 48 h; y de *P. corrugata* CECT 124^T, *P. oleovorans* CECT 4079^T y *P. lutea* CECT 5822^T cultivadas en NA durante 48 h a 26, 28 y 30°C respectivamente (tabla 9), que mostraron los mismos ácidos grasos mayoritarios que el resto (SF 3, 16:0 y SF 8). Asimismo, mostraron una variación considerable en el 12:0 (4,3-10,1%) y el 18:0 3OH (ND-3,4%).

Tabla 9. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *P. argentinensis* CECT 7010^T; 2, *P. rhizosphaerae* CECT 5726^T; 3, *P. corrugata* CECT 124^T; 4, *P. oleovorans* CECT 4079^T; y 5, *P. lutea* CECT 5822^T cultivados en NA a 26, 28 ó 30°C, durante 24 ó 48 h. La columna rango hace referencia al valor mínimo y máximo detectado en un determinado ácido graso. ND: No Detectado. SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehido), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 5 (18:0 ante/18:2 ω6,9c), SF 7 (19:1ω7c/19:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c).

	NA					Rango
	28°C 48 h	26°C 24 h	28°C 24 h	30°C 24 h		
	1	2	3	4	5	
9:0	-	0,5	0,2	0,2	0,3	ND-0,5
10:0 iso	-	-	0,2	-	-	ND-0,2
10:0	-	-	0,3	0,2	-	ND-0,3
11:0	0,3	-	-	0,1	-	ND-0,3
10:0 3OH	3,4	3,1	5,1	3,6	2,8	2,8-5,1
12:0	10,1	5,2	5,0	7,6	4,3	4,3-10,1
11:0 iso 3OH	-	-	-	0,2	-	ND-0,2
11:0 3OH	0,5	-	-	0,2	-	ND-0,5
13:0 iso	-	-	-	0,2	-	ND-0,2
13:0	0,2	-	-	0,1	-	ND-0,2
12:0 2OH	-	2,8	3,2	-	2,1	ND-3,2
12:1 3OH	-	-	0,3	-	-	ND-0,3
12:0 3OH	4,8	5,4	5,2	4,1	4,7	4,1-5,4
14:0 anteiso	-	-	0,1	-	-	ND-0,1
14:1 ω5c	0,2	-	-	-	-	ND-0,2
14:0	0,7	1,5	0,5	0,6	0,6	0,5-1,5
15:0 anteiso	-	-	0,2	-	-	ND-0,2
15:1 ω6c	0,4	-	-	0,1	-	ND-0,4
SF 2	-	-	0,3	-	-	ND-0,3
16:0 iso	0,2	-	-	0,1	-	ND-0,2
16:0 anteiso	-	-	0,3	-	-	ND-0,3
SF 3	17,9	34,2	30,4	20,2	32,8	17,9-34,2
16:1 ω5c	-	-	-	0,1	0,1	ND-0,1
16:0	18,1	25,3	19,4	14,7	28,2	14,7-28,2
17:1 anteiso ω9c	-	-	0,3	-	-	ND-0,3
17:1 iso ω5c	0,2	0,3	-	-	0,1	ND-0,3
17:0 iso	-	-	0,6	0,5	0,2	ND-0,6
17:0 anteiso	-	-	0,6	0,1	-	ND-0,6
17:1 ω8c	0,9	0,4	0,2	0,5	0,2	0,2-0,9
17:1 ω6c	0,3	-	-	-	-	ND-0,3
17:0 ciclo	-	-	0,9	1,5	1,1	ND-1,5
17:0	1,1	0,6	0,4	0,4	0,3	0,3-1,1
16:1 2OH	-	-	1,7	-	-	ND-1,7
18:1 iso H	-	-	1,8	-	-	ND-1,8
18:0 iso	-	-	0,3	-	-	ND-0,3
SF 5	-	-	0,1	-	-	ND-0,1
18:1 ω9c	-	0,8	-	-	-	ND-0,8

	NA					Rango
	28°C 48 h		26°C 24 h	28°C 24 h	30°C 24 h	
	1	2	3	4	5	
SF 8	40,0	18,1	16,3	42,6	20,5	16,3-42,6
18:1 ω5c	-	-	-	0,1	-	ND-0,1
18:0	0,9	1,4	0,7	1,0	1,2	0,7-1,4
18:1 ω7c 11-metil	-	-	-	0,5	-	ND-0,5
17:0 iso 3OH	-	-	-	0,2	-	ND-0,2
17:0 2OH	-	-	1,3	-	-	ND-1,3
19:0 iso	-	0,4	0,4	0,2	0,3	ND-0,4
SF 7	-	-	-	0,1	-	ND-0,1
19:0 ciclo ω8c	-	-	-	0,1	0,1	ND-0,1
19:0	-	-	0,1	-	-	ND-0,1
18:1 2OH	-	-	0,3	-	-	ND-0,3
18:0 3OH	-	-	3,4	-	-	ND-3,4
20:1 ω7c	-	-	-	0,1	-	ND-0,1
20:0 iso	-	-	0,3	-	-	ND-0,3

Aunque se ha observado que los ácidos grasos mayoritarios son los mismos para las 24 especies mostradas hasta ahora pese a haber sido cultivadas en diferentes medios de cultivo (NA I, NA II, TSA y MA), diferente tiempo de incubación (24/48 h) y temperatura (desde 22 a 37°C), también se aprecian diferencias en porcentajes y en presencia/ausencia de otros ácidos grasos, y no es posible dilucidar si se debe a diferencias entre especies u ocasionadas por variaciones en el cultivo. Con el fin de determinar de qué manera influyen las condiciones de cultivo a la composición de ácidos grasos se realizó su extracción a cepas sometidas a distintas condiciones de cultivo (tabla 10), donde se observa que el hecho de variar las condiciones de cultivo afecta principalmente a los ácidos grasos mayoritarios. Así pues, al cultivar *P. litoralis* CECT 7669 en TSA se detectó 8,6 unidades porcentuales más de SF 3, 3,2 unidades porcentuales más de 16:0 y 3 unidades porcentuales menos de SF 8 que al cultivarlo en MA, siendo la variación del resto de ácidos grasos poco significativa. Lo mismo ocurrió con *P. litoralis* CECT 7670^T, donde se produjo una variación de 10,2 en el SF 3, 4,2 en el 16:0 y de 3,5 en el 17:0. En el caso de *P. pelagia* CECT 7689^T, se observó una diferencia de 7,3 unidades porcentuales en el SF 3 y 3,4 en el SF 8, al cultivar durante 48 h en TSA a 28°C con respecto a lo obtenido al cultivar en MA a 30°C.

Tabla 10. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *P. litoralis* CECT 7669; 2, *P. litoralis* CECT 7670^T cultivados en MA a 28°C 48 h; 1', *P. litoralis* CECT 7669; 2', *P. litoralis* CECT 7670^T cultivados en TSA a 28°C 48 h; 3, *P. pelagia* CECT 7689^T cultivados en MA a 30°C 48 h; y 3', *P. pelagia* CECT 7689^T cultivado en TSA a 28°C 48 h. |Δ| hace referencia a la variación en valor absoluto observada para cada ácido graso de una cepa con respecto a la misma cepa cultivada en diferentes condiciones. SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 5 (18:0 ante/18:2 ω6, 9c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c).

	28°C 48 h						48 h		
	MA	TSA		MA	TSA		MA 30°C	TSA 28°C	
	1	1'	Δ	2	2'	Δ	3	3'	Δ
9:0	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2
10:0	-	-	-	-	-	-	-	0,3	0,3
11:0	0,5	0,3	0,2	0,6	-	0,6	-	0,3	0,3
10:0 3OH	3,3	2,9	0,4	3,2	3,0	0,2	4,3	3,1	1,2
12:0	8,8	7,5	1,3	8,6	7,9	0,7	8,9	8,1	0,8
11:0 3OH	0,8	0,6	0,2	0,9	0,3	0,6	-	0,4	0,4
13:0	0,5	0,3	0,2	0,5	-	0,5	-	0,4	0,4
12:0 3OH	4,2	3,9	0,3	3,5	4,2	0,7	4,4	4,4	0,0
14:0	1,0	1,0	0,0	0,6	0,7	0,1	1,2	0,8	0,4
15:1 ω6c	0,4	0,5	0,1	0,5	0,2	0,3	-	0,8	0,8
16:0 iso	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2
SF 3	9,7	18,3	8,6	7,9	18,1	10,2	17,3	24,6	7,3
16:1 ω5c	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2
16:0	14,2	17,4	3,2	14,3	18,5	4,2	14,4	11,8	2,6
17:0 iso	0,5	0,3	0,2	0,5	0,2	0,3	-	0,2	0,2
17:1 ω8c	2,1	1,6	0,5	2,5	0,7	1,8	0,6	1,1	0,5
17:0 ciclo	10,3	8,5	1,8	10,8	8,9	1,9	6,0	4,4	1,6
17:0	3,2	1,8	1,4	4,3	0,8	3,5	0,5	0,8	0,3
SF 5	0,7	0,5	0,2	1,0	0,6	0,4	0,3	0,3	0,0
SF 8	34,8	31,8	3,0	35,1	32,6	2,4	38,8	35,4	3,4
18:0	2,3	1,2	1,1	1,9	1,2	0,7	1,7	1,0	0,7
19:0 ciclo ω8c	2,3	1,4	0,9	2,9	1,8	1,1	1,5	-	1,5
19:0	0,4	0,3	0,1	0,5	0,3	0,2	-	-	-

Del mismo modo, para estudiar la reproducibilidad de la técnica se analizó la composición de ácidos grasos en réplicas bajo las mismas condiciones de cultivo (tabla 11). Como puede observarse, los perfiles obtenidos para las réplicas de *P. litoralis* CECT 7669, *P. litoralis* CECT 7670^T y *P. pelagia* CECT 7689^T, son muy similares entre sí, observándose como máximo una variación de 3,6, como ocurre en el SF 8 de *P. pelagia* CECT 7689^T respecto a su réplica. De modo que, la técnica GC FAME puede considerarse una técnica adecuada para la autenticación de cepas del género *Pseudomonas*.

Tabla 11. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *P. litoralis* CECT 7669; 1', *P. litoralis* CECT 7669 réplica; 2, *P. litoralis* CECT 7670^T; 2', *P. litoralis* CECT 7670^T réplica; 3, *P. pelagia* CECT 7689^T; y 3', *P. pelagia* CECT 7689^T réplica, cultivados en MA 28°C 48 h (1, 1', 2 y 2') y en TSA 28°C 48 h (3 y 3'). |ΔI| hace referencia a la variación en valor absoluto observada para cada ácido graso de una cepa con respecto a su réplica. SF 1 (13:0 3OH/15:1 iso H), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 5 (18:0 ante/18:2 ω6,9c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c), SF 9 (17:1 iso ω9c/16:0 10-metil).

	MA 28°C 48 h					TSA 28°C 48 h			
	1	1'	ΔI	2	2'	ΔI	3	3'	ΔI
10:0	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2	0,0
9:0 3OH	-	-	-	-	-	-	0,5	0,8	0,3
11:0	0,5	0,6	0,1	-	-	-	1,0	1,1	0,1
10:0 3OH	3,3	3,2	0,1	3,5	3,6	0,1	3,4	3,7	0,3
12:0	8,8	8,6	0,2	8,8	9,5	0,7	6,2	6,1	0,1
11:0 iso 3OH	-	-	-	-	-	-	0,3	0,6	0,3
11:0 3OH	0,8	0,9	0,1	0,6	0,5	0,1	1,7	1,7	0,0
13:0 iso	-	-	-	-	-	-	0,2	0,4	0,2
13:0	0,5	0,5	0,0	-	0,2	0,2	1,1	1,3	0,2
12:0 3OH	4,2	3,5	0,8	4,9	4,6	0,3	3,4	3,4	0,0
14:0	1,0	0,6	0,4	1,4	0,9	0,5	0,4	1,5	1,1
SF 1	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2	0,0
15:0 iso	-	-	-	-	-	-	0,2	0,3	0,1
15:1 ω8c	-	-	-	-	-	-	0,2	0,3	0,1
15:1 ω6c	0,4	0,5	0,1	-	-	-	1,6	1,5	0,1
SF 3	9,7	7,9	1,8	8,0	9,6	1,6	13,8	14,3	0,5
16:1 ω5c	-	-	-	-	-	-	0,7	-	0,7
16:0	14,2	14,3	0,1	17,0	15,7	1,3	7,6	7,9	0,3
SF 9	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2
17:0 iso	0,5	0,5	0,0	-	-	-	1,2	1,6	0,4
17:0 anteiso	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2
17:1 ω8c	2,1	2,5	0,4	1,2	1,0	0,2	4,9	5,3	0,4
17:0 ciclo	10,3	10,8	0,5	12,1	10,5	1,6	10,8	9,0	1,8
17:0	3,2	4,3	1,1	1,8	1,4	0,4	4,0	3,3	0,7
16:1 2OH	-	-	-	-	-	-	-	0,7	0,7
18:1 iso H	-	-	-	-	-	-	-	0,7	0,7
SF 5	0,7	1,0	0,3	0,8	0,8	0,0	0,4	0,5	0,1
SF 8	34,8	35,1	0,3	34,6	36,4	1,8	29,3	25,7	3,6
18:0	2,3	1,9	0,4	1,9	2,3	0,4	0,8	0,9	0,1
18:1 ω7c 11-metil	-	-	-	-	-	-	0,3	0,3	0,0
19:0 iso	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2
19:0 ciclo ω8c	2,3	2,9	0,6	3,0	2,4	0,6	5,2	3,8	1,4
19:0	0,4	0,5	0,1	0,4	0,4	0,0	0,2	0,3	0,1
18:0 3OH	-	-	-	-	-	-	-	2,0	2,0
20:2 ω6,9c	-	-	-	-	-	-	0,2	0,3	0,1

En el transcurso del trabajo esta técnica demostró su utilidad para detectar un problema real de identidad (tabla 12), ya que se observó que la cepa *P. alcaligenes* CECT 929^T mostraba una composición de ácidos grasos diferente al resto de *Pseudomonas*, pues los ácidos grasos mayoritarios que presentaba fueron el SF 3 (13,8%) y el 15:0 iso F (35,5%), mientras que en el resto de *Pseudomonas* los ácidos grasos mayoritarios fueron el SF 3, el 16:0, y el SF 8. Además, esta cepa fue identificada por el sistema MIDI (Sherlock) como *Stenotrophomonas maltophilia* con un índice de similitud de 0,903 (se considera positiva la identificación por encima de 0,5). Al disponer del perfil de ácidos grasos de la cepa *Stenotrophomonas maltophilia* CECT 115^T, que se utiliza como control positivo en cada análisis, se comparó con el obtenido de la cepa CECT 929^T, de modo que se observó una coincidencia considerable entre ambos perfiles. La identidad de esta cepa fue estudiada también mediante MALDI-TOF MS y secuencia del gen 16S rRNA, corroborando que se trataba de *Stenotrophomonas maltophilia* y no de *Pseudomonas alcaligenes*. Tras comprobar el resultado en lotes de cepas anteriores, la cepa CECT 929^T se eliminó del catálogo de la CECT, siendo sustituida por la cepa equivalente de la DMSZ, cuya identidad era correcta, y catalogada con el número CECT 7784^T. La composición de ácidos grasos de la nueva cepa incorporada en la CECT, *Pseudomonas alcaligenes* CECT 7784^T, coincide con el resto de *Pseudomonas* (tabla 12).

Tabla 12. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *P. alcaligenes* CECT 929^T; 2, *Stenotrophomonas maltophilia* CECT 115^T; 3, *P. alcaligenes* CECT 7784^T, cultivadas en NA a 26°C durante 24 h. SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c), SF 9 (17:1 iso ω9c/16:0 10-metil).

	1	2	3
10:0 iso	0,1	-	-
10:0	0,7	0,7	3,0
11:0 iso	2,8	3,1	0,2
11:0	-	-	0,4
10:0 3OH	0,2	0,2	5,5
12:0	-	-	6,3
11:0 iso 3OH	1,7	1,6	0,2
11:0 3OH	-	-	0,5
13:0 iso	0,5	0,6	-
13:0	-	-	0,3
12:0 3OH	3,4	3,4	5,7
14:0 iso	0,5	0,5	-
14:1 ω5c	-	-	0,3
14:0	3,7	4,1	4,4
13:0 iso 3OH	4,0	3,7	-
13:0 2OH	0,5	0,3	-
15:1 iso F	1,4	1,2	-
15:0 iso	35,5	34,1	0,2
15:0 anteiso	8,4	7,9	-
15:1 ω8c	-	-	0,2
15:1 ω6c	-	-	0,2
16:0 iso	0,6	0,8	-
16:1 ω9c	3,6	3,7	-
SF 3	13,8	12,8	25,4
16:1 ω5c	-	-	0,3
16:0	6,8	8,9	12,3
SF 9	4,5	4,6	-
17:1 anteiso ω9c	0,1	-	-
17:0 iso	2,8	3,5	-
17:0 anteiso	0,2	0,3	-
17:1 ω8c	0,2	0,2	1,1
17:1 ω6c	-	-	0,5
17:0	-	-	0,2
18:1 ω9c	1,2	1,8	-
SF 8	0,7	0,9	31,4
18:0	0,3	0,7	0,4
18:1 ω7c 11-metil	-	-	0,7
17:0 2OH	-	-	0,4
19:0 iso	0,4	0,5	-
18:0 2OH	0,4	-	-
20:1 ω7c	0,1	-	-
20:0 iso	1,1	-	-

Por lo tanto, la técnica GC FAME puede considerarse como una técnica adecuada para la autenticación de cepas del género *Pseudomonas*, ya que los perfiles obtenidos son los suficientemente discriminatorios como para diferenciar al menos entre especies. Asimismo, los ácidos grasos más representativos de este género por estar presentes en todas las cepas estudiadas fueron el 10:0 3OH, 12:0, 12:0 3OH, SF 3 (16:1 ω 7c/16:1 ω 6c), 16:0, SF 8 (18:1 ω 6c/18:1 ω 7c) y 18:0. Los ácidos grasos mayoritarios fueron el SF 3 que representa entre un 8,5 y un 40,6% del total de los ácidos grasos presentes en el género *Pseudomonas* dependiendo de la especie estudiada, el 16:0 que representa entre un 7,9 y un 38,2% y el SF 8 que representa entre un 7,6 y un 36,8%, coincidiendo con los ácidos grasos mayoritarios (figura 51). Sin embargo, otros ácidos grasos son importantes también para la discriminación entre especies dentro de este grupo, debido a que están presentes en determinadas especies en cantidades considerablemente altas mientras que no están presentes en otras especies, o lo están en cantidades muy bajas, como son el 12:0 que dependiendo de la especie presenta entre el 1,0 y el 9,4% de los ácidos grasos totales, el 12:0 2OH cuyo rango varía entre no detectable y 6,9%, el 17:1 ω 8c entre no detectable y 5,3%, y el 17:0 ciclo entre no detectable y 13,5%.

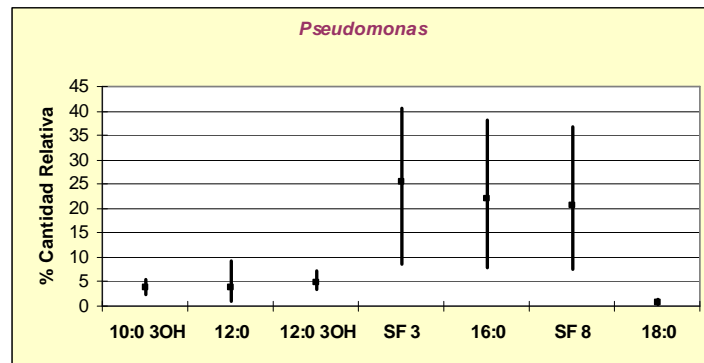


Figura 51. Gráfica de los ácidos grasos más representativos del género *Pseudomonas* y la variación observada en la cantidad relativa de éstos.

2.2 Análisis de cepas de la familia *Vibrionaceae*

En este apartado se analizaron 68 cepas de la familia *Vibrionaceae* mediante GC FAME (3 del género *Aliivibrio*, 4 de *Enterovibrio*, 1 de *Grimontia*, 10 de *Photobacterium*, 1 de *Salinivibrio* y 49 de *Vibrio*).

Las condiciones de cultivo de las cepas estudiadas son muy similares, por lo que casi todas las cepas fueron cultivadas en MA a 26°C durante 48 h antes de realizar la extracción de ácidos grasos.

En la tabla 13 se muestra la composición de ácidos grasos de las cepas estudiadas de los géneros *Aliivibrio*, *Enterovibrio* y *Grimontia*, así como el rango de cantidad relativa observada para cada ácido graso. A pesar de pertenecer a géneros diferentes, estas cepas presentaron los mismos ácidos grasos mayoritarios: el SF 3, el 16:0 y el SF 8, coincidiendo también con el género *Pseudomonas*, estudiado en el apartado anterior. Respecto al género *Aliivibrio* destacó la variabilidad interespecífica observada para el ácido graso mayoritario SF 3, presente entre el 37,0 y el 46,8% dependiendo de la especie. Lo mismo ocurrió en el género *Enterovibrio*, donde el ácido graso más destacado por su variabilidad interspecífica fue también el SF 3 cuyo rango varió entre 30,3 y 46,6%, aunque también destacaron el 16:0 iso, por presentar una cantidad relativa entre 0,2 y 5,1%, y el 18:1 ω 9c cuyo rango estuvo comprendido entre el 1,5 y 7,8%.

Tabla 13. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *Aliivibrio finisterrensi* CECT 7228^T; 2, *Aliivibrio fischeri* CECT 524^T; 3, *Enterovibrio calviensis* CECT 7414^T; 4, *Enterovibrio coralii* CECT 7249^T; 5, *Enterovibrio nigricans* CECT 7320^T; 6, *Enterovibrio norvegicus* CECT 7288^T; y 7, *Grimontia hollisae* CECT 5069^T cultivados en MA 26°C 48 h. Las columnas de rango hacen referencia al valor mínimo y máximo detectado en un determinado ácido graso. ND: No Detectado. SF 1 (13:0 3OH/15:1 iso H), SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehído), SF 3 (16:1 ω 7c/16:1 ω 6c), SF 7 (19:1 ω 7c/19:1 ω 6c), SF 8 (18:1 ω 6c/18:1 ω 7).

	Aliivibrio			Enterovibrio					Grimontia
	1	2	Rango	3	4	5	6	Rango	7
10:0 3OH	-	-	-	0,2	-	0,2	0,2	ND-0,2	0,4
12:0 iso	-	-	-	-	-	-	0,3	ND-0,3	-
12:0	6,1	4,0	4,0-6,1	5,1	4,8	3,2	3,7	3,2-5,1	3,6
13:0	0,2	-	ND-0,2	-	-	-	0,1	ND-0,1	-
12:0 3OH	5,0	4,1	4,1-5,0	3,3	3,1	1,9	2,8	1,9-3,3	3,9
14:0 iso	-	-	-	-	-	0,3	1,1	ND-1,1	-
14:0	2,7	4,6	2,7-4,6	1,1	4,0	1,5	2,1	1,1-4,0	3,2
SF 1	0,5	-	ND-0,5	-	-	0,4	0,4	ND-0,4	-
15:1 ω8c	0,2	-	ND-0,2	-	-	0,5	0,4	ND-0,5	0,2
15:1 ω6c	-	-	-	-	-	0,1	-	ND-0,1	-
14:0 iso 3OH	-	-	-	-	0,9	0,5	1,0	ND-0,9	-
SF 2	7,7	4,6	4,6-7,7	3,8	3,6	3,7	3,0	3,0-3,8	5,3
16:0 iso	-	-	-	0,2	3,5	2,2	5,1	0,2-5,1	0,2
16:1 ω9c	-	-	-	2,9	3,6	-	-	ND-3,6	3,0
SF3	37,0	46,8	37,0-46,8	39,1	30,3	46,6	36,4	30,3-46,6	35,7
16:1 ω5c	-	-	-	0,3	-	0,4	0,3	ND-0,4	0,3
16:0	20,4	18,9	18,9-20,4	19,3	15,6	16,4	15,8	15,6-19,3	16,3
17:1 ω8c	1,3	0,9	0,9-1,3	0,4	2,0	2,2	2,3	0,4-2,3	1,2
17:1 ω6c	0,3	-	ND-0,3	-	-	0,4	0,3	ND-0,4	0,2
17:1 ω5c	-	-	-	0,2	-	-	-	ND-0,2	-
17:0	1,7	0,8	0,8-1,7	0,4	-	0,9	1,4	ND-1,4	0,4
16:0 iso 3OH	-	-	-	-	-	-	0,2	ND-0,2	-
16:0 3OH	-	-	-	-	-	-	0,2	ND-0,2	-
18:0 iso	-	-	-	-	1,7	0,6	1,3	ND-1,7	-
18:1 ω9c	-	-	-	2,0	7,8	1,5	3,0	1,5-7,8	4,1
SF 8	13,0	14,4	13,0-14,4	18,8	15,6	14,7	15,4	14,7-18,8	19,1
18:1 ω5c	-	-	-	0,2	-	0,2	0,2	ND-0,2	0,2
18:0	2,2	0,9	0,9-2,2	2,4	3,6	1,5	2,4	1,5-3,6	2,4
18:1 ω7c 11-metil	-	-	-	-	-	-	0,2	ND-0,2	0,1
SF 7	0,6	-	ND-0,6	0,2	-	-	0,4	ND-0,4	0,1
19:0	0,2	-	ND-0,2	-	-	-	-	-	-
20:1 ω7c	0,9	-	ND-0,9	0,3	-	0,2	0,2	ND-0,3	0,4
20:0	-	-	-	-	-	-	0,1	ND-0,1	-

La composición de ácidos grasos de las cepas tipo estudiadas del género *Photobacterium* se muestra en la tabla 14, donde se observa que el mayor rango de variabilidad tuvo lugar en los ácidos grasos mayoritarios SF 3 (27,9-45,8%), 16:0 (5,0-22,3%) y el SF 8 (6,4-19,4%). Sin embargo, también destacaron otros ácidos grasos por presentar diferencias considerables entre las distintas especies de *Photobacterium* como el 12:0 (2,6-6,4%), el 12:0 3OH (2,9-7,3%), el 14:0 (ND-5,8%) y el 15:0 iso (ND-3,9%).

Tabla 14. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *P. angustum* CECT 5690^T; 2, *P. aphoticum* CECT 7614^T; 3, *P. damsela* CECT 626^T; 4, *P. ganghwense* CECT 7641^T; 5, *P. halotolerans* CECT 5860^T; 6, *P. leiognathi* CECT 4191^T; 7, *P. lutimaris* CECT 7642^T; 8, *P. rosenbergii* CECT 7644^T; y 9, *P. swingsii* CECT 7576^T cultivados en MA 26°C 48 h. La columna de rango hace referencia al valor mínimo y máximo detectado de cada ácido graso. ND: No Detectado. SF 1 (13:0 3OH/15:1 iso H), SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehído), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 9 (17:1 iso ω9c/16:0 10-metil).

	<i>Photobacterium</i>									Rango
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
10:0	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	ND-0,5
11:0	0,3	-	-	-	0,4	-	-	-	-	ND-0,4
10:0 3OH	0,3	-	-	-	-	0,7	-	-	-	ND-0,7
12:0 iso	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	ND-0,3
12:0	5,3	2,6	4,8	4,6	6,3	6,4	3,9	3,0	3,8	2,6-6,4
11:0 3OH	0,6	1,2	0,6	-	0,5	0,6	0,7	1,3	-	ND-1,3
13:0 iso	0,2	2,2	-	0,7	0,2	0,9	1,0	1,5	-	ND-2,2
13:0 anteiso	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	ND-0,1
13:0	0,9	1,1	0,3	-	0,4	0,7	0,7	0,7	0,4	ND-1,1
12:0 iso 3OH	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	ND-0,3
12:0 3OH	3,6	2,9	3,7	3,7	7,3	4,0	3,6	3,7	3,0	2,9-7,3
14:0 iso	-	0,9	-	-	-	-	-	0,2	-	ND-0,9
14:0	3,4	3,3	5,1	5,8	1,2	5,4	4,0	2,8	-	ND-5,8
13:0 iso 3OH	-	0,9	-	-	0,2	-	-	0,5	-	ND-0,9
15:1 iso F	-	2,8	-	-	-	-	0,3	0,4	-	ND-2,8
SF 1	1,1	1,8	1,0	1,0	1,4	0,7	1,0	1,1	0,3	0,3-1,8
15:0 iso	-	3,9	-	0,4	0,2	1,8	2,1	3,4	-	ND-3,9
15:0 anteiso	0,7	0,8	-	-	-	-	-	-	-	ND-0,8
15:1 ω8c	0,6	3,0	0,5	0,7	0,8	0,2	1,2	1,2	0,3	0,2-3,0
15:1 ω6c	0,7	1,4	-	-	-	-	0,6	2,3	-	ND-2,3
14:0 iso 3OH	-	1,0	-	-	0,7	-	-	0,4	-	ND-1,0
16:1 ω7c alcohol	0,3	-	-	0,7	-	0,8	-	-	1,0	ND-1,0
SF 2	5,3	3,8	5,8	5,3	6,2	6,7	4,8	4,7	4,0	3,8-6,7
16:0 N alcohol	-	-	-	0,4	-	-	-	-	0,4	ND-0,4
16:0 iso	-	2,4	-	-	1,9	-	0,4	0,9	0,6	ND-2,4
SF 3	45,8	33,4	40,7	38,0	27,9	40,0	42,0	41,5	44,5	27,9-45,8
16:1 ω5c	0,2	0,3	0,2	0,4	-	-	-	-	-	ND-0,4
16:0	18,8	7,3	16,5	15,2	15,0	16,4	11,7	5,0	22,3	5,0-22,3
15:0 iso 3OH	-	1,7	-	0,4	0,2	0,4	0,7	1,7	-	ND-1,7
15:0 2OH	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	ND-0,4
SF9	-	2,4	-	0,5	-	-	0,8	1,6	-	ND-2,4
17:1 anteiso ω9c	0,2	0,4	-	-	-	-	-	-	-	ND-0,4
17:0 iso	-	1,6	-	0,4	0,4	0,6	0,9	2,9	-	ND-2,9
17:0 anteiso	0,4	1,1	-	-	0,3	-	0,2	0,2	-	ND-1,1
17:1 ω8c	1,4	1,5	1,3	1,3	2,9	0,6	2,2	2,4	0,6	0,6-2,9
17:1 ω6c	0,7	0,8	0,5	0,4	0,5	0,3	0,6	0,6	0,3	0,3-0,8
17:0	1,6	1,1	1,6	1,5	2,9	1,1	1,7	1,3	0,4	0,4-2,9
18:0 iso	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	ND-0,2

	<i>Photobacterium</i>									Rango	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
18:1 ω9c	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	ND-0,4
SF 8	6,4	9,5	16,4	18,4	19,4	10,8	14,4	14,1	13,6	6,4-19,4	
18:0	0,7	0,4	0,8	0,4	0,6	0,6	0,7	0,4	0,9	0,4-0,9	
17:0 iso 3OH	-	0,5	-	-	0,4	-	-	-	-	ND-0,5	
19:0 iso	0,2	0,9	-	-	0,3	-	-	-	-	ND-0,9	
SF 6	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	ND-0,2	
SF7	0,2	0,5	0,4	-	-	-	-	0,2	0,2	ND-0,5	
18:1 2OH	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	ND-0,4	

La composición de ácidos grasos de las cepas pertenecientes al género *Vibrio* se muestra en las tablas 15, 16, 17 y 18. Los ácidos grasos mayoritarios presentes en las cepas estudiadas del género *Vibrio* fueron los mismos que los observados en el resto de cepas de la familia *Vibrionaceae* (SF 3, 16:0 y SF 8).

Tabla 15. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *V. aerogenes* CECT 7868^T; 2, *V. alginolyticus* CECT 521^T; 3, *V. anguillarum* CECT 522^T; 4, *V. artabrorum* CECT 7226^T; 5, *V. atlanticus* CECT 7223^T; 6, *V. breoganii* CECT 7222^T; 7, *V. campbellii* CECT 523^T; 8, *V. celticus* CECT 7224^T; 9, *V. cholerae* CECT 514^T; 10, *V. cincinnatiensis* CECT 4216^T; 11, *V. diazotrophicus* CECT 627^T cultivados en MA 26°C 48 h. SF 1 (13:0 3OH/15:1 iso H), SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehído), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 7 (19:1ω7c/19:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c).

	<i>Vibrio</i>										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
10:0 3OH	0,4	-	-	-	-	-	-	-	0,5	0,5	0,2
12:0 iso	-	-	0,3	-	-	-	-	0,3	-	-	0,2
12:0	5,2	6,3	5,7	6,8	5,6	4,3	6,0	8,3	-	5,5	4,8
11:0 3OH	-	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13:0 iso	-	0,5	-	-	-	-	1,0	-	-	-	-
13:0 anteiso	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-
13:0	-	0,8	-	0,2	-	0,3	-	-	-	-	-
12:0 iso 3OH	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	0,1
12:1 3OH	-	-	-	-	-	1,9	-	-	0,3	0,1	-
12:0 3OH	3,9	5,5	3,2	3,4	3,5	0,4	4,1	3,5	5,5	4,4	4,5
14:0 iso	-	-	0,6	0,4	0,8	0,7	0,8	1,3	1,0	-	0,8
14:0	4,5	6,6	6,9	2,7	3,6	6,9	6,9	6,7	6,6	5,7	3,1
13:0 iso 3OH	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-
SF 1	0,8	1,6	0,3	0,6	0,4	-	0,5	0,3	0,2	0,5	0,3
15:0 iso	-	-	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-
15:0 anteiso	-	-	-	-	-	-	1,2	-	-	-	-
15:1 ω8c	-	0,4	0,2	0,1	0,4	-	-	-	0,1	0,1	0,2
15:1 ω6c	-	0,2	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-
14:0 iso 3OH	-	0,6	0,8	0,7	0,7	-	1,3	1,4	1,6	-	0,9
16:1 ω7c alcohol	-	-	0,3	1,0	0,2	0,3	-	0,6	-	-	-

	Vibrio										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SF 2	5,3	8,3	3,5	8,7	2,9	6,1	7,4	4,7	4,7	6,3	3,5
16:0 iso	-	0,8	3,2	1,2	4,1	1,6	3,1	5,8	4,9	0,1	3,0
SF 3	32,4	34,6	40,8	39,2	44,1	39,5	37,8	37,6	39,0	31,6	39,1
16:1 ω5c	0,2	-	0,4	0,2	0,2	-	-	-	0,5	0,3	0,3
16:0	25,9	11,6	19,2	15,8	21,1	16,3	8,8	17,5	17,3	18,4	17,8
15:0 iso 3OH	-	0,3	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-
15:0 2OH	-	-	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-
15:0 3OH	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17:1 anteiso ω9c	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-
17:0 iso	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-
17:0 anteiso	-	-	-	-	-	-	1,8	-	-	-	-
17:1 ω8c	0,5	2,9	0,4	0,8	0,7	0,3	0,5	0,4	0,6	1,2	0,8
17:1 ω6c	0,4	0,7	-	0,2	0,3	0,2	0,2	-	0,2	0,4	0,3
17:0 ciclo	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-
17:0	1,3	1,7	0,3	0,8	1,0	1,0	0,3	0,4	0,3	0,9	0,5
16:0 iso 3OH	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-
16:0 3OH	0,2	0,8	0,2	-	0,2	-	-	0,8	-	-	-
18:0 iso	-	-	-	0,2	0,5	0,2	-	0,3	0,7	-	0,4
18:1 ω9c	0,4	-	-	-	0,2	-	-	-	0,5	-	-
SF 8	17,4	13,8	13,3	13,9	6,7	19,0	14,8	8,2	14,1	22,3	18,3
18:1 ω5c	-	-	-	0,2	0,1	-	-	-	0,2	0,3	0,1
18:0	0,8	0,4	0,5	1,3	1,8	0,8	0,4	0,8	0,7	1,4	0,7
18:1 ω7c 11-metil	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-
SF 7	-	-	-	0,7	0,5	0,2	-	0,6	0,1	-	0,2
19:0 ciclo ω8c	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-
18:0 3OH	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20:1 ω7c	-	-	-	0,8	0,4	0,2	-	-	-	0,2	-

Tabla 16. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *V. fluvialis* CECT 4217^T; 2, *V. furnissii* CECT 4203^T; 3, *V. gallaecicus* CECT 7244^T; 4, *V. gazogenes* CECT 5068^T; 5, *V. harveyi* CECT 525^T; 6, *V. ichthyoenteri* CECT 5675^T; 7, *V. inhibens* CECT 7692^T; 8, *V. lentus* CECT 5110^T; 9, *V. mangrovi* CECT 7927^T; 10, *V. mediterranei* CECT 621^T; y 11, *V. mediterranei* CECT 623 cultivados en MA 26°C 48 h. SF 1 (13:0 3OH/15:1 iso H), SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehído), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 6 (19:1 ω9c/19:1 ω11c), SF 7 (19:1ω7c/19:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c), SF 9 (17:1 iso ω9c/16:0 10-metil).

	Vibrio										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
10:0	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-
10:0 3OH	-	-	-	1,8	-	0,2	-	-	0,4	-	-
12:0 iso	-	-	0,2	-	-	-	-	0,2	-	-	-
12:0	4,4	5,4	4,5	5,3	5,8	3,7	3,1	5,4	5,1	4,7	5,6
11:0 3OH	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13:0 iso	1,4	1,1	1,1	0,2	0,5	-	0,9	-	-	1,4	1,1
13:0 anteiso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	0,2
13:1 at 12-13	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9	-	-
13:0	0,6	1,3	-	0,2	0,9	0,2	0,2	-	-	0,2	0,2
12:0 iso 3OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-
12:0 2OH	-	-	-	1,7	-	-	-	-	1,7	-	-
12:1 3OH	-	-	-	15,1	-	-	-	-	5,2	-	-
12:0 3OH	3,6	4,2	2,2	6,0	4,9	2,9	2,2	4,1	4,5	2,6	2,7
14:0 iso	1,1	0,4	1,4	-	0,3	0,5	0,3	0,5	0,4	2,4	1,1
14:0	5,9	6,0	1,7	8,0	7,9	3,4	4,2	4,6	8,2	6,0	7,3
13:0 iso 3OH	0,3	-	0,4	-	-	-	0,2	-	-	0,3	0,3
15:1 iso F	-	-	-	0,3	-	-	-	-	0,3	-	-
SF 1	0,8	1,8	0,4	0,5	1,0	0,3	0,4	0,2	0,6	0,4	
15:0 iso	1,7	0,5	1,1	-	0,3	-	0,5	-	-	2,4	2,0
15:0 anteiso	0,5	-	0,5	-	-	-	0,3	-	-	1,9	1,7
15:1 ω8c	0,7	1,3	0,3	-	0,2	0,5	0,3	-	-	0,2	-
15:1 ω6c	0,3	0,4	0,4	-	0,3	-	0,1	-	-	-	-
14:0 iso 3OH	1,3	1,1	1,2	-	0,5	0,3	0,5	0,7	0,4	1,5	0,6
16:1 ω7c alcohol	0,4	-	0,9	-	-	0,4	-	1,1	-	-	-
SF 2	4,9	5,9	4,8	5,6	7,5	4,2	3,3	3,0	4,7	4,3	4,0
16:0 iso	3,1	1,7	6,5	0,2	0,8	1,0	2,3	3,2	0,9	6,7	3,3
SF 3	33,7	35,0	42,9	26,0	34,2	42,5	43,6	43,6	31,5	31,7	30,3
16:1 ω5c	0,3	-	0,2	-	0,2	0,2	0,3	0,2	-	0,2	0,4
16:0	13,8	11,9	15,5	19,3	15,4	20,9	12,9	14,5	19,7	8,0	12,0
15:0 iso 3OH	0,8	0,5	0,4	-	0,3	-	0,6	-	-	0,7	0,6
15:0 2OH	0,1	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	0,4
SF 9	0,2	-	-	-	-	-	0,1	-	-	0,5	0,3
17:1 iso ω5c	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-
17:1 anteiso ω9c	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	0,3	0,2
17:0 iso	1,4	0,5	1,4	-	0,2	-	1,1	-	-	1,9	2,0
17:0 anteiso	0,4	0,3	0,7	-	-	-	0,4	-	-	2,0	1,8
17:1 ω8c	2,0	2,6	1,0	0,4	1,0	0,9	1,8	0,6	0,4	1,1	0,8
17:1 ω6c	0,5	0,6	0,4	-	0,4	0,2	0,6	0,2	0,4	0,4	0,3
17:0	2,0	2,1	1,1	0,7	2,0	0,5	1,4	0,6	0,8	0,5	0,4
18:1 iso H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	0,2
16:0 iso 3OH	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-
16:0 3OH	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-
18:0 iso	0,7	0,5	0,6	-	-	-	0,3	0,8	-	0,7	0,3
18:1 ω9c	-	-	-	0,5	0,3	-	-	-	0,6	-	-
SF 8	12,1	13,4	7,0	7,5	14,2	16,2	17,3	13,9	13,0	16,0	18,0
18:1 ω5c	-	-	-	-	-	-	0,1	0,3	-	-	-
18:0	0,8	0,9	0,7	0,5	0,8	0,8	0,4	1,6	0,6	0,4	0,5
18:1 ω7c 11-metil	0,2	0,2	-	-	-	-	0,1	-	-	-	0,3
17:0 2OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2
SF 7	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Resultados y Discusión

	Vibrio											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
18:0 3OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1
20:1 ω7c	-	-	0,2	-	-	0,3	0,1	0,9	-	-	-	-
20:0	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 17. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *V. mimicus* CECT 4218^T; 2, *V. mytili* CECT 632^T; 3, *V. natriegens* CECT 526^T; 4, *V. nereis* CECT 595^T; 5, *V. nigripulchritudo* CECT 628^T; 6, *V. ordalii* CECT 582^T; 7, *V. ostreicida* CECT 7398; 8, *V. ostreicida* CECT 7399; 9, *V. pelagius* CECT 4202^T; 10, *V. ponticus* CECT 5869^T cultivados en MA 26°C 48 h. SF 1 (13:0 3OH/15:1 iso H), SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehído), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 7 (19:1ω7c/19:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c), SF 9 (17:1 iso ω9c/16:0 10-metil).

	Vibrio									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10:0 3OH	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12:0 iso	-	0,4	-	-	-	-	-	-	0,3	-
12:0	-	3,8	4,0	4,8	-	-	3,6	4,0	5,0	2,2
11:0 3OH	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	1,1
13:0 iso	-	-	0,4	0,6	-	-	0,8	-	-	1,3
13:0	-	-	0,4	0,4	-	-	0,4	-	-	0,6
12:0 iso 3OH	0,2	0,3	-	-	-	-	-	-	0,3	-
12:1 3OH	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12:0 3OH	5,8	3,9	3,6	4,0	4,1	8,4	3,2	2,8	3,8	2,9
14:0 iso	0,3	0,7	-	0,3	0,5	-	0,2	-	1,8	0,5
14:0	4,7	4,5	6,2	8,1	5,3	5,7	6,2	5,5	4,3	3,7
13:0 iso 3OH	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	0,5
SF 1	0,4	0,4	0,9	0,7	0,3	0,5	0,8	-	0,5	1,1
15:0 iso	-	-	0,4	0,5	-	-	0,3	-	-	2,8
15:0 anteiso	-	-	-	0,3	-	-	0,2	-	-	0,3
15:1 ω8c	0,1	-	0,3	0,3	-	0,3	0,3	-	0,3	0,6
15:1 ω6c	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	0,4
14:0 iso 3OH	1,1	2,1	0,3	0,4	0,3	-	0,3	-	1,9	0,8
16:1 ω7c alcohol	0,3	-	-	-	0,3	0,7	0,8	1,6	-	-
SF 2	4,6	4,8	4,6	3,5	8,6	4,8	2,8	3,1	4,4	2,7
16:0 N alcohol	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-
16:0 iso	3,1	7,3	0,8	1,0	0,9	0,1	1,0	0,6	5,4	2,6
SF 3	38,1	35,1	39,8	41,4	37,7	33,9	36,4	36,9	40,5	26,5
16:1 ω5c	0,4	0,2	-	0,3	0,3	0,6	0,2	0,3	0,2	0,2
16:0	19,0	9,4	14,7	12,1	20,3	27,0	18,9	19,4	10,7	6,5
15:0 iso 3OH	-	-	0,3	-	-	-	0,2	-	-	1,2
SF 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3
17:1 anteiso ω9c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2
17:0 iso	-	-	0,5	0,2	-	-	0,9	-	-	2,4
17:0 anteiso	-	0,2	-	-	-	-	0,3	0,2	-	0,3

	Vibrio									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
17:1 ω8c	1,2	1,0	3,3	1,7	0,6	0,9	2,8	0,9	1,1	5,6
17:1 ω6c	0,3	0,3	0,6	0,6	-	0,4	0,7	0,4	0,4	1,5
17:0	0,8	0,5	2,0	0,5	0,3	1,1	1,8	0,6	0,7	4,0
18:1 iso H	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
16:0 iso 3OH	-	-	-	-	0,6	-	0,3	-	-	-
18:0 iso	0,8	1,5	-	-	-	-	-	-	0,6	1,0
18:1 ω9c	0,7	-	0,5	-	-	0,4	0,3	0,9	-	0,4
SF 8	15,6	22,0	15,1	17,8	19,3	13,5	14,9	21,2	16,2	22,1
18:1 ω5c	0,2	-	-	-	-	0,3	-	0,4	-	0,1
18:0	1,3	1,1	0,7	0,5	0,6	1,2	0,5	1,2	0,9	2,2
18:1 ω7c 11-metil	0,1	-	0,3	-	-	0,2	0,3	-	-	-
17:0 3OH	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-
19:0 iso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3
SF 7	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	0,1
19:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3
18:1 2OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1
20:1 ω7c	0,2	0,5	-	-	-	-	0,2	0,2	0,6	0,7
20:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2

Tabla 18. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *V. rhizosphareae* CECT 7877^T; 2, *V. ruber* CECT 7878^T; 3, *V. scopthalmi* CECT 4638^T; 4, *V. sinaloensis* CECT 7298^T; 5, *V. aestivus* CECT 7758^T; 6, *V. aestivus* CECT 7559; 7, *V. quintilis* CECT 7734^T; 8, *V. splendidus* CECT 528^T; 9, *V. stylophorae* CECT 7929^T; 10, *V. tapetis* CECT 4600^T; 11, *V. tubiashii* CECT 4196^T; 12, *V. vulnificus* CECT 529^T cultivados en MA 26°C 48 h. SF 1 (13:0 3OH/15:1 iso H), SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehído), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 7 (19:1 ω7c/19:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c), SF 9 (17:1 iso ω9c/16:0 10-metil).

	Vibrio											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
9:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-
10:0	-	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11:0 anteiso	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11:0	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-
10:0 3OH	0,6	1,3	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-	-
12:0 iso	-	-	0,2	-	0,1	-	-	0,2	-	-	-	-
12:0	6,1	4,4	3,0	4,1	3,9	2,9	5,0	8,0	2,2	-	5,0	-
13:0 iso	-	-	-	0,2	1,1	1,8	-	-	-	0,2	0,6	-
13:0 anteiso	-	-	-	-	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-
13:0	-	-	0,2	0,4	0,3	0,3	0,8	0,4	-	-	0,4	0,5
12:0 iso 3OH	-	0,3	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	0,3
12:0 2OH	0,9	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12:1 3OH	5,2	19,7	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-
12:0 3OH	5,7	7,6	4,0	1,4	2,4	1,8	3,2	4,5	5,1	2,5	4,3	5,1

Resultados y Discusión

	<i>Vibrio</i>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
14:0 iso	0,3	0,2	2,1	0,6	1,2	0,9	-	0,9	-	0,1	0,2	0,9
14:0	8,3	4,6	6,4	7,0	6,8	5,8	4,9	7,9	17,7	5,3	7,1	2,6
13:0 iso 3OH	-	-	-	-	0,3	0,5	-	-	-	-	0,2	0,9
13:0 2OH	-	-	-	-	0,1	0,2	-	-	-	-	-	-
15:1 iso F	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SF 1	0,5	0,4	0,5	0,5	0,4	0,3	1,0	0,4	-	0,3	0,7	1,2
15:0 iso	-	-	-	0,3	2,1	6,0	-	-	-	1,4	0,4	1,7
15:0 anteiso	-	-	-	0,2	2,8	3,2	-	-	-	0,2	0,2	0,7
15:1 ω8c	-	-	0,5	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	-	0,3	0,2	0,6
15:1 ω6c	-	-	-	0,1	-	0,2	-	-	-	-	0,1	0,5
14:0 iso 3OH	0,5	0,5	1,0	0,5	0,8	0,5	-	0,8	-	-	0,3	1,4
16:1 ω7c alcohol	-	-	0,2	0,6	0,4	0,2	-	0,4	-	0,5	0,2	0,4
SF 2	6,4	6,8	4,8	6,6	2,7	2,1	4,6	3,9	4,7	6,4	3,8	9,1
16:0 iso	0,6	0,4	4,8	1,3	3,9	3,3	-	3,9	-	0,5	0,8	4,2
16:1 ω9c	-	-	-	-	-	-	-	-	9,7	-	-	-
SF 3	28,4	18,9	40,9	43,5	31,1	32,3	39,4	39,3	32,9	43,2	36,9	30,0
16:1 ω5c	-	0,2	0,2	0,3	0,1	0,1	0,2	-	0,6	0,2	0,2	-
16:0	20,0	11,3	17,4	22,1	13,2	10,2	20,9	18,0	16,0	27,4	14,7	10,7
15:0 iso 3OH	-	-	-	-	0,4	0,9	-	-	-	-	0,2	1,5
15:0 2OH	-	-	-	-	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-
SF 9	-	-	-	-	0,1	0,4	-	-	-	-	-	-
15:0 3OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8
17:1 anteiso ω9c	-	-	-	-	0,1	0,1	-	-	0,2	-	0,1	-
17:0 iso	-	-	-	0,2	1,2	4,1	-	-	-	1,3	0,4	1,8
17:0 anteiso	-	-	-	-	1,2	2,0	-	-	-	0,2	0,2	0,9
17:1 ω8c	0,4	0,4	0,8	0,6	2,3	2,2	0,7	0,7	-	0,9	1,3	3,8
17:1 ω6c	-	0,1	0,2	0,2	0,5	0,5	0,4	0,2	-	0,1	0,4	0,9
17:0	0,6	0,5	0,4	0,8	1,0	1,0	1,0	0,6	-	0,7	1,4	1,8
18:1 iso H	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-
16:0 3OH	-	-	-	0,2	-	-	0,2	0,3	-	-	0,3	-
18:0 iso	0,2	0,4	-	-	0,7	0,5	-	0,3	-	-	-	0,6
18:1 ω9c	1,2	0,4	-	0,2	-	-	-	0,2	1,5	0,3	-	0,7
SF8	13,0	16,2	11,4	7,7	17,2	14,5	16,2	7,6	7,2	7,5	18,8	15,0
18:1 ω5c	-	0,3	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	0,7
18:0	0,9	1,3	0,6	0,4	0,7	0,4	0,4	1,0	1,4	0,8	0,5	0,6
18:1 ω7c 11-metil	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
SF7	0,3	-	-	-	-	0,2	-	0,3	0,2	-	-	-
20:1 ω7c	-	0,2	0,2	-	0,4	0,2	-	0,3	0,3	-	-	-
20:0	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-

En la tabla 19 se muestra la cantidad relativa mínima y máxima de cada ácido graso obtenida en los perfiles del género *Vibrio*, donde se observa que los ácidos grasos mayoritarios presentan una amplia variabilidad intraespecífica: SF 3 (18,9-44,1%), 16:0 (6,5-27,4%) y SF 8 (6,7-22,3%). Además, cabe destacar la importancia de otros ácidos grasos en la diferenciación entre especies por medio de GC FAME, debido a su heterogénea presencia en las especies del género *Vibrio*, como son: el 12:0 (ND-8,3%), el 12:1 3OH (ND-19,7%), el 12:0 3OH (0,4-8,4%), el 14:0 (1,7-17,7%), el 15:0 iso (ND-6%), el SF 2 (2,1-9,1%), el 16:0 iso (ND-7,3%), el 16:1 ω 9c (ND-9,7%), el 17:0 iso (ND-4,1%), el 17:1 ω 8c (ND-5,6%) y el 17:0 (ND-4,0%).

Tabla 19. Rango de valores máximos y mínimos de la cantidad relativa detectados en cada ácido graso dentro del género *Vibrio*. ND: No Detectado. SF 1 (13:0 3OH/15:1 iso H), SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehído), SF 3 (16:1 ω 7c/16:1 ω 6c), SF 7 (19:1 ω 7c/19:1 ω 6c), SF 8 (18:1 ω 6c/18:1 ω 7c), SF 9 (17:1 iso ω 9c/16:0 10-metil).

<i>Vibrio</i>	
	Rango
9:0	ND-0,2
10:0	ND-1,5
11:0 anteiso	ND-0,2
11:0	ND-0,2
10:0 3OH	ND-1,8
12:0 iso	ND-0,4
12:1 at 11-12	ND-0,3
12:0	ND-8,3
11:0 3OH	ND-1,1
13:0 iso	ND-1,8
13:0 anteiso	ND-0,3
13:1 at 12-13	ND-0,9
13:0	ND-1,3
12:0 iso 3OH	ND-0,4
12:0 2OH	ND-1,7
12:1 3OH	ND-19,7
12:0 3OH	0,4-8,4
14:0 iso	ND-2,4
14:0	1,7-17,7
13:0 iso 3OH	ND-0,9
13:0 2OH	ND-0,2
15:1 iso F	ND-0,3
SF 1	ND-1,8
15:0 iso	ND-6,0
15:0 anteiso	ND-3,2

<i>Vibrio</i>	
	Rango
15:1 ω8c	ND-1,3
15:1 ω6c	ND-0,5
14:0 iso 3OH	ND-2,1
16:1 ω7c alcohol	ND-1,6
SF 2	2,1-9,1
16:0 N alcohol	ND-0,2
16:0 iso	ND-7,3
16:1 ω9c	ND-9,7
SF 3	18,9-44,1
16:1 ω5c	ND-0,6
16:0	6,5-27,4
15:0 iso 3OH	ND-1,5
15:0 2OH	ND-0,6
SF 9	ND-0,5
17:1 iso ω5c	ND-0,1
15:0 3OH	ND-0,8
17:1 anteiso ω9c	ND-0,3
17:0 iso	ND-4,1
17:0 anteiso	ND-2,0
17:1 ω8c	ND-5,6
17:1 ω6c	ND-1,5
17:0 ciclo	ND-0,4
17:0	ND-4,0
18:1 iso H	ND-0,3
16:0 iso 3OH	ND-0,6
16:0 3OH	ND-0,8
18:0 iso	ND-1,5
18:1 ω9c	ND-0,2
SF 8	6,7-22,3
18:1 ω5c	ND-0,7
18:0	0,4-2,2
18:1 ω7c 11-metil	ND-0,3
17:0 2OH	ND-0,2
17:0 3OH	ND-0,2
19:0 iso	ND-0,3
SF 7	ND-0,7
19:0 ciclo ω8c	ND-0,1
19:0	ND-0,3
18:1 2OH	ND-0,1
18:0 3OH	ND-1,1
20:1 ω7c	ND-0,9
20:0	ND-0,3

En la tabla 20 se muestra el perfil de ácidos grasos obtenido mediante GC FAME de cepas de la familia *Vibrionaceae* que fueron cultivadas en condiciones diferentes. A pesar de las diferentes condiciones aplicadas, los ácidos grasos mayoritarios detectados fueron también el SF 3, el 16:0 y el SF 8. También destaca, como en

el resto de cepas de la familia *Vibrionaceae*, la presencia de 12:0 3OH, 14:0, y SF 2.

Tabla 20. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *Aliivibrio logei* CECT 5009^T cultivado en MA 20°C 48 h; 2, *Photobacterium* sp. CECT 7580^T; 3, *Salinivibrio costicola* CECT 4059^T; 4, *V. agarivorans* CECT 5085^T; 5, *V. marisflavi* CECT 7928^T; 6, *V. orientalis* CECT 629^T; 7, *V. parahaemolyticus* CECT 511^T cultivados en MA 26°C 24 h. SF 1 (13:0 3OH/15:1 iso H), SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehído), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 7 (19:1ω7c/19:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c).

	MA						
	20°C 48 h	26°C 24 h					
	1	2	3	4	5	6	7
9:0	-	-	0,6	-	-	-	-
11:0	-	-	-	-	0,4	-	0,2
10:0 3OH	-	-	0,8	-	-	-	-
12:0	3,5	0,8	4,7	4,5	4,3	4,9	4,2
11:0 3OH	-	-	-	-	1,1	-	0,8
13:0 iso	-	-	-	-	0,7	-	0,5
13:0	-	-	-	-	3,2	0,2	0,8
12:0 3OH	4,1	5,5	3,9	3,5	3,5	2,2	3,0
14:0 iso	-	-	-	0,2	-	-	-
14:1 ω5c	0,1	-	-	-	-	0,2	-
14:0	1,8	1,7	4,2	8,0	3,2	11,3	4,8
13:0 iso 3OH	-	-	-	-	0,2	-	-
SF 1	0,3	-	-	0,3	2,7	0,2	1,4
15:0 iso	-	-	-	-	0,4	-	0,2
15:0 anteiso	-	-	-	-	0,2	0,1	-
15:1 ω8c	0,2	-	-	-	1,3	-	0,3
15:1 ω6c	0,1	-	-	-	0,2	-	0,4
14:0 iso 3OH	-	-	-	-	-	-	0,4
16:1 ω7c alcohol	-	-	-	0,5	-	0,7	-
SF 2	4,5	3,6	5,1	3,5	3,8	3,6	5,3
16:0 iso	-	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,5
SF 3	53,5	43,9	38,1	44,9	28,9	44,8	26,3
16:1 ω5c	0,1	-	-	0,4	-	0,3	-
16:0	20,3	21,5	25,2	15,6	16,0	19,6	11,3
15:0 iso 3OH	-	-	-	-	0,4	-	0,3
15:0 3OH	-	-	-	-	0,5	-	0,4
17:1 anteiso ω9c	-	-	0,2	-	-	-	-
17:0 iso	-	-	-	-	0,6	-	0,3
17:0 anteiso	-	-	-	-	0,1	-	0,2
17:1 ω8c	0,8	0,7	0,3	0,7	6,0	0,2	3,2
17:1 ω6c	0,1	-	-	0,2	1,1	-	0,7
17:0	0,7	0,7	0,2	0,3	5,5	0,2	5,3
16:0 2OH	-	-	1,3	-	-	-	-
16:0 3OH	-	-	-	-	0,2	-	0,4
18:0 iso	-	-	-	-	-	-	0,3
18:1 ω9c	-	0,5	0,7	-	-	-	-

	MA						
	20°C 48 h	26°C 24 h					
	1	2	3	4	5	6	7
SF 8	7,9	18,5	12,4	16,2	14,4	11,0	25,9
18:1 ω5c	-	-	-	0,2	-	-	-
18:0	1,2	1,6	1,4	0,4	0,6	0,4	2,3
18:1 ω7c 11-metil	-	0,4	0,3	-	-	-	-
17:0 3OH	-	-	-	-	0,1	-	-
SF 7	0,5	-	0,3	-	-	-	-
19:0	-	-	-	-	-	-	0,2
20:1 ω7c	0,4	0,3	-	0,2	0,2	-	0,4

Por otro lado, se estudió la variabilidad existente en la composición de ácidos grasos entre cepas pertenecientes a la misma especie (tabla 21). Como puede observarse, el perfil de ácidos grasos entre las dos cepas pertenecientes a *V. mediterranei* fue bastante similar, siendo la diferencia encontrada entre ambas cepas en cuanto a la cantidad relativa de determinados ácidos grasos menor a 1,5, excepto para el ácido graso 16:0 iso donde *V. mediterranei* CECT 621^T presentó 3,4 unidades porcentuales más que *V. mediterranei* CECT 623, para el 16:0 cuya diferencia entre ambas cepas fue de 4, y para el SF 8 que fue de 2. Lo mismo ocurrió para las dos cepas estudiadas de *V. ostreicida*, el perfil es muy similar excepto para el ácido graso 17:1 ω8c donde la diferencia entre la cantidad relativa de *V. ostreicida* CECT 7398 y *V. ostreicida* CECT 7399 fue de 2, y para el SF 8 que presentó una variación de 6,3. En el caso de *V. aestivus*, las dos cepas de esta especie presentaron una diferencia en la cantidad relativa del ácido graso 15:0 iso de 3,9, de 3 en el 16:0 y de 2,9 en el SF 8. Por lo que aunque las diferencias no fueron excesivamente grandes, sí lo suficiente como para diferenciar ambas cepas.

Tabla 21. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *V. mediterranei* CECT 621^T; 2, *V. mediterranei* CECT 623; 3, *V. ostreicida* CECT 7398; 4, *V. ostreicida* CECT 7399; 5, *V. aestivus* CECT 7758^T; 6, *V. aestivus* CECT 7759; 4, cultivados en MA 26°C 24 h. |Δ| hace referencia a la variación en valor absoluto observada para cada ácido graso de una cepa con respecto a otra cepa de la misma especie cultivada en las mismas condiciones. SF 1 (13:0 3OH/15:1 iso H), SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehído), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 7 (19:1 ω7c/19:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c).

	1	2	ΔI	3	4	ΔI	5	6	ΔI
12:0 iso	-	-	-	-	-	-	0,1	-	0,1
12:0	4,7	5,6	0,8	3,6	4,0	0,4	3,9	2,9	1,0
11:0 3OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13:0 iso	1,4	1,1	0,3	0,8	-	0,8	1,1	1,8	0,7
13:0 anteiso	0,3	0,2	0,1	-	-	-	0,1	0,1	0,0
13:0	0,2	0,2	0,0	0,4	-	0,4	0,3	0,3	0,0
12:0 iso 3OH	0,2	-	0,2	-	-	-	0,1	-	0,1
12:0 3OH	2,6	2,7	0,1	3,2	2,8	0,4	2,4	1,8	0,6
14:0 iso	2,4	1,1	1,3	0,2	-	0,2	1,2	0,9	0,3
14:0	6,0	7,3	1,3	6,2	5,5	0,7	6,8	5,8	1,0
13:0 iso 3OH	0,3	0,3	0,0	0,2	-	0,2	0,3	0,5	0,2
13:0 2OH	-	-	-	-	-	-	0,1	0,2	0,1
15:1 iso F	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SF 1	0,4	-	0,4	0,8	-	0,8	0,4	0,3	0,1
15:0 iso	2,4	2,0	0,4	0,3	-	0,3	2,1	6,0	3,9
15:0 anteiso	1,9	1,7	0,2	0,2	-	0,2	2,8	3,2	0,6
15:1 ω8c	0,2	-	0,2	0,3	-	0,3	0,3	0,3	0,0
15:1 ω6c	-	-	-	0,1	-	0,1	-	0,2	0,2
14:0 iso 3OH	1,5	0,6	0,9	0,3	-	0,3	0,8	0,5	0,3
16:1 ω7c alcohol	-	-	-	0,8	1,6	0,8	0,4	0,2	0,2
SF 2	4,3	4,0	0,3	2,8	3,1	0,3	2,7	2,1	0,6
16:0 iso	6,7	3,3	3,4	1,0	0,6	0,4	3,9	3,3	0,6
SF 3	31,7	30,3	1,4	36,4	36,9	0,5	31,1	32,3	1,2
16:1 ω5c	0,2	0,4	0,2	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1	0,0
16:0	8,0	12,0	4,0	18,9	19,4	0,5	13,2	10,2	3,0
15:0 iso 3OH	0,7	0,6	0,1	0,2	-	0,2	0,4	0,9	0,5
15:0 2OH	-	0,4	0,4	-	-	-	0,1	0,1	0,0
SF 9	0,5	0,3	0,2	-	-	-	0,1	0,4	0,3
17:1 anteiso ω9c	0,3	0,2	0,1	-	-	-	0,1	0,1	0,0
17:0 iso	1,9	2,0	0,1	0,9	-	0,9	1,2	4,1	2,9
17:0 anteiso	2,0	1,8	0,2	0,3	0,2	0,1	1,2	2,0	0,8
17:1 ω8c	1,1	0,8	0,3	2,8	0,8	2,0	2,3	2,2	0,1
17:1 ω6c	0,4	0,3	0,1	0,7	0,4	0,3	0,5	0,5	0,0
17:0	0,5	0,4	0,1	1,8	0,6	1,2	1,0	1,0	0,0
18:1 iso H	0,3	0,2	0,1	-	-	-	0,1	-	0,1
16:0 iso 3OH	-	-	-	0,3	-	0,3	-	-	-
18:0 iso	0,7	0,3	0,4	-	-	-	0,7	0,5	0,2
18:1 ω9c	-	-	-	0,3	0,9	0,6	-	-	-
SF 8	16,0	18,0	2,0	14,9	21,2	6,3	17,2	14,5	2,7
18:1 ω5c	-	-	-	-	0,4	0,4	0,1	-	0,1
18:0	0,4	0,5	0,1	0,5	1,2	0,7	0,7	0,4	0,3
18:1 ω7c 11-metil	-	0,3	0,3	0,3	-	0,3	-	-	-
17:0 3OH	-	-	-	0,2	-	0,2	-	-	-
SF 7	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2
20:1 ω7c	-	-	-	0,2	0,2	0,0	0,4	0,2	0,2

Para corroborar la reproducibilidad de la técnica dentro de la familia *Vibrionaceae*, se realizaron réplicas de algunas de las cepas para ver si variaba el perfil de ácidos grasos (tabla 22). Como se observa, las réplicas obtenidas para cada cepa fueron muy similares entre sí, no observándose variaciones mayores a 1,3 en ningún caso, lo que implica una alta reproducibilidad de la técnica para la familia *Vibrionaceae*.

Tabla 22. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *Photobacterium aphoticum* CECT 7614^T; 1', *Photobacterium aphoticum* CECT 7614^T réplica; 2, *Photobacterium ganghwense* CECT 7641^T; 2', *Photobacterium ganghwense* CECT 7641^T réplica; 3, *Photobacterium halotolerans* CECT 5860^T; 3', *Photobacterium halotolerans* CECT 5860^T réplica; 4, *Photobacterium rosenbergii* CECT 7644^T; 4', *Photobacterium rosenbergii* CECT 7644^T réplica, cultivados en MA 26°C 24 h. |ΔI| hace referencia a la variación en valor absoluto observada para cada ácido graso de una cepa con respecto a su réplica. SF 1 (13:0 3OH/15:1 iso H), SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehído), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 7 (19:1 ω7c/19:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c), SF 9 (17:1 iso ω9c/16:0 10-metil).

	1	1'	ΔI	2	2'	ΔI	3	3'	ΔI	4	4'	ΔI
9:0	-	-	-	-	0,4	0,4	-	0,2	0,2	-	0,2	0,2
10:0 iso	0,3	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10:0	-	-	-	-	-	-	0,4	0,4	0,0	-	-	-
11:0	-	-	-	-	-	-	0,4	0,4	0,0	-	0,1	0,1
10:0 3OH	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2	0,2	0,2	0,0
12:0 iso	-	-	-	-	-	-	0,3	0,3	0,0	-	-	-
12:0	2,3	2,4	0,1	4,5	4,2	0,3	5,4	5,2	0,2	2,7	2,5	0,2
11:0 3OH	0,4	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13:0 iso	1,4	1,8	0,4	0,8	0,8	0,0	0,3	0,2	0,1	1,1	1,2	0,1
13:0 anteiso	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2	0,0	-	-	-
13:0	0,5	0,4	0,1	0,3	0,2	0,1	0,4	0,4	0,0	0,2	0,3	0,1
12:0 iso 3OH	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2	0,0	-	-	-
12:0 3OH	2,5	2,6	0,1	3,9	3,7	0,2	6,6	6,0	0,6	3,3	3,0	0,3
14:0 iso	0,3	0,3	0,0	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2	0,0
14:0	3,4	3,3	0,1	3,9	4,4	0,5	0,8	1,0	0,2	2,4	2,5	0,1
13:0 iso 3OH	0,4	0,6	0,2	-	0,2	0,2	-	0,1	0,1	0,4	0,4	0,0
15:1 iso F	1,1	1,3	0,2	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2	0,0
SF 1	1,0	1,0	0,0	0,7	0,6	0,1	1,1	1,0	0,1	0,5	0,5	0,0
15:0 iso	2,1	2,5	0,4	0,6	0,5	0,1	0,1	0,1	0,0	2,5	3,1	0,6
15:0 anteiso	1,5	1,3	0,2	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2	0,0
15:1 ω8c	2,4	2,0	0,4	0,6	0,5	0,1	1,0	0,9	0,1	0,5	0,6	0,1
15:1 ω6c	0,8	0,4	0,4	-	-	-	-	-	-	0,2	0,4	0,2
14:0 iso 3OH	0,4	0,4	0,0	-	-	-	0,6	0,5	0,1	0,3	0,3	0,0
16:1 ω7c alcohol	-	-	-	0,3	0,3	0,0	-	-	-	-	-	-

	1	1'	ΔI	2	2'	ΔI	3	3'	ΔI	4	4'	ΔI
SF 2	3,1	3,4	0,3	5,3	4,6	0,7	4,9	4,2	0,7	3,9	3,3	0,6
16:0 iso	1,5	1,5	0,0	0,5	0,5	0,0	2,1	2,1	0,0	1,3	1,3	0,0
SF 3	37,6	37,6	0,0	38,3	37,4	0,9	31,3	30,9	0,5	38,4	38,0	0,4
16:1 ω5c	0,3	0,4	0,1	0,4	0,4	0,0	0,2	0,2	0,0	0,2	0,2	0,0
16:0	10,1	11,4	1,3	14,5	15,3	0,8	16,2	17,0	0,8	10,9	9,8	1,1
15:0 iso 3OH	0,7	1,1	0,4	0,4	0,4	0,0	0,2	0,1	0,1	1,1	1,1	0,0
15:0 2OH	0,2	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SF 9	1,9	2,2	0,3	0,4	0,4	0,0	-	-	-	1,1	1,4	0,3
17:1 anteiso ω9c	0,3	0,4	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17:0 iso	1,2	1,5	0,3	0,7	0,7	0,0	0,5	0,4	0,1	3,3	4,0	0,7
17:0 anteiso	2,8	2,1	0,7	-	-	-	0,3	0,4	0,1	0,5	0,5	0,0
17:1 ω8c	1,6	1,2	0,4	0,8	0,8	0,0	3,0	2,9	0,1	1,3	1,4	0,1
17:1 ω6c	0,8	0,7	0,1	0,5	0,4	0,0	0,6	0,5	0,1	0,5	0,5	0,0
17:0	1,2	1,0	0,2	1,3	1,2	0,1	2,9	3,0	0,1	1,5	1,5	0,1
18:1 iso H	-	0,3	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18:0 iso	0,2	-	0,2	-	-	-	0,2	0,2	0,0	0,1	0,2	0,1
18:1 ω9c	-	-	-	-	0,6	0,6	-	0,4	0,4	-	-	-
SF 8	15,0	14,1	1,1	21,0	20,5	0,5	18,4	18,8	0,4	20,3	20,0	0,3
18:0	0,4	0,4	0,0	0,5	0,9	0,4	0,7	0,9	0,2	0,6	0,7	0,1
18:1 ω7c 11-metil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	0,1
17:0 iso 3OH	-	-	-	-	-	-	0,8	0,4	0,4	-	-	-
19:0 iso	-	-	-	-	0,3	0,3	0,3	0,3	0,0	0,1	0,2	0,1
SF 7	0,2	-	0,2	-	-	-	-	-	-	0,1	0,2	0,1
18:0 3OH	-	0,5	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Por todo lo expuesto se puede considerar que GC FAME es una técnica adecuada para la autenticación de cepas de la familia *Vibrionaceae*, debido a que éstas presentan un perfil lo suficientemente discriminatorio para diferenciar entre especies y a que los resultados obtenidos son reproducibles. Los ácidos grasos más representativos de la familia *Vibrionaceae* por estar presentes en todas las cepas estudiadas fueron: 12:0 3OH, 14:0, SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehído), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), 16:0 y SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c). Además, el SF 3 es el ácido graso que se encuentra en mayor proporción en todas las cepas (figura 52).

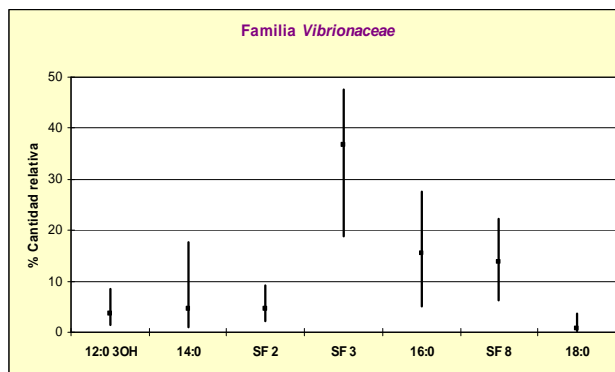


Figura 52. Gráfica de los ácidos grasos más representativos de las cepas estudiadas de la familia *Vibrionaceae* y la variación observada de éstos en la cantidad relativa.

En la figura 53 se muestran los ácidos grasos representativos del género *Aliivibrio* por estar presentes en todas las cepas estudiadas. Al estar basada en un número menor de cepas (3) y de especies (3), se observa una menor variación en los ácidos grasos presentes, y además de los siete ácidos grasos comunes a la familia *Vibrionaceae*, se encuentran presentes también en todos los casos los ácidos grasos: 12:0, 17:1 ω8c y 17:0. Además, cabe destacar que el ácido graso SF 3 presentó la mayor variabilidad, estando presente en un rango de entre 37,0 y 48,8%, mientras que el resto de ácidos grasos presentaron una variabilidad entre las cepas estudiadas menor, siendo la mayor diferencia encontrada entre el valor máximo y mínimo de 3,1 (SF 2). Por otro lado, destaca el género *Aliivibrio* por ser el único donde en todos los casos la cantidad relativa del 16:0 es mayor que la del SF 8.

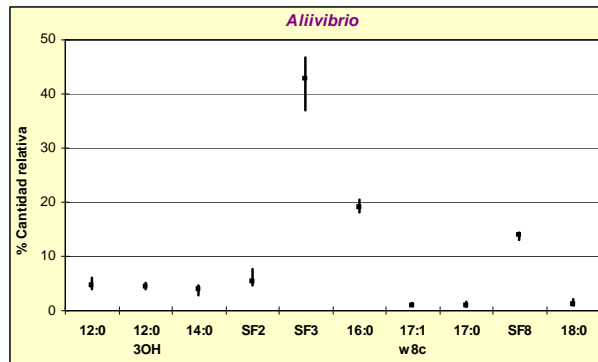


Figura 53. Gráfica de los ácidos grasos más representativos de las cepas estudiadas del género *Aliivibrio* y la variación observada de éstos en la cantidad relativa.

El género *Enterovibrio* destaca por ser el único de la familia *Vibrionaceae* que presenta 18:1 ω 9c en todas las cepas del género (figura 54). Asimismo, a pesar de basar el estudio en sólo 4 especies (un total de 4 cepas), la variabilidad encontrada en cuanto a la cantidad relativa de los ácidos grasos es mayor a la observada en el género *Aliivibrio*, como vemos en el ácido graso 14:0 (1,0-4,0%), SF 3 (30,3-46,6%), 16:0 (15,6-19,3%), 18:1 ω 9c (1,5-7,8%) y SF 8 (14,7-18,8%).

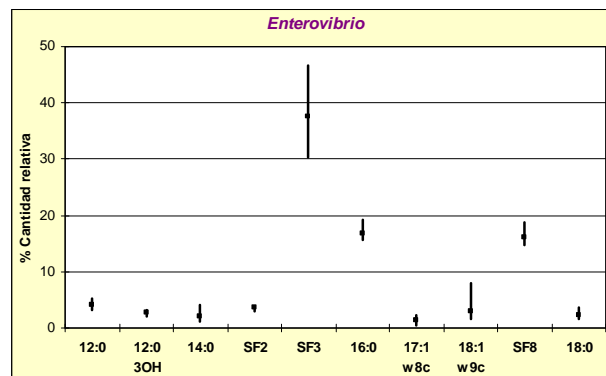


Figura 54. Gráfica de los ácidos grasos más representativos de las cepas estudiadas del género *Enterovibrio* y la variación observada de éstos en la cantidad relativa.

El género *Photobacterium* destaca porque, a diferencia del resto de géneros de la familia *Vibrionaceae*, todas sus cepas presentan los ácidos grasos SF 1 (13:0 3OH/15:1 iso H), 15:1 ω 8c y 17:1 ω 6c. Destaca también, al igual que ocurre en el género *Vibrio* (figura 56), que el rango de variabilidad para el 16:0 y para el SF 8, es mayor que el observado anteriormente, llegando incluso en algunos casos a valores por debajo de 10. Por otro lado, para la discriminación entre especies pertenecientes al género *Photobacterium* destaca también el ácido graso 15:0 iso, ya que en algunas especies no se encuentra presente, mientras que en otras sí lo está en cantidades considerables (3,9%).

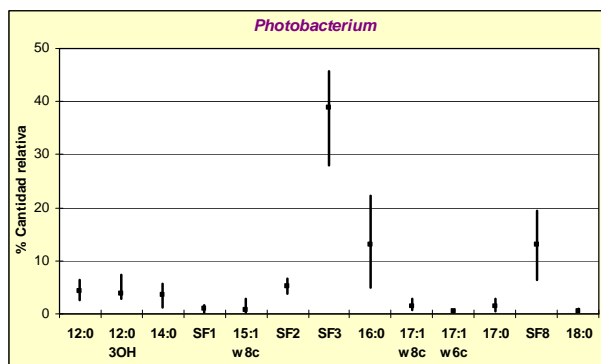


Figura 55. Gráfica de los ácidos grasos más representativos de las cepas estudiadas del género *Photobacterium* y la variación observada en la cantidad relativa de éstos.

Por último, los ácidos grasos más representativos del género *Vibrio* por estar presentes en todas las cepas estudiadas fueron: 12:0 3OH, 14:0, SF 2, SF 3, 16:0, SF 8 y 18:0 (figura 56). Destaca el amplio rango de cantidad relativa de todos ellos, excepto del 18:0, y el valor máximo que alcanza el ácido graso 14:0 (17,7%), estando en mayor cantidad incluso que el 16:0 y SF 8 como ocurre en el perfil de *V. stylophorae* CECT 7929^T. A la hora de diferenciar entre especies destacaron por estar presentes en algunas especies en cantidades relativamente altas, mientras que estaban ausentes en otras, los ácidos grasos: 12:1 3OH, 17:0 iso, el 17:1 ω 8c y el 17:0.

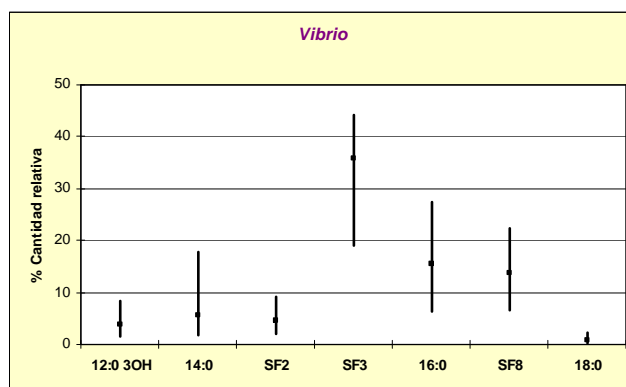


Figura 56. Gráfica de los ácidos grasos más representativos de las cepas estudiadas del género *Vibrio* y la variación observada en cuanto la cantidad relativa de éstos.

2.3 Análisis de cepas del género *Aeromonas*

En este apartado se detalla el resultado del análisis mediante GC FAME de 64 cepas pertenecientes al género *Aeromonas*, con el fin de obtener una base de datos curada para el proceso de autenticación de cepas.

Debido a la homogeneidad en las condiciones de crecimiento recomendadas para las cepas del género *Aeromonas* analizadas, todas las cepas se cultivaron en TSA a 30°C durante 24 h.

En las tablas 23, 24, 25, 26, 27, 28 y 29 se muestra la composición de ácidos grasos de las cepas del género *Aeromonas* estudiadas. Cabe destacar que como ocurrió con el género *Pseudomonas* y la familia *Vibrionaceae*, también pertenecientes a la clase *Gammaproteobacteria*, los ácidos grasos mayoritarios detectados fueron el SF 3 (16:1 ω 7c/16:1 ω 6c), el 16:0 y el SF 8 (18:1 ω 6c/18:1 ω 7c).

Tabla 23. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *A. allosaccharophila* CECT 4911^T; 2, *A. allosaccharophila* CECT 4220; 3, *A. aquariorum* CECT 7289^T; 4, *A. bestiarum* CECT 4227^T; 5, *A. bestiarum* CECT 5219; 6, *A. bestiarum* CECT 7451; 7, *A. bivalvium* CECT 7113^T; 8, *A. bivalvium* CECT 7112; 9, *A. caviae* CECT 838^T; y 10, *A. caviae* CECT 4226, cultivados en TSA 30°C 24 h. SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehído), SF 3 (16:1 ω 7c/16:1 ω 6c), SF 7 (19:1 ω 7c/19:1 ω 6c), SF 8 (18:1 ω 6c/18:1 ω 7c), SF 9 (17:1 iso ω 9c/16:0 10-metil).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
9:0	0,8	0,3	-	-	0,2	0,2	-	-	-	-
10:0 iso	0,4	-	0,2	0,3	-	-	0,1	-	-	-
10:0	0,2	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
11:0	0,4	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
12:0	6,5	5,0	5,1	5,6	5,7	4,2	4,4	5,3	5,8	6,3
13:0 iso	0,6	0,1	0,3	0,3	0,2	0,3	0,7	0,6	0,5	0,6
13:00	0,3	0,4	0,4	0,4	0,1	0,2	0,1	0,1	-	-
12:0 3OH	0,2	0,2	0,2	-	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2
14:0 iso	-	0,1	0,2	-	-	0,1	-	-	-	-
14:0	3,9	3,7	7,1	4,1	2,1	4,8	2,4	3,2	3,2	2,6
15:1 iso F	0,2	-	-	-	-	0,1	0,1	-	-	-
15:0 iso	1,6	0,7	0,9	0,7	0,3	1,3	1,5	1,0	1,0	1,0
15:0 anteiso	-	0,1	0,2	-	-	0,1	0,1	-	0,1	-
15:1 ω8c	0,1	0,2	0,1	-	-	0,1	-	-	-	-
15:1 ω5c	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-
16:1 ω7c alcohol	-	0,1	2,4	2,5	0,1	0,9	-	-	-	-
SF 2	8,3	7,0	11,5	8,0	7,8	6,3	6,8	8,7	7,5	8,4
16:0 N alcohol	-	-	0,6	0,5	-	0,2	-	-	-	-
16:0 iso	0,4	0,8	0,9	0,5	0,2	1,1	0,3	0,1	0,1	0,3
SF 3	36,4	40,8	33,9	41,9	40,3	37,8	35,9	35,3	35,9	36,1
16:1 ω5c	0,3	0,2	0,1	-	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2
16:0	20,1	21,5	19,6	19,7	25,1	24,7	24,1	23,8	26,8	25,9
15:0 iso 3OH	2,5	0,7	1,1	0,6	0,8	0,9	1,6	1,4	0,8	1,1
15:0 2OH	-	0,1	0,1	-	-	-	0,1	-	-	-
SF 9	2,5	0,9	0,8	0,9	0,8	1,5	2,5	1,1	0,7	0,9
15:0 3OH	0,3	0,3	0,3	-	-	0,1	-	-	-	-
17:1 anteiso ω9c	-	-	-	0,4	-	-	-	-	0,1	-
17:0 iso	1,7	0,7	0,7	0,7	1,4	1,3	4,1	3,0	1,1	1,5
17:0 anteiso	0,2	0,2	0,2	-	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	-
17:1 ω8c	1,1	2,1	1,3	1,5	0,6	0,9	0,7	0,3	0,2	0,3
17:1 ω6c	-	0,5	0,3	0,4	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	-
17:0	0,6	1,2	1,2	0,8	0,5	0,7	0,8	0,5	0,3	0,3
16:0 2OH	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16:0 3OH	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-
18:1 ω9c	0,2	-	-	-	0,2	-	-	-	0,3	-
SF 8	7,8	10,8	9,8	9,6	11,7	10,4	12,1	14,1	13,9	13,4
18:1 ω5c	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-
18:0	1,6	1,1	0,7	0,6	1,0	1,1	0,7	0,9	0,8	0,8
18:1 ω7c 11-metil	-	0,1	-	-	0,2	-	0,2	0,2	0,2	0,2
SF 7	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-
20:1 ω7c	-	-	-	-	0,1	-	0,1	-	-	-
20:0	0,2	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 24. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *A. encheleia* CECT 4342^T; 2, *A. encheleia* CECT 4985; 3, *A. encheleia* CECT 5027; 4, *A. enteropelogenes* CECT 4487^T; 5, *A. enteropelogenes* CECT 4935; 6, *A. enteropelogenes* CECT 4937; 7, *A. eucrenophila* CECT 4224^T; 8, *A. eucrenophila* CECT 4827; y 9, *A. eucrenophila* CECT 4855, cultivados en TSA 30°C 24 h. SF 1 (13:0 3OH/15:1 iso H), SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehído), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c), SF 9 (17:1 iso ω9c/16:0 10-metil).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
9:0	-	0,2	-	0,3	-	-	-	-	-
10:0 iso	0,1	-	-	0,2	-	-	0,1	-	-
11:0	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-
12:0 iso	-	-	-	0,1	-	0,1	-	-	-
12:0	4,8	5,0	6,0	3,9	3,9	4,1	5,2	5,4	6,4
13:0 iso	0,6	0,4	0,4	0,8	0,7	0,6	1,1	0,4	0,2
13:0 anteiso	0,1	-	-	0,1	0,1	0,1	-	-	-
13:0	-	-	-	0,9	0,2	0,2	-	-	-
12:0 3OH	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
14:0 iso	-	-	-	0,2	0,2	0,2	-	-	-
14:0	2,6	2,7	2,9	2,6	3,0	3,3	3,2	3,4	3,8
15:1 iso F	0,1	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-
SF 1	-	-	-	1,1	-	-	-	-	-
15:0 iso	2,2	1,2	0,9	1,1	1,7	1,3	3,8	1,5	0,7
15:0 anteiso	0,2	0,2	-	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1
15:1 ω8c	-	-	-	0,3	0,1	0,1	-	-	-
15:1 ω6c	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-
14:0 iso 3OH	-	-	-	0,8	-	0,7	-	-	-
16:1 ω7c alcohol	-	-	-	1,7	0,4	0,9	-	-	-
SF 2	7,2	7,7	10,0	5,1	6,1	6,1	6,3	7,8	9,7
16:0 N alcohol	-	-	-	0,5	-	0,2	-	-	-
16:0 iso	0,3	0,1	0,2	2,2	1,6	1,8	0,2	-	-
SF 3	41,0	42,6	47,1	31,4	33,5	34,6	41,1	43,1	44,6
16:1 ω5c	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
16:0	21,0	22,3	19,3	13,6	21,4	21,1	18,8	23,4	24,3
15:0 iso 3OH	2,1	1,4	1,9	1,8	1,7	1,3	2,9	1,2	0,6
15:0 2OH	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	-	-	-
SF 9	3,2	1,6	1,2	3,2	2,6	2,2	3,1	1,3	0,6
15:0 3OH	-	-	-	0,6	-	0,1	-	-	-
17:1 anteiso ω9c	0,1	-	-	-	-	-	0,1	-	-
17:0 iso	3,5	1,9	1,2	2,3	2,6	1,9	3,2	1,3	0,5
17:0 anteiso	0,4	0,3	0,2	0,5	0,5	0,4	0,1	0,1	
17:1 ω8c	0,2	0,2	0,3	5,4	1,0	1,2	0,5	0,3	0,2
17:1 ω6c	-	-	-	1,4	0,2	0,3	0,1	-	-
17:0	0,1	0,2	-	2,9	0,8	0,8	0,2	0,2	0,1
18:0 iso	-	-	-	0,2	0,1	0,1	-	-	-
18:1 ω9c	-	0,2	-	-	0,3	-	-	0,3	0,2
SF 8	8,7	10,3	7,6	13,0	15,4	15,0	9,0	9,5	7,5

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
18:1 ω5c	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-
18:0	0,5	0,8	0,3	0,6	0,9	0,7	0,4	0,5	0,3
18:1 ω7c 11-metil	0,3	0,1	-	-	0,1	0,1	-	-	-
19:0 iso	0,1	-	-	-	0,1	-	-	-	-
18:1 2OH	-	-	-	-	0,1	0,1	-	-	-
20:1 ω7c	-	-	-	-	0,1	0,1	-	-	-

Tabla 25. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *A. fluvialis* CECT 7401^T; 2, *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* CECT 4221^T; 3, *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* CECT 4558; 4, *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* CECT 839^T; 5, *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* CECT 398; 6, *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* CECT 4330; 7, *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* CECT 5743; 8, *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* CECT 5745; 9, *A. ichthiosmia* CECT 4486^T; 10, *A. jandaei* CECT 4228^T; 11, *A. jandaei* CECT 4229; y 12, *A. jandaei* CECT 4335, cultivados en TSA 30°C 24 h. SF 1 (13:0 3OH/15:1 iso H), SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehído), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 7 (19:1 ω7c/19:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c), SF 9 (17:1 iso ω9c/16:0 10-metil).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
9:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-
10:0 iso	0,4	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-
10:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1
11:0 iso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1
11:0	-	-	-	-	0,1	0,2	-	-	-	-	0,1	0,2
12:0 iso	-	-	-	-	0,1	0,2	-	-	-	-	-	0,1
12:0	6,7	6,3	4,7	4,5	3,8	4,5	3,7	3,7	4,7	3,6	3,2	4,0
13:0 iso	-	0,5	0,2	0,1	1,1	0,4	0,3	0,4	0,8	0,3	0,1	0,7
13:0 anteiso	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-
13:0	-	0,1	0,5	0,2	0,5	0,8	0,3	0,3	0,3	0,6	0,8	0,7
12:0 3OH	-	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,1	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2
14:0 iso	-	-	0,1	-	0,7	0,2	0,1	0,2	-	-	-	0,5
14:1 ω5c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14:0	9,5	3,7	5,2	6,4	3,4	2,9	5,0	4,9	4,1	7,2	4,9	1,8
15:1 iso F	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	0,2
SF 1	-	-	-	-	-	1,4	-	-	-	-	1,4	-
15:0 iso	-	0,9	0,6	0,5	2,7	0,9	0,9	1,2	1,1	1,0	0,2	2,3
15:0 anteiso	-	-	0,2	0,1	0,2	0,6	0,1	0,2	0,1	0,2	-	0,2
15:1 ω8c	-	-	0,1	-	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
15:1 ω6c	-	-	-	-	0,1	0,1	-	0,1	-	0,2	0,1	0,1
14:0 iso 3OH	-	-	-	-	1,2	0,8	-	-	-	-	-	0,9
16:1 ω7c alcohol	0,2	-	0,3	1,2	1,9	1,5	1,5	1,2	0,5	1,0	1,4	2,2
SF 2	11,1	8,2	7,9	7,2	4,8	6,3	6,6	6,4	7,2	6,8	6,2	4,1
16:0 N alcohol	-	-	-	0,5	0,4	0,4	0,6	0,5	-	0,3	0,6	0,6
16:0 iso	-	-	0,7	0,3	3,8	2,0	0,8	1,6	0,6	0,6	0,4	3,1
SF 3	33,2	35,1	35,1	37,1	31,1	35,9	36,6	35,8	37,0	35,1	29,7	29,1

Resultados y Discusión

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
16:1 ω5c	-	0,2	0,1	0,1	0,1	-	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1
16:0	25,0	25,4	23,2	26,5	15,3	17,6	23,7	24,1	16,7	20,1	16,6	14,2
15:0 iso 3OH	-	0,8	0,5	0,2	2,2	0,5	0,7	0,9	1,7	0,7	0,3	2,7
15:0 2OH	-	-	-	-	0,1	0,3	-	0,2	-	-	-	0,2
SF 9	-	1,0	0,4	0,4	3,4	0,7	0,8	0,9	1,4	1,0	0,3	4,1
17:1 iso ω5c	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15:0 3OH	-	0,1	0,3	-	0,3	0,5	-	0,2	0,3	0,4	0,5	0,3
17:0 iso	-	0,7	0,5	0,3	3,2	0,6	0,7	1,1	1,6	1,0	0,3	5,3
17:0 anteiso	-	-	0,2	0,1	0,3	0,8	0,2	0,2	0,2	0,2	-	0,4
17:1 ω8c	-	0,4	1,9	0,6	2,8	3,6	1,6	1,6	1,9	2,8	4,4	3,9
17:1 ω6c	-	0,1	0,4	0,1	0,6	0,7	0,3	0,4	0,5	0,7	1,0	0,8
17:0	-	0,4	2,0	0,6	1,5	2,7	1,4	1,4	1,0	2,3	3,3	2,3
16:0 3OH	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18:0 iso	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	0,3
18:1 ω9c	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	0,4	-
SF 8	12,3	15,1	13,8	11,7	12,2	11,9	12,7	11,3	16,9	12,2	21,6	12,9
18:0	1,5	0,7	1,0	0,8	0,7	0,5	1,1	0,9	0,7	0,8	1,7	0,7
18:1 ω7c 11-metil	-	0,2	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-
19:0 iso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1
SF 7	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-
20:1 ω7c	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	0,2	0,1

Tabla 26. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *A. media* CECT 4232^T; 2, *A. media* CECT 4231; 3, *A. molluscorum* CECT 5864^T; 4, *A. piscicola* CECT 7443^T; 5, *A. piscicola* CECT 7444; 6, *A. popoffi* CECT 4995; 7, *A. popoffi* CECT 5176^T; y 8, *A. popoffi* CECT 5250, cultivados en TSA 30°C 24 h. SF 1 (13:0 3OH/15:1 iso H), SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehído), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 7 (19:1ω7c/19:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c), SF 9 (17:1 iso ω9c/16:0 10-metil).

	1	2	3	4	5	6	7	8
9:0	-	0,4	-	-	-	-	-	-
10:0 iso	-	-	0,2	-	-	-	0,1	-
10:0	-	-	-	-	-	-	-	-
11:0 iso	-	-	-	-	-	-	-	-
11:0	-	-	-	-	-	-	-	-
12:0 iso	-	-	-	0,2	-	-	-	-
12:0	5,6	4,1	5,3	4,5	5,6	3,8	3,9	3,6
13:0 iso	0,9	0,7	0,6	0,7	0,6	0,6	0,6	0,8
13:0	-	0,7	0,4	0,2	0,5	0,2	0,1	0,2
12:0 3OH	-	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
14:0 iso	-	0,2	-	0,5	-	-	-	-
14:0	2,9	5,4	3,6	3,2	3,4	2,2	1,9	2,2
15:1 iso F	-	-	-	0,2	0,1	-	0,1	0,1
15:0 iso	2,0	1,9	0,8	2,8	2,0	0,8	0,7	1,2
15:0 anteiso	-	0,2	-	0,1	0,1	-	0,1	-

	1	2	3	4	5	6	7	8
15:1 ω8c	-	0,2	0,1	-	0,2	-	-	0,1
15:1 ω6c	-	0,1	0,2	-	-	-	-	-
14:0 iso 3OH	-	-	-	0,8	-	-	-	-
16:1 ω7c alcohol	-	1,4	-	0,2	1,9	1,1	1,7	1,2
SF 2	6,5	6,3	10,5	5,6	6,5	6,0	5,9	5,0
16:0 N alcohol	-	0,3	-	0,1	0,6	0,5	0,8	0,5
16:0 iso	0,3	1,3	0,4	4,2	0,9	0,5	0,8	0,5
SF 3	38,2	33,1	39,8	34,2	36,9	37,3	38,7	39,5
16:1 ω5c	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
16:0	19,3	18,3	16,2	20,8	22,2	22,6	21,2	22,5
15:0 iso 3OH	2,6	1,6	2,6	1,8	1,9	1,6	1,6	1,7
15:0 2OH	-	0,1	-	-	-	-	0,1	-
SF 9	3,6	1,5	1,4	3,9	1,6	2,4	2,5	2,6
15:0 3OH	-	0,4	-	-	0,3	-	-	0,1
17:0 iso	5,4	1,7	2,3	5,0	2,3	2,8	3,1	3,9
17:0 anteiso	0,2	0,3	-	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2
17:1 ω8c	0,2	3,0	1,5	0,6	1,5	1,0	0,8	1,1
17:1 ω6c	-	0,7	0,3	0,1	0,3	0,3	0,2	0,3
17:0 ciclo	-	-	-	-	1,3	-	-	-
17:0	0,2	2,1	1,1	0,5	-	1,1	0,7	1,2
18:0 iso	-	-	-	0,2	-	-	0,1	-
18:1 ω9c	0,4	0,6	-	0,3	-	-	-	0,2
SF 8	10,7	11,9	11,1	7,9	8,5	13,4	11,4	9,9
18:1 ω5c	-	-	-	-	-	-	0,1	-
18:0	0,7	1,1	0,7	0,9	0,5	0,8	0,7	0,6
18:1 ω7c 11-metil	-	-	0,7	0,1	0,1	0,6	0,7	0,6
19:0 iso	-	-	-	-	-	-	-	-
SF 7	-	-	-	-	-	0,2	0,6	0,2
18:1 2OH	-	-	-	-	-	-	0,4	0,2
20:4 ω6,9,12,15c	-	-	-	-	-	-	0,1	-
20:1 ω7c	-	-	-	-	-	-	0,1	-

Tabla 27. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* CECT 895^T; 2, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* CECT 4238; 3, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* CECT 4239; 4, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* CECT 896^T; 5, *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica* CECT 5752; 6, *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica* CECT 5753; 7, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* CECT 894^T; 8, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* CECT 5209; y 9, *A. salmonicida* subsp. *smithia* CECT 5179^T, cultivados en TSA 30°C 24 h. SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehido), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 7 (19:1 ω7c/19:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c), SF 9 (17:1 iso ω9c/16:0 10-metil).

Resultados y Discusión

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
9:0	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-
10:0 iso	-	-	-	-	0,3	-	0,1	-	-
11:0	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-
12:0	6,1	6,1	4,6	6,4	7,2	5,0	7,0	4,8	5,6
13:0 iso	-	-	-	-	-	0,2	-	0,3	-
13:0	0,1	0,2	0,4	-	-	0,1	0,4	0,2	0,4
12:0 3OH	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-
14:0 iso	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4
14:1 ω5c	-	0,4	0,5	-	-	-	-	-	-
14:0	2,7	5,1	2,5	2,9	3,0	1,6	1,9	1,3	2,6
15:1 iso F	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-
15:0 iso	-	0,5	1,6	-	-	0,5	-	0,5	0,5
15:0 anteiso	-	0,1	1,4	-	-	-	-	-	0,4
15:1 ω8c	-	0,1	0,2	-	-	-	0,1	0,1	-
15:1 ω6c	-	0,3	0,8	-	-	-	0,1	0,1	-
14:0 iso 3OH	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3
16:1 ω7c alcohol	0,4	0,1	-	-	0,5	0,9	0,3	1,2	-
SF 2	14,1	12,8	7,8	9,5	9,5	6,6	9,4	5,8	10,8
16:0 N alcohol	-	-	-	-	0,4	0,3	-	0,3	-
16:0 iso	0,1	0,6	1,7	-	0,5	0,3	0,1	0,5	3,0
SF 3	40,3	44,1	44,4	47,8	44,1	43,4	40,1	37,9	37,4
16:1 ω5c	0,3	0,3	-	0,2	-	0,1	0,2	0,1	-
16:0	26,4	21,9	11,0	20,9	22,8	21,8	24,1	22,7	22,1
15:0 iso 3OH	-	0,6	2,9	-	0,3	0,7	-	1,1	1,4
15:0 2OH	-	-	1,2	-	-	-	-	-	-
SF 9	-	0,8	3,7	-	0,2	0,8	-	1,2	0,7
17:1 iso ω5c	-	-	-	-	0,3	-	0,1	-	-
15:0 3OH	0,2	0,3	-	-	-	-	0,3	0,2	0,5
17:1 anteiso ω9c	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-
17:0 iso	-	1,0	3,8	-	0,4	1,4	-	2,5	1,9
17:0 anteiso	-	0,2	4,0	-	-	0,1	-	0,2	0,6
17:1 ω8c	0,4	0,9	1,8	0,6	0,5	0,8	1,5	1,8	1,5
17:1 ω6c	0,1	0,2	0,3	0,1	-	0,2	0,4	0,4	-
17:0	0,3	0,5	0,7	0,4	0,4	0,6	1,6	1,7	2,1
16:0 3OH	0,1	0,1	-	-	-	-	0,1	-	-
18:0 iso	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-
18:1 ω9c	0,2	0,3	0,3	0,5	0,2	-	-	-	0,5
SF 8	7,5	2,1	3,7	9,5	8,1	13,9	11,1	13,7	5,6
18:1 ω5c	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-
18:0	0,5	0,3	0,4	0,8	0,6	0,5	0,7	0,9	0,8
18:1 ω7c 11-metil	-	-	-	0,2	-	0,1	0,1	0,2	-
SF 7	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-
20:1 ω7c	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1	-

Tabla 28. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *A. schubertii* CECT 4240^T; 2, *A. schubertii* CECT 4934; 3, *A. schubertii* CECT 4241; 4, *A. sobria* CECT 4245^T; 5, *A. sobria* CECT 837; 6, *A. sobria* CECT 4835; 7, *A. tecta*

CECT 7080; 8, *A. tecta* CECT 7081; 9, *A. tecta* CECT 7083; 10, *A. tecta* CECT 7084; 11, *A. tecta* CECT 7082^T, cultivados en TSA 30°C 24 h. SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehido), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c), SF 9 (17:1 iso ω9c/16:0 10-metil).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
10:0 iso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4
11:0 iso	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-
11:0	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12:0	7,6	3,7	6,3	4,7	4,4	4,0	3,9	4,8	4,8	4,4	5,8
13:0 iso	1,4	1,9	0,4	0,8	1,4	0,5	1,4	0,8	1,0	1,8	0,8
13:0	1,0	0,6	0,5	0,1	0,3	0,5	-	-	-	-	-
12:0 3OH	0,3	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	-
14:0 iso	-	0,1	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-
14:0	4,0	2,1	3,2	4,9	3,1	3,3	3,2	3,3	3,8	3,1	3,5
15:1 iso F	0,2	1,0	-	-	0,1	0,2	0,3	0,1	0,3	0,3	-
15:0 iso	1,4	6,4	0,4	1,7	3,4	2,9	7,0	3,3	5,1	6,8	2,7
15:0 anteiso	-	0,1	-	0,2	0,1	0,2	0,1	-	-	0,1	-
15:1 ω8c	0,3	0,3	0,1	-	0,1	0,3	-	-	-	-	-
15:1 ω6c	-	0,1	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-
16:1 ω7c alcohol	2,9	2,8	1,6	0,2	0,6	1,3	-	-	-	-	-
SF 2	10,0	3,6	8,4	6,9	5,9	5,0	4,6	6,2	5,8	4,8	8,2
16:0 N alcohol	1,8	1,5	0,8	0,2	0,4	0,4	-	-	-	-	-
16:0 iso	0,6	0,7	0,2	0,4	1,0	0,7	-	-	-	-	0,3
SF 3	33,7	23,7	37,2	36,8	36,1	38,9	41,2	44,9	41,5	38,0	43,3
16:1 ω5c	0,2	0,2	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2
16:0	14,0	13,1	18,2	22,2	16,4	16,9	15,6	18,9	21,2	14,9	19,6
15:0 iso 3OH	2,3	3,7	0,6	1,9	3,4	2,4	3,7	2,8	2,8	5,4	2,8
15:0 2OH	-	-	-	-	0,1	0,1	-	-	-	-	-
SF 9	1,6	7,4	0,6	1,1	2,8	4,5	6,3	3,0	3,9	6,7	2,2
15:0 3OH	0,6	0,2	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-
17:1 anteiso ω9c	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	0,2
17:0 iso	1,4	8,2	0,6	3,1	5,7	4,7	4,8	2,6	3,3	6,1	2,4
17:0 anteiso	-	0,1	0,1	0,3	0,2	0,3	0,1	-	-	0,2	-
17:1 ω8c	1,6	1,4	0,9	0,6	1,4	2,5	0,2	0,2	0,2	0,3	0,4
17:1 ω6c	0,5	0,5	0,4	0,1	0,3	0,5	-	-	-	-	-
17:0 ciclo	-	-	-	0,4	0,8	1,3	-	0,1	-	0,1	-
17:0	1,1	1,2	0,9	-	-	-	-	-	-	-	0,2
18:1 iso H	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-
18:3 ω6c (6,9,12)	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18:0 iso	-	0,1	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-
18:1 ω9c	-	-	-	0,6	-	0,2	0,3	-	0,2	-	0,2
SF 8	10,3	13,8	17,1	10,8	10,8	7,8	6,6	8,4	5,7	6,5	6,2
18:1 ω5c	-	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
18:0	0,6	0,7	0,8	1,3	0,7	0,4	0,3	0,2	0,2	0,2	0,4
18:1 ω7c 11-metil	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19:0 iso	0,4	0,2	0,2	-	-	-	-	-	-	-	0,2
18:0 3OH	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-
20:1 ω7c	0,2	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 29. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *A. veronii* CECT 4257^T; 2, *A. veronii* CECT 4819; 3, *A. veronii* CECT 4910; 4, *A. veronii* CECT 5761; y 5, *A. veronii* CECT 7060 cultivados en TSA 30°C 24 h. SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehído), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c), SF 9 (17:1 iso ω9c/16:0 10-metil).

	1	2	3	4	5
11:0	-	0,1	-	-	-
12:0	4,5	3,3	3,9	4,6	3,5
13:0 iso	0,2	0,4	1,1	0,9	0,6
13:0 anteiso	-	0,1	-	-	-
13:0	0,7	0,8	0,5	0,3	0,6
12:0 3OH	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
14:0 iso	-	0,2	0,2	-	-
14:0	4,4	3,3	3,0	4,3	4,1
15:1 iso F	-	0,1	0,1	-	0,1
SF 1	-	1,0	-	-	-
15:0 iso	0,4	1,3	2,4	2,2	1,7
15:0 anteiso	-	0,3	0,1	0,2	0,1
15:1 ω8c	0,2	0,3	0,2	-	0,2
15:1 ω6c	0,1	0,2	0,1	-	0,1
14:0 iso 3OH	-	0,5	0,6	-	-
16:1 ω7c alcohol	0,2	2,8	-	0,9	1,2
SF 2	7,5	4,6	5,0	6,7	4,6
16:0 N alcohol	-	0,8	-	0,2	0,5
16:0 iso	0,2	1,5	1,3	0,9	0,6
SF 3	35,4	32,0	32,3	34,0	34,6
16:1 ω5c	-	0,1	0,1	0,2	0,1
16:0	20,0	16,4	16,7	18,9	20,7
15:0 iso 3OH	0,4	0,9	2,4	2,0	1,2
15:0 2OH	-	0,1	0,1	0,1	-
SF 9	0,4	1,5	2,8	2,1	1,3
15:0 3OH	0,4	0,4	0,2		0,3
17:0 iso	0,4	1,5	3,7	2,4	1,9
17:0 anteiso	0,1	0,4	0,3	0,3	0,2
17:1 ω8c	3,3	4,8	2,5	1,3	3,0
17:1 ω6c	0,7	1,0	0,5	0,3	0,7
17:0	2,5	3,3	1,8	0,8	2,2
16:0 3OH	-	0,1	-	-	-
18:0 iso	-	0,2	0,1	-	-
18:1 ω9c	0,4	-	-	0,4	-
SF 8	16,4	15,0	17,3	14,8	15,3
18:0	0,9	0,7	0,7	0,9	0,6
18:1 ω7c 11-metil	-	0,1	-	-	-
20:1 ω7c	-	0,1	0,1	-	-

La cantidad relativa de cada ácido graso se representa en forma de un rango que comprende el valor mínimo y máximo encontrado al comparar todas las cepas estudiadas del género *Aeromonas* (tabla 30). Como se observa, los ácidos grasos que presentaron una mayor variabilidad en cuanto a la cantidad relativa fueron los mayoritarios: SF 3 (23,7-47,8%), 16:0 (11,0-26,8%) y SF 8 (2,1-21,6%). Sin embargo, también destacaron otros ácidos grasos por tener una variabilidad intraespecífica alta, estando en muchos casos ausentes en determinadas especies, estos fueron: 12:0 (3,2-7,6%), 14:0 (1,3-9,5%), 15:0 iso (ND-7%), SF 2 (3,6-14,1%), 16:0 iso (ND-4,2%), 15:0 iso 3OH (ND-5,4%), SF 9 (ND-7,4%), 17:0 iso (ND-8,2%), 17:0 anteiso (ND-4,0%), 17:1 ω8c (ND-5,4%) y 17:0 (ND-3,3%).

Tabla 30. Rango de valores mínimos y máximos de la cantidad relativa detectados en cada ácido graso dentro del género *Aeromonas*. ND: No Detección. SF 1 (13:0 3OH/15:1 iso H), SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehído), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 7 (19:1 ω7c/19:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c), SF 9 (17:1 iso ω9c/16:0 10-metil).

<i>Aeromonas</i>	
	Rango
9:0	ND-0,8
10:0 iso	ND-0,4
10:0	ND-0,2
11:0 iso	ND-0,1
11:0	ND-0,4
12:0 iso	ND-0,2
12:0	3,2-7,6
13:0 iso	ND-1,9
13:0 anteiso	ND-0,2
13:0	ND-1,0
12:0 3OH	ND-0,3
14:0 iso	ND-0,7
14:1 ω5c	ND-0,5
14:0	1,3-9,5
15:1 iso F	ND-1,0
SF 1	ND-1,4
15:0 iso	ND-7,0
15:0 anteiso	ND-1,4
15:1 ω8c	ND-0,3
15:1 ω6c	ND-0,8
15:1 ω5c	ND-0,1
14:0 iso 3OH	ND-1,3

<i>Aeromonas</i>	
	Rango
16:1 ω7c alcohol	ND-2,9
SF 2	3,6-14,1
16:0 N alcohol	ND-1,8
16:0 iso	ND-4,2
SF 3	23,7-47,8
16:1 ω5c	ND-0,3
16:0	11,0-26,8
15:0 iso 3OH	ND-5,4
15:0 2OH	ND-1,2
SF 9	ND-7,4
17:1 iso ω5c	ND-0,3
15:0 3OH	ND-0,6
17:1 anteiso ω9c	ND-0,4
17:0 iso	ND-8,2
17:0 anteiso	ND-4,0
17:1 ω8c	ND-5,4
17:1 ω6c	ND-1,4
17:0 ciclo	ND-1,3
17:0	ND-3,3
16:0 2OH	ND-0,1
18:1 iso H	ND-0,1
16:0 3OH	ND-0,4
18:3 ω6c (6,9,12)	ND-0,1
18:0 iso	ND-0,3
18:1 ω9c	ND-0,6
SF 8	2,1-21,6
18:1 ω5c	ND-0,1
18:0	0,2-1,7
18:1 ω7c 11-metil	ND-0,7
19:0 iso	ND-0,4
SF 7	ND-0,6
18:1 2OH	ND-0,4
20:4 ω6,9,12,15c	ND-0,1
18:0 3OH	ND-0,2
20:1 ω7c	ND-0,2
20:0	ND-0,2

Otro factor estudiado fue la variabilidad existente entre cepas de la misma especie. En la tabla 30 se muestra la desviación máxima en las cantidades relativas de cada ácido graso observado entre perfiles de cepas pertenecientes a la misma especie. En la mayoría de los casos, estas desviaciones se observan en los ácidos grasos mayoritarios (SF 3, 16:0 y SF 8). Las desviaciones máximas obtenidas al comparar las distintas cepas pertenecientes a *A. bivalvium*, *A. caviae*, *A. piscicola* y *A. popoffi* resultaron bajas, siendo la mayor

diferencia encontrada de 3,5 (*A. popoffi* CECT 4995 presentó 3,5 unidades porcentuales más de cantidad relativa del ácido graso SF 8 que *A. popoffi* CECT 5250), lo que indica que la composición de ácidos grasos entre cepas de estas especies es similar.

En otros casos, estas desviaciones fueron mayores, como se observó en *A. allosaccharophila* donde se encontró una diferencia de 4,4 unidades porcentuales en el ácido graso SF 3 entre sus dos cepas; *A. bestiarum* donde la cepa CECT 4227^T mostró 5,3 unidades porcentuales más de cantidad relativa del ácido graso 16:0 que la cepa CECT 5219; *A. encheleia* cuya cepa CECT 4342^T presentó 6,1 unidades porcentuales más en el SF 3 que la cepa CECT 5027; *A. eucrenophila*, donde la cepa CECT 4224^T mostró 5,3 unidades porcentuales más del 16:0 que la cepa CECT 4855; *A. media*, presentó una diferencia de 5,1 unidades porcentuales en el SF 3 entre las cepas CECT 4232^T y CECT 4231; *A. sobria*, cuya cepa CECT 837 presentó un 5,8 unidades porcentuales más del 16:0 que la cepa CECT 4835; o las cepas CECT 4819 y CECT 7060 de *A. veronii* que presentaron una diferencia del 4,4 unidades porcentuales entre sí en el ácido graso 16:0.

Sin embargo, se obtuvieron desviaciones máximas elevadas al comparar cepas de la misma especie en el caso de *A. enteropelogenes* donde se observó una diferencia del 7,9 unidades porcentuales en el ácido graso 16:0 y de 4,4 en el ácido graso 17:1 ω8c entre las cepas CECT 4487^T y CECT 4935; *A. hydrophila*, cuyas cepas CECT 4558 y CECT 398 presentaron una diferencia en la cantidad relativa de los ácidos grasos 16:0 y SF 3 de 11,2 y 6,0 unidades porcentuales respectivamente; *A. jandaei* donde se observó una diferencia de 5,3 unidades porcentuales en el ácido graso 14:0, de 6,0 en el SF 3, de 5,9 en el 16:0, de 5,0 en el 17:0 iso, y de 9,4 en el SF 8 entre sus cepas; *A. salmonicida* que presentó una diferencia de 8,3 unidades porcentuales en el SF 2 entre las cepas CECT 5209 y CECT 895^T (de las subespecies *salmonicida* y *achromogenes* respectivamente), de 7,8 en el SF 3 entre CECT 896 y CECT 894^T (de las subespecies *masoucida* y *salmonicida* respectivamente), de 15,4 en la cantidad

relativa del ácido graso 16:0 entre las cepas CECT 4239 y 895^T (ambas de la subespecie *achromogenes*) y de 11,6 en el SF 8 entre la cepas CECT 5209 y CECT 4238 (de las subespecies *salmonicida* y *achromogenes* respectivamente); y *A. schubertii* que presentó una diferencia máxima entre sus cepas de 6 en el 15:0 iso, 6,5 en el SF 2, 13,5 en el SF 3, 5,1 en el 16:0, 6,8 en el SF 9, 7,6 en el 17:0 iso y 6,8 en el SF 8. Estas diferencias entre cepas pertenecientes a la misma especie resultaron más elevadas de lo esperado.

Tabla 30. Desviación máxima de la cantidad relativa de cada ácido graso obtenida al comparar distintas cepas pertenecientes a la misma especie. 1, *A. allosaccharophila* (cepas CECT 4911^T y CECT 4220); 2, *A. bestiarum* (cepas CECT 4227^T, CECT 5219, CECT 7451); 3, *A. bivalvium* (cepas CECT 7113^T y CECT 7112); 4, *A. caviae* (cepas CECT 838^T y CECT 4226); 5, *A. encheleia* (cepas CECT 4342^T, CECT 4985 y CECT 5027); 6, *A. enteropelogenes* (cepas CECT 4487^T, CECT 4935 y CECT 4937); 7, *A. eucrenophila* (cepas CECT 4224^T, CECT 4827 y CECT 4855); 8, *A. hydrophila* (cepas CECT 839^T, CECT 4221, CECT 4588, CECT 5743, CECT 5745, CECT 398, CECT 4330 y CECT 4486); 9, *A. jandaei* (cepas CECT 4228^T, CECT 4229, CECT 4231, CECT 4235); 10, *A. media* (CECT 4232^T, CECT 4231); 11, *A. piscicola* (CECT 7443^T, CECT 7444) 12, *A. popoffi* (cepas CECT 5176^T, CECT 4995 y CECT 5250) ; 13, *A. salmonicida* (cepas CECT 894^T, CECT 5752, CECT 896, CECT 5209, CECT 4238, CECT 4239, CECT 895, CECT 5753 y CECT 5179); 14, *A. schubertii* (cepas CECT 4240^T, CECT 4241 y CECT 4934); 15, *A. sobria* (cepas CECT 4245^T, CECT 837 y CECT 4835); 16, *A. veronii* (cepas CECT 4257^T, CECT 4819, CECT CECT 4910, CECT 5761 y CECT 7060). Cultivadas en TSA a 30°C durante 24 h. SF 1 (13:0 3OH/15:1 iso H), SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehido), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 7 (19:1 ω7c/19:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c), SF 9 (17:1 iso ω9c/16:0 10-metil).

	ΔI															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
9:0	0,5	0,2	-	-	0,2	0,3	-	-	0,3	0,4	-	-	0,4	-	-	-
10:0 iso	0,4	0,3	0,1	-	0,1	0,2	0,1	-	-	-	-	0,1	0,3	-	-	-
10:0	0,1	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-
11:0 iso	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	0,1	-	-
11:0	0,3	-	-	-	-	0,2	-	0,1	0,2	-	-	-	0,1	0,1	-	0,1
12:0 iso	-	-	-	-	-	0,1	-	0,1	0,1	-	0,2	-	-	-	-	-
12:0	1,4	1,5	0,9	0,5	1,1	0,3	1,2	1,8	0,8	1,6	1,1	0,3	2,2	4,0	0,7	1,2
13:0 iso	0,5	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,9	1,0	0,6	0,2	0,1	0,1	0,3	1,5	1,0	0,7

Resultados y Discusión

	ΔI															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
13:0 anteiso	-	-	-	-	0,1	0,0	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	0,1
13:0	0,1	0,3	0,0	-	-	0,7	-	0,3	0,1	0,7	0,3	0,1	0,4	0,5	0,3	0,4
12:0 3OH	0,0	0,2	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,2	0,1	0,2	0,1	0,0	0,2	0,2	0,0	0,1
14:0 iso	0,1	0,1	-	-	-	0,1	-	0,7	0,5	0,2	0,5	0,0	0,4	0,1	0,1	0,2
14:1 ω5c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-
14:0	0,2	2,7	0,8	0,5	0,3	0,7	0,6	3,0	5,3	2,5	0,3	0,3	3,8	1,9	1,8	1,2
15:1 iso F	0,2	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,2	-	-	0,1	0,1	0,2	1,0	0,2	0,1
SF 1	-	-	-	-	-	1,1	-	1,4	1,4	-	-	-	-	-	-	1,0
15:0 iso	1,0	0,9	0,5	0,0	1,3	0,6	3,2	2,2	2,2	0,1	0,8	0,5	1,6	6,0	1,7	1,3
15:0 anteiso	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,0	0,0	0,4	0,2	0,2	0,0	0,1	1,4	0,1	0,0	0,3
15:1 ω8c	0,1	0,1	-	-	-	0,2	-	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2
15:1 ω6c	-	-	-	-	-	0,1	-	0,1	0,1	0,1	-	-	0,8	0,1	0,2	0,1
15:1 ω5c	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14:0 iso 3OH	-	-	-	-	-	0,8	-	1,2	0,9	-	0,8	-	1,3	-	-	0,6
16:1 ω7c alcohol	0,1	2,4	-	-	-	1,4	-	1,3	1,2	1,4	1,8	0,7	1,1	1,3	1,0	2,8
SF 2	1,3	1,7	1,9	0,9	2,8	1,0	3,3	2,4	2,7	0,2	0,9	1,0	8,3	6,5	1,9	2,9
16:0 N alcohol	-	0,5	-	-	-	0,5	-	0,6	0,3	0,3	0,5	0,3	0,4	1,0	0,2	0,8
16:0 iso	0,4	0,9	0,2	0,2	0,2	0,6	0,2	3,6	2,7	1,0	3,2	0,3	2,7	0,4	0,6	1,3
SF 3	4,4	4,2	0,6	0,1	6,1	3,2	3,5	6,0	6,0	5,1	2,8	2,2	7,8	13,5	2,8	3,4
16:1 ω5c	0,1	0,2	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,3	0,1	0,0	0,1
16:0	1,3	5,3	0,3	0,9	3,1	7,9	5,5	11,2	5,9	1,0	1,4	1,5	15,4	5,1	5,8	4,4
15:0 iso 3OH	1,9	0,3	0,3	0,3	0,7	0,5	2,2	2,0	2,4	1,0	0,1	0,2	2,9	3,1	1,6	1,5
15:0 2OH	0,1	-	0,1	-	0,1	0,1	0,0	0,2	0,2	0,1	-	0,1	1,2	-	0,1	0,1
SF 9	1,6	0,7	1,4	0,2	2,0	1,0	2,5	3,0	3,8	2,1	2,2	0,2	3,7	6,8	3,4	1,3
17:1 iso ω5c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-
15:0 3OH	0,1	0,1	-	-	-	0,6	-	0,3	0,1	0,4	0,3	0,1	0,5	0,4	-	0,3
17:1 anteiso ω9c	-	0,4	-	0,1	0,1	-	0,1	-	-	-	-	-	0,3	-	0,2	-
17:0 iso	1,1	0,7	1,1	0,4	2,3	0,8	2,7	3,0	5,0	3,7	2,7	1,0	3,8	7,6	2,5	2,2
17:0 anteiso	0,1	0,2	0,0	0,1	0,2	0,1	0,1	0,5	0,4	0,1	0,1	0,1	4,0	0,1	0,1	0,3
17:1 ω8c	1,0	0,9	0,3	0,1	0,1	4,4	0,3	2,2	1,5	2,8	0,8	0,3	1,4	0,7	1,9	2,3
17:1 ω6c	0,5	0,3	0,1	0,1	-	1,2	0,1	0,5	0,4	0,7	0,2	0,1	0,3	0,1	0,4	0,5
17:0 ciclo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	-	0,0	-
17:0	0,6	0,3	0,2	0,1	0,2	2,1	0,1	1,4	1,0	1,9	0,5	0,4	1,5	0,4	-	1,4
16:0 2OH	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18:1 iso H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-
16:0 3OH	-	-	-	0,4	-	-	-	0,1	-	-	-	-	0,1	-	-	0,1
18:3 ω6c (6,9,12)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-
18:0 iso	-	-	-	-	-	0,1	-	0,3	0,3	-	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
18:1 ω9c	0,2	0,2	-	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,2	0,3	0,2	0,5	-	0,6	0,4
SF 8	3,0	2,1	2,0	0,4	2,7	2,4	2,0	3,5	9,4	1,3	0,5	3,5	11,6	6,8	3,0	2,5
18:1 ω5c	-	-	0,0	0,1	-	0,1	-	-	-	-	-	0,1	0,1	0,1	0,0	-
18:0	0,5	0,5	0,3	0,0	0,6	0,3	0,2	0,2	0,9	0,4	0,5	0,2	0,6	0,1	0,9	0,3
18:1 ω7c 11-metil	0,1	0,2	0,0	0,0	0,3	0,1	-	0,3	-	-	0,0	0,1	0,2	0,3	-	0,1
19:0 iso	-	-	-	-	0,1	0,1	-	-	0,1	-	-	-	-	0,3	-	-
SF 7	-	-	0,2	-	-	-	-	0,2	-	-	-	0,4	0,1	-	-	-
18:1 2OH	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-
20:4 ω6,9,12,15c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-

	ΔI															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
18:0 3OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-
20:1 ω7c	-	0,1	0,1	-	-	0,1	-	0,1	0,2	-	-	0,1	0,1	0,2	-	0,1
20:0	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Para estudiar si las diferencias encontradas en los perfiles de algunas cepas pertenecientes a la misma especie eran debidas a diferencias causadas por el proceso de incubación, extracción y análisis de ácidos grasos, se hicieron réplicas del proceso de incubación, extracción y análisis de algunas en las cepas. Como se observa en la tabla 31, los perfiles de las réplicas de *A. bestiarum*, *A. sobria*, *A. veronii* y *A. schubertii* fueron similares entre sí, ya que las diferencias observadas en el perfil de cada cepa y de su réplica resultaron muy bajos. De este modo, se corrobora la reproducibilidad de la técnica GC FAME.

Tabla 31. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *A. bestiarum* CECT 7451; 1', *A. bestiarum* CECT 7451 réplica; 2, *A. sobria* CECT 4245^T; 2', *A. sobria* CECT 4245^T réplica; 3, *A. veronii* CECT 4257^T; 3', *A. veronii* CECT 4257^T réplica; 4, *A. schubertii* CECT 4241; 4', *A. schubertii* CECT 4241 réplica, cultivados en TSA 30°C 24 h. |ΔI| hace referencia a la variación en valor absoluto observada para cada ácido graso de una cepa con respecto a su réplica. SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehido), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c), SF 9 (17:1 iso ω9c/16:0 10-metil).

	1	1'	ΔI	2	2'	ΔI	3	3'	ΔI	4	4'	ΔI
9:0	0,2	0,2	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10:0 iso	-	-	-	-	0,1	0,1	-	-	-	0,1	-	0,1
11:0	0,1	-	0,1	-	-	-	-	-	-	0,1	-	0,1
12:0	4,3	4,2	0,1	4,7	4,6	0,1	4,5	4,4	0,1	5,3	6,3	1,0
13:0 iso	0,3	0,3	0,0	0,8	1,1	0,3	0,2	0,3	0,1	0,5	0,4	0,1
13:0	0,2	0,2	0,0	0,1	0,3	0,2	0,7	0,6	0,1	0,7	0,5	0,2
12:0 3OH	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,2	0,0
14:0 iso	0,1	0,1	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14:0	4,9	4,8	0,1	4,9	3,8	1,1	4,4	5,1	0,7	3,1	3,2	0,1
15:1 iso F	-	0,1	0,1	-	0,1	-	-	-	-	0,1	-	0,1
15:0 iso	1,4	1,3	0,1	1,7	2,4	0,6	0,4	0,7	0,3	0,6	0,4	0,2
15:0 anteiso	0,1	0,1	0,0	0,2	0,1	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1
15:1 ω8c	0,1	0,1	0,0	-	0,1	0,1	0,2	0,2	0,0	0,2	0,1	0,1
15:1 ω6c	-	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1	-	0,1
16:1 ω7c alcohol	0,9	0,9	0,0	0,2	0,9	0,7	0,2	0,5	0,3	1,2	1,6	0,4
SF 2	6,4	6,3	0,1	6,9	6,2	0,7	7,5	6,7	0,8	7,1	8,4	1,3
16:0 N alcohol	0,2	0,2	0,0	0,2	0,6	0,4	-	0,2	0,2	0,6	0,8	0,2

	1	1'	\Delta	2	2'	\Delta	3	3'	\Delta	4	4'	\Delta
16:0 iso	1,1	1,1	0,0	0,4	0,6	0,2	0,2	0,3	0,1	0,3	0,2	0,1
SF 3	37,6	37,8	0,2	36,8	37,5	0,7	35,4	32,8	2,6	36,0	37,2	1,2
16:1 ω 5c	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,2	0,3	0,1
16:0	24,5	24,7	0,2	22,2	19,1	3,1	20,0	20,5	0,5	18,5	18,2	0,3
15:0 iso 3OH	0,9	0,9	0,0	1,9	2,2	0,3	0,4	0,7	0,3	0,8	0,6	0,2
15:0 2OH	-	-	-	-	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-
SF 9	1,4	1,5	0,1	1,1	1,8	0,7	0,4	0,8	0,4	0,9	0,6	0,3
15:0 3OH	0,1	0,1	0,0	-	0,2	0,2	0,4	0,4	0,0	0,3	0,3	0,0
17:1 anteiso ω 9c	-	-	-	0,2	-	0,2	-	-	-	-	-	-
17:0 iso	1,3	1,3	0,0	3,1	3,6	0,5	0,4	0,9	0,5	1,0	0,6	0,4
17:0 anteiso	0,2	0,2	0,0	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0
17:1 ω 8c	0,9	0,9	0,0	0,6	1,3	0,7	3,3	3,0	0,3	1,4	0,9	0,5
17:1 ω 6c	0,2	0,2	0,0	0,1	0,3	0,2	0,7	0,6	0,1	0,5	0,4	0,1
17:0	0,8	0,7	0,1	0,4	0,8	0,4	2,5	2,5	0,0	1,4	0,9	0,5
18:1 iso H	-	-	-	0,1	-	0,1	-	-	-	-	-	-
18:1 ω 9c	-	-	-	0,6	-	0,6	0,4	0,7	0,3	-	-	-
SF 8	10,5	10,4	0,1	10,8	10,6	0,2	16,4	16,0	0,4	17,5	17,1	0,4
18:1 ω 5c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1	0,0
18:0	1,0	1,1	0,1	1,3	0,8	0,5	0,9	1,3	0,3	0,9	0,8	0,1
19:0 iso	0,1	-	0,1	-	0,2	0,2	-	-	-	0,1	0,2	0,1
18:1 2OH	0,1	-	0,1	-	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-
18:0 3OH	-	-	-	0,2	-	0,2	-	-	-	-	-	-
20:1 ω 7c	0,1	-	0,1	-	-	-	-	0,2	0,2	0,2	-	0,2

Por otro lado, se utilizó la técnica GC FAME para analizar dos cepas que presentaban dos tipos distintos de morfología colonial, la cepa *A. popoffi* CECT 5250 que presentaba colonias translúcidas y colonias opacas, y la cepa *A. veronii* CECT 4819 que presentaba colonias amarillas y colonias blancas. De modo que se separaron ambas morfologías coloniales de las dos cepas en placas diferentes, y tras su cultivo se procedió a la extracción de ácidos grasos. En la tabla 32 se muestra el resultado obtenido, donde puede observarse que la variación observada para cada ácido graso entre ambas morfologías coloniales es baja, lo que indica que las colonias translúcidas y las colonias opacas de *A. popoffi* CECT 5250 presentan un perfil de ácidos grasos muy similar, igual que las colonias amarillas y blancas de *A. veronii* CECT 4819. Por lo que se concluyó que estas dos cepas presentan doble morfología colonial.

Tabla 32. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *A. popoffi* CECT 5250 colonias translúcidas; 1', *A. popoffi* CECT 5250 colonias opacas; 2, *A. veronii* CECT 4819 colonias amarillas; 2', *A. veronii* CECT 4819 colonias blancas, cultivados en TSA 30°C 24 h. |\Delta| hace referencia a la variación en

Resultados y Discusión

valor absoluto observada para cada ácido graso entre las dos morfología coloniales observadas de cada cepa. SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehído), SF 3 (16:1 ω 7c/16:1 ω 6c), SF 8 (18:1 ω 6c/18:1 ω 7c), SF 9 (17:1 iso ω 9c/16:0 10-metil).

	1	1'	\Delta	2	2'	\Delta
11:0	-	-	-	0,1	0,1	0,0
12:0	3,7	3,6	0,1	3,3	3,5	0,2
13:0 iso	0,7	0,8	0,1	0,4	0,6	0,2
13:0 anteiso	-	-	-	0,1	-	0,1
13:0	0,1	0,2	0,1	0,8	1,0	0,2
12:0 3OH	-	0,1	0,1	0,2	0,2	0,0
14:0 iso	-	-	-	0,2	0,3	0,1
14:0	2,3	2,2	0,1	3,3	3,3	0,0
15:1 iso F	1,1	0,1	1,0	0,1	0,1	0,0
SF 1	-	-	-	1,0	1,2	0,2
15:0 iso	-	1,2	1,2	1,3	1,6	0,3
15:0 anteiso	-	-	-	0,3	0,3	0,0
15:1 ω 8c	-	0,1	0,1	0,3	0,3	0,0
15:1 ω 6c	-	-	-	0,2	0,2	0,0
14:0 iso 3OH	-	-	-	0,5	0,7	0,2
16:1 ω 7c alcohol	1,1	1,2	0,1	2,8	2,7	0,1
SF 2	5,3	5,0	0,3	4,6	4,9	0,3
16:0 N alcohol	0,5	0,5	0,0	0,8	0,7	0,1
16:0 iso	0,4	0,5	0,1	1,5	1,8	0,3
SF 3	41,6	39,5	2,1	32,0	31,1	0,9
16:1 ω 5c	0,2	0,2	0,0	0,1	0,1	0,0
16:0	22,5	22,5	0,0	16,4	15,3	1,1
15:0 iso 3OH	1,5	1,7	0,2	0,8	1,3	0,5
15:0 2OH	-	-	-	0,1	0,2	0,1
SF 9	2,2	2,6	0,4	1,5	1,9	0,4
15:0 3OH	-	0,1	-	0,4	0,6	0,2
17:1 anteiso ω 9c	0,1	-	0,1	-	-	-
17:0 iso	3,2	3,9	0,7	1,5	1,8	0,3
17:0 anteiso	0,2	0,2	0,0	0,4	0,5	0,1
17:1 ω 8c	0,8	1,1	0,3	4,8	5,1	0,3
17:1 ω 6c	0,2	0,3	0,1	1,0	1,1	0,1
17:0	0,8	1,2	0,4	3,3	3,2	0,1
16:0 3OH	-	-	-	0,1	-	0,1
18:0 iso	-	-	-	0,2	0,2	0,0
18:1 ω 9c	0,3	0,2	0,1	-	-	-
SF 8	10,2	9,9	0,3	15,0	13,7	1,3
18:0	0,6	0,6	0,0	0,7	0,6	0,1
18:1 ω 7c 11-metil	0,5	0,6	0,1	0,1	-	0,1
SF 7	0,1	0,2	0,1	-	-	-
18:1 2OH	0,1	0,2	0,1	-	-	-
20:1 ω 7c	-	-	-	0,1	-	0,1

Por tanto, puede considerarse la técnica GC FAME como una herramienta adecuada para la autenticación de cepas dentro del género *Aeromonas*. Sin embargo, la heterogeneidad observada en cuanto a la cantidad relativa de determinados ácidos grasos entre cepas pertenecientes a las especies *A. enteropelogenes*, *A. hydrophila*, *A. jandaei*, *A. salmonicida* y *A. schubertii* sugiere que probablemente estas especies sólo pueden ser autenticados mediante esta técnica a nivel de género.

Los ácidos grasos más representativos del género *Aeromonas* por estar presentes en todas las cepas estudiadas fueron: 12:0, 14:0, SF 2, SF 3, 16:0 y SF 8 (figura 57). Aunque, tal y como se ha mencionado anteriormente, también son importantes para la discriminación entre especies los ácidos grasos: 15:0 iso, 16:0 iso, 15:0 iso 3OH, SF 9, 17:0 iso, 17:0 anteiso, 17:1 ω8c y 17:0.

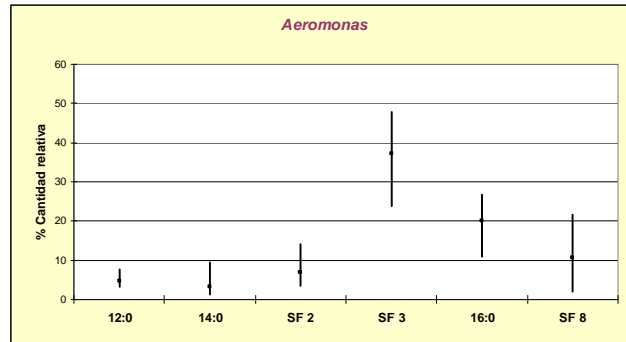


Figura 57. Gráfica que muestra los ácidos grasos más representativos del género *Aeromonas* y la variación observada de éstos en la cantidad relativa.

2.4 Análisis de otras cepas de la clase *Gammaproteobacteria*

Se analizaron 7 cepas marinas adicionales de la clase *Gammaproteobacteria* (1 del género *Haliea*, 1 *Halomonas*, 4 *Marinomonas* y 1 *Shewanella*).

En la tabla 33 se muestra la composición de ácidos grasos de estas 7 cepas, y las condiciones de cultivo utilizadas. En este caso *Haliea* y *Shewanella* comparten orden, igual que *Halomonas* y *Marinomonas*, por lo que no es de extrañar encontrar diferencias más notables que en el resto de apartados donde se comparan cepas del mismo género o de la misma familia. Como se observa en la tabla, el ácido graso mayoritario común a estas cuatro especies fue el SF 3 (16:1 ω 7c/16:1 ω 6c). Sin embargo, además del SF 3, *Haliea mediterranea* presentó como ácidos grasos mayoritarios el 17:1 ω 9c y el SF 8 (18:1 ω 6c/18:1 ω 7c); *Halomonas rifensis*, el 16:0, el SF 8 y el 19: ciclo ω 8c; *Marinomonas* spp., el 16:0 y el SF 8; y *Shewanella* spp., el 13:0 iso, el 15:0 iso y el 16:0.

Tabla 33. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *Haliea mediterranea* CECT 7447^T, cultivado en MA 28°C 48 h; 2, *Shewanella* sp. CECT 5130, cultivado en MA 26°C 24 h; 3, *Halomonas rifensis* CECT 7698^T, cultivado en MA 30°C 48 h; 4, *Marinomonas alcarazii* CECT 7730^T; 5, *Marinomonas aquaplantarum* CECT 7732^T; 6, *Marinomonas foliarum* CECT 7731^T; y 7, *Marinomonas mediterranea* CECT 4803^T cultivados en MA 26°C 24 h. SF 1 (13:0 3OH/15:1 iso H), SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehído), SF 3 (16:1 ω 7c/16:1 ω 6c), SF 7 (19:1 ω 7c/19:1 ω 6c), SF 8 (18:1 ω 6c/18:1 ω 7c).

	1	2	3	4	5	6	7
9:0	0,2	-	0,3	0,2	0,2	0,2	-
10:0 iso	0,1	-	-	-	0,2	-	-
10:0	0,6	-	3,9	0,9	0,6	0,1	0,5
9:0 3OH	0,1	-	-	-	-	-	-
11:0	2,3	0,2	-	-	-	-	-
10:0 3OH	1,3	-	0,2	8,0	8,9	6,2	12,7
12:0 iso	0,1	-	-	-	-	-	-
12:0	0,8	3,5	4,0	0,4	0,2	0,2	0,6
11:0 iso 3OH	0,1	-	-	-	-	-	-
11:0 2OH	0,2	-	-	-	-	-	-
11:0 3OH	5,1	0,1	-	-	-	-	-
13:0 iso	-	14,8	-	-	-	-	-
13:0	0,8	1,7	-	-	-	-	-

	1	2	3	4	5	6	7
12:0 iso 3OH	0,1	-	-	-	-	-	-
12:1 3OH	-	-	-	4,2	6,6	7,0	-
12:0 3OH	1,3	1,1	9,7	0,1	0,3	0,8	-
14:0 iso	0,1	1,2	-	-	-	-	-
14:1 ω5c	-	-	-	-	-	-	-
14:0	0,7	3,9	0,8	1,2	1,4	1,6	4,5
SF1	0,1	0,6	-	-	-	-	-
15:0 iso	0,2	23,0	-	-	-	-	-
15:0 anteiso	-	1,5	-	-	-	-	-
15:1 ω8c	1,4	0,5	-	-	-	-	-
15:1 ω6c	1,8	0,4	-	-	-	-	-
SF 2	-	0,5	-	-	-	-	-
16:0 N alcohol	0,1	-	-	-	-	-	-
16:0 iso	0,6	0,2	-	-	-	-	-
SF 3	17,7	13,6	13,2	24,7	24,4	29,1	29,7
16:1 ω5c	-	-	-	0,1	0,1	0,1	-
16:0	5,9	9,2	21,7	18,2	18,1	18,8	18,1
15:0 iso 3OH	-	0,5	-	-	-	-	-
17:1 iso ω5c	0,1	-	0,2	-	0,1	0,1	-
15:0 3OH	-	0,4	-	-	-	-	-
17:0 iso	0,1	0,8	-	-	-	-	-
17:0 anteiso	0,2	-	-	-	-	-	-
17:1 ω8c	30,5	5,2	-	-	-	0,1	-
17:1 ω6c	5,6	0,5	-	-	-	0,1	-
17:0 ciclo	-	-	0,8	-	-	-	-
17:0	8,3	1,1	0,1	0,2	0,2	0,2	-
16:1 2OH	0,1	-	-	-	-	-	-
18:1 iso H	0,1	-	-	-	-	-	-
16:0 3OH	-	0,6	-	-	-	-	-
18:1 ω9c	-	1,3	-	-	-	-	-
SF 8	12,9	3,2	27,1	36,6	33,8	31,5	32,9
18:1 ω5c	-	-	0,2	0,2	0,2	0,2	-
18:0	0,2	0,4	0,6	3,9	4,3	3,3	1,0
18:1 ω7c 11-metil	-	-	0,7	0,4	-	0,1	-
17:0 2OH	0,1	-	-	-	-	-	-
19:0 iso	-	-	0,3	-	0,2	-	-
19:0 anteiso	0,1	-	-	-	-	-	-
SF 7	-	-	-	0,7	0,1	0,3	-
19:0 ciclo ω8c	-	-	15,9	-	-	-	-
18:0 3OH	0,4	-	-	-	-	-	-
20:2 ω6,9c	-	-	0,6	-	-	-	-
20:1 ω7c	-	-	-	0,2	0,2	0,1	-
20:0	-	-	-	-	0,1	-	-

En la tabla 34, se muestra el rango de valores máximos y mínimos de la cantidad relativa que alcanza cada ácido graso dentro del género *Marinomonas*. Los ácidos grasos mayoritarios presentaron un rango de 24,4-29,7% para el SF 3, de 31,5-36,6% para el SF 8, y de 18,1-18,8% para el 16:0, donde se observa en este último una mínima variación entre las cuatro especies estudiadas. Destacan también otros ácidos grasos por su variabilidad intraespecífica, indicando que son importantes para la diferenciación entre especies de dicho género, estos ácidos grasos son: 10:0 3OH (6,2-12,7%) y 12:1 3OH (ND-7,0%).

Tabla 34. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *Marinomonas alcazarii* CECT 7730^T; 2, *Marinomonas aquaplantarum* CECT 7732^T; 3, *Marinomonas foliarum* CECT 7731^T; y 4, *Marinomonas mediterranea* CECT 4803^T, cultivados en MA 26°C 24 h. La columna de rango hace referencia al valor mínimo y máximo detectado de cada ácido graso. ND: No Detectado. SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 7 (19:1ω7c/19:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c).

	1	2	3	4	Rango
9:0	0,2	0,2	0,2	-	ND-0,2
10:0 iso	-	0,2	-	-	ND-0,2
10:0	0,9	0,6	0,1	0,5	0,1-0,9
10:0 3OH	8,0	8,9	6,2	12,7	6,2-12,7
12:0	0,4	0,2	0,2	0,6	0,2-0,6
12:1 3OH	4,2	6,6	7,0	-	ND-7,0
12:0 3OH	0,1	0,3	0,8	-	ND-0,8
14:0	1,2	1,4	1,6	4,5	1,2-4,5
SF 3	24,7	24,4	29,1	29,7	24,4-29,7
16:1 ω5c	0,1	0,1	0,1	-	ND-0,1
16:0	18,2	18,1	18,8	18,1	18,1-18,8
17:1 iso ω5c	-	0,1	0,1	-	ND-0,1
17:1 ω8c	-	-	0,1	-	ND-0,1
17:1 ω6c	-	-	0,1	-	ND-0,1
17:0	0,2	0,2	0,2	-	ND-0,2
SF 8	36,6	33,8	31,5	32,9	31,5-36,6
18:1 ω5c	0,2	0,2	0,2	-	ND-0,2
18:0	3,9	4,3	3,3	1,0	1,0-4,3
18:1 ω7c 11-metil	0,4	-	0,1	-	ND-0,4
19:0 iso	-	0,2	-	-	ND-0,2
SF 7	0,7	0,1	0,3	-	ND-0,7
20:1 ω7c	0,2	0,2	0,1	-	ND-0,2
20:0	-	0,1	-	-	ND-0,1

Los ácidos grasos más representativos del género *Marinomonas* por estar presentes en todas las cepas estudiadas fueron: 10:0, 10:0 3OH, 12:0, 14:0, SF 3, 16:0, SF 8 y 18:0 (figura 58). Además, para la diferenciación de especies del género *Marinomonas* mediante GC FAME fueron importantes los ácidos grasos: 10:0 3OH y 12:1 3OH.

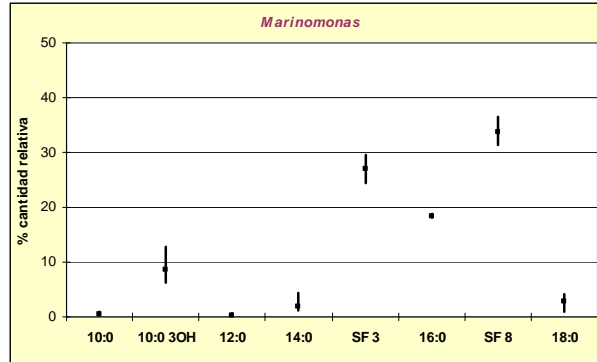


Figura 58. Gráfica que muestra los ácidos grasos más representativos de las cepas del género *Marinomonas* estudiadas y la variación de éstos en cuanto a la cantidad relativa observada.

Con el fin de estudiar la reproducibilidad de la técnica GC FAME, se realizaron réplicas de la extracción de ácidos grasos de la cepa *Haliae mediterranea* CECT 7447^T. Como se observa en la tabla 35, no existe apenas variación entre ambas réplicas, por lo que la técnica es reproducible.

Tabla 35. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *Haliae mediterranea* CECT 7447^T; 1', *Haliae mediterranea* CECT 7447^T réplica, cultivados en MA 26°C 24 h. |Δ| hace referencia a la variación en valor absoluto observada para cada ácido graso de una cepa con respecto a su réplica. SF 1 (13:0 3OH/15:1 iso H), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c).

	1	1'	\Delta
9:0	0,2	0,2	0,0
10:0 iso	0,1	0,1	0,0
10:0	0,6	0,6	0,0
9:0 3OH	0,1	0,1	0,0
11:0	2,2	2,3	0,1
10:0 3OH	1,2	1,3	0,1
12:0 iso	0,1	0,1	0,0
12:0	0,7	0,8	0,1
11:0 iso 3OH	0,1	0,1	0,0
11:0 2OH	0,2	0,2	0,0
11:0 3OH	4,9	5,1	0,2
13:0	0,7	0,8	0,1
12:0 iso 3OH	0,1	0,1	0,0
12:0 3OH	1,3	1,3	0,0
14:0 iso	0,1	0,1	0,0
14:0	0,7	0,7	0,0
SF 1	0,1	0,1	0,0
15:0 iso	0,2	0,2	0,0
15:1 ω 8c	1,3	1,4	0,1
15:1 ω 6c	1,7	1,8	0,1
16:0 N alcohol	0,1	0,1	0,0
16:0 iso	0,5	0,6	0,1
SF 3	18,0	17,7	0,3
16:1 ω 5c	0,1	-	0,1
16:0	6,1	5,9	0,2
17:1 iso ω 5c	-	0,1	0,1
17:0 iso	0,1	0,1	0,0
17:0 anteiso	0,1	0,2	0,1
17:1 ω 8c	30,8	30,5	0,3
17:1 ω 6c	5,7	5,6	0,1
17:0	8,6	8,3	0,3
16:1 2OH	-	0,1	0,1
18:1 iso H	-	0,1	0,1
SF 8	13,4	12,9	0,5
18:0	0,3	0,2	0,1
17:0 2OH	-	0,1	0,1
19:0 anteiso	-	0,1	0,1
18:0 3OH	-	0,4	0,4

Aún tratándose de una muestra muy reducida, los resultados permiten aventurar que la técnica GC FAME puede ser utilizada como herramienta de autenticación para los géneros *Haliea*, *Halomonas*, *Marinomonas* y *Shewanella*.

2.5 Análisis de cepas de la familia *Rhodobacteraceae*

En esta parte de la tesis doctoral se analizaron 41 cepas pertenecientes a la familia *Rhodobacteraceae* de los géneros: *Actibacterium* (1), *Antarctobacter* (1), *Jannaschia* (3), *Maribius* (2), *Marinovum* (1), *Nautella* (1), *Oceanicola* (6), *Palleronia* (1), *Phaeobacter* (4), *Phaeomarinomonas* (5), *Ponticoccus* (1), *Roseovarius* (8), *Ruegeria* (3), *Sagittula* (1), *Shimia* (1) y *Tropicibacter* (2).

El género con más cepas analizadas fue *Roseovarius* (8), donde destacaron los ácidos grasos: SF 8, con una cantidad relativa de entre 65,9 y 78,0%; el ácido graso SF 3, cuyo rango estuvo comprendido entre 0,4 y 5,0%; y el 16:0 que presentó entre 3,0 y 13,7% (tabla 36). También fueron importantes por estar presentes en algunas especies en cantidades considerables mientras que no se detectaron en otras los ácidos grasos: 10:0 3OH (ND-5,4%), 12:0 (ND-6,4%), 12:1 3OH (ND-3,7%), 12:0 3OH (ND-6,2%), SF 2 (ND-7,5%), 16:0 2OH (ND-4,7%), 18:0 iso (ND-6,4%), 18:1 ω7c metil (ND-7,1%).

Tabla 36. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *Roseovarius aestuarii* CECT 7745^T; 2, *Roseovarius crassostreae* CECT 7676^T; 3, *Roseovarius halotolerans* CECT 8110^T; 4, *Roseovarius litoralis* CECT 7450^T; 5, *Roseovarius marinus* CECT 7971^T; 6, *Roseovarius mucosus* CECT 7973^T; 7, *Roseovarius nubinihibens* CECT 7750^T; 8, *Roseovarius tolerans* CECT 7738^T, cultivados en MA 28°C 48 h. La columna de rango hace referencia al valor mínimo y máximo detectado de cada ácido graso. ND: No Detectado. SF 1 (13:0 3OH/15:1 iso H), SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehido), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 7 (19:1ω7c/19:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c).

	Roseovarius								Rango
	1	2	3	4	5	6	7	8	
10:0 iso	-	0,1	-	-	-	-	-	-	ND-0,1
10:0	0,7	-	0,7	0,8	-	-	1,0	-	ND-1,0
10:0 3OH	0,5	3,3	0,6	0,2	5,4	0,8	-	-	ND-5,4
12:0	5,2	0,1	3,4	5,5	0,3	4,8	6,4	-	ND-6,4
12:0 2OH	-	-	-	-	-	0,8	-	0,6	ND-0,8
12:1 3OH	-	-	2,8	-	0,3	3,0	-	3,7	ND-3,7
12:0 3OH	6,2	0,1	3,0	-	-	0,3	3,3	-	ND-6,2

	Roseovarius								Rango
	1	2	3	4	5	6	7	8	
14:0	0,6	0,2	0,1	0,4	0,2	0,3	0,7	0,5	0,1-0,7
SF 1	-	0,1	-	-	-	-	-	-	ND-0,1
SF 2	-	6,5	-	7,4	-	-	0,8	-	ND-7,4
SF 3	0,7	2,0	0,4	0,6	5,0	1,0	2,2	0,6	0,4-5,0
16:0	13,7	5,0	5,4	9,4	3,0	7,6	13,0	10,2	3,0-13,7
17:1 iso ω5c	-	0,1	-	-	-	-	-	-	ND-0,1
17:1 ω8c	-	-	-	-	0,4	-	-	1,0	ND-1,0
17:0	0,2	0,2	0,4	0,2	0,6	0,4	0,3	3,6	0,2-3,6
16:1 2OH	-	-	-	-	-	0,1	-	-	ND-0,1
16:0 2OH	-	-	0,5	4,7	-	1,8	-	0,5	ND-4,7
16:0 3OH	-	0,5	-	-	0,2	-	-	-	ND-0,5
18:0 iso	1,4	1,8	0,6	2,1	-	6,4	0,8	5,0	ND-6,4
SF 8	68,6	78,0	77,1	67,1	75,3	68,3	67,4	65,9	65,9-78,0
18:1 ω5c	-	0,1	0,1	-	-	0,1	-	-	ND-0,1
18:0	1,4	0,9	1,7	0,9	2,1	1,1	1,1	1,3	0,9-2,1
18:1 ω7c 11-metil	0,4	0,7	2,9	0,2	6,1	0,9	-	7,1	ND-7,1
SF 7	-	-	-	-	-	0,6	-	-	ND-0,6
19:0 ciclo ω8c	0,4	-	0,3	0,4	-	1,6	3,2	-	ND-1,6
19:0	-	0,1	-	-	0,3	-	-	-	ND-0,3
18:1 2OH	-	-	-	0,3	-	-	-	-	ND-0,3
18:0 3OH	-	-	-	-	0,4	-	-	-	ND-0,4
20:1 ω7c	-	-	0,1	-	0,6	0,2	-	-	ND-0,6

La composición de ácidos grasos de 6 cepas pertenecientes al género *Oceanicola* se detalla en la tabla 37. Este género presentó una elevada heterogeneidad en cuanto al perfil de ácidos grasos de sus especies, el rango del ácido graso SF 8 varió entre 28,9-78,0%. Además, a diferencia del resto de cepas, *Oceanicola marinus* CECT 7751^T presentó como ácido graso mayoritario el 19:0 ciclo ω8c con 31,8% de cantidad relativa mientras que en otras especies osciló entre ND y 5,6%. Dentro de este género también destacaron los ácidos grasos 12:1 3OH (ND-6,3%), 12:0 3OH (ND-4,1%), 16:0 (2,0-16,9%), 17:1 ω8c (ND-5,9%), 17:1 ω6c (ND-8,3%), 17:0 (ND-21,6%) y 18:1 ω7c 11-metil (3,2-27,1%).

Tabla 37. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *Oceanicola batsensis* CECT 7860^T; 2, *Oceanicola granulosis* CECT 7759^T; 3, *Oceanicola marinus* CECT 7751^T; 4, *Oceanicola nanhaiensis* CECT 7831^T; 5, *Oceanicola pacificus* CECT 7832^T; 6, *Oceanicola* sp. CECT 7582, cultivados en MA 28°C 48 h. La columna de rango hace referencia al valor mínimo y máximo detectado de cada ácido graso. ND: No Detectado. SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso

I/12:0 aldehído), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 5 (18:0 ante/18:2 ω6,9c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c).

	<i>Oceanicola</i>						Rango
	1	2	3	4	5	6	
10:0	-	-	0,7	-	-	-	ND-0,7
10:0 3OH	-	1,7	-	1,4	1,4	-	ND-1,7
12:0	2,2	0,8	0,6	0,5	0,5	-	ND-2,2
11:0 2OH	-	-	-	-	0,8	-	ND-0,8
11:0 3OH	-	-	-	-	2,6	-	ND-2,6
12:1 3OH	-	-	6,3	-	4,1	-	ND-6,3
12:0 3OH	4,1	1,7	-	-	-	-	ND-4,1
14:0	1,4	0,6	0,5	0,3	0,4	-	ND-1,4
SF 2	-	-	-	1,1	-	-	ND-1,1
SF 3	-	2,0	1,5	2,1	-	3,1	ND-3,1
16:0	13,7	10,5	16,9	6,0	2,0	12,9	2,0-16,9
15:0 2OH	-	-	-	-	0,9	-	ND-0,9
17:1 ω8c	-	-	-	-	5,9	-	ND-5,9
17:1 ω6c	-	-	-	-	8,3	-	ND-8,3
17:0	1,7	-	-	1,0	21,6	1,1	ND-21,6
16:0 2OH	-	-	-	-	1,0	-	ND-1,0
18:1 ω9c	-	-	1,2	-	-	-	ND-1,2
SF 8	62,5	78,0	28,9	71,4	38,1	54,7	28,9-78,0
18:1 ω5c	-	-	-	-	0,4	-	ND-0,4
18:0	1,5	1,1	1,2	1,2	0,9	1,3	0,9-1,5
18:1 ω7c 11-metil	12,8	3,7	8,5	12,0	3,8	27,1	3,7-27,1
17:0 2OH	-	-	-	-	1,1	-	ND-1,1
19:0 ciclo ω8c	-	-	31,8	2,9	5,6	-	ND-31,8
19:0	-	-	-	-	0,4	-	ND-0,4
20:2 ω6,9c	-	-	2,1	-	0,4	-	ND-2,1

En la tabla 38 se muestra el perfil de ácidos grasos de las cepas pertenecientes al género *Phaeoamrinomonas*, que se caracteriza por presentar 68,0-77,9% de SF 8. Por otra parte, destaca la proporción de ácidos grasos tan parecida entre las distintas cepas pertenecientes a *Phaeoamrinomonas mediterranea* con respecto a la especie de *Phaeoamrinomonas litorea*.

Tabla 38. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *Phaeoamrinomonas litorea* CECT 7639^T; 2, *Phaeoamrinomonas mediterranea* CECT 5090; 3, *Phaeoamrinomonas mediterranea* CECT 7637; 4, *Phaeoamrinomonas mediterranea* CECT 7615^T; 5, *Phaeoamrinomonas mediterranea* CECT 7616, cultivados en MA 28°C 48 h. La columna de rango hace referencia al valor mínimo y máximo detectado de cada ácido graso. ND: No Detectado. SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 5 (18:0 ante/18:2 ω6,9c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c).

	<i>Phaeoarinomonas</i>					Rango
	1	2	3	4	5	
9:0	1,2	-	-	-	-	ND-1,2
10:0 3OH	4,8	3,3	3,5	3,5	3,6	3,3-4,8
12:0	1,3	0,6	0,7	0,7	0,7	0,6-1,3
12:0 2OH	1,2	1,4	1,2	1,3	1,5	1,2-1,5
12:0 3OH	0,9	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3-0,9
14:0	1,7	0,3	0,8	0,6	0,4	0,3-1,7
SF 3	-	0,2	0,1	0,2	0,2	ND-0,2
16:0	8,4	5,1	5,0	5,4	5,7	5,0-8,4
17:0	-	-	0,1	0,2	-	ND-0,2
16:0 2OH	1,6	2,7	2,3	2,6	2,9	1,6-2,9
18:0 iso	2,1	1,5	1,2	1,5	1,9	1,2-2,1
SF 5	0,5	-	-	-	-	ND-0,5
SF 8	68,0	76,8	77,9	75,6	73,2	68,0-77,9
18:1 ω5c	-	-	0,2	0,2	0,2	ND-0,2
18:0	3,6	1,6	1,9	1,6	1,5	1,5-3,6
18:1 ω7c 11-metil	5,0	6,0	4,6	6,2	7,8	4,6-7,8
20:1 ω7c	-	0,2	0,2	0,2	-	ND-0,2

El género *Phaeobacter* presentó como ácido graso mayoritario el SF 8, en un rango comprendido entre 68,0 y 77,9%, que coincide exactamente con el encontrado en *Phaeoarinomonas*. También destacaron los ácidos grasos 16:0 (2,3-9,0%) y 18:1 ω7c 11-metil (1,1-9,7%) (tabla 39).

Tabla 39. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *Phaeobacter daeponensis* CECT 7309^T; 2, *Phaeobacter gallaeciensis* CECT 7277^T; 3, *Phaeobacter inhibens* CECT 7251^T; 4, *Phaeobacter* sp. CECT 7735, cultivados en MA 28°C 48 h. La columna de rango hace referencia al valor mínimo y máximo detectado de cada ácido graso. ND: No Detectado. SF 1 (13:0 3OH/15:1 iso H), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 7 (19:1 ω7c/19:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c).

	<i>Phaeobacter</i>				Rango
	1	2	3	4	
9:0	-	0,5	-	0,4	ND-0,5
10:0 iso	-	-	-	0,2	ND-0,2
10:0 3OH	2,5	2,6	2,4	2,6	2,4-2,6
12:0	0,9	0,6	0,5	0,2	0,2-0,9
12:0 3OH	2,7	1,8	1,8	-	ND-2,7
14:0	0,3	0,9	0,2	1,0	0,2-1,0
SF 1	0,2	-	-	-	ND-0,2
SF 3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2-0,3
16:0	2,3	9,0	7,2	5,0	2,3-9,0
17:1 iso ω5c	-	-	-	0,3	ND-0,3

	<i>Phaeobacter</i>				
	1	2	3	4	Rango
17:1 ω 8c	-	-	-	0,3	ND-0,3
17:1 ω 6c	-	-	-	0,2	ND-0,2
17:0	0,3	0,2	0,2	1,0	0,2-1,0
16:0 2OH	3,1	3,4	1,7	2,0	1,7-3,4
18:0 iso	3,8	0,8	1,2	3,5	0,8-3,8
SF 8	71,6	68,0	73,7	77,9	68,0-77,9
18:1 ω 5c	-	-	-	0,2	ND-0,2
18:0	1,0	3,3	1,7	2,2	1,0-3,3
18:1 ω 7c 11-metil	9,7	8,1	8,6	1,1	1,1-9,7
17:0 2OH	0,1	-	-	0,3	ND-0,3
19:0 iso	-	-	-	0,4	ND-0,4
SF 7	0,5	0,3	0,2	-	ND-0,5
19:0	-	-	-	0,3	ND-0,3
18:1 2OH	0,8	-	-	0,3	ND-0,8
20:1 ω 7c	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2-0,3
20:0	-	0,1	-	0,2	ND-0,2

En la tabla 40 se muestra la composición de ácidos grasos obtenida mediante cromatografía de gases de 3 cepas pertenecientes al género *Jannaschia* y 2 del género *Maribius*. En el caso del género *Jannaschia* el ácido graso SF 8 de las tres cepas estudiadas presentó una cantidad relativa que varió entre 72,1 y 85,5%, además destacaron otros ácidos grasos por su presencia en cantidades moderadas en algunas especies y su ausencia en otras, de manera que se consideran candidatos para su valoración a la hora de discriminar entre especies, como el ácido graso 18:1 ω 7c 11-metil que varía entre su no detección y el 3,9% en las distintas especies de *Jannaschia* estudiadas, o el 19:0 ciclo ω 8c que varía entre su no detección y el 8,8%. En el caso del género *Maribius*, el SF 8 estuvo presente entre 73,4-83,1%, y destacó también el 19:0 ciclo ω 8c (1,5-5,4%).

Tabla 40. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *Jannaschia donghaensis* CECT 7802^T; 2, *Jannaschia rubra* CECT 5088^T; 3, *Jannaschia seosinensis* CECT 7799^T; 4, *Maribius pelagius* CECT 7801^T; 5, *Maribius salinus* CECT 7800^T; cultivados en MA 28°C 48 h. La columna de rango hace referencia al valor mínimo y máximo detectado de cada ácido graso. ND: No Detectado. SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehído), SF 3 (16:1 ω 7c/16:1 ω 6c), SF 5 (18:0 ante/18:2 ω 6,9c), SF 7 (19:1 ω 7c/19:1 ω 6c), SF 8 (18:1 ω 6c/18:1 ω 7c).

	<i>Jannaschia</i>				<i>Maribius</i>		
	1	2	3	Rango	4	5	Rango
9:0	-	0,4	-	ND-0,4	-	-	-
10:0 3OH	4,0	3,5	3,4	3,4-3,5	5,5	6,1	5,5-6,1
12:0	-	0,2	-	ND-0,2	0,6	0,7	0,6-0,7
11:0 3OH	0,3	-	-	ND-0,3	-	-	-
14:00	-	0,8	-	ND-0,8	-	-	-
16:1 ω7c alcohol	0,4	-	-	ND-0,4	-	-	-
SF 2	-	0,6	1,6	ND-1,6	-	-	-
SF 3	-	0,7	0,6	ND-0,7	-	0,6	ND-0,6
16:0	0,5	2,5	1,0	0,5-2,5	2,0	4,3	2,0-4,3
17:0	0,4	0,5	0,8	0,4-0,8	-	1,6	ND-1,6
18:0 iso	0,7	0,4	-	ND-0,7	-	-	-
SF 8	77,1	72,1	85,5	72,1-85,5	83,1	73,4	73,4-83,1
18:1 ω5c	-	0,1	-	ND-0,1	-	-	-
18:0	5,4	7,9	6,0	5,4-7,9	3,0	2,3	2,3-3,0
18:1 ω7c 11-metil	3,9	0,4	-	ND-3,9	3,1	4,0	3,1-4,0
SF 7	1,4	-	-	ND-1,4	0,8	1,6	0,8-1,6
19:0 ciclo ω8c	-	8,8	-	ND-8,8	1,5	5,4	1,5-5,4
19:0	2,6	-	0,4	ND-2,6	-	-	-
20:2 ω6,9c	-	0,2	-	ND-0,2	-	-	-
20:1 ω7c	2,8	0,8	0,7	0,7-2,8	0,6	-	ND-0,6
20:0	0,3	0,2	-	ND-0,3	-	-	-

En la tabla 41 se muestra la composición de ácidos grasos de 3 cepas pertenecientes al género *Ruegeria* y 2 del género *Tropicibacter*. El ácido graso SF 8 se vio que estaba presente entre 67,0-74,2% en el género *Ruegeria*, siendo también relevantes los ácidos grasos 12:0 3OH (ND-6,1%), 16:0 (4,4-9,5%), 18:0 iso (ND-9,7%) y 18:1 ω7c 11-metil (ND-5,6%). Las cepas estudiadas del género *Tropicibacter* presentaron entre 70,9-73,5% del ácido graso mayoritario SF 8, siendo importantes también el 10:0 3OH (ND-4,8%), 12:1 3OH (ND-3,4%), 16:0 2OH (ND-3,8%), 18:0 (2,7-6,9%) y 18:1 ω7c 11-metil (1,8-5,3%).

Tabla 41. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *Ruegeria atlantica* CECT 4292^T; 2, *Ruegeria pomeroyi* CECT 7647^T; 3, *Ruegeria* sp. CECT 7638; 4, *Tropicibacter multivorans* CECT 7557^T; y 5, *Tropicibacter naphthalenivorans* CECT 7648^T, cultivados en MA 28°C 48 h, excepto *Ruegeria atlantica* CECT 4292^T cultivada a 20°C. La columna de rango hace referencia al valor mínimo y máximo detectado de cada ácido graso. ND: No Detectado. SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehído), SF 3 (16:1 ω7c/16:1

$\omega 6c$), SF 5 (18:0 ante/18:2 $\omega 6,9c$), SF 7 (19:1 $\omega 7c$ /19:1 $\omega 6c$), SF 8 (18:1 $\omega 6c$ /18:1 $\omega 7c$).

	Ruegeria				Tropicibacter		
	1	2	3	Rango	4	5	Rango
9:0	-	-	-	-	-	1,5	ND-1,5
10:0 iso	0,1	-	-	ND-0,1	-	-	-
10:0	2,6	3,2	-	ND-3,2	-	-	-
10:0 3OH	0,7	0,8	5,0	0,7-5,0	4,8	-	ND-4,8
12:0	2,7	1,3	0,8	0,8-2,7	0,5	0,6	0,5-0,6
12:0 2OH	-	-	1,6	ND-1,6	-	-	-
12:1 3OH	-	-	-	-	-	3,4	ND-3,4
12:0 3OH	4,9	6,1	-	ND-6,1	1,0	-	ND-1,0
14:00	0,2	0,4	2,1	0,2-2,1	0,9	2,1	0,9-2,1
SF 2	-	-	-	-	0,2	-	ND-0,2
SF 3	0,3	0,4	-	ND-0,4	0,5	-	ND-0,5
16:0	4,4	7,2	9,5	4,4-9,5	8,2	7,4	7,4-8,2
17:1 iso $\omega 5c$	0,2	0,2	-	ND-0,2	-	-	-
17:0	0,1	0,3	-	ND-0,3	0,3	-	ND-0,3
16:1 2OH	0,2	-	-	ND-0,2	-	-	-
16:0 2OH	2,7	4,3	3,0	2,7-4,3	3,8	-	ND-3,8
18:0 iso	9,7	-	1,1	ND-9,7	-	-	-
SF 5	-	-	-	-	-	0,9	ND-0,9
18:1 $\omega 9c$	-	-	-	-	-	1,3	ND-1,3
SF 8	67,0	68,3	74,2	67,0-74,2	70,9	73,5	70,9-73,5
18:1 $\omega 5c$	0,1	-	-	ND-0,1	0,2	-	ND-0,2
18:0	0,5	1,7	2,7	0,5-2,7	2,7	6,9	2,7-6,9
18:1 $\omega 7c$ 11-metil	2,8	5,6	-	ND-5,6	5,3	1,8	1,8-5,3
SF 7	0,2	-	-	ND-0,2	0,2	-	ND-0,2
18:1 2OH	0,6	0,2	-	ND-0,6	0,3	-	ND-0,3
20:1 $\omega 9c$	0,1	-	-	ND-0,1	-	-	-
20:1 $\omega 7c$	0,2	-	-	ND-0,2	-	-	-
20:0	-	-	-	-	0,3	0,5	0,3-0,5

La composición de ácidos grasos de 8 especies adicionales de la familia *Rhodobacteraceae* se muestra en la tabla 42. Todas estas cepas tienen en común tener como ácido mayoritario el SF 8, además de presentar cantidades moderadas del 16:0. Destaca también la presencia de 12:1 3OH en cantidades relativas considerables en *Antarctobacter heliothermus*, *Ponticoccus litoralis* y *Sagitulla stellata*, 18:1 $\omega 7c$ 11-metil en todos los casos excepto en *Palleronia marisminoris*, y de la presencia de un 14,7% de 19:0 ciclo $\omega 8c$ en *Palleronia marisminoris*.

Tabla 42. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *Actibacterium mucosus* CECT 7668^T; 2, *Antarctobacter heliothermus* CECT 7783^T; 3, *Marinovum algicola* CECT 7396^T; 4, *Nautella italica* CECT 7645^T; 5, *Palleronia marisminoris* CECT 7066^T; 6, *Ponticoccus litoralis* CECT 7786^T; 7, *Sagittulla stellata* CECT 7782^T; 8, *Shimia marina* CECT 7688^T, cultivados en MA 28°C 48 h. La columna de rango hace referencia al valor mínimo y máximo detectado de cada ácido graso. ND: No Detectado. SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 7 (19:1 ω7c/19:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c).

	1	2	3	4	5	6	7	8
9:0	-	-	-	-	-	-	0,6	-
10:0 iso	0,2	-	-	-	-	-	-	-
10:0	-	0,9	-	-	-	0,8	0,6	-
10:0 3OH	3,3	-	1,6	2,7	3,8	0,6	0,7	3,2
12:1 at 11-12	-	-	-	-	-	1,1	-	-
12:0	1,3	-	-	0,7	-	0,5	-	1,3
12:1 3OH	-	7,9	0,6	-	-	5,2	5,2	-
12:0 3OH	0,7	-	1,2	2,0	-	1,1	-	0,7
14:0	0,4	0,6	0,8	1,3	1,4	1,3	1,0	1,0
SF 3	0,5	1,2	-	-	-	0,4	0,4	0,5
16:0	4,5	7,6	3,4	8,0	2,7	6,1	11,8	5,5
17:1 iso ω5c	0,2	-	-	-	-	-	-	-
17:1 anteiso ω9c	-	-	-	-	-	0,3	-	-
17:0	0,2	0,5	-	-	0,8	-	0,3	0,3
16:0 2OH	1,2	-	-	1,9	-	-	-	1,0
18:0 iso	-	-	1,1	2,9	1,9	-	-	-
SF 8	76,5	74,9	83,7	69,3	70,7	72,3	70,5	76,9
18:1 ω5c	0,2	-	-	-	-	-	-	0,4
18:0	1,2	1,4	2,4	2,2	3,1	3,1	3,3	1,8
18:1 ω7c 11-metil	9,1	2,7	4,7	8,9	-	7,1	3,0	7,3
SF 7	0,3	-	-	-	-	-	-	-
19:0 ciclo ω8c	-	2,5	-	-	14,7	-	2,5	-
18:1 2OH	0,3	-	-	-	-	-	-	-
20:2 ω6,9c	-	-	-	-	1,0	-	-	-
20:1 ω7c	-	-	0,4	-	-	-	-	0,3

Para comprobar la reproducibilidad de la técnica GC FAME, se realizaron extracciones de ácidos grasos de la misma cepa en diferentes días, manteniendo las mismas condiciones de cultivo. Como se observa en la tabla 43, la técnica presentó alta reproducibilidad, puesto que la diferencia máxima observada en la cantidad relativa de un determinado ácido graso entre dos cepas fue de 2,1 unidades porcentuales (el ácido graso SF 8 de *Nautella italica* CECT 7645^T).

Tabla 43. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *Actibacterium mucosus* CECT 7668^T; 1', *Actibacterium mucosum* CECT 7668^T réplica; 2, *Nautella italica* CECT 7645^T; 2' *Nautella italica* CECT 7645^T réplica; 3, *Oceanicola pacificus* CECT 7832^T; 3', *Oceanicola pacificus* CECT 7832^T réplica; 4, *Phaeobacter gallaeciensis* CECT 7277^T; 4', *Phaeobacter gallaeciensis* CECT 7277^T réplica; 5, *Phaeoarinomonas litorea* CECT 7639^T; 5', *Phaeoarinomonas litorea* CECT 7639^T réplica, cultivados en MA 28°C 48 h, excepto *Phaeobacter gallaeciensis* CECT 7277^T a 20°C. |ΔI| hace referencia a la variación en valor absoluto observada para cada ácido graso de una cepa con respecto a su réplica. SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 5 (18:0 ante/18:2 ω6,9c), SF 7 (19:1 ω7c/19:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c).

	1	1'	ΔI	2	2'	ΔI	3	3'	ΔI	4	4'	ΔI	5	5'	ΔI
9:00	-	-	-	-	0,8	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10:0 iso	0,3	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	-	-	-	0,2	-	0,2	0,2	-	0,2
10:0 3OH	4,4	3,3	1,1	2,9	2,1	0,8	1,5	1,4	0,1	3,2	3,3	0,1	2,7	3,3	0,6
12:00	1,5	1,3	0,2	0,4	0,5	0,1	-	0,5	0,5	0,6	0,6	0,0	0,8	0,8	0,0
11:0 2OH	-	-	-	-	-	-	1,0	0,8	0,2	-	-	-	-	-	-
11:0 3OH	-	-	-	-	-	-	3,1	2,6	0,5	-	-	-	-	-	-
13:00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	0,1
12:0 2OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	1,3	0,0
12:1 3OH	-	-	-	-	-	-	4,3	4,1	0,2	-	-	-	-	-	-
12:0 3OH	0,8	0,7	0,1	1,9	1,3	0,6	-	-	-	1,7	1,9	0,2	0,8	0,9	0,1
14:00	1,0	0,4	0,6	0,4	1,1	0,7	-	0,4	0,4	0,3	0,5	0,2	-	0,5	0,5
16:0 iso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	0,1
SF 3	0,6	0,5	0,1	0,3	0,2	0,1	0,3	-	0,3	0,2	0,2	0,0	0,2	-	0,2
16:00	4,5	4,5	0,0	4,0	5,6	1,6	1,9	2,0	0,1	4,7	5,7	1,0	2,9	1,9	1,0
15:0 2OH	-	-	-	-	-	-	0,6	0,9	0,3	-	-	-	-	-	-
17:1 iso ω5c	0,3	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	-	-	-	-	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2
17:1 anteiso ω9c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	0,1
17:1 ω8c	-	-	-	-	-	-	5,9	5,9	0,0	-	-	-	-	-	-
17:1 ω6c	-	-	-	-	-	-	8,7	8,3	0,4	-	-	-	-	-	-
17:00	-	0,2	0,2	0,2	-	0,2	22,0	21,6	0,4	0,1	0,1	0,0	0,2	0,3	0,1
16:0 2OH	2,0	1,2	0,8	1,2	0,7	0,5	0,6	1,0	0,4	1,9	1,7	0,2	2,2	1,7	0,5
18:0 iso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,7	4,0	0,7	3,2	4,6	1,4
SF 5	-	-	-	4,7	3,9	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SF 8	75,0	76,5	1,5	81,0	78,9	2,1	38,7	38,1	0,6	79,8	81,4	1,7	76,9	74,9	2,0
18:1 ω5c	0,2	0,2	0,0	0,2	-	0,2	0,5	0,4	0,1	-	-	-	0,1	0,2	0,1
18:00	1,2	1,2	0,0	1,2	2,2	1,0	1,0	0,9	0,1	1,2	-	1,2	1,5	1,5	0,0
18:1 ω7c 11-metil	7,4	9,1	1,7	1,3	1,6	0,3	3,2	3,8	0,6	1,3	-	1,3	6,2	7,3	1,1
17:0 2OH	-	-	-	-	-	-	0,8	1,1	0,3	-	-	-	-	-	-
19:0 iso	-	-	-	0,2	0,5	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SF 7	-	0,3	0,3	-	-	-	-	-	-	0,2	-	0,2	-	-	-
19:0 ciclo ω8c	-	-	-	-	-	-	5,5	5,6	0,1	-	-	-	-	-	-
19:00	-	-	-	-	-	-	0,5	0,4	0,1	-	-	-	-	-	-
18:1 2OH	0,5	0,3	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,6	0,5
20:1 ω7c	0,3	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	0,2

Debido a su reproducibilidad, y a la capacidad de diferenciar entre géneros y entre especies, GC FAME se puede considerar como una herramienta adecuada en la autenticación de cepas dentro de la familia *Rhodobacteraceae*. Los ácidos grasos comunes a todas las cepas estudiadas de esta familia fueron: 16:0, SF 8 y 18:0.

Los ácidos grasos más representativos del género *Jannaschia*, por estar presentes en todas las cepas estudiadas fueron: 10:0 3OH, 16:0, 17:0, SF 8, 18:0 y 20:1 ω 7c (figura 59), destaca la poca variación existente en la cantidad relativa de estos ácidos grasos entre las 3 especies estudiadas, excepto en el SF 8. Además, también resultaron importantes a la hora de diferenciar entre especies los ácidos grasos 18:1 ω 7c 11-metil y el 19:0 ciclo ω 8c.

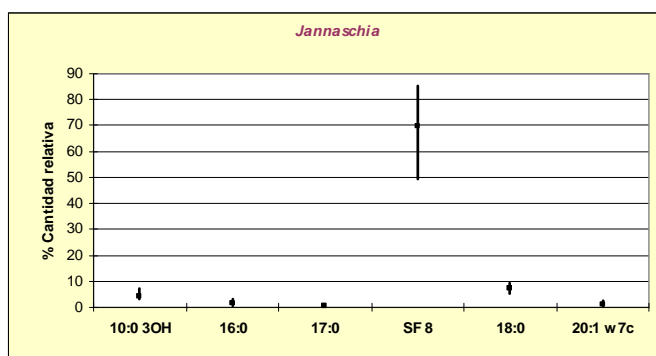


Figura 59. Gráfica que muestra los ácidos grasos más representativos del género *Jannaschia* y la variación observada de éstos en la cantidad relativa.

En el caso de las dos especies que componen el género *Maribius*, los ácidos grasos más representativos fueron: 10:0 3OH, 12:0, 16:0, SF 8, 18:0, 18:1 ω 7c 11-metil, SF 7 y 19:0 ciclo ω 8c (figura 60). Además, se observa poca variabilidad en cuanto a la cantidad relativa de dichos ácidos grasos.

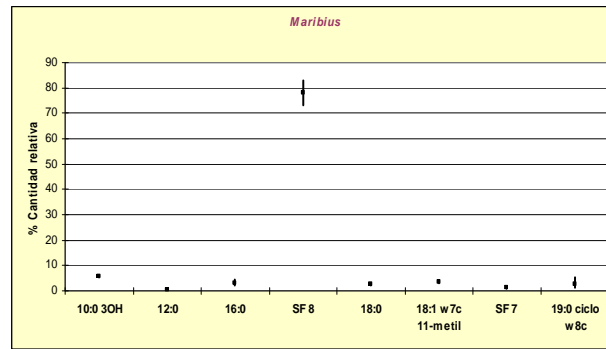


Figura 60. Gráfica que muestra los ácidos grasos más representativos del género *Maribius* y la variación de éstos observada en la cantidad relativa.

El género *Oceanicola* presenta la mayor variabilidad en cuanto a la cantidad relativa de los ácidos grasos SF 8, 16:0 y 18:1 ω 7c 11-metil de las cepas estudiadas de la familia *Rhodobacteraceae*. Además de estos ácidos grasos, también fueron representativos del género: 12:0, 14:0, 16:0, SF 8, 18:0 y 18:1 ω 7c 11-metil (figura 61). Y a la hora de la discriminación entre especies fueron relevantes por estar presentes en cantidades considerables en algunas especies, mientras que no se detectaron o se detectaron en cantidades bajas en otras los ácidos grasos: 12:1 3OH, 12:0 3OH, 17:1 ω 8c, 17:1 ω 6c y 17:0.

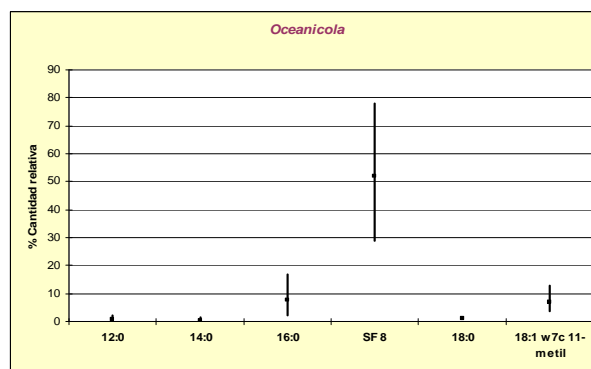


Figura 61. Gráfica que muestra los ácidos grasos más representativos de las cepas del género *Oceanicola* estudiadas y la variación de éstos observada en la cantidad relativa.

El género que presentó mayor número de ácidos grasos comunes a todas las cepas estudiadas fue *Phaeobacter*, estos ácidos grasos fueron: 10:0 3OH, 12:0, 12:0 3OH, 14:0, SF 3, 16:0, 17:0, 18:0 2OH, 18:0 iso, SF 8, 18:0, 18:1 ω 7c 11-metil, SF 7 y 20:1 ω 7c (figura 62). Al mismo tiempo, la variabilidad intraespecífica en la cantidad relativa de estos ácidos grasos fue baja.

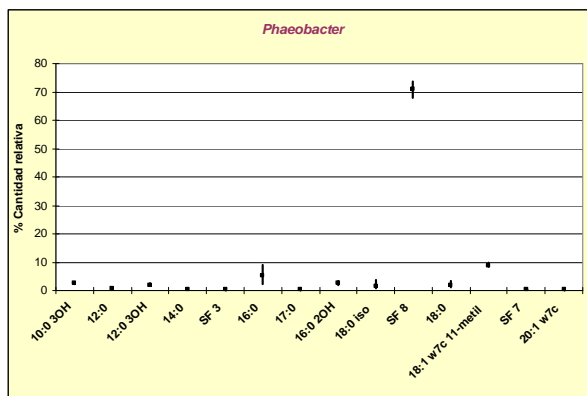


Figura 62. Gráfica que muestra los ácidos grasos más representativos de las cepas del género *Phaeobacter* estudiadas y la variación de éstos observada en la cantidad relativa.

En el caso del género *Phaeomarinomonas*, se observa también poca variabilidad en la cantidad relativa de los ácidos grasos más representativos (figura 63), lo cual no es de extrañar ya que a pesar de haber contado para el estudio con 5 cepas, éstas forman parte sólo de dos especies.

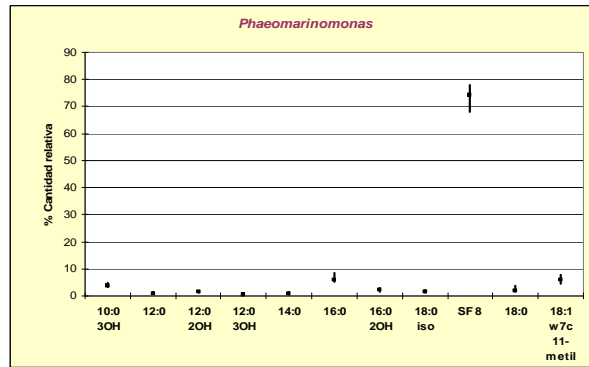


Figura 63. Gráfica que muestra los ácidos grasos más representativos del género *Phaeoarinomonas* y la variación de éstos observada en la cantidad relativa.

El estudio de la composición de ácidos grasos para género *Roseovarius* fue llevado a cabo con 8 de las 12 especies descritas para este género. Los ácidos grasos más representativos fueron: 14:0, SF 3, 16:0, 17:0, SF 8 y 18:0 (figura 64), observándose la mayor variabilidad en cuanto a su cantidad relativa en los ácidos grasos 16:0 y SF 8, sin embargo, este rango no es muy elevado en comparación con otros géneros de la misma familia, como el género *Oceanicola*.

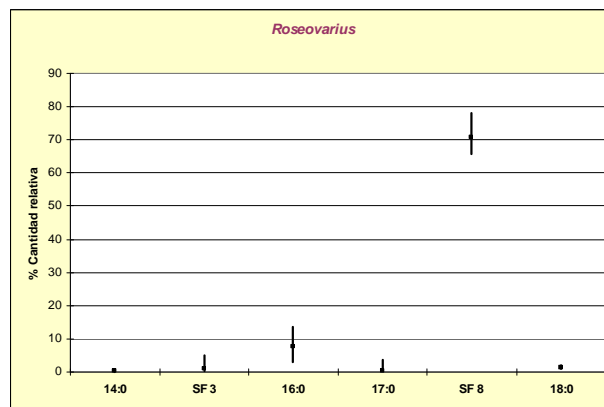


Figura 64. Gráfica que muestra los ácidos grasos más representativos de las cepas del género *Roseovarius* estudiadas y la variación de éstos observada en la cantidad relativa.

Los ácidos grasos más representativos del género *Ruegeria* fueron: 10:0 3OH, 12:0, 14:0, 16:0, 16:0 2OH, SF 8 y 18:0 (figura 65), siendo también relevantes los ácidos grasos 12:0 3OH, 18:0 iso y 18:1 ω 7c 11-metil. Entre los ácidos grasos comunes a las cepas estudiadas destaca la diferencia existente entre la proporción del ácido graso SF 8 (67,0-74,2%) con respecto al resto de ácidos grasos. Por otro lado, para la diferenciación de cepas a nivel intraespecífico son relevantes también por estar presentes en algunas especies mientras que no se detectan en otras los ácidos grasos: 18:0 iso, 18:1 ω 7c 11-metil y el 12:0 3OH

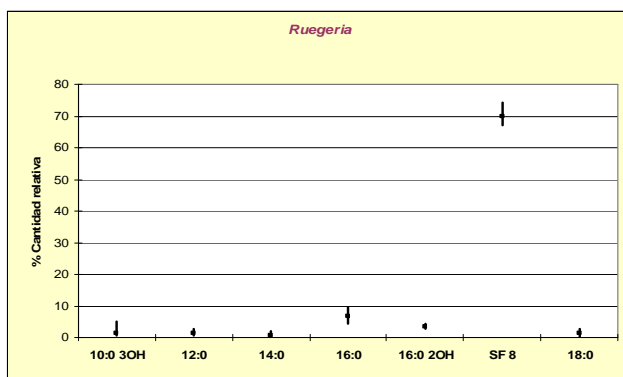


Figura 65. Gráfica que muestra los ácidos grasos más representativos de las cepas del género *Ruegeria* estudiadas y la variación de éstos observada en la cantidad relativa.

Por último, los ácidos grasos más representativos de las cepas del género *Tropicibacter* estudiadas fueron: 12:0, 14:0, 16:0, SF 8, 18:0, 18:1 ω 7c 11-metil y 20:0 (figura 66), presentando una variabilidad muy baja. En este estudio se han utilizado dos de las tres especies descritas dentro del mismo género, por lo que es probable que esta variabilidad fuera mayor al incluir la especie que falta. También fueron de interés por estar presentes en una especie en cantidades considerables mientras que no se detectaron en la otra especie los ácidos grasos 10:0 3OH, 12:1 3OH y 16:0 2OH.

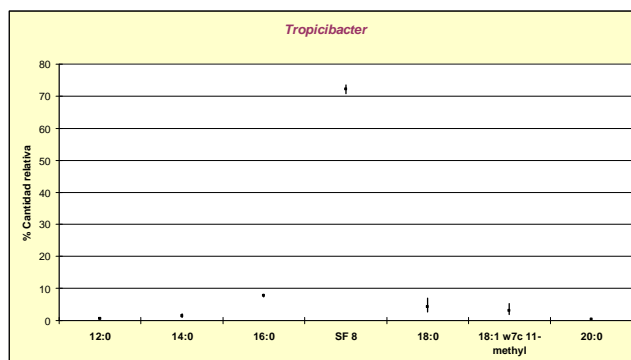


Figura 66. Gráfica que muestra los ácidos grasos más representativos de las cepas del género *Tropicibacter* estudiadas y la variación de éstos observada en la cantidad relativa.

2.6 Análisis de cepas del filo *Bacteroidetes*

En este apartado se analizaron 17 cepas pertenecientes al filo *Bacteroidetes* mediante GC FAME.

En la tabla 44 se muestra la composición de ácidos grasos de nueve cepas pertenecientes al género *Winogradskyella*. Los ácidos grasos mayoritarios para este género fueron el 15:1 iso G que presentó una cantidad relativa de 9,5-28%, el 15:0 iso presente entre el 13,5 y 19,2%, el 15:0 anteiso cuyo rango fue 1,4-11,2%, el 15:0 iso 3OH presente entre 3,8 y 16,4%, el 16:0 iso 3OH cuyo rango varió entre 4,4 y 15,7% y el 17:0 iso 3OH que mostró entre 5,6-14,3% de cantidad relativa. A la hora de diferenciar entre especies según su perfil de ácidos grasos, además de los ácidos grasos anteriormente señalados, también destacaron otros por estar presentes en algunas especies en cantidades considerables mientras que estaban ausentes en otras, como es el caso del 15:1 ω 6c con un rango que varía entre la no detección y el 6,1%, el 16:1 iso H (ND-9,4%), el SF 9 (ND-4,3%), el 17:1 anteiso ω 9c (ND-3,7%) y el 17:0 2OH (ND-5,2%).

Tabla 44. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *Winogradskyella arenosi* CECT 7959^T; 2, *Winogradskyella echinorum* CECT 7944^T; 3, *Winogradskyella epiphytica* CECT 7945^T; 4, *Winogradskyella eximia* CECT 7946^T; 5, *Winogradskyella lutea* CECT 7947^T; 6, *Winogradskyella pacifica* CECT 7948^T; 7, *Winogradskyella rapida* CECT 7392^T; 8, *Winogradskyella* sp. CECT 7476; 9, *Winogradskyella thalassocola* CECT 7943^T, cultivados en MA 28°C 48 h. La columna de rango hace referencia al valor mínimo y máximo detectado de cada ácido graso. ND: No Detectado. SF 3 (16:1 ω 7c/16:1 ω 6c), SF 4 (17:1 iso I/anteiso B), SF 9 (17:1 iso ω 9c/16:0 10-metil).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Rango
12:0	0,3	0,3	0,5	0,5	0,5	0,3	0,7	0,2	0,6	0,2-0,7
13:0 iso	0,4	0,4	-	-	0,9	-	-	0,3	-	ND-0,9
13:0	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	ND-0,3
14:0 iso	0,4	0,4	0,9	2,3	1,3	0,6	-	0,4	1,6	ND-2,3
14:0	0,3	0,6	0,4	1,0	0,7	0,5	0,5	0,3	0,7	0,3-1,0
15:1 iso G	10,2	28,0	15,6	9,5	18,7	13,3	13,6	15,8	15,8	9,5-28,0
15:1 anteiso A	3,0	2,0	4,5	2,3	2,1	3,4	4,2	2,0	1,7	1,7-4,5
15:0 iso	13,5	19,2	16,3	17,8	16,7	15,6	16,1	18,4	17,6	13,5-19,2
15:0 anteiso	9,8	1,4	11,2	5,0	4,3	8,7	10,2	4,9	4,5	1,4-11,2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Rango
15:1 ω 6c	3,3	-	0,5	3,2	2,3	6,1	5,3	2,6	4,0	ND-6,1
14:0 iso 3OH	0,4	-	0,5	1,0	0,5	0,4	-	0,3	0,6	ND-1,0
16:1 iso G	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	ND-0,7
16:1 iso H	0,7	-	3,1	9,4	1,6	2,1	0,7	0,6	4,1	ND-9,4
16:0 N alcohol	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	ND-0,5
16:0 iso	0,4	0,4	3,4	4,7	2,0	1,0	0,5	0,4	1,6	0,4-4,7
16:0 anteiso	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	ND-0,3
16:1 ω 9c	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	ND-0,4
SF 3	2,9	6,7	4,8	4,3	3,1	3,1	3,4	6,9	3,8	2,9-6,9
16:1 ω 5c	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	ND-0,3
16:0	-	2,5	-	2,3	2,5	-	-	-	3,1	ND-3,1
15:0 iso 3OH	16,4	15,5	3,8	4,5	7,3	10,5	14,6	13,5	11,8	3,8-16,4
15:0 2OH	2,6	0,7	2,0	1,4	1,2	2,0	2,0	2,0	-	ND-2,6
SF 9	2,4	1,8	4,3	2,1	0,7	2,0	2,1	3,4	-	ND-4,3
SF 4	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-	ND-0,7
15:0 3OH	-	1,2	-	2,0	2,5	3,3	-	2,2	-	ND-3,3
17:1 anteiso ω 9c	3,7	-	1,6	-	-	-	-	-	2,4	ND-3,7
17:1 ω 8c	0,6	-	-	0,7	0,7	0,6	0,9	0,8	0,9	ND-0,9
17:1 ω 6c	1,4	-	-	1,6	0,9	2,4	2,0	1,4	-	ND-2,4
16:0 iso 3OH	7,9	4,4	8,1	14,5	11,8	10,0	6,4	5,0	15,7	4,4-15,7
16:0 3OH	0,3	0,9	-	1,4	1,1	0,7	-	0,4	-	ND-1,4
18:1 ω 9c	0,9	0,8	1,3	1,1	1,8	1,1	1,4	0,7	1,2	0,7-1,8
18:0	-	-	-	-	1,3	-	-	-	-	ND-1,3
17:0 iso 3OH	12,2	11,4	11,7	5,6	10,5	8,5	10,5	14,3	8,5	5,6-14,3
17:0 2OH	5,2	-	4,9	2,0	1,5	3,1	4,6	2,7	-	ND-5,2
17:0 3OH	-	0,3	-	-	1,1	0,5	-	0,4	-	ND-1,1

La composición de ácidos grasos de cepas del género *Marinifilum* y del género *Pontibacter* se muestran en la tabla 45. En el caso de *Marinifilum*, el ácido graso mayoritario fue el 15:0 iso (41,3-42,2%), aunque también destacaron por las diferencias encontradas entre ambas especies estudiadas: el 15:1 iso F (5,4-14,2%), el 16:0 (1,0-5,6%), el 15:0 iso 3OH (11,1-15,2%) y el SF 9 (5,3-9,2%). Las cepas estudiadas del género *Pontibacter* presentaron como ácidos grasos mayoritarios el 15:1 iso (21-33,1%) y el SF 4 (17:1 iso I/anteiso B) (22,1-38,4%).

Tabla 45. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *Marinifilum flexuosus* CECT 7448^T; 2, *Marinifilum fragile* CECT 7942^T; 3, *Pontibacter* sp. CECT 7705; 4, *Pontibacter* sp. CECT 7711; 5, *Pontibacter* sp. CECT 7713, cultivados en MA 30°C 72 h. La columna de rangos hace referencia al valor mínimo y máximo detectado de cada ácido graso. ND: No Detección. SF 1 (13:0 3OH/15:1 iso H), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 4 (17:1 iso I/anteiso B), SF 9 (17:1 iso ω9c/16:0 10-metil).

	1	2	Rango	3	4	5	Rango
10:0 iso	-	-	-	0,2	-	-	ND-0,2
12:0	2,5	0,4	0,4-2,5	0,1	-	-	ND-0,1
13:0 iso	3,8	5,5	3,8-5,5	-	-	0,5	ND-0,5
14:0 iso	-	0,2	ND-0,2	0,2	0,5	0,7	0,2-0,7
14:1 ω5c	-	-	-	0,1	-	-	ND-0,2
14:0	3,4	0,7	0,7-3,4	0,6	1,1	0,4	0,4-1,1
15:1 iso F	5,4	14,2	5,4-14,2	-	-	-	-
SF 1	1,2	3,6	1,2-3,6	2,8	1,6	2,4	1,6-2,8
15:0 iso	41,3	42,2	41,3-42,2	21,0	33,1	31,6	21,0-33,1
15:0 anteiso	1,8	0,9	0,9-1,8	1,1	0,8	1,3	0,8-1,3
15:1 ω6c	-	-	-	2,1	0,6	1,0	0,6-2,1
16:1 iso H	-	-	-	3,2	2,7	3,5	2,7-3,5
16:0 iso	-	-	-	2,2	3,9	3,9	2,2-3,9
SF 3	-	0,4	ND-0,4	1,9	0,7	2,0	0,7-2,0
16:1 ω5c	-	-	-	2,8	0,6	1,8	0,6-2,8
16:0	5,6	1,0	1,0-5,6	0,9	2,7	0,7	0,7-2,7
15:0 iso 3OH	15,2	11,1	11,1-15,2	2,0	3,2	3,4	2,0-3,4
SF 9	5,3	9,2	5,3-9,2	0,4	0,3	-	ND-0,4
SF 4	-	1,4	ND-1,4	38,4	26,6	22,1	22,1-38,4
17:0 iso	-	-	-	1,5	2,1	2,4	1,5-2,4
17:0 anteiso	-	-	-	0,9	0,5	1,4	0,5-1,4
17:1 ω6c	-	-	-	4,1	2,4	2,7	2,4-4,1
17:0	-	-	-	0,3	0,3	0,5	0,3-0,5
16:0 iso 3OH	-	-	-	0,6	0,9	1,1	0,6-1,1
18:1 iso H	-	-	-	0,4	0,3	0,4	0,3-0,4
16:0 3OH	-	0,2	ND-0,2	0,2	-	0,3	ND-0,3
18:1 ω9c	2,5	-	ND-2,5	2,4	1,5	2,0	1,5-2,4
18:1 ω5c	2,1	3,6	2,1-3,6	-	-	-	-
18:0	3,5	1,6	1,6-3,5	0,4	0,9	0,3	0,3-0,9
17:0 iso 3OH	5,9	3,7	3,7-5,9	9,0	12,2	13,0	9,0-13,0
17:0 2OH	-	-	-	0,3	-	0,4	0,3-0,4
17:0 3OH	-	-	-	0,2	-	0,4	0,2-0,4
19:0 iso	-	-	-	-	0,3	-	ND-0,3

En la tabla 46 se muestra la composición de ácidos grasos de cinco especies adicionales del filo *Bacteroidetes*. Destacó como ácido graso mayoritario el 15:0 iso, y por aparecer también en cantidades elevadas el 17:0 iso 3OH, en el caso de *Cytophaga fermentans*,

Euzebyella saccharophila y *Mesonia algae*. Además, también destacaron el 15:0 anteiso en el caso de *Cytophaga fermentans* y el 15:1 iso G en el caso de *Euzebyella saccharophila*.

Tabla 46. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *Cytophaga fermentans* CECT 7602^T; 2, *Euzebyella saccharophila* CECT 7477^T; 3, *Mesonia algae* CECT 7520, cultivados en MA 28°C 48 h. SF 1 (13:0 3OH/15:1 iso H), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 4 (17:1 iso I/anteiso B), SF 9 (17:1 iso ω9c/16:0 10-metil).

	1	2	3
10:0 iso	-	0,2	-
12:0	0,4	-	0,2
13:0 iso	0,5	0,2	0,4
14:0 iso	1,6	-	0,9
14:0	0,6	0,6	0,9
15:1 iso F	1,2	-	-
15:1 iso G	-	15,5	6,7
SF 1	0,7	-	-
15:1 anteiso A	-	-	0,6
15:0 iso	34,4	34,1	23,1
15:0 anteiso	20,9	0,3	6,2
15:1 ω6c	-	2,9	3,8
14:0 iso 3OH	-	-	0,2
16:1 iso H	-	0,2	2,6
16:0 iso	0,9	0,3	2,7
SF 3	0,5	8,6	5,2
16:1 ω5c	0,3	-	-
16:0	1,7	1,2	1,8
15:0 iso 3OH	8,7	3,8	3,3
15:0 2OH	2,3	0,4	2,0
SF 9	2,7	6,5	5,7
SF 4	1,4	1,6	-
17:1 anteiso ω9c	-	-	2,6
17:1 anteiso A	-	-	0,9
17:0 iso	1,5	0,2	0,1
17:0 anteiso	0,3	-	0,2
17:1 ω8c	-	0,2	1,6
17:1 ω6c	-	0,6	3,1
16:1 2OH	-	0,3	-
16:0 iso 3OH	2,3	0,8	5,7
16:0 3OH	0,3	0,9	0,6
18:1 ω9c	0,8	0,6	0,7
18:1 ω5c	1,2	-	-
18:0	0,9	-	0,9
17:0 iso 3OH	10,4	19,9	13,7
17:0 2OH	1,3	-	2,3
17:0 3OH	-	-	0,9
19:0 iso	-	-	0,3

Para comprobar la reproducibilidad de la técnica GC FAME en las cepas estudiadas pertenecientes al filo *Bacteroidetes*, se realizaron réplicas del proceso de cultivo, extracción y análisis de los ácidos grasos de algunas de las cepas (tabla 47). Como se observa en la tabla, los perfiles obtenidos para cada cepa fueron muy similares a los perfiles de sus réplicas, siendo la máxima diferencia observada en el ácido graso SF 9 de 2,8 unidades porcentuales en *Winogradskyella thalassocola* CECT 7943^T. Esto sugiere que la técnica GC FAME también es adecuada para la autenticación de las cepas estudiadas de este filo.

Tabla 47. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *Euzebyella saccharophila* CECT 7477^T; 1', *Euzebyella saccharophila* CECT 7477^T réplica; 2, *Marinifilum flexuosus* CECT 7448^T; 2' *Marinifilum flexuosus* CECT 7448^T réplica; 3, *Winogradskyella pacifica* CECT 7948^T; 3', *Winogradskyella pacifica* CECT 7948^T réplica; 4, *Winogradskyella thalassocola* CECT 7943^T; 4', *Winogradskyella thalassocola* CECT 7943^T réplica; cultivados en MA 28°C 48 h, excepto *Marinifilum flexuosus* CECT 7448^T que se cultivó a 30°C 72 h. |ΔI| hace referencia a la variación en valor absoluto observada para cada ácido graso de una cepa con respecto a su réplica. SF 1 (13:0 3OH/15:1 iso H), SF 2 (14:0 3OH/16:1 iso I/12:0 aldehido), SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 4 (17:1 iso I/anteiso B), SF 9 (17:1 iso ω9c/16:0 10-metil).

	1	1'	ΔI	2	2'	ΔI	3	3'	ΔI	4	4'	ΔI
9:0	-	-	-	-	0,6	0,6	-	-	-	-	-	-
10:0 iso	0,2	0,2	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12:0	0,1	-	0,1	2,9	2,5	0,4	0,3	-	0,3	0,6	-	0,6
13:0 iso	0,2	0,2	0,0	3,8	3,8	0,0	-	-	-	-	-	-
14:0 iso	-	-	-	-	-	-	0,6	0,7	0,1	1,6	1,7	0,1
14:0	0,6	0,6	0,0	3,6	3,4	0,2	0,5	-	0,5	0,7	-	0,7
15:1 iso F	-	-	-	5,6	5,4	0,2	-	-	-	-	-	-
15:1 iso G	14,1	15,5	1,4	-	-	-	13,3	13,9	0,6	15,8	15,6	0,2
SF 1	-	-	-	1,3	1,2	0,1	-	-	-	-	-	-
15:1 anteiso A	-	-	-	-	-	-	3,4	3,4	0,0	1,7	1,2	0,5
15:0 iso	34,1	34,1	0,0	41,6	41,3	0,3	15,6	16,6	1,0	17,6	17,9	0,3
15:0 anteiso	0,3	0,3	0,0	1,7	1,8	0,1	8,7	8,9	0,2	4,5	4,3	0,2
15:1 ω6c	2,7	2,9	0,2	-	-	-	6,1	6,1	0,0	4,0	5,4	1,4
14:0 iso 3OH	-	-	-	-	-	-	0,4	-	0,4	0,6	-	0,6
16:1 iso H	0,4	0,2	0,2	-	-	-	2,1	2,0	0,1	4,1	4,1	0,0
SF 2	0,2	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16:0 N alcohol	0,1	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16:0 iso	0,4	0,3	0,1	-	-	-	1,0	0,9	0,1	1,6	1,4	0,2

	1	1'	ΔI	2	2'	ΔI	3	3'	ΔI	4	4'	ΔI
SF 3	9,1	8,6	0,5	-	-	-	3,1	3,1	0,0	3,8	3,3	0,5
16:1 ω5c	-	-	-	-	-	-	0,3	-	0,3	-	-	-
16:0	1,0	1,2	0,2	5,7	5,6	0,1	-	1,4	1,4	3,1	1,5	1,6
15:0 iso 3OH	3,9	3,8	0,1	15,0	15,2	0,2	10,5	10,9	0,4	11,8	11,7	0,1
15:0 2OH	0,5	0,4	0,1	-	-	-	2,0	2,0	0,0	-	-	-
SF 9	5,9	6,5	0,6	4,8	5,3	0,5	2,0	2,0	0,0	-	2,8	2,8
SF 4	1,4	1,6	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15:0 3OH	-	-	-	-	-	-	3,3	3,0	0,3	-	2,0	2,0
17:1 anteiso ω9c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,4	-	2,4
17:0 iso	0,3	0,2	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17:1 ω8c	0,2	0,2	0,0	-	-	-	0,6	-	0,6	0,9	-	0,9
17:1 ω6c	0,7	0,6	0,1	-	-	-	2,4	2,2	0,2	-	1,6	1,6
16:1 2OH	0,4	0,3	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16:0 iso 3OH	0,8	0,8	0,0	-	-	-	10,0	10,4	0,4	15,7	15,7	0,0
16:0 3OH	-	0,9	0,9	-	-	-	0,7	-	0,7	-	-	-
18:1 ω9c	0,8	0,6	0,1	2,4	2,5	0,1	1,1	-	1,1	1,2	-	1,2
18:1 ω5c	-	-	-	2,1	2,1	0,0	-	0,9	0,9	-	1,4	1,4
18:0	0,9	-	0,9	3,8	3,5	0,3	-	-	-	-	-	-
17:0 iso 3OH	21,0	19,9	1,1	5,7	5,9	0,2	8,5	8,7	0,2	8,5	8,3	0,2
17:0 2OH	-	-	-	-	-	-	3,1	3,1	0,0	-	-	-
17:0 3OH	-	-	-	-	-	-	0,5	-	0,5	-	-	-

La comparación de los distintos perfiles de ácidos grasos de las cepas del filo *Bacteroidetes* estudiadas, mostró que el único ácido graso que estaba presente en todas estas cepas fue el 14:0, encontrándose en un rango de entre 0,3 y 3,4%.

Por otro lado, las dos especies que forman el género *Marinifilum* tienen en común la presencia de los siguientes ácidos grasos: 12:0, 13:0 iso, 14:0, 15:1 iso F, SF 1, 15:0 iso, 15:0 anteiso, 16:0, 15:0 iso 3OH, SF 9, 18:1 ω5c, 18:0 y 17:0 iso 3OH (figura 67), siendo el más abundante el 15:0 iso. Además, los ácidos grasos 15:1 iso F, 6:0, 15:0 iso 3OH, SF 9 son determinantes para diferenciar entre ambas especies.

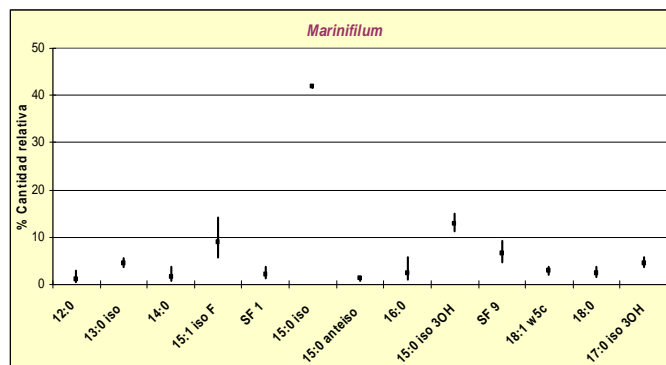


Figura 67. Gráfica que muestra los ácidos grasos más representativos del género *Marinifilum* y la variación de éstos en cuanto a la cantidad relativa observada.

Los ácidos grasos presentes en todas las cepas del género *Winogradskyella* estudiadas, fueron: 12:0, 14:0, 15:1 iso G, 15:1 anteiso A, 15:0 iso, 15:0 anteiso, 16:0 iso, SF 3, 15:0 iso 3OH, 16:0 iso 3OH, 18:1 ω9c y 17:0 iso 3OH (figura 68). El ácido graso presente en mayor cantidad en el perfil de todas las cepas estudiadas fue el 15:1 iso G (28% en *W. echinorum*), sin embargo, no en todos los casos este ácido graso fue el mayoritario, ya que algunas cepas presentaron como mayoritario el 15:0 iso o el 15:0 iso 3OH. Por otra parte, destaca la ausencia del ácido graso 16:0 en algunas de las especies estudiadas, ya que el resto de géneros estudiados del filo *Bacteroidetes* presentan este ácido graso en mayor o menor cantidad, aunque hay que tener en cuenta que el número de cepas estudiadas de este filo no fue muy elevado.

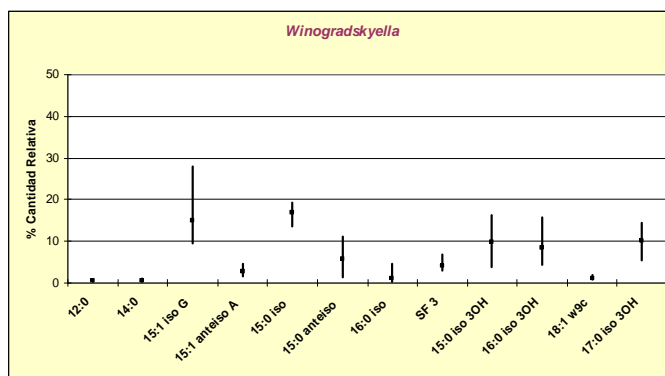


Figura 68. Gráfica que muestra los ácidos grasos más representativos de las cepas del género *Winogradskyella* estudiadas y la variación de éstos en cuanto a la cantidad relativa observada.

2.7 Análisis de cepas del género *Lactobacillus*

Se analizaron 15 cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* mediante GC FAME.

Debido a la heterogeneidad en las condiciones de cultivo dentro del género *Lactobacillus* en cuanto a la temperatura de incubación y los requerimientos o no de anaerobiosis, se obtuvieron los distintos perfiles de ácidos grasos en las condiciones óptimas de cada cepa.

En la tabla 48 se muestra el perfil de ácidos grasos de 10 especies, cultivadas en MRSA a 28°C y 48 h de incubación. Destacaron como ácidos grasos mayoritarios el 16:0 y el 18:1 ω 9c, sin embargo, la cantidad relativa que presentaron en cada una de las especies fue heterogénea, ya que para el 16:0 el rango observado varió entre 5,5 y 35%, y para el 18:1 ω 9c entre 17,1 y 86,9%. También destacaron otros ácidos grasos como el 14:0 cuya cantidad relativa varió en las distintas especies entre un 1,7 y 8,1%, el SF 3 (2,9-9,7%), el SF 8 (ND-25,3%) y el SF 7 (ND-29%).

Tabla 48. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *L. agilis* CECT 4131^T; 2, *L. buchneri* CECT 4111^T; 3, *L. casei* CECT 475^T; 4, *L. coryniformis* CECT 982^T; 5, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CECT 4005^T; 6, *L. malefermentans* CECT 5928^T; 7, *L. oris* CECT 4021^T; 8, *L. parabuchneri* CECT 5740^T; 9, *L. plantarum* CECT 748^T; y 10, *L. rhamnosus* CECT 278^T, cultivados en MRSA 28°C 48 h. La columna de rango hace referencia al valor mínimo y máximo detectado de cada ácido graso. ND: No Detectado. SF 3 (16:1 ω 7c/16:1 ω 6c), SF 7 (19:1 ω 7c/19:1 ω 6c), SF 8 (18:1 ω 6c/18:1 ω 7c).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Rango
9:0	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND-0,1
10:0 iso	-	-	0,1	-	-	-	0,2	-	-	-	ND-0,2
12:0	0,7	1,3	0,1	0,7	-	1,4	0,3	0,5	0,7	-	ND-1,4
14:1 ω5c	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	ND-0,1
14:0	6,9	3,6	2,8	6,4	1,7	8,1	3,4	3,3	4,5	2,8	1,7-8,1
15:0 iso	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	ND-0,1
15:0 anteiso	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	ND-0,1
SF 3	3,1	3,3	4,1	9,7	3,0	2,9	4,7	4,3	4,1	5,3	2,9-9,7
16:1 ω5c	-	-	0,3	0,7	-	-	0,3	0,2	-	-	ND-0,7
16:0	29,7	35,0	15,7	19,5	5,5	33,1	14,6	34,5	30,8	18,6	5,5-35,0
17:1 iso ω5c	-	-	0,3	-	-	-	0,4	0,2	-	0,6	ND-0,6
17:1 ω8c	-	-	0,2	-	-	-	0,2	0,2	-	-	ND-0,2
18:1 ω9c	44,8	46,1	43,2	18,8	86,9	17,1	49,4	32,0	30,7	33,1	17,1-86,9
SF 8	6,6	5,2	12,2	18,2	-	2,6	7,3	8,4	16,7	25,3	ND-25,3
18:0	2,1	1,0	1,2	3,6	1,3	4,9	1,9	2,5	4,0	2,9	1,0-4,9
17:0 2OH	1,9	0,9	1,2	1,1	-	1,0	1,6	0,8	1,1	1,0	ND-1,9
19:1 iso I	-	-	0,7	-	-	-	0,6	0,2	-	-	ND-0,7
19:0 iso	1,9	0,9	1,0	1,1	1,6	-	1,5	0,9	1,3	1,3	0,9-1,9
SF 7	1,3	2,7	16,5	20,0	-	29,0	13,0	11,4	6,2	8,5	ND-29,0
20:2 ω6,9c	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	ND-0,1
20:1 ω9c	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	0,7	ND-0,7
20:0	-	-	-	-	-	-	0,5	0,3	-	-	ND-0,5

La composición de ácidos grasos de 5 especies del género *Lactobacillus* cultivadas en distintas condiciones se muestra en la tabla 49. A pesar de las diferentes condiciones del cultivo empleadas, siguen predominando como ácidos grasos mayoritarios el 16:0 (10,8-33,6%) y el 18:1 ω9c (35,1-68%). Destacan también los ácidos grasos: SF 8 (0-13,7%) y SF 7 (0,3-17,3%), por su capacidad para discriminar entre especies.

Tabla 49. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *L. acidophilus* CECT 903^T; 2, *L. paracasei* CECT 4022^T, cultivados en MRSA 28°C 5 días; 3, *L. collinoides* CECT 922^T, cultivado en MRSA 28°C 72 h en anaerobiosis; 4, *L. hilgardii* CECT 4786^T, cultivado en MRSA 28°C 72 h; 5, *L. gasseri* CECT 4479^T, cultivado en MRSA 28°C 48 h en anaerobiosis. La columna de rango hace referencia al valor mínimo y máximo detectado de cada ácido graso. ND: No Detectado. SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 7 (19:1 ω7c/19:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c).

	1	2	3	4	5	Rango
12:0	0,8	0,8	0,7	0,3	1,3	0,3-0,8
14:1 ω5c	0,3	-	0,3	-	0,3	ND-0,3
14:0	4,7	2,1	4,4	1,9	2,6	1,9-4,7
15:0 anteiso	0,3	-	-	-	-	ND-0,3
SF 3	1,0	1,7	4,5	2,4	2,0	1,0-4,5
16:1 ω5c	-	-	0,2	-	-	ND-0,2
16:0	10,8	18,7	20,4	33,6	18,9	10,8-33,6
17:1 ω8c	-	-	0,3	-	0,4	ND-0,4
18:1 ω9c	66,5	63,6	35,1	36,4	68,0	35,1-68,0
SF 8	-	-	4,6	13,7	-	ND-13,7
18:0	2,5	2,3	3,3	2,4	2,1	2,1-3,3
18:1 ω7c 11-metil	-	-	-	0,3	-	ND-0,3
17:0 2OH	1,1	2,1	1,4	0,4	1,6	0,4-2,1
19:1 iso I	0,6	-	0,3	-	-	ND-0,6
19:0 iso	1,5	2,9	2,1	0,8	1,8	0,8-2,9
SF 7	8,8	4,5	17,3	7,4	0,3	0,3-17,3
18:0 3OH	-	-	-	-	0,6	ND-0,6
20:2 ω6,9c	-	-	0,2	0,4	-	ND-0,4
20:1 ω7c	-	-	0,5	-	-	ND-0,5
20:0	1,1	1,2	-	-	-	ND-1,2

Se realizaron réplicas de las extracciones de ácidos grasos de algunas de las cepas de *Lactobacillus*, utilizando las mismas condiciones de cultivo (tabla 47). Como se muestra en la tabla, la mayor diferencia encontrada fue de 2,6 unidades porcentuales en el ácido graso 16:0 de *L. agilis* CECT 4131^T, con respecto a su réplica. Por lo que se demuestra, una vez más, la reproducibilidad de la técnica GC FAME.

Tabla 47. Composición de ácidos grasos celulares de 1, *L. agilis* CECT 4131^T; 1', *L. agilis* CECT 4131^T réplica; 2, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CECT 4005^T; 2' *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CECT 4005^T réplica, cultivados en MRSA 28°C 48h. |Δ| hace referencia a la variación en valor absoluto observada para cada ácido graso de una cepa con respecto a su réplica. SF 3 (16:1 ω7c/16:1 ω6c), SF 7 (19:1ω7c/19:1 ω6c), SF 8 (18:1 ω6c/18:1 ω7c).

	1	1'	Δ	2	2'	Δ
9:0	-	1,0	1,0	-	-	-
12:0	0,9	0,7	0,2	0,6	-	0,6
14:0	6,1	6,9	0,8	1,9	1,7	0,2
SF 3	3,3	3,1	0,2	1,3	3,0	1,7
16:0	27,1	29,7	2,6	8,0	5,5	2,5
17:0	-	1,0	1,0	-	-	-
18:1 ω9c	47,5	44,8	2,7	84,8	86,9	2,1
SF 8	7,3	6,6	0,7	-	-	-
18:0	1,6	2,1	0,5	1,6	1,3	0,3
17:0 2OH	2,0	1,9	0,1	0,6	-	0,6
19:0 iso	1,8	1,9	0,1	1,2	1,6	0,4
SF 7	2,5	1,3	1,2	-	-	-

Como muestra la figura 69, los ácidos grasos más representativos de las cepas de *Lactobacillus* estudiados fueron: 14:0, SF 3, 16:0, 18:1 ω9c y 18:0, además destaca la amplia variabilidad en cuanto a la cantidad que presenta el ácido graso 18:1 ω9c (12,2-86,9%). A la hora de diferenciar entre especies resultaron relevantes por estar presentes en algunas especies en cantidades considerables y no detectarse en otras, los ácidos grasos SF 8 y SF 7.

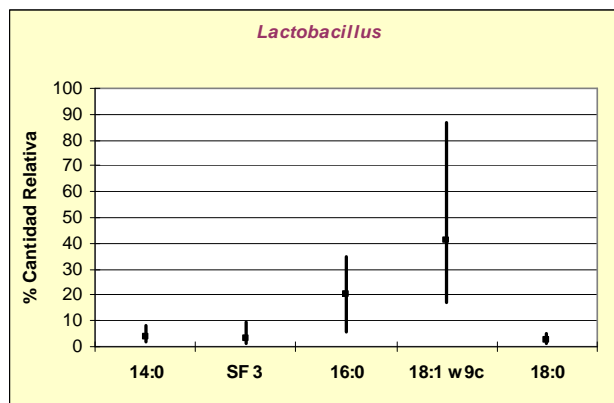


Figura 69. Gráfica que muestra los ácidos grasos más representativos de las cepas estudiadas del género *Lactobacillus* y la variación de éstos en cuanto a la cantidad relativa observada.

3. BALANCE PRÁCTICO

La elección de una técnica para ser utilizada como herramienta rutinaria de autenticación conlleva una serie de consideraciones, de diversa índole.

En esta parte de la tesis doctoral se analizan las ventajas e inconvenientes del uso de cuatro técnicas de autenticación comúnmente utilizadas para cepas procariotas en Colecciones de Cultivos microbianas: MALDI-TOF, GC FAME, Sistemas miniaturizados (API) y Secuenciación parcial del gen 16S rRNA.

Para el cálculo del coste económico que supone cada técnica (tabla 48) se tuvo en cuenta el gasto de material generado para la realización del protocolo (productos químicos, kits comerciales, placas de cultivo, geles de agarosa, pipetas, puntas, tubos, etc.), el gasto generado por la adquisición de determinados aparatos y *softwares* (cromatógrafo, termociclador, centrifuga, baño, biotyper 1.1, etc.), el gasto que conlleva la solicitud de un servicio externo (SCSIE) en el caso del 16S rRNA (secuenciación) y MALDI-TOF (análisis con espectrómetro de masas), y el coste generado por la contratación de un técnico cualificado que realice los protocolos y análisis de datos, calculado en función de las horas necesarias para la realización del protocolo y análisis del resultado, teniendo en cuenta el número de muestras que se realizan a la vez.

COSTE	MALDI-TOF	GC FAME	API 20E	16S rRNA
Material	0,44 €	2,23 €	7,55 €	8,10 €
Amortización de equipos	1,33 €	2,90 €	-	0,69 €
Servicios externos	18,00 €	-	-	8,00 €
Personal	4,28 €	8,56 €	11,41 €	14,27 €
TOTAL	24,04 €	13,69 €	18,96 €	31,06 €

Tabla 48. Estimación económica del gasto que supone el uso de técnicas de autenticación: MALDI-TOF, GC FAME, Sistema miniaturizado API 20E y Secuenciación del gen 16S rRNA.

Como se observa en la figura 48, la técnica de menor coste sería GC FAME, seguida de API 20E, MALDI-TOF, y análisis de secuencias parciales del gen 16S rRNA. Sin embargo, se ha puesto como ejemplo de sistema miniaturizado el API 20E cuyas galerías conllevan un coste de 7 €/galería, mientras que otros sistemas miniaturizados como las galerías API 50CH tienen un coste de 24 €/galería, por lo que el coste total de la técnica, teniendo en cuenta el gasto de material y personal, sería de 36 €. E incluso si se quiere obtener un perfil API 50CHE (para enterobacterias) es necesario gastar además una galería API 20E para completar los resultados, lo que elevaría el coste a unos 55 €.

Además, del coste económico existen otros parámetros a tener en cuenta como son: la facilidad del procesado de la muestra y de interpretación de los resultados, el poder de resolución, la reproducibilidad inter- e intralaboratorio, el tiempo requerido hasta la obtención del resultado, y la cobertura y accesibilidad de la base de datos. En la tabla 49, se muestra una comparación de estos parámetros entre MALDI-TOF, GC FAME, Sistemas miniaturizados (API) y secuenciación parcial del gen 16S rRNA.

	MALDI-TOF	GC FAME	Sistemas API	16S rRNA
Procesado de muestras	Moderado	Moderado	Fácil	Difícil
Análisis e Interpretación de datos	Difícil	Moderado	Fácil	Difícil
Poder de resolución	Alto	Moderado	Moderado	Muy alto
Reproducibilidad intralaboratorio	Alta	Alta	Moderada	Muy alta
Reproducibilidad interlaboratorio	Alta	Alta	Moderada	Muy alta
Tiempo empleado (días)	2	1	2	6
Cobertura de la base de datos	Limitada	Limitada	Limitada	Universal
Accesibilidad a la base de datos	Licencia	Licencia	Licencia	Pública

Tabla 49. Características de las técnicas de autenticación: MALDI-TOF, GC FAME, Sistema miniaturizado API 20E y Secuenciación del gen 16S rRNA.

En cuanto al procesado de las muestras en el laboratorio, los sistemas miniaturizados API se consideran una técnica de fácil manejo, aunque para una correcta identificación es necesario seguir

las indicaciones del fabricante, sobre todo en cuanto a la turbidez del cultivo adecuada antes de inocular la galería. En el caso de MALDI-TOF su facilidad de manejo es moderada, ya que aunque el protocolo de extracción proteica a realizar es corto y sencillo, siendo posible prescindir de la extracción proteica (depositando directamente sobre la placa 1 colonia bacteriana y sobre ella 2 μ l de matriz), el proceso hasta la adquisición de espectros requiere de personal que tenga conocimientos en el manejo de un espectrómetro de masas. Del mismo modo, para GC FAME también es necesario un técnico capacitado para utilizar el cromatógrafo de gases, y además se requiere mayor destreza en cuanto al procesado de muestras, ya que una incorrecta manipulación del extracto en el momento de la separación entre fase acuosa, fase orgánica e interfase puede generar el arrastre de agentes residuales que dañen el sistema cromatográfico, provocando una disminución e incluso pérdida de los ácidos metil éster hidroxilados. Por último, la secuenciación del gen 16S rRNA se puede considerar una técnica difícil, ya que requiere conocimientos previos en Biología Molecular por parte del personal técnico, para realizar con éxito los procesos de extracción de DNA, PCR y limpieza del amplificado, así como los controles de calidad necesarios en cada paso (electroforesis, determinación de la pureza A_{260}/A_{280} , etc.) y para secuenciar las muestras.

El análisis e interpretación de datos se considera fácil en el caso de los sistemas miniaturizados API, ya que siguiendo las instrucciones del fabricante se suele llegar a una clave numérica abreviada que se introduce de forma sencilla en una base de datos. De modo que, se genera un resultado de identificación, con fiabilidad de la misma y recomendando pruebas adicionales si la identificación no es concluyente. Sin embargo, en el caso de GC FAME para el análisis de datos es necesario tener conocimientos básicos en cuanto a la interpretación de los perfiles generados, y saber manejar el programa correspondiente (*Sherlock 6.1 Microbial Identification System*, en nuestro caso) para el análisis del cromatograma, generación de librerías, dendrogramas, etc. El análisis de datos MALDI-TOF se

considera difícil, ya que es necesario manejar programas informáticos poco intuitivos como el Biotyper 1.1, para generar librerías, interpretar dendrogramas o parámetros como el *log score*. Por último, la secuenciación parcial del gen 16S rRNA requiere conocimientos previos en la interpretación de los cromatogramas generados, en el manejo de programas que permitan analizar la secuencia de nucleótidos (chromas, etc.) y en el manejo de bases de datos donde comparar las secuencias generadas, por lo que se considera una técnica difícil, al menos si se quiere llevar a cabo con rigor.

A grandes rasgos, el poder de resolución de la técnica es equivalente entre MALDI-TOF y la secuenciación del gen 16S rRNA, considerándose alta o muy alta a excepción de su uso en determinados grupos microbianos, donde es posible que la técnica no sea capaz de diferenciar entre un grupo determinado de especies pertenecientes al mismo género. El poder de resolución de GC FAME y Sistemas API es menor a las anteriores, considerándose moderado, ya que son técnicas fenotípicas.

En cuanto a la reproducibilidad, MALDI-TOF, GC FAME y la secuenciación son altamente reproducibles inter- e intralaboratorio. Sin embargo, en nuestra experiencia los sistemas miniaturizados pueden variar en determinadas pruebas bioquímicas, aunque sin que ello conlleve en muchos casos una identificación errónea.

Una vez el cultivo microbiano haya crecido, la técnica que permite obtener resultados antes es GC FAME, ya que el tiempo necesario para la realización del protocolo más el tiempo requerido para procesar las muestras en el cromatógrafo no suele superar las 3 horas (si se procesan un total de 8-10 muestras). En el sistema miniaturizado API 20E, generalmente se realiza una lectura del resultado a las 24 horas y otra a las 48 horas, sin embargo otras galerías requieren menos horas de incubación. El protocolo de extracción proteica en MALDI-TOF no suele llevar más de 30 minutos, sin embargo la adquisición de espectros en la CECT es llevado a cabo por el SCSIE, lo que supone 24-48 horas hasta obtener los resultados. Asimismo, en la secuenciación del gen 16s rRNA, la

extracción de DNA, PCR y limpieza del amplificado puede realizarse en unas 7-8 horas de trabajo, pero la secuenciación en la CECT es llevada a cabo por el SCSIE por lo que los resultados no suelen tenerse antes de 4-6 días.

Otro aspecto a valorar en el proceso de selección de una técnica u otra es la cobertura que ofrece su base de datos y la accesibilidad a la misma. La secuenciación del gen 16S rRNA, es la única técnica de las estudiadas que puede considerarse universal, ya que su base de datos engloba a microorganismos que cubren prácticamente toda la diversidad conocida, además su accesibilidad es pública. Sin embargo, las bases de datos de MALDI-TOF, GC FAME y Sistemas miniaturizados API están limitadas a lo ofertado por el fabricante, que suele incluir microorganismos de interés clínico o alimentario, y suelen requerir una licencia, es decir, su uso conlleva un coste económico. Las bases de datos de MALDI-TOF (~100.000 €) son considerablemente más caras que las de GC FAME (~10.000 €), y éstas a su vez lo son bastante más que las de los sistemas API (~300 €). Si bien, estas tres últimas técnicas pueden ser utilizadas para autenticar microorganismos no disponibles en las bases de datos comerciales, siempre y cuando el usuario genere sus propias librerías.

Por tanto, cualquiera de las dos técnicas estudiadas en esta tesis doctoral, MALDI-TOF y GC FAME, podría ser utilizada para autenticar cepas. Sin embargo, ninguna de ellas puede reemplazar a la secuenciación del gen 16S rRNA, y es conveniente que esté presente al menos en la primera autenticación que se realiza a las cepas que van a constituir un nuevo taxón para corroborar que el material depositado coincide con el material original, para lo cual se necesita que entre la información de la cepa cedida por el depositante esté una secuencia parcial del gen 16S rRNA. Aún así, puede ser muy conveniente autenticar mediante MALDI-TOF y GC FAME en autenticaciones sucesivas, es decir, cuando se prepara nuevo lote, especialmente cuando la cepa a estudiar está incluida en las bases de datos de MALDI-TOF y/o GC FAME, ya que mediante estas dos técnicas se obtiene un resultado en menor tiempo y suponen un menor

coste económico, especialmente GC FAME. También pueden utilizarse como resultado preliminar, en circunstancias en las que no se consigue amplificar por PCR el gen 16S rRNA de una determinada cepa, cuando hay problemas con el secuenciador, etc. Ambas técnicas también sirven como técnicas de apoyo, cuando el resultado obtenido mediante 16S rRNA no es lo suficientemente determinante, como ocurre entre especies de determinados géneros.

Por último, no hay que olvidar que ambas técnicas se ofrecen como métodos de identificación y que además pueden resultar útiles en investigación para caracterizar cepas (GC FAME) o para establecer relaciones entre aislados (MALDI-TOF).

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral prueban que MALDI-TOF MS es una técnica útil para la autenticación de cepas de la CECT, por su buena reproducibilidad, resolución, facilidad de manejo y coste económico.
2. Se ha constatado, no obstante, que la resolución de MALDI-TOF MS depende del taxón. Así, las cepas estudiadas del filo *Bacteroidetes*, de la clase *Alphaproteobacteria*, de las familias *Leuconostocaceae* y *Vibrionaceae*, y de los géneros *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Pediococcus* se pudieron discriminar bien a nivel de especie con pocas excepciones. Por el contrario, la resolución fue más baja en el género *Pseudomonas* y aún menor en el género *Aeromonas*.
3. Al igual que MALDI-TOF MS, GC FAME es una herramienta útil para la autenticación de cepas de la CECT, por su buena reproducibilidad, resolución, facilidad de manejo y coste económico.
4. Se han analizado los rasgos comunes en los perfiles de ácidos grasos de los taxones estudiados. Así, la mayoría de las cepas de la clase *Gammaproteobacteria* presentaron como mayoritarios los ácidos grasos SF 3, 16:0 y SF 8; en las cepas de la familia *Rhodobacteraceae* fue SF 8; en el género *Lactobacillus* fueron 18:1 ω 9c y 16:0; y en el filo *Bacteroidetes* el 15:0 iso. Además de la proporción de los ácidos grasos mayoritarios, la diferenciación de cepas a nivel de especie mediante GC FAME depende de la presencia/ausencia de otros ácidos grasos que se encuentran en menor proporción.
5. Tanto MALDI-TOF como GC FAME, pueden ser utilizadas como técnicas de autenticación en el trabajo de rutina de la CECT integrándose con las que ya se aplican.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

Abbott SL, Cheung WK, Janda JM (2003). The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J Clin Microbiol* 41, 2348-2357.

Albesharat R, Ehrmann MA, Korakli M, Yazaji S, Vogel RF (2011). Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Syst Appl Microbiol*, 34(2),148-55.

Albuquerque L, Ferreira C, Tomaz D, Tiago I, Veríssimo A, da Costa MS, Nobre MF (2009). *Meiothermus rufus* sp. nov., a new slightly thermophilic red-pigmented species and emended description of the genus *Meiothermus*. *Syst Appl Microbiol* 32, 306-313.

Albuquerque L, Rainey FA, Nobre MF, da Costa MS (2010). *Meiothermus granaticius* sp. nov., a new slightly thermophilic red-pigmented species from the Azores. *Syst Appl Microbiol* 33, 243-246.

Albuquerque L, França L, Rainey FA, Schumann P, Nobre MF, da Costa MS (2011). *Gaiella occulta* gen. nov., sp. nov., a novel representative of a deep branching phylogenetic lineage within the class *Actinobacteria* and proposal of *Gaiellaceae* fam. nov. and *Gaiellales* ord. nov. *Syst Appl Microbiol* 34, 595-599.

Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, Oyaizu H (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* 50 Pt 4, 1563-1589.

Arahal DR, Sánchez E, Macián MC, Garay E (2008). Value of recN sequences for species identification and as a phylogenetic marker within the family “*Leuconostocaceae*”. *Int Microbiol* 11, 33-39.

Arnold RJ, Karty JA, Ellington AD, Reilly JP (1999). Monitoring the growth of a bacteria culture by MALDI-MS of whole cells. *Anal Chem* 71, 1990-1996.

Björkroth J, Holzappel W (2006). Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. En *The Prokaryotes*, 3rd ed., pp 267-319. Editado por

M Dworkin, S Falkow, E Rosenberg, KH Schleifer y E Stackebrandt. New York: Springer.

Bochner BR (2006) Biolog: Modern Phenotypic Microbial Identification, En *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*, vol. 2, Cap. 3, pp. 55-73.

Carreto L, Wait R, Nobre MF, da Costa MS (1996). Determination of the structure of a novel glycolipid from *Thermus aquaticus* 15004 and demonstration that hydroxy fatty acids are amide linked to glycolipids in *Thermus* spp. *J Bacteriol* 178, 6479-6486.

Chun J, Rivera IN, Colwell RR (2002). Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* for detection of these species. *Methods Mol Biol* 179, 171-178.

Chun J, Lee JH, Jung Y, Kim M, Kim S, Kim BK, Lim YW (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.

Cowan ST, Steel KJ (1982). Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. México: C.E.C.S.A.

Cundell AM, Chatellier S, Schumann P, Lilischkis R (2010). Equivalence of quality control strains of microorganisms used in the compendial microbiological tests: are national culture collection strains identical? *PDA J Pharm Sci Technol* 64, 137-155.

Da Costa MS, Albuquerque L, Nobre MF, Wait R (2011). The Identification of Fatty Acids in Bacteria. In *Methods in Microbiology*, Vol. 38, pp. 183-196.

Dawyndt P, Vancanneyt M, De Meyer H, Swings J (2005). Knowledge accumulation and resolution of data inconsistencies during the integration of microbial information sources, *IEEE Trans Knowledge Data Eng* 17, pp. 1111-1126.

De Bruyne K, Slabbinck B, Waegeman W, Vauterin P, De Baets B, Vandamme P (2011). Bacterial species identification from MALDI-TOF mass spectra through data analysis and machine learning. *Syst Appl Microbiol* 34, 20-29.

Decristophoris P, Fasola A, Benagli C, Tonolla M, Petrini O (2011). Identification of *Staphylococcus intermedius* Group by MALDI-TOF MS. *Syst Appl Microbiol* 34, 45-51.

De Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23, 4407-4414.

Dieckmann R, Helmuth R, Erhard M, Malorny B (2008). Rapid classification and identification of salmonellae at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 74, 7767-7778.

Diogo A, Veríssimo A, Nobre MF, da Costa MS (1999). Usefulness of fatty acid composition for differentiation of *Legionella* species. *J Clin Microbiol* 37, 2248-2254.

Dridi B, Drancourt M (2011). Characterization of Prokaryotes using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Methods in Microbiology*, 38, pp. 283-297.

Endo A, Okada S (2008). Reclassification of the genus *Leuconostoc* and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 2195-2205.

Gaia V, Casati S, Tonolla M (2011). Rapid identification of *Legionella* spp. by MALDI-TOF MS based protein mass fingerprinting. *Syst Appl Microbiol* 34, 40-44.

Garay E (2009). El caso de la CECT. *Actualidad SEM* 49, 30-31.

Garay E (2008). La Colección Española de Cultivos Tipo, servicio de la Universidad de València. *Profesión Veterinaria*, Vol. 16, Nº 69, 74-79.

Garay E (2010). El depósito de cepas en las colecciones de cultivos microbianos. *Actualidad SEM*.

Hammes WP, Hertel C (2006). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. En *The Prokaryotes*, 3^o ed., pp 320-403. Editado por M Dworkin, S Falkow, E Rosenberg, KH Schleifer y E Stackebrandt. New York: Springer.

Hammes WP, Franz CMAP, Ludwig W, Back W, Dicks LMT (2006). The genera *Pediococcus* and *Tetragenococcus*. In *The Prokaryotes*, 3rd ed., pp 229-266. Edited by M Dworkin, S Falkow, E Rosenberg, KH Schleifer and E Stackebrandt. New York: Springer.

He Y, Li H, Lu X, Stratton CW, Tang YW (2010). Mass spectrometry biotyper system identifies enteric bacterial pathogens directly from colonies grown on selective stool culture media. *J Clin Microbiol* 48, 3888-3892.

Hinse D, Vollmer T, Erhard M, Welker M, Moore ER, Kleesiek K, Dreier J (2011). Differentiation of species of the *Streptococcus bovis/equinus*-complex by MALDI-TOF Mass Spectrometry in comparison to *sodA* sequence analyses. *Syst Appl Microbiol* 34, 52-57.

Hwang CY, Zhang GI, Kang SH, Kim HJ, Cho BC (2009). *Pseudomonas pelagia* sp. nov., isolated from a culture of the Antarctic green alga *Pyramimonas gelidicola*. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 3019–3024.

Janssens D, Arahall DR, Bizet C, Garay E (2010). The role of public biological resource centers in providing a basic infrastructure for microbial research. *Res Microbiol* 161, 422-429.

Jarman KH, Daly DS, Petersen CE, Saenz AJ, Valentine NB, Wahl KL (1999). Extracting and visualizing matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectral fingerprints. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13, 1586-1594.

Jarman KH, Cebula ST, Saenz A , Petersen CE, Valentine NB, Kingsley, M. T. & Wahl, K. L. (2000). An algorithm for automated bacterial identification using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 72, 1217-1223.

Kawai Y, Yabuuchi E (1975). *Pseudomonas pertucinogena* sp. nov., an organism previously misidentified as *Bordetella pertussis*. *Int J Syst Bacteriol* 25, 317–323.

Kim KH, Roh SW, Chang HW, Nam YD, Yoon JH, Jeon CO, Oh HM, Bae JW (2009). *Pseudomonas sabulinigri* sp. nov., isolated from black beach sand. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 38–41.

Krieg NR (2005). Identification of Prokaryotes. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, segunda edición, vol. 2 (The *Proteobacteria*), parte A (Introductory Essays), pp 33-37. Editado por DJ Brenner, NR Krieg, JT Staley y GM Garrity. New York: Springer.

Labeda DP (2002). International Committee on Systematic Bacteriology. IXth International (IUMS) Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. Minutes of the meeting, 14 and 17 August 1999, Sydney, Australia. *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 2245-2247.

Labeda DP (2005). Culture Collections: An Essential Resource for Microbiology. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, segunda edición, vol. 2 (The *Proteobacteria*), parte A (Introductory Essays), pp 33-37. Editado por DJ Brenner, NR Krieg, JT Staley and GM Garrity. New York: Springer.

Lai Q, Shao Z (2008). *Pseudomonas xiamenensis* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 58, 1911–1915.

Lapage SP, Sneath PHA, Lessel EF, Skerman VBD, Seeliger HPR, Clark WA (1992). International Code of Nomenclature of Bacteria (1990 Revision). American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Liu M, Luo X, Zhang L, Dai J, Wang Y, Tang Y, Li J, Sun T, Fang C (2009). *Pseudomonas xinjiangensis* sp. nov., a moderately thermotolerant bacterium isolated from desert sand. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 1286–1289.

Lucena T, Ruvira MA, Arahal DR, Macián MC, Pujalte MJ (2012). *Vibrio aestivus* sp. nov. and *Vibrio quintilis* sp. nov., related to *Marisflavi* and *Gazogenes* clades, respectively. *Syst Appl Microbiol*. 35(7),427-31.

Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB (2005). Order II "Lactobacillales". En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, segunda edición, vol. 3 (The Firmicutes), pp 464-532. Editado por DJ Brenner, NR Krieg, JT Staley and GM Garrity. New York: Springer.

Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP (2009). Sistemática Microbiana. En: *Brock. Biología de los microorganismos*. 12 ed., pp. 425-429.

Maier T, Klepel S, Renner U, and Kostrzewa M (2006). Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification, *Nat Methods* 22 (2006).

Maier T, Kostrzewa M (2007). Fast and reliable MALDI-TOF MS based microorganism identification. *Chem Today* 25, 68-71

Martin-Carnahan A, Joseph SW (2005). Family I. *Aeromonadaceae*. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, segunda edición, vol. 2 parte B Gammaproteobacteria, pp 556-577. Edited by DJ Brenner, NR Krieg, JT Staley and GM Garrity. New York: Springer.

Mellmann A, Cloud J, Maier T (2008). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J Clin Microbiol* 46, 1946-1954.

MIDI (2004). MIS Whole cell fatty acid analysis by gas chromatography. Training Manual. Editado por R. Paisley. Newark, MIDI Inc.

MIDI (2008). Sherlock Microbial Identification System Operating Manual, versión 6.1. Newark, MIDI Inc.

Miller L, Berger T (1985). Bacterial Identification by Gas Chromatography of Whole Cell Fatty Acids. Gas Chromatography. Application Note 228-41.

Moore ERB, Mau M, Arnscheidt A, Böttger EC, Hutson RA, Collins MD, Van de Peer Y, De Wachter R, Timmis KN (1996). The determination and comparison of the 16S rRNA gene sequences

of species of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) and estimation of the natural intrageneric relationship. *Syst Appl Microbiol* 19, 478–492.

Mukwaya G M, Welch DF (1989). Subgrouping of *Pseudomonas cepacia* by cellular fatty acid composition. *J Clin Microbiol* 27, 2640-2646.

Mulet M, Lalucat J, García-Valdés E (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ Microbiol* 12, 1513–1530.

Murray PR (2010). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 16, 1626-1630.

Nobre MF, Carreto L, Wait R, Tenreiro S, Fernandes O, Sharp, RJ, Da Costa MS (1996). Fatty Composition of the Species of the Genera *Thermus* Acid *Meiothermus*. *Syst Appl Microbiol* 19, 303-311.

OCDE (2001). Biological Resource Centers Underpinning the Future of Life Sciences and Biotechnology. OCDE, Paris.
<http://www.oecd.org/dataoecd/55/48/2487422.pdf>
http://www.wfcc.info/pdf/OECD_Centres.pdf

OCDE (2007). OCDE Best Practices Guidelines for Biological Resource Centers. OCDE, Paris.
<http://www.oecd.org/dataoecd/6/27/38778261.pdf>
http://www.wfcc.info/pdf/OECD_guidelines.pdf

Olive DM, Bean P (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 37, 1661-1669.

Peltroche-Llacsahuanga H, Schmidt S, Lütticken R, Haase G (2000). Discriminative power of fatty acid methyl ester (FAME) analysis using the microbial identification system (MIS) for *Candida (Torulopsis) glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 38, 213-221.

Pineda FJ, Lin JS, Fenselau C, Dimerov PA (2000). Testing the significance of microorganism identification by mass spectrometry and proteome database search. *Anal Chem* 72, 3739-3744.

Quezada M, Buitrón G, Moreno-Andrade I, Moreno G, López-Marín LM (2007). The use of fatty acid methyl esters as biomarkers to determine aerobic, facultatively aerobic and anaerobic communities in wastewater treatment systems. *FEMS Microbiol Lett* 266, 75-82.

Roger F, Marchandin H, Jumas-Bilak E, Kodjo A, Lamy B (2012). Multilocus genetics to reconstruct aeromonad evolution. *BMC Microbiol* 12, 62.

Romanenko LA, Uchino M, Falsen E, Frolova GM, Zhukova NV., Mikhailov VV (2005). *Pseudomonas pachastrellae* sp. nov., isolated from a marine sponge. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 919–924.

Russell NJ, Nichols DS (1999). Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria--a dogma rewritten. *Microbiol.* 145, 767-779.

Ryzhov V, Fenselau C (2001). Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. *Anal Chem* 73, 746-750.

Sasser M (1990). Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids, MIDI Technical Note 101. Newark: DE: MIDI Inc.

Sawabe T, Kita-Tsukamoto K, Thompson FL (2007). Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis. *J Bacteriol* 189, 7932-7936.

Schleifer KH, Björkroth J, Dicks LMT, Holzappel WT (2005). Family *V. Leuconostocaceae*. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, segunda edición, vol. 3 Firmicutes, pp 624-654. Editado por DJ Brenner, NR Krieg, JT Staley y GM Garrity. New York: Springer.

Schleifer KH (2009). Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. *Syst Appl Microbiol* 32, 533-542.

Sedo O, Voráč A, Zdráhal Z (2011). Optimization of mass spectral features in MALDI-TOF MS profiling of *Acinetobacter* species. *Syst Appl Microbiol* 34, 30-34.

Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 49, 543-551.

Shah HN, Rajakaruna L, Ball G, Misra R, Al-Shahib A, Fang M, Gharbia SE (2011). Tracing the transition of methicillin resistance in sub-populations of *Staphylococcus aureus*, using SELDI-TOF Mass Spectrometry and Artificial Neural Network Analysis. *Syst Appl Microbiol* 34, 81-86.

Sharpe ME, Latham MJ, Garvie EI, Zirngibl J, Kandler O (1973). Two new species of *Lactobacillus* isolated from the bovine rumen, *Lactobacillus ruminis* sp. nov. and *Lactobacillus vitulinus* sp. nov. *J Gen Microbiol* 77, 37-49.

Slabbinck B, De Baets B, Dawyndt P, De Vos P (2009). Towards large-scale FAME-based bacterial species identification using machine learning techniques. *Syst Appl Microbiol* 32, 163-176.

Slabbinck B, Waegeman W, Dawyndt P, De Vos P, De Baets B (2010). From learning taxonomies to phylogenetic learning: integration of 16S rRNA gene data into FAME-based bacterial classification. *BMC Bioinformatics* 11, 69.

Smibert RM, Krieg NR (1994). Systematics. Phenotype characterization. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*, pp 625. Edited by P Gerhardt, RGE Murray, WA Wood, NR Krieg.

Smith D (2003). Culture collections over the world. *Int Microbiol* 6, 95-100.

Smith D (2011). Culture collections operation and management. En *The UK National Culture Collection (UKNCC). Biological Resource: Properties, Maintenance and Management*, pp 12-21., Edited by Smith D, Ryan MJ, Day JG.

Smith D, Fritze D, Stackebrandt E (2012). Public Service Collections and Biological Resource Centres of Microorganisms. In *The Prokaryotes*, 4th ed., (In press).

Stackebrandt E, Goebel BM (1994). Taxonomic Note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 44, 846-849.

Stackebrandt E, Ebers J (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today* 33, 152-155.

Stackebrandt E (2010). Diversification and focusing: strategies of microbial culture collections. *Trends Microbiol* 18, 283-287.

Suh MJ, Hamburg D M, Gregory ST, Dahlberg AE, Limbach PA (2005). Extending ribosomal protein identifications to unsequenced bacterial strains using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proteomics* 5, 4818-4831.

Tindall BJ, Rosselló-Móra R, Busse HJ, Ludwig W Kämpfer P (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 249-266.

Trüper HG, Schleifer KH (2006). Prokaryote Characterization and Identification. En *The Prokaryotes*, 3^o ed., pp 58-79. Editado por M Dworkin, S Falkow, E Rosenberg, KH Schleifer y E Stackebrandt. New York: Springer.

Urakawa H, Kita-Tsukamoto K, Ohwada K (1997). 16S rDNA genotyping using PCR/RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis among the family *Vibrionaceae*. *FEMS Microbiol Lett* 152, 125-132.

Uruburu F (2003). History and services of culture collections. *Int Microbiol* 6, 101-103.

Vasileuskaya-Schulz Z, Kaiser S, Maier T, Kostrzewa M, Jonas D (2011). Delineation of *Stenotrophomonas* spp. by multi-locus sequence analysis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Syst Appl Microbiol* 34, 35-39.

Verslyppe B, De Smet W, De Baets B, De Vos P, Dawyndt P (2011). Make Histri: Reconstructing the exchange history of bacterial and archaeal type strains, *Syst Appl Microbiol* 34, 328-336.

Vila J, Marcos MA, Jimenez de Anta MT (1996). A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex. *J Med Microbiol* 44, 482-489.

Welker M, Moore ER (2011). Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Syst Appl Microbiol* 34, 2-11.

Wittwer M, Heim J, Schär M, Dewarrat G, Schürch N (2011). Tapping the potential of intact cell mass spectrometry with a combined data analytical approach applied to *Yersinia* spp.: detection, differentiation and identification of *Y. pestis*. *Syst Appl Microbiol* 34, 12-19.

Wunschel SC, Jarman KH, Petersen CE, Valentine NB, Wahl K L, Schauki D, Jackman J, Nelson CP, White E (2005). Bacterial analysis by MALDI-TOF mass spectrometry: an inter-laboratory comparison. *J Am Soc Mass Spectrom* 16, 456-462.

Yano Y, Nakayama A, Yoshida K (1997). Distribution of polyunsaturated Fatty acids in bacteria present in intestines of deep-sea fish and shallow-sea poikilothermic animals. *Appl Environ Microbiol* 63, 2572-2577.

Zhang Z, Schwartz S, Wagner L & Miller W (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7(1-2), 203-214.

Anexo

ANEXO**MEDIOS DE CULTIVO****Medios Líquidos****Caldo Manitol**

Extracto de levadura	5 g
Peptona	3 g
Manitol	25 g
Agua destilada	1 L

Esterilizar a 121°C, 20 min

Caldo marino (MB)

Marine broth (Difco 2216)	37,4 g
Agua destilada	1 L

Esterilizar a 121°C, 20 min.

Caldo nutritivo I (NB)

Extracto de carne	5 g
Peptona	10 g
NaCl	5 g
Agua destilada	1 L

Ajustar el pH a 7,2

Esterilizar a 121°C, 20 min.

Caldo nutritivo II (NB*)

Extracto de carne	1 g
Extracto de levadura	2 g
Peptona	5 g
NaCl	5 g
Agua destilada	1 L

Ajusta el pH a 7,2

Esterilizar a 121°C, 20 min

BHI

Infusión de cerebro de	12,5 g
Infusión de corazón de	5 g
Peptona Proteasa	10 g
Glucosa	2 g
HNa ₂ PO ₄	2,5 g
NaCl	5 g
Agua destilada	1 L

Esterilizar a 121°C, 20 min.

Medio de *Lactobacillus homohiochii*

Agua destilada	1 L
Extracto de carne	2 g
Extracto de levadura	5 g
Glucosa	20 g
Acetato de sodio	20 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg
MnSO ₄ ·H ₂ O	7,5 mg
KH ₂ PO ₄	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Tween 80	1 ml

Ajustar el pH a 5,2.

Repartir en tubos 9,5 ml.

Esterilizar a 121°C, 20 min.

Añadir asepticamente 0,4 ml de etanol y 0,1 ml de ácido DL-mevalónico 3 mg/ml

Medio de *Leuconostoc oeni* (MLO)

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Glucosa	10 g
Fructosa	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,05g
Citrato diamónico	3,5 g
Zumo de tomate filtrado	100 ml
Tween 80	1 ml
Agua destilada	1 L

Ajustar el pH a 4,8.

Esterilizar a 121°C, 20 min.

Medio MH 7,5

Glucosa	1 g
Proteosa-peptona	5 g
Extracto de levadura	10 g
Solución salina Subov's	250 ml
Agua destilada	1 L

Solución Salina Subov's

NaCl	234 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	42g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	60 g
KCl	1,1 g
HNaCO ₃	6 g
NaBr	2 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O (solución al 5%)	9 gotas
Agua destilada	1 L

Esterilizar a 121°C, 20 min.

Medio TSBY sal

Caldo soja tripticasa	30 g
Extracto de levadura	3 g
NaCl	13 g
KCl	0,34 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	4 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,45 g
NH ₄ Cl	0,25 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,14 g
Agua destilada	1 L

Ajustar el pH a 7,2.

Esterilizar a 121°C, 20 min.

MRS

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,05 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Agua destilada	1 L
Citrato amónico	2 g
Acetato de sodio	5 g

Esterilizar a 121°C, 20 min.

TSB

Triptona	17 g
Peptona de soja	3 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
Glucosa	2,5 g
Agua destilada	1 L

Esterilizar a 121°C, 20 min.

TSB + 0,3% Extracto de levadura

Triptona	17 g
Peptona de soja	3 g
Extracto de levadura	3g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
Glucosa	2,5 g
Agua destilada	1 L

Esterilizar a 121°C, 20 min.

YGLPB

Extracto de carne	8 g
Extracto de levadura	3 g
Glucosa	5 g
Lactosa	5 g
Peptona	10 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,05 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
Agua destilada	1 L

Ajustar el pH a 6,8.

Esterilizar a 121°C, 20 min.

Medios Sólidos

Agar marino (MA)

Caldo marino	1 L
Agar bacteriológico	15 g

Esterilizar a 121°C, 20 min.

Agar nutritivo I (NA)

Caldo Nutritivo I	1 L
Agar bacteriológico	15 g

Esterilizar a 121°C, 20 min.

Agar nutritivo II (NA*)

Caldo Nutritivo II	1 L
Agar bacteriológico	15 g

Esterilizar a 121°C, 20 min.

Agar Sangre

TSBA	1 L
------	-----

Esterilizar a 121°C, 20 min.

Añadir 5% de sangre de oveja desfibrinada

BHA

BHI	1 L
Agar bacteriológico	15 g

Esterilizar a 121°C, 20 min.

Caldo Manitol Agar

Caldo Manitol	1 L
Agar bacteriológico	15 g

Esterilizar a 121°C, 20 min.

Columbia Agar

Peptona especial	23 g
Almidón	1 g
NaCl	5 g
Agua destilada	1 L
Agar bacteriológico	10 g

Esterilizar a 121°C, 20 min.

Medio de Bacteria Anaeróbica

Triptona	30 g
Extracto de levadura	20 g
L-Cisteína hidrocloreídrica	0,5 g
Solución de Hemina	25 ml
Agar bacteriológico	15 g
Agua destilada	1 L

Ajustar el pH a 7,2.

Esterilizar a 110°C, 30 min.

Medio MH 7,5 agar

MH 7,5	1 L
Agar bacteriológico	15 g

Esterilizar a 121°C, 20 min.

MRSA

MRS	1 L
Agar bacteriológico	15 g

Esterilizar a 121°C, 20 min.

TSA

Triptona	15 g
Peptona de soja	5 g
NaCl	5 g
Agua destilada	1 L
Agar bacteriológico	15 g

Esterilizar a 121°C, 20 min.

TSA + 0,3% Extracto de levadura

Triptona	15 g
Peptona de soja	5 g
Extracto de levadura	3g
NaCl	5 g
Agua destilada	1 L

Ajustar el pH a 7,3

Esterilizar a 121°C, 20 min.

YGLPA

YGLPB	1 L
Agar bacteriológico	15 g

Esterilizar a 121°C, 20 min.

