



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

Departamento de Microbiología y Ecología

Colección Española de Cultivos Tipo



Programa de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología

TAXOGENÓMICA EN *RHODOBACTERACEAE*

Directores de Tesis

David Ruiz Arahal

M^a Jesús Pujalte Domarco

Alexandra La Mura Arroyo

Tesis Doctoral

Valencia, Noviembre, 2019



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

Dra. María Jesús Pujalte Domarco, Catedrática del Departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia,

INFORMAN :

Que **Alexandra La Mura Arroyo**, Graduada en Biología por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **Taxogenómica en *Rhodobacteraceae***, y que hallándose concluida, reúne todos los requisitos para su juicio y calificación. Por tanto, **autorizan su depósito**, a fin de que pueda ser juzgado por el tribunal correspondiente para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

Y para que conste, en el cumplimiento de la legislación, firman el presente informe en Valencia, a 13 de noviembre de 2019.

David Ruiz Arahal

M^a Jesús Pujalte Domarco

Relación de publicaciones derivadas de la presente Tesis Doctoral

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada por la Subvención para la contratación de personal investigador de carácter predoctoral (ACIF/2016/343) de la Generalitat Valenciana y el Fondo Social Europeo.

Los resultados obtenidos a lo largo de la realización de la Tesis Doctoral se han presentado a través de publicaciones y comunicaciones científicas en el ámbito de la taxonomía, y son los siguientes:

- **Artículos:**

La Mura A, Arahal DR, Pujalte MJ. (2018). *Roseivivax atlanticus* (Li, Lai, Liu, Sun and Shao, 2015) is a later heterotypic synonym of *Roseivivax marinus* (Dai, Shi, Gao, Liu and Zhang, 2014). *Int J Syst Evol Microbiol.* 68, 2650-2652.

Arahal DR, **La Mura A**, Lucena T, Rodrigo-Torres L, Aznar R, Pujalte MJ. (2019). *Shimia thalassica* sp. nov., and reclassification of *Pseudopelagicola gijangensis* as *Shimia gijangensis* comb. nov. and *Thalassobius activus* as *Cognatishimia activa* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* doi: 10.1099/ijsem.0.003629.

- **Congresos**

Comunicación póster: **La Mura A**, Pujalte MJ, Arahal DR. Taxogenomic study of marine bacteria belonging to the family *Rhodobacteraceae*. Presentada en el 7th Congress of European Microbiologist (FEMS) realizado en Valencia en 2017.

Comunicación oral: **La Mura A**, Arahal DR, Aznar R, Pujalte MJ. Reclasificación y sinonimias en la era taxogenómica: Estudio de la familia *Rhodobacteraceae*. Presentada en la Reunión de los Grupos Especializados en Taxonomía, Filogenia y Diversidad Microbiana y de Microbiología del Medio Acuático de la Sociedad Española de Microbiología realizada en Sitges (Barcelona) en 2018.

Comunicación oral: **La Mura A**, Arahal DR, Lucena T, Rodrigo-Torres L, Aznar R, Pujalte MJ. *Shimia thalassica* sp. nov., y reclasificación de *Pseudopelagicola gijangensis* como *Shimia gijangensis* comb. nov. y *Thalassobius activus* como *Cognatishimia activa* comb. nov. Presentada en el XXVII Congreso SEM realizado en Málaga en 2019.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de tesis, David Ruiz Arahál y María Jesús Pujalte, el apoyo recibido tanto a nivel profesional como personal. Gracias por confiar en mí a pesar de mi inexperiencia, por vuestra paciencia, por ayudarme a convertirme en la científica que soy ahora y sobre todo por inculcarme la pasión por la Microbiología desde el primer momento... yo que años atrás decía que jamás de los jamases me dedicaría a esta área de conocimiento... y *voilà* aquí estoy. ¡Gracias de corazón!

A mis compañeros de la CECT: MariCarmen, Laura, Bea, Rosa, Nuria, Jordi, MJou, Ana, Aurora, Teresa, Amparo, Patri y Chemi, sin vuestra ayuda esto no habría sido posible. En especial, quiero agradecer a Rosa Aznar por darme la oportunidad de formarme en la Colección.

Sin olvidarme de mis chicas del 0.27, Lidia, María Nicolás y María Piñar creo que tras estos tres años solo os puedo decir una cosa con total seguridad: Os quiero. Lidia gracias por contestarme a las eternas dudas (... pero para eso eres nuestra Reina y la piedra angular de ya sabes donde), y por tener la paciencia de enseñarme a utilizar los programas bioinformáticos. Esta tesis es mía y un poco tuya. Chicas, gracias por estar ahí en los momentos de agobio, por permitirme ensayar con vosotras todas las presentaciones una y otra vez, por ser mi diccionario particular de sinónimos, por las risas en el despacho, por los viajes, los miércoles de cine, el *coffee break*, por Rupert y Helen y por convertir a Ramona en toda una *influencer*... En general gracias por todos los momentos de felicidad vividos y los que nos quedan. No tengo ninguna duda que sin vosotras esto no habría salido adelante! Espero en un futuro poder volver a trabajar junto a vosotras. ¡Sois geniales!

A toda la gente del EAM Lab. Especialmente a Martina y Stefàno por aceptarme en vuestro laboratorio y hacerme sentir una más. Paolo, Dani (o mejor dicho 'el loco Danielito') gracias por compartir vuestro despacho conmigo, por enseñarme y ayudarme cuando algo salía mal, por enseñarme el italiano y que nunca se puede añadir mayonesa a la pasta! A ti Priscilla, gracias por hacerme sentir como en casa aunque estuviera lejos, por ser mi amiga, por compartir los momentos de desgracias en el laboratorio, por explorar juntas Italia y por descubrirme el Pão de queijo (delicioso! Aunque no pueda decir lo mismo del mate...) ¡Muchas gracias por hacer que los tres meses pasaran volando! Te deseo todo lo mejor. Espero verte pronto. Y no olvides que tú molas mucho! Gracias de verdad!

Por último, agradecer eternamente a mi familia y amigos el apoyo constante recibido y a todos aquellos que de una forma u otra habéis hecho posible esta tesis.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Taxonomía de procariotas	1
1.1. Definición y concepto	1
1.2. Historia de la taxonomía de procariotas	2
1.3. Técnicas y metodologías empleadas en la taxonomía polifásica de procariotas	4
1.4. Introducción de la taxonomía de procariotas en la era genómica	9
1.5. Aplicación del enfoque taxogenómico en la delimitación de taxones bacterianos	10
1.6. Aplicación del enfoque taxogenómico en la reconstrucción filogenética	12
1.7. Limitaciones del enfoque taxogenómico en la taxonomía de procariotas	16
2. Generalidades de la familia <i>Rhodobacteraceae</i>	17
OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	23
MATERIAL Y MÉTODOS	27
1. Material: Cepas bacterianas	27
2. Metodología	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
1. Secuenciación genómica <i>de novo</i>	41
1.1. Cultivo celular y obtención de DNA genómico	41
1.2. Secuenciación	41
1.3. Evaluación de los datos brutos obtenidos en la secuenciación	42
1.4. Evaluación de la calidad de los ensamblados	42
1.5. Confirmación de la identidad específica de los genomas secuenciados	44
2. Análisis genómico e inferencia fenotípica	46
2.1. Organización y contenido del genoma	46
2.2. Metabolismo central de carbohidratos	53
2.3. Metabolismo del nitrógeno	59
2.4. Metabolismo del hierro	73
2.5. Metabolismo del fósforo	78
2.6. Metabolismo de compuestos C1	83
2.7. Degradación de compuestos aromáticos	94
2.8. Movilidad bacteriana	100
2.9. Adherencia y producción de biopelículas	107
2.10. Mecanismos de defensa frente a diferentes condiciones de estrés	110
2.11. Producción de metabolitos secundarios	119
2.12. Resistencia a metales y otros elementos tóxicos	125
3. Validación de la inferencia fenotípica	136
3.1. Determinación de la resistencia a metales pesados a través del análisis de concentraciones mínimas inhibitorias	136
3.2. Análisis Phenotype Microarray	139

4. Análisis filogenómico de la familia <i>Rhodobacteraceae</i>	143
4.1. Delimitación de los géneros de <i>Rhodobacteraceae</i>	146
CONCLUSIONES	173
BIBLIOGRAFÍA	177
ANEXO I	221
ANEXO II	229

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Conjunto de cepas bacterianas de interés secuenciadas en el estudio	27
Tabla 2. Información de secuenciación y ensamblado de las cepas de estudio	43
Tabla 3. Cepas utilizadas durante el trabajo con indicación de la semejanza de su secuencia 16S rRNA con la cepa tipo más próxima en EzBioCloud	44
Tabla 4. Características genómicas de las cepas de estudio	46
Tabla 5. Sistemas CRISPR-Cas y elementos genéticos móviles predichos en los genomas de <i>Rhodobacteraceae</i>	50
Tabla 6. Rutas metabólicas analizadas en los genomas de <i>Rhodobacteraceae</i>	54
Tabla 7. Rutas metabólicas relacionadas con la ganancia energética analizadas en los genomas de <i>Rhodobacteraceae</i>	57
Tabla 8. Predicción de genes involucrados en la desnitrificación en los genomas analizados de <i>Rhodobacteraceae</i>	62
Tabla 9. Predicción de genes involucrados en DNRA en los genomas de <i>Rhodobacteraceae</i> .	66
Tabla 10. Predicción de los genes involucrados en la ruta de asimilación del nitrato	69
Tabla 11. Predicción de los genes involucrados en la síntesis de transportadores de tipo ABC para la absorción de hierro	76
Tabla 12. Predicción de la presencia de genes involucrados en la obtención de Pi en los genomas de <i>Rhodobacteraceae</i> analizados	79
Tabla 13. Substratos potenciales para el metabolismo C1 presentes en el hábitat marino	83
Tabla 14. Estudio de la presencia de la enzima metanol deshidrogenasa entre los miembros de <i>Rhodobacteraceae</i> realizado mediante BLASTn	86
Tabla 15. Predicción de la presencia de los genes involucrados en el catabolismo de la glicina-betaína (GBT) en los genomas de <i>Rhodobacteraceae</i> analizados	87
Tabla 16. Estudio de la presencia de genes involucrados en la degradación de aminas metiladas entre los miembros de <i>Rhodobacteraceae</i>	90
Tabla 17. Predicción de la presencia de genes involucrados en el catabolismo del DMSP en los genomas de <i>Rhodobacteraceae</i> analizados	92
Tabla 18. Predicción de la presencia de las ramas del protocatecuato y catecol en la vía del β -cetoadipato	96
Tabla 19. Predicción de la presencia de las rutas metabólicas de degradación de benzoato, salicilato, fenilacetato, homogentisato, gentisato y homoprotecuato en los genomas analizados	97
Tabla 20. Predicción del conjunto de genes esenciales para la movilidad flagelar analizados en los miembros de <i>Rhodobacteraceae</i> a estudio	101

Tabla 21. Predicción de la presencia de genes involucrados en el proceso de quimiotaxis analizados en los genomas de <i>Rhodobacteraceae</i>	104
Tabla 22. Predicción de los genes relacionados con la respuesta frente al estrés oxidativo analizados en los genomas de <i>Rhodobacteraceae</i>	112
Tabla 23. Exploración de los genes involucrados en la ruta de biosíntesis del glutatión presentes en los genomas de <i>Rhodobacteraceae</i>	114
Tabla 24. Potencial para la producción de metabolitos secundarios bioactivos en los genomas de <i>Rhodobacteraceae</i>	121
Tabla 25. Conjunto total de productos naturales predichos en los genomas de <i>Rhodobacteraceae</i> a partir de la herramienta NaPDos	123
Tabla 26. Presencia de genes implicados en la resistencia al arsénico en los genomas de <i>Rhodobacteraceae</i> analizados	126
Tabla 27. Predicción del operón <i>mer</i> , de resistencia al mercurio, en los genomas de <i>Rhodobacteraceae</i>	128
Tabla 28. Estudio de la presencia de las subunidades AdeG y AdeH en las siete cepas en las que se halló la proteína AdeF a partir de la exploración con CARD	135
Tabla 29. Fuentes de carbono utilizadas por las tres cepas de <i>Rhodobacteraceae</i> estudiadas en el análisis de <i>Phenotype Microarray</i>	140
Tabla 30. Nivel de resistencia o sensibilidad a los diferentes compuestos químicos utilizados en el análisis de <i>Phenotype Microarray</i> por las tres cepas de <i>Rhodobacteraceae</i> estudiadas	141
Tabla 31. Valores ANIb e isDDH entre los genomas disponibles del género <i>Roseivivax</i>	144
Tabla 32. Valores de AAI entre los genomas que conforman el clado <i>Tropicimonas</i> del árbol filogenómico de <i>Rhodobacteraceae</i>	148
Tabla 33. Valores de AAI entre los genomas que conforman el clado <i>Palleronia</i> del árbol filogenómico de <i>Rhodobacteraceae</i>	149
Tabla 34. Valores de AAI entre los genomas que conforman el clado <i>Shimia</i> del árbol filogenómico de <i>Rhodobacteraceae</i>	150
Tabla 35. Valores de AAI entre los genomas que conforman el clado <i>Octadecabacter</i> del árbol filogenómico de <i>Rhodobacteraceae</i>	151
Tabla 36. Valores de AAI entre los genomas que conforman el clado <i>Rhodovulum</i> del árbol filogenómico de <i>Rhodobacteraceae</i>	152
Tabla 37. Valores de AAI entre los genomas que conforman el clado <i>Thalassobius</i> del árbol filogenómico de <i>Rhodobacteraceae</i>	153
Tabla 38. Valores de AAI entre los genomas que conforman el clado <i>Roseobacter</i> del árbol filogenómico de <i>Rhodobacteraceae</i>	154
Tabla 39. Valores de AAI entre los genomas que conforman el clado <i>Leisingera</i> del árbol filogenómico de <i>Rhodobacteraceae</i>	157

Tabla 40. Valores de AAI entre los genomas que conforman el clado <i>Roseovarius</i> del árbol filogenómico de <i>Rhodobacteraceae</i>	159
Tabla 41. Valores de AAI entre los genomas que conforman el clado <i>Sagittula</i> del árbol filogenómico de <i>Rhodobacteraceae</i>	161
Tabla 42. Valores de AAI entre los genomas que conforman el clado <i>Paracoccus</i> del árbol filogenómico de <i>Rhodobacteraceae</i>	162

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Evaluación de la práctica taxonómica en los tres últimos siglos	2
Fig. 2. Reconstrucción filogenética de la familia <i>Rhodobacteraceae</i> en base a la secuencia del gen 16S rRNA	17
Fig. 3. Número de aislados o clones pertenecientes al grupo Roseobacter con indicación y origen del muestreo	18
Fig. 4. Organización genética de los cuatro módulos de replicación/partición de los ERC de <i>Rhodobacteraceae</i>	48
Fig. 5. Rutas catabólicas para el metabolismo de la glucosa	53
Fig. 6. Ciclo biogeoquímico del nitrógeno	59
Fig. 7. Proceso de desnitrificación	60
Fig. 8. Reducción desasimilatoria de nitrato a amonio (DNRA)	65
Fig. 9. Reducción asimilatoria de nitrato	68
Fig.10. Proceso de nitrificación donde la reacción A es realizada por los organismos AOB/AOA y la reacción B por los NOB	71
Fig.11. Fijación del N ₂	72
Fig.12. Rutas metabólicas involucradas en el metabolismo C1	84
Fig. 13. Ruta metabólica para la degradación de la colina	86
Fig. 14. Ruta metabólica para el catabolismo de las aminas metiladas	89
Fig. 15. Vía de escisión y desmetilación bacteriana del DMSP	91
Fig. 16. Ruta microbiana del β-KAP	94
Fig. 17. Vías de degradación de compuestos aromáticos propuestas en genomas del grupo Roseobacter	95
Fig. 18. Distribución de las proteínas flagelares entre las diversas especies flageladas	100
Fig. 19. Vía de quimiotaxis	104
Fig. 20. La detección del QS en bacterias Gram negativas	107
Fig. 21. Formación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) a través de transferencia de electrones (e ⁻) o de energía	110
Fig. 22. Dominios de PKS (Izqda.) y NRPS (Dcha.)	119
Fig. 23. Mecanismo molecular de la resistencia a mercurio en bacterias Gram negativas	128
Fig. 24. Principales familias de transportadores involucrados en la resistencia a metales pesados	130
Fig. 25. Los mecanismos homeostáticos de cobre detoxifican la célula, utilizando los sistemas cromosómicos de eflujo de cobre; <i>cus-cue</i>	132

Fig. 26. Ensayo de concentraciones mínimas inhibitorias de las diez cepas analizadas de <i>Rhodobacteraceae</i> expuestas durante 5 días a concentraciones crecientes de Na_3AsO_4	136
Fig. 27. Ensayo de concentraciones mínimas inhibitorias de las diez cepas analizadas de <i>Rhodobacteraceae</i> expuestas durante 5 días a concentraciones crecientes de K_2TeO_3	138
Fig. 28. Árbol filogenómico compactado por clados de la familia <i>Rhodobacteraceae</i> generado con el programa UBCG utilizando las secuencias de nucleótidos	146
Fig. 29. Clado <i>Tropicimonas</i> extraído de la reconstrucción filogenómica de <i>Rhodobacteraceae</i> realizada mediante el programa UBCG utilizando las secuencias de aminoácidos ...	147
Fig. 30. Clado <i>Palleronia</i> extraído de la reconstrucción filogenómica de <i>Rhodobacteraceae</i> realizada mediante el programa UBCG utilizando las secuencias de aminoácidos	149
Fig. 31. Clado <i>Shimia</i> extraído de la reconstrucción filogenómica de <i>Rhodobacteraceae</i> realizada mediante el programa UBCG utilizando las secuencias de aminoácidos	150
Fig. 32. Clado <i>Octadecabacter</i> extraído de la reconstrucción filogenómica de <i>Rhodobacteraceae</i> realizada mediante el programa UBCG utilizando las secuencias de aminoácidos ...	151
Fig. 33. Clado <i>Rhodovulum</i> extraído de la reconstrucción filogenómica de <i>Rhodobacteraceae</i> realizada mediante el programa UBCG utilizando las secuencias de aminoácidos ...	152
Fig. 34. Clado <i>Thalassobius</i> extraído de la reconstrucción filogenómica de <i>Rhodobacteraceae</i> realizada mediante el programa UBCG utilizando las secuencias de aminoácidos ...	154
Fig. 35. Clado <i>Roseobacter</i> extraído de la reconstrucción filogenómica de <i>Rhodobacteraceae</i> realizada mediante el programa UBCG utilizando las secuencias de aminoácidos ...	155
Fig. 36. Clado <i>Leisingera</i> extraído de la reconstrucción filogenómica de <i>Rhodobacteraceae</i> realizada mediante el programa UBCG utilizando las secuencias de aminoácidos ...	157
Fig. 37. Clado <i>Roseovarius</i> extraído de la reconstrucción filogenómica de <i>Rhodobacteraceae</i> realizada mediante el programa UBCG utilizando las secuencias de aminoácidos ...	158
Fig. 38. Clado <i>Sagittula</i> extraído de la reconstrucción filogenómica de <i>Rhodobacteraceae</i> realizada mediante el programa UBCG utilizando las secuencias de aminoácidos ...	160
Fig. 39. Clado <i>Paracoccus</i> extraído de la reconstrucción filogenómica de <i>Rhodobacteraceae</i> realizada mediante el programa UBCG utilizando las secuencias de aminoácidos ...	162

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
AAI	<i>Average Aminoacid Identity</i> (Identidad promedio de aminoácidos)
AAnP	<i>Aerobic Anoxic Phototrophy</i> (Fototrofia aerobia anoxigénica)
AHL	<i>Acyl Homoserine Lactone</i> (Acil-homoserina lactona)
ANI	<i>Average Nucleotide Identity</i> (Identidad promedio de nucleótidos)
ANIb	Identidad promedio de nucleótidos mediante el algoritmo BLAST
ANIm	Identidad promedio de nucleótidos mediante el algoritmo MUMmer
AOA	<i>Ammonia-Oxidizing Archea</i> (Arqueas oxidantes de amonio)
AOB	<i>Ammonia-Oxidizing Bacteria</i> (Bacterias oxidantes de amonio)
BCG	<i>Biosynthetic Gene Clusters</i> (Clústers de genes biosintéticos)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CDS	<i>Coding Sequence</i> (Secuencia codificante)
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CODH	<i>Carbon monoxide dehydrogenase</i> (Monóxido de carbono deshidrogenasa)
Comb. nov.	Combinación nueva
Csp	<i>Cold shock protein</i> (Proteína de choque frío)
DDBJ	<i>DNA Data Bank of Japan</i>
DDH	Hibridación DNA-DNA
DMS	Dimetilsulfuro
DMSP	Dimetilsulfoniopropionato
DNAss	<i>Single strand DNA</i> (DNA monocatenario)
DNRA	<i>Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium</i> (Reducción desasimilatoria de nitrato a amonio)
DOP	<i>Dissolved Organic Phosphorus</i> (Fosforo orgánico disuelto)
DR	<i>Direct Repeat</i> (Repetición directa)
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i> (Laboratorio Europeo de Biología molecular)
Emend.	Enmendado
ERC	<i>Extrachromosomal rDNA Circle</i> (Replicón extracromosómico)
FDH	Formiato deshidrogenasa
GEBA	<i>Genomic Encyclopedia of Bacteria and Archea</i>
Gen. nov.	Género nuevo
GGDC	<i>Genome-to-Genome Distance Calculator</i>
GS-GOGAT	<i>Glutamine Synthetase-Glutamine Oxoglutarate Aminotransferase</i> (Glutamina sintetasa – glutamato sintasa)
GSI	<i>Gene Support Index</i> (Índice de soporte genético)
GTA	<i>Gene transfer agent</i> (Agente de transferencia de genes)
HMM	<i>Hidden Markov Model</i> (Modelos ocultos de Markov)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida)
HSP	<i>Heat Shock Protein</i> (Proteína de choque térmico)
isDDH	Hibridación DNA-DNA <i>in silico</i>
JGI	<i>Joint Genome Institute</i>
MA	<i>Marine Agar</i> (Agar marino)
MA	Aminas metiladas
MB	<i>Marine Broth</i> (Caldo marino)
MCP	<i>Methyl-accepting Chemotaxis Protein</i> (Proteínas quimiosensorasceptoras de metilo)
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (Concentración mínima inhibitoria)

MLSA	<i>Multilocus Sequence Analysis</i> (Análisis de secuencias multilócico)
MMPA	Metil mercaptopropionato
MUM	<i>Maximal Unique Matches</i> (Coincidencias máximas únicas)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> (Secuenciación de nueva generación)
NOB	<i>Nitrite-oxidizing Bacteria</i> (Bacterias oxidantes de nitrito)
NRP	<i>Nonribosomal Peptide</i> (Péptidos no ribosomales)
NRPS	<i>Nonribosomal Peptide Synthetases</i> (Sintasas de péptidos no ribosomales)
°C	Grado centígrado
OD	<i>Optical Density</i> (Densidad óptica)
OGRIs	<i>Overall Genoma Relatedness Index</i> (Índices de relación global del genoma)
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Marco abierto de lectura)
orthoANI	<i>Orthologous Average Nucleotide Identity</i> (Índice de identidad media de nucleótidos por ortología)
p/v	Peso/volumen
PK	<i>Polyketide</i> (Policétidos)
PKS	<i>Polyketide synthases</i> (Policétidos sintasas)
PM	<i>Phenotype Microarray</i>
PMF	<i>Proton Motive Force</i> (Fuerza protón-motriz)
POCP	<i>Percentage of Conserved Protein</i> (Porcentaje de proteínas conservadas)
Q	Puntuación de calidad
qPCR	<i>quantitative-PCR</i> (PCR a tiempo real)
QQ	<i>Quorum Quenching</i>
QS	<i>Quorum Sensing</i>
RBR	<i>Relative Binding Ratio</i> (Tasa de unión relativa)
RND	Resistencia-Nodulación-División
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Especies reactivas del oxígeno)
S	Superficie
Sp.	Especie
T	Cepa tipo
T ^a	Temperatura
TBE	Tris-borato-EDTA
TGH	Transferencia Horizontal de Genes
THF	Tetrahidrofolato
T _m	Temperatura de desnaturalización térmica o fusión
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
v/v	Volumen/volumen
β-KAP	<i>β-ketoadipate</i> (β-Cetoadipato)
Δ	Diferencia

1. TAXONOMÍA DE PROCARIOTAS

1.1. Definición y concepto

El término **Taxonomía** ha sido frecuentemente utilizado de forma errónea como un equivalente al término sistemática. Sin embargo, es más apropiado integrar la taxonomía dentro de la práctica de la sistemática, ya que tal y como expuso Sneath (1989), la sistemática debe entenderse como el estudio científico de la diversidad de organismos, mientras que la taxonomía es el estudio teórico de la clasificación, incluyendo sus bases y principios. Así, la taxonomía procariota se define como el estudio de la clasificación de las arqueas y las bacterias y está constituida por tres áreas independientes, pero interrelacionadas: la **clasificación**, es decir, la organización de los organismos en grupos previamente establecidos (taxones) en base a sus similitudes fenotípicas y genotípicas o su parentesco evolutivo; la **nomenclatura**, proceso de asignar un nombre a los taxones identificados en la clasificación siguiendo las reglas establecidas por el Código Internacional de Nomenclatura de Procariotas (ICNP, *International Code of Nomenclature of Prokaryotes*; Parker *et al.*, 2019); y por último, la **identificación**, que consiste en determinar si un aislado pertenece a un taxón definido en la clasificación y nombrado en la nomenclatura (Sentausa & Fournier, 2013).

La influencia de la taxonomía procariota, pese a que en ocasiones se haya considerado simplemente un campo científico de importancia práctica, se extiende a lo largo de las múltiples disciplinas de la microbiología, ya que asignar un nombre a una cepa bacteriana supone establecer suposiciones e implicaciones asociadas con ese organismo, tales como el potencial biotecnológico o de patogenicidad que podría albergar, la seguridad necesaria para su manejo y su coste. Por lo tanto, el simple hecho de adscribir una cepa bacteriana a una designación taxonómica puede tener efectos de alto alcance (Moore *et al.*, 2010).

También ha sido considerada una de las disciplinas científicas más progresivas, ya que la forma de clasificar a las bacterias ha ido evolucionando a lo largo del tiempo conforme se van produciendo nuevos avances tecnológicos; así, como se puede observar en la figura 1, en apenas dos siglos hemos pasado de clasificar a las bacterias en base a sus características fenotípicas básicas a clasificarlas en base a la secuencia completa de sus genomas, puesto que la primera secuenciación de un genoma bacteriano en 1995 (Fleischmann *et al.*, 1995), junto con el posterior desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva promovieron un cambio radical en la práctica taxonómica al permitir el acceso a todo el repertorio genético de una cepa.

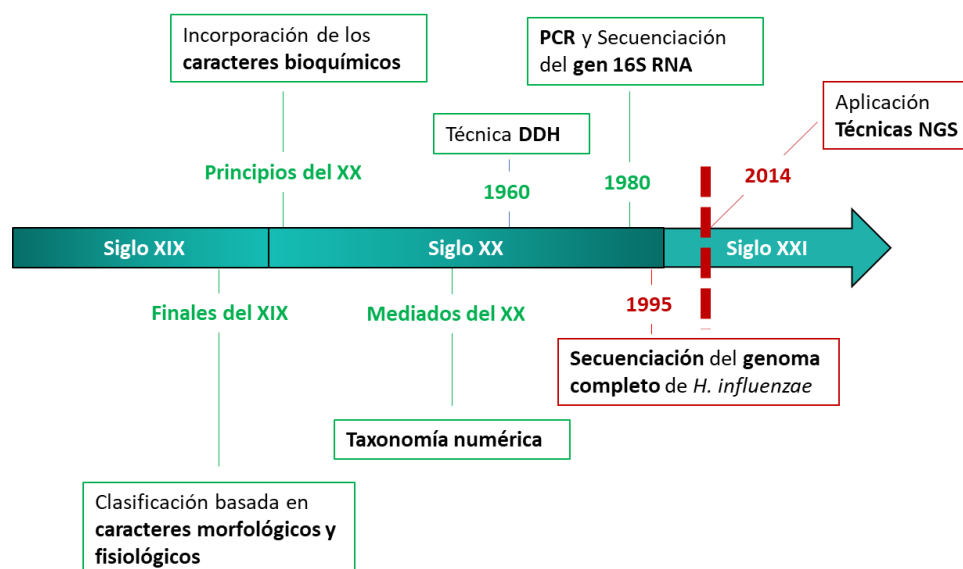


Fig. 1. Evolución de la práctica taxonómica de procariontes en los tres últimos siglos

1.2. Historia de la taxonomía de procariontes

Las bases de la taxonomía moderna se establecieron a mediados del siglo XVIII cuando Carl Linneaus, a través de su estudio realizado con plantas, introdujo el actual sistema binomial de nomenclatura en la primera edición de su obra *Systema Naturae*, en el que a cada planta le asignó un nombre en latín compuesto por un nombre genérico seguido de un nombre específico. Unos años más tarde, concretamente en 1773, F. Müller desarrolló el primer sistema de clasificación de bacterias a través de criterios morfológicos y biológicos, como el movimiento, el hábitat y la formación de agregados, llegando a describir dos géneros (*Monas* y *Vibrio*) con los que diferenciaba a las bacterias puntiformes de las elongadas, respectivamente (Palleroni, 2003; Guerrero, 2001; Drews, 2000).

A principios del siglo XIX, C. Ehrenberg extendió la nomenclatura de Müller y agregó a la clasificación las bacterias helicoidales. Los intentos posteriores de clasificación idearon sistemas más simples, aunque basados todavía en la morfología microscópica (Rosselló-Móra & Amann, 2001). A finales de dicho siglo, F. Cohn estableció por primera vez los rangos taxonómicos de especie y género en la clasificación procarionte. Además, diseñó un sistema de clasificación compuesto por seis géneros basándose en la forma y apariencia general de las células bacterianas. Sin embargo, rápidamente se dio cuenta de la limitación que presentaba su sistema de clasificación, ya que aquellas clasificaciones basadas únicamente en criterios morfológicos no eran adecuadas, pues bacterias con una morfología similar podían presentar grandes diferencias en cuanto a su fisiología. Esta crítica consiguió que, a finales de dicho siglo y durante las dos primeras décadas del siglo XX, se utilizaran cada vez más los datos fisiológicos y bioquímicos, además de la morfología, como marcadores importantes para la clasificación e identificación de los microorganismos, creándose así un sistema de clasificación más complejo, basado en características morfológicas, fisiológicas, metabólicas y de patogenicidad (Pascual, 2010; Schleifer, 2009). Tales características también fueron utilizadas por la Sociedad Americana de Bacteriólogos en un informe sobre caracterización y clasificación de bacterias que se convirtió

en la base de la primera edición del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* publicado en 1923. En el momento de su publicación no existía un acuerdo común sobre la clasificación procariota, por lo que este manual junto a sus ediciones posteriores (nueve) llegó a constituir la obra de referencia para la clasificación bacteriana al proporcionar un marco de acción para unificar los criterios utilizados entre los microbiólogos y evitar los problemas de nomenclatura que ocurrieron con relativa frecuencia durante los primeros años de la clasificación bacteriana (Rosselló-Móra & Amann, 2001).

En los años posteriores, los sistemas de clasificación se volvieron todavía más robustos gracias a la introducción en 1950 de la taxonomía numérica, debido al naciente desarrollo de la informática. La taxonomía numérica mejoró la identificación fenotípica al aumentar el número de pruebas utilizadas y calcular los coeficientes de similitudes fenéticas entre cepas y especies. Asimismo, los sistemas de clasificación se vieron complementados a través de la caracterización quimiotaxonómica y genotípica. La caracterización genotípica empezó a adquirir importancia a finales de la década de 1950, cuando la comunidad científica advirtió que las grandes macromoléculas como las proteínas o el DNA podían contener información relacionada con la historia evolutiva de los organismos. De este modo, el DNA se convirtió en el foco de interés para la taxonomía. En consecuencia, a principios de la década de 1960, tras el desarrollo de técnicas de biología molecular y el conocimiento cada vez mayor de las propiedades del DNA, se empezó a especular que la clasificación bacteriana se vería reforzada mediante la comparación de las secuencias de ácidos nucleicos (Johnson, 2014; Vandamme & Peeters, 2014; Rosselló-Móra & Amann, 2001). Por consiguiente, las bacterias fueron inicialmente clasificadas en función de la composición de bases de una molécula de DNA (% en moles de G+C) y, posteriormente, en base al porcentaje de hibridación entre las secuencias de DNA homodúplex y heterodúplex con el desarrollo de la técnica de hibridación DNA-DNA (DDH), que llegó a convertirse en la técnica estándar para la circunscripción de especies bacterianas (Wayne *et al.*, 1987). Finalmente, en la década de 1980, la irrupción de las técnicas de amplificación y secuenciación automática, en particular la del gen 16S rRNA, permitió un gran adelanto en la determinación de las relaciones genéticas entre organismos relacionados de forma distante (Staley, 2006). Todos estos avances condujeron a la utilización de un enfoque polifásico en la práctica taxonómica. Este enfoque hace referencia a un tipo de taxonomía de consenso cuyo objetivo es utilizar toda la información fenotípica y genotípica disponible para lograr analizar la diversidad dentro y entre los taxones.

El término 'taxonomía polifásica', pese a ser introducido en la década de los 70 por Colwell (1970), se sigue utilizando actualmente para la delimitación de los taxones en todos los niveles (Cole *et al.*, 2018; Huq, 2018; Park *et al.*, 2018; Butler *et al.*, 2005; Ivanova *et al.*, 2004; Stackebrandt y Schumann, 2000) a través de una combinación, como ya se ha señalado anteriormente, de características fenotípicas, genotípicas y filogenéticas.

1.3. Técnicas y metodologías empleadas en la taxonomía polifásica de procariotas

▪ Características fenotípicas

Las características fenotípicas han constituido, desde los orígenes de la taxonomía procariota, los pilares básicos de la descripción y clasificación bacteriana. Los principales rasgos fenotípicos empleados en la práctica taxonómica implican el uso de una gran variedad de métodos, cuyos objetivos son describir las características físicas morfológicas y fisicoquímicas más importantes de los microorganismos. Entre tales características se encuentran: las preferencias por distintas condiciones de crecimiento, los requerimientos aeróbicos, anaeróbicos o de dióxido de carbono (CO₂), los componentes de los medios que cubren los requerimientos nutricionales, la morfología celular y colonial, la movilidad, las propiedades antigénicas, la composición proteica, la patogénesis y/o el hábitat (Ramasamy *et al.*, 2014; Moore *et al.*, 2010). Este tipo de análisis también se ha visto beneficiado a través del desarrollo de los métodos fenotípicos de alto rendimiento como son la espectrometría de masas MALDI-TOF, que genera perfiles de péptidos ribosómicos que permiten la identificación a nivel de especie con un poder de resolución similar al obtenido por métodos genéticos (Seuylemezian *et al.*, 2018), o la espectrometría de resonancia ciclotrónica de iones (ICR-FT MS), dirigida a la detección y comparación de metabolitos pequeños (entre 50 y 1000 D) que permiten obtener descripciones metabolómicas precisas de los organismos bajo estudio (Lee *et al.*, 2013b; Rosselló-Móra, 2012). Otras técnicas de alto rendimiento valiosas en la práctica taxonómica son la espectrometría infrarroja de Fourier (HT-FTIR), la cromatografía líquida (HPLC-MS) o la cromatografía acoplada a espectrometría de masas de relación isotópica (GC-IRMS) (Rosselló-Móra & Amann, 2015).

El análisis fenotípico también integra el estudio de las características quimiotaxonómicas que comprenden los diferentes constituyentes químicos que conforman los componentes estructurales de la célula procariota, es decir, la pared celular, la membrana plasmática y el citoplasma. Por tanto, la quimiotaxonomía o caracterización química hace referencia a la aplicación de diferentes métodos analíticos para la recogida de información sobre los diferentes marcadores moleculares de la célula con el fin de clasificar a los microorganismos. Estos marcadores tienen generalmente un carácter de exclusión entre los taxones y no de inclusión. De ellos, los más utilizados en el estudio taxonómico son los siguientes: I) Quinonas isoprenoides y lipoquinonas respiratorias; II) Citocromos; III) Peptidoglucano; IV) Ácidos grasos; V) Lípidos polares; VI) Poliaminas, y; VII) Ácidos micólicos (Tindall *et al.*, 2010; Rosselló-Móra & Amann, 2001; Busse *et al.*, 1996).

Pese a la gran cantidad de información que puede derivarse del análisis fenotípico, se ha reportado que su aplicación a la taxonomía presenta una serie de inconvenientes. En primer lugar, algunos de los análisis fenotípicos muestran una escasa reproducibilidad, siendo necesaria una estandarización de protocolos, ya que no hay que olvidar que el fenotipo es el resultado observable en las condiciones bajo las que se expresa el genotipo subyacente. En segundo lugar, algunas de las pruebas fenotípicas que se realizan habitualmente en el enfoque polifásico consumen mucho tiempo, son económicamente costosas y a menudo proporcionan información muy limitada sobre las propiedades biológicamente importantes del organismo, dado que no reflejan las condiciones naturales de los ambientes donde habitan los microorganismos en

cuestión. Además, la mayoría de las clasificaciones a nivel de especie se basan en cepas únicas y por lo tanto, la universalidad de las características medidas dentro del taxón es cuestionable (Rosselló-Móra & Amann, 2015; Thompson *et al.*, 2014; Prakash *et al.*, 2007). Por último, otro inconveniente asociado a los análisis fenotípicos es que en su mayoría no pueden realizarse en bacterias no cultivables y teniendo en cuenta que solo se cultiva el 0.1% de la diversidad microbiana existente (Davis *et al.*, 2005); la clasificación del 99.9% restante de bacterias no cultivables resultaría muy complicada.

- **Características genotípicas**

Contenido G+C del DNA

La primera técnica basada en ácidos nucleicos aplicada a la taxonomía fue la composición de bases de una molécula de DNA, definida como la abundancia relativa del par de bases guanina (G) – citosina (C) y generalmente expresada como % en moles de G+C:

$$\frac{[C+G]}{[C+G+A+T]} * 100 \text{ (mol\%)}$$

Este parámetro no refleja la similitud de secuencia nucleotídica dado que no aporta información sobre la secuencia lineal de bases del DNA. Por lo tanto, valores similares en el contenido de G+C entre dos organismos no indican necesariamente una relación genética entre ellos. Por consiguiente, su valor en taxonomía es el de un criterio de exclusión entre los taxones y no de inclusión (Meier-Kolthoff *et al.*, 2014; Owen, 2004). No obstante, fue una de las primeras características genéticas más utilizadas en las descripciones taxonómicas de microorganismos, puesto que proporcionó, a diferencia de las características fenotípicas y quimiotaxonómicas, una constante valiosa independiente de las condiciones de cultivo, que permitía distinguir entre cepas fenotípicamente similares, pero genéticamente diferentes (Owen, 2004). La literatura indica que en procariotas el contenido G+C varía entre 17 – 75 mol%, y que aquellos microorganismos que difieren en más de un 10% en moles de G+C no pertenecen al mismo género, mientras que el 5% en moles es el rango común que se encuentra dentro de una especie (Rosselló-Móra & Amann, 2001).

A pesar de la gran utilidad que supuso el contenido G+C para la delimitación de especies y géneros, rápidamente se observó que es una técnica que presenta varias limitaciones. De las diversas metodologías disponibles para la determinación del contenido en G+C, como son la temperatura de desnaturalización térmica (T_m), la ultracentrifugación en gradiente de densidad de CsCl o la HPLC, ésta última fue la más utilizada. Sin embargo, este método requiere mucho tiempo, mucha cantidad de DNA y no ofrece una elevada reproducibilidad intra- e interlaboratorio. También, se ha observado que los valores obtenidos mediante el análisis de la composición de bases del DNA solo permiten comparaciones muy superficiales y, además, la fórmula con la que se obtienen no era adecuada para procariotas con contenidos de G+C muy bajos o elevados (Fournier *et al.*, 2006). Asimismo, en la actualidad el contenido G+C mol% puede obtenerse a partir de las secuencias genómicas con una precisión mayor en comparación con la obtenida a partir de las técnicas clásicas de laboratorio. De hecho, se ha observado que la diferencia intraespecífica en el contenido G+C mol% derivado de los genomas puede ser inferior al 1% en moles (Meier-Kolthoff *et al.*, 2014).

Hibridación DNA-DNA (DDH)

A finales de los años 60, tras el descubrimiento de la estructura del DNA y el desarrollo de nuevas técnicas moleculares, se desarrolló un método experimental para medir el grado de relación genética de dos organismos mediante la hibridación de ácidos nucleicos (Johnson & Ordal, 1968). Una propiedad característica de los ácidos nucleicos es su capacidad para la reasociación, una vez desnaturalizado y bajo unas condiciones estandarizadas. Dadas estas condiciones, el DNA de dos organismos diferentes, se puede reasociar en función de la similitud de sus secuencias de nucleótidos, permitiendo de este modo la cuantificación del grado de relación, generalmente expresado como % de similitud (Rosselló-Móra, 2006).

Esta técnica se denomina hibridación DNA-DNA y llegó a considerarse la técnica estándar para la delimitación de especies tanto de bacterias como de arqueas, puesto que presentaba un elevado grado de correlación entre la similitud de ácidos nucleicos y la similitud fenotípica. Se desarrollaron varios métodos para determinar los valores de DDH, que incluyen desde el método tradicional radioactivo hasta ensayos de microtitulación utilizando fluorometría y qPCR (Mahato *et al.*, 2017). No obstante, independientemente de ello, los principales parámetros para medir el grado de relación son la tasa de unión relativa (RBR, *Relative Binding Ratio*) y la diferencia en el punto medio de desnaturalización térmica (ΔT_m). El RBR refleja la proporción relativa de hibridación entre DNA heterólogos en comparación con la hibridación obtenida entre DNA homólogos, asumiendo que los valores de hibridación obtenidos con el homodúplex representan el 100% de reasociación. La ΔT_m es un reflejo de la estabilidad térmica de los dúplex de DNA. La desnaturalización, depende entre otros factores de la temperatura. En una curva de cinética de desnaturalización de DNA bicatenario, la temperatura a la que el 50% de las hebras de DNA ya se desnaturalizan se llama punto de fusión (T_m). Los DNA heterodúplex tienen menos apareamiento de bases que los DNA homodúplex, por lo que serán menos estables, y en consecuencia la T_m se alcanza a una menor temperatura. En este caso, el parámetro utilizado para medir el grado de reasociación DNA-DNA es la ΔT_m entre la T_m de DNA homodúplex y la T_m de los DNA heterodúplex (Rosselló-Móra & Amann, 2001). En base a estos parámetros, Wayne *et al.*, (1987) recomendó que valores superiores a 70% de RBR o de 5 °C o inferiores de ΔT_m indican una relación a nivel de especie, mientras que valores comprendidos entre el 20-60% de RBR dan evidencia para el género.

Esta técnica tampoco queda exenta de limitaciones. Los valores de corte siguen sin ser aplicables de forma consistente a todos los géneros procariontes. Siguiendo con el ejemplo anterior, el valor de corte del 70% DDH en el género *Rickettsia* no distingue entre las especies *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. sibirica* y *R. montanensis*. Además, los valores obtenidos en la comparación por pares de cepas no son necesariamente simétricos, pudiéndose obtener resultados diferentes dependiendo de qué cepa se utilice como referencia y, dado que se basa en una estimación comparativa, no se puede crear una base de datos incremental. Asimismo, su realización requiere instalaciones especiales solamente disponibles en un número limitado de laboratorios, siendo un método laborioso, propenso a errores y que carece de reproducibilidad entre laboratorios (Mahato *et al.*, 2017; Ramasamy *et al.*, 2014; Sentausa & Fournier, 2013; Gao & Gupta, 2012; Auch *et al.*, 2010; Achtman & Wagner, 2008).

Análisis de la secuencia de RNA ribosómico

Las secuencias del rRNA demostraron ser un marcador molecular muy útil para fines taxonómicos, puesto que son moléculas universales, constantes y muy limitadas, no se ven afectadas por cambios en el organismo y se pueden aislar en grandes cantidades. Además, no sufren transferencia horizontal de genes (TGH) y pueden ser secuenciadas directamente (Janda & Abbott, 2007). Por ello, y dado que contienen gran cantidad de información genética y que se componen de regiones altamente conservadas que pueden revelar relaciones de ramificación profunda (como clases o filos), además de regiones variables que tienen la capacidad de discriminar entre especies dentro de un mismo género, constituyeron los principales marcadores moleculares utilizados para la reconstrucción filogenética (Mignard & Flandrois, 2006).

Entre las tres moléculas de rRNA presentes en procariotas, el gen 16S rRNA, debido a su tamaño (1.500 pb), fue el escogido como marcador universal. Para la década de 1990, el análisis de la secuencia de dicho gen ya se había convertido en el método principal para establecer las relaciones filogenéticas entre los procariotas, y su secuencia se empezó a determinar de forma sistemática en la mayoría de los estudios taxonómicos (Bee *et al.*, 2018). De este modo, el volumen 42 (1992) de la revista *International Journal of Systematic Bacteriology* contenía 26 artículos (de un total de 102; 25%) en donde se utilizaron datos de la secuencia del gen 16S rRNA para sustentar una conclusión sistemática; el volumen 43 (1993) contenía 40 artículos (de 139; 29%); y, el volumen 44 (1994) contenía 66 artículos (de 119; 37%) (Clayton *et al.*, 1995).

En el análisis comparativo de la secuencia del gen 16S rRNA, se asume que aquellos procariotas con una similitud menor del 97% deben considerarse como miembros de especies diferentes, dado que tales diferencias se correlacionaban empíricamente con valores inferiores al 70% de DDH (Schleifer, 2009). Este valor de corte a nivel de especie fue reevaluado e incrementado hasta el 98,7% (Stackebrandt & Ebers, 2006) y posteriormente al 98,65% (Kim *et al.*, 2014a). Por otra parte, el valor de corte a nivel de género se estableció en el 95% de similitud 16S rRNA (Stackebrandt & Goebel, 1994). Desafortunadamente, esta técnica no permite discriminar especies estrechamente relacionadas de forma satisfactoria, debido al alto grado de conservación que presentan a veces las secuencias del 16S rRNA entre las mismas; como es el caso de las especies del género *Brucella*, *Edwardsiella* y algunas del género *Bacillus* (como *B. globisporus* y *B. psychrophilus*) que no difieren en más del 1% o en los géneros *Streptomyces* y *Chlorobium*, en donde las similitudes interespecie más bajas son del 78% y 86,1%, respectivamente. Otro factor limitante de este marcador taxonómico es la posibilidad de ser adquirido por TGH pudiendo distorsionar las relaciones filogenéticas entre los taxones, como ha sido reportado recientemente (Tian *et al.*, 2015). Además, se ha reportado la existencia de heterogeneidad intragenómica dentro del operón 16S rRNA. El número de copias de este operón en un genoma bacteriano puede variar de 1 a 15. Normalmente, estas copias son idénticas, pero ocasionalmente se encuentran variaciones nucleotídicas entre los operones del mismo genoma, pudiendo llegar a alcanzar un nivel de divergencia del 6.4% como ocurre en el genoma de la especie *Thermobispora bispora*, limitando así el poder de resolución del gen 16S rRNA para la reconstrucción filogenética (Mahato *et al.*, 2017; Tu & Lin, 2016; Rossi-Tamisier *et al.*, 2015; Ramasamy *et al.*, 2014; Konstantinidis & Tiedje, 2007; Boudewijns *et al.*, 2006; Coenye *et al.*, 2005). Debido a esta heterogeneidad, otros genes de copia única altamente conservados se han

propuesto como alternativa a la filogenia basada en el gen 16S rRNA. Así, la chaperonina GroEL, la subunidad beta de la RNA polimerasa (*rpoB*), la subunidad beta de la DNA girada (*gyrB*) y la proteína de choque térmico (*dnaK*) se han utilizado para definir las relaciones taxonómicas entre procariotas, obteniéndose de esta forma topologías de árboles muy similares a las obtenidas a partir del gen 16S rRNA (Kämpfer & Glaeser, 2012; Rajendhran & Gunasekaran, 2011).

Por otro lado, se ha encontrado que la secuencia espaciadora transcrita interna del gen 16S-23S rRNA es útil para identificar especies que no son diferenciables por las secuencias del gen 16S rRNA, siendo utilizada para distinguir entre especies del género *Mycobacterium* (Roth *et al.*, 1998). Del mismo modo, la secuencia del gen 23S rRNA ha permitido delimitar entre especies del género *Streptococcus* (Kotilainen *et al.*, 2006) y la del gen que codifica la enzima citrato sintasa entre especies de *Bartonella* y *Rickettsia* (Norman *et al.*, 1995; Roux *et al.*, 1997). Otro enfoque genotípico con gran potencial para la circunscripción de especies bacterianas, que fue firmemente respaldado por el Comité Internacional sobre Sistemática de Procariotas, es el análisis multilocus de secuencias (MLSA; *Multilocus Sequence Analysis*). Esta técnica consiste en la secuenciación de fragmentos de aproximadamente 500 pb de varios genes constitutivos, recomendándose siete genes, cuyo perfil de secuencias concatenadas es utilizado para la reconstrucción filogenética en un amplio rango de niveles taxonómicos, desde intraespecíficos hasta por encima del nivel de especie (Glaeser & Kämpfer, 2015). Esta utilización de múltiples genes elude los posibles efectos de recombinación genética o TGH que distorsionan las filogenias basadas en genes únicos. Además, el MLSA puede aclarar la distinción entre especies estrechamente relacionadas, en las que el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA muestra baja resolución, puesto que los genes con los que trabaja esta técnica muestran un mayor grado de divergencia que los genes ribosómicos. Asimismo, Zeigler (2003) afirmó que un pequeño número de secuencias de genes cuidadosamente seleccionados podría igualar, o incluso superar, la precisión de la DDH para cuantificar el nivel de similitud entre dos genomas. No obstante, este método puede enmascarar los diferentes procesos evolutivos que subyacen a los genes individuales y además no se ha establecido cuál es el conjunto de genes y tamaño de fragmentos adecuados para la realización de la técnica, ni tampoco cuál es el grado de variación de las secuencias que se puede utilizar como punto de corte para la delimitación de las especies. (Colston *et al.*, 2014; Schleifer, 2009). Por ello, aunque tales métodos y genes marcadores hayan sido propuestos y científicamente validados, los enfoques basados en genes únicos (16S rRNA y alternativos) o en múltiples (MLSA) aportan menor resolución taxonómica en comparación con aquellos basados en la secuencia completa del genoma.

Por lo tanto, es evidente, considerando la discusión anterior, que el enfoque polifásico tradicional ha proporcionado criterios clave para la delimitación de las especies procariotas, pero también ha recibido importantes críticas por parte de la comunidad científica debido a las numerosas limitaciones que presenta. Estos inconvenientes han desencadenado que numerosos autores en sus publicaciones y simposios (Pujalte *et al.*, 2018; Rodrigo-Torres *et al.*, 2017; Sangal *et al.*, 2016; Pillonel *et al.*, 2015; Meier-Kolthoff *et al.*, 2013; Thompson *et al.*, 2011; Klenk & Göker, 2010) hayan expresado la necesidad de abordar la secuencia genómica en la práctica taxonómica, concluyendo que la taxonomía procariota no puede basarse únicamente en este enfoque polifásico, sino que requiere de un nuevo enfoque que integre también la información genómica, puesto que proporciona un método reproducible, robusto y altamente informativo para inferir las relaciones evolutivas entre los procariotas.

1.4. Introducción de la taxonomía de procariotas en la era genómica

El progreso en el desarrollo de estudios matemáticos y computacionales producidos a mediados de la década de 1990 comenzó una revolución tecnológica que culminó en el desarrollo de las tecnologías de secuenciación masiva (NGS; *Next-Generation Sequencing*), que proyectaron la práctica taxonómica a la era genómica con la posibilidad de establecer estudios taxonómicos basados en la información obtenida a partir de la secuencia completa del genoma, y complementados con las características fenotípicas y quimiotaxonómicas tradicionales (Raina *et al.*, 2018; Thompson *et al.*, 2013).

No obstante, la intención de utilizar las secuencias genómicas con el fin de evaluar las relaciones taxonómicas entre procariotas se remonta varios años atrás al desarrollo de las técnicas NGS. A finales de la década de los 90, Fitz-Gibbons y House (1999) ya propusieron que la presencia o ausencia de genes dentro de los genomas podría utilizarse para determinar las relaciones evolutivas entre los microorganismos. Estudios posteriores (Huson & Steel, 2004; Coenye & Vandamme, 2003; Henz *et al.*, 2003; Wolf *et al.*, 2002; Gupta, 2001; Rokas & Holland, 2000; Snel *et al.*, 1999) también sugirieron que las secuencias genómicas podrían llegar a constituir una importante fuente de parámetros taxonómicos entre los que se incluyen: el orden genético (sintenia), la comparación de rutas metabólicas, la comparación de genes ortólogos y la presencia de inserciones y deleciones y/o polimorfismos de nucleótidos simples en los genes conservados (Ramamamy *et al.*, 2014). Sin embargo, en la década posterior a la secuenciación pionera del genoma de *Haemophilus influenzae* en 1995 (Fleischmann *et al.*, 1995), la secuenciación de un genoma bacteriano o de arquea se llevaba a cabo mediante la técnica de Sanger. Esta técnica pese a haber sido considerada un estándar de referencia en la época, precisa mucho trabajo y una gran inversión económica y de tiempo, por lo que no se pudo adaptar al uso rutinario en la taxonomía microbiana, y por consiguiente, la utilización de las secuencias genómicas para fines taxonómicos no empezó a ser factible hasta alrededor de 2005, cuando las tecnologías NGS tomaron el relevo a la secuenciación de Sanger, promoviendo un método de secuenciación rápido, automatizado y que superó los inconvenientes impuestos por el método tradicional. Sin embargo, seguían presentando una limitación importante: su elevado coste económico (Raina *et al.*, 2018; Chun & Rainey, 2014; Thompson *et al.*, 2013). Por ello, la auténtica revolución de la secuenciación genómica se produjo alrededor del año 2012, cuando la disminución en los costes de las tecnologías NGS junto con los avances producidos en bioinformática promovieron un incremento exponencial del número de genomas depositados en las bases de datos públicas (Vernikos *et al.*, 2015; Sangal *et al.*, 2014). Según el NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) a fecha de julio del 2019 se dispone de un total de 202.097 genomas de bacterias de los cuales 11.171 pertenecen a cepas tipo, 14.647 son completos y 184.928 están ensamblados hasta *scaffolds* o *contigs*. Este incremento ha supuesto un gran progreso en los estudios genómicos, los cuales son cada vez más trascendentes en la taxonomía dada su utilidad para esclarecer las relaciones evolutivas existentes entre los diversos taxones e inferir el potencial metabólico, estructural, funcional y fenotípico de los diferentes microorganismos, sin la necesidad de requerimientos especiales (Tanaka *et al.*, 2018; Mahato *et al.*, 2017; Garrity, 2016; Borris *et al.*, 2011).

La utilización de la genómica para obtener información de la secuencia completa de los genomas y combinarla con el estudio de los parámetros fenotípicos y quimiotaxonómicos tradicionales, ha sido acuñada bajo el término taxogenómica (Ramasamy *et al.*, 2014) y actualmente, este enfoque taxogenómico es el que se recomienda encarecidamente en la taxonomía bacteriana (Chun *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018a).

1.5. Aplicación del enfoque taxogenómico en la delimitación de los taxones bacterianos

Como se ha comentado anteriormente, en la actual era genómica pueden obtenerse fácilmente cantidades masivas de secuencias genómicas de alta calidad mediante un enfoque de secuenciación de alto rendimiento (Teng *et al.*, 2016). Este hecho, junto a la aparición de herramientas bioinformáticas asociadas, ha promovido un cambio radical en la práctica taxonómica, al disponer de nuevas métricas basadas en la comparación de las secuencias genómicas que han permitido la delineación de especies bacterianas de una forma simple, rápida y reproducible. Chun y Rainey (2014) acuñaron para estas nuevas métricas el término Índices de Relación Global del Genoma (OGRIs; *Overall Genome Relatedness Indexes*) y hacen referencia a cualquier medida digital de distancia o similitud que utilice la secuencia completa del genoma para calcular el grado de relación entre dos genomas.

Existen muchos OGRIs en función del algoritmo utilizado. Entre ellos, la identidad promedio de nucleótidos (ANI; *Average Nucleotide Identity*) es el más utilizado para la identificación de especies en la taxonomía procariota (Chun & Rainey, 2014; Arahal, 2014; Sentausa & Fournier, 2013). ANI es un índice de semejanza genómica que representa el promedio de valores de identidad entre múltiples conjuntos de regiones ortólogas compartidas por dos genomas (designados como genoma de consulta y genoma de referencia). Fue propuesto por Konstantinidis y Tiedje (2005) como una medida robusta de la distancia evolutiva, fuertemente correlacionada con la DDH y la secuencia del gen 16S rRNA, para los cuales valores del 95 – 96% ANI se corresponden con valores cercanos al umbral del 70% DDH (Kim *et al.*, 2014a).

Goris *et al.* (2007) introdujeron una variación al método, que es el actualmente utilizado para el cálculo de ANI, que involucra la segmentación *in silico* del genoma de consulta en fragmentos de 1.020 nucleótidos consecutivos para simular la fragmentación del DNA genómico en fragmentos de aproximadamente 1 Kb que se producen durante las reacciones experimentales de la DDH tradicional. A continuación, estos fragmentos de 1020 nt se lanzan contra la secuencia genómica completa del genoma de referencia utilizando el algoritmo de BLASTn (ANiB). Por último, el valor ANI entre el genoma de consulta y el de referencia se calcula como la identidad media de todas las coincidencias de BLASTn que muestran más del 30% de identidad de secuencia global sobre una región alineada de al menos el 70%. Richter y Rosselló-Móra (2009) informaron de que el algoritmo MUMmer (ANIm), que realiza una alineación ultra rápida del genoma, también podía utilizarse en lugar de ANiB para obtener resultados más rápidos sin perder precisión. No obstante, ANiB es más utilizado que ANIm, ya que, a pesar de que ambos algoritmos dan resultados casi idénticos en el rango de alta identidad (80% - 100%), difieren para comparaciones distantes del genoma, donde ANiB parece tener una mejor aplicación. Richter y Rosselló-Móra (2009) también sugirieron que ANI podría utilizarse como una alternativa a la DDH para la demarcación de especies bacterianas superando los inconvenientes que presenta

la técnica tradicional. Asimismo, Tindall *et al.* (2010) también propusieron en una nota taxonómica sobre la caracterización de las cepas procariotas que el índice ANI podría sustituir fácilmente en un futuro los análisis experimentales de hibridación DNA-DNA.

Recientemente, se ha introducido el índice de identidad media de nucleótidos por ortología (OrthoANI) (Lee *et al.*, 2016a) como alternativa al índice ANI, siendo cada vez más empleado en los estudios taxonómicos (a modo de ejemplo Corral *et al.*, 2018, Galisteo *et al.*, 2019, Riesco *et al.*, 2019). Esto se debe a que, como ocurría con la tradicional técnica de hibridación DNA-DNA, los valores obtenidos mediante ANI no son simétricos, pudiendo diferir a veces en más de un 1% dependiendo de qué genoma se utiliza como consulta y cuál como referencia. Por tanto, para superar esta limitación, el algoritmo de OrthoANI fragmenta ambas secuencias genómicas en la misma longitud y calcula el promedio de los valores de identidad entre todos los pares de fragmentos ortólogos compartidos por los dos genomas a estudio (Lee *et al.*, 2016a). Además, otra ventaja que supone este nuevo algoritmo respecto al ANI original es la disminución del tiempo necesario para su cálculo, al no requerir cálculos recíprocos (Yoon *et al.*, 2017).

Otro índice propuesto, para reemplazar de forma rápida y precisa la tradicional técnica de DDH, es la hibridación DNA-DNA *in silico* (isDDH) mediante la herramienta online *Genome-to-Genome Distance Calculator* (GGDC) (Auch *et al.*, 2010). Este algoritmo, a diferencia de ANI, es un índice de relación genómica basado en distancia. El GGDC se basa en el programa *Genome BLAST Distance Phylogeny* (GBDP) para calcular distancias intergenómicas que luego son convertidas en valores de isDDH (Liu *et al.*, 2015). Concretamente, este algoritmo alinea entre sí las dos secuencias genómicas a estudio mediante herramientas de alineación local como BLAST, BLAST+, BLAT o MUMmer, para obtener conjuntos de segmentos de alta puntuación por pares (HSP; *High-scoring segments pairs*) o coincidencias máximas únicas (MUM; *maximally unique matches*) que serán convertidos en valores de distancia mediante una fórmula específica. Al igual que la DDH experimental, el límite de corte para la circunscripción de especies procariotas con la isDDH es del 70%. Además de la demarcación de especies, también es posible utilizar la isDDH para la delimitación de subespecies utilizando como punto de corte un valor del 79% (Mahato *et al.*, 2017; Chun & Rainey, 2014; Meier-Kolthoff *et al.*, 2013). Por otra parte, se ha reportado que los valores de la isDDH derivados del GGDC son preferibles sobre los valores del índice ANI, puesto que el GGDC proporciona una mayor correlación con los resultados de la DDH experimental que cualquiera de las implementaciones de ANI anteriormente explicadas (Liu *et al.*, 2015). De este modo, la isDDH ha sido aplicada con éxito a muchos estudios taxonómicos, siendo un ejemplo de ello las publicaciones de Arahall *et al.*, 2018, Lucena *et al.*, 2017a y 2017b.

MUMi (*Maximally Unique Matches Index*) es otro índice de distancia basado en el número de MUMs de una longitud mínima dada compartida por dos secuencias genómicas, cuyo valor puede variar entre 0, para genomas muy similares, y 1, para genomas muy distantes (Raina *et al.*, 2018). Inicialmente, fue desarrollado para proporcionar una mayor resolución taxonómica a nivel de subespecie, pero hoy en día es utilizado también para estimar la distancia evolutiva entre especies estrechamente relacionadas, a través del cálculo de la proporción de DNA compartido por dos genomas (Ramasamy *et al.*, 2014). Al igual que ANIm, MUMi utiliza el programa MUMMER para una comparación rápida por pares de la secuencia genómica que utiliza segmentos compartidos de al menos 19 pb de longitud (Chun & Rainey, 2014), obteniendo una buena correlación con los valores de ANI (Deloger *et al.*, 2009).

En contraste con el número de OGRIs propuestos y desarrollados para la demarcación de especies, los géneros procariotas continúan vagamente definidos, basados simplemente en la secuencia del gen 16S rRNA. Actualmente, un nuevo género procariota es propuesto si éste forma un grupo monofilético en el análisis filogenético con una divergencia media menor del 6% respecto a la secuencia del gen 16S rRNA entre sus vecinos más próximos y si, además, tiene características fenotípicas únicas que lo diferencien de los géneros más cercanos (Sangal *et al.*, 2016). Se han realizado muy pocos intentos para definir límites genéricos entre procariotas mediante las secuencias genómicas. Konstantinidis y Tiedje (2005) plantearon también el índice de Identidad Promedio de Aminoácidos (AAI; *Average Aminoacid Identity*) para la demarcación de especies bacterianas. Este índice es el equivalente a ANI pero basado en la secuencia de aminoácidos en lugar de la de nucleótidos. Sin embargo, debido a que las secuencias de aminoácidos presentan una menor tasa de evolución que las secuencias nucleotídicas, se concluyó que el índice AAI es más adecuado y ofrece una mejor resolución para el análisis de genomas relacionados de forma distante (Cabal *et al.*, 2018; Rosselló-Móra, 2005). De este modo, Luo *et al.* (2014) demostraron que aquellos microorganismos que pertenecen a géneros relacionados pero diferentes presentan valores de AAI que varían entre el 60 – 80% sin exceder nunca el 85%. Por otra parte, Qin *et al.* (2014) sugirieron el porcentaje de proteínas conservadas (POCP; *Percentage of Conserved Proteins*) entre los genomas como un nuevo índice para evaluar la distancia evolutiva y fenotípica entre los microorganismos. Este índice se calcula mediante la fórmula $[(C1 + C2)/(T1 + T2)] * 100\%$, donde *C1* y *C2* representan el número de proteínas conservadas en los dos genomas que se comparan, respectivamente. Estos valores se obtienen mediante la alineación del genoma de consulta contra el genoma de referencia a través de BLASTp, considerando que las proteínas son conservadas cuando la coincidencia BLASTp muestra un e-valor $< 1e^{-5}$ y una identidad de secuencia superior al 40% en una región alineada de más del 50%. Por último, *T1* y *T2* representan el número total de proteínas en los dos genomas analizados, respectivamente. Por tanto, el valor POCP puede variar de 0 – 100 %, dependiendo del grado de similitud proteica entre los dos genomas bajo estudio. En base a los resultados obtenidos en el estudio genómico basado en el índice POCP realizado por Qin *et al.* (2014), se propuso que aquellas especies pertenecientes a un mismo género deben compartir al menos la mitad de su contenido proteico y por consiguiente, se estableció un valor de POCP del 50% como punto de corte para la delimitación de géneros procariotas, el cual ha sido aplicado en numerosos estudios taxonómicos. Por último, recientemente, también se ha sugerido la utilización del AAI del coregenoma (cAAI) para la demarcación de nuevos géneros procariotas (Wirth & Whitman, 2018). Este parámetro se obtiene calculando la similitud media de las secuencias proteicas de cada uno de los genes ortólogos que se encuentran en el coregenoma de las cepas analizadas. El estudio de Wirth y Whitman (2018) demostró que el cAAI establece de forma exitosa las relaciones entre los taxones que su aplicación para la circunscripción de géneros se ajusta a los mismos criterios propuestos por Luo *et al.* (2014) en el AAI convencional.

1.6. Aplicación del enfoque taxogenómico en la reconstrucción filogenética

La secuencia del genoma no sirve únicamente para la delimitación de los taxones bacterianos sino también para realizar estudios filogenómicos a través de los siguientes análisis:

- **Pangenoma**

El pangenoma es el repertorio genético global de un taxón bacteriano (Tettellin *et al.*, 2005), que se puede dividir en tres partes: I) Coregenoma: son los genes que están presentes en todos los miembros del taxón y que, por lo tanto, son los responsables de los principales aspectos biológicos y rasgos fenotípicos; II) Genoma flexible: aquellos genes compartidos por un subconjunto de las cepas, siendo los responsables de aportar diversidad al codificar rutas bioquímicas alternativas y funciones no esenciales para el crecimiento, pero que a la vez confieren ventajas selectivas al microorganismo que las posee, como pueden ser la adaptación a nuevos nichos, la resistencia a antibióticos o la colonización de nuevos huéspedes; y III) Genoma específico: incluye los genes que son exclusivos de una única cepa (Fournier & Raoult, 2017; Vernikos *et al.*, 2015 ; Xiao *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013).

Por lo tanto, de acuerdo con su definición, el análisis del pangenoma también incluye el estudio de aquellos genes que no son compartidos por todos los miembros del taxón estudiado, y que, con frecuencia, son ignorados por los enfoques filogenéticos de la taxonomía polifásica tradicional, ya que estos enfoques únicamente obtienen conclusiones sobre la base del coregenoma. De esta forma, el estudio del pangenoma proporciona un recurso adicional para abordar la investigación taxonómica, puesto que amplía el contenido de información genética analizado, permitiendo así determinar con mayor grado de precisión las relaciones evolutivas existentes entre las diferentes especies (Ding *et al.*, 2018; Mahato *et al.*, 2017; Marschall *et al.*, 2018). Además, se ha reportado que la evaluación del contenido del genoma flexible puede ser significativo para la demarcación de especies estrechamente relacionadas (Caputo *et al.*, 2015; Méric *et al.*, 2014).

- **Sesgo en el uso de codones**

La degeneración del código genético implica que varios tripletes codifican para el mismo aminoácido; a excepción de los aminoácidos metionina y triptófano que son codificados por tripletes individuales. En este escenario, los tripletes que traducen el mismo aminoácido reciben el nombre de codones sinónimos (Athey *et al.*, 2017; Grantham *et al.*, 1980).

Se ha observado que entre organismos (e incluso entre proteínas dentro de un mismo organismo) existe una preferencia a la hora de utilizar unos codones sobre otros y, por consiguiente, las frecuencias con las que se utilizan los codones sinónimos también varían entre los diferentes organismos. Varios estudios (Kamatani & Shirota, 2017; Mahato *et al.*, 2017; Behura & Severson, 2013; Salim *et al.*, 2008; Willenbrock *et al.*, 2006) han demostrado que esta preferencia no es un proceso aleatorio, sino que está vinculado a una gran variedad de factores, incluyendo la mutación, la selección y la deriva aleatoria como las principales fuerzas que impulsan dicha inclinación hacia la selección de codones sinónimos. Del mismo modo, se ha relacionado con la selección en la eficiencia de transducción, es decir, el uso de los codones está sesgado hacia aquellos tRNA más abundantes o hacia aquellos codones que se ligan a sus respectivos tRNA con más fuerza que otros codones sinónimos. De esta forma, se evita la utilización de codones que se traducen con mayor lentitud y que por tanto son más propensos a incorporar el aminoácido incorrecto. Además, se ha correlacionado de forma positiva con el nivel de expresión genética y con el contenido de G+C (% moles). Por último, otros factores relacionados son la tasa de recombinación, la estabilidad del mRNA, la longitud y estructura secundaria de las proteínas y las condiciones ambientales, entre otros.

Este uso preferencial de unos codones sinónimos sobre otros en el proceso de traducción, se conoce como ‘sesgo en el uso de codones’ y puede ser utilizado para inferir las relaciones evolutivas a través de las similitudes en la utilización del uso de codón en cada especie bacteriana (Behura & Severson, 2013; Bahir *et al.*, 2009), puesto que el sesgo en el uso de codones genera un patrón concreto al seleccionar unos codones específicos frente a otros que codifican los mismos aminoácidos y dicho patrón puede ser específico de cada genoma (Mahato *et al.*, 2017; Athey *et al.*, 2017). A lo largo de los años, se han propuesto diferentes enfoques basados en la distribución estadística de los patrones del uso de codones dentro de los genes, con el fin de cuantificar el sesgo en el uso de los codones sinónimos. Entre los enfoques desarrollados se incluyen: la frecuencia de codones óptimos (Ikemura, 1981); el sesgo de preferencia de codón (McLachlan *et al.*, 1984); la estadística de preferencia del codón (Gribskov *et al.*, 1984); el uso relativo del codón sinónimo (Sharp *et al.*, 1986); el índice de adaptación del codón (CAI) (Sharp y Li, 1987) y el número efectivo de codones (Wright, 1990). Por último, Zeeberg (2002) propuso un método diferente a los anteriores, cuyo principio se basaba en el cálculo de la entropía de cada codón sinónimo para cada aminoácido en la proteína. Sin embargo, todos estos enfoques presentan un inconveniente para la identificación de especies estrechamente relacionadas, ya que la demarcación entre ellas se centra únicamente sobre la base de codones sinónimos. No obstante, actualmente, con el gran avance en el desarrollo de herramientas computacionales es más fácil generar y comparar patrones de sesgo en el uso de codones, incluso entre organismos muy relacionados, a través de tablas de sesgos en el uso de codones que se pueden encontrar online (www.genscript.com/cgi-bin/tools/codon_freq_table) para comparar e identificar nuevas especies.

- **Sintenia**

El análisis del grado de sintenia es otro enfoque de gran utilidad para examinar las relaciones filogenéticas existentes entre las diferentes bacterias (Mahato *et al.*, 2017; Snir, 2016; Mahadevan & Seto, 2010). El término original de sintenia define aquellos loci ubicados en el mismo cromosoma, independientemente de si están o no relacionados genéticamente. Sin embargo, esta definición ha ido evolucionando a lo largo del tiempo y actualmente el concepto de sintenia hace referencia a los loci de genes de diferentes organismos situados en una región cromosómica de ascendencia evolutiva común (Oberto, 2013). En otras palabras, la sintenia es la conservación del orden y la orientación de los genes a lo largo de los cromosomas (o plásmidos) entre las diferentes especies.

De acuerdo con su definición, el grado de sintenia entre los genomas depende de la ascendencia compartida y los intercambios intra- e intercromosómicos (Guerrero *et al.*, 2005). Por tanto, se asume que aquellos organismos estrechamente relacionados, presentarán una disposición y orientación de genes similares entre sí, y, por consiguiente, compartirán un mayor grado de sintenia (Salazar & Abeel, 2018). Para estudiar la sintenia, se han desarrollado multitud de herramientas, tales como SynFind (Tang *et al.*, 2015); SimpleSynteny (Veltri *et al.*, 2016), i-ADHoRe (Proost *et al.*, 2012), MCScanX (Wang *et al.*, 2012c), o SyMAP (Soderlund *et al.*, 2011), cuyo manejo es de gran utilidad para completar los estudios taxonómicos. Así, por ejemplo, la novedad taxonómica de la cepa *Methanocaldococcus bathoardescens* JH146^T, ha sido establecida en base al análisis de sintenia, el cual ha facilitado el proceso para su clasificación y diferenciación respecto a sus vecinos filogenéticamente más cercanos, además de destacar

regiones específicas de los genomas individuales (Stewart *et al.*, 2015). Por otro lado, en un estudio más reciente, el análisis de sintenia ha sido utilizado como fundamento para determinar que la cepa *Mycobacterium* sp. JS623 no pertenece, tal como se había propuesto en un principio, a la especie *M. smegmatis* (García & Gola, 2016). Así pues, tal como se observa en los ejemplos anteriores, el análisis de sintenia puede ayudar a deducir las relaciones evolutivas existentes entre los microorganismos.

- **Genómica funcional**

La genómica funcional es una de las áreas de estudio de la genómica que se encarga de establecer la función biológica de los genes y sus productos (López-López *et al.*, 2005). Aunque en un principio el estudio de la genómica funcional no parezca tener ningún vínculo directo con la taxonomía y sistemática microbiana, lo cierto es que ejerce un papel muy importante a la hora de comprender las relaciones evolutivas entre los microorganismos, puesto que la obtención del perfil funcional de los genomas de los microorganismos analizados, puede ser útil para realizar comparaciones entre diferentes especies bacterianas, mediante el estudio de las vías metabólicas (Mahato *et al.*, 2017). Asimismo, se ha informado que las filogenias basadas en el contenido de las rutas metabólicas, a diferencia de aquellas basadas en genes únicos o multigenes, proporcionan una visión más completa y precisa de la evolución, pues consideran los saltos evolutivos causados por la transferencia, la duplicación, la eliminación y el reemplazo funcional de genes. Además, ayudan también a comprender los mecanismos de adaptación de microorganismos que habitan diversos nichos ambientales (Hong *et al.*, 2004).

Por otra parte, el estudio de la genómica funcional exhibe igualmente un gran potencial para la caracterización taxonómica de las cepas bacterianas (Brbić *et al.*, 2016; Rosselló-Móra & Amann, 2015; Whitman, 2015), ya que la vinculación de un gen a un rasgo fenotípico en particular (incluidos aquellos que informan sobre la ecología y la evolución), proporciona una visión profunda sobre la biología de los microorganismos. El enfoque de inferir el fenotipo en base a la secuencia genómica se conoce como 'fenotipado *in silico*', y constituye una buena alternativa a la caracterización fenotípica tradicional, la cual requiere mucho tiempo y dinero, y además carece de portabilidad puesto que la información fenotípica solo se encuentra disponible en los artículos científicos, libros y manuales, y por consiguiente no es accesible a los análisis automatizados (Brbić *et al.*, 2016; Thompson *et al.*, 2014). Ante esta alternativa, Vandamme y Peeters (2014) propusieron que la descripción de las especies bacterianas debería basarse principalmente en la secuencia completa del genoma, y que habría que realizar únicamente una descripción mínima experimental de las características fenotípicas que son consideradas suficientes, rentables y apropiadas para la descripción de una especie. Del mismo modo, Amaral *et al.* (2014) plantearon un enfoque para la caracterización fenotípica basado en el rastreo del contenido genético, con el que se consiguió predecir con una elevada confianza los rasgos fenotípicos de cada uno de los genomas analizados.

No obstante, es necesario recordar que solo una pequeña fracción de las proteínas que se encuentran en las bases de datos públicas tienen asignada una anotación funcional conocida validada experimentalmente (Weimann, 2016), por lo que, por el momento, y a pesar de los avances que supone la inferencia del fenotipo basado en el genoma, seguirá siendo necesario que dicha inferencia se valide mediante pruebas fenotípicas experimentales.

1.7. Limitaciones del enfoque taxogenómico en la taxonomía de procariontas

Pese a la gran contribución que ha supuesto la aplicación de la secuencia genómica en la taxonomía microbiana, varios autores han señalado también los inconvenientes que presenta su utilización para fines taxonómicos. En 2010, Klenk y Göker (2010) argumentaron que muchos de los principales linajes de procariontas carecían de genomas secuenciados en las bases de datos públicas, ya que los genomas secuenciados y depositados pertenecían mayoritariamente a los filos *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteria*, y, por consiguiente, muchos filos se encuentran poco representados en la genómica. Además, apreciaron que incluso si la secuencia del genoma de la especie de interés se encuentra disponible en la base de datos, en muchos casos esta no se corresponde con la cepa tipo, y, por tanto, debe utilizarse con precaución, ya que la taxonomía procarionta requiere de la cepa tipo como referencia. Dicha apreciación también fue apoyada por Tindall *et al.* (2010). Manteniéndose en esta línea, Zhi *et al.* (2012) argumentaron que a pesar del creciente número de genomas depositados en las bases de datos públicas, estos siguen estando sesgados hacia microorganismos de importancia médica o biotecnológica. Sin embargo, las iniciativas del DOE *Joint Genome Institute* con los proyectos *Genomic Encyclopedia of Bacteria and Archaea* (GEBA; Whitman *et al.*, 2015) e *Integrated Microbial Genomes* (IMG; Markowitz *et al.*, 2014) o la de otros proyectos como *Thousand Microbial Genome* (KMG; Kyrpides *et al.*, 2014), están trabajando para superar dichas limitaciones mediante el objetivo de secuenciar todas aquellas cepas tipo de especies conocidas (Raina *et al.*, 2018 ; Thompson *et al.*, 2014; Whitman, 2015; Sentausa & Fournier, 2013). En consecuencia, se prevé que en un futuro próximo la mayoría, si no todas, las cepas tipo de especie conocidas (> 16.000) dispondrán de su genoma depositado en las bases de datos públicas (Wu *et al.*, 2018). Asimismo, tal y como expone Whitman (2015), estas limitaciones también se verán superadas mediante la propuesta de la inclusión de la secuencia del genoma en las descripciones de nuevas especies. Volviendo a los inconvenientes, Ricker *et al.* (2012) informaron que las secuencias genómicas depositadas en las bases de datos varían enormemente respecto a su calidad final, pudiéndolas encontrar frecuentemente como ensamblados genómicos, que, de acuerdo con Klassen y Currie (2012) son menos informativos que las secuencias del genoma completo. No obstante, este otro inconveniente se ha resuelto de forma exitosa mediante la definición de unos estándares a seguir para obtener una calidad de secuencia del genoma mínima que permita su inclusión en los análisis taxonómicos (Chun *et al.*, 2018).

Por tanto, es evidente que la integración de la información genómica en la taxonomía procarionta proporciona conclusiones más robustas y estables sobre la caracterización y asignación filogenética de los taxones existentes.

2. GENERALIDADES DE LA FAMILIA *RHODOBACTERACEAE*

La familia *Rhodobacteraceae* fue descrita por primera vez por Garrity *et al.* (2005) como el único miembro del orden *Rhodobacterales*. Es una de las principales subdivisiones de la clase *Alphaproteobacteria* (Simon *et al.*, 2017), comprendiendo más de 400 especies distribuidas en más de 100 géneros, los cuales han sido asignados en base a la homología de la secuencia del gen 16S rRNA (www.bacterio.net/index.html), siendo *Rhodobacter* el género tipo.

Los integrantes de la familia *Rhodobacteraceae* presentan una gran diversidad fenotípica, metabólica y ecológica. Comprenden principalmente foto- y quimioheterótrofos aerobios, además de metilótrofos facultativos y bacterias púrpuras no dependientes de azufre, las cuales realizan la fotosíntesis en condiciones anaerobias. Principalmente son bacterias acuáticas, muchas de las cuales requieren el ion sodio u otras sales para el crecimiento. Son bacterias Gram negativas, la mayoría oxidasa positivas, que se dividen por fisión binaria o gemación seguida de crecimiento monopolar. Son móviles por flagelos polares o inmóviles. Algunas presentan pigmentación (debida a bacterioclorofila *a*, Bchl *a*, y carotenoides de la clase esferoidenos). La principal quinona respiratoria es la ubiquinona 10 y el ácido graso mayoritario es C_{18:1} ω7c, que habitualmente constituye más del 50% del total. Respecto a su contenido de G+C moles% es superior al 50%, con solo una excepción conocida (*Pelagicola*, 47 mol%), siendo el rango más frecuente 55 – 70 mol% y el rango total 47 – 76 mol% (Pujalte *et al.*, 2014).

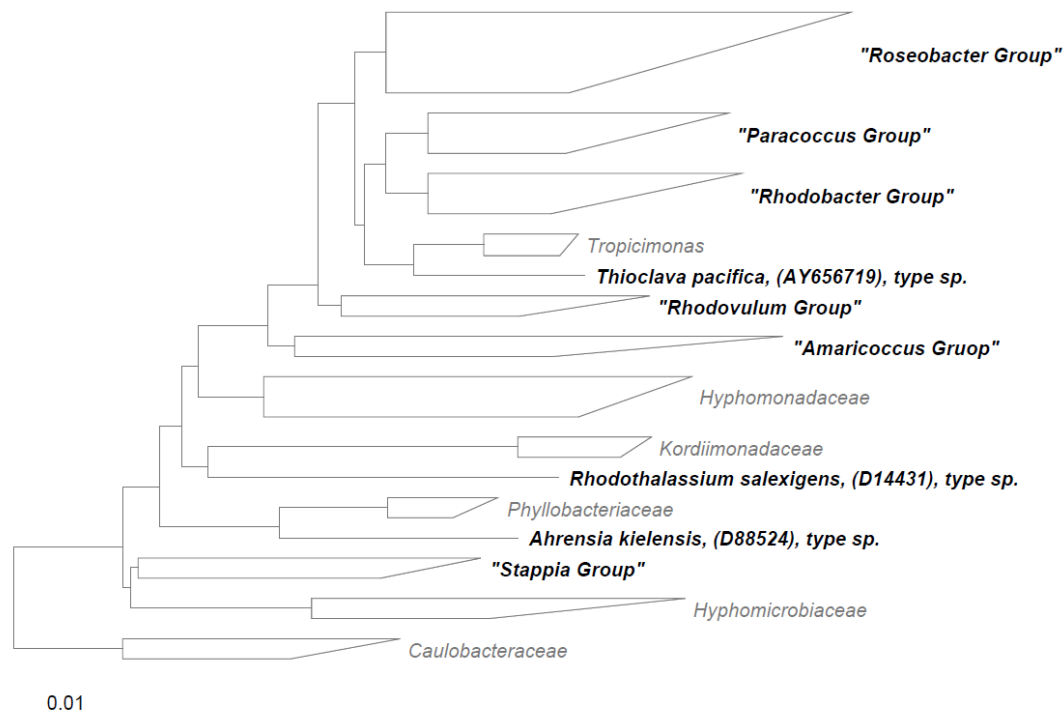


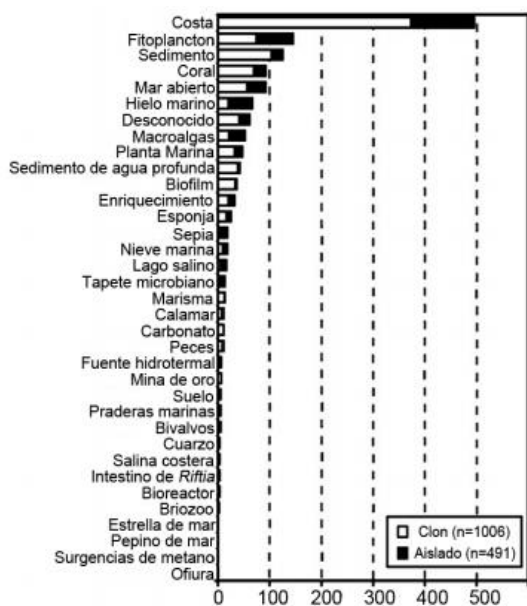
Fig. 2. Reconstrucción filogenética de la familia *Rhodobacteraceae* en base a la secuencia del gen 16S rRNA. La barra de escala indica la divergencia de secuencia estimada. Imagen obtenida de Pujalte *et al.* (2014).

En términos filogenéticos también se caracteriza por ser una familia heterogénea: cómo se puede observar en el árbol filogenético obtenido a partir de la secuencia del gen 16S rRNA (Pujalte *et al.*, 2014) un conjunto de géneros incluidos formalmente dentro de la familia se

posiciona muy alejado filogenéticamente del gran clado que constituyen las verdaderas rhodobacterias (familia *Rhodobacteraceae sensu stricto*) (Fig. 2). Desde el momento de la publicación de Pujalte *et al.* (2014) hasta la actualidad se ha enmendado la descripción de los géneros *Rhodothalassium* y *Ahrensia* que han sido transferidos a las familias *Rhodothalassiaceae* (Venkata *et al.*, 2013) y *Phyllobacteriaceae* (Liu *et al.*, 2016), respectivamente. Del mismo modo, el grupo *Stappia* formado por los géneros *Labrenzia*, *Nesiotobacter*, *Pannonibacter*, '*Polymorphum*', *Pseudovibrio*, *Roseibium* y *Stappia*, podría ser propuesto como una familia adicional '*Stappiaceae*' y el género *Agaricola* podría ser excluido de la familia *Rhodobacteraceae* al relacionarse con la especie *Prosthecomicrobium pneumaticum* (dato no mostrado). Así, los géneros restantes sí que forman un clado monofilético que puede considerarse como la verdadera familia *Rhodobacteraceae*.

▪ **Generalidades del grupo Roseobacter: Filogenia, estilo de vida y hábitat**

El clado Roseobacter, más recientemente denominado como grupo Roseobacter, es un grupo parafilético dentro de *Rhodobacteraceae* (Simon *et al.*, 2017) siendo además uno de los grupos bacterianos más ampliamente distribuidos y abundantes dentro del ecosistema marino, llegando a representar más del 20% del bacterioplancton de las comunidades costeras y del 3 – 5% en las aguas superficiales de los océanos abiertos. Está constituido por aproximadamente 400 especies distribuidas en casi 90 géneros (Pohlner *et al.*, 2017a), aisladas a partir de una gran variedad de ambientes marinos, tales como regiones costeras, océanos abiertos, aguas superficiales, sedimentos costeros y de aguas profundas e hipersalinas, fuentes hidrotermales, y/o nieve marina, entre otros (Fig. 3). Asimismo, se ha reportado que los miembros de este grupo son ubicuos de los océanos templados y polares; en este último se incluyen los hábitats de hielo marino, en donde Roseobacter es un importante filotipo (Tang *et al.*, 2016; Luo &



Moran, 2014; Lenk *et al.*, 2012; Buchan *et al.*, 2005; Sleje *et al.*, 2004). Pese a que frecuentemente se encuentran en un estilo de vida libre en el agua del mar o adheridos a agregados marinos, también es habitual hallarlos asociados a organismos eucariotas superiores como el fitoplancton marino, micro- y macroalgas, así como a numerosos invertebrados marinos como son las esponjas, corales, ostras, cefalópodos (sepias y calamares) y larvas de vieiras.

Fig. 3. Número de aislados o clones pertenecientes al grupo Roseobacter con indicación del origen del muestreo. (Adaptación Buchan *et al.*, 2005).

Varios autores han reportado que muchas de estas interacciones con huéspedes eucariotas representan relaciones de mutualismo. En este escenario, Seyedsayamdost *et al.* (2011) informaron que la especie *Phaeobacter gallaeciensis* promueve el crecimiento del alga unicelular *Emiliania huxleyi* biosintetizando auxinas y antibióticos contra competidores del alga, mientras que *E. huxleyi* produce dimetilsulfoniopropionato (DMSP) que las bacterias pueden

utilizar como fuente de carbono. Del mismo modo, Durham *et al.* (2015) expusieron que *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 presenta una dependencia obligada con la diatomea *Thalassiosira pseudonana* para obtener carbono, mientras que la diatomea obtiene vitamina B₁₂ de la bacteria. Amin *et al.* (2015) también reflejaron que varias especies del género *Sulfitobacter* promueven la división de otra diatomea, concretamente de la especie *Pseudo-nitzschia multiseriis*, mediante la secreción del ácido indolacético, a la vez que bacteria utiliza el triptófano generado por la diatomea. Asimismo se ha observado que los miembros del grupo *Roseobacter* se asocian a la glándula nidamental accesoria de varios cefalópodos, incluyendo *Doryteuthis pealeii*, *Sepia officinalis*, y *Euprymna scolopes*, favoreciendo su reproducción (Collins *et al.*, 2015). Y por último, también parecen jugar un papel importante en la decoloración de los corales al actuar como probióticos contra patógenos (Luo & Moran, 2014). De forma no tan común también se han establecido relaciones de parasitismo, puesto que varios miembros del grupo *Roseobacter* han sido implicados como agentes causantes de la enfermedad de la ostra juvenil en la especie *Crassostrea virginica* (ostra oriental), y de la enfermedad de la banda negra en los corales (Piekarski *et al.*, 2009).

- **Principales rasgos genéticos y metabólicos del grupo *Roseobacter***

El incremento producido en el número de genomas de *Roseobacter* depositados en las bases de datos públicas en los últimos años ha permitido determinar que la mayor parte de los miembros del grupo *Roseobacter*, con excepción de *Roseobacter* sp. HTCC225 y algunos miembros no cultivables, presentan genomas de gran tamaño con un elevado porcentaje de G+C (60% ± 4%) y una gran versatilidad metabólica (Daniel *et al.*, 2018; Luo & Moran, 2014). Una característica genética específica de los roseobácteres es su capacidad para producir agentes de transferencia de genes (GTAs). Los GTAs son partículas similares a los bacteriófagos que transfieren DNA genómico entre diferentes células y que son codificados a partir de un clúster de genes conservado de aproximadamente 15 Kb (Tomasch *et al.*, 2018; Fu *et al.*, 2013).

Los miembros del grupo *Roseobacter* también son muy diversos metabólicamente. Debido a la gran variedad de mecanismos para la adquisición de energía que presentan, son consideradas bacterias mixotróficas puesto que son capaces de obtener carbono y energía mediante procesos quimioorganótrofos, fotoheterótrofos y/o quimiolitótrofos (Newton *et al.*, 2010). Además de la ganancia de energía de forma heterótrofa a partir de la oxidación de la materia orgánica, algunas especies pertenecientes al grupo han sido descritas como bacterias fotoheterótrofas al contener un conjunto de genes fotosintéticos con capacidad para realizar la fototrofia aerobia anoxigénica (AAnP) (Berghoff *et al.*, 2011). Entre este conjunto de genes se incluyen los genes *bch* que codifican las enzimas de la ruta biosintética de la bacterioclorofila *a*, los genes del operón *puf* que codifican las subunidades del complejo de captación de luz y las subunidades L y M del centro de reacción fotosintético. Por tanto, estas bacterias AAnP son capaces de utilizar la luz como fuente de energía, pero siguen requiriendo de un suministro de carbono orgánico, dado que carecen de los genes necesarios para la fijación de carbono, tales como la RuBisCO y/o la fosforibuloquinasa. Asimismo, la utilización de la luz basada en proteorrodopsinas o en xantorrodopsina también se ha encontrado en algunas cepas afiliadas al grupo *Roseobacter* (Tang *et al.*, 2016; Luo & Moran, 2014; Oz *et al.*, 2005).

Además de la capacidad de algunos roseobácteres de obtener energía a partir de la luz, una característica común en este grupo es el metabolismo quimiolitotrófico no obligado como mecanismo de obtención de energía alternativa. Así, numerosas publicaciones (Durham *et al.*, 2014; Luo & Moran, 2014; Cunliffe, 2011; Newton *et al.*, 2010; Buchan *et al.*, 2005; Tolli & Taylor, 2005) han registrado la capacidad de los roseobácteres para oxidar el monóxido de carbono (CO)

presente en la superficie del mar a dióxido de carbono (CO₂), a través de los genes *cox* codificantes para la monóxido de carbono deshidrogenasa, por lo que han sido referidos como organismos carboxidovoros (Cunliffe, 2011). Por otra parte, también se ha reportado (Bakenhus *et al.*, 2018; Tang *et al.*, 2016; Muthusamy *et al.*, 2014; Riedel *et al.*, 2014; Lenk *et al.*, 2012; Meyer *et al.*, 2007; Swingley *et al.*, 2007) su capacidad para oxidar los compuestos reducidos de azufre como fuente de energía, que están presentes en las columnas de agua costeras y/o sedimentos. Este proceso lo llevan a cabo mediante un sistema enzimático periplasmático de oxidación del azufre (Sox) que contiene 15 genes, que oxidan el tiosulfato a dos moléculas de sulfato sin formación de glóbulos de azufre como intermediario. Por último, también se han identificado en la mayoría en los genomas del grupo Roseobacter (Kanukollu *et al.*, 2016; Laass *et al.*, 2014; Luo & Moran, 2014; Piekarski *et al.*, 2009), los genes codificantes para las nitrato y nitrito reductasas desasimilatorias, implicadas en la reducción desasimilatoria del nitrato cuyo objetivo es la producción de energía metabólica al utilizar los compuestos de nitrógeno reducidos como aceptores de electrones alternativos.

Otro rasgo metabólico que encontramos en el grupo Roseobacter es su capacidad para degradar el DMSP, una molécula antiestrés producida en grandes cantidades por el fitoplancton marino (Burkhardt *et al.*, 2017; Onda *et al.*, 2015; Miller & Belas, 2004). El catabolismo de esta molécula se realiza a través de la vía de desmetilación que degrada el DMSP en última instancia a metanotiol y acetaldehído, y/o la vía de degradación que genera como producto final acrilato y sulfuro de dimetilo (DSM), que tiene diversos efectos ambientales; es un quimioatrayente para diferentes animales marinos y sus productos de oxidación actúan como núcleos de condensación, desencadenan la formación de nubes, aumentando el albedo y regulan el clima (Hehemann *et al.*, 2014; Todd *et al.*, 2012). Además, los roseobácteres son el único grupo bacteriano conocido hasta la fecha que posee ambas vías incluso en el mismo organismo, como es el caso de *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 (Moran *et al.*, 2004). Por tanto, la degradación del DMSP por parte del grupo Roseobacter tiene una importante implicación en el ciclo biogeoquímico del azufre y el clima.

Por último, otra característica importante del grupo es su habilidad para producir antibióticos o metabolitos secundarios bioactivos, que pueden estar involucrados en efectos patogénicos o probióticos (D'Alvise, 2014; Sharifah & Eguchi, 2011; Porsby *et al.*, 2008). Así los roseobácteres productores del compuesto antibacteriano ácido tropodietético son de especial interés en la aplicación biotecnológica como bacterias probióticas en la acuicultura marina, especialmente, en las larvas de peces ya que son propensas a las infecciones bacterianas debido a su sistema inmune poco desarrollado y a que los probióticos son una buena alternativa a la utilización de antibióticos que pueden resultar en el desarrollo y propagación de la resistencia a antibióticos (Sonnenschein *et al.*, 2018). Ejemplo de ello es la cepa *Roseobacter* sp. 27-4 que protege a las larvas del rodaballo frente a la especie patógena *Vibrio anguillarum* (Planas *et al.*, 2006), mientras que *Phaeobacter gallaeciensis* tiene efectos similares en las larvas de vieiras (Ruiz-Ponte, 1998), así como también inhibe el crecimiento de este patógeno en cultivos de microalgas y rotíferos, y previene la vibriosis en larvas de bacalao (D'Alvise, 2014). Por otra parte, respecto a los efectos patogénicos en los que están involucrados los miembros de Roseobacter, se ha encontrado que varios aislados pertenecientes a este grupo son capaces de producir toxinas paralizantes de marisco (Gallacher *et al.*, 1997; Lafay *et al.*, 1995).

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Los objetivos planteados en la presente Tesis Doctoral han sido:

1. Realizar la secuenciación genómica de novo, el ensamblado, la anotación y el depósito en bases de datos públicas de aproximadamente 40 cepas tipo correspondientes a especies bacterianas de origen marino que se encuentran disponibles en la base de datos de la Colección Española de Cultivos Tipo.
2. Realizar una inferencia fenotípica mediante el análisis genómico de cada uno de los genomas secuenciados. La contrastación de los resultados de anotación obtenidos en el objetivo previo con los rasgos fenotípicos conocidos para cada cepa permitirá establecer correspondencias, además de resaltar genes y rutas metabólicas que aporten información novedosa sobre el microorganismo.
3. Confirmar, en la medida que sea posible, los rasgos inferidos mediante experimentación con las cepas correspondientes.
4. Llevar a cabo una exploración filogenómica y revisión taxonómica de la familia *Rhodobacteraceae*. Cada uno de los taxones considerados en este estudio será analizado de forma general y en clados menores con el objetivo de esclarecer y mejorar la clasificación dentro de los mismos resolviendo problemas como la diferenciación de clados de especies muy próximas entre sí, sinonimias, propuestas de nuevas especies e incluso géneros. Este análisis es extensible a otras secuencias de dominio público de taxones pertenecientes a *Rhodobacteraceae*.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material: Cepas bacterianas

En el presente estudio se han secuenciado un total de 36 cepas bacterianas pertenecientes a la familia *Rhodobacteraceae* (Tabla 1) procedentes del catálogo público de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

La elección de las cepas de interés para secuenciación se realizó de acuerdo con los siguientes criterios: I) Selección de cepas de origen marino (ecosistema marino en sentido amplio); II) Exclusión de aquellas cepas que ya se encontrasen en las bases de datos de genomas, ensamblados y lecturas genómicas; III) Estudio de la asignación taxonómica para cada cepa, y; IV) Priorización de las cepas tipo de especie frente a aquellas otras adicionales.

Tabla 1. Conjunto de cepas bacterianas de interés secuenciadas en el estudio.

<i>Aliiroseovarius pelagivivens</i> CECT 8811 ^T	<i>Primorskyibacter insulae</i> CECT 8871 ^T
<i>Aquimixticola soesokkakensis</i> CECT 8620 ^T	<i>Pseudoceanicola marinus</i> CECT 7751 ^T
<i>Asciadiaceihabitan donghaensis</i> CECT 8599 ^T	<i>Pseudooctadecabacter jejudonensis</i> CECT 8397 ^T
<i>Boseongicola aestuarii</i> CECT 8489 ^T	<i>Pseudoroseicyclus aestuarii</i> CECT 9025 ^T
<i>Confluentimicrobium lipolyticum</i> CECT 8621 ^T	<i>Pseudoruegeria aquimaris</i> CECT 7680 ^T
<i>Defluviimonas aquaemixtae</i> CECT 8626 ^T	<i>Roseibaca ekhonensis</i> CECT 7235 ^T
<i>Flavimaricola marinus</i> CECT 8899 ^T	<i>Roseisalinus antarcticus</i> CECT 7023 ^T
<i>Limimaricola soesokkakensis</i> CECT 8367 ^T	<i>Roseivivax jejudonensis</i> CECT 8625 ^T
<i>Maliponia aquimaris</i> CECT 8898 ^T	<i>Roseovarius aestuarii</i> CECT 7745 ^T
<i>Marinovum algicola</i> CECT 5396 ^T	<i>Roseovarius albus</i> CECT 7450 ^T
<i>Octadecabacter asciadiaceicola</i> CECT 8868 ^T	<i>Roseovarius gaetbuli</i> CECT 8370 ^T
<i>Pacificibacter marinus</i> CECT 7971 ^T	<i>Roseovarius halotolerans</i> CECT 8110 ^T
<i>Palleronia abyssalis</i> CECT 8504 ^T	<i>Ruegeria arenilitoris</i> CECT 8715 ^T
<i>Palleronia marisminoris</i> CECT 7066 ^T	<i>Ruegeria litorea</i> CECT 7639 ^T
<i>Paracoccus lutimaris</i> CECT 8525 ^T	<i>Ruegeria mediterranea</i> CECT 7615 ^T
<i>Pelagicola litorisediminis</i> CECT 8287 ^T	<i>Ruegeria meonggei</i> CECT 8411 ^T
<i>Pelagimonas varians</i> CECT 8663 ^T	<i>Tropicibacter phthalicus</i> CECT 8649 ^T
<i>Pontivivens insulae</i> CECT 8812 ^T	<i>Yoonia sediminilitoris</i> CECT 8284 ^T

Las cepas *Y. sediminilitoris* CECT 8284^T, *Pa. lutimaris* CECT 8525^T y *Py. aestuarii* CECT 9025^T se incluyeron dentro del proyecto GEBA fase III (Whitman *et al.*, 2015) por lo que el proceso de extracción y secuenciación de DNA genómico de dichas cepas fue realizado por parte del Joint Genome Institute (JGI).

▪ Condiciones de cultivo y conservación

Las cepas de interés se recuperaron a partir de liófilos y se sembraron según las condiciones de crecimiento óptimo indicadas para cada cepa en las fichas disponibles del catálogo de la CECT (Anexo I - A). Generalmente las cepas se cultivaron en placas de Agar Marino (MA, *Marine Agar*) y tubos de Caldo Marino (MB, *Marine Broth*) incubados a 30 °C en condiciones aerobias durante el tiempo especificado para cada cepa en cuestión.

En las ocasiones indicadas se conservaron en stocks mediante la suspensión de las células en MB suplementado con glicerol al 20% (v/v) y conservadas a -80 °C.

La composición de los medios de cultivos utilizados en este trabajo, se encuentra descrita en el Anexo I.

2. Metodología

▪ Confirmación de pureza y obtención de DNA

Con la finalidad de confirmar que las cepas recuperadas eran cultivos puros, se realizó una siembra por triple estría en placas de MA, para así obtener colonias aisladas. Las placas se incubaron bajo las mismas condiciones de cultivo descritas anteriormente (Anexo I). Una vez determinada su pureza y viabilidad, las cepas se resembraron en placas de MA mediante siembra masiva y se procedió a la recogida de biomasa para la extracción de DNA.

La biomasa se recogió en tubos eppendorf estériles de 1,5 ml y se almacenaron a -20 °C durante 24 h.

▪ Extracción de DNA y control de calidad e integridad del DNA extraído

Extracción del DNA genómico

La extracción del DNA se realizó con un sistema de extracción fisicoquímica, *Jena Bioscience Bacteria DNA Preparation Kit* (Diffractia S.L. España), siguiendo el protocolo del fabricante con las siguientes modificaciones: las muestras se incubaron durante 3 horas a 37 °C tras el tratamiento con RNAsa y durante 30 minutos a 65 °C tras la adición de la solución de hidratación.

Control de calidad del DNA extraído

La calidad del DNA genómico extraído se determinó mediante espectrometría: Nanodrop 2000. Este equipo tiene unas lámparas de deuterio que permiten analizar absorbancias a longitudes de onda de 230, 260 y 280 nm. La pureza de las muestras se examinó comprobando que todas ellas presentaran una ratio $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ superior a 1,8 – 2,0 y una concentración superior a 100 ng/ μl .

Valores de absorción comprendidos entre el rango 1,8 – 2,0 se relacionan con un grado de pureza adecuado. Las proteínas absorben a 280 nm (principalmente por residuos de triptófano), de modo que el cociente $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ disminuye al aumentar el nivel de contaminación proteica. Por el contrario, la presencia de otras impurezas, tales como carbohidratos, EDTA y fenol se correlacionan con valores elevados de absorbancia a 230 nm (T042 – *TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers*)

Control de integridad del DNA extraído

La integridad del DNA obtenido se estudió mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) en TBE 0,5%.

Para la verificación de la calidad y pureza de las extracciones de DNA, se cargaron 2 μl de la muestra del DNA extraído junto a 2 μl del tampón de carga 6X (6X *Orange DNA Loading*) en cada pocillo de carga del gel. El último pocillo se cargó con 2 μl del marcador 1 Kb *DNA Ladder*. La electroforesis fue programada a 60 V. durante 1 h. Tras finalizar el proceso de electroforesis, se visualizaron las bandas de DNA obtenidas mediante luz UV con el transiluminador y se tomó una fotografía de la imagen obtenida mediante el captador de imagen.

▪ Secuenciación

La secuenciación de las muestras de DNA obtenido a partir de las cepas de estudio fue realizada por el Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia. La plataforma de secuenciación escogida fue Illumina MiSeq de la compañía Illumina.

En esta plataforma, el proceso de secuenciación comienza con la preparación del *template* que consiste en la construcción y amplificación de la librería de ácidos nucleicos. La librería se prepara a partir de una fragmentación aleatoria del DNA seguida de una ligación de adaptadores específicos de Illumina que se fusionan a los extremos de los fragmentos de DNA permitiendo su adhesión a la célula de flujo. A continuación, los fragmentos de librería son amplificados *in situ* en la superficie de la célula de flujo, mediante una etapa de amplificación en puente para finalmente producir los clústeres de secuenciación. Cada clúster contiene aproximadamente un millón de copias del fragmento original, suficiente para emitir una señal de intensidad óptima para que sea detectada cada que se incorpora un nucleótido durante el paso de secuenciación (Bahassi & Stambrook, 2014; Mardis, 2008).

El sistema de Illumina utiliza un enfoque de secuenciación por síntesis basado en el método del terminador reversible, en el que los cuatro nucleótidos se añaden simultáneamente a los canales de la célula de flujo junto con la DNA polimerasa para su incorporación a la hebra de DNA molde. La clave de este sistema es que los cuatro nucleótidos se encuentran modificados con un fluoróforo reversible en el extremo 3'-OH que hacen que estén químicamente bloqueados, impidiendo que la enzima polimerasa añada más nucleótidos a la nueva cadena hasta que el bloqueo no sea eliminado. Después de cada ciclo de incorporación, se identifica el nucleótido que se ha agregado en cada una de las celdas de la placa mediante excitación del fluoróforo inducida por láser y a continuación se procede a la captación de la imagen. Finalmente, el fluoróforo de cada nucleótido es químicamente eliminado, regenerando así el grupo 3'-OH que queda listo para el siguiente ciclo de incorporación de nucleótidos.

La cobertura de secuenciación alcanzada durante el proceso de secuenciación se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$\frac{\Sigma \text{ nucleótidos de R1} + \Sigma \text{ nucleótidos de R2}}{\text{Longitud del ensamblado}}$$

, donde R1 son las lecturas de secuenciación en sentido directo y R2 en sentido reverso.

- **Procesado de los datos crudos, control de calidad y ensamblado**

Los datos crudos obtenidos en la secuenciación fueron almacenados en formato FASTQ. Para cada una de las cepas secuenciadas se obtuvieron dos archivos (R1 y R2) ya que la secuenciación se realiza desde los extremos de cada fragmento de la librería (*paired-end reads*). En este tipo de archivos a cada nucleótido para una posición *i* se le asigna una probabilidad estimada de error (p_i) representada como una puntuación de calidad (*Q*) mediante la ecuación $Q_i = -10 \log_{10} p_i$. De esta forma, una puntuación de calidad de 20 ($Q_i=20$) asignada a una base *i*, representa una tasa de error de 1 cada 100 ocurrencias con una precisión de *base call* para esa base del 99%.

La calidad de los datos crudos se analizó mediante la herramienta FastQC versión 0.11.3 (Andrews, 2012; www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc) con el objetivo de detectar y eliminar secuencias de marcaje y adaptadores, filtrar segmentos de baja calidad de señal e identificar posibles contaminaciones. Para ello, se analizaron los siguientes parámetros descriptivos proporcionados por el programa:

- Calidad de la secuencia por base: gráfico que muestra la calidad de las bases en función de la posición de lectura. Los datos se consideran de buena calidad si la calidad de la lectura en las distintas posiciones queda dentro de los índices de calidad según Sanger (zona verde; $Q > 20$).
- Calidad por secuencia: Gráfico que representa la distribución de la calidad de las lecturas. Permite observar si existe un subconjunto de secuencias de baja calidad derivadas de un error durante la secuenciación. Los datos se consideran de buena calidad si la calidad media está por encima de 27.
- Contenido de bases por secuencia: Gráfico que informa de la frecuencia de cada base en cada posición de lectura. Al utilizar la plataforma Illumina que utiliza librerías generadas de forma aleatoria, no deberían existir diferencias significativas en la frecuencia de las distintas bases en cada posición de lectura, por lo que las líneas en esta gráfica deberían representarse paralelas entre sí. Se consideran valores de mala calidad cuando la diferencia entre A y T o G y C es mayor del 20% en alguna de las posiciones de lectura.
- Contenido en G+C por secuencia: Gráfico que muestra la distribución de G+C por secuencia. En una librería aleatoria cabe esperar que la distribución observada (roja) y esperada (azul) coincidan.
- Contenido de Ns por base: Gráfico que refleja el porcentaje de *base call* para cada posición de lectura donde se asignó el carácter N. No es extraño encontrar una proporción baja de Ns al final de secuencia. Sin embargo, los datos se consideran de baja calidad si cualquier posición muestra un contenido de Ns $> 20\%$.
- Distribución de la longitud de secuencia: Gráfico que muestra la distribución de los tamaños de las lecturas secuenciadas. Los datos se consideran de buena calidad si la longitud de todas las lecturas es uniforme.
- Secuencias duplicadas: Gráfico que muestra el grado de duplicación de cada secuencia. Los datos se consideran de buena calidad si la mayoría de las lecturas no están duplicadas. Un bajo nivel de duplicación sugiere un alto grado de cobertura de secuenciación. Por el contrario, un alto grado de duplicación (secuencia $> 50\%$ del total) sugiere algún tipo de sesgo de enriquecimiento (por ejemplo, PCR sobre la amplificación).
- Secuencias sobrerrepresentadas: Gráfico que muestra la presencia de secuencias que aparecen en mayor cantidad de la esperada ($> 0,1\%$ del total). Para cada secuencia sobrerrepresentada, el programa busca coincidencias en una base de datos de contaminantes comunes e informa del mejor *hit* obtenido. Los *hits* deben tener al menos 20 pb de longitud y no contener más de 1 *mismatch*. Normalmente suelen corresponderse a las secuencias de adaptadores utilizados en la secuenciación o a los adaptadores de la PCR. Los datos se consideran de buena calidad si todas las secuencias representan menos del 0,1% del total.

Aquellas regiones con una calidad inferior a Q 20 fueron eliminadas mediante la herramienta *FastA/Q Trimmer* versión 0.0.14 disponible en FastX-Toolkit (hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/). FastX-Toolkit es una colección de herramientas de línea de comandos que permite el procesamiento de archivos de lecturas cortas en formato FASTA o FASTQ. El comando empleado para la utilización de la herramienta *FastQ Quality Trimmer* se describe en el Anexo I.

Las secuencias sobrerrepresentadas se eliminaron a través de la herramienta *fastq-mcf* versión 1.04.676 disponible en *ea-utils* (expressionanalysis.github.io/ea-utils/) que también conforma una colección de herramientas de línea de comandos para el procesamiento de secuencias en formato FASTQ. Concretamente *fastq-mcf* detecta los niveles de presencia de adaptadores en las lecturas, calcula las probabilidades y ubicaciones (inicio, final) de la secuencia de adaptador y posteriormente la elimina. El comando empleado para la utilización de la herramienta *fastq-mcf* se describe en el Anexo I.

- **Ensamblado y evaluación de la calidad del ensamblado**

Las lecturas resultantes fueron ensambladas *de novo* mediante el programa SPAdes versión 3.9.0 (Bankevich *et al.*, 2012) en su modo iterativo por defecto.

SPAdes es un ensamblador de secuencias cortas basado en gráficos de Bruijn, donde se representan solapamientos entre subsecuencias de longitud k (*k-mers*) generadas a partir de las lecturas secuenciadas, para crear el ensamblado. SPAdes no genera el ensamblado a partir de un único valor de *k-mer*, sino que lo genera a partir de un combinado de valores de *k-mer* previamente establecidos por el usuario. Esto es ventajoso porque valores pequeños de *k-mer* permiten un aumento de la sensibilidad (aunque pueden resultar en falsas superposiciones), mientras que valores grandes de *k-mer* permiten una mayor especificidad. Por ello, los desarrolladores han sugerido utilizar un amplio rango de tamaños de *k-mer* para crear el ensamblado. Además, SPAdes es capaz de trabajar con cobertura no uniforme e incluye un software (*BayesHammer*) para la corrección de errores y el recorte de calidad antes del ensamblado. Para este estudio se ha utilizado un conjunto de tamaños de *k-mer* de 77, 99 y 127. Los *contigs* resultantes con un tamaño inferior a 500 pb así como aquellos cuya cobertura se desviase de la cobertura media total fueron eliminados del ensamblado. Los comandos utilizados para realizar el ensamblado a través de SPAdes y el filtrado de los *contigs* por tamaño y cobertura, así como los pasos desarrollados para este fin, se especifican en el Anexo I.

La profundidad media del ensamblado se calculó mediante la fórmula: $\frac{Ck \times L}{(L-k+1)}$, donde Ck es la cobertura *k-mer* obtenida en SPAdes ($Ck = \Sigma (\text{cobertura} \times \text{Longitud de todos los contigs del ensamblado}) / \text{Longitud total del ensamblado}$), L es la longitud media de las lecturas tras su procesamiento y k es el tamaño del *k-mer* más grande utilizado en el ensamblado.

La calidad de cada ensamblado fue evaluada usando el programa QUAST versión 4.3.0 (Gurevich *et al.*, 2013). En presencia de una referencia de confianza, QUAST por medio de Nucmer alinea el ensamblado generado en formato FASTA contra la referencia proporcionada y genera una serie de métricas que informan de la calidad del ensamblado. Entre las métricas que proporciona el programa destacan las siguientes:

- Contigs: Número total de *contigs* que contiene el ensamblado.
- Contig más largo: Longitud del *contig* más largo en el ensamblado.
- Longitud total: Número total de bases en el ensamblado.

- **Longitud de referencia:** Número total de bases en el genoma de referencia.
- **N50:** Este parámetro es una medida de la longitud media de un conjunto de secuencias y se define como el valor X para el cual al menos el 50% de las bases ensambladas están contenidas en *contigs* de una longitud X o superior.
- **NG50:** El parámetro NG50 es una medida análoga de la anterior, pero en vez de considerar el 50% del ensamblado, considera el 50% del tamaño del genoma que estamos ensamblando.
- **N75 y NG75:** Análogos a los dos anteriores, pero con un porcentaje del 75% en lugar del 50%.
- **Nº de *contigs* no alineados:** Nº de *contigs* que no se han alineado con el genoma de referencia.

Para seleccionar el ensamblado óptimo con el cual realizar los análisis posteriores, se prestó especial interés a aquel ensamblado que preferiblemente contuviera un número de *contigs* inferior a 200, un valor de N50 preferiblemente superior a 100.000 y que la longitud del ensamblado fuese próxima a tamaño real del genoma de la especie estudiada.

Posteriormente, el grado de integridad y contaminación de los ensamblados seleccionados se analizó mediante el programa CheckM versión 1.0.7 (Parks *et al.*, 2015; www.ecogenomics.github.io/CheckM) utilizando la configuración por defecto. Este programa utiliza un conjunto de genes marcadores de copia única específicos de linaje para estimar el nivel de integridad, contaminación y heterogeneidad que presentan los genomas de estudio. Aquellos ensamblados con un grado de integridad $\geq 90\%$ y una contaminación $\leq 5\%$ se consideran de buena calidad.

Los comandos utilizados para ejecutar QUAST y CheckM se describen en el anexo I.

▪ **Anotación**

La anotación de los genomas obtenidos se realizó en paralelo utilizando el programa Prokka versión 1.12 (Seemann, 2014) y la plataforma web *Rapid Annotation using Subsystem Technology* (RAST) (Aziz *et al.*, 2008) utilizando los parámetros por defecto y como *input* el ensamblado generado a través de SPAdes en formato FASTA.

Prokka es una herramienta de línea de comandos (www.vicbioinformatics.com) basada en programas externos de predicción de función, que permiten identificar las coordenadas de las características genómicas de los *contigs* del ensamblado a estudiar. Las herramientas externas que utiliza son: Prodigal para la predicción de CDS (Hyatt, 2010), RNAmmer para rRNA (Lagesen *et al.*, 2007), Aragorn para tRNA (Laslett & Canback, 2004), SignalP para péptidos de señal líder (Petersen *et al.*, 2011b) e Infernal para la identificación de RNA no codificante (Kolbe & Eddy, 2011). Prokka produce 10 archivos de salida, entre los que destacan el archivo de *contigs* (nucleótidos) en formato FASTA (.fna) y el archivo de genes codificantes traducidos (.faa). El comando empleado para utilizar Prokka se especifica en el Anexo I.

La plataforma RAST (www.rast.nmpdr.org) es un servicio automatizado diseñado para identificar y anotar de forma rápida los genes de los genomas procariontes que desee cargar el usuario en su cuenta. Para ello utiliza una biblioteca de subsistemas basada en familias de proteínas que garantizan un alto grado de consistencia en la asignación de identidad (FIGfams). Además, realiza un análisis de los genes y subsistemas del genoma, mediante técnicas de análisis comparativas y de clasificación de grupos funcionales. Por tanto, el servidor RAST realiza de forma automática una anotación funcional a través de dos estrategias: identificación basada en

el reconocimiento de grupos funcionales de los genes presentes en la secuencia a analizar, y complementa esta información con una segunda estrategia basada en la comparación e integración de subsistemas, permitiendo la reconstrucción de posibles rutas metabólicas.

- **Confirmación de la identidad de los genomas secuenciados**

Tras realizar el proceso de anotación, para asegurar que no se han producido errores de etiquetado o posibles contaminaciones previo y durante el proceso de secuenciación, se llevó a cabo una confirmación de la identidad específica de los genomas secuenciados. Para ello, primero se localizaron los operones del 16S rRNA mediante búsqueda por anotación, y a continuación, se realizó un análisis comparativo de las secuencias 16S rRNA obtenidas frente a aquellas disponibles en la base de datos pública que se encuentra en el servidor *online* EZBioCloud (www.ezbiocloud.net; Kim *et al.*, 2012).

- **Depósito de los genomas en la base de datos públicas**

Los genomas fueron depositados en la *European Nucleotide Archive* (ENA) del *European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute* (EMBL – EBI). Para ello, el *ouput* de Prokka con extensión .gbk fue transformado en formato EMBL mediante un conversor *online* (www.sequenceconversion.bugaco.com) utilizando como alfabeto el DNA. El programa ENA stand-alone-validator se utilizó para comprobar que el archivo EMBL obtenido presentaba el formato adecuado para su depósito. Tras corregir los posibles errores que pudiera tener el archivo EMBL, se depositó mediante Webin que es el sistema de depósito basado en web recomendado por el EMBL para la secuencia de nucleótidos e información de anotación biológica.

- **Análisis filogenómico**

El análisis filogenómico de la familia *Rhodobacteraceae*, se realizó tanto a nivel de secuencia de nucleótidos como a nivel de aminoácidos. Para ello, se descargaron en formato FASTA todas las secuencias genómicas, y las correspondientes secuencias aminoacídicas, de todas aquellas cepas tipo pertenecientes a *Rhodobacteraceae* que estuvieran disponibles en la base de datos *Whole Genome Sequences* (WGS) del NCBI a fecha de marzo del 2018 y a éstas se le sumaron las 36 cepas tipo secuenciadas en la tesis. Por tanto, el análisis filogenómico se realizó con un conjunto final de 224 cepas bacterianas (Tabla S2; Anexo II).

La reconstrucción filogenética se realizó mediante dos aproximaciones diferentes. En la primera de ellas se utilizó la plataforma web CVTree 3.0 (www.tlfe.fudan.edu.cn/cvtree/cvtree; Zuo & Hao, 2015) usando los parámetros predeterminados. Esta plataforma está basada en el enfoque de vectores de composición (CV) que permite la creación de árboles filogenómicos libres de alineamiento. Concretamente CVTree 3.0 infiere la relación evolutiva entre las cepas de estudio en función de la frecuencia de ocurrencia de una longitud fija de oligopéptidos (K) en los proteomas completos. La utilización de este enfoque elude la ambigüedad de elegir marcadores genéticos, soluciona el problema de la TGH y evita la necesidad de alinear las secuencias genómicas con diferente longitud y contenido genético (Hao *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2004). Por el contrario, la segunda aproximación utilizada se basó en la concatenación de 92 genes de copia única del genoma conservado a través del programa *Up-to-date Bacterial Core Genes* (UBCG) versión 3.0 (www.ezbiocloud.net/tools/ubcg; Na *et al.*, 2018) utilizando los parámetros por defecto. Este método estima la solidez de cada rama del árbol final a partir de árboles genéticos individuales. Esto se debe a que el programa genera 92 árboles filogenéticos, uno a partir de cada gen individual que conforman el conjunto de genes con los que trabaja el programa y a

continuación genera el árbol final basado en la alineación múltiple de los 92 genes. Posteriormente se calcula el número de árboles genéticos individuales que apoya cada una de las ramas del árbol final y el valor obtenido se designa como índice de soporte genético (GSI). Así, cuanto más altos sean los valores de GSI, más robusto será el nodo en cuestión. El comando utilizado para ejecutar UBCG se describe en el Anexo I.

De cada aproximación se obtuvieron dos árboles filogenómicos en formato newick (nwk): uno a partir de las secuencias nucleotídicas (fna) y otro a partir de las secuencias aminoacídicas (faa) obtenidas con Prokka. A excepción de UBCG, que para realizar el análisis filogenómico tanto a nivel de nucleótido como de aminoácidos, requiere como *input* las secuencias de nucleótidos en formato FASTA (fna). Las topologías de los árboles fueron visualizadas utilizando el programa MEGA 7 (www.megasoftware.net), utilizando como *outgroup* la cepa *Labrenzia alexandrii* DFL-11^T.

Con los árboles obtenidos se construyó un árbol de consenso estricto, aquel en el cual aparecen solo los grupos monofiléticos presentes en todos los árboles comparados, y un árbol de consenso mayoritario, aquel que incluye los grupos monofiléticos que aparecen en al menos el 50% de los árboles comparados, mediante el programa Dendroscope versión 3.5.9 (www.ab.informatik.uni-tuebingen.de/software/dendroscope; Huson *et al.*, 2007).

▪ Comparaciones basadas en el genoma

Para el procesado de los datos obtenidos en el análisis filogenómico se calcularon los índices de semejanza genómica ANI y isDDH mediante las herramientas web JSpeciesWS (www.jspecies.ribohost.com/jspeciesws; Richter *et al.*, 2016) y GGDC 2.1 (www.ggdc.dsmz.de; Auch *et al.*, 2010) respectivamente, con el fin de delimitar las especies entre las cepas estudiadas.

El índice ANI se calcula mediante comparaciones por pares de genomas, en donde la secuencia del genoma de consulta se divide en fragmentos consecutivos de 1020 nucleótidos. Posteriormente cada uno de estos fragmentos es utilizado para realizar una búsqueda BLASTn contra la secuencia del genoma de referencia. El índice ANI entre el genoma de consulta y el de referencia, se calcula como la identidad promedio de todas aquellas coincidencias BLASTn que mostraron más del 30% de identidad de secuencia sobre una región alineada de al menos el 70% de su longitud. ANI se calculó basándose en el algoritmo de BLAST (ANIb) y en el algoritmo de MUMmer (ANIm). En ambos casos, valores de identidad igual o superior al 95% ANI indican que las cepas analizadas pertenecen a una misma especie.

El método GGDC se basa en el alineamiento local de los dos genomas a estudiar por medio de BLASTn, que produce un conjunto de pares de segmentos de alta puntuación (HSP); la información de estos HSP se transforma en un único valor de isDDH utilizando una fórmula de distancia específica que establece el límite de especie en el 70% de similitud (Auch *et al.*, 2010). Así, valores superiores al 70% isDDH, equivalentes a valores $\geq 95\%$ ANI, indican que las cepas estudiadas pertenecen a la misma especie, mientras que valores inferiores a estos umbrales indican que corresponden a especies diferentes.

Para la delimitación de géneros se calculó el índice AAI para el conjunto completo de taxones a través del servidor online ANI/AAI-Matrix (www.enve-omics.ce.gatech.edu/g-matrix) utilizando como dato de entrada el archivo fasta de aminoácidos obtenido con Prokka. El índice AAI se determinó por pares de genomas, identificando los mejores resultados recíprocos mediante el análisis con el programa Blastp y, a continuación, calculando la puntuación AAI sobre la base de

estos ortólogos. Luo *et al.* (2014) han establecido que aquellas especies pertenecientes a un mismo género muestran valores que típicamente varían en un rango del 60 – 80% AAI.

- **Inferencia fenotípica basada en el genoma**

El conjunto de genomas secuenciados en este estudio se analizó de forma rutinaria mediante las herramientas que proporciona el servidor RAST para explorar rutas metabólicas. También se exploraron manualmente los genes de interés utilizando los ficheros de salida que proporciona PROKKA. En aquellos casos donde fuera necesario una exploración en mayor profundidad se utilizaron los programas bioinformáticos que se detallan a continuación:

BAGEL4

Bagel4 es una herramienta (www.bagel4.molgenrug.nl) que permite la identificación y visualización de los clústeres de genes implicados en la biosíntesis de bacteriocinas modificadas y no modificadas, de compuestos ribosomales no bactericidas y de los péptidos modificados postraduccionalmente y sintetizados por ribosomas (RiPPs) con sus correspondientes bases de datos. Cada base de datos contiene todos los registros que pertenecen a una de las tres clases de proteínas internas de BAGEL4: La clase I contiene RiPPs > 10 KDa, que se divide en más de 12 subclases compatibles; la clase II contiene péptidos no modificados que no se ajustan a los criterios de la primera base de datos, y; la clase III contiene proteínas antimicrobianas de más de 10KDa. BAGEL4 utiliza como dato de entrada las secuencias de nucleótidos en formato FASTA que presenten una longitud superior al umbral establecido (por defecto 3.000 pb). El archivo de entrada se traduce en seis proteínas grandes (una para cada marco de lectura). Posteriormente, las proteínas se criban para detectar la aparición de ciertos motivos proteicos y se lanza BLAST contra la base de datos de péptidos centrales. En base a estos resultados se seleccionan las áreas de interés (AOI) y se combinan aquellas AOI superpuestas. Los ORF de cada AOI son identificados mediante Glimmer3 y se lanzan mediante BLAST contra la base central de péptidos y de anotación para su anotación. Finalmente, los resultados se visualizan en una página html con enlaces a informes detallados por AOI. El informe detallado consiste en una visualización gráfica de los genes (anotados), promotores y terminadores. Además se muestra una alineación si se encontró homología con un registro en la base de datos de péptidos centrales (van Heel *et al.*, 2018 y 2013).

AntiSMASH

AntiSMASH es otro servidor web (www.antismash.secondarymetabolites.org) y herramienta automática para la identificación y el análisis de clústeres de genes biosintéticos de compuestos de metabolitos secundarios como los péptidos no ribosomales sintasa (NRPS), policétidos sintasas (PKS) y otros antimicrobianos (Medema *et al.*, 2011). Este programa se basa en detectar los perfiles de modelos ocultos de Markov (pHMM) en secuencias de genes, y utilizar dominios conservados típicos de enzimas implicadas en metabolitos secundarios como marcadores para la identificación de los posibles clústeres de genes biosintéticos. Además utiliza BLASTp para identificar los clústeres génicos predichos mediante la comparación con las bases de datos COG y PFAM a través del análisis de regiones conservadas de secuencias de genes características. Asimismo, el algoritmo ClusterFinder se usa para detectar agrupamientos de genes putativos de tipos desconocidos. Finalmente, se genera un resultado de html y los agrupamientos de genes putativos se enumeran en una tabla. Los datos de entrada utilizados para el servidor fueron las secuencias nucleotídicas en formato FASTA generadas a partir de PROKKA.

NaPDoS

La herramienta web Natural Product Domain Seeker (NaPDoS) está diseñada para detectar y extraer secuencias homólogas a los dominios cetosintasas y de condensación de las PKS y NRPS respectivamente. Los datos de entrada utilizados fueron las secuencias de aminoácidos en formato FASTA obtenidas a través de Prokka. La plataforma identifica los dominios candidatos KS y C mediante una combinación de HMM y análisis BLAST contra la base de datos de dominios KS y C propia. El resultado obtenido incluye la identificación de la consulta, la mejor coincidencia de la base de datos, el porcentaje de identidad, la longitud de alineación, el valor e y el producto y clasificación de la ruta biosintética asociada con la mejor coincidencia (Ziemert *et al.*, 2012).

PRISM3

PRISM3 (PREdiction Informatics for Secondary Metabolomes) es una aplicación web para la predicción genómica y la dereplicación bio- y quimio-informática de las estructuras químicas de los péptidos no ribosomales y policétidos de tipo I y II. El programa implementa una biblioteca de 479 HMM para identificar los dominios enzimáticos asociados con la biosíntesis y resistencia de los productos metabólicos naturales, y los agrupa en grupos de genes biosintéticos putativos mediante la utilización de un algoritmo codicioso. Los datos de entrada utilizados en PRISM fueron las secuencias de nucleótidos en formato FASTA. Solo los 1000 contigs más grandes se tienen en consideración para el resultado, descartando aquellos de menos de 500 nucleótidos de longitud. El output generado por PRISM es un archivo en formato HTML y JSON donde se especifica una tabla de clústeres identificados dentro de una secuencia enviada por el usuario, incluidos los marcos de lectura abierta biosintéticos de cada grupo codificado por color mediante función putativa, el producto previsto si se conoce y la familia de biosíntesis del clúster (Skinnider *et al.*, 2017).

CRISPRFinder

CRISPRFinder es una herramienta web que permite la detección de secuencias CRISPR (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) a partir de una secuencia de consulta genómica de longitud de hasta 67 Mb en formato FASTA. Los CRISPR constituyen una familia particular de repeticiones constituidas por una sucesión de regiones altamente conservadas (DR; *Direct Repeat*), separadas por secuencias únicas de tamaño similar (espaciadores) de origen generalmente viral. El funcionamiento del programa se puede dividir en cuatro pasos principales: I) Búsqueda de las repeticiones máximas de longitud 23 – 55 pb intercaladas por secuencias de 25 – 60 pb, para obtener posibles localizaciones CRISPR utilizando el programa Vmatch; II) Selección del DR consenso de acuerdo con las ocurrencias de candidatos y un cálculo de puntuación: la puntuación privilegia los *mismatches* internos entre repeticiones directas de un clúster en lugar de los *mismatches* de límites; III) Comprobación del tamaño del DR y espaciadores, y; IV) Eliminación de las repeticiones en tándem utilizando ClustalW para alinear espaciadores. El resultado se resume en una tabla con el número de CRISPR confirmados y cuestionables. Un locus CRISPR se presenta de acuerdo con un código de color que muestra los DR en amarillo y los espaciadores en diferentes colores. Se muestran las posiciones respectivas, además de los enlaces a dos archivos: un resumen de las propiedades mostradas (número de motivos, consenso de DR, posiciones, etc) y un archivo fasta que contiene la lista de espaciadores. Además, un archivo PNG muestra la ubicación de los diferentes candidatos en la secuencia analizada (Grissa *et al.*, 2007).

PHAST

El servidor web PHAST se ha desarrollado para la identificación y anotación de los bacteriófagos, los cuales pueden llegar a representar más del 20% de los genomas bacterianos. Los datos de

entrada utilizados en PHAST fueron las secuencias genómicas en formato FASTA. La detección de los bacteriófagos se realiza mediante búsquedas BLAST contra una base de datos de profagos/fagos. Los genes homólogos a fagos se agrupan en regiones de profagos mediante el programa DBSCAN. Los genes no relacionados con fagos identificados en estas regiones, se anotan mediante una segunda búsqueda BLAST frente a una base de datos de proteínas bacterianas no redundantes, y a las regiones profágicas se les asigna una puntuación de completitud basada en la proporción de genes de fagos en la región identificada. Finalmente el *output* se muestra en la web a través de una variedad de tablas hipervinculadas y mapas cromosómicos coloreados (Zhou *et al.*, 2011).

CARD

La base de datos *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD; www.card.mcmaster.ca) es una colección curada de determinantes de resistencia conocidos y antibióticos asociados, que incluye más de 1.600 antimicrobianos, organizada por la *Antibiotic Resistance Ontology*. Además de la base de datos, CARD también incluye una herramienta predictiva, el identificador de genes de resistencia (RGI), que predice elementos conocidos de resistencia a los antibióticos a partir de datos a escala genómica. Para la utilización de la herramienta RGI (modo por defecto) se utilizaron como datos de entradas las secuencias de nucleótidos en formato FASTA generados a partir de PROKKA. El resultado es un listado de los genes encontrados implicados en la resistencia a antimicrobianos con indicación del % de identidad obtenido, la familia proteica de resistencia antimicrobiana a la que pertenece el gen y el mecanismo de resistencia por el que actúa (Jia *et al.*, 2017a).

- **Validación experimental de los rasgos fenotípicos inferidos**

Análisis de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) a arseniato, arsenito y telurito

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de arseniato, es decir la mínima concentración de Na_3AsO_4 en la cual no se observó crecimiento bacteriano, las cepas de interés se cultivaron en tubos de MB hasta obtener una absorbancia $A_{600\text{nm}} \approx 0.4$ y a partir de ellos se realizaron diluciones seriadas de forma decimal (1:10) en suero salino hasta una dilución 10^{-6} . Las diluciones posteriores a 10^{-3} se expusieron a concentraciones crecientes de Na_3AsO_4 , que oscilaban entre 0 – 15.600 $\mu\text{g/ml}$ (0 – 50 mM). Para ello, a cada una de las concentraciones ensayadas se le aplicó 20 μl de la respectiva dilución del cultivo, repitiéndose este ensayo de dos a tres veces por triplicado. Tras 5 días de incubación, el número de células viables se determinó mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas de MA modificadas con arseniato. Dado que el recuento se realizó por triplicado, los datos se reportaron como el promedio de las UFC/ml medidas y dicho valor se convirtió a escala logarítmica. El mismo procedimiento se realizó para calcular la concentración mínima inhibitoria de arsenito y telurito. En estas ocasiones, las concentraciones de K_2TeO_3 y NaAsO_2 ensayadas, oscilaron en unos rangos entre 0 – 5.120 $\mu\text{g/ml}$ (0 – 20 mM) y de 0 a 2.598 $\mu\text{g/ml}$ (20 mM), respectivamente.

Análisis Phenotype Microarray

El *Phenotype Microarray* (PM) se realizó utilizando microplacas Biolog GEN III, que representan un ensayo de crecimiento desarrollado por Biolog Incorporated (Biolog, Inc., Hayward, CA) que permite testar la utilización de 71 fuentes de carbono (Anexo I) y la realización de 23 ensayos de sensibilidad química (Anexo I; pocillos subrayados). La tecnología *Phenotype Microarray* utiliza la reducción irreversible del violeta de tetrazolio a formazán como informador del metabolismo activo de las células. La reducción del colorante causa un color violeta que se registra con un

dispositivo de carga acoplada cada 15 minutos y proporciona información cuantitativa y cinética sobre la respuesta de las células microbianas en las placas GEN III. Los procedimientos se realizaron según lo indicado por el fabricante (Biolog Inc. USA). La placa contiene un control negativo respecto al ensayo de la utilización de fuentes de carbono y un control positivo respecto al ensayo de sensibilidad química, donde en ambos casos la bacteria se prueba sin ningún sustrato.

Las cepas de interés fueron sembradas, a partir de los stocks de glicerol en placas de MA, y se incubaron durante 5 días a 30 °C. La biomasa obtenida fue recogida de la superficie de las placas MA utilizando un hisopo de algodón estéril. A partir de la biomasa obtenida se generaron suspensiones celulares, mediante la suspensión de las células en 1 ml de los respectivos mixes utilizados (ver composición en Anexo I) a una densidad equivalente al 60% de transmitancia (=0,22 OD). Las suspensiones se inocularon posteriormente en las microplacas apropiadas a un volumen de 100 µl/pocillo. Las microplacas se colocaron en el instrumento OmniLog Reader (Biolog Inc., EEUU) y se incubaron durante 24 h a 30 °C. Las lecturas se realizaron automáticamente cada 15 minutos y los datos se almacenaron para su posterior análisis a través del programa Omnilog-PM (Biolog, Hayward, CA) que genera una curva en el curso del tiempo para la formación del color formazán.

Análisis de datos PM

Para el análisis de los datos del metabolismo de carbohidratos y de la sensibilidad/tolerancia química, se utilizó el programa *opm* (Vaas *et al.*, 2013), un paquete de R, específicamente diseñado para este tipo de análisis. A partir de los datos cinéticos en bruto, generados mediante el programa Omnilog-PM, se calcularon los parámetros descriptivos de la curva (la fase *lag*, λ ; la tasa de respiración, μ ; la altura máxima de la curva, *A*; y el área bajo la curva, AUC) mediante el método *spline*. Una vez estimados, los datos fueron clasificados en base al parámetro *A* (altura máxima de la curva) mediante la agrupación *k*-medias. Esta función se llevó a cabo para clasificar las curvas cinéticas en reacciones positivas, negativas o débiles y, por consiguiente, para proporcionar información sobre la capacidad de las células de estar activas en unas condiciones de cultivo específicas. Los compuestos con un valor de *A* inferior a 184,24 unidades Omnilog se consideraron como no metabolizados, mientras que los valores más altos se asignaron a compuestos que proporcionan niveles crecientes de actividad metabólica: compuestos en el rango entre 184,24 y 275,30 se consideraron como débilmente metabolizados, mientras que aquellos compuestos con un valor superior a 275,30 unidades Omnilog se consideraron que podían ser metabolizados eficientemente por los microorganismos. Respecto al ensayo de sensibilidad química, se utilizó el parámetro IC_{50} generado a partir de Omnilog-PM. Este parámetro se define como el pocillo o la fracción del mismo en el que un determinado parámetro descriptivo de la curva se encuentra en la mitad de su valor máximo en la serie de concentración. El parámetro de referencia utilizado fue el área bajo la curva (AUC). Aquellos compuestos con un valor de AUC superior al IC_{50} del control positivo se consideraron inocuos para el microorganismo, mientras que aquellos otros con un valor inferior, fueron considerados tóxicos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. SECUENCIACIÓN GENÓMICA *DE NOVO*

La búsqueda global de cepas disponibles en el depósito público de la CECT dio como resultado un listado de 3.948 cepas bacterianas (septiembre 2016). Tras la aplicación de los filtros descritos en el Material y Métodos se obtuvo un conjunto final de 36 cepas a secuenciar (Tabla 1), todas ellas incluidas dentro de la familia *Rhodobacteraceae*.

Se escogió esta familia como taxón de interés dado que el grupo de investigación cuenta con experiencia previa en el mismo. Asimismo, escogiendo este grupo se ha tratado de tener un número de cepas disponibles para secuenciar que sea representativo de la diversidad de la familia y que también se ajuste a nuestras capacidades. Además las cepas de este grupo, a diferencia de otras *Alphaproteobacteria* marinas, son fácilmente cultivables lo que las convierte en excelentes modelos para el estudio de la ecología y fisiología de las bacterias marinas generalistas (Piña, 2012).

1.1. Cultivo celular y obtención de DNA

Durante la purificación y aislamiento, todos los cultivos resultaron ser puros, por lo que se procedió a la recogida de biomasa y extracción de DNA. Finalizado este proceso, se analizó la integridad del DNA obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. En todos los patrones electroforéticos obtenidos se pudo observar de forma íntegra el DNA genómico limpio de DNA plasmídico y RNA.

Con respecto al análisis de pureza (Tabla S1; Anexo II) todas las muestras presentaban una concentración de DNA superior a 100 ng/ μ l y una ratio A_{260nm}/A_{280nm} entre 1,8 – 2,0 lo que indica que el DNA extraído es puro, ya que una ratio de aproximadamente 1.8 indica que el DNA presente en la muestra contribuye a la absorbancia total de la misma, reflejando la ausencia de contaminantes. Si la ratio observada es menor a 1.8 puede indicar la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes, los cuales absorben fuertemente cerca de los 280 nm (www.nanodrop.com). Con respecto a esto último, se aprecia que la ratio obtenida para *L. soesokkakensis* CECT 8367^T, *Rb. ekhonensis* CECT 7235^T, *Ru. litorea* CECT 7639^T, *Ru. mediterranea* CECT 7615^T y *Rx. jejudonensis* CECT 8625^T (Tabla S1; Anexo II) era inferior a 1,8. No obstante, pese a repetir el proceso de extracción no se obtuvo un valor de calidad superior, por lo que se secuenciaron pese a no presentar la ratio requerida.

1.2. Secuenciación

Los datos obtenidos en la secuenciación fueron almacenados en formato FASTQ y consistieron en lecturas *paired-end* (PE) obtenidas a partir de la plataforma Illumina MiSeq. Los detalles de cada muestra secuenciada se encuentran representados en la Tabla 2. Se escogió esta tecnología de secuenciación ya que recientemente se ha reportado que puede generar aproximadamente 15 Gpb de datos de secuenciación por *run*, con > 80% de bases por encima de Q 30 y con una elevada profundidad de secuenciación en pequeños genomas (Fang *et al.*, 2015). Además esta estrategia de secuenciación permite tener una baja tasa de error en las lecturas en comparación con otras tecnologías NGS (Mardis, 2008).

En la tabla 2 se puede observar el conjunto de secuencias de lecturas PE derivadas de la secuenciación. La cobertura de secuenciación, es decir el número de veces que cada posición

nucleotídica es leída, fue en todos los casos superior a 50x. Este valor ha sido recientemente establecido por Chun *et al.* (2018) como la cobertura mínima de secuenciación recomendada para el depósito de genomas en las bases de datos públicas.

1.3. Evaluación de los datos brutos obtenidos en la secuenciación

Los errores en las lecturas iniciales pueden ser una de las principales causas de los niveles de fragmentación y errores producidos durante el proceso de ensamblado genómico (Chawla *et al.*, 2016).

Pese a que las lecturas generadas por los secuenciadores de Illumina se caracterizan por presentar una baja tasa de error en el *basecalling* (< 1%), su distribución se incrementa conforme aumenta la longitud de la secuencia (Marçais *et al.*, 2015). Por ello, con el fin de conocer si las lecturas crudas requerían un procesamiento previo al proceso de ensamblado, su calidad fue evaluada mediante la herramienta FastQC.

La exploración de los datos brutos por FastQC permitió observar que la calidad por base de las lecturas no era homogénea dado que presentaban una baja calidad hacia el extremo 3' (Q < 20), requiriendo de recorte selectivo mediante la herramienta *FASTA/Q Trimmer*, y de la eliminación de las secuencias de adaptadores por parte del programa *fastq-mcf*. Los parámetros restantes analizados mediante FastQC fueron correctos.

Tras este procesamiento, la calidad de las lecturas volvió a ser examinada por FastQC. Los resultados para este segundo análisis mostraron que todos los parámetros analizados alcanzaron un nivel satisfactorio reflejando que el conjunto de secuencias era de buena calidad y con un porcentaje de bases equilibrado: La calidad por base fue alta y homogénea en todas las lecturas, no hubo Ns en ninguna de las posiciones de las secuencias analizadas, al igual que tampoco se encontraron secuencias sobrerrepresentadas o altamente repetitivas. Además, el porcentaje de bases nucleotídicas presentes en los genomas a estudio coincidió con los analizados en la secuenciación, al igual que la distribución teórica del contenido G+C coincidió con la existente en los genomas a estudio.

Estos resultados demuestran la necesidad del procesamiento de las secuencias crudas con el objetivo de mejorar su calidad y ensamblado posterior y están conforme a la bibliografía donde se expone que la utilización de las lecturas sin procesar tiende a ser perjudicial para los análisis NGS, dado que pueden agregar secuencias poco fiables y potencialmente aleatorias al conjunto de datos, conduciendo a falsas interpretaciones de los mismos (Del Fabbro *et al.*, 2013; Patel & Jain, 2012).

1.4. Evaluación de la calidad de los ensamblados

El éxito del proceso de ensamblado se ve reflejado en la contigüidad, consistencia y precisión del ensamblado del genoma construido. Para evaluar dichas características y por tanto analizar la calidad de los ensamblados se empleó el programa QUAST. Los resultados obtenidos en este análisis (Tabla 2) reflejan la formación de ensamblados mínimamente fragmentados y por ende de buena calidad. Esto es debido a que en todos los casos la longitud total del ensamblado fue próxima al tamaño del genoma de la especie en cuestión, el número de *contigs* fue inferior a 200 y el valor de N50, parámetro utilizado principalmente para evaluar la contigüidad del genoma, superior a 100.000. Respecto a este último parámetro hubo dos excepciones (*Rs*.

antarcticus CECT 7235^T y *Rv. gaetbuli* CECT 8370^T) que no cumplieron con el criterio establecido. Pese repetir varias veces el ensamblado cambiando los parámetros del programa para mejorar la calidad del mismo, no se consiguió un valor N50 superior a 100.000, por lo que se decidió aceptar el ensamblado, para cada una de ellas, con los valores de calidad que más se acercó a los óptimos.

Tabla 2. Información de secuenciación y ensamblado de las cepas de estudio. *Al. pelagivivens* CECT 8811^T; *Aq. soesokkakensis* CECT 8620^T; *As. donghaensis* CECT 8599^T; *B. aestuarii* CECT 8489^T; *C. lipolyticum* CECT 8621^T; *D. aquaemixtae* CECT 8626^T; *F. marinus* CECT 8899^T; *Y. sediminilitoris* CECT 8284^T; *L. soesokkakensis* CECT 8367^T; *Ml. aquimaris* CECT 8898^T; *Mr. algicola* CECT 5396^T; *O. ascidiaceicola* CECT 8868^T; *P. marinus* CECT 7971^T; *Pl. abyssalis* CECT 8504^T; *Pl. marisminoris* CECT 7066^T; *Pa. lutimaris* CECT 8525^T; *Pc. litorisediminis* CECT 8287^T; *Pm. varians* CECT 8663^T; *Po. insulae* CECT 8812^T; *Pr. insulae* CECT 8871^T; *Ps. marinus* CECT 7751^T; *Pd. jejudonensis* CECT 8397^T; *Py. aestuarii* CECT 9025^T; *Pg. aquimaris* CECT 7680^T; *Rb. ekhonensis* CECT 7235^T; *Rs. antarcticus* CECT 7023^T; *Rx. jejudonensis* CECT 8625^T; *Rv. aestuarii* CECT 7745^T; *Rv. albus* CECT 7450^T; *Rv. gaetbuli* CECT 8370^T; *Rv. halotolerans* CECT 8110^T; *Ru. arenilitoris* CECT 8715^T; *Ru. meonggei* CECT 8411^T; *Ru. litorea* CECT 7639^T; *Ru. mediterranea* CECT 7615^T; *Tr. phthalicus* CECT 8649^T.

Nº CECT	Estadísticos secuenciación		Estadísticos ensamblados				
	Lecturas	Cobertura secuenciación	Nº <i>contigs</i>	Max. <i>contigs</i>	Long. total	N50	Cobertura ensamblado
5396 ^T	1.696.672	96	63	888.700	5.304.586	203.721	77
7023 ^T	1.298.984	76	155	647.843	5.002.715	160.186	60
7066 ^T	1.030.370	82	33	752.518	3.750.464	321.249	65
7235 ^T	2.198.168	168	196	199.035	3.901.528	73.264	167
7450 ^T	1.863.204	130	39	549.253	4.287.842	293.852	110
7615 ^T	2.034.290	115	49	669.759	5.278.962	321.536	85
7639 ^T	1.268.100	81	18	2.811.949	4.691.634	2.811.949	68
7680 ^T	636.572	52	60	293.886	3.691.014	114.539	42
7745 ^T	1.902.390	110	82	663.074	4.810.238	191.076	88
7751 ^T	2.017.398	132	34	805.837	4.533.138	541.850	107
7971 ^T	1.359.438	104	43	674.172	3.914.648	240.692	90
8110 ^T	1.561.630	125	14	1.420.803	3.725.543	821.111	103
8284 ^T	*	*	48	1.029.558	4.668.516	208.218	*
8287 ^T	1.941.344	144	39	709.333	3.998.736	397.939	124
8367 ^T	2.290.776	173	43	559.732	3.936.691	423.709	138
8370 ^T	1.535.950	111	144	244.897	4.130.403	75.187	99
8397 ^T	1.810.206	157	15	1.043.057	3.412.627	3.412.629	130
8411 ^T	1.660.170	109	33	535.168	4.543.068	403.937	94
8489 ^T	3.450.944	200	69	594.630	4.001.270	235.871	264
8504 ^T	1.645.514	111	49	735.893	4.404.602	356.211	64
8525 ^T	*	*	92	542.018	4.206.165	156.596	*
8599 ^T	2.581.128	189	7	3.729.116	4.077.640	3.729.116	137
8620 ^T	1.404.468	120	32	617.776	3.490.749	264.700	99
8621 ^T	3.526.000	210	11	1.745.820	3.877.740	1.745.064	199
8625 ^T	1.976.692	137	21	1.037.545	4.312.868	618.761	110
8626 ^T	2.393.286	169	18	2.410.600	4.235.016	2.410.600	110
8649 ^T	3.622.400	170	17	2.088.212	4.814.893	1.632.373	155
8663 ^T	1.970.884	92	59	471.884	4.897.107	195.460	88
8715 ^T	2.791.150	165	11	1.485.757	3.871.907	790.957	155
8811 ^T	2.484.688	223	4	2.500.797	3.725.379	2.500.797	181
8812 ^T	2.496.318	210	10	1.118.895	3.547.102	996.947	176
8868 ^T	2.944.742	210	11	1.067.346	3.233.060	677.144	199
8871 ^T	1.885.988	141	28	1.100.942	4.006.290	350.329	94

Nº CECT	Estadísticos secuenciación		Estadísticos ensamblados				
	Lecturas	Cobertura secuenciación	Nº contigs	Max. contigs	Long. total	N50	Cobertura ensamblado
8898 ^T	3.215.792	133	56	614.629	5.313.976	327.888	124
8899 ^T	3.795.628	179	56	1.423.956	4.792.571	404.368	167
9025 ^T	*	*	26	1.005.852	3.444.313	906.490	*

*Dato desconocido: Cepas secuenciadas por parte del JGI

Además, se analizó el grado de integridad y contaminación de los ensamblados generados a través del programa CheckM. Los resultados obtenidos en este análisis indicaron que los grados de completitud y de contaminación obtenidos se encontraron siempre dentro del rango de valores aceptables establecidos por Parks (2015).

1.5. Confirmación de la identidad específica de los genomas secuenciados

Con la finalidad de comprobar que las identidades de las cepas bajo estudio se corresponden con la identidad de los genomas secuenciados y ensamblados, se realizó un análisis comparativo de las secuencias del gen 16S rRNA de las cepas de estudio frente a la base de datos pública que se encuentra en el programa informático en línea EzBioCloud (www.ezbiocloud.net). Los resultados de este análisis (Tabla 3) corroboraron que la identidad de los genomas secuenciados se correspondía con la asignación taxonómica esperada de cada cepa al presentar un nivel de semejanza del 100% entre las respectivas secuencias del gen 16S rRNA y por lo tanto no se han producido errores durante la secuenciación. Tan solo cuatro resultados fueron ligeramente inferiores (99,7 a 99,9%) pero cabe achacarlos a errores en las secuencias de referencia.

Tabla 3. Cepas utilizadas durante el trabajo con indicación de la semejanza de su secuencia 16S rRNA con la cepa tipo más próxima en EzBioCloud.

Cepa	% Semejanza	Identificación EzBioCloud
<i>Al. pelagivivens</i> CECT 8811 ^T	100,0	<i>Al. pelagivivens</i> GYSW-22 ^T
<i>Aq. soesokkakensis</i> CECT 8620 ^T	100,0	<i>Aq. soesokkakensis</i> DSSK2-3 ^T
<i>As. donghaensis</i> CECT 8599 ^T	100,0	<i>As. donghaensis</i> RSS1-M3 ^T
<i>B. aestuarii</i> CECT 8489 ^T	100,0	<i>B. aestuarii</i> BS-W15 ^T
<i>C. lipolyticum</i> CECT 8621 ^T	100,0	<i>C. lipolyticum</i> SSK1-4 ^T
<i>D. aquaemixtae</i> CECT 8626 ^T	100,0	<i>D. aquaemixtae</i> CDM-7 ^T
<i>F. marinus</i> CECT 8899 ^T	100,0	<i>F. marinus</i> MDM-7 ^T
<i>L. soesokkakensis</i> CECT 8367 ^T	100,0	<i>L. soesokkakensis</i> DSSK1-5 ^T
<i>Ml. aquimaris</i> CECT 8898 ^T	100,0	<i>Ml. aquimaris</i> MM-10 ^T
<i>Mr. algicola</i> CECT 5396 ^T	100,0	<i>Mr. algicola</i> DSM 10251 ^T
<i>O. ascidiaceicola</i> CECT 8868 ^T	100,0	<i>O. ascidiaceicola</i> RA1-3 ^T
<i>P. marinus</i> CECT 7971 ^T	100,0	<i>P. marinus</i> HDW-9 ^T
<i>Pa. lutimaris</i> CECT 8525 ^T	100,0	<i>Pa. lutimaris</i> HDM-25 ^T
<i>Pc. litorisediminis</i> CECT 8287 ^T	100,0	<i>Pc. litorisediminis</i> D1-W8 ^T
<i>Pd. jejudonensis</i> CECT 8397 ^T	100,0	<i>Pd. jejudonensis</i> SSK2-1 ^T
<i>Pg. aquimaris</i> CECT 7680 ^T	100,0	<i>Pg. aquimaris</i> SW-255 ^T
<i>Pl. abyssalis</i> CECT 8504 ^T	99,9	<i>Pl. abyssalis</i> 221-F1 ^T
<i>Pl. marisminoris</i> CECT 7066 ^T	100,0	<i>Pl. marisminoris</i> DSM 26347 ^T
<i>Pm. varians</i> CECT 8663 ^T	100,0	<i>Pm. varians</i> SH4-1 ^T
<i>Po. insulae</i> CECT 8812 ^T	100,0	<i>Po. insulae</i> GYSW-23 ^T

Cepa	% Semejanza	Identificación EzBioCloud
<i>Pr. insulae</i> CECT 8871 ^T	100,0	<i>Pr. insulae</i> SSK3-2 ^T
<i>Ps. marinus</i> CECT 7751 ^T	100,0	<i>Ps. marinus</i> AZO-C ^T
<i>Py. aestuarii</i> CECT 9025 ^T	100,0	<i>Py. aestuarii</i> DB-4 ^T
<i>Rb. ekhonensis</i> CECT 7235	100,0	<i>Rb. ekhonensis</i> EL-50 ^T
<i>Rs. antarcticus</i> CECT 7023 ^T	100,0	<i>Rs. antarcticus</i> EI-88 ^T
<i>Ru. arenilitoris</i> CECT 8715 ^T	100,0	<i>Ru. arenilitoris</i> G-M8 ^T
<i>Ru. litorea</i> CECT 7639 ^T	100,0	<i>Ru. litorea</i> R37 ^T
<i>Ru. mediterranea</i> CECT 7615 ^T	99.7	<i>Ru. mediterranea</i> M17 ^T
<i>Ru. meonggei</i> CECT 8411 ^T	100,0	<i>Ru. meonggei</i> MA-E2-3 ^T
<i>Rv. aestuarii</i> CECT 7745 ^T	100,0	<i>Rv. aestuarii</i> SMK-122 ^T
<i>Rv. albus</i> CECT 7450 ^T	100,0	<i>Rv. albus</i> 4SM10 ^T
<i>Rv. gaetbuli</i> CECT 8370 ^T	100,0	<i>Rv. gaetbuli</i> YM-20 ^T
<i>Rv. halotolerans</i> CECT 8110 ^T	99.9	<i>Rv. halotolerans</i> HJ50 ^T
<i>Rx. jejudonensis</i> CECT 8625 ^T	100,0	<i>Rx. jejudonensis</i> CDM-17 ^T
<i>Tr. phthalicus</i> CECT 8649 ^T	99.9	<i>Tr. phthalicus</i> KU27E1 ^T
<i>Y. sediminilitoris</i> CECT 8284 ^T	100,0	<i>Y. sediminilitoris</i> D1-W3 ^T

Tras confirmar la identificación de las cepas secuenciadas a estudio, sus respectivos ensamblados fueron depositados en el DDBJ/EMBL/GenBank bajo los números de acceso indicados en el anexo II.

2. ANÁLISIS GENÓMICO E INFERENCIA FENOTÍPICA

2.1 Organización y contenido del genoma

El contenido genómico de *Rhodobacteraceae* ha sido abordado en anteriores revisiones y artículos de investigación (Newton *et al.*, 2010; Slightom & Buchan, 2009; Brinkhoff *et al.*, 2008; Moran *et al.*, 2007), en la presente tesis se actualiza su estado incluyendo 36 cepas tipo de especies de *Rhodobacteraceae* cuyas secuencias genómicas no se encontraban disponibles en las bases de datos públicas. Los rasgos generales para los genomas de las cepas secuenciadas se encuentran representados en la tabla 4. El tamaño de los genomas secuenciados en este estudio se encuentra dentro de un rango que va desde los 3.2 a 5.3 Mb, siendo típico del grupo Roseobacter (*Rhodobacteraceae*) y similar a otras cepas de bacterias marinas generalistas. Este mayor tamaño del genoma refleja el estilo de vida generalista y el potencial metabólico registrado para estas bacterias (Collins *et al.*, 2015; Newton *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2010). Cada genoma hospeda una media total de 4.043 genes codificantes de proteínas (CDS) con un contenido medio de G+C mol% del 61%. Ambos valores están conforme a lo establecido en la literatura (Pujalte *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2010). Los datos observados en la tabla también sugieren que ha habido una posible pequeña pérdida de genes (o decaimiento del genoma) lo que ha podido ocurrir por asociación cercana con otros organismos, tales como microalgas, macroalgas, esponjas y/o corales (Simon *et al.*, 2017).

Tabla 4. Características genómicas de las cepas de estudio. Con indicación del tamaño del genoma en Mbp, contenido de G+C (mol%), contenido de genes codificantes de proteínas, rRNA, y tRNA. El % de genes perdidos, respecto a sus ancestros, se muestra en base a las predicciones obtenidas con RAST. *Al. pelagivivens* CECT 8811^T; *Aq. soesokkakensis* CECT 8620^T; *As. donghaensis* CECT 8599^T; *B. aestuarii* CECT 8489^T; *C. lipolyticum* CECT 8621^T; *D. aquaemixtae* CECT 8626^T; *F. marinus* CECT 8899^T; *Y. sediminilitoris* CECT 8284^T; *L. soesokkakensis* CECT 8367^T; *Ml. aquimaris* CECT 8898^T; *Mr. algicola* CECT 5396^T; *O. ascidiaceicola* CECT 8868^T; *P. marinus* CECT 7971^T; *Pl. abyssalis* CECT 8504^T; *Pl. marisminoris* CECT 7066^T; *Pa. lutimaris* CECT 8525^T; *Pc. litorisediminis* CECT 8287^T; *Pm. varians* CECT 8663^T; *Po. insulae* CECT 8812^T; *Pr. insulae* CECT 8871^T; *Ps. marinus* CECT 7751^T; *Pd. jejudonensis* CECT 8397^T; *Py. aestuarii* CECT 9025^T; *Pg. aquimaris* CECT 7680^T; *Rb. ekhonensis* CECT 7235^T; *Rs. antarcticus* CECT 7023^T; *Rx. jejudonensis* CECT 8625^T; *Rv. aestuarii* CECT 7745^T; *Rv. albus* CECT 7450^T; *Rv. gaetbuli* CECT 8370^T; *Rv. halotolerans* CECT 8110^T; *Ru. arenilitoris* CECT 8715^T; *Ru. meonggei* CECT 8411^T; *Ru. litorea* CECT 7639^T; *Ru. mediterranea* CECT 7615^T; *Tr. phthalicus* CECT 8649^T

Nº CECT	Tamaño genoma (Mbp)	Contenido GC (%)	Contenido CDS	Contenido rRNA	Contenido tRNA	Posibles genes perdidos (% del total)
5396 ^T	5.3	65.04	5068	3	49	29 (0.5)
7023 ^T	5.0	66.72	4706	3	50	40 (0.8)
7066 ^T	3.7	66.35	3666	3	54	59 (1.6)
7235 ^T	3.9	61.62	3888	3	45	13 (0.3)
7450 ^T	4.2	54.33	4170	3	44	5 (0.1)
7615 ^T	5.2	58.87	5006	6	51	8 (0.2)
7639 ^T	4.6	59.16	4494	5	51	20 (0.4)
7680 ^T	3.6	66.65	3591	5	48	29 (0.8)
7745 ^T	4.8	57.92	4596	3	48	44 (0.9)
7751 ^T	4.5	66.76	4211	3	45	63 (1.5)
7971 ^T	3.9	52.05	3812	3	43	11 (0.2)
8110 ^T	3.7	63.79	3637	3	44	38 (1.0)
8284 ^T	4.7	57.22	4610	3	41	20 (0.4)

Nº CECT	Tamaño genoma (Mbp)	Contenido GC (%)	Contenido CDS	Contenido rRNA	Contenido tRNA	Posibles genes perdidos (% del total)
8287 ^T	3.9	57.13	3905	3	42	15 (0.4)
8367 ^T	3.9	67.00	3685	6	53	84 (2.2)
8370 ^T	4.1	60.38	3930	3	42	37 (0.9)
8397 ^T	3.4	59.56	3346	3	43	5 (0.1)
8411 ^T	4.5	57.30	4471	3	45	12 (0.3)
8489 ^T	4.0	57.91	4014	3	41	15 (0.4)
8504 ^T	4.4	64.08	4309	4	51	28 (0.6)
8525 ^T	4.2	65.18	4030	3	44	23 (0.5)
8599 ^T	4.0	55.26	4028	6	42	15 (0.4)
8620 ^T	3.4	61.41	3319	3	48	17 (0.5)
8621 ^T	3.8	57.73	3759	6	46	12 (0.3)
8625 ^T	4.3	67.98	4087	3	49	66 (1.6)
8626 ^T	4.2	64.45	4133	3	47	23 (0.6)
8649 ^T	4.8	57.89	4710	6	49	16 (0.3)
8663 ^T	4.8	55.19	4740	3	47	22 (0.5)
8715 ^T	3.8	61.27	3791	3	49	21 (0.5)
8811 ^T	3.3	58.11	3216	3	44	2 (0.1)
8812 ^T	3.5	59.89	3501	3	43	13 (0.4)
8868 ^T	3.2	54.92	3288	3	39	5 (0.1)
8871 ^T	4.0	60.36	3840	3	45	17 (0.4)
8898 ^T	5.3	67.18	5078	3	54	46 (0.9)
8899 ^T	4.7	52.23	4550	3	48	22 (0.5)
9025 ^T	3.4	69.15	3358	3	46	42 (1.3)

Una característica genética común a todos los miembros de la familia *Rhodobacteraceae* es su versatilidad a nivel de arquitectura genómica, que puede abarcar desde un solo cromosoma en *Planktomarina temperata* (Voget *et al.*, 2015), a un replicón extracromosómico (ERC) adicional en *Ruegeria pomeroyi* (Moran *et al.*, 2004), hasta una decena coexistentes en *Marinovum algicola* (Pradella *et al.*, 2010). Los ERC comprenden cósmidos y plásmidos (Simon *et al.*, 2017). El mantenimiento de estos plásmidos en bajo número de copias en una misma célula, está garantizado por los sistemas de replicación compatibles, que normalmente comprenden una replicasa, un operón bicistrónico con dos genes de partición (*parA* y *parB*) que media el anclaje coordinado de los replicones en los polos celulares durante la división celular, y el origen de replicación (*oriV*) ubicado en módulos compactos tal y como se muestra en la figura 4 (Bartling *et al.*, 2017; Petersen *et al.*, 2013). En *Rhodobacteraceae* se han identificado 4 sistemas de replicación (RepA, RepB, RepABC y DnaA-like) en base a sus replicasas no homologas, con más de 20 grupos de compatibilidad diferentes. RepABC ha sido probablemente el sistema de replicación más estudiado y está presente exclusivamente en la clase *Alphaproteobacteria*: es frecuente en *Rhizobiales*, *Rhodobacterales*, *Rhodospirillales* y *Caulobacterales*, mientras que en *Rickettsiales* no ha sido identificado. Está formado por tres genes, los genes de división *repA* y *repB*, así como el gen de replicación *repC*, estando dispuestos en un operón característico, *repABC*. La estructura de este módulo coincide con la localización del origen de replicación dentro de la parte que codifica la proteína replicasa (*repC*) y la presencia de un ARN antisentido regulador entre *repB* y *repC*. El sistema RepA/RepB del sistema de replicación RepABC es homólogo al sistema de partición universal ParA/ParB del cromosoma bacteriano y otros plásmidos tripartitos. Respecto a distribución de los demás sistemas de replicación, DnaA-like exhibe una distribución natural aún más pequeña que RepABC, restringida a *Rhodobacterales*, mientras que los plásmidos de tipo RepA y RepB tienen un rango de hospedadores más amplio,

y también están presentes en *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* (Petersen *et al.*, 2013).

Los módulos de replicación de las cepas analizadas fueron identificados mediante búsqueda BLASTp de las replicasas RepA (YP_006564734.1), RepB (YP_006564673.1) y DnaA-like (YP_006575239.1) de *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 y de la replicasa RepABC (YP_001542300.1) de *Dinoroseobacter shibae* DSM 16493^T en los genomas a estudio. Los diferentes tipos de sistemas de replicación fueron encontrados, con un % de cobertura >70% y un valor de identidad > 35%, en la mayoría de los genomas analizados, a excepción de 4 cepas (Tabla 5) en cuyos genomas no se halló ninguno de los cuatro módulos de replicación descritos para *Rhodobacteraceae*. Así, el análisis reveló en total 13 módulos RepABC, 25 RepA, 13 RepB y 10 DnaA-like. Sin embargo, ninguno de estos módulos se posicionó en el mismo *contig* que el gen *dnaA* codificante para la proteína de iniciación de la replicación cromosómica, a excepción de la cepa *D. aquaemixtae* CECT 8626^T donde aparece la proteína iniciadora de la replicación del plásmido en el mismo *contig* (*gnl|X|M_2*) que el gen *dnaA*, esto indica que en esta cepa ha podido ocurrir la integración del plásmido en el cromosoma, lo cual sí que ha sido propuesto para otros miembros de la familia (Petersen *et al.*, 2012). En el resultado obtenido se puede apreciar también que el módulo RepA presenta una frecuencia superior al módulo RepABC, esto contradice los resultados obtenidos en otras publicaciones (Petersen & Wagner-Döbler 2017; Simon *et al.*, 2017) donde se ha observado que los módulos RepABC representan el tipo de plásmido más frecuente entre los cuatro sistemas de replicación característicos de los ERC en el grupo *Roseobacter*. No obstante, esta frecuencia de aparición es similar a los resultados obtenidos en el estudio de Petersen *et al.* (2009) donde el análisis de 30 genomas de cepas pertenecientes al grupo *Roseobacter* manifestó que dos tercios de las mismas contenían plásmidos tipo RepABC, pudiéndose identificar en total 40 replicones. Los resultados obtenidos también respaldan la hipótesis propuesta por Voget *et al.* (2015) donde se expone que las cepas de *Rhodobacteraceae* estrictamente pelágicas poseen un único cromosoma y entre cero y dos ERC, mientras que las cepas asociadas a la superficie (como es el caso) albergan al menos una, pero principalmente entre tres y hasta doce ERC coexistentes. Esta amplia distribución de elementos extra cromosómicos encontrada entre los miembros de *Rhodobacteraceae* está conforme a lo descrito en la bibliografía (Simon *et al.*, 2017; Rodrigo-Torres *et al.*, 2016a; Collins *et al.*, 2015; Frank *et al.*, 2014) y es un indicador de la elevada plasticidad genómica que poseen los miembros de esta familia.

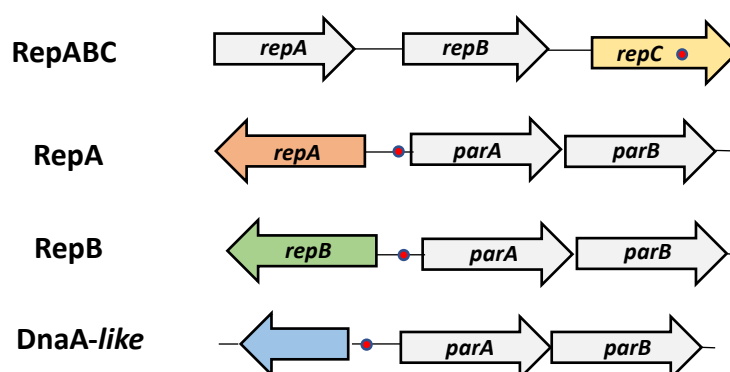


Fig. 4. Organización genética de los cuatro módulos de replicación/partición de los ERC de *Rhodobacteraceae*. Las replicasas epónimas RepC, RepA, RepB y DnaA-like están acentuadas en color amarillo, naranja, verde y azul, respectivamente. Los operones de partición *parAB* se muestran en gris claro (en el módulo RepABC se denominan *repAB*). El punto rojo indica el origen de replicación *oriV*. Imagen adaptada de Petersen (2011a).

- **Procesos de transferencia horizontal de genes**

Se ha especulado que la transferencia por conjugación de estos ERC entre otras especies o géneros puede ser un mecanismo importante para la TGH en *Rhodobacteraceae*, permitiendo la adaptación de la familia a nuevos nichos ecológicos (Bartling *et al.*, 2017; Patzelt *et al.*, 2016). Newton *et al.* (2010) demostraron que la TGH es una fuerza evolutiva particularmente dominante en este linaje bacteriano. Además de la transferencia de plásmidos por conjugación, se conocen otros dos mecanismos de TGH en el océano, la transformación a través de la captación directa de DNA, y la transducción por fagos o por GTAs. No obstante, se cree que la conjugación es cuantitativamente más importante que los otros dos mecanismos de TGH. Esto se debe a que los fagos tienen rangos restringidos de hospedadores y pequeñas regiones de carga, mientras que algunos plásmidos pueden conjugarse entre organismos filogenéticamente muy lejanos, incluyendo la conjugación entre bacterias y eucariotas. Además, el DNA libre se encuentra en el océano pelágico a una baja concentración (0.6 a 88 µg/litro), posiblemente demasiado diluido para una transformación frecuente (Biers *et al.*, 2008). Al mismo tiempo, la transformación nunca ha sido observada en *Rhodobacteraceae* y no se ha podido lograr experimentalmente (Petersen & Wagner-Döbler, 2017; Smillie *et al.*, 2010).

El mecanismo más frecuente de conjugación implica la transferencia de DNA monocatenario (DNAss) desde la célula donadora hasta la receptora, donde el proceso de replicación restablece las copias de DNA de doble cadena en cada una de las células. Este proceso se basa en tres componentes principales: un relaxosoma, una proteína de acoplamiento (T4CP) y los componentes del canal de apareamiento que ensamblan un sistema de secreción tipo IV (T4SS). El relaxosoma incluye una proteína clave para la conjugación, la relaxasa (MOB), que reconoce el origen de transferencia (*oriT*), una secuencia corta de DNA que es la única secuencia requerida en *cis* para que un plásmido sea transferible conjugativamente. La relaxasa cataliza la etapa inicial y final de la conjugación, es decir, la escisión inicial de *oriT* en la célula donadora, para producir la cadena de DNAss que se transferirá, y la ligación final del ADN transferido a la célula receptora que reconstituye el plásmido conjugado. La proteína T4CP participa en la conexión entre el relaxosoma y el canal de transporte. También se piensa que bombea activamente el DNA a la célula receptora. Y, por último, el canal de apareamiento que es básicamente un sistema de secreción de proteína de tipo IV constituido por doce proteínas, VirB1-VirB11 y VirD4. Además, como la transferencia es direccional de 5' a 3', se ha sugerido que la relaxasa unida a la molécula de DNAss sirve también para pilotar el DNAss a través del canal de secreción (Guglielmini *et al.*, 2014; Smillie *et al.*, 2010; Garcillán-Barcia *et al.*, 2009; Wallden *et al.*, 2010; Christie *et al.*, 2005).

Algunos estudios previos (Petersen & Wagner-Döbler, 2017; Patzelt *et al.*, 2016; Luo & Moran, 2014; Persson *et al.*, 2009) han demostrado que el sistema de secreción de tipo IV está frecuentemente presente en los plásmidos del grupo Roseobacter mediando su conjugación. La búsqueda BLASTp identificó homólogos de las proteínas constituyentes del T4SS presente en el plásmido de *Dinoroseobacter shibae* DFL12^T (pDSHI03; VirB1-VirB6, WP_012187322.1-27.1; VirB8-VirB11, WP_012187329.1-32.1; relaxasa VirD2, WP_012187338.1; T4CP (VirD4), WP_044029496.1) en las cepas *Mr. algicola* CECT 5396^T, *Rv. halotolerans* CECT 8110^T, *C. lipolyticum* CECT 8621^T, *Tr. phthalicus* CECT 8649^T, *Pm. varians* CECT 8663^T, *Ml. aquimaris* CECT 8898^T, *F. marinus* CECT 8899^T, *Pr. insulae* CECT 8871^T, *Pl. abyssalis* CECT 8504^T, *Ru. mediterranea* CECT 7615^T y *Rb. ekhonensis* CECT 7235^T. Estas once cepas presentaban el sistema de secreción tipo IV completo, incluyendo el grupo de genes VirB para la formación del pilus, la relaxasa VirD2, y la proteína de acoplamiento (T4CP) VirD4. Además, se localizaron en el mismo contig donde

se hallaron los respectivos módulos RepABC, lo que sugiere que las cepas podrían ser conjugativas.

Aparte de la conjugación, la transducción es otro mecanismo de intercambio genético que puede ser ecológicamente relevante en el océano, ya que los virus libres son relativamente abundantes en el agua del mar y los profagos integrados son evidentes en los genomas bacterianos (Biers *et al.*, 2008). Hace más de tres décadas fue descubierto en *Rhodobacter capsulatus* un nuevo modo de TGH que parecía ser similar a la transducción generalizada mediada por virus, pero en este caso el agente transductor no era un bacteriófago típico, sino una pequeña partícula similar a un fago denominada GTA. Hasta hace poco se creía que cada una de estas partículas contiene al azar un fragmento de aproximadamente 4.5 Kb de DNA genómico bacteriano que puede transferirse entre las células. Sin embargo, recientemente se ha propuesto que el empaquetamiento del DNA por la partícula de GTA no es aleatorio sino que está influenciado por el porcentaje de G+C y las modificaciones del DNA (Tomasch *et al.*, 2018). El GTA de *R. capsulatus* (RcGTA) fue genéticamente caracterizado por Lang y Beatty (2000) descubriéndose que el clúster de genes de RcGTA comprende 15 genes (designados orfg1 a orfg15), incluyendo homólogos de los genes estructurales de los fagos (cápsida, cola y empaquetamiento del DNA), pero no de los genes implicados en la autorreplicación o en la lisis del huésped como por ejemplo la proteína holina (Sun *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2009; Biers *et al.*, 2008). El clúster de genes de TGA ha sido detectado en *Alphaproteobacteria*, incluyendo *Rhodobacterales*, *Caulobacterales*, *Parvularculales*, *Rhodospirillales*, *Rhizobiales* y *Sphingomonadales* (Shakya *et al.*, 2017). Actualmente, todos los genomas públicos del grupo Roseobacter excepto las cepas HTCC2083 y HCC2255 contienen GTAs. Respecto a los genomas analizados en el presente estudio, en todos se hallaron GTAs, a excepción de *Rv. aestuarii* CECT 7745^T, *Ru. meonggei* CECT 8411^T, *B. aestuarii* CECT 8489^T y *F. marinus* CECT 8899^T, con un valor promedio de 5 GTAs (Tabla 5). Este valor promedio es muy similar al obtenido para los miembros de “*Stappiaceae*” (La Mura, 2015), lo que puede sugerir que *Rhodobacteraceae* pese a quedar filogenéticamente distante de “*Stappiaceae*” podría intercambiar material genético con ellos. Por otro lado, la ausencia de GTAs en las cuatro cepas puede deberse a que el estado de los genomas no es cerrado, ya que el gran tamaño de sus genomas (> 4 Mb) y el fácil crecimiento en condiciones de laboratorio sugieren que estas cuatro cepas, a diferencia de lo que ocurría para las cepas HTCC2255 y HTCC2083, no son miembros oligotróficos de grupo Roseobacter para los cuales los genes GTA no son típicos (Biers *et al.*, 2008). La presencia de elementos similares a los fagos se analizó con la herramienta en línea PFAST. El programa reveló que el 86% de las cepas (Tabla 5) contenían en sus respectivos genomas secuencias de profagos ya fuesen íntegras o incompletas con un tamaño entre 4.7 Kb y 42.5 Kb. Estos resultados muestran que los fagos y los GTAs también son junto a la conjugación una fuerza motriz para la diversificación genómica de la familia *Rhodobacteraceae* (Zhan *et al.*, 2016).

Tabla 5. Sistemas CRISPR-Cas y elementos genéticos móviles predichos en los genomas de *Rhodobacteraceae*. -, el valor no se pudo obtener al no cumplir con el mínimo de longitud.

	Sistema CRISPR- Cas	Profagos	Módulos de replicación	Integrasas	Transposasas	Genes GTA
<i>Al. pelagivivens</i> CECT 8811 ^T	1	1	0	4	0	6
<i>Aq. soesokakkensis</i> CECT 8620 ^T	2	4	3	6	2	7
<i>As. donghaensis</i> CECT 8599 ^T	1	-	3	6	3	6
<i>B. aestuarii</i> CECT 8489 ^T	0	2	0	12	4	0
<i>C. lipolyticum</i> CECT 8621 ^T	0	2	3	3	0	7

	Sistema CRISPR- Cas	Profagos	Módulos de replicación	Integrasas	Transposasas	Genes GTA
<i>D. aquaemixtae</i> CECT 8626 ^T	0	3	1	1	2	7
<i>F. marinus</i> CECT 8899 ^T	1	0	6	8	9	0
<i>L. soesokkakensis</i> CECT 8367 ^T	0	1	4	6	2	6
<i>Ml. aquimaris</i> CECT 8898 ^T	3	5	2	4	5	8
<i>Mr. algicola</i> CECT 5396 ^T	2	1	6	10	10	6
<i>O. ascidiaceicola</i> CECT 8868 ^T	2	2	1	4	5	6
<i>P. marinus</i> CECT 7971 ^T	0	1	1	7	3	6
<i>Pa. lutimaris</i> CECT 8525 ^T	3	3	3	16	10	9
<i>Pc. litoresediminis</i> CECT 8287 ^T	0	0	1	12	2	1
<i>Pd. jejudonensis</i> CECT 8397 ^T	2	2	2	8	1	6
<i>Pg. aquimaris</i> CECT 7680 ^T	0	2	3	2	1	8
<i>Pl. abyssalis</i> CECT 8504 ^T	0	2	3	10	15	6
<i>Pl. marisminoris</i> CECT 7066 ^T	3	2	1	6	3	7
<i>Pm. varians</i> CECT 8663 ^T	0	5	4	4	2	9
<i>Po. insulae</i> CECT 8812 ^T	1	1	0	2	4	6
<i>Pr. insulae</i> CECT 8871 ^T	0	2	4	11	4	6
<i>Ps. marinus</i> CECT 7751 ^T	2	5	1	7	2	7
<i>Py. aestuarii</i> CECT 9025 ^T	1	3	2	7	2	6
<i>Rb. ekhonensis</i> CECT 7235 ^T	2	2	1	12	3	4
<i>Rs. antarcticus</i> CECT 7023 ^T	3	0	3	12	12	11
<i>Ru. arenilitoris</i> CECT 8715 ^T	0	3	1	10	2	5
<i>Ru. litorea</i> CECT 7639 ^T	1	2	2	5	5	6
<i>Ru. mediterranea</i> CECT 7615 ^T	1	2	2	15	2	6
<i>Ru. meonggei</i> CECT 8411 ^T	0	2	2	5	5	0
<i>Rv. aestuarii</i> CECT 7745 ^T	0	0	1	14	5	0
<i>Rv. albus</i> CECT 7450 ^T	0	3	1	11	2	7
<i>Rv. gaetbuli</i> CECT 8370 ^T	1	2	1	9	9	1
<i>Rv. halotolerans</i> CECT 8110 ^T	1	4	3	4	0	1
<i>Rx. jejudonensis</i> CECT 8625 ^T	0	2	2	5	5	1
<i>Tr. phthalicus</i> CECT 8649 ^T	1	3	2	2	4	6
<i>Y. sediminilitoris</i> CECT 8284 ^T	3	1	0	14	7	6

La presencia de integrasas y transposasas es igualmente indicativa de la existencia de procesos de transferencia genética horizontal. Por ello, aparte de los elementos genéticos que aportan plasticidad al genoma vistos hasta el momento también se analizó la presencia de estos elementos móviles mediante la exploración de las anotaciones (Tabla 5). Respecto a la presencia de transposasas, excepto *Rv. halotolerans* CECT 8110^T, *C. lipolyticum* CECT 8621^T y *Al. pelagivivens* CECT 8811^T que carecen de transposasas, el resto de las cepas presentó un valor promedio de 4 transposasas por genoma. Este número es muy bajo comparado con el valor promedio (52 ± 38) anotados en los genomas del grupo Roseobacter (Newton *et al.*, 2010). Lo mismo ocurre para las integrasas encontradas en todas las cepas con un valor promedio de 8 integrasas por genoma. Sin embargo, al comparar el número de integrasas y transposasas de forma individual se acerca más a los resultados obtenidos en otras publicaciones (Rodrigo-Torres *et al.*, 2016a; Mas-Lladó *et al.*, 2015).

El sistema CRISPR-Cas comprende un locus genómico llamado CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Small Palindromic Repeats*) que alberga elementos repetitivos cortos (repeticiones) de un tamaño entre 23 a 47 pb, separados por secuencias únicas de tamaño similar (espaciadores), que pueden originarse a partir de elementos genéticos móviles como

bacteriófagos, transposones o plásmidos (Hille & Charpentier, 2016). Este sistema CRISPR-Cas es poco común en la mayoría de los genomas del grupo *Roseobacter* (Voget *et al.*, 2015). Pese a ello, el análisis mediante la herramienta online CRISPRFinder (crispr.i2bc.paris-saclay.fr) mostró que el 58% (21 de las 36) de las cepas (Tabla 5) presentaban CRISPRs. El resultado obtenido es consistente con el alto número de secuencias de profagos encontradas, dado que el sistema CRISPR-Cas puede proporcionar al huésped resistencia a los fagos, posiblemente mediante un mecanismo similar a la interferencia de RNA (Huang *et al.*, 2010).

De todos los resultados comentados anteriormente se puede concluir que de manera similar a otros genomas de *Roseobacter*, los genomas aquí analizados exhiben una elevada plasticidad con la adquisición de genes, como demuestran las abundantes transposasas, integrasas, presencia de plásmidos conjugativos, profagos y agentes de transferencia genética encontrados. Esta plasticidad genómica puede dar lugar a la gran diversidad metabólica que caracteriza a la familia *Rhodobacteraceae*, proporcionando la base para la adaptación a una gran variedad de nichos ecológicos y, por tanto, al éxito global de este taxón en la naturaleza.

2.2 Metabolismo central de carbohidratos

De forma generalizada los microorganismos poseen dos rutas metabólicas alternativas para el catabolismo de la glucosa, la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMPP, *Embden-Meyerhof-Parnas pathway*) y la vía Entner-Doudoroff (EDP, *Entner-Doudoroff pathway*). También poseen la vía de la pentosa fosfato (PPP, *pentose phosphate pathway*) que complementa las dos anteriores. Entre ellas, destaca la ruta EMP al encontrarse de forma casi universal en el reino bacteriano. Esto se debe a que es una estrategia energéticamente más eficiente que las otras dos rutas glicolíticas (Fig. 5; ecuación 1), al producir el doble de ATP que las rutas ED (ecuación 2) o PPP (ecuación 3).

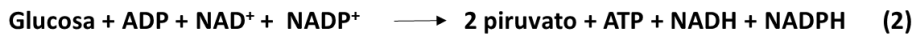
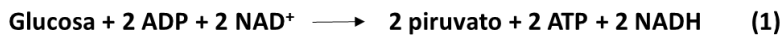


Fig. 5. Rutas catabólicas para el metabolismo de la glucosa. 1) Ruta Embden-Meyerhof-Parnas; 2) Ruta Entner-Doudoroff y 3) Ruta de la pentosa fosfato.

No obstante, varios estudios genómicos han confirmado que a pesar de la ventaja energética que supone catabolizar la glucosa mediante la vía EMP, el 12% de los procariotas (entre los que se encuentran bacterias filogenéticamente muy diversas; *Firmicutes*, *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*) confían únicamente en la vía ED para la degradación de la glucosa (Klingner *et al.*, 2015; Fuhrer *et al.*, 2005).

La mayor parte de los genomas analizados en el presente estudio (86%, 31 de las 36 cepas totales) contienen los genes necesarios para codificar de forma completa los enzimas de la ruta de ED para el metabolismo de la glucosa. Sin embargo, todos ellos carecen del gen necesario para la síntesis de la Fosfofructoquinasa (EC 2. 7. 1. 11), enzima clave de la ruta EMP (Tabla 6). Este resultado es conforme a lo establecido en la literatura (Gromek *et al.*, 2016; Rodrigo-Torres *et al.*, 2016b; Riedel *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2009) e implica que los miembros de la familia *Rhodobacteraceae* catalizan la glucosa exclusivamente por la vía de Entner-Doudoroff. Esta preferencia, ha sido interpretada como una protección frente al estrés oxidativo, que es de gran importancia en los hábitats marinos cercanos a la superficie, ya que la producción de NADPH de esta ruta en comparación con la ruta EMP, es utilizada como cofactor de muchas enzimas que intervienen en la protección frente a los radicales libres del oxígeno (Berger *et al.*, 2014; Chavarría *et al.*, 2013).

La ruta de la pentosa fosfato se encuentra completa en la mayor parte de los genomas analizados, solamente 13 carecen del gen *pgd* codificante para la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa (EC 1.1.1.44) responsable de la oxidación del 6-fosfogluconato a ribulosa-5-fosfato (Tabla 6). La pérdida de esta enzima es común en *Rhodobacteraceae* ya que también ha sido detectada en otros miembros de esta familia (Gromerk *et al.*, 2016; Collins *et al.*, 2015; Zong & Jiao, 2012; Tang *et al.*, 2009). Como ruta alternativa, el 6-fosfogluconato producido durante las dos primeras reacciones de la ruta oxidativa de la pentosa fosfato puede introducirse en la ruta ED para un metabolismo adicional de carbohidratos.

Tabla 6. Rutas metabólicas analizadas en los genomas de *Rhodobacteraceae*. Abreviaturas: ED, Entner-Doudoroff; EMP, Embden-Meyerhof-Parnas; PP, Fosfato Pentosas; TCA, Ciclo del Ácido Tricarboxílico. +, indica presencia de la ruta completa; -, indica ausencia de la ruta completa.

Cepa	Ruta ED	Ruta EMP	Ruta PP	TCA	Ciclo Glioxilato	Etilmalonil CoA
<i>Al. pelagivivens</i> CECT 8811 ^T	+	-	-	+	-	+
<i>Aq. soesokkakensis</i> CECT 8620 ^T	+	-	+	+	-	+
<i>As. donghaensis</i> CECT 8599 ^T	+	-	+	+	-	+
<i>B. aestuarii</i> CECT 8489 ^T	+	-	+	+	-	+
<i>C. lipolyticum</i> CECT 8621 ^T	+	-	-	+	-	+
<i>D. aquaemixtae</i> CECT 8626 ^T	+	-	-	+	-	+
<i>F. marinus</i> CECT 8899 ^T	+	-	+	+	-	+
<i>L. soesokkakensis</i> CECT 8367 ^T	+	-	+	+	-	+
<i>Ml. aquimaris</i> CECT 8898 ^T	+	-	-	+	-	+
<i>Mr. algicola</i> CECT 5396 ^T	+	-	-	+	-	+
<i>O. ascidiaceicola</i> CECT 8868 ^T	+	-	+	+	-	+
<i>P. marinus</i> CECT 7971 ^T	+	-	+	+	-	+
<i>Pa. lutimaris</i> CECT 8525 ^T	+	-	+	+	+	+
<i>Pc. litorisediminis</i> CECT 8287 ^T	-	-	+	+	-	+
<i>Pd. jejudonensis</i> CECT 8397 ^T	+	-	+	+	-	+
<i>Pg. aquimaris</i> CECT 7680 ^T	+	-	+	+	-	+
<i>Pl. abyssalis</i> CECT 8504 ^T	+	-	+	+	-	+
<i>Pl. marisminoris</i> CECT 7066 ^T	+	-	+	+	-	+
<i>Pm. varians</i> CECT 8663 ^T	+	-	-	+	-	+
<i>Po. insulae</i> CECT 8812 ^T	+	-	+	+	-	+
<i>Pr. insulae</i> CECT 8871 ^T	+	-	-	+	-	+
<i>Ps. marinus</i> CECT 7751 ^T	+	-	-	+	-	+
<i>Py. aestuarii</i> CECT 9025 ^T	+	-	+	+	-	+
<i>Rb. ekhonensis</i> CECT 7235 ^T	+	-	-	+	-	+
<i>Rs. antarcticus</i> CECT 7023 ^T	+	-	+	+	-	+
<i>Ru. arenilitoris</i> CECT 8715 ^T	+	-	-	+	-	+
<i>Ru. litorea</i> CECT 7639 ^T	-	-	+	+	-	+
<i>Ru. mediterraneas</i> CECT 7615 ^T	+	-	+	+	-	+
<i>Ru. meonggei</i> CECT 8411 ^T	+	-	-	+	-	+
<i>Rv. aestuarii</i> CECT 7745 ^T	-	-	+	+	-	+
<i>Rv. albus</i> CECT 7450 ^T	-	-	+	+	-	+
<i>Rv. gaetbuli</i> CECT 8370 ^T	-	-	+	+	-	+
<i>Rv. halotolerans</i> CECT 8110 ^T	+	-	+	+	-	+
<i>Rx. jejudonensis</i> CECT 8625 ^T	+	-	-	+	-	+
<i>Tr. phthalicus</i> CECT 8649 ^T	+	-	-	+	-	+
<i>Y. sediminilitoris</i> CECT 8284 ^T	+	-	+	+	-	+

Todos los genomas codifican el ciclo completo del ácido tricarboxílico (TCA). Además, todos ellos presentan genes codificantes de enzimas anapleróticas (piruvato carboxilasa) y catapleróticas (enzima málica y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa) que trabajan juntas para asegurar un balance apropiado de flujo de carbono entre el interior y exterior del ciclo de TCA. Por el contrario, la ruta del ciclo del glioxilato está incompleta, salvo en la cepa *Pa. lutimaris* CECT 8525^T, al carecer de los genes codificantes de la isocitrato liasa (EC 4.1.3.1) y la malato sintasa (EC 2.3.3.9), enzimas clave en este proceso (Dunn *et al.*, 2009). Sin embargo, la ruta del etilmalonil-CoA puede suministrar glioxilato (a partir del acetyl-CoA) para el ciclo de la serina ya que todos los genes para esta ruta están presentes (Tabla 6). Esto implica que *Rhodobacteraceae* puede asimilar compuestos C2, como el acetato, así como numerosos sustratos que comparten

una conversión inicial común a acetil-CoA como punto de entrada en el metabolismo central del carbono. Entre estos sustratos se incluyen abundantes ácidos grasos, alcoholes, ésteres, terpenos, ceras, alquenos y polihidroxicanoatos (Schneider *et al.*, 2011; Alber *et al.*, 2006).

Por último, se ha encontrado que los genomas estudiados presentan sistemas transportadores de alfa-glucósidos (*aglEFGK*), ramnosa (*rhaPSQT*), fructosa (*frcABC*), ribosa (*rbsABC*), sorbitol/manitol (*smoEFG*), D-xilosa (*xyIFGH*) y glicerol (*glpVPQST*), así como sistemas de absorción de ácidos orgánicos; transportador tripartito independiente del ATP (*dctPQM*) y el sistema tripartito de tricarboxilato (*tctABC*). Esto indica que su potencial de absorción de carbohidratos y ácidos orgánicos es alto, lo que está conforme con la gran diversidad de metabolismo catabólico que presentan estas bacterias.

- **Estrategias alternativas de obtención de energía**

Fototrofia aerobia anoxigénica (AAnP)

Los miembros de la familia *Rhodobacteraceae* tienen una amplia variedad de mecanismos para la obtención de energía. Además de la adquisición quimiotrófica de energía a través de la oxidación de la materia orgánica, estudios genómicos han indicado que algunos son capaces de obtener energía de forma fotótrofa (Luo & Moran, 2014). De hecho, se ha manifestado que uno de los principales contribuyentes a la AAnP en las aguas superficiales de los océanos es el orden *Rhodobacterales* (particularmente del grupo *Roseobacter* y relativos) junto al orden *Sphingomonadales* (*Erythrobacter*) y algunas especies de las clases *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* (Oz *et al.*, 2005). El aparato fotosintético de las bacterias AAnP, se compone de tres complejos proteína-pigmento que atraviesan la membrana, conocidos como centro de reacción (RC) y los complejos de recolección de luz (LH1 y LH2, respectivamente). La energía de la luz capturada por LH1 y LH2 es transferida al RC donde se producirá la primera reacción fotoquímica. El RC los constituyen tres subunidades L, M y H, mientras que los complejos LH están formados por dos polipéptidos que atraviesan la membrana (subunidades alfa y beta) y se asocian a bacterioclorofilas y carotenoides. Cuarenta y tres genes forman el clúster fotosintético de aproximadamente 45 Kb que incluye genes necesarios para la biosíntesis de carotenoides (*crtEF*), síntesis de bacterioclorofila (*bchFNBHLMCXYZ*), RC y LH1 (*pufBALM*), y regulación (*ppaA* y *ppsR*). A 146 Kb por detrás de este clúster principal se encuentra un grupo más pequeño de genes codificantes del LH2 (*pucBACD*) (Liotenberg *et al.*, 2008; Masuda *et al.*, 2000; Moran y Miller, 2007). La utilización de la luz que involucra la bacterioclorofila *a* sintetizada por las especies AAnP se encontró únicamente en *Rs. antarcticus* CECT 7023^T, *Rv. gaetbuli* CECT 8370^T, *Pd. jejudonensis* CECT 8397^T, *Rx. jejudonensis* CECT 8625^T, *Ml. aquimaris* CECT 8898^T, *F. marinus* CECT 8899^T, *Pl. abyssalis* CECT 8504^T, *As. donghaensis* CECT 8599^T, *Po. insulae* CECT 8812^T, *Y. sediminilitoris* CECT 8284^T y *Rb. ekhonensis* CECT 7235^T (31%). Para estas once cepas, los genes para la fijación de carbono están ausentes, lo que sugiere que estas especies sí son capaces de utilizar la luz como fuente de energía, aunque siguen requiriendo compuestos orgánicos como fuente de carbono. No obstante, *C. lipolyticum* CECT 8621^T y *Pr. insulae* CECT 8871^T presentan en su genoma los genes necesarios para la síntesis de RuBisCO (*rbcL* y *rbcS*), lo que sugiere que estas especies podrían comportarse como autótrofas. La fototrofia basada en proteorrodopsina está ausente en todas las cepas estudiadas.

Oxidación del monóxido de carbono (CO)

El CO es el oxocarbono más simple generado por la descomposición biótica o termal incompleta de los compuestos orgánicos. Se espera que sea ampliamente prevalente en la superficie de los océanos debido a la fotodegradación de la materia orgánica disuelta (Tolli *et al.*, 2006; Hoshino

& Inagaki, 2017). Pese a su baja concentración atmosférica de 0.06-0.15 ppm (IPCC) tiene una gran importancia para la biosfera ya que como resultado de reacciones fotoquímicas ejerce una influencia sustancial en los niveles atmosféricos de metano, CO₂ y ozono y, por lo tanto, intensifica el efecto invernadero. Además, es altamente tóxico para muchos organismos, ya que reacciona fácilmente con los metales de transición en los centros activos de muchas enzimas (Sokolova *et al.*, 2017). Sin embargo, el CO también puede actuar como una fuente de carbono y energía para microorganismos filogenéticamente diversos que viven tanto en condiciones aerobias como anaerobias, la mayoría de ellos, asociados estrechamente a la clase *Alphaproteobacteria* (grupo Roseobacter) y al filo *Firmicutes* (Jeoung *et al.*, 2014; King, 2003). En todos los genomas analizados, a excepción de *L. soesokkakensis* CECT 8367^T, *Aq. soesokkakensis* CECT 8620^T, *B. aestuarii* CECT 8489^T, *P. marinus* CECT 7971^T, *Pa. lutimaris* CECT 8525^T, *Py. aestuarii* CECT 9025^T y *Al. pelagivivens* CECT 8811^T, se encontró la presencia de los genes *cox* codificantes para la forma I y/o II del monóxido de la carbono deshidrogenasa (CODH) que cataliza la oxidación de CO a CO₂ (Tabla 7). La presencia de ambas formas en el mismo organismo ofrece una ventaja ecológica bajo un rango de concentraciones de CO, ya que existe evidencias de que la forma CODH II tiene una afinidad menor por el CO en comparación con la forma CODH I (Cunliffe *et al.*, 2011). Por tanto, la oxidación del CO, junto a la AAnP en algunos casos, y sin una aparente vía de fijación del CO₂, se utilizan como suplemento de energía, resultando en mayores rendimientos de crecimiento heterotrófico en las aguas donde la materia orgánica es limitante pero el CO es ubicuo, lo que representa una adaptación exitosa al ecosistema marino que es considerado en general oligotrófico (Moran & Miller, 2007).

Oxidación de compuestos inorgánicos del azufre

La oxidación de los compuestos inorgánicos del azufre por las bacterias es una parte importante del ciclo biogeoquímico del azufre. Asimismo, este proceso metabólico puede ser explotado industrialmente en la biominería de metales y en la limpieza de emisiones de combustibles fósiles (Grabarczyk & Berks, 2017).

En los sedimentos costeros, se liberan grandes cantidades de sulfuro de hidrógeno durante la degradación anaerobia de la materia orgánica que luego es re-oxidado a sulfato en la superficie del sedimento. Las principales bacterias oxidantes del azufre en los sedimentos costeros pertenecen a las clases *Gammaproteobacteria* y *Epsilonproteobacteria*. No obstante, varios estudios han indicado que las clases *Dehalococcoidia* y *Alphaproteobacteria* pueden ser también importantes para la oxidación del azufre en las columnas de agua costeras (Wasmund *et al.*, 2016; Lenk *et al.*, 2012). Hay varios sistemas enzimáticos que se han asociado con la oxidación de los compuestos inorgánicos del azufre. Sin embargo, el sistema de oxidación del azufre (Sox) es el más extendido entre las bacterias fotosintéticas y no fotosintéticas. Este sistema está formado por cuatro complejos enzimáticos (SoxXA, SoxYZ, SoxB y SoxCD) responsables de la oxidación del sulfuro de hidrógeno, tiosulfato, azufre elemental y sulfito a intermediarios del azufre o sulfato en al menos dos vías metabólicas. La vía de oxidación del azufre de *Paracoccus* (PSO) cataliza la oxidación del tiosulfato a sulfato sin la formación de intermediarios de azufre mediante el complejo enzimático SoxCD. Mientras que la vía ramificada, que carece de SoxCD, cataliza la oxidación de los compuestos reducidos del azufre a compuestos intermediarios de azufre que son depositados como glóbulos de azufre intra- o extracelulares, más comúnmente como polisulfuros (Headd & Engel, 2014). SoxAX está relacionada con la tiosulfato deshidrogenasa TsdA, que cataliza la oxidación conjugativa de dos moléculas de tiosulfato a través de la formación de un enlace de disulfuro. SoxB es un miembro de la familia de enzimas hidrolíticas que contiene un par de iones metálicos divalentes en su sitio activo y ha demostrado

tener actividad de tiosulfohidrolasa. SoxCD se relaciona con la sulfito oxidasa. SoxYZ se corresponden con una proteína de unión covalente al azufre y una proteína quelante del compuesto de azufre, respectivamente (Grabarczyk & Berks, 2017).

En base al análisis de la secuencia del genoma (Tabla 7) se prevé que *Rhodobacteraceae* puede oxidar los compuestos de azufre inorgánico generados, dado que en el 67% de las cepas (24 de 36) se encontró la presencia de los genes codificantes para la vía Sox. Sin embargo, esta vía está truncada puesto que todos ellos carecen del complejo SoxCD. Este dato es conforme a lo establecido en el trabajo de Yin *et al.* (2014) donde se afirma que el complejo SoxCD está ausente en muchas *Alphaproteobacteria*.

De estos resultados se concluye que los miembros de la familia *Rhodobacteraceae* pueden obtener energía a partir de la oxidación de los compuestos inorgánicos del azufre a compuestos intermediarios que actuarán como reserva intra- o extracelular de azufre.

Tabla 7. Rutas metabólicas relacionadas con la ganancia energética analizadas en los genomas de *Rhodobacteraceae*. Abreviaciones: AAnP, Fototrofia aerobia anoxigénica; Cox, oxidación del CO con indicación de la forma de la CODH que presentan; Sox, oxidación de los compuestos de azufre. +, presencia; -, ausencia.

Cepa	AAnP	Cox	Forma CODH	Sox
<i>Al. pelagivivens</i> CECT 8811 ^T	-	-	-	+
<i>Aq. soesokkakensis</i> CECT 8620 ^T	-	+	I, II	-
<i>As. donghaensis</i> CECT 8599 ^T	+	+	II	+
<i>B. aestuarii</i> CECT 8489 ^T	-	-	-	+
<i>C. lipolyticum</i> CECT 8621 ^T	-	-	-	+
<i>D. aquaemixtae</i> CECT 8626 ^T	-	+	II	+
<i>F. marinus</i> CECT 8899 ^T	+	+	I	+
<i>L. soesokkakensis</i> CECT 8367 ^T	-	-	-	+
<i>Ml. aquimaris</i> CECT 8898 ^T	+	+	I	+
<i>Mr. algicola</i> CECT 5396 ^T	-	+	II	+
<i>O. ascidiaceicola</i> CECT 8868 ^T	-	+	I	+
<i>P. marinus</i> CECT 7971 ^T	-	-	-	+
<i>Pa. lutimaris</i> CECT 8525 ^T	-	-	-	-
<i>Pc. litorisediminis</i> CECT 8287 ^T	-	+	II	+
<i>Pd. jejudonensis</i> CECT 8397 ^T	+	+	I	-
<i>Pg. aquimaris</i> CECT 7680 ^T	-	+	I, II	-
<i>Pl. abyssalis</i> CECT 8504 ^T	+	+	II	-
<i>Pl. marisminoris</i> CECT 7066 ^T	-	+	I	+
<i>Pm. varians</i> CECT 8663 ^T	-	+	I, II	+
<i>Po. insulae</i> CECT 8812 ^T	+	+	II	-
<i>Pr. insulae</i> CECT 8871 ^T	-	+	II	+
<i>Ps. marinus</i> CECT 7751 ^T	-	+	II	+
<i>Py. aestuarii</i> CECT 9025 ^T	-	-	-	-
<i>Rb. ekhonensis</i> CECT 7235 ^T	+	+	II	+
<i>Rs. antarcticus</i> CECT 7023 ^T	+	+	I	-
<i>Ru. arenilitoris</i> CECT 8715 ^T	-	+	I, II	-
<i>Ru. litorea</i> CECT 7639 ^T	-	+	I, II	+
<i>Ru. mediterranea</i> CECT 7615 ^T	-	+	II	+
<i>Ru. meonggei</i> CECT 8411 ^T	-	+	I, II	-

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cepa	AAnP	Cox	Forma CODH	Sox
<i>Rv. aestuarii</i> CECT 7745 ^T	-	+	I	-
<i>Rv. albus</i> CECT 7450 ^T	-	+	I	-
<i>Rv. gaetbuli</i> CECT 8370 ^T	+	+	I	+
<i>Rv. halotolerans</i> CECT 8110 ^T	-	+	II	+
<i>Rx. jejudonensis</i> CECT 8625 ^T	+	+	I	+
<i>Tr. phthalicus</i> CECT 8649 ^T	-	+	I, II	+
<i>Y. sediminilitoris</i> CECT 8284 ^T	+	+	II	+

2.3 Metabolismo del nitrógeno

El nitrógeno (N) se distribuye a través de la litosfera terrestre, atmósfera, hidrosfera y biosfera. La litosfera contiene aproximadamente el 94% de todo el nitrógeno de la Tierra, aproximadamente el 6% se encuentra en la atmósfera, y una pequeña fracción (<0.006%) dentro de la hidrosfera y la biosfera. Es un compuesto clave para los organismos vivos, puesto que es el principal constituyente de los ácidos nucleicos y las proteínas (Sparcino-Watkins *et al.*, 2014; Patey *et al.*, 2008).

El N es el cuarto elemento más abundante de la biosfera, situado por detrás del hidrogeno, el carbono y el oxígeno. Se puede encontrar en varios estados de oxidación que van desde +5 en su forma más oxidada (nitrato; NO_3^-) hasta -3 en su forma más reducida (amonio; NH_4^+), siendo ésta última forma casi exclusiva de los compuestos biológicos (Priyanka & Koel, 2015). Las interconversiones entre estas especies de nitrógeno, constituyen el ciclo biogeoquímico del nitrógeno (Fig. 6) que es esencial para la función de los sistemas ecológicos marinos. El ciclo del N implica tanto procesos oxidativos como reductivos catalizados principalmente por los microorganismos. Esto se debe a que los procariotas metabolizan el N a través de una serie de reacciones de oxidación-reducción con las que obtienen energía metabólica o realizan procesos de detoxificación y/o asimilación (Zehr *et al.*, 2002). En los océanos, estos procesos de oxidación-reducción se producen a través de la fijación del N_2 , la nitrificación y la reducción asimilatoria (asimilación) o desasimilatoria (desnitrificación y DNRA) de los nitratos (Jiang & Jiao, 2016).

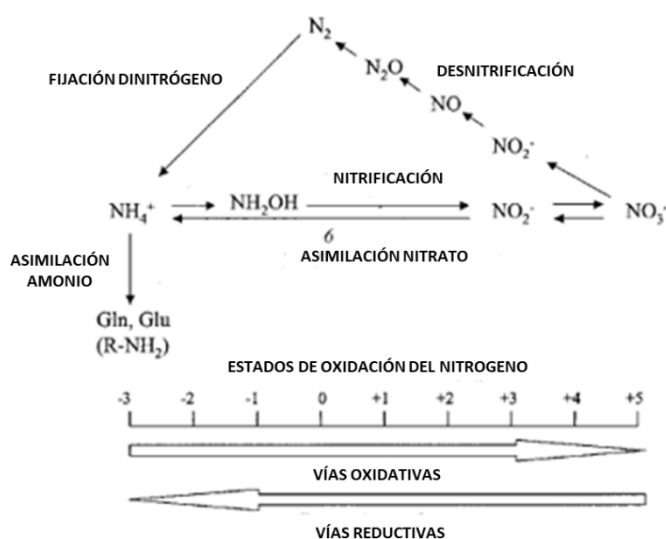


Fig. 6. Ciclo biogeoquímico del nitrógeno. Los diferentes compuestos del nitrógeno están ordenados en función de su estado de oxidación y los principales procesos oxidativos y reductivos que engloba el ciclo están representados por flechas. Adaptado de Cabello *et al.* (2004).

En los hábitats marinos, el nitrógeno se encuentra principalmente como gas dinitrógeno (N_2) (>95%) que es inaccesible para la mayoría de las especies. El resto se encuentra en forma de nitrógeno inorgánico disuelto (DIN), es decir como nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) y amoníaco (NH_3). Siendo el NO_3^- el producto intermedio de la conversión del nitrógeno más estable e importante que puede encontrarse de forma biodisponible en los océanos; cuya concentración

puede variar enormemente tanto a nivel espacial como temporal (Voss *et al.*, 2013; Patey *et al.*, 2008).

En procariontes el nitrato puede reducirse de forma asimilatoria o desasimilatoria dependiendo del destino final del nitrógeno reducido. La reducción asimilatoria del nitrato, es una ruta anabólica, cuyo objetivo es la utilización del NO_3^- como fuente de N para biosíntesis. Para ello, el NO_3^- es primero reducido por el enzima nitrato reductasa (Nar) a NO_2^- que posteriormente se transformará en NH_4^+ a través de la enzima nitrito reductasa asimilatoria. Por el contrario, la reducción desasimilatoria del nitrato, es una vía catabólica cuyo fin es la producción de energía metabólica, al utilizar los compuestos de nitrógeno reducidos como aceptores de electrones alternativos. En esta ruta también se forma NO_2^- a partir de NO_3^- , pero esta vez la enzima responsable es la nitrato reductasa desasimilatoria (Nar o Nap). El nitrito formado puede metabolizarse a N_2 o NH_4^+ en función, si la reducción forma parte de la desnitrificación o de la reducción desasimilatoria del NO_3^- a NH_4^+ (DNRA), respectivamente (Sparcino-Watkins *et al.*, 2014).

▪ **Reducción desasimilatoria del nitrato: Desnitrificación**

La desnitrificación es la reducción secuencial de nitrato a nitrito, óxido nítrico, óxido nitroso y dinitrógeno (Fig. 7). Es un proceso respiratorio, en el cual las formas oxidadas del nitrógeno actúan como aceptores terminales alternativos del oxígeno (O_2). Tiene un trato facultativo ya que desde el punto de vista metabólico es menos favorable que el O_2 . Por ello, se produce en situaciones preferiblemente anaerobias o microaerófilas con bajas tensiones de oxígeno (González, 2007; Shapleigh, 2009). Esto hace que el proceso de desnitrificación cobre especial importancia en los océanos dado que las áreas oceánicas hipóxicas se están extendiendo debido al cambio climático (Wyman *et al.*, 2013).

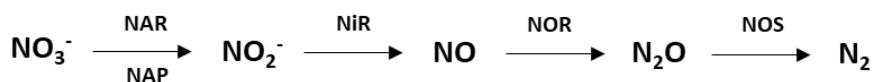


Fig. 7. Proceso de desnitrificación. Abreviaturas: NAR, nitrato reductasa respiratoria; NAP, nitrato reductasa periplasmática; NiR, nitrito reductasa; NOR, óxido nítrico reductasa; NOS, óxido nitroso reductasa.

Como se observa en la Fig. 7, el primer paso en la desnitrificación consiste en la reducción del nitrato a nitrito. En procariontes se han descrito dos sistemas desasimilatorios de reducción de nitratos (Moreno-Vivián *et al.*, 1999). El primer tipo, es una nitrato reductasa respiratoria ligada a membrana (Nar) que se encuentra orientada hacia el citoplasma y participa en la generación de una fuerza protón motriz (PMF) acoplada a la síntesis de ATP, al utilizar el nitrato como un aceptor de electrones en condiciones anaerobias. Nar está compuesta de tres subunidades: una subunidad catalítica α (NarG), una subunidad soluble β (NarH) y la subunidad γ (NarI). Es inhibida por el oxígeno. El segundo sistema reductor de nitratos, es una nitrato reductasa periplasmática (Nap) que se encuentra en algunas bacterias Gram negativas. Se considera una enzima desasimilatoria en sentido estricto dado que la oxidación del quinol por Nap no se relaciona con la generación de una PMF y además es independiente del citocromo bc1. Estructuralmente, es un heterodímero codificado por los genes *napA* y *napB*. La subunidad mayor con funciones catalíticas es NapA mientras que NapB es un citocromo de tipo c. En el operon *nap* también se encuentran otros genes relacionados con la actividad redox (NapC, NapG, NapH) o con la maduración transcripcional de NapA (NapD, NapL y NapF). A diferencia de Nar, ésta no es

inhibida por el oxígeno, y parece estar implicada en el equilibrio redox, en la respiración (tanto desnitrificación como DNRA) y en el aprovechamiento del nitrato residual (Pryanka & Koel, 2015). Además, en la mayoría de los microorganismos desnitrificantes se ha visto que interviene en la adaptación transitoria al metabolismo anaerobio, es decir cuando el microorganismo en condiciones aerobias pasa a una situación de anoxia en presencia de nitrato (González, 2007). La síntesis de una u otra, se produce en función de la disponibilidad de NO_3^- y de la fuente de carbono; bajo condiciones limitantes de nitrato, Nap aporta una mayor ventaja selectiva, mientras que, si la concentración de carbono es baja, se expresa favorablemente Nar.

La segunda enzima que interviene en el proceso de desnitrificación es la nitrito reductasa (Nir) responsable de la reducción de un electrón del NO_2^- a NO. Esta es la reacción definitoria de la desnitrificación ya que es el primer paso en el que se produce un compuesto gaseoso (Shapleigh, 2013). Existen dos nitrito reductasas en función de su grupo prostético que son estructuralmente diferentes, pero funcionalmente equivalentes: la nitrito reductasa dependiente de cobre (Nir-Cu) codificada por el gen *nirK* y la nitrito reductasa dependiente del citocromo cd1 (Nir-cd1) codificada por el gen *nirS* (Braker *et al.*, 2000). Sin embargo, la presencia de ambos tipos en un mismo organismo es muy rara. Una vez obtenido el NO este se reduce a N_2O por medio de la enzima óxido nítrico reductasa (Nor). En procariontes existen dos tipos de Nor: la cNor de Gram negativos y la qNor de Gram positivos. La proteína cNor es un complejo transmembrana que está presente en la mayor parte de bacterias desnitrificantes y está compuesto por dos subunidades: una mayor, NorB, que es un citocromo tipo b que contiene 3 centros de Fe, es decir, dos grupos hemo tipo b y uno de Fe no-hemo, y una subunidad menor, NorC constituida por un citocromo de tipo c que acepta los electrones de un donador externo ya sea el citocromo c551 o de la proteína de cobre. Los genes que las codifican se denominan *norB* y *norC*, respectivamente (Shiro, 2012). El paso final consiste en la reducción del N_2O a N_2 . Este paso es catalizado por la enzima óxido nítrico reductasa (Nos), una enzima periplasmática compuesta por dos subunidades idénticas asociadas a diferentes tipos de cobre, que está codificada por un conjunto de genes encontrados únicamente en *Proteobacteria*: el gen *nosZ* que codifica la parte estructural, *nosR* que regula la expresión de *nosZ* y los genes *nosDFY* codificantes de proteínas involucradas en el ensamblaje del cobre al sitio catalítico de la enzima. Asimismo, la subclase *Alphaproteobacteria* contiene también el gen *nosX* (González, 2007).

La capacidad de desnitrificación no es específica de ningún grupo filogenético. Wawrick *et al.* (2011) afirma que las bacterias desnitrificantes son muy frecuentes en los sistemas marinos, siendo *Proteobacteria* el filo que abarca la mayor parte de organismos desnitrificantes y en donde son particularmente prominentes las *Alphaproteobacteria* (Rich, 2003; Shapleigh, 2009). Numerosos estudios han implicado a los miembros de *Rhodobacteraceae* en el proceso de desnitrificación (Priyanka & Koel, 2015; Kraft, 2014; Wyman *et al.*, 2013; Piekarski *et al.*, 2009), lo que sugiere que esta familia puede ejercer un papel ambiental potencialmente importante en las regiones costeras que experimentan altas cargas antropogénicas de N, ya que se estima que el proceso de desnitrificación elimina de forma global aproximadamente 24 Tg de N fijado por año.

Tabla 8. Predicción de genes involucrados en la desnitrificación en los genomas analizados de *Rhodobacteraceae*; +, presencia; -, ausencia.

	Nitrato reductasa			Nitrito reductasa		Óx. nítrico reductasa		Óx. nitroso reductasa				
	<i>narG</i>	<i>narH</i>	<i>narI</i>	<i>nirS</i>	<i>nirK</i>	<i>norB</i>	<i>norC</i>	<i>nosY</i>	<i>nosF</i>	<i>nosD</i>	<i>nosZ</i>	<i>nosR</i>
<i>As. donghaensis</i> CECT 8599 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Al. pelagivivens</i> CECT 8811 ^T	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aq. soesokkakensis</i> CECT 8620 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>B. aestuarii</i> CECT 8489 ^T	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. lipolyticum</i> CECT 8621 ^T	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>D. aquaemixtae</i> CECT 8626 ^T	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>F. marinus</i> CECT 8899 ^T	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
<i>L. soesokkakensis</i> CECT 8367 ^T	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Ml. aquimaris</i> CECT 8898 ^T	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Mr. algicola</i> CECT 5396 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>O. ascidiaceicola</i> CECT 8868 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. marinus</i> CECT 7971 ^T	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Pa. lutimaris</i> CECT 8525 ^T	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pc. litorisediminis</i> CECT 8287 ^T	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pd. jejudonensis</i> CECT 8397 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pg. aquimaris</i> CECT 7680 ^T	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Pl. abyssalis</i> CECT 8504 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pl. marisminoris</i> CECT 7066 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pm. varians</i> CECT 8663 ^T	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Po. insulae</i> CECT 8812 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pr. insulae</i> CECT 8871 ^T	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Ps. marinus</i> CECT 7751 ^T	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Py. aestuarii</i> CECT 9025 ^T	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rb. ekhonensis</i> CECT 7235 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rs. antarcticus</i> CECT 7023 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ru. arenilitoris</i> CECT 8715 ^T	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rv. gaetbuli</i> CECT 8370 ^T	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ru. litorea</i> CECT 7639 ^T	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-

	Nitrato reductasa			Nitrito reductasa		Óx. nítrico reductasa		Óx. nitroso reductasa				
	<i>narG</i>	<i>narH</i>	<i>narI</i>	<i>nirS</i>	<i>nirK</i>	<i>norB</i>	<i>norC</i>	<i>nosY</i>	<i>nosF</i>	<i>nosD</i>	<i>nosZ</i>	<i>nosR</i>
<i>Ru. mediterranea</i> CECT 7615 ^T	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Ru. meonggei</i> CECT 8411 ^T	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rv. aestuarii</i> CECT 7745 ^T	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rv. albus</i> CECT 7450 ^T	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Rv. halotolerans</i> CECT 8110 ^T	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Rx. jejudonensis</i> CECT 8625 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Tr. phthalicus</i> CECT 8649 ^T	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+
<i>Y. sediminilitoris</i> CECT 8284 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Como se puede observar en la tabla 8, los resultados obtenidos sugieren que la mayor parte de *Rhodobacteraceae* (64%; 23 cepas de las 36 totales) son capaces de respirar sobre nitrato y/o nitrito, al contener en sus respectivos genomas los genes codificantes para la nitrato reductasa respiratoria o periplasmática (Nar/Nap) y/o para la nitrito reductasa desasimilatoria (NiR). No obstante, el 34% de las cepas (12 de 36) no son desnitrificantes dado que carecen de todos los genes codificantes para la ruta completa de desnitrificación. Las cepas *Rv. aestuarii* CECT 7745^T, *Ru. meonggei* CECT 8411^T, *Ru. arenilitoris* CECT 8715^T y *Pa. lutimaris* CECT 8525^T son desnitrificantes totales al contener los genes necesarios para la completa reducción de NO₃⁻ a N₂. Asimismo, *Ml. aquimaris* CECT 8898^T y *Al. pelagivivens* CECT 8811^T probablemente también sean desnitrificantes totales y la carencia del gen para las NiR se deba a que no se está trabajando a nivel de genoma cerrado.

Estos resultados sugieren que *Rhodobacteraceae* pese a ser descrita como una familia de organismos aerobios, pueden sobrevivir y prosperar en ambientes anaerobios mediante la respiración de oxianiones nitrogenados. Además, implica que los miembros de esta familia pueden tener una aplicación en la biorremediación de las aguas residuales, ya que la desnitrificación es uno de los métodos más efectivos y rentables de eliminación de nitrato en las aguas. El resto de las cepas analizadas en el estudio resultaron ser desnitrificantes parciales ya que solo contienen algunas de las enzimas implicadas en la ruta de desnitrificación. En estos desnitrificantes parciales, es menos probable que la desnitrificación sirva como una función desnitrificadora, sino más bien, que las enzimas que estén presentes sean usadas para un equilibrio redox o mitigar el efecto tóxico de algunos intermediarios. Un ejemplo de ello, lo constituyen las cepas *Ps. marinus* CECT 7751^T, *P. marinus* CECT 7971^T y *L. soesokkakensis* CECT 8367^T que solo contienen en su genoma la enzima óxido nítrico reductasa. El NO en exceso es tóxico para la célula, ya sea procariota o eucariota. De hecho, la susceptibilidad bacteriana al NO es uno de los mecanismos de defensa empleados por el hospedador ante una infección; los macrófagos inducen la síntesis de NO tras la interacción con bacterias. Esto explicaría que la capacidad de reducir el óxido nítrico no esté restringida a los desnitrificantes y pueda ser llevada a cabo por multitud de microorganismos sin conducir necesariamente a la generación de nitrógeno gas como producto final. Así, esta propiedad reductora podría haberse desarrollado como un mecanismo de detoxificación.

En la tabla también se observa que la frecuencia de aparición de los dos tipos de NiR es muy similar: Nir-Cu (*nirK*) lo presentan 10 cepas, mientras que Nir-cd1 aparece en 9 cepas. Este dato está conforme a lo publicado por González (2007) donde explica que dentro de las *Proteobacteria* no consta una estricta asociación de cada tipo de NiR con una clase en concreto, sino que ambos tipos pueden encontrarse en una misma clase; no obstante, sí que es más frecuente la presencia de Nir-Cu entre las *Alphaproteobacteria* y *Betaproteobacterias*, y la Nir-cd1 entre las *Gammaproteobacteria*. A su vez, contradice el trabajo de Kraft (2014) donde se expone que generalmente en los hábitats marinos NiR-cd1 es más común que NiR-Cu.

Y, por último, la distribución taxonómica de este conjunto de genes para la desnitrificación no mapea coherentemente con la filogenia de las especies, lo que sugiere que la ganancia o pérdida de este rasgo ha ocurrido múltiples veces durante la evolución de los *Rhodobacteraceae*, consistente con el escenario de que los miembros de esta familia han explorado continuamente nuevos hábitats ecológicos (Luo & Moran, 2014).

▪ **Reducción desasimilatoria de nitrato a amonio (DNRA)**

La DNRA o también llamada amonificación nítrica, comparte con la desnitrificación un primer paso de reducción de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), con similar trato bioenergético, y es llevado a cabo por las mismas enzimas, si bien la etapa posterior de la DNRA conduce a la formación de amonio (Fig. 8). La generación de este producto final aporta a la DNRA su principal importancia ya que el nitrato es convertido a otra forma de N mineral menos móvil y, por tanto, en contraste con la desnitrificación cuyo producto final es el N_2 , puede conservar N en el ecosistema de una forma biológicamente útil. Por ello, la DNRA es conocida como un “cortocircuito en el ciclo del N” ya que la transferencia directa de NO_3^- y NO_2^- a NH_4^+ evita la desnitrificación y la fijación del N_2 (Rütting *et al.*, 2011).

Además, su importancia relativa en la reducción de nitratos se ha vuelto cada vez más evidente en varios ambientes acuáticos, ya sean ecosistemas marinos o ecosistemas de agua dulce. Asimismo, algunos estudios han informado que la labor de la DNRA en la eliminación de nitratos de zonas costeras y estuarios es más importante que la ejercida por la desnitrificación (Bonaglia *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2011; Burgin & Hamilton, 2007).

Tanto la desnitrificación como la DNRA compiten por el NO_3^- bajo condiciones hipóxicas o anaerobias (Simon, 2002). Sin embargo, muchos estudios han demostrado que la DNRA domina sobre la desnitrificación en zonas ricas en donantes de electrones con una baja disponibilidad de NO_3^- y una mayor temperatura. Favoreciéndose también en ambientes alcalinos con un alto grado de carbono orgánico lábil y una alta tasa de salinidad (Bu *et al.*, 2017; Giblin *et al.*, 2010).

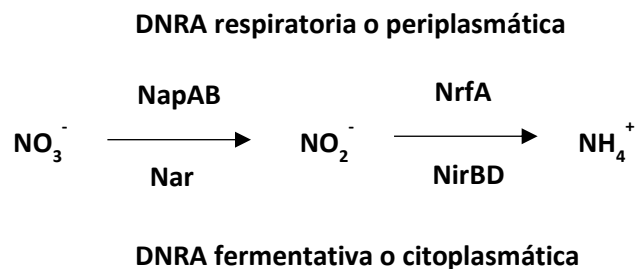


Fig. 8. Reducción desasimilatoria de nitrato a amonio (DNRA). Abreviaciones: NapAB, complejo periplasmático de nitrato reductasa; Nar, nitrato reductasa respiratoria ligada a membrana; NrfA, nitrito reductasa citocromo c; NirBD, nitrito reductasa dependiente de NADH.

Como se observa en la Fig. 8, la DNRA se puede dividir en dos pasos. El primer paso consiste en la reducción de NO_3^- a NO_2^- que al igual que la desnitrificación, es catalizado por las nitrato reductasas periplasmáticas (Nap) o ligadas a membrana (Nar), siendo *napA* y *narG* los genes codificantes para estas enzimas, respectivamente. Después de la reducción del NO_3^- , el NO_2^- se reduce a NH_4^+ a través de la enzima nitrito reductasa (Nir). En función del tipo de enzimas empleada en el proceso, se observan dos tipos de DNRA: I) una DNRA periplásmica cuya función es la conservación de energía, que utiliza una nitrito reductasa citocromo c pentahemo (Nfr) que cataliza la transferencia de electrones desde el formiato o H_2 hasta el nitrito, y II) un sistema desasimilatorio citoplasmático que actúa como un sumidero de electrones y detoxifica el NO_2^- formado durante la respiración del NO_3^- , el cual usa una nitrito reductasa dependiente de NADH con un grupo sirohemo para reducir el NO_2^- .

Por tanto, la DNRA es catalizada por diferentes enzimas (Nap-Nrf y Nar-Nir), ocurre en diferentes compartimentos celulares (periplasma y citoplasma) y ejerce diferentes funciones (generación de ATP/disipación del poder reductor y detoxificación del nitrito) dependiendo del organismo. Así, aunque el amonio formado durante el proceso de DNRA podría ser potencialmente asimilado, esta no es su principal función. Por lo tanto, la regulación de este proceso es completamente diferente a la reducción asimilatoria del nitrato, pero similar a la desnitrificación, al ser un proceso inhibido por el O₂ y su expresión no se ve alterada por el NH₄⁺ (Cabello *et al.*, 2009)

En la DNRA respiratoria, la reducción del NO₃⁻ es catalizada por un complejo periplásmico de nitrato reductasa (NapAB), mientras que la reducción de NO₂⁻ a NH₄⁺ está mediada por una nitrito reductasa citocromo c pentahemo (NfrA) que usa sustratos no fermentables (predominantemente formiato o H₂) como donadores de electrones. Aunque también puede usar otros compuestos, como la hidroxilamina, sulfito y peróxido de hidrógeno como sustrato alternativo. En este sistema periplásmico, la transferencia de electrones del formiato (o H₂) al NO₂⁻ genera una fuerza protón motriz a través de la membrana que permite la síntesis de ATP (Giblin *et al.*, 2013; Simon, 2002).

Alternativamente, muchas bacterias realizan una DNRA fermentativa donde utilizan el NO₂⁻ como un sumidero de electrones que consume el exceso de poder reductor en ambientes anaeróbicos, permitiendo una reoxidación muy eficiente del NADH y, por tanto, la generación de ATP durante la glucólisis. El beneficio secundario de esta vía es la detoxificación del nitrito formado durante la respiración del nitrato en bacterias anaerobias no desnitrificantes (Polcyn & Podeszwa, 2009). Las enzimas involucradas en esta vía son la nitrato reductasa respiratoria (Nar) responsable de la reducción del NO₃⁻ y una nitrito reductasa dependiente de NADH que cataliza la reducción del NO₂⁻ a NH₄⁺. Esta Nir dependiente de NADH está formada por una subunidad catalítica mayor (NirB) y una subunidad menor (NirD), y a diferencia de las nitrito reductasas asimilatorias dependientes de NADH su expresión solo es inducida por anoxia y no es reprimida por amonio. Aunque la DNRA fermentativa no está acoplada a la conservación de energía, las bacterias facultativas pueden obtener ATP en anaerobiosis mediante la respiración del nitrato a través de la enzima Nar.

Tabla 9. Predicción de genes involucrados en la DNRA en los genomas de *Rhodobacteraceae*. Las proteínas nitrato reductasa ligada a membrana (NarG) y la NADH-nitrito reductasa (NirBD) constituyen la DNRA fermentativa o citoplasmática, mientras que las proteínas nitrato reductasa periplasmática (NapAB) y nitrito reductasa dependiente de citocromo c (NrfA) constituyen la DNRA respiratoria o citoplasmática.

Cepa	Nitrato reductasas		Nitrito reductasas (Nir)	
	NarG	NapAB	NrfA	NirBD
<i>Al. pelagivivens</i> CECT 8811 ^T	+	-	-	-
<i>Aq. soesokkakensis</i> CECT 8620 ^T	-	-	-	+
<i>As. donghaensis</i> CECT 8599 ^T	-	-	-	+
<i>B. aestuarii</i> CECT 8489 ^T	-	-	-	-
<i>C. lipolyticum</i> CECT 8621 ^T	+	-	-	+
<i>D. aquaemixtae</i> CECT 8626 ^T	-	-	-	-
<i>F. marinus</i> CECT 8899 ^T	+	-	-	+
<i>L. sediminilitoris</i> CECT 8284 ^T	-	-	-	-
<i>L. soesokkakensis</i> CECT 8367 ^T	-	-	-	-

Cepa	NarG	NapAB	NrfA	NirBD
<i>Ml. aquimaris</i> CECT 8898 ^T	+	-	-	+
<i>Mr. algicola</i> CECT 5396 ^T	-	-	-	+
<i>O. ascidiaceicola</i> CECT 8868 ^T	-	-	-	-
<i>Po. insulae</i> CECT 8812 ^T	-	-	-	+
<i>Pr. insulae</i> CECT 8871 ^T	+	-	-	+
<i>P. marinus</i> CECT 7971 ^T	-	-	-	+
<i>Pc. litorisediminis</i> CECT 8287 ^T	-	-	-	+
<i>Pd. jejudonensis</i> CECT 8397 ^T	-	-	-	-
<i>Pg. aquimaris</i> CECT 7680 ^T	-	+	-	+
<i>Pl. abyssalis</i> CECT 8504 ^T	-	-	-	+
<i>Pl. marisminoris</i> CECT 7066 ^T	-	-	-	+
<i>Pm. varians</i> CECT 8663 ^T	-	-	-	+
<i>Po. lutimaris</i> CECT 8525 ^T	-	+	-	+
<i>Ps. marinus</i> CECT 7751 ^T	-	-	-	-
<i>Py. aestuarii</i> CECT 9025 ^T	-	-	-	+
<i>Rb. ekhonensis</i> CECT 7235 ^T	-	-	-	-
<i>Rs. antarcticus</i> CECT 7023 ^T	-	-	-	-
<i>Ru. arenilitoris</i> CECT 8715 ^T	-	+	-	+
<i>Ru. litorea</i> CECT 7639 ^T	-	+	-	-
<i>Ru. mediterranea</i> CECT 7615 ^T	-	+	-	+
<i>Ru. meonggei</i> CECT 8411 ^T	-	+	-	+
<i>Rv. aestuarii</i> CECT 7745 ^T	+	-	-	-
<i>Rv. albus</i> CECT 7450 ^T	-	+	-	-
<i>Rv. gaetbuli</i> CECT 8370 ^T	-	-	-	+
<i>Rv. halotolerans</i> CECT 8110 ^T	-	+	-	-
<i>Rx. jejudonensis</i> CECT 8625 ^T	-	-	-	-
<i>Tr. phthalicus</i> CECT 8649 ^T	-	+	-	+

Los resultados obtenidos (Tabla 9) muestran que ninguna de las cepas analizadas contuvo en su genoma el gen *nfrA* responsable de la síntesis de la nitrito reductasa citocromo c, lo que indica que *Rhodobacteraceae* no realiza la DNRA respiratoria y por tanto no obtiene energía a partir de este proceso. Este resultado era de esperar puesto que a pesar de que el gen *nfrA* se encuentra distribuido entre bacterias filogenéticamente muy diversas, dentro de *Proteobacteria* únicamente se ha descrito en los miembros de las clases *Gammaproteobacteria* (*E. coli*), *Deltaproteobacteria* (*Desulfovibrio*) y *Epsilonproteobacteria* (*Wolinella*), pero no en las clases *Betaproteobacteria* ni *Alphaproteobacteria*, a la cual pertenece la familia *Rhodobacteraceae* (Simon, 2002). Esto es debido a que los miembros pertenecientes a estas dos últimas clases son bacterias aerobias o anaerobias facultativas capaces de realizar el proceso de desnitrificación, y se sabe que tanto la DNRA respiratoria como la desnitrificación son procesos anaerobios que permiten la generación de energía, pero que no ocurren en la misma especie bacteriana. Esta preferencia a la desnitrificación sobre la DNRA está relacionada con el nicho ecológico que ocupa *Rhodobacteraceae*, dado que se ha establecido que el rendimiento energético obtenido a partir de la reducción de nitrato es ligeramente superior durante la DNRA que en la desnitrificación y probablemente por esta razón, las bacterias que habitan en un ambiente con limitación de nitrato realizan la DNRA sobre la desnitrificación al obtener una mayor ganancia energética. Sin embargo, *Rhodobacteraceae* habita zonas costeras donde no existe esta limitación de nitrato.

Por el contrario, se puede observar que el gen *nirBD* que cataliza la síntesis de la NADH-nitrito reductasa, involucrada en la vía DNRA fermentativa está extendida entre los miembros de la familia, ya que se encontró en 21 genomas de los 36 analizados (58%). Sin

embargo, de estas 21 cepas únicamente 4 - *C. lipolyticum* CECT 8621^T, *Ml. aquimaris* CECT 8898^T, *F. marinus* CECT 8899^T; y *Pr. insulae* CECT 8871^T - utilizan la vía fermentativa de la DNRA para disipar el exceso de poder reductor y detoxificar el nitrito formado durante la respiración del nitrato, puesto que presentan los genes codificantes para las enzimas Nar y NADH-NiR. También se puede observar que la nitrato reductasa periplasmática (NapAB) es más frecuente (25%) que la nitrito reductasa ligada a membrana (NarG; 17%). Esto podría sugerir que el medio del cual fueron aisladas las cepas es un medio con baja concentración de nitrato y alto contenido en carbono, ya que bajo estas condiciones la expresión de Nap se ve favorecida frente a la de Nar (González, 2007) lo que contradice la hipótesis anteriormente planteada referente a la preferencia de *Rhodobacteraceae* de la desnitrificación sobre la DSNR respiratoria.

Las concentraciones excesivas de N, a menudo en forma de nitrato, provenientes de la utilización de fertilizantes y/o plantaciones de cultivos fijadores de N₂ representan un grave problema de calidad de las aguas cada vez más preocupante. Además, la presencia de nitratos en zonas costeras se ha relacionado con la eutrofización costera, el desarrollo de zonas hipóxicas marinas y floraciones de algas nocivas, por lo que no cabe duda de que los aumentos en la carga de N representan una gran perturbación para los hábitats acuáticos. En este escenario, los resultados obtenidos tanto para la desnitrificación como para la DRNA indican que los miembros de *Rhodobacteraceae* tienen una profunda implicación en el manejo de los sistemas acuáticos, puesto que promueven la eliminación de los nitratos mediante su reducción.

▪ **Asimilación de nitrato**

La capacidad de reducir el nitrato a amonio, para su posterior incorporación al material celular, es común en la mayor parte de plantas, hongos, algas y bacterias. Con respecto a estas últimas, Kirchman (2000) informó que las bacterias marinas pueden ser importantes consumidoras de nitrógeno inorgánico con valores medios de consumo del 30% y 40% para el NH₄⁺ y el NO₃⁻, respectivamente. El proceso, que comprende la reducción de NO₃⁻ a NO₂⁻ y la de éste a NH₄⁺ por medio de las enzimas nitrato y nitrito reductasas asimilatorias (Fig. 9) se denomina asimilación de nitrato y es el principal proceso del ciclo del N (Castillo, 2005).

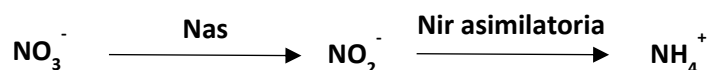


Fig. 9. Reducción asimilatoria de nitrato. Abreviaciones: nitrato reductasa asimilatoria; Nir asimilatoria, nitrito reductasa asimilatoria (Nir sirohemo).

Este sistema de asimilación de nitrato está codificado por el operón *nas*, que incluye genes relacionados con el transporte y reducción del nitrato y nitrito. Además, cabe señalar que su organización varía en función de la bacteria a estudio. La caracterización genética del operón *nas* se ha centrado principalmente en cianobacterias, pero también se ha estudiado en bacterias heterótrofas como *R. capsulatus*, *Klebsiella oxytoca*, *Azotobacter vinelandii* y la bacteria Gram positiva *Bacillus subtilis*. Pese a que los estudios en organismos heterótrofos han sido escasos; el análisis de los genomas disponibles actualmente ha sugerido que las nitrato reductasas asimilatorias se encuentran filogenéticamente muy distribuidas entre bacterias y arqueas heterótrofas (Luque-Almagro *et al.*, 2011).

El proceso de asimilación de nitrato, que transcurre en dos pasos, comienza con la reducción de NO_3^- a NO_2^- catalizada por la molibdoenzima nitrato reductasa asimilatoria (Nas). Se ha observado que existen dos tipos de Nas: I) la Nas dependiente de ferredoxina o flavodoxina encontrada en cianobacterias, *Azotobacter*, y en la arquea *Haloferax mediterraneii* y II) la Nas dependiente de NADH propia de *R. capsulatus* y otras bacterias heterótrofas. Este segundo tipo, es un heterodímero constituido por una subunidad catalítica (92 KDa) codificada por el gen *nasA*, y una subunidad diaforasa (45 KDa) codificada por el gen *nasC*, que responde a una NADH oxidoreductasa que contiene FAD y media la transferencia de electrones del NADH a la subunidad catalítica NasA. No obstante, ambos tipos son proteínas citoplasmáticas y en contraste con las nitrato reductasas desasimilatorias su expresión no se encuentra regulada por el O_2 . En cambio, son inducidas por el NO_3^- y NO_2^- e inhibidas por el NH_4^+ o por una relación C/N baja. A esto se le añade, que recientemente la caracterización del sistema de asimilación de nitratos en la especie *P. denitrificans* ha revelado una nueva proteína (NasG) cuya actividad es esencial para acoplar la oxidación del NADH a la reducción de nitrato y nitrito (Jiang & Jiao, 2016; Cabello *et al.*, 2009; Castillo, 2005; Allen *et al.*, 2001; Moreno-Vivián *et al.*, 1999)

El segundo paso del proceso de asimilación de nitrato consiste en la reducción del NO_2^- a NH_4^+ mediante una reacción de seis electrones, catalizada por la enzima citoplasmática nitrito reductasa asimilatoria. Así, el amonio generado durante esta reacción es incorporado a los esqueletos carbonados, principalmente por el ciclo GS-GOGAT.

Al igual que ocurre con las Nas, las nitrito reductasas asimilatorias también se clasifican en dos grupos: las dependientes de ferredoxina (Nir-Fd) y las dependientes de NADH (Nir-NADH). La enzima Nir-Fd se encuentra en organismos fotosintéticos oxigénicos, ya sean eucariotas o procariontes, y en la arquea *H. mediterraneii*, mientras que la Nir-NADH está presente en hongos, bacterias heterótrofas, y en la bacteria versátil *R. capsulatus* (Cabello *et al.*, 2009; Moreno-Vivián *et al.*, 1999).

Los avances en los análisis genómicos han revelado que el sistema de asimilación de nitrato, vía nitrito, se encuentra ampliamente distribuido entre las *Alphaproteobacteria*. Concretamente el gen *nasA* se ha encontrado en los genomas de muchos miembros de la familia *Rhodobacteraceae*, confirmando que muchas especies pertenecientes a esta familia son capaces de asimilar de forma natural el nitrato marino (Jiang *et al.*, 2015; Wawrik *et al.*, 2011; Moran *et al.*, 2007). Un ejemplo, es la cepa *Salipiger bermudensis* HTCC2601^T cuyo genoma contiene la vía de reducción asimilatoria de nitrato completa (Thrash *et al.*, 2010). Esto queda respaldado por los resultados obtenidos en este estudio ya que como se puede observar en la tabla 10, 19 de las 36 (52%) cepas analizadas presentan la ruta completa de asimilación de nitrato, puesto que contienen los genes codificantes para las enzimas nitrato reductasa asimilatoria y la nitrito reductasa asimilatoria dependiente de NADH. En todos ellos también se encontraron las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT) que constituyen el ciclo GS-GOGAT necesario para la incorporación del amonio a los esqueletos carbonados.

Tabla 10. Predicción de los genes involucrados en la ruta de asimilación del nitrato. La nitrito reductasa asimilatoria se ha investigado con BLASTn utilizando como secuencia de búsqueda (*query*) el gen *nasb* de *R. capsulatus* (ENA|AAQ18184.1). +, presencia; -, ausencia.

	Nitrato reductasa asimilatoria	Nitrito reductasa asimilatoria
<i>Al. pelagivivens</i> CECT 8811 ^T	-	-
<i>Aq. soesokkakensis</i> CECT 8620 ^T	+	+
<i>As. donghaensis</i> CECT 8599 ^T	-	-
<i>B. aestuarii</i> CECT 8489 ^T	-	-
<i>C. lipolyticum</i> CECT 8621 ^T	+	+
<i>D. aquaemixtae</i> CECT 8626 ^T	+	-
<i>F. marinus</i> CECT 8899 ^T	+	+
<i>L. soesokkakensis</i> CECT 8367 ^T	+	+
<i>Ml. aquimaris</i> CECT 8898 ^T	-	-
<i>Mr. algicola</i> CECT 5396 ^T	+	+
<i>O. ascidiaceicola</i> CECT 8868 ^T	-	-
<i>P. marinus</i> CECT 7971 ^T	+	+
<i>Pa. lutimaris</i> CECT 8525 ^T	+	+
<i>Pc. litorisediminis</i> CECT 8287 ^T	+	-
<i>Pd. jejudonensis</i> CECT 8397 ^T	+	+
<i>Pg. aquimaris</i> CECT 7680 ^T	+	+
<i>Pl. abyssalis</i> CECT 8504 ^T	+	+
<i>Pl. marisminoris</i> CECT 7066 ^T	+	+
<i>Pm. varians</i> CECT 8663 ^T	+	+
<i>Po. insulae</i> CECT 8812 ^T	+	+
<i>Pr. insulae</i> CECT 8871 ^T	+	+
<i>Ps. marinus</i> CECT 7751 ^T	-	-
<i>Py. aestuarii</i> CECT 9025 ^T	+	+
<i>Rb. ekhonensis</i> CECT 7235 ^T	-	-
<i>Rs. antarcticus</i> CECT 7023 ^T	-	-
<i>Ru. arenilitoris</i> CECT 8715 ^T	+	+
<i>Ru. litorea</i> CECT 7639 ^T	-	-
<i>Ru. mediterranea</i> CECT 7615 ^T	+	+
<i>Rv. aestuarii</i> CECT 7745 ^T	-	-
<i>Rv. albus</i> CECT 7450 ^T	-	-
<i>Rv. gaetbuli</i> CECT 8370 ^T	+	-
<i>Rv. halotolerans</i> CECT 8110 ^T	-	-
<i>Rx. jejudonensis</i> CECT 8625 ^T	-	-
<i>Ry. meonggei</i> CECT 8411 ^T	+	+
<i>Tr. phthalicus</i> CECT 8649 ^T	+	+
<i>Y. sediminilitoris</i> CECT 8284 ^T	-	-

No obstante, en los resultados obtenidos se observa que la asimilación de nitrato se distribuye entre los miembros de *Rhodobacteraceae* independientemente de la estrategia metabólica que emplean para la obtención de energía. Es decir, la ruta de asimilación de nitrato se encuentra presente en genomas donde también se han encontrado genes involucrados con la AAnP como es el caso de *Rv. gaetbuli* CECT 8370^T o *Pd. jejudonensis* CECT 8397^T pero también está ausente en otras cepas que supuestamente son AAnP como *Rs. antarcticus* CECT 7023^T o *Rx. jejudonensis* CECT 8625^T. Del mismo modo, la ruta de asimilación del nitrato está presente en la cepa *C. lipolyticum* CECT 8621^T, que contiene también los genes necesarios para la síntesis de RuBisCO sugiriendo que es una cepa autótrofa. Asimismo, se observan cepas heterótrofas capaces de asimilar el nitrato como son *Pl. marisminoris* CECT 7066^T y *Pc. litorisediminis* CECT 8287^T, pero también las hay que

no poseen esta capacidad de asimilación, como el caso de *Rv. albus* CECT 7450^T o *Ps. marinus* CECT 7751^T. Esto contradice la hipótesis planteada en el artículo de Jiang *et al.* (2015) donde se expone que la capacidad de asimilación del nitrato inorgánico se relaciona con la estrategia metabólica de la AAnP que utiliza la energía lumínica para reducir el gasto de materia orgánica para la producción de ATP.

▪ Nitrificación

La nitrificación hace referencia a la oxidación secuencial del amonio a nitrato. El proceso clásico de nitrificación es una sucesión de dos pasos, que consiste en la conversión de NH_4^+ en NO_2^- , que a su vez se convierte en NO_3^- (Fig. 10). Estos pasos son llevados a cabo por dos grupos diferentes de organismos quimilitoautótrofos conocidos como las bacterias o arqueas oxidantes del amonio (AOB o AOA) y las bacterias oxidantes del nitrito (NOB), respectivamente. No obstante, recientemente se ha descubierto un organismo perteneciente al género *Nitrospira* que realiza la oxidación completa de amonio a nitrato (proceso que recibe el nombre de comammox) al contener en su genoma las vías metabólicas para la oxidación del amonio y nitrito (Daims *et al.*, 2015; Van Kessel *et al.*, 2015).

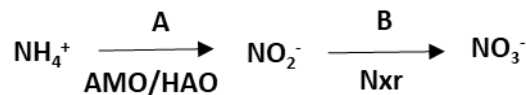


Fig. 10. Proceso de nitrificación donde la reacción A es realizada por los organismos AOB/AOA y la reacción B por los NOB. Las enzimas involucradas en las vías son: AMO, amonio monooxigenasa; HAO, hidroxilamina oxidoreductasa tipo C; Nxr, nitrito oxidoreductasa.

La conversión del NH_4^+ en NO_2^- realizada por los AOB/AOA, es un proceso complejo puesto que comprende dos pasos con la hidroxilamina (NH_2OH) como producto intermedio. En el primer paso, el amonio es oxidado a hidroxilamina por la enzima amonio monooxigenasa (AMO). En el siguiente paso, la hidroxilamina se oxida formando nitrito por acción de la enzima trimérica multihemo hidroxilamina oxidoreductasa tipo C (HAO) (Cáceres *et al.*, 2018; Nowka *et al.*, 2015; Ward, 2013; Cabello *et al.*, 2009).

La segunda parte de la nitrificación involucra la oxidación del NO_2^- a NO_3^- y es llevada a cabo por los NOB a través de la enzima nitrito oxidoreductasa (Nxr). Esta proteína es un heterodímero formado por tres subunidades $-\alpha$, β y λ - codificadas por los genes *nxrA*, *nxrB* y *nxC*, respectivamente (Daims *et al.*, 2015; Cabello *et al.*, 2009; Starkenburg *et al.*, 2006).

El proceso de nitrificación descrito hasta el momento hace referencia a la clásica nitrificación quimiliotrófica asociada a organismos aerobios obligados. No obstante, la nitrificación no queda restringida a organismos quimilitoautótrofos ya que se ha visto que también ocurre en diversas bacterias heterótrofas como *Rhodococcus* sp. CPZ24, *Klebsiella pneumoniae* CF-S9, *Vibrio diabolicus* SF16, *Anoxybacillus contaminans* HA y *Pseudomonas tolaasii* Y-11 (Sun *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2011). Los miembros de *Rhodobacteraceae* no son ni oxidantes del amonio ni del nitrito puesto que todos ellos carecen de las enzimas amonio monooxigenasa (Amo), hidroxilamina oxidoreductasa (Hao) y nitrito oxidoreductasa (Nxr), esto sugiere que no utilizan el proceso de nitrificación para alcanzar un equilibrio redox, puesto que la nitrificación heterótrofa parece tener una función más importante en el balance redox que en la conservación de energía puesto que, a diferencia

de la nitrificación quimiolitotrofica, aquí no se genera ninguna fuerza protón motriz que permita la síntesis de ATP (Cabello *et al.*, 2009).

- **Fijación de N₂**

El N₂ es una molécula muy estable químicamente, esto hace que no sea aprovechable por la mayoría de los organismos vivos y deba ser fijado antes a una forma biodisponible permitiendo su asimilación. Por tanto, la fijación del N₂ es el proceso mediante el cual se lleva a cabo la reducción del N₂ a amonio (Fig. 11). La fijación del N₂ es junto a la deposición atmosférica, la principal fuente de nitrógeno fijo en el océano y está catalizada por diversos grupos de microorganismos (Devol 2015; Zehr *et al.*, 2003).

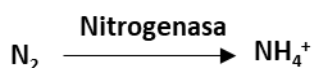


Fig. 11. Fijación del N₂. La enzima involucrada en esta vía es el complejo nitrogenasa.

El complejo enzimático nitrogenasa es el responsable de la fijación del N₂, está constituido por dos componentes: la dinitrogenasa reductasa (con Fe como cofactor) codificada por el gen *nifH* y la dinitrogenasa (con Mo y Fe como cofactores) codificada por los genes *nifD* (codifica la cadena α) y *nifK* (codifica la cadena β) siendo la responsable de la transferencia de electrones al N₂ (Ibarra, 2010; Rojas, 2008). La mayoría de los organismos diazótrofos presentan la nitrogenasa dependiente de molibdeno, sin embargo, se ha encontrado que, en condiciones de baja disponibilidad de este elemento, se induce la síntesis de la nitrogenasa alternativa dependiente de vanadio (Va) y hierro (Fe) como cofactor codificadas por los genes *vnf* y *anf*, respectivamente.

La capacidad de fijar el nitrógeno molecular está ampliamente distribuida entre los procariotas, encontrándose en diversos grupos parafiléticos, como en diferentes estilos de vida y metabolismos que incluyen: aerobiosis, anaerobiosis, autotrofia, heterotrofia, bacterias de vida libre y bacterias simbióticas, siendo *Proteobacteria* el filo que abarca una mayor abundancia de organismos fijadores de N₂ (Covelli, 2013). No obstante, pese a pertenecer a este filo, en ninguno de los genomas analizados se halló la presencia de los genes codificantes para el complejo multienzimático nitrogenasa.

2.4 Metabolismo del hierro

El hierro (Fe) es uno de los metales más abundantes de la corteza terrestre y en la naturaleza puede encontrarse en estado ferroso (Fe^{2+}) o estado férrico (Fe^{3+}). Es un elemento esencial para el metabolismo de los organismos puesto que participa en numerosos procesos celulares como la respiración, fotosíntesis, procesamiento de las ROS, síntesis de DNA y RNA, etc, habiéndose observado recientemente que también ejerce un importante papel en la formación de biopelículas, ya que regula la movilidad superficial de los microorganismos (Ahmed & Holmström, 2014; Glick *et al.*, 2010). Sin embargo, a pesar de su abundancia e importancia, no está biológicamente disponible en la mayoría de los ambientes acuáticos puesto que, en condiciones fisiológicas la forma férrica (Fe^{3+}) es insoluble y forma hidróxidos férricos altamente insolubles, conduciendo a que, en las aguas oceánicas superficiales, el hierro disuelto se encuentre a muy bajas concentraciones (< 0.5 nM). Además, el 99% del hierro disuelto que está disponible para los microorganismos en el océano superficial, se considera unido a ligandos orgánicos. En cambio, en condiciones aerobias la forma ferrosa del hierro (Fe^{2+}) es soluble, pero inestable y a través de la reacción de Fenton produce especies de iones férricos y radicales hidroxilos que son nocivos para la mayoría de las macromoléculas. Además, al igual que ocurre con el ion Fe^{3+} , las concentraciones de Fe^{2+} encontradas en el mar (10^{-10} a 10^{-9} M) están por debajo de las requeridas (10^{-7} a 10^{-5} M) para la vida de los microorganismos (Saha *et al.*, 2016; Roe *et al.*, 2012; Amin *et al.*, 2009; Wandersman & Delepelaire, 2004).

Para superar esta limitación de hierro, los microorganismos han desarrollado estrategias para mejorar la absorción de dicho compuesto. Estas estrategias se basan en dos mecanismos generales: I) adquisición de hierro por receptores específicos usando quelantes de Fe de bajo peso molecular denominados sideróforos y; II) adquisición de hierro mediada por receptores de proteínas que contengan hierro o grupos hemo sintetizadas a partir de otros organismos (Krewulak & Vogel, 2008).

Los sideróforos son agentes quelantes de Fe^{3+} de alta afinidad, sintetizados por una gran mayoría de bacterias aerobias y anaerobias facultativas como compuestos orgánicos de bajo peso molecular bajo condiciones de estrés por hierro. Se pueden considerar parte de los grupos de ligando orgánicos que se unen al hierro en el agua del mar. El sideróforo primero se une al ion Fe^{3+} y posteriormente el complejo sideróforo- Fe^{3+} formado se introduce en la célula a través de los transportadores de membrana externa que son específicos para los diferentes grupos de sideróforos. En el caso de las bacterias Gram negativas, los responsables del transporte del complejo sideróforo- Fe^{3+} son un receptor de membrana externa, una proteína de unión periplasmática y una proteína de membrana citoplasmática que pertenece al transportador de casete de unión al ATP (transportador ABC). Una vez que el complejo se encuentre en el citosol, el Fe^{3+} se reduce a Fe^{2+} , y esta se libera del sideróforo. Por último, después de la liberación del hierro, los sideróforos se degradan o se reciclan por excreción a través del sistema de bombeo de salida (Amin *et al.*, 2009; Stojiljkovic *et al.*, 1992). Alternativamente a la producción de sideróforos, las bacterias marinas pueden adquirir el hierro a través de la absorción de hemoproteínas y otras proteínas que contengan hierro, como son la lactoferrina, transferrina y ferritina (Abdelhamed *et al.*, 2016). La presencia de estas moléculas en la columna de agua se debe a procesos de degradación celular causados por el pastoreo del zooplancton, la lisis viral y/o la degradación bacteriana del detrito. En el ambiente marino destaca principalmente el hemo

que se encuentra muy distribuido en este tipo entorno, al actuar como cofactor de las enzimas heterocíclicas que contienen hierro y como grupo prostético de muchas hemoproteínas, como la hemoglobina y los citocromos. Tras su liberación por los procesos anteriores, es probable que se encuentren complejos hemo sobre superficies o en partículas debido a su hidrofobicidad a valores de pH oceánicos. En ambientes marinos, el hemo se ha detectado en concentraciones picomolares en el material particulado y en concentraciones nanomolares en la fase disuelta de estuarios. Por tanto, el hemo puede representar una fuente de hierro local potencialmente abundante para aquellas bacterias que viven cerca del fitoplancton (Hogle *et al.*, 2017; Roe *et al.*, 2013).

Las exploraciones de las anotaciones a través de RAST han permitido observar que los miembros de *Rhodobacteraceae* no adquieren el hierro a través de la síntesis de sideróforos, puesto que en ninguno de los genomas analizados se hallaron genes relacionados con este fin. Asimismo, los resultados obtenidos mediante AntiSMASH tampoco mostraron clústeres génicos involucrados en la biosíntesis de sideróforos en ningunos de los genomas a estudio. Estos datos corroboran el resultado de Collins *et al.* (2015) donde se concluye que la presencia de genes de síntesis de sideróforos en el grupo Roseobacter es rara. Dentro del grupo Roseobacter únicamente se han predicho genes de sideróforos en especies pertenecientes a los géneros *Phaeobacter* y *Leisingera*, para los que no se cuenta con representantes entre los genomas analizados en el presente trabajo. No obstante, en 3 de los genomas analizados (*Pl. marisminoris* CECT 7066^T, *Pa. lutimaris* CECT 8525^T y *Aq. soesokkakensis* CECT 8620^T) se encontraron genes codificantes para tres enzimas: 2,3-DHB dehidrogenasa (EC 1.3.1.28), isocorismatasa (EC 3.3.2.1) e isocorismato sintasa (EC 5.4.4.2), cuya función está involucrada en la síntesis de diversos tipos de sideróforos. Asimismo, el genoma de *As. donghaensis* CECT 8599^T presentó un módulo NRPS para la síntesis del sideróforo fluorescente pioverdina, que es el principal sideróforo producido por las especies de *Pseudomonas* (Trapet *et al.*, 2016). Estos hallazgos abren la posibilidad de que *Rhodobacteraceae* realmente sí que sea capaz de producir sideróforos, aunque sus sistemas de producción no hayan sido caracterizados todavía. Esta hipótesis queda respaldada por el elevado número de sistemas de transporte de sideróforos encontrados entre los genomas analizados. En todos los genomas, a excepción de *Pl. marisminoris* CECT 7066^T y *Py. aestuarii* CECT 9025^T, se halló el operón *pitADC* codificante para un sistema de adquisición de grupos hemo, sideróforos (ferricromo; Fch) e iones férricos. Tales compuestos se unen a la lipoproteína PitA, y se transferirán a la transferasa PitC para atravesar la membrana celular utilizando la energía proporcionada por la hidrólisis de ATP mediante la proteína PitD (Brown *et al.*, 2004) Por otra parte, el genoma de la cepa *P. marinus* CECT 7971^T presentó el sistema de absorción de hidroxamato férrico (*fhu*) responsable del transporte de los complejos sideróforo-Fe³⁺. En este sistema el receptor FhuA transporta los sideróforos de tipo hidroxamato a través de la membrana externa, la proteína periplasmática FhuD y la citoplasmática FhuC, translocan los sideróforos desde el periplasma hasta el citoplasma mediante la hidrólisis de ATP catalizada por la proteína FhuC (Köster, 2004; Abdelhamed *et al.*, 2016). Además, en 8 de los genomas analizados (tabla 11) se encontraron los constituyentes de los transportadores ABC implicados en la absorción de sideróforos, hemo y vitamina B₁₂ (Köster, 2001). En la tabla se aprecia que las cepas *Mr. algicola* CECT 5396^T, *Ru. litorea* CECT 7639^T y *Ru. meonggei* CECT 8411^T carecen del constituyente ATPasa, sin embargo, esta función podría ser cubierta por el gen codificante para la ATPasa del transportador ABC-Fe³⁺/cobalamina encontrado en prácticamente todos los genomas (dato no mostrado). Del mismo modo, otras 5 cepas (tabla 11) contenían en

sus genomas los genes codificantes para otro sistema transportador de tipo ABC sideróforo-Fe³⁺, dado que la carencia de la ATPasa de las cepas *P. marinus* CECT 7971^T y *Pg. aquimaris* CECT 7680^T, igual que en el caso anterior, puede cubrirse por la ATPasa del transportador ABC-Fe³⁺/cobalamina. En general, la presencia de estos sistemas de transporte de sideróforos junto con la falta de rutas de biosíntesis encontradas entre los genomas a estudio puede sugerir dos cosas: que los procesos de biosíntesis de sideróforos en *Rhodobacteraceae* no estén bien caracterizados, como ya había apuntado anteriormente, o que esta familia utilice una estrategia, para la adquisición de Fe, menos costosa energéticamente que involucra la utilización de los quelantes de Fe producidos por otras bacterias con las que cohabita, reduciendo así la competencia por el hierro.

Por último, tal y como ha sido planteado en publicaciones previas (Hogle *et al.*, 2017, 2016; Roe *et al.*, 2013) los resultados obtenidos también han demostrado que las *Rhodobacteraceae* son capaces de utilizar fuentes de hierro de tipo hemo, ya que los sistemas de transporte de sideróforos encontrados anteriormente también permiten la captación de grupos hemo exógenos. Aparte de estos sistemas, en 11 cepas (*C. lipolyticum* CECT 8621^T, *Aq. soesokkakensis* CECT 8620^T, *O. ascidiaceicola* CECT 8868^T, *P. marinus* CECT 7971^T, *Ru. mediterranea* CECT 7615^T, *Ru. arenilitoris* CECT 8715^T, *Ru. litorea* CECT 7639^T, *Mr. algicola* CECT 5396^T, *Py. aestuarii* CECT 9025^T, *Ps. marinus* CECT 7751^T y *As. donghaensis* CECT 8599^T) se encontraron el sistema específico de adquisición de hemo, formado por un complejo TonB (ExbB y TonB), un receptor de membrana externa (HumR) y un sistema de transporte ABC, que consiste en una proteína de unión periplasmática (HumT), una permeasa de membrana (HmuU) y una ATPasa (HmuV). Además, en estas cepas también se halló la proteína hemo oxigenasa y/o chaperona (HmuS), localizada en el citoplasma, que parece necesaria para utilizar con éxito el hierro de los complejos hemo en los sistemas caracterizados (Roe *et al.*, 2013). Por tanto, en conjunto los resultados obtenidos sugieren que los miembros de *Rhodobacteraceae* son capaces de sobreponerse a la limitación de hierro encontrada en los ambientes acuáticos a través de la utilización sistemas de transporte específicos de hierro y grupos hemo.

Tabla 11. Predicción de los genes involucrados en la síntesis de los transportadores de tipo ABC para la absorción de hierro. +, presencia; -, ausencia.

	Transportador ABC (Hierro, B ₁₂ , sideróforos, hemo)			Transportador ABC sideróforo-Fe ³⁺		
	Proteína periplasmática	Permeasa	ATPasa	Proteína periplasmática	Permeasa	ATPasa
<i>Al. pelagivivens</i> CECT 8811 ^T	-	-	-	-	-	-
<i>Aq. soesokkakensis</i> CECT 8620 ^T	-	-	-	-	-	-
<i>As. donghaensis</i> CECT 8599 ^T	+	+	+	-	-	-
<i>B. aestuarii</i> CECT 8489 ^T	-	-	-	-	-	-
<i>C. lipolyticum</i> CECT 8621 ^T	-	-	-	-	+	+
<i>D. aquamixtae</i> CECT 8626 ^T	-	-	-	-	-	-
<i>F. marinus</i> CECT 8899 ^T	-	-	-	-	-	+
<i>L. soesokkakensis</i> CECT 8367 ^T	-	-	-	-	-	-
<i>Ml. aquimaris</i> CECT 8898 ^T	-	-	-	-	-	-
<i>Mr. algicola</i> CECT 5396 ^T	+	+	-	-	+	+
<i>O. ascidiaceicola</i> CECT 8868 ^T	-	-	-	-	-	-
<i>P. marinus</i> CECT 7971 ^T	-	-	-	+	+	-
<i>Pa. lutimaris</i> CECT 8525 ^T	-	-	-	-	-	-
<i>Pc. litorisediminis</i> CECT 8287 ^T	-	-	-	-	-	-
<i>Pd. jejudonensis</i> CECT 8397 ^T	+	+	+	-	-	-
<i>Pg. aquimaris</i> CECT 7680 ^T	-	-	-	+	+	-
<i>Pl. abyssalis</i> CECT 8504 ^T	+	+	+	+	+	+
<i>Pl. marisminoris</i> CECT 7066 ^T	-	-	-	+	+	+
<i>Pm. varians</i> CECT 8663 ^T	-	-	-	-	+	+
<i>Po. insulae</i> CECT 8812 ^T	-	-	-	-	-	-
<i>Pr. insulae</i> CECT 8871 ^T	-	-	-	-	-	-
<i>Ps. marinus</i> CECT 7751 ^T	+	+	+	-	-	-

	Transportador ABC (Hierro, B ₁₂ , sideróforos, hemo)			Transportador ABC sideróforo-Fe ³⁺		
	Proteína periplasmática	Permeasa	ATPasa	Proteína periplasmática	Permeasa	ATPasa
<i>Py. aestuarii</i> CECT 9025 ^T	+	+	+	+	+	+
<i>Rb. ekhonensis</i> CECT 7235 ^T	-	-	-	-	-	-
<i>Rs. antarcticus</i> CECT 7023 ^T	-	-	-	-	-	-
<i>Ru. arenilitoris</i> CECT 8715 ^T	+	+	+	-	-	-
<i>Rv. gaetbuli</i> CECT 8370 ^T	-	-	-	-	-	-
<i>Ru. litorea</i> CECT 7639 ^T	+	+	-	-	-	-
<i>Ru. mediterranea</i> CECT 7615 ^T	+	+	-	-	-	-
<i>Ru. meonggei</i> CECT 8411 ^T	+	+	-	-	-	-
<i>Rv. aestuarii</i> CECT 7745 ^T	+	+	-	-	-	-
<i>Rv. albus</i> CECT 7450 ^T	+	+	+	-	-	-
<i>Rv. halotolerans</i> CECT 8110 ^T	-	-	-	-	-	-
<i>Rx. jejudonensis</i> CECT 8625 ^T	-	-	-	+	-	-
<i>Tr. phthalicus</i> CECT 8649 ^T	+	+	+	-	-	-
<i>Y. sediminilitoris</i> CECT 8284 ^T	-	-	-	-	-	-

2.5 Metabolismo del fósforo

El fósforo (P) es un compuesto esencial para la vida al constituir un importante componente de las biomoléculas y de procesos celulares regulatorios. Se encuentra generalmente en la biosfera en su estado de oxidación más alto (5+) como fosfato inorgánico (P_i), siendo su forma más biodisponible. La disponibilidad del P se ha identificado como un determinante clave de la productividad marina y su ciclo está estrechamente relacionado con la dinámica del carbono y el nitrógeno en los océanos (Romano *et al.*, 2017; Villarreal-Chiu *et al.*, 2012).

Las principales formas en las que se encuentra el P en la columna de agua superior son el P_i disuelto y el fósforo orgánico disuelto (DOP). Pese a que el P_i se considera la fuente de P preferible para los microorganismos al encontrarse directamente disponible para el crecimiento bacteriano, su concentración en entornos naturales suele ser escasa (Orchard *et al.*, 2010). De esta forma, en regiones oligotróficas, y estacionalmente en las aguas superficiales de una amplia gama de ambientes marinos, las concentraciones de P_i pueden ser extremadamente bajas. Por ejemplo, la mayoría de los giros oceánicos centrales tienen niveles cercanos al límite de detección química ($< 1\text{nM}$), lo que limita el crecimiento y la productividad bacteriana (Luo *et al.*, 2009). Bajo estas condiciones limitantes de P_i , las bacterias marinas han desarrollado un sistema que les permite sobreponerse a la carencia de este elemento esencial. Este sistema se basa en la producción de diversas enzimas que liberan P_i a partir de las moléculas orgánicas que forman parte del DOP presente en la superficie del océano y que puede llegar a comprender una porción significativa del P total de los océanos (Romano *et al.*, 2017).

El principal componente del DOP marino son los ésteres de fosfato. Estos son compuestos organofosforados que contienen en su estructura el enlace C-O-P y que pueden llegar a constituir una proporción del 75% del DOP que se encuentra en la superficie del océano (Kolowitz *et al.*, 2001). Las fosfatasa alcalinas producidas por una amplia diversidad de microorganismos son las responsables de la hidrólisis de los ésteres de fosfato. En procariontes se han identificado tres tipos de fosfatasa alcalinas (EC 3.1.3.1; PhoA, PhoD y PhoX), las cuales difieren en la especificidad del sustrato y en los requisitos de los iones metálicos específicos para sus actividades (Luo *et al.*, 2009; Tseng & Tang 2014). Como se puede observar en la tabla 12, todos los genomas de *Rhodobacteraceae* analizados presentaron el gen codificante para la fosfatasa alcalina tradicional PhoA. Además, en 2 de ellos se halló también el gen para la fosfatasa alcalina PhoD. Sin embargo, ninguno de ellos contuvo el gen codificante para la fosfatasa alcalina PhoX. Estos resultados pueden deberse a que las concentraciones de Mg^{2+} en el océano son superiores a la de Ca^{2+} (www.web.stanford.edu/group/Urchin/mineral.html) siendo este último ion el requerido para el funcionamiento de las fosfatasa alcalinas PhoD y PhoX, mientras que el cofactor necesario para PhoA es Mg^{2+} o Zn^{2+} . Por tanto, la utilización de fosfatasa alcalinas dependientes de Mg^{2+} en lugar de Ca^{2+} supone una ventaja ecológica para la hidrólisis de compuestos organofosforados por parte de *Rhodobacteraceae*.

Tabla 12. Predicción de la presencia de genes involucrados en la obtención de P en los genomas de *Rhodobacteraceae* analizados. El gen *ppk* codifica para el almacenamiento de P_i como polifosfatos. +, presencia; -, ausencia.

	Transportadores P _i		Transporte fosfonatos			Fosfatasas alcalinas			Vía C-P liasa							<i>ppk</i> *
	<i>pitA</i>	<i>Pst</i> system	<i>phnC</i>	<i>phnD</i>	<i>phnE</i>	<i>phoA</i>	<i>phoD</i>	<i>phoX</i>	<i>phnG</i>	<i>phnH</i>	<i>phnI</i>	<i>phnJ</i>	<i>phnK</i>	<i>phnL</i>	<i>phnN</i>	
<i>Al. pelagivivens</i> CECT 8811 ^T	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Aq. soesokkakensis</i> CECT 8620 ^T	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>As. donghaensis</i> CECT 8599 ^T	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. aestuarii</i> CECT 8489 ^T	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>C. lipolyticum</i> CECT 8621 ^T	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>D. aquaemixtae</i> CECT 8626 ^T	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>F. marinus</i> CECT 8899 ^T	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>L. soesokkakensis</i> CECT 8367 ^T	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Ml. aquimaris</i> CECT 8898 ^T	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Mr. algicola</i> CECT 5396 ^T	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>O. ascidiaceicola</i> CECT 8868 ^T	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. marinus</i> CECT 7971 ^T	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pa. lutimaris</i> CECT 8525 ^T	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Pc. litorisediminis</i> CECT 8287 ^T	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Pd. jejudonensis</i> CECT 8397 ^T	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Pg. aquimaris</i> CECT 7680 ^T	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pl. abyssalis</i> CECT 8504 ^T	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pl. marisminoris</i> CECT 7066 ^T	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Pm. varians</i> CECT 8663 ^T	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Po. insulae</i> CECT 8812 ^T	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Pr. insulae</i> CECT 8871 ^T	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ps. marinus</i> CECT 7751 ^T	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Py. aestuarii</i> CECT 9025 ^T	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Rs. antarcticus</i> CECT 7023 ^T	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Ru. arenilitoris</i> CECT 8715 ^T	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ru. litorea</i> CECT 7639 ^T	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

	Transportadores P _i		Transporte fosfonatos			Fosfatasas alcalinas			Vía C-P liasa							ppk*
	<i>pitA</i>	<i>Pst</i> system	<i>phnC</i>	<i>phnD</i>	<i>phnE</i>	<i>phoA</i>	<i>phoD</i>	<i>phoX</i>	<i>phnG</i>	<i>phnH</i>	<i>phnI</i>	<i>phnJ</i>	<i>phnK</i>	<i>phnL</i>	<i>phnN</i>	
<i>Ru. mediterranea</i> CECT 7615 ^T	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ru. meonggei</i> CECT 8411 ^T	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rv. aestuarii</i> CECT 7745 ^T	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rv. albus</i> CECT 7450 ^T	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Rv. gaetbuli</i> CECT 8370 ^T	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Rv. halotolerans</i> CECT 8110 ^T	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rx. jejudonensis</i> CECT 8625 ^T	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Tr. phthalicus</i> CECT 8649 ^T	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Y. sediminitoris</i> CECT 8284 ^T	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

El segundo componente mayoritario del DOP marino son los fosfonatos. Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza en un rango de moléculas biogénicas que contienen el enlace C-P en lugar del enlace C-O-P propio de los ésteres de fosfato (Villarreal-Chiu *et al.*, 2012). Pueden constituir una proporción del 25% del DOP marino, por lo que son considerados otra fuente significativa de P para los microorganismos. De esta forma, varios estudios (Martínez *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2011; Gilbert *et al.*, 2009) han respaldado la importancia ecológica de la utilización de los fosfonatos como ruta alternativa para la adquisición de fósforo en bacterias marinas mediante la detección de la distribución generalizada de genes biosintéticos y catabólicos de fosfonatos en el océano.

La ruta principal para la utilización microbiana de fosfonatos es la vía C-P liasa, cuya presencia y actividad ha sido demostrada en varios microorganismos marinos entre los que se encuentran miembros del orden *Rhodobacterales* (Sosa *et al.*, 2017; Villarreal-Chiu *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2010). Esta ruta ha sido estudiada en *E. coli*, donde se ha demostrado que el complejo C-P liasa está compuesto por 14 productos génicos que en conjunto catalizan la hidrólisis de una amplia gama de fosfonatos estructuralmente diversos que pueden contener enlaces C-P activados o no activados. En cada caso, el producto final de la ruta es el hidrocarburo correspondiente y P_i . De los 14 genes que constituyen la vía C-P liasa, se ha especulado que siete de ellos (*phnGHIJKLM*) constituyen el núcleo central de la ruta metabólica. Mientras que los restantes codifican para transportadores de casete de unión a ATP (*phnCDE*), para proteínas represoras (*phnF*) o para funciones reguladoras u otros roles accesorios (*phnNOP*) (Villarreal-Chiu *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos en el rastreo de los genes implicados en el catabolismo de los fosfonatos muestran que el 50% (18 de 36) de las cepas (Tabla 12) presentaban en sus genomas los genes centrales para la vía de la C-P liasa, lo que sugiere que miembros de *Rhodobacteraceae* son capaces de utilizar los fosfonatos como fuente de P en condiciones de privación de P_i puesto que los genes que codifican esta vía se transcriben a partir de un único promotor que es miembro del regulón Pho cuya expresión es dependiente de los niveles de P_i . Respecto a la presencia de los genes *phnCDE* relacionados con la adquisición de fosfonatos se puede apreciar que en casi todos los genomas analizados (29 de los 36) se halló el gen *phnE*, pero todos carecían de los genes *phnC* y *phnD*. Esta observación puede sugerir dos cosas: 1) la ausencia de *phnC* y *phnD* se deba al hecho de trabajar con genomas abiertos. Esta hipótesis implicaría que todas las cepas de *Rhodobacteraceae* analizadas sí que contienen transportadores de fosfonatos en sus genomas independientemente de que contengan o no los genes necesarios para su catabolismo, lo que puede sugerir que los fosfonatos no siempre se usen como fuente de P_i , sino que después de su transporte a la célula pueden incorporarse en fosfolípidos, fosfoproteínas u otras macromoléculas mediante rutas anabólicas. Otra explicación para la presencia de transportadores de fosfonatos en las cepas que carecen de genes asociados a la vía C-P liasa es que posiblemente contengan otras enzimas independientes a esta vía y que también escinden los enlaces C-P como son la enzima fosfonoacetaldehído hidrolasa (PhnX; EC 3.11.1.1), la fosfonoacetato hidrolasa (PhnA; EC 3.11.1.2) o la enzima fosfonopiruvato hidrolasa (Pph; EC 3.11.1.3). De hecho, esta segunda explicación queda avalada por los resultados obtenidos puesto que la enzima fosfonoacetato hidrolasa (PhnA), responsable de la formación de acetato y P_i a partir de fosfonoacetato, se ha encontrado en 6 cepas analizadas (dato no mostrado), 4 de las cuales carecían de los genes asociados a la vía C-P liasa. Sin embargo, las enzimas fosfonoacetaldehído hidrolasa y fosfonopiruvato hidrolasa no se hallaron en ninguno de los genomas analizados. La expresión de estas enzimas a diferencia de la vía C-P liasa, es insensible al P_i por lo que desempeñan un papel complementario al complejo C-P liasa en el entorno marino; y 2) puede que la ausencia de *phnC* y *phnD* no se deba al grado

de acabado del ensamblado si no que sea una carencia real, lo que sugeriría la existencia de rutas de absorción de fosfonatos aún desconocidas.

Además, como se observa en la tabla 12, las cepas estudiadas también contienen los dos sistemas principales para el transporte de fosfato inorgánico. Todas las cepas presentaron en sus genomas el transportador ABC de P_i de alta afinidad (*pstSCAB*) que es inducido a bajas concentraciones externas de P_i por el regulón *pho* (*phoUBR*). La mayoría presentaron también el transportador P_i de baja afinidad (*pitA*) que es dependiente de la fuerza protón-motriz (Harris *et al.*, 2001). Asimismo, todas ellas presentaron la presencia de genes para el almacenamiento de P_i como polifosfatos (*ppk*) pudiendo proporcionar una estrategia alternativa para mantener un suministro confiable de fósforo.

De los resultados obtenidos se puede concluir que los miembros de *Rhodobacteraceae* pueden utilizar fuentes de fósforo tanto en forma orgánica como inorgánica para su crecimiento y reproducción, lo que les permite adaptarse a una amplia variedad de nichos ecológicos.

2.6 Metabolismo de compuestos C1

El metabolismo de compuestos C1 incluye todas aquellas reacciones que involucran el traspaso de radicales con un átomo de carbono de un compuesto a otro. Estas unidades C1 pueden transferirse en forma de grupos metilo (-CH₃), metileno (-CH₂·), metenilo (-CH=), formilo (-CHO) y formimino (-CH=NH) entre los diversos compuestos. Algunos microorganismos especializados son capaces de realizar dichas transferencias mediante la oxidación de grupos metilo y compuestos C1, como son el metano, formaldehído, formiato o metilamina, para ser utilizados como fuente de carbono y energía (Chistoserdova, 2011, 2009; Sun *et al.*, 2011). Entre estos organismos, los más conocidos son los organismos metilótrofos que asimilan las unidades C1 en biomasa a través de la ruta de la ribulosa monofosfato (RuMP) o a partir del ciclo de la serina, utilizando como intermediario clave el formaldehído (Orita *et al.*, 2006; Chistoserdova *et al.*, 2005).

En el océano existe una gran cantidad de compuestos C1 (Tabla 13). Estos compuestos son sustratos potenciales para el metabolismo C1 y tienen un importante papel en el ciclo global del carbono y la química atmosférica. Asimismo, la materia orgánica contiene muchos compuestos metilados que actúan como importantes osmorreguladores. Ejemplos importantes de estos son el DMSP, la glicina-betaína (GBT), la colina, la carnitina y la trimetilamina N-óxido (TMAO), cuyos grupos metilo se eliminan cuando se catabolizan y se oxidan por rutas metabólicas similares a las utilizadas para los compuestos C1. Además, la degradación de estos compuestos produce pequeñas aminas metiladas (MAs) como son la trimetilamina (TMA), dimetilamina (DMA) y la monometilamina (MMA) que pueden ser utilizadas por las bacterias marinas como fuentes de carbono y nitrógeno (Sun, 2014).

En trabajos previos se ha constatado la presencia de la metilotrofia entre los miembros de la familia *Rhodobacteraceae* (Chistoserdova *et al.*, 2009; Schäfer *et al.*, 2005, 2002) Sin embargo, menos conocidos son aquellos microorganismos que pese a poseer rutas de oxidación de compuestos C1, carecen de las rutas necesarias para la síntesis neta de biomasa, los cuales han sido denominados por Sun *et al.* (2011) como organismos metilóvoros.

Tabla 13. Sustratos potenciales para el metabolismo C1 presentes en el hábitat marino. Adaptación de Sun (2014).

Sustrato	Fórmula química	
Metanol	CH ₃ OH	
Formaldehído	CH ₂ O	
Ácido fórmico	HCOOH	
Aminas metiladas	Trimetilamina	(CH ₃) ₃ N
	Dimetilamina	(CH ₃) ₂ NH
	Monometilamina	CH ₃ NH ₂
Osmolitos metilados (aminas cuaternarias)	Glicina betaína	(CH ₃) ₃ N ⁺ CH ₂ COO ⁻
	TMAO	(CH ₃) ₃ N ⁺ O ⁻
Sulfuro metilado	DMS	CH ₃ SCH ₃
	Metanotiol	CH ₃ SH

▪ Ruta central en la oxidación de compuestos C1

Un proceso central en el metabolismo C1 es la vía de oxidación ligada a tetrahidrofolato (THF) que oxida las unidades de un carbono hasta CO₂ produciendo energía en forma de nucleótidos reducidos y ATP (Fig. 12 A). En esta ruta, los productos de los genes de *metF*, *fold* y *fhs* catalizan los primeros pasos de esta vía de oxidación ligada a metil-THF. Mientras que los genes *fdhF*, *fdsB* y *fdhD* codifican las diferentes subunidades de la formiato deshidrogenasa (FDH) responsable del último paso de la vía, la oxidación del formiato a CO₂. Por último, los genes *mobA* y *moeA* codifican proteínas necesarias para la síntesis del cofactor de molibdeno, que se requiere para la actividad de la mayoría de las molibdoenzimas bacterianas, como por ejemplo la FDH.

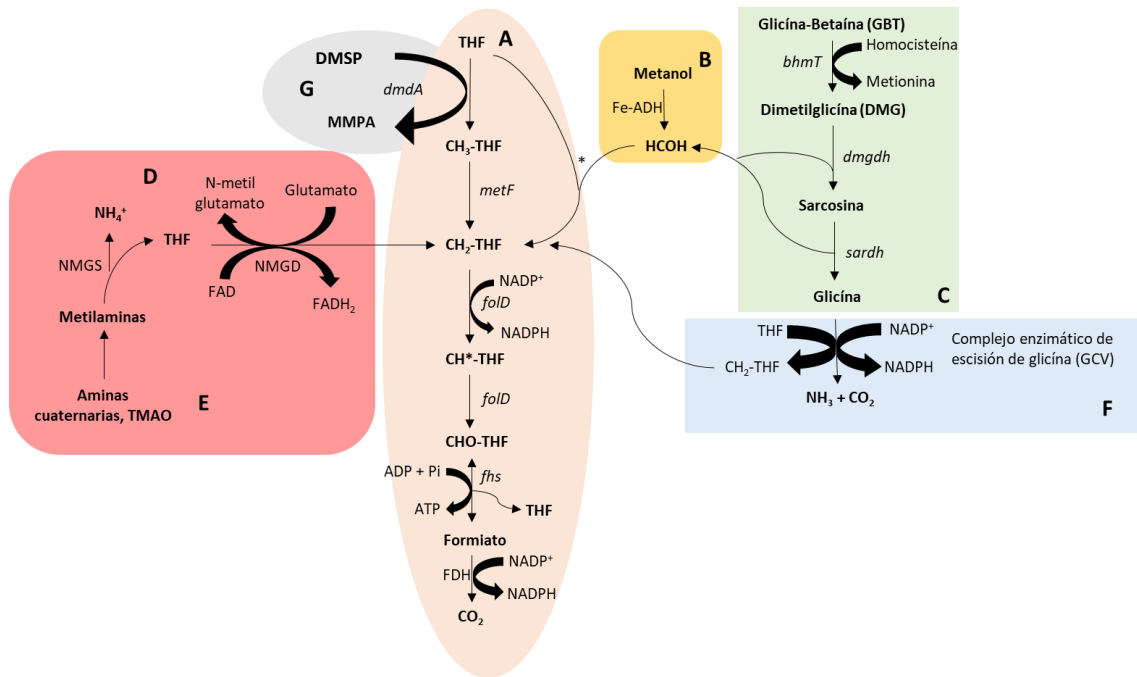


Fig. 12. Rutas metabólicas involucradas en el metabolismo C1. A) Vía de oxidación ligada al THF; B) Vía de oxidación del metanol; C) Desmetilación y oxidación de la glicina betaína; D) Vías de oxidación de las metilaminas; E) Vías de degradación de aminas cuaternarias (colina, carnitina) y TMAO; F) Vía de escisión de la glicina; G) Vía de desmetilación del DMSP. **THF**, tetrahidrofolato; **CH₃-THF**, 5-metiltetrahidrofolato; **CH₂-THF**, 5,10-metilentetrahidrofolato; **CHO-THF**, 10-formiltetrahidrofolato; **HCOH**, formaldehído; **DMSP**, dimetilsulfoniopropionato; **MMPA**, metil mercaptopropionato; **TMAO**, óxido de N-trimetilamina; **NH₄⁺**, amonio; *dmdA*, DMSP desmetilasa; *metF*, metileno-THF reductasa; *fold*, 5,10-metileno tetrahidrofolato deshidrogenasa/ciclohidrolasa; *fhs*, formiato-THF ligasa; *FDH*, formiato deshidrogenasa; *Fe-ADH*, alcohol deshidrogenasa dependiente de Fe; *bhmT*, betaína homocisteina metiltransferasa; *dmgdh*, dimetilglicina deshidrogenasa; *sardh*, sarcosina deshidrogenasa; **NMGS**, N-metilglutamato sintasa; **NMGD**, N-metilglutamato deshidrogenasa; *-reacción espontánea. Adaptación de Sun *et al.*(2011).

La exploración de los genomas en estudio determinó que la mayoría de las cepas (86%, 31 de 36) contenían en sus genomas todos los genes necesarios para codificar de forma completa la vía de oxidación ligada a THF. Las únicas excepciones fueron *Pl. abyssalis* CECT 8504^T, *Pl. marisminoris* CECT 7066^T y *P. marinus* CECT 7971^T al carecer del gen *fhs* codificante de la enzima formiato-THF ligasa. De igual forma, la cepa *Aq. soesokkakensis* CECT 8620^T careció también de dicho gen, así como de los necesarios para codificar la subunidad alfa (*fdhF*) y beta (*fdsB*) de la formiato deshidrogenasa. Por último, el genoma de *Py. aestuarii* CECT 9025^T no presentó ninguno de los genes codificantes para las enzimas metil-H₄F reductasa (*metF*), formiato

deshidrogenasa o formiato-THF ligasa. Pese a estas excepciones, el porcentaje de cepas obtenido que contienen la ruta de oxidación ligada al THF, confirma el estudio de Lidbury *et al.* (2017) donde se plantea que las bacterias marinas únicamente oxidan los compuestos C1 a través de la vía ligada a THF, dado que carecen de los genes necesarios para la oxidación a través de la tetrahidrometanopterin (H₄MPT), de la vía ligada al glutatión o de la enzima activadora del formaldehído. Del mismo modo, los resultados también están conformes al estudio de Sun *et al.* (2011) donde se observa que los genes involucrados en la oxidación ligada a THF de los compuestos C1 están ampliamente distribuidos dentro del orden *Rhodobacterales*. Por otro lado, se observó que ninguno de los genomas analizados contuvo los genes codificantes para las dos enzimas clave, la hexulosa fosfato sintasa (*hps*) y la hexulosa fosfato isomerasa (*hpi*), que permiten el ciclo RuMP. De igual modo, el gen para una enzima clave del ciclo de la serina, la fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*), está ausente en todos los genomas (Chistoserdova, 2011). Esta presencia de genes involucrados en la oxidación de unidades C1 junto con la carencia de rutas metabólicas para la asimilación de dichos compuestos, lleva a sugerir que los miembros de *Rhodobacteraceae* puedan ser considerados como organismos metilóvoros al utilizar el metabolismo C1 para la generación de energía, pero no biomasa.

- **Oxidación del metanol**

El metanol es un compuesto orgánico abundante en el océano, donde puede servir como fuente de carbono y energía para los microorganismos metilótrofos. La capacidad para oxidar el metanol se ha relacionado con la presencia de los genes *mx* que codifican las diferentes subunidades de la enzima metanol deshidrogenasa (MDH), la cual contiene un cofactor de pirroloquinolina quinona (PQQ) para oxidar el metanol a formaldehído (Ramachandran & Walsh, 2015). En ninguno de los genomas analizados se hallaron genes codificantes de dicha enzima, lo que sugiere que *Rhodobacteraceae* no sería capaz de oxidar el metanol, dado que la oxidación de dicho compuesto se ha observado pocas veces en bacterias no metilótrofas que carecen de la MDH-PQQ (Sun *et al.*, 2011). Sin embargo, todos los genomas contenían genes codificantes para la enzima alcohol deshidrogenasa dependiente de hierro (Fe-ADH). Diferentes estudios (Sun *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2009; Jeon *et al.*, 2008; Radianingtyas & Wright, 2003) han demostrado que la Fe-ADH pese a no oxidar de forma específica el metanol, es capaz de oxidar varios alcoholes de cadena corta (metanol, etanol y 1-propanol) generando energía en forma de ATP. Además, el análisis de las secuencias con BLASTn reveló que 6 de los genomas estudiados (Tabla 14) contenían un gen homólogo al gen *xoxF* (ACS40517.1) de *Methylobacterium extorquens* ATCC 14718, codificante para una MDH alternativa que contiene lantano y que ha sido identificado en muchos microorganismos metilótrofos (Chu & Lidstrom, 2016; Goenrich *et al.*, 2001). Estos resultados sugieren que *Rhodobacteraceae* puede oxidar el metanol mediante la Fe-ADH y/o la lantano-MDH produciendo formaldehído, el cual podrá ser oxidado adicionalmente a CO₂, mediante la vía de oxidación ligada a THF analizada anteriormente, produciendo de este modo energía en forma de nucleótidos reducidos y ATP (Fig. 12 B).

Tabla 14. Estudio de la presencia de la enzima metanol deshidrogenasa entre los miembros de *Rhodobacteraceae* realizado mediante BLASTn. Secuencia utilizada en la búsqueda (*query*): gen *xoxF* de *Methylobacterium extorquens* ATCC 14718 (ACS40517.1). Las cepas estudiadas que faltan en la tabla carecían de dicho gen.

	Cobertura <i>query</i> (%)	Valor E	Identidad (%)
<i>Pl. marismínoris</i> CECT 7066 ^T	93	0	75
<i>Rv. aestuarii</i> CECT 7745 ^T	90	0	74
<i>Rv. gaetbuli</i> CECT 8370 ^T	93	0	76
<i>Ru. meonggei</i> CECT 8411 ^T	92	0	74
<i>C. lipolyticum</i> CECT 8621 ^T	89	0	75
<i>D. aquaemixtae</i> CECT 8626 ^T	93	0	77

▪ **Degradación de aminas metiladas y sus precursores**

Las aminas metiladas (trimetilamina, TMA; dimetilamina, DMA; monometilamina; MMA) forman parte del *pool* del nitrógeno orgánico disuelto marino, encontrándose muy extendidas por el ambiente marino. Sus precursores, glicina betaína (GBT), trimetilamina-N óxido (TMAO), colina y carnitina, son importantes constituyentes de las membranas lipídicas eucariotas y, además, son utilizados por los organismos marinos como osmorreguladores para contrarrestar el estrés hídrico (Beale & Airs, 2016).

La glicina betaína puede generarse a través del metabolismo de la colina (Fig. 13). La colina es el principal grupo polar de las membranas eucariotas; en el ambiente marino es producida por las microalgas marinas y plantas costeras en forma de colina O-sulfato (COS), encontrándose muy distribuida por las aguas superficiales (Lidbury *et al.*, 2015b). La conversión de la colina a GBT ocurre por una reacción de dos pasos, donde intervienen una colina deshidrogenasa que contiene FAD (BetA) responsable de la transformación de la colina en betaína aldehído y una betaína aldehído deshidrogenasa ligada a NAD (BetB) que cataliza el segundo paso de la reacción, la transformación de la betaína aldehído a GBT. Además, los genes que codifican dichas enzimas, normalmente se localizan agrupados junto a genes codificantes para transportadores específico de colina (BetT) y represores transcripcionales (BetI).

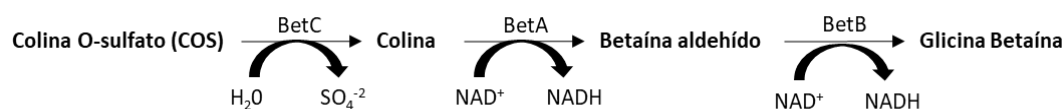


Fig. 13. Ruta metabólica para la degradación de la colina. Las enzimas implicadas en esta ruta son: BetC, colina sulfatasa (codificada por *betC*); BetA, colina deshidrogenasa (*betA*); BetB, betaína aldehído deshidrogenasa (*betB*).

Los genes requeridos para la conversión de colina y COS a GBT (*betA*, *betB* y *betC*) fueron encontrados en casi todos los genomas estudiados. Las únicas excepciones fueron los genomas de *Ml. aquimaris* CECT 8898^T y *D. aquaemixtae* CECT 8626^T que carecieron del gen *betB*. Sin embargo, se ha propuesto (Lidbury *et al.*, 2015b) que el gen *betB* pese a estar implicado en el catabolismo de la colina no es esencial, puesto que su función puede ser cubierta, aun siendo menos eficaz, por alguna aldehído deshidrogenasa que tenga la misma función que BetB. Por tanto, los resultados obtenidos respaldan los estudios de Zhang *et al.* (2016) y Lidbury *et al.* (2015b) donde se reveló que el catabolismo de la colina está muy extendido en los heterótrofos marinos del grupo Roseobacter. Además, el catabolismo de la colina también se encuentra

acoplado a la producción de energía mediante la vía de oxidación ligada a THF, debido a que dos de los tres grupos metilo que surgen de la degradación de este compuesto se conjugarán al tetrahidrofolato (H₄F) oxidándose completamente hasta CO₂ a través de la vía anteriormente mencionada. Por tanto, la colina no es utilizada únicamente como nutriente o como osmolito (a través de su conversión a GBT) sino que también puede ser utilizada como fuente de energía alternativa. Así, el metabolismo de la colina en *Rhodobacteraceae* proporciona una ventaja de crecimiento para estas bacterias que se sabe que forman asociaciones estrechas con la biota eucariota (Wagner-Döbler & Biebl, 2006; Buchan *et al.*, 2005; Miller & Belas, 2004).

Respecto a la GBT (N,N,N-trimetilglicina), su degradación se produce por una desmetilación secuencial, donde se eliminan los tres grupos N-metilo que contiene, mediante tres enzimas: betaína-homocisteína metiltransferasa (*bhmt*), dimetilglicina deshidrogenasa (*dmgdh*) y sarcosina deshidrogenasa (*sardh*). Estos grupos metilo tienen diferentes destinos predichos. El primer grupo metilo es transferido a la homocisteína por la BHMT, produciendo metionina y dimetilglicina (DMG) (Barra *et al.*, 2006), mientras que el segundo y tercer grupo metilo son transferidos al THF, en reacciones que se acoplan a la oxidación parcial y posterior oxidación a CO₂ por la vía de oxidación ligada al THF descrita anteriormente (Fig. 12 C). Los genes codificantes para la ruta completa de degradación de la GBT se hallaron en el 56% (20 de 36) de las secuencias estudiadas (Tabla 15). El resto de las cepas analizadas, salvo dos, parece que llevan a cabo una desmetilación parcial de la glicina betaína, ya que sus genomas carecían del gen *dmgdh* codificante para la dimetilglicina deshidrogenasa, enzima responsable de la eliminación del segundo grupo N-metilo produciendo sarcosina a partir de la DMG. Esta desmetilación parcial de la GBT ha sido estudiada en otros organismos (Watkins *et al.*, 2014; Van der Maarel *et al.*, 1996; Heijthuisen & Hansen, 1989) donde se ha observado que permite una generación de energía, dado que la eliminación del primer grupo metilo rinde cinco veces más energía que los otros dos, a la vez que un ahorro energético puesto que el producto final de la reacción (DMG), es un osmorregulador, por lo que en estos microorganismos no será necesario consumir energía para la biosíntesis de osmorreguladores.

Tabla 15. Predicción de la presencia de los genes involucrados en el catabolismo de la glicina - betaína (GBT) en los genomas de *Rhodobacteraceae* analizados. +, presente; -, ausente.

	Betaína-homocisteína metiltransferasa (<i>bhmt</i>)	Sarcosina deshidrogenasa (<i>sardh</i>)	Dimetilglicina deshidrogenasea (<i>dmgdh</i>)
<i>Al. pelagivivens</i> CECT 8811 ^T	+	+	+
<i>Aq. soesokkakensis</i> CECT 8620 ^T	+	-	-
<i>As. donghaensis</i> CECT 8599 ^T	+	+	+
<i>B. aestuarii</i> CECT 8489 ^T	+	+	+
<i>C. lipolyticum</i> CECT 8621 ^T	+	+	-
<i>D. aquaemixtae</i> CECT 8626 ^T	+	+	+
<i>F. marinus</i> CECT 8899 ^T	+	+	+
<i>L. soesokkakensis</i> CECT 8367 ^T	+	+	+
<i>Ml. aquimaris</i> CECT 8898 ^T	+	+	+
<i>Mr. algicola</i> CECT 5396 ^T	+	+	+
<i>O. ascidiaceicola</i> CECT 8868 ^T	+	+	+
<i>P. marinus</i> CECT 7971 ^T	+	-	-
<i>Pa. lutimaris</i> CECT 8525 ^T	+	+	-
<i>Pc. litorisediminis</i> CECT 8287 ^T	+	+	+

	Betaína-homocisteina metiltransferasa (<i>bhmT</i>)	Sarcosina deshidrogenasa (<i>sardh</i>)	Dimetilglicina deshidrogenasa (<i>dmgdh</i>)
<i>Pd. jejudonensis</i> CECT 8397 ^T	+	+	+
<i>Pg. aquimaris</i> CECT 7680 ^T	+	+	-
<i>Pl. abyssalis</i> CECT 8504 ^T	+	+	-
<i>Pl. marisminoris</i> CECT 7066 ^T	+	+	-
<i>Pm. varians</i> CECT 8663 ^T	+	+	+
<i>Po. insulae</i> CECT 8812 ^T	+	+	-
<i>Pr. insulae</i> CECT 8871 ^T	+	+	-
<i>Ps. marinus</i> CECT 7751 ^T	+	+	-
<i>Py. aestuarii</i> CECT 9025 ^T	+	+	-
<i>Rb. ekhonensis</i> CECT 7235 ^T	+	+	-
<i>Rs. antarcticus</i> CECT 7023 ^T	+	+	+
<i>Ru. arenilitoris</i> CECT 8715 ^T	+	+	+
<i>Ru. litorea</i> CECT 7639 ^T	+	+	+
<i>Ru. mediterranea</i> CECT 7615 ^T	+	+	+
<i>Ru. meonggei</i> CECT 8411 ^T	+	+	+
<i>Rv. aestuarii</i> CECT 7745 ^T	+	+	+
<i>Rv. albus</i> CECT 7450 ^T	+	+	+
<i>Rv. gaetbuli</i> CECT 8370 ^T	+	+	+
<i>Rv. halotolerans</i> CECT 8110 ^T	+	+	-
<i>Rx. jejudonensis</i> CECT 8625 ^T	-	+	-
<i>Tr. phthalicus</i> CECT 8649 ^T	+	+	-
<i>Y. sediminilitoris</i> CECT 8284 ^T	+	+	-

Las concentraciones de dichas MAs pueden variar desde rangos a nivel nanomolar (nM) en aguas superficiales costeras y mar abierto, hasta rangos a nivel micromolar (μ M) en las aguas intersticiales de los sedimentos marinos (Yin *et al.*, 2018; Lidbury *et al.*, 2017, 2014; Gibb & Hatton 2004). Las bacterias marinas capaces de degradar dichas aminas se relacionan principalmente con la clase *Alphaproteobacteria*, donde destacan dos grupos: el grupo Roseobacter y el grupo SAR11 (*Pelagibacterales*). De hecho, numerosas publicaciones (Lidbury *et al.*, 2017, 2015a, 2014; Simon *et al.*, 2017; Chen, 2012, 2011; Arata *et al.*, 1992) han demostrado que los miembros del grupo Roseobacter tienen el potencial genético para utilizar las MAs (especialmente TMA y TMAO) como fuentes alternativas de nitrógeno y energía.

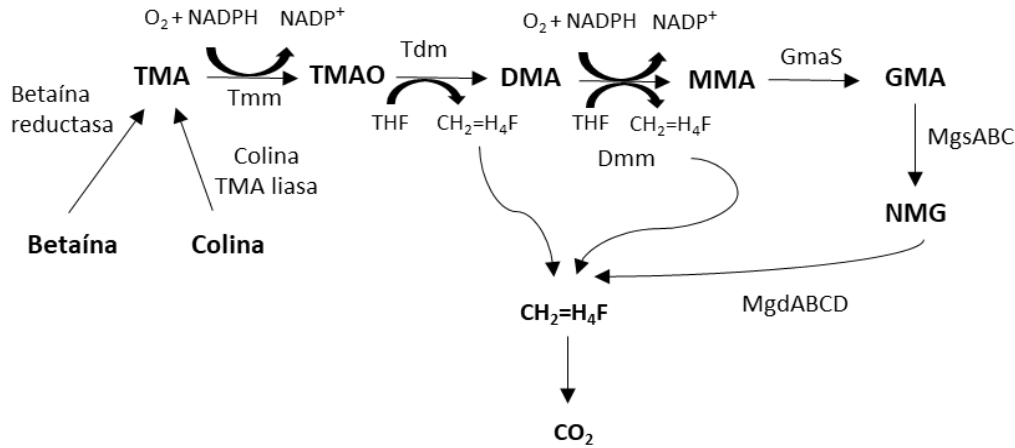


Fig. 14. Ruta metabólica para el catabolismo de las aminas metiladas. TMA, trimetilamina; TMAO, óxido de N-trimetilamina; DMA, dimetilamina; MMA, monometilamina; GMA, γ -glutamilmetilamida; NMG, N-metilglutamato; CH₂=H₄F, 5,10 metileno tetrahidrofolato; CO₂, dióxido de carbono; Tmm, trimetilamina monooxigenasa; Tdm, dimetilamina monooxigenasa; THF, tetrahidrofolato; GmaS, γ -glutamilmetilamida sintasa; MgsABC, N-metilglutamato sintasa; MgdABCD, N-metilglutamato deshidrogenasa (Lidbury *et al.*, 2015a)

El catabolismo de las MAs comienza con una primera reacción donde la TMA se oxida produciendo TMAO a través de una TMA monooxigenasa (Tmm). Posteriormente, el TMAO generado se convierte a MMA a través de un paso de desmetilación y uno de oxidación por acción de la TMAO desmetilasa (Tdm) y la DMA monooxigenasa (Dmm), respectivamente (Fig. 14). Estos genes fueron investigados mediante BLASTn, utilizando las siguientes secuencias génicas de *Methylocella silvestris* BL2^T (Zhu *et al.*, 2014) como secuencias *query*: *tdm* (Msil_3603), *tmm* (Msil_3604), *dmmD* (Msil_3605), *dmmA* (Msil_3607), *dmmB* (Msil_3608) y *dmmC* (Msil_3609). El resultado de este análisis reveló que únicamente el 31% (11 de 36) de las cepas estudiadas contenían genes involucrados en el metabolismo de las aminas metiladas (Tabla 16). Como se puede observar en la tabla, los genes homólogos a *dmmC* (subunidad codificante para la DMA monooxigenasa) se encuentran con una frecuencia muy similar (19% del total de genomas analizados; 7 de 36) a la de aquellos genes codificantes de las enzimas TMAO desmetilasa (*tdm*) y TMA monooxigenasa (*tmm*) (19% y 22% del total). Sin embargo, las subunidades restantes para la DMA monooxigenasa no se han encontrado en ninguno de los genomas analizados. Por tanto, estos resultados respaldan la existencia de un cuello de botella metabólico y genético en la vía de degradación marina de MAs, ya que muchos genomas de bacterias marinas carecen de genes homólogos a *dmmABCD*, y consecuentemente su abundancia en metagenomas marinos es significativamente menor que los genes requeridos para las otras etapas metabólicas de la vía de degradación de las MAs (Lidbury *et al.*, 2017). El resultado obtenido también está acorde con el estudio de Lidbury *et al.* (2014) donde se muestra que, generalmente, en las bacterias marinas la presencia de *tmm* implica la presencia de *tdm*, pero no al revés, como se puede observar en la cepa de *R. meonggei* CECT 8411^T. Por otro lado, ninguna de las cepas presentó en sus genomas el gen codificante de la γ -glutamilmetilamina (Gmas) responsable de la desmetilación de la monometilamina (MMA), ni se halló el gen para la metilamina deshidrogenasa, responsable de la degradación alternativa de la MMA a formaldehído y amonio. Así como tampoco se hallaron los genes necesarios para codificar una segunda ruta alternativa, mediada por glutamato, para la oxidación de la MMA, en donde, la N-metilglutamato sintasa (NMGS) y la N-metilglutamato deshidrogenasa (NMGD), codificadas por los genes *mgsABC* y *mgdABCD*, son las enzimas responsables de la oxidación de la metilamina

(Latypova *et al.*, 2010). En general, los resultados obtenidos para el estudio del catabolismo de aminas metiladas, sugieren tal y como proponen Lidbury *et al.* (2015b), que el potencial genético para usar compuestos metilados (colina, GTB, etc.) en *Rhodobacteraceae* parece estar más extendido que su capacidad para utilizar metilaminas, dado que únicamente el 31% de las genomas estudiados podrían ser capaces de degradar la TMA y el TMAO como fuente de nitrógeno y energía adicional, al oxidar sus grupos metilos por la vía de oxidación ligada al THF.

Tabla 16. Estudio de la presencia de genes involucrados en la degradación de aminas metiladas entre los miembros de *Rhodobacteraceae*. Los genes homólogos fueron identificados mediante BLASTn utilizando las secuencias Msil_3603 (*tdm*), Msil_3604(*tmm*), Msil_3605 (*dmmD*), Msil_3607 (*dmmA*), Msil_3608 (*dmmB*) y Msil_3609 (*dmmC*) de *Methylocella silvestris* BL2^T como *query*. Los valores de corte fueron los siguientes: cobertura de secuencia, 50%; e identidad de secuencia, 50%. En la tabla solo aparecen las cepas/genes que obtuvieron un resultado significativo.

Cepa	Gen	Cobertura <i>query</i> (%)	valor E	Identidad %
<i>As. donghaensis</i> CECT 8599 ^T	<i>tmm</i>	74	2e ⁻¹¹¹	69
	<i>dmmC</i>	66	5e ⁻⁴⁸	70
<i>D. aquaemixtae</i> CECT 8626 ^T	<i>tdm</i>	72	3e ⁻⁴⁹	64
	<i>tmm</i>	77	5e ⁻¹⁰⁷	69
<i>O. ascidiaceicola</i> CECT 8868 ^T	<i>tmm</i>	83	9e ⁻⁹⁰	65
	<i>dmmC</i>	79	2e ⁻³⁹	65
<i>Pc. litorisediminis</i> CECT 8287 ^T	<i>tdm</i>	53	2e ⁻⁷⁰	66
	<i>tmm</i>	79	2e ⁻¹⁰⁵	69
<i>Rb. ekhonensis</i> CECT 7235 ^T	<i>tdm</i>	73	8e ⁻¹¹⁹	66
	<i>tmm</i>	73	2e ⁻¹³¹	71
	<i>dmmC</i>	93	4e ⁻⁷⁵	67
<i>Ru. mediterranea</i> CECT 7615 ^T	<i>dmmC</i>	74	5e ⁻⁵⁰	66
<i>Ru. meonggei</i> CECT 8411 ^T	<i>tdm</i>	57	1e ⁻⁴⁰	71
	<i>dmmC</i>	77	4e ⁻⁴⁴	67
<i>Rv. aestuarii</i> CECT 7745 ^T	<i>tmm</i>	76	2e ⁻¹¹¹	70
	<i>tdm</i>	52	3e ⁻⁵⁵	65
<i>Rv. albus</i> CECT 7450 ^T	<i>tmm</i>	72	2e ⁻⁸⁰	67
	<i>dmmC</i>	62	9e ⁻³⁹	69
	<i>tdm</i>	75	3e ⁻¹¹⁹	66
<i>Rv. gaetbuli</i> CECT 8370 ^T	<i>tmm</i>	73	2e ⁻⁷⁹	68
	<i>dmmC</i>	87	8e ⁻⁹⁰	69
	<i>tdm</i>	67	4e ⁻⁹¹	66
<i>Rv. halotolerans</i> CECT 8110 ^T	<i>tmm</i>	71	2e ⁻⁹¹	69

En los genomas también se han encontrado dos genes parálogos a las aminotransferasas (AMTs), responsables de catalizar la reacción de transferencia de un grupo metileno al THF produciendo 5,10-metilenotetrahidrofolato y amoniaco. El primero de ellos es un gen codificante para la proteína T del sistema de escisión de la glicina (GcvT), que forma parte del complejo multienzimático de escisión de la glicina (GCV) que cataliza la degradación de la glicina produciendo 5,10-metileno-THF, CO₂ y NH₃ (Fig. 12 F). Este gen se encontró en todos los genomas de *Rhodobacteraceae* analizados, por lo que el catabolismo de la glicina, principal aminoácido del DOM marino, no solo podrá acoplarse a la oxidación del THF actuando como fuente de energía alternativa, sino que también podrá ser utilizado para producir una

remineralización de amoníaco, pudiendo estimular el crecimiento de otras bacterias marinas con las que cohabiten los miembros de *Rhodobacteraceae* (Lidbury *et al.*, 2015b, 2014).

El segundo gen se encuentra relacionado con el metabolismo del DMSP producido por el fitoplancton marino (Reisch *et al.*, 2011a). Las bacterias marinas son capaces de degradar el DMSP, mediante dos vías metabólicas competitivas, la vía de desmetilación o de escisión. Aproximadamente el 10% del DMSP marino se metaboliza a través de la ruta de escisión formando dimetilsulfuro (DMS) y acrilato (o 3-hidroxiopropinato), con importantes consecuencias para el flujo de azufre en la atmósfera oceánica. Sin embargo, la mayoría del DMSP se degrada por la ruta de desmetilación, produciendo metil-THF, metanotiol (MeSH), acetaldehído y CO₂, facilitando la retención de carbono y azufre por parte del bacterioplancton marino (Fig. 15). En esta vía, el DMSP se desmetila para formar MMPA, lo que impide la formación de DMS, permitiendo así, la utilización del DMSP como fuente de carbono y azufre reducido por parte del bacterioplancton (Bullock *et al.*, 2014; Moran *et al.*, 2012).

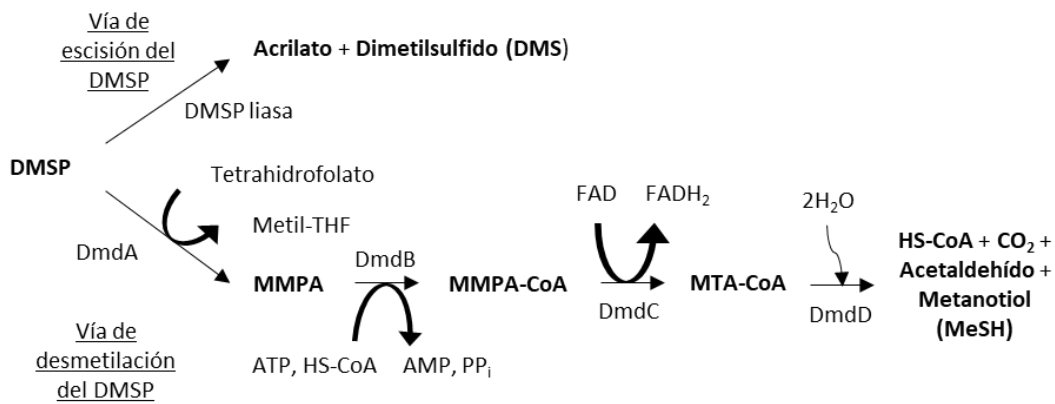


Fig. 15. Vía de escisión y desmetilación bacteriana del DMSP. La ruta de desmetilación del DMSP es catalizada por la DMSP desmetilasa (DmdA), MMPA-CoA ligasa (DmdB), MMPA-CoA deshidrogenasa (DmdC) y MTA-CoA hidratasa (DmdD). La vía de escisión del DMSP es catalizada por una DMSP liasa. Abreviaciones: **MMPA**, metil mercaptopropionato; **MMPA-CoA**, metil mercaptopropionato-CoA; **MTA-CoA**, metiltioacrililo-CoA.

El gen codificante para la enzima DMSP liasa (*dddL* o *dddD*) implicada en la escisión del DMSP a DMS únicamente se halló en 9 de los 36 genomas analizados (Tabla 17). Esto sugiere que en *Rhodobacteraceae* el DMSP se cataboliza principalmente a través de la ruta de desmetilación a MeSH, tal y como propuso Dickschat (2010). También se observa que las cepas *Po. insulae* CECT 8812^T, *Rv. albus* CECT 7450^T, *Y. sediminilitoris* CECT 8284^T y *Pm. varians* CECT 8663^T albergan genes tanto para la vía de escisión como de desmetilación, al igual que se ha detectado en otros miembros de la familia, como *Ruegeria pomeroyi* DSS-3^T (Reisch *et al.*, 2013) y *Planktotalea frisia* SH6-1^T (Bakenhus *et al.*, 2018), lo que muestra la capacidad que tienen las *Rhodobacteraceae* para utilizar el DMSP como fuente de carbono y azufre reducido.

Tabla 17. Predicción de la presencia de genes involucrados en el catabolismo del DMSP en los genomas de *Rhodobacteraceae* analizados. Las enzimas DMSP desmetilasa, MMMPA-CoA ligasa, MMMPA-CoA deshidratasa y MTA-CoA hidrasara forman parte de la ruta de desmetilación del DMSP. Las enzimas DMSP liasas (DddL o Dddd) constituyen la ruta de escisión del DMSP. +, presente; -, ausente.

Cepas	DMSP desmetilasa (DmdA)	MMMPA-CoA ligasa (DmdB)	MMMPA-CoA deshidratasa (DmdC)	MTA-CoA hidratasa (DmdD)	DMSP liasas
<i>Al. pelagivivens</i> CECT 8811 ^T	+	+	-	-	-
<i>Aq. soesokkakensis</i> CECT 8620 ^T	-	-	-	-	-
<i>As. donghaensis</i> CECT 8599 ^T	+	+	+	-	-
<i>B. aestuarii</i> CECT 8489 ^T	-	+	-	-	-
<i>C. lipolyticum</i> CECT 8621 ^T	-	+	+	-	-
<i>D. aquaemixtae</i> CECT 8626 ^T	+	+	+	-	-
<i>F. marinus</i> CECT 8899 ^T	+	+	+	-	-
<i>L. soesokkakensis</i> CECT 8367 ^T	-	-	+	-	-
<i>Ml. aquimaris</i> CECT 8898 ^T	+	+	-	-	-
<i>Mr. algicola</i> CECT 5396 ^T	+	+	+	-	-
<i>O. ascidiaceicola</i> CECT 8868 ^T	+	+	+	-	-
<i>P. marinus</i> CECT 7971 ^T	-	-	-	-	-
<i>Pa. lutimaris</i> CECT 8525 ^T	-	-	+	-	-
<i>Pc. litorisediminis</i> CECT 8287 ^T	+	+	+	-	-
<i>Pd. jejudonensis</i> CECT 8397 ^T	+	+	+	-	-
<i>Pg. aquimaris</i> CECT 7680 ^T	-	-	+	-	-
<i>Pl. abyssalis</i> CECT 8504 ^T	-	-	+	-	-
<i>Pl. marisminoris</i> CECT 7066 ^T	-	-	+	-	-
<i>Pm. varians</i> CECT 8663 ^T	+	+	+	-	+
<i>Po. insulae</i> CECT 8812 ^T	+	+	+	-	+
<i>Pr. insulae</i> CECT 8871 ^T	-	+	+	-	-
<i>Ps. marinus</i> CECT 7751 ^T	-	+	-	-	-
<i>Py. aestuarii</i> CECT 9025 ^T	-	-	+	-	-
<i>Rb. ekhonensis</i> CECT 7235 ^T	-	+	-	-	+
<i>Rs. antarcticus</i> CECT 7023 ^T	-	-	+	-	+
<i>Ru. arenilitoris</i> CECT 8715 ^T	+	+	+	-	-
<i>Ru. litorea</i> CECT 7639 ^T	+	+	+	-	-
<i>Ru. mediterranea</i> CECT 7615 ^T	+	+	+	-	-
<i>Ru. meonggei</i> CECT 8411 ^T	+	+	+	-	-
<i>Rv. aestuarii</i> CECT 7745 ^T	+	+	+	-	-
<i>Rv. albus</i> CECT 7450 ^T	+	+	+	-	+
<i>Rv. gaetbuli</i> CECT 8370 ^T	+	+	+	-	+
<i>Rv. halotolerans</i> CECT 8110 ^T	-	+	+	-	+
<i>Rx. jejudonensis</i> CECT 8625 ^T	-	+	+	-	+
<i>Tr. phthalicus</i> CECT 8649 ^T	-	+	+	-	-
<i>Y. sediminilitoris</i> CECT 8284 ^T	+	+	+	-	+

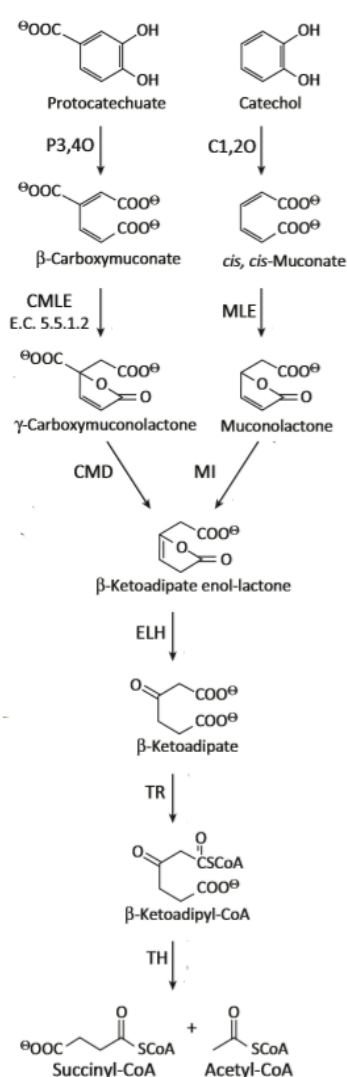
La ruta de desmetilación comienza con una primera reacción de desmetilación, en la cual el DMSP es transformado a MMMPA por acción de la enzima DMSP desmetilasa, codificada por el gen *dmdA*. Este gen se encontró en 19 de los 36 genomas estudiados (53%) sugiriendo que entre los miembros de *Rhodobacteraceae*, la degradación del DMSP no tiene la única finalidad de actuar como fuente de carbono y azufre reducido a través de la generación del MMMPA, sino también la de actuar como una fuente de energía alternativa. Esto se debe, a que durante la desmetilación inicial del DMSP se forma también 5-metil-THF, que lleva a el grupo metilo

eliminado del DMSP, y que podrá acoplarse a la vía de oxidación del THF para producir energía en forma de ATP y nucleótidos reducidos. No obstante, el MMPA generado se procesará a través de una ruta similar a la β -oxidación de ácidos grasos. En esta vía, el MMPA es convertido a MMPA-CoA por la MMPA-Coa ligasa (*dmdB*) y a continuación a MTA-CoA por la enzima MMPA-CoA deshidrogenasa (*dmdC*), y finalmente a acetaldehído, MeSH y CO₂ por acción de la MTA-CoA hidratasa (*dmdD*). En ninguno de los genomas analizados se halló el gen *dmdD*, este dato coincide con la observación general de que la gran mayoría de bacteria marinas que utilizan la vía de desmetilación carecen de dicho gen (Bullock *et al.*, 2017; Reisch *et al.*, 2011a, 2011b). Sin embargo, 22 genomas (61% del total) presentaron los dos genes necesarios para la conversión del MMPA a MTA-CoA. Esta mayor distribución encontrada de los genes *dmdB* y *dmdC* (61%) sobre la del gen *dmdA* (54%), se debe a que a diferencia de la enzima DMSP desmetilasa (DmdA) que se originó específicamente para el metabolismo del DMSP, como sugiere su elevada especificidad de sustrato, la enzimas MMPA-CoA ligasa (DmdB) y CoA deshidrogenasa (DmdC) probablemente han evolucionado a partir de las vías de degradación de metionina y oxidación de ácidos grasos, puesto que pueden utilizar un rango más amplio de sustratos, como aquellos estructuralmente parecidos al MMPA, como pueden ser los derivados azufrados (p. ej. 3-metil tio-propanol, 3-metil tio-propanal y etil-3-metil tio-propionato) producidos por plantas (Bullock *et al.*, 2017).

En conclusión, los resultados obtenidos para el metabolismo C1 confirman estudios previos (Howat *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2016; Lidbury *et al.*, 2015a, 2015b; Newton *et al.*, 2010) donde se ha revelado que los miembros de *Rhodobacteraceae* son capaces de oxidar una gran variedad de compuestos C1 y/o metilados para mantener la viabilidad celular durante los tiempos de limitación de carbono a través de la generación de equivalentes reductores y ATP. Siendo esta una respuesta más al porqué de la prevalencia global de *Rhodobacteraceae* entre los miembros del bacterioplancton marino.

2.7 Degradación de compuestos aromáticos

La degradación microbiana de los compuestos aromáticos representa un papel importante en el ciclo global del carbono y en la biorremediación (Fuchs *et al.*, 2011). En general, la degradación ocurre en dos fases; en la primera fase, los compuestos aromáticos se preparan para la escisión del anillo mediante una variedad de reacciones de modificación del anillo, conocidas como rutas superiores (o periféricas) que transforman un conjunto diverso de compuestos aromáticos en un número limitado de intermediarios. La segunda fase incluye la escisión del anillo y las reacciones posteriores que conducen a la generación de intermediarios del TCA. Esta fisión es catalizada por dioxigenasas y se denomina escisión en orto (escisión intradiol), cuando se produce entre los grupos hidroxilo, y escisión en meta (escisión extradiol), cuando se produce junto a uno de los grupos hidroxilo (Gulvik & Buchan 2013; Zeyaulah *et al.*, 2009).



La capacidad de *Rhodobacteraceae* para utilizar compuestos aromáticos ha sido demostrada en estudios anteriores (Mas, 2017; Alejandro-Marín *et al.*, 2014; Nogales *et al.*, 2013; Harwati *et al.*, 2007). La primera vía de degradación de compuestos aromáticos descrita en miembros del grupo *Roseobacter* fue la del β-cetoadipato (β-KAP). Esta vía está precedida por la conversión preliminar de una amplia gama de compuestos orgánicos en uno de dos compuestos aromáticos, catecol o protocatecuato. El protocatecuato puede derivarse de monómeros de lignina (por ejemplo, alcohol coniferílico) y aromáticos clorados (por ejemplo, 4-clorobenzoato) entre otros materiales de partida. El catecol, puede provenir de moléculas comparables, así como de nitroaromáticos (por ejemplo, 2-nitrofenol) e hidrocarburos aromáticos cíclicos simples que incluyen los contaminantes prioritarios benceno, tolueno y fenol. La β-KAP (Fig. 16) comienza con la orto-escisión del anillo del catecol o del protocatecuato a través de las enzimas clave catecol 1,2-dioxigenasa (CatA) o protocatecuato 3,4 dioxigenasa (PcaGH) produciendo cis,cis-muconato o β-carboximuconato, respectivamente. A continuación, dos pasos enzimáticos adicionales se unen a las ramas del catecol y protocatecuato en la formación de β-cetoadipato enolactona. Este intermediario molecular es convertido mediante una enolactona hidrolasa (PcaD o CatD) en β-cetoadipato. Finalmente, dos pasos adicionales convierten el β-cetoadipato en metabolitos intermediarios de múltiples vías anabólicas incluyendo el ciclo del TCA o la síntesis de ácidos grasos (Wells & Ragauskas 2012).

Fig. 16. Ruta microbiana del β-KAP. Abreviaciones: P3,4O, protocatecuato 3,4-dioxigenasa; C1,2O, catecol 1,2-dioxigenasa; CMLE, β-carboxi-cis-lactonización de cis-muconato (cicloisomerasa); MLE, cis, cis-muconato lactonización (cicloisomerasa); CMD, λ-carboxi-muconolactona descarboxilasa; MI, muconolactona isomerasa; ELH, β-cetoadipato enolactona; TR, β-cetoadipato succinil-CoA transferasa; TH, β-cetoadipil-CoA tiasa. Adaptación de Wells y Ragauskas (2012).

Posteriormente, la secuenciación genómica ha permitido postular la presencia de otras cinco rutas de degradación de compuestos monoaromáticos en *Rhodobacteraceae* (Moran *et al.*, 2007). Estas incluyen la degradación aeróbica de los intermediarios aromáticos de benzoato, fenilacetato, homoprotocatecuato, homogentisato y gentisato (Fig. 17).

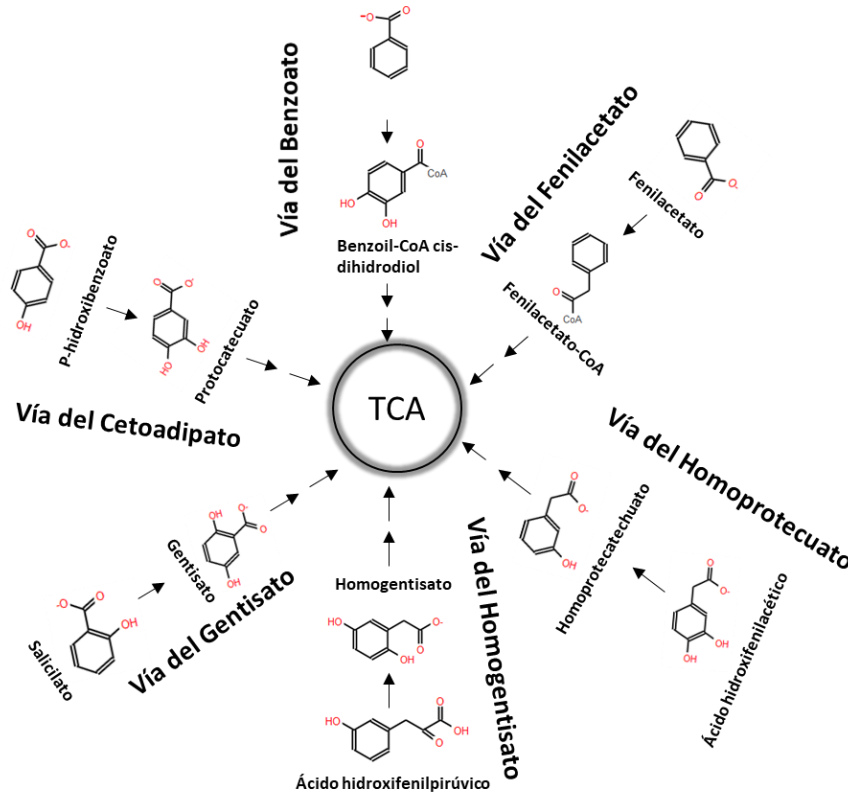


Fig. 17. Vías de degradación de compuestos aromáticos propuestas en genomas del grupo Roseobacter. Adaptación de Moran *et al.*, 2007.

Estas seis rutas de degradación de compuestos aromáticos descritas en *Rhodobacteraceae* fueron analizadas en los genomas estudiados. Los resultados para este análisis con respecto al catabolismo β -cetoadipato (Tabla 18) demostraron que el 72% (26 de 36) de los genomas analizados poseían los genes principales para una o ambas ramas de la vía β -KAP; así la presencia del gen codificante para la enzima protocatecuato 3,4-dioxigenasa (*pcaGH*) se detectó en 20 genomas (55%), mientras que el gen codificante para la enzima catecol 1,2-dioxigenasa (*catA*) se detectó en 16 genomas (44%). No obstante, en ninguno de ellos se halló de forma completa la ruta del β -KAP, puesto que dicha vía solo se halló completamente hasta la formación del β -cetoadipato en el 95% (19 de 20) de los genomas donde se encontró el gen *pcaGH* y en el 56% (9 de 16) donde se encontró el gen *catA*, careciendo todos los genomas estudiados de los genes codificantes de los dos últimos pasos de la ruta. Buchan *et al.* (2000) además de ser los primeros en describir la ruta del β -KAP en *Rhodobacteraceae*, reportaron en el mismo estudio la presencia de una ORF altamente conservada (*chr*), de función desconocida, que pertenecía a la familia de proteínas PFAM DUF849 y que parecía tener una estrecha relación con la capacidad de degradación del β -cetoadipato. Más tarde, Bastard *et al.* (2014) demostraron que las proteínas pertenecientes a dicha familia proteica, nombrada como BKACE para la escisión de los β -cetoácidos, catalizan una reacción genérica de condensación de los β -cetoácidos con acetil-CoA

para producir éster CoA y acetato, estableciendo así una estrategia alternativa a la vía del β -KAP para la degradación del β -ceto adipato. En ninguno de los genomas analizados se encontró dicha enzima, por lo que los miembros de *Rhodobacteraceae* aquí analizados no parecen presentar ninguno de los dos mecanismos específicos para la transformación del β -ceto adipato. Sin embargo, esta transformación también puede ser realizada mediante enzimas comunes a otras rutas metabólicas, tal y como sugiere Mas (2017), por lo que es posible que *Rhodobacteraceae* sí que presente el potencial genético completo para la degradación del β -ceto adipato. De este modo, en 22 de los 36 genomas analizados (61%) se halló el gen *pobA* codificante para la enzima 4-hidroxibenzoato hidroxilasa, un precursor del protocatecuato, avalando la capacidad de *Rhodobacteraceae* para degradar el 4-hidroxibenzoato y el protocatecuato, tal y como se ha descrito en anteriores publicaciones (Mas, 2017; Nogales *et al.*, 2013).

Tabla 18. Predicción de la presencia de las ramas del protocatecuato y catecol de la vía del β -ceto adipato Abreviaciones: P3,4O, protocatecuato 3,4-dioxigenasa (EC 1.13.11.3); C1,2O, catecol 1,2-dioxigenasa (EC 1.13.11.1); CMLE, β -carboxi-*cis*-lactonización de *cis*-muconato (cicloisomerasa; EC 5.5.1.2); MLE, *cis*, *cis*-muconato lactonización (cicloisomerasa; EC 5.5.1.1); CMD, λ -carboxi-muconolactona descarboxilasa (EC 4.1.1.44); MI, muconolactona isomerasa (EC 5.3.3.4); PobA, 4-hidroxibenzoato hidroxilasa.

	Rama protocatecuato vía B-KAP			Rama catecol vía B-KAP			PobA
	P3,4O	CMLE	CMD	C1,2O	MLE	MI	
<i>Al. pelagivivens</i> CECT 8811 ^T	-	-	+	+	-	+	-
<i>Aq. soesokkakensis</i> CECT 8620 ^T	-	-	+	+	-	+	+
<i>As. donghaensis</i> CECT 8599 ^T	+	+	+	-	-	+	+
<i>B. aestuarii</i> CECT 8489 ^T	+	+	+	-	-	+	+
<i>C. lipolyticum</i> CECT 8621 ^T	+	+	+	+	+	+	+
<i>D. aquaemixtae</i> CECT 8626 ^T	+	+	+	-	+	+	+
<i>F. marinus</i> CECT 8899 ^T	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. soesokkakensis</i> CECT 8367 ^T	+	+	+	-	-	+	-
<i>Ml. aquimaris</i> CECT 8898 ^T	+	+	+	+	+	+	+
<i>Mr. algicola</i> CECT 5396 ^T	-	-	+	+	-	+	+
<i>O. ascidiaceicola</i> CECT 8868 ^T	-	-	+	-	-	+	-
<i>Pa. lutimaris</i> CECT 8525 ^T	-	-	+	-	-	+	-
<i>Pa. marinus</i> CECT 7971 ^T	+	+	+	-	-	+	+
<i>Pc. litorisediminis</i> CECT 8287 ^T	-	-	+	-	+	+	-
<i>Pd. jejudonensis</i> CECT 8397 ^T	-	-	+	-	-	+	+
<i>Pg. aquimaris</i> CECT 7680 ^T	-	+	+	+	-	+	-
<i>Pl. abyssalis</i> CECT 8504 ^T	+	+	+	+	-	-	+
<i>Pl. marisminoris</i> CECT 7066 ^T	+	+	+	-	-	-	+
<i>Pm. varians</i> CECT 8663 ^T	+	+	+	+	-	+	-
<i>Po. insulae</i> CECT 8812 ^T	-	-	+	-	+	-	-
<i>Pr. insulae</i> CECT 8871 ^T	-	-	+	+	-	-	+
<i>Ps. marinus</i> CECT 7751 ^T	+	+	+	+	+	+	+
<i>Py. aestuarii</i> CECT 9025 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rb. ekhonensis</i> CECT 7235 ^T	-	-	+	-	+	+	-
<i>Rs. antarcticus</i> CECT 7023 ^T	-	+	+	-	-	+	-
<i>Ru. arenilitoris</i> CECT 8715 ^T	-	-	+	+	+	+	-
<i>Ru. litorea</i> CECT 7639 ^T	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ru. mediterranea</i> CECT 7615 ^T	+	+	+	-	+	+	+
<i>Ru. meonggei</i> CECT 8411 ^T	+	+	+	-	+	+	+

	Rama protocatecuato vía B-KAP			Rama catecol vía B-KAP			PobA
	P3,4O	CMLE	CMD	C1,2O	MLE	MI	
<i>Rv. aestuarii</i> CECT 7745 ^T	+	-	+	-	+	+	-
<i>Rv. albus</i> CECT 7450 ^T	-	-	+	-	+	+	-
<i>Rv. gaetbuli</i> CECT 8370 ^T	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rv. halotolerans</i> CECT 8110 ^T	-	-	+	-	-	+	+
<i>Rx. jejudonensis</i> CECT 8625 ^T	+	+	+	+	+	+	+
<i>Tr. phthalicus</i> CECT 8649 ^T	+	+	+	-	+	+	+
<i>Y. sediminilitoris</i> CECT 8284 ^T	+	+	+	+	+	+	+

Por otra parte, la dominancia encontrada de los genes codificantes para la enzima protocatecuato 3,4-dioxigenasa frente a aquellos codificantes para la enzima catecol 1,2-dioxigenasa confirma, como se había previsto en estudios anteriores (Alejandro-Marín *et al.*, 2014), la relevancia de la rama del protocatecuato de la vía β -KAP en los miembros de *Rhodobacteraceae*. Este hecho podría ser indicativo de la importancia de esta vía para la ecología y aptitud de las *Rhodobacteraceae* en ambientes marinos, ya que la mayor parte de los compuestos aromáticos presentes en los hábitats acuáticos son compuestos fenólicos, derivados de la lignina de plantas y algunas algas, así como otros metabolitos producidos por estos organismos superiores, los cuales son metabolizados a partir del protocatecuato (Buchan *et al.*, 2004). La presencia del gen de la catecol 1,2-dioxigenasa tiene implicaciones importantes ya que contradice el trabajo de Gulvik y Buchan (2013), donde se expone que los Roseobacter, al igual que muchas alfaproteobacterias, carecen de la rama del catecol de la ruta de β -cetoadipto. Además, la presencia de esta enzima supone una adaptación ecológica importante, dado que el protocatecuato y el catecol se forman a partir de diferentes compuestos aromáticos. Por ejemplo, algunos monómeros de lignina como ferulato y vainillina se metabolizan a protocatecuato mientras que otros, como el cinamato, se metabolizan a catecol. Por tanto, las *Rhodobacteraceae* que putativamente tienen ambas ramas de la vía podrían utilizar una gama más amplia de compuestos aromáticos (Alejandro-Marín *et al.*, 2014). Por otro lado, las *Rhodobacteraceae* que sólo tienen la rama del catecol podrían usar sustratos diferentes de aquellos que poseen la rama del protocatecuato y, por lo tanto, reducir la competencia por los recursos. Finalmente, este estudio también demuestra que la presencia de las enzimas para la escisión en meta del protocatecuato (EC 1.13.11.8) y del catecol (EC 1.13.11.2) no es común en *Rhodobacteraceae*.

Tabla 19. Predicción de la presencia de las rutas metabólicas de degradación de benzoato, salicilato, fenilacetato, homogentisato, gentisato y homoprotocatecuato en los genomas analizados. Se indican las rutas a las que pertenece cada enzima con colores: gris (benzoato), naranja (salicilato), verde (fenilacetato), amarillo (homogentisato), azul (gentisato), y rojo (homoprotocatecuato). Los números EC hacen referencia a los enzimas benzoato 1,2-dioxigenasa (EC 1.14.12.10), 1,6-dihidroxiclohexa-2,4-dieno-1-carboxilasa deshidrogenasa (EC 1.3.1.25), salicialato hidroxilasa (EC 1.14.13.1), fenilacetato-CoA ligasa (EC 6.2.1.30), homogentisato 1,2-dioxigenasa (EC 1.13.11.5), maleilacetoacetato isomerasa (EC 5.2.1.2), fumarilacetoacetasa (EC 3.7.1.2), gentisato 1,2-dioxigenasa (EC 1.13.11.4), maleilpiruvato isomerasa (EC 5.2.1.4), acilpiruvato hidrolasa (EC 3.7.1.5) y homoprotocatecuato 2,3-dioxigenasa (EC 1.13.11.15).

	EC 1.14.12.10	EC 1.13.1.25	EC 1.14.13.1	EC 6.2.1.30	E.C.1.13.11.5	EC 5.2.1.2	EC 3.7.1.2	EC 1.13.11.4	EC 5.2.1.4	EC 3.7.1.5	EC 1.13.11.15
<i>Mr. algicola</i> CECT 5396 ^T	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rs. antarcticus</i> CECT 7023 ^T	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Pl. marismenor</i> CECT 7066 ^T	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Rv. albus</i> CECT 7450 ^T	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Ru. litorea</i> CECT 7639 ^T	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>Pg. aquimaris</i> CECT 7680 ^T	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Rv. aestuarii</i> CECT 7745 ^T	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Ps. marinus</i> CECT 7751 ^T	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Pa. marinus</i> CECT 7971 ^T	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Rv. halotolerans</i> CECT 8110 ^T	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Pc. litorisediminis</i> CECT 8287 ^T	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
<i>L. soesokkakensis</i> CECT 8367 ^T	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Rv. gaetbuli</i> CECT 8370 ^T	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>Pd. jejudonensis</i> CECT 8397 ^T	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Ru. meonggei</i> CECT 8411 ^T	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>B. aestuarii</i> CECT 8489 ^T	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Aq. soesokkakensis</i> CECT 8620 ^T	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>C. lipolyticum</i> CECT 8621 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Rx. jejudonensis</i> CECT 8625 ^T	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Tr. phthalicus</i> CECT 8649 ^T	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>Pm. varians</i> CECT 8663 ^T	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>Ru. arenilitoris</i> CECT 8715 ^T	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>O. ascidiaceicola</i> CECT 8868 ^T	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>Ml. aquimaris</i> CECT 8898 ^T	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>F. marinus</i> CECT 8899 ^T	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>Ru. mediterranea</i> CECT 7615 ^T	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>Pl. abyssalis</i> CECT 8504 ^T	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>As. donghaensis</i> CECT 8599 ^T	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>D. aquaemixtae</i> CECT 8626 ^T	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Al. pelagivivens</i> CECT 8811 ^T	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>Po. insulae</i> CECT 8812 ^T	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>P. insulae</i> CECT 8871 ^T	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>Y. sediminilitoris</i> CECT 8284 ^T	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>Pa. lutimaris</i> CECT 8525 ^T	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Py. aestuarii</i> CECT 9025 ^T	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Rb. ekhonensis</i> CECT 7235 ^T	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-

Asimismo, la degradación del salicilato hasta catecol se ha detectado en todos los genomas analizados. La ruta completa de degradación del homogentisato se ha detectado en la mayoría de los genomas de *Rhodobacteraceae* (78%; 28 de 36), mientras que en ninguno de los genomas analizados se halló de forma completa la ruta de degradación del fenilacetato. No obstante, el gen clave para esta ruta (*paak*; fenilacetato-CoA ligasa) se encontró en el 80% (29 de 36). De forma similar, el gen clave para la degradación del benzoato se ha hallado en el 67% (24 de 36) de los genomas, mientras que de éstos únicamente tres genomas poseían los dos genes necesarios para degradar de forma completa el benzoato. Por último, la ruta de degradación del gentisato tampoco se ha encontrado completa en ninguno de los genomas analizados (Tabla 19). Estos resultados son muy similares a las predicciones sobre la presencia de rutas para la

degradación de compuestos aromáticos realizadas en base a estudios genómicos de los miembros *Roseobacter* (Mas, 2017; Piña 2012; Newton *et al.*, 2010; Buchan & González 2010). Del mismo modo, se ha detectado en todos los genomas el gen que codifica la enzima alcano monooxigenasa (EC 1.14.15.3), responsable de la primera reacción de hidroxilación de los alcanos a alcoholes. Esta capacidad para degradar los alcanos sugiere una aplicabilidad de los miembros de *Rhodobacteraceae* para la biorremediación de ambientes contaminados con petróleo (Nie *et al.*, 2014).

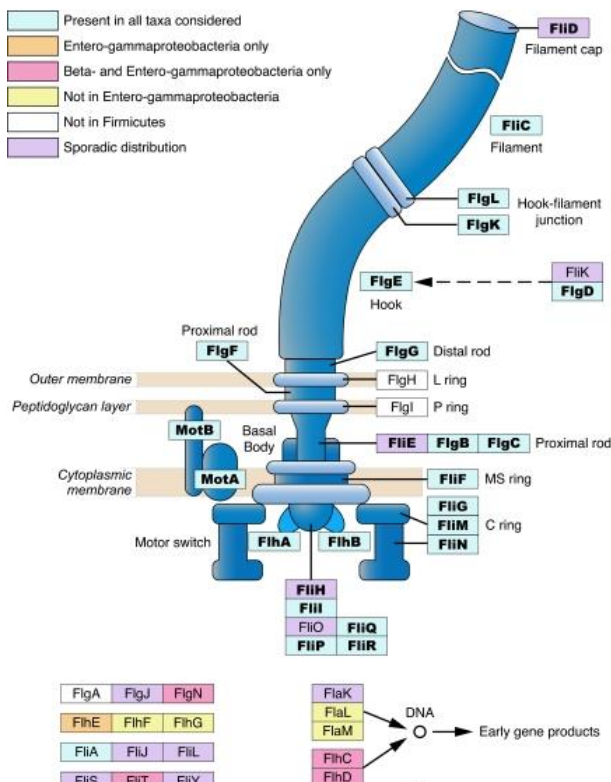
Esta versatilidad para la degradación de compuestos aromáticos que presentan los miembros de *Rhodobacteraceae* contribuye a mejorar su competitividad en los sistemas naturales, especialmente en las zonas costeras y marismas, donde los compuestos aromáticos son un componente significativo del reservorio de carbono orgánico disuelto; por tanto, puede explicar la ubicuidad y el éxito en los océanos de *Rhodobacteraceae* (Gulvik & Buchan 2013). Asimismo, los microorganismos que tienen la capacidad de degradar estos compuestos cumplen una importante labor de biorremediación puesto que muchos contaminantes ambientales son compuestos aromáticos como el benceno, entre otros.

2.8 Movilidad bacteriana

▪ Movilidad flagelar

La movilidad es crucial para las interacciones que forma una bacteria dentro del entorno en el que reside, ya que permite que los microorganismos se desplacen hacia entornos más favorables y compitan con éxito contra otros microorganismos. Además, juega un importante papel en el reconocimiento de superficie, acoplamiento, desarrollo de biopelículas, quimiotaxis y en el proceso de virulencia (Slightom & Buchan, 2009; Soutourina *et al.*, 2003). La movilidad se puede llevar a cabo a través de diferentes tipos de desplazamiento que incluyen los denominados *swimming*, *swarming*, *twitching* y *gliding*. Los movimientos de *swimming* y *swarming* se asocian a la presencia de flagelos, mientras que el *twitching* se relaciona con la existencia de pili y el *gliding* puede producirse por uno o varios mecanismos diferentes. Pese a que el *swimming* y el *swarming* están ambos relacionados con la actividad flagelar, son movimientos diferentes y la capacidad de realizar uno no garantiza la capacidad de realizar el otro. Así, el *swarming* se produce sobre una superficie sólida y se considera como un esfuerzo común a toda la población bacteriana, mientras que el *swimming* es la acción de una sola célula permitiendo su movimiento a través de un medio líquido (Slightom, 2008; Terashima *et al.*, 2008; Hernández & Rodríguez, 1993).

La movilidad mediante flagelos está muy extendida en el mundo microbiano, y más del 80% de las especies bacterianas conocidas (incluidas varias arqueas flageladas) poseen estos orgánulos.



Así, el flagelo bacteriano es el órgano de movilidad utilizado por la mayoría de las bacterias móviles (Li *et al.*, 2011). Los principales componentes del flagelo incluyen el cuerpo basal (incluyendo el anillo L, el anillo P, el anillo MS, y el anillo C), el motor flagelar, el gancho, el filamento y el aparato de exportación, el cual utiliza tanto ATP como PMF como fuentes de energía para la exportación de proteínas requeridas para un ensamblaje flagelar eficiente (Fig. 18). En los sistemas flagelares bien estudiados, como el de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, aproximadamente 50 genes, distribuidos en al menos 10 operones, están involucrados en la formación, regulación y función de los flagelos. La mitad de estos genes codifican los componentes estructurales del flagelo, mientras que el resto es responsable ya sea de la regulación del ensamblaje o de la regulación y procesamiento de las señales ambientales a las cuales responden los flagelos (Minamino *et al.*, 2014; Liu & Ochman, 2007).

Fig. 18. Distribución de las proteínas flagelares entre las diversas especies flageladas. Aquellas proteínas codificadas por el conjunto central de genes están en negrita, mientras que el color del cuadrado marca la distribución entre los fila. Imagen obtenida de Liu y Ochman (2007).

Aunque la estructura del flagelo esté bien conservada a través de las bacterias, los diferentes linajes pueden variar respecto al número de flagelos que contengan por célula, a su ubicación sobre la superficie celular, así como a la cantidad total de genes destinados a la síntesis y regulación de los flagelos (Fig. 18). Sin embargo, comparaciones de las secuencias completas de los genomas de las bacterias flageladas han revelado que el flagelo se basa en un conjunto ancestral de 21 genes centrales para los cuales hay homólogos presentes en los genomas de todos los fila. Este conjunto central de genes incluye 21 genes que especifican las proteínas que forman el filamento (*fliC*), que a menudo está presente en múltiples copias), la unión del filamento al gancho (*flgK* y *flgL*), el gancho (*flgE*), la varilla (*flgB*, *flgC*, *flgG* y *flgF*), el anillo MS (*fliF*), el anillo C (*fliG*, *fliM* y *fliN*), el motor (*motA* y *motB*), y el aparato de exportación (*flhA*, *flhB*, *fliL*, *fliP*, *fliR* y *fliQ*). Además, *flgD*, codifica la proteína que bloquea al gancho, que se requiere para en ensamblaje flagelar, pero no contribuye a la estructura final. Tiene homólogos en todas las bacterias flageladas y, por tanto, es considerada como parte del conjunto central. Otros genes estructurales que se distribuyen de manera amplia pero no universal entre las bacterias flageladas incluyen *flgH*, *flgI*, *fliD*, *fliE* y *fliH*. La ausencia de algunos de estos genes en los genomas es comprensible una vez que se consideran las características de las bacterias particulares. Así, los tres genes (*fliD*, *fliE* y *fliH*) están presentes en los principales grupos bacterianos, pero faltan esporádicamente en algunos genomas, más notablemente en las *Alphaproteobacteria*. Debido a que las distribuciones actuales de estos tres genes son atribuibles a la pérdida secundaria, también deben considerarse parte del conjunto ancestral de genes que especifican el flagelo bacteriano, lo que eleva el total de genes centrales a 24. Los genes restantes, incluidos los que desempeñan funciones reguladoras o auxiliares en el ensamblaje o función flagelar (como los reguladores *flhC* y *flhD*, y el gen *fliK* de control de la longitud del gancho), tienen distribuciones altamente variables y se excluyen del conjunto central de genes, aun sabiendo que algunos de ellos son esenciales para el correcto funcionamiento del sistema flagelar en una especie en particular.

Diversos análisis han sugerido que alrededor del 70% de todas las *Proteobacteria* poseen de forma completa los sistemas genéticos del flagelo, los cuales parecen ser un rasgo común a la mayoría de los genomas del grupo Roseobacter. De hecho, la movilidad flagelar ha sido demostrada en muchos miembros de este grupo bacteriano (Pohlner *et al.*, 2017b; Christie-Oleza *et al.*, 2012; Sule & Belas 2013; Belas *et al.*, 2009; Slightom & Buchan, 2009). Los resultados obtenidos en este estudio (Tabla 20) muestran que la mayoría de las cepas analizadas pertenecientes a la familia *Rhodobacteraceae* parecen ser flageladas, ya que contienen en sus respectivos genomas el conjunto de 21 genes necesarios para la biosíntesis flagelar. Las únicas cepas que parecen no ser móviles, al carecer de dichos genes fueron *Rv. albus* CECT 7450^T, *Pg. aquimaris* CECT 7680^T, *Rv. halotolerans* CECT 8110^T, *Pc. litorisediminis* CECT 8287^T, *Rv. gaetbuli* CECT 8370^T, *B. aestuarii* CECT 8489^T y *Rx. jejudonensis* CECT 8625^T. Estos resultados están en concordancia con las descripciones originales de dichas especies (Lucena *et al.*, 2014; Jung *et al.*, 2014a; Park *et al.*, 2014c, 2014e, 2013a; Oh *et al.*, 2009; Yoon *et al.*, 2007). Sin embargo, las cepas *Pd. jejudonensis* CECT 8397^T, *Ru. meonggei* CECT 8411^T, *Pa. lutimaris* CECT 8525^T, *Ru. mediterranea* CECT 7615^T, *Pl. abyssalis* CECT 8504^T, *As. donghaensis* CECT 8599^T, *D. aquaemixtae* CECT 8626^T y *Y. sediminilitoris* CECT 8284^T pese a poseer una gran cantidad de genes involucrados en la movilidad flagelar, todas ellas están descritas como especies no móviles (Albuquerque *et al.*, 2015; Billerbeck *et al.*, 2015; Jung *et al.*, 2014b, 2014c; Kim *et al.*, 2014b, 2014c; Park *et al.*, 2013b; Lucena *et al.*, 2013). Del mismo modo, los resultados obtenidos para las cepas restantes, a excepción de *Rv. aestuarii* CECT 7745^T, *Tr. phthalicus* CECT 8649^T, *Pm.*

varians CECT 8663^T y *Ru. arenilitoris* CECT 8715^T, entran en contradicción con las descripciones originales de dichas especies, puesto que, a pesar de contener el conjunto central de genes requeridos para la biosíntesis del flagelo, están descritas como especies no móviles (Jung *et al.*, 2016a, 2016b, 2011; Park *et al.*, 2016, 2015b, 2015c, 2015a, 2014b, 2014d, 2013c; Park & Yoon, 2014; Lucena *et al.*, 2013; Labrenz *et al.*, 2009, 2005; Lin *et al.*, 2007; Martens *et al.*, 2006; Martínez-Checa *et al.*, 2005).

Tabla 20. Predicción del conjunto de genes esenciales para la movilidad flagelar analizados en los miembros de *Rhodobacteraceae* a estudio. *Al. pelagivivens* CECT 8811^T; *Aq. soesokkakensis* CECT 8620^T; *As. donghaensis* CECT 8599^T; *B. aestuarii* CECT 8489^T; *C. lipolyticum* CECT 8621^T; *D. aquaemixtae* CECT 8626^T; *F. marinus* CECT 8899^T; *Y. sediminilitoris* CECT 8284^T; *L. soesokkakensis* CECT 8367^T; *Ml. aquimaris* CECT 8898^T; *Mr. algicola* CECT 5396^T; *O. ascidiaceicola* CECT 8868^T; *P. marinus* CECT 7971^T; *Pl. abyssalis* CECT 8504^T; *Pl. marisminoris* CECT 7066^T; *Pa. lutimaris* CECT 8525^T; *Pc. litorisediminis* CECT 8287^T; *Pm. varians* CECT 8663^T; *Po. insulae* CECT 8812^T; *Pr. insulae* CECT 8871^T; *Ps. marinus* CECT 7751^T; *Pd. jejudonensis* CECT 8397^T; *Py. aestuarii* CECT 9025^T; *Pg. aquimaris* CECT 7680^T; *Rb. ekhonensis* CECT 7235^T; *Rs. antarcticus* CECT 7023^T; *Rx. jejudonensis* CECT 8625^T; *Rv. aestuarii* CECT 7745^T; *Rv. albus* CECT 7450^T; *Rv. gaetbuli* CECT 8370^T; *Rv. halotolerans* CECT 8110^T; *Ru. arenilitoris* CECT 8715^T; *Ru. meonggei* CECT 8411^T; *Ru. litorea* CECT 7639^T; *Ru. mediterranea* CECT 7615^T; *Tr. phthalicus* CECT 8649^T. +, presencia; -, ausencia.

Nº CECT	<i>fljC</i>	<i>fljK</i>	<i>fljL</i>	<i>fljE</i>	<i>fljB</i>	<i>fljC</i>	<i>fljF</i>	<i>fljG</i>	<i>fljF</i>	<i>fljG</i>	<i>fljM</i>	<i>fljN</i>	<i>motA</i>	<i>motB</i>	<i>flhA</i>	<i>flhB</i>	<i>flil</i>	<i>fljP</i>	<i>fljR</i>	<i>fljQ</i>	<i>fljD</i>
5396 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7023 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7066 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7450 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
7639 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7680 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
7745 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7751 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7971 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8110 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
8284 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
8287 ^T	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
8367 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8370 ^T	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
8397 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8411 ^T	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
8489 ^T	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
8620 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8621 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8625 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
8649 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8663 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8715 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8868 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8898 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8899 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8525 ^T	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9025 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7235 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7615 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8504 ^T	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Nº CECT	<i>fljC</i>	<i>fljK</i>	<i>fljL</i>	<i>fljE</i>	<i>fljB</i>	<i>fljC</i>	<i>fljF</i>	<i>fljG</i>	<i>fljI</i>	<i>fljG</i>	<i>fljM</i>	<i>fljN</i>	<i>motA</i>	<i>motB</i>	<i>flhA</i>	<i>flhB</i>	<i>fliI</i>	<i>fliP</i>	<i>fliR</i>	<i>fliQ</i>	<i>flgD</i>	
8599 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8626 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8811 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8812 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8871 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Además, la mayor parte de las cepas analizadas carecían de los genes *fliE*, *fliH* y *fliD*, dato que confirma la hipótesis de Liu y Ochman (2007) donde se sugiere que los genomas de muchas *Alphaproteobacteria* carecen de dichos genes debido a pérdidas secundarias. En general, los resultados obtenidos sugieren que la movilidad puede no ser un rasgo determinante para el éxito ecológico de *Rhodobacteraceae* en el entorno marino, corroborando el hecho de que muchas de ellas vivan típicamente asociadas a superficies bióticas o abióticas y/o formando biofilms, situaciones donde los flagelos carecen de utilidad.

▪ **Quimiotaxis**

Un comportamiento estrechamente asociado a la movilidad es la quimiotaxis, que se define como el movimiento dirigido de las células en respuesta a gradientes químicos. Es decir, la quimiotaxis permite que una bacteria detecte su entorno utilizando receptores de membrana y que altere su movimiento hacia o en contra de un atrayente o repelente, respectivamente (Slightom, 2008).

Por tanto, los sistemas de quimiotaxis permiten a las bacterias controlar sus movimientos en respuesta a gradientes de sustancias químicas beneficiosas y nocivas que van encontrando a medida que la célula nada a través de su entorno. En estos sistemas, una vía de transducción de señales bien definida media la comunicación entre las proteínas de la superficie celular y los motores flagelares, y este control permite que la célula migre hacia gradientes quimioatrayentes o en contra de quimiorrepelentes. Las proteínas receptoras de membrana (también llamadas MCPs o proteínas quimiosensoras aceptoras de metilo) reciben el sensor químico y modulan, en consecuencia, la actividad de CheA, una proteína histidina quinasa autofosforilante. La proteína CheA fosforilada (CheA-P), a su vez, dirige la activación de CheY mediante la donación de su grupo fosforilo, así CheY-P difunde a los motores flagelares donde promueve la rotación de los flagelos en sentido horario, un evento que hace que la célula cambie su dirección de natación. La unión de una molécula quimioatrayente al dominio periplásmico de una proteína MCP produce una disminución de la actividad autoquinasa de CheA, reduciendo por tanto el *pool* intracelular de CheY-P y la probabilidad de un cambio en la dirección de la natación. Sin embargo, CheA-P aparte de dirigir la activación de la proteína CheY como acabamos de ver, dirige también la activación de la proteína CheB con función metilesterasa. De forma similar la fosforilación de la proteína CheB (CheB-P) a través de CheA-P, eleva la actividad de la metilesterasa y procede a la desmetilación de los MCPs, lo que conduce a la atenuación de la señalización del MCP, un proceso que contribuye a la adaptación sensorial en los sistemas de quimiotaxis durante estímulos negativos. Contraria a la función de CheB, encontramos la metiltransferasa CheR, que transfiere continuamente grupos metilo de moléculas S-adenosil metionina a los MCPs permitiendo la adaptación a los estímulos positivos (Fig. 19) (Harighi, 2009; Slightom, 2008; Boukhvalova *et al.*, 2002; Tawa & Stewart, 1994).

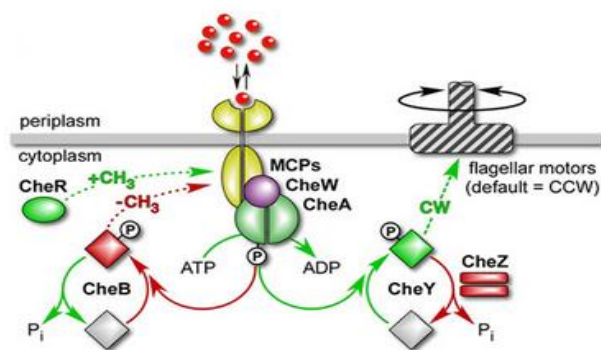


Fig. 19. Vía de quimiotaxis. Las reacciones y los componentes que generan la rotación en sentido horario se representan en verde, aquellos que la generan en sentido antihorario en rojo. Los motores flagelares de *E. coli* giran en sentido antihorario. Los MCP en respuesta a los estímulos quimioefectores transfieren las señales y hacen que CheA se autofosforile a través de la proteína adaptadora CheW. Entonces la molécula CheA-P sirve como donante de grupos fosforilo a residuos específicos de aspartato en cheY y cheB. CheY-P potencia la rotación en sentido horario de los motores flagelares FliM; CheB-P tiene una alta actividad MCP metiltransferasa que ayuda a cambiar la rotación hacia sentido antihorario, y estarán inactivos debido al grupo fosforilo a través de autohidrólisis espontánea. CheZ mejora aún más la tasa de defosforilación de CheY-P, para asegurar respuestas locomotoras rápidas a los cambios en el suministro de grupos fosforilo de señalización a cheY. Imagen de Parkinson Lab - University of Utah.

Se ha encontrado que las bacterias marinas exhiben movilidad y quimiotaxis de alto rendimiento, existiendo evidencia de que la quimiotaxis puede ser un fenotipo ecológicamente importante entre las poblaciones de bacterias marinas (Tout *et al.*, 2015). Así, la quimiotaxis ha sido bien documentada en varias especies marinas, incluyendo *Vibrio fischeri* y *Rhodobacter sphaeroides* (DeLoney-Marino *et al.*, 2003; Armitage & Schmitt, 1997). Respecto al grupo Roseobacter, la primera cepa caracterizada como quimiotáctica fue *Silicibacter* sp. TM1040 (Miller *et al.*, 2004) descrita como quimiotáctica hacia el DMSP de osmolitos de algas y una variedad de aminoácidos producidos por el dinoflagelado *Pfiesteria* del cual se aisló. Actualmente, con la disponibilidad de genomas secuenciados, se ha observado que los genomas de Roseobacter contienen una gran cantidad de genes que codifican rutas de quimiotaxis, existiendo una fuerte conservación de un casete de genes (*cheYAWR*) que codifica el conjunto mínimo de proteínas junto a las MCPs requeridas para la quimiotaxis funcional (Christie-Oleza *et al.*, 2012; Slightom & Buchan, 2009).

Tabla 21. Predicción de la presencia de genes involucrados en el proceso de quimiotaxis analizados en los genomas de *Rhodobacteraceae*. Abreviaciones: MCP, Proteínas quimiosensoras aceptadoras de metilo. +, presencia; -, ausencia.

	<i>cheW</i>	<i>cheA</i>	<i>cheY</i>	<i>cheZ</i>	<i>cheB</i>	<i>cheR</i>	<i>cheD</i>	MCP
<i>Al. pelagivivens</i> CECT 8811 ^T	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Aq. soesokkakensis</i> CECT 8620 ^T	+	+	+	-	+	+	+	8
<i>As. donghaensis</i> CECT 8599 ^T	+	+	+	-	-	+	+	9
<i>B. aestuarii</i> CECT 8489 ^T	-	-	+	-	-	+	-	7
<i>C. lipolyticum</i> CECT 8621 ^T	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>D. aquaemixtae</i> CECT 8626 ^T	-	-	+	-	-	-	-	2
<i>F. marinus</i> CECT 8899 ^T	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>L. soesokkakensis</i> CECT 8367 ^T	-	-	-	-	-	+	-	1
<i>Ml. aquimaris</i> CECT 8898 ^T	+	+	+	-	+	+	+	11

	<i>cheW</i>	<i>cheA</i>	<i>cheY</i>	<i>cheZ</i>	<i>cheB</i>	<i>cheR</i>	<i>cheD</i>	MCP
<i>Mr. algicola</i> CECT 5396 ^T	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>O. ascidiaceicola</i> CECT 8868 ^T	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>P. marinus</i> CECT 7971 ^T	+	+	+	-	+	+	+	7
<i>Pa. lutimaris</i> CECT 8525 ^T	-	-	-	-	-	-	-	3
<i>Pc. litorisediminis</i> CECT 8287 ^T	-	-	-	-	-	+	-	2
<i>Pd. jejudonensis</i> CECT 8397 ^T	-	-	-	-	-	+	-	1
<i>Pg. aquimaris</i> CECT 7680 ^T	-	-	-	-	-	-	-	3
<i>Pl. abyssalis</i> CECT 8504 ^T	-	+	+	-	+	+	-	13
<i>Pl. marisminoris</i> CECT 7066 ^T	+	+	+	-	+	+	+	7
<i>Pm. varians</i> CECT 8663 ^T	+	+	+	-	+	+	+	11
<i>Po. insulae</i> CECT 8812 ^T	+	+	+	-	+	+	-	9
<i>Pr. insulae</i> CECT 8871 ^T	+	+	+	-	+	+	+	12
<i>Ps. marinus</i> CECT 7751 ^T	-	+	+	-	+	+	+	11
<i>Py. aestuarii</i> CECT 9025 ^T	+	+	+	-	+	+	+	5
<i>Rb. ekhonensis</i> CECT 7235 ^T	-	-	-	-	-	-	-	4
<i>Rs. antarcticus</i> CECT 7023 ^T	+	+	+	-	+	+	+	9
<i>Ru. arenilitoris</i> CECT 8715 ^T	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Ru. litorea</i> CECT 7639 ^T	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Ru. mediterranea</i> CECT 7615 ^T	-	-	-	-	-	-	-	4
<i>Ru. meonggei</i> CECT 8411 ^T	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Rv. aestuarii</i> CECT 7745 ^T	-	-	-	-	-	+	-	3
<i>Rv. albus</i> CECT 7450 ^T	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Rv. gaetbuli</i> CECT 8370 ^T	-	-	-	-	-	+	-	1
<i>Rv. halotolerans</i> CECT 8110 ^T	-	-	-	-	-	-	-	3
<i>Rx. jejudonensis</i> CECT 8625 ^T	+	+	+	-	+	+	+	9
<i>Tr. phthalicus</i> CECT 8649 ^T	-	+	+	-	+	+	+	19
<i>Y. sediminilitoris</i> CECT 8284 ^T	+	+	+	-	+	+	+	11

Las proteínas MCP detectan productos químicos específicos, y se sabe que su frecuencia en los genomas bacterianos varía significativamente. Entre los *Rhodobacteraceae* analizados que contienen el operón *che* (Tabla 21) existe una variación significativa en el repertorio de quimiorreceptores en una cepa dada, el recuento de quimiorreceptores encontrados varía de 5 a 19 con un promedio de 10 MCPs por célula, no existiendo ningún tipo de correlación entre el tamaño del genoma analizado y el número de MCPs identificados. Aunque se han caracterizado pocos quimiorreceptores bacterianos con respecto a sus ligandos, es probable que el número de quimiorreceptores sea un reflejo directo de la especificidad de detección y la flexibilidad de una cepa dada. Por lo tanto, esta abundancia de MCPs encontrada es un reflejo más del metabolismo versátil que caracteriza a la familia (Pujalte *et al.*, 2014).

En la tabla también se puede observar que el conjunto mínimo de genes (*cheYAWR*) necesarios para la quimiotaxis funcional únicamente se detectó en el 41% de los genomas analizados (15 de 36), ya que se asume que la carencia de la proteína CheW en los genomas de *Ps. marinus* CECT 7751^T, *Tr. phthalicus* CECT 8649^T y *Pl. abyssalis* CECT 8504^T probablemente se deba simplemente a una pérdida durante la anotación. En estos genomas también se encontraron presentes los genes para CheB que tiene un rol en la adaptación y CheD que contribuye a la activación de las MCPs. Si este resultado se compara con el obtenido en el análisis de movilidad flagelar (Tabla 20) se observa una correlación débil entre la producción de flagelos y la quimiotaxis, ya que solo un 48% (puesto que *Rx. jejudonensis* CECT 8625^T no es móvil) de las

cepas de *Rhodobacteraceae* analizadas contienen genes para ambos rasgos dentro de sus genomas. Este resultado está de acuerdo con Slightom y Buchan (2009) sugiriendo que muchos miembros de *Rhodobacteraceae* son incapaces de transducir señales de quimiotaxis y, por lo tanto, de detectar y responder cinéticamente en gradientes químicos. Esto sugiere que los flagelos pueden tener funciones distintas a la movilidad direccional y la navegación en gradientes, tal y como se ha observado en los resultados derivados del análisis de flagelos, por lo que la quimiotaxis parece no ser esencial para el estilo de vida de *Rhodobacteraceae*. Dado el grado de pérdida de genes de quimiotaxis observado entre los genomas de esta familia, se espera que los miembros de *Rhodobacteraceae* quimiotácticos y no quimiotácticos usen los flagelos de forma diferente. Esto puede reflejar estrategias de vida claramente diferentes y/o los diferentes nichos que pueden ocupar. Por ejemplo, en algunos entornos ambientales, algunas cepas pueden requerir quimiotaxis para mantener una ventaja competitiva sobre otras poblaciones bacterianas respecto a la captación de sustratos de crecimiento, lo que podría ser indicativo de un nicho más selectivo (Seymour *et al.*, 2008). Así, los *Rhodobacteraceae* móviles que carecen de maquinaria de quimiotaxis pueden depender de los flagelos para su dispersión y/o unión, como se ha propuesto para otra *Alphaproteobacteria* marina, como es *Hyphomonas neptunium* (Badger *et al.*, 2005). Alternativamente, la función de los flagelos podría estar relacionada con la agregación celular, tal y como sugieren Serra *et al.* (2013). Y como última hipótesis para esta carencia de genes de quimiotaxis, algunos miembros de *Rhodobacteraceae* podrían contener vías quimiotácticas completamente nuevas y no caracterizadas. Otra observación interesante que se puede obtener a partir de estos resultados es que los genomas de *Rhodobacteraceae* analizados varían en tamaños que van de 3.2 a 5.3 Mb, observándose una prevalencia de genes de quimiotaxis en genomas de tamaño ≥ 4.0 Mb (73%, n=11) en relación con aquellos genomas de < 4.0 Mb (27%, n=4). Por lo tanto, esto podría sugerir que, si no es un rasgo de vital importancia para la célula, la quimiotaxis puede ser una función fácilmente perdida en la racionalización de los genomas de *Rhodobacteraceae*.

2.9 Adherencia y producción de biopelículas

Las bacterias marinas están expuestas a una gran variedad de superficies en el ambiente acuático. Un aspecto importante del comportamiento bacteriano es la capacidad de unirse y colonizar estas superficies, produciendo biopelículas. Este término, se aplica a aquellas comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o a un tejido vivo (Jiménez, 2009). Diversos estudios (Bruhn *et al.*, 2007; Segev *et al.*, 2015; D'Alvise, 2013) han propuesto que la adherencia y la formación de biopelículas puede ser una característica común en los miembros del grupo Roseobacter, siendo descritos como uno de los colonizadores más rápidos de superficies en ambientes costeros, llegando a recibir el nombre de colonizadores agresivos.

Un aspecto potencialmente importante de la producción de biopelículas es la capacidad de los microorganismos para comunicarse entre sí. Para comenzar a formar una estructura de biopelícula, muchas especies bacterianas deben ser capaces de señalarse entre sí que existe una densidad celular adecuada para iniciar la colonización. Esta coordinación se produce a través de un mecanismo de comunicación célula a célula llamado *Quorum Sensing* (QS). Este mecanismo, confiere a las bacterias la capacidad de reconocer la densidad de población midiendo la acumulación de una molécula de señalización específica que los miembros de la comunidad secretan. Las moléculas señal del QS tienen un bajo peso molecular y pueden pertenecer a una amplia variedad de clases químicas, incluyendo; acil homoserinas lactonas (AHL), furanosil borato diésteres (AI2), cis-ácidos grasos insaturados (familia DSF) y péptidos (Solano *et al.*, 2014).

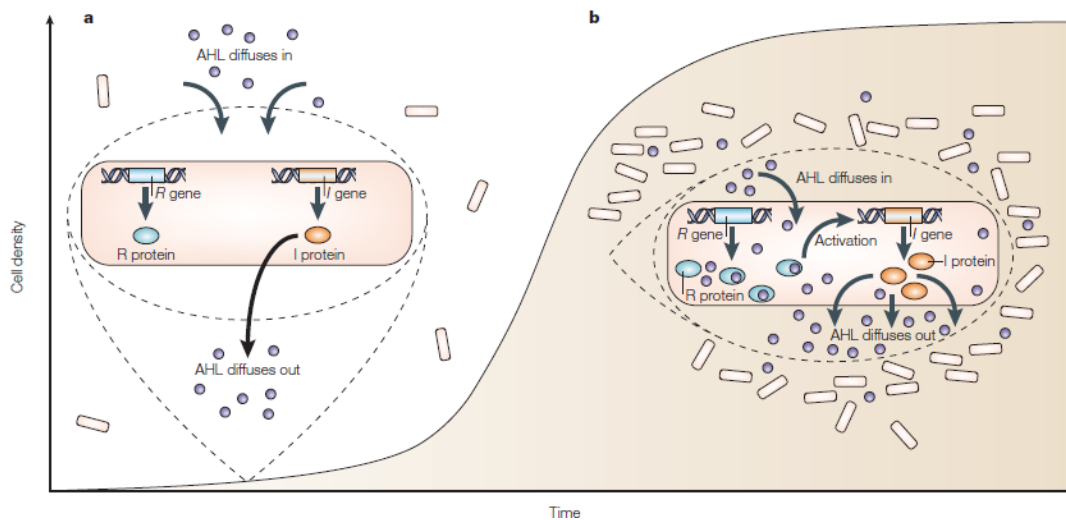


Fig. 20. La detección del QS en bacterias Gram negativas. El gen *luxR* codifica el regulador transcripcional (proteína R) y *luxI* codifica la AHL sintasa (proteína I). **A** | A bajas densidades celulares, las moléculas de AHL se sintetizan y se acumulan. Dependiendo de la longitud de la cadena de acilo, las AHL difunden o se bombean hacia el exterior celular, donde las moléculas están disponibles para su difusión o absorción por las células bacterianas. **B** | A altas densidades celulares, la cantidad de AHL alcanza una concentración umbral. La proteína R forma un complejo con su AHL afín y este complejo activa o reprime la transcripción de los genes diana. Como el gen *luxI* generalmente está regulado positivamente por la proteína R en complejo con su AHL afín, se produce una rápida amplificación de los resultados de la señal AHL, lo que facilita la regulación transcripcional coordinada de múltiples genes. Imagen obtenida de Lazdunski *et al.* (2004).

El modelo de QS basado en AHL, se encuentra exclusivamente en bacterias Gram negativas y es el mecanismo de señalización mejor estudiado en el filo *Proteobacteria*. En este tipo de bacterias, la detección del QS está mediada por dos proteínas: LuxI y LuxR. Las proteínas LuxI, generalmente denominadas AHL sintetas, son las enzimas biosintéticas responsables de la producción de las moléculas químicas que detectan el *quorum*, a menudo denominadas autoinductores. Por su parte, las proteínas LuxR son reguladores transcripcionales que median la actividad de LuxI, siendo el principio por el que actúan el siguiente; cuando la densidad celular es baja y por tanto la concentración de AHL también lo es, las moléculas de AHL atraviesan rápidamente la membrana celular bacteriana por difusión pasiva y son diluidas en el ambiente. Sin embargo, a medida que la densidad celular aumenta, las moléculas de AHL se van acumulando proporcionalmente y una vez que la densidad de población y, por tanto, la concentración de AHL, alcanza un cierto nivel umbral, estas moléculas se unen a su receptor LuxR. Así, el complejo AHL-LuxR formado inhibirá o activará un cierto conjunto de genes diana, coordinando el comportamiento de la comunidad microbiana (Fig. 20).

Este sistema de detección del QS vía AHL ha sido extensamente descrito en *Rhodobacteraceae* (Chi *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2015; Zan *et al.*, 2014; Cude & Buchan, 2013; Mohamed *et al.*, 2008; Wagner-Döbler *et al.*, 2005; Gram *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos en este trabajo refuerzan las conclusiones de estos autores, puesto que en todos los genomas analizados se halló la presencia de genes homólogos a luxR, que codifica el regulador transcripcional de LuxI. Sin embargo, el 39% de los genomas (14 de 36) carecían de genes homólogos a luxI, codificantes para la AHL sintasa. Esta carencia de genes ya fue descrita en otros miembros del grupo Roseobacter, como son *Oceanicola batsensis* HTCC2597^T, *Oceanicola* sp. S124, *Salipiger bermudensis* HTCC2601^T, *Rhodobacterales* HTCC2255 y *Ruegeria* sp. TM1040 (Cude & Buchan 2013), y sugiere que las *Rhodobacteraceae* no se comunican vía AHL dentro de sus propias especies, pero parecen utilizar LuxR como receptor para otras moléculas señal producidas por otros microorganismos, lo que puede facilitar el desarrollo de biopelículas mixtas. Este resultado muestra que los mecanismos de detección del *quorum* están distribuidos entre los miembros de la familia (Slightom & Buchan, 2009) pudiendo regular una variedad de procesos celulares que incluyen la ya comentada formación de biopelículas, bioluminiscencia, simbiosis y/o virulencia. Por otra parte, también se detectó que el genoma de la cepa *P. marinus* CECT 7971^T contenía genes implicados en un aparato de transporte -transportador regulado por LuxS (Lsr)- implicado en la internalización y escisión de otra molécula señal del QS, denominada autoinductor AI-2 (Marques *et al.*, 2011; Xavier *et al.*, 2007), lo que implica que esta cepa puede responder a la presencia de bacterias competidoras, secuestrando y destruyendo las moléculas AI-2, eliminando así las capacidades de comunicación intercelular de los competidores. Este proceso de inactivación enzimática de señales del QS ha sido denominado *Quorum Quenching* (QQ), siendo muy frecuente en el medio marino (Muras *et al.*, 2018; Blanchet *et al.*, 2017). Pese a encontrarse el sistema Lsr, encargado de la escisión de la molécula señal AI-2, en la cepa *P. marinus* CECT 7971^T, ninguno de los genomas analizados contenía genes codificantes para las proteínas AHL lactonasas y/o AHL acilasas, enzimas responsables de la escisión de la molécula señal AHL, que tal y como se ha comentado anteriormente es la principal molécula señal del QS en *Rhodobacteraceae*.

Recientemente se ha propuesto que la formación de biopelículas y la movilidad de natación dependen esencialmente de la presencia de un replicón tipo RepA-I de 65Kb descrito en *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 (Frank *et al.*, 2015). Este plásmido contiene más de 20 genes para la síntesis y transporte de exopolisacáridos incluyendo un operón de ramnosa. No se obtuvieron resultados significativos a partir de la búsqueda BLAST de la secuencia del plásmido

pPGA1_65 de *P. inhibens* DSM 17395 (CP002979.1) en los genomas a estudio. Tampoco se han encontrado genes relacionados con la síntesis de los exopolisacáridos capsulares succinoglicano (Cheng y Yao, 2004) y xantano (Kim *et al.*, 2009). También carecían del gen *neuS* necesario para la polimerización del ácido polisialílico involucrado en la formación de las cápsulas (Vann *et al.*, 2004). Así como también presentaron de forma incompleta el clúster Eps (Wu *et al.*, 2014; Stingel *et al.*, 1996), el clúster Kps (Jia *et al.*, 2017b; Diao *et al.*, 2017; Johnson & O'bryan, 2004; Rowe *et al.*, 2000), el clúster Wcb (Reckseidler *et al.*, 2001) y la vía dependiente de Wzy (Sachdeva *et al.*, 2017; Su *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2015; Reid & Whitfield, 2005; Arco *et al.*, 2005), todos ellos relacionados con la síntesis de exopolisacáridos o polisacáridos capsulares en diversas bacterias. No obstante, se encontró que la cepa *As. donghaensis* CECT 8599^T posee el potencial genético (*algA*, *algC*, *algD*, *algF*, *algI*, *algJ*, *algL*, *algX* y *alg8*) para la biosíntesis del exopolisacárido alginato (Schurr, 2013; Muhammadi & Ahmed, 2007) y, puede que las cepas *Py. abyssalis* CECT 8504^T y *L. soesokkakensis* CECT 8367^T para la producción de celulosa, puesto que contenían las dos subunidades catalíticas del complejo enzimático celulosa sintasa (Krasteva *et al.*, 2017; Römmling & Galperin, 2015). Todos los genomas analizados, a excepción de *Pa. lutimaris* CECT 8525^T, presentaron el sistema regulatorio *chv* de dos componentes característico de las *Alphaproteobacteria*, involucrado en la regulación de exopolisacáridos y el reconocimiento simbiótico en *Rhizobium*, además, de un clúster génico de alta adherencia (TAD), que constituye un subtipo del sistema de secreción de tipo II, involucrado en la adhesión celular, la producción de fibrillas adhesivas de bajo peso molecular (Flp), el desarrollo de biopelículas y la colonización del huésped (Yassin *et al.*, 2017; Mongiardini *et al.*, 2016; Haq *et al.*, 2014; Tomich *et al.*, 2007). Pese a la carencia del plásmido biofilm en los genomas estudiados, la presencia del locus de adherencia TAD y el sistema de dos componentes, puede ser uno de los factores que permite a la familia *Rhodobacteraceae* colonizar algas, llegando así a considerarse la microbiota dominante del fitoplancton marino (Bruhn *et al.*, 2007). Y, además, esta supuesta capacidad de adherencia y producción de biopelículas supone una ventaja adaptativa que sus competidores de vida libre no tienen, puesto que se ha observado que las biopelículas experimentan una mayor tolerancia a una gran diversidad de factores ambientales, incluyendo la resistencia a antibióticos y el pastoreo de organismos eucariotas unicelulares (Guttenplan & Kearns, 2013).

2.10 Mecanismos de defensa frente a diferentes condiciones de estrés

Las bacterias se enfrentan a condiciones ambientales cambiantes, por lo que han desarrollado mecanismos de defensa que les permiten hacer frente a diversos tipos de estrés ambiental, y por consiguiente han logrado la adaptación de forma exitosa a los entornos fluctuantes.

▪ Mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo

Muchos procesos biológicos clave dependen del oxígeno molecular. Una consecuencia del uso del O_2 en rutas bioenergéticas u otras rutas metabólicas, es la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) que son tóxicas para los organismos ya que pueden causar mutaciones y daños importantes en proteínas, DNA, membranas celulares, etc. Existen dos clases de ROS, una creada mediante reacciones de transferencia de electrones (tipo I), y la otra mediante reacciones de transferencia de energía (tipo II). En las reacciones de transferencia de electrones, la reducción del O_2 con un electrón produce un anión peróxido radical (O_2^-) denominado comúnmente superóxido. A su vez, el O_2^- se reducirá mediante otro electrón produciendo un anión peróxido (O_2^{2-}), el cual existe como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en los sistemas biológicos. Por su parte, el H_2O_2 reacciona con el hierro ferroso (Fe^{2+}) en la reacción de Fenton produciendo un radical hidroxilo (OH^\cdot). En el segundo tipo de reacción, la transferencia de energía al O_2 da como resultado la formación de oxígeno singlete (1O_2), el cual es considerado una de las ROS más dañinas (Fig. 21) (Wang *et al.*, 2017, 2012a; Ziegelhoffer & Donohue, 2009). Así, cualquier entorno en el que haya oxígeno tiene el potencial de producir ROS, y por tanto los organismos que se encuentren en él deben tener mecanismos para eliminar estas especies reactivas y reparar cualquier daño causado.

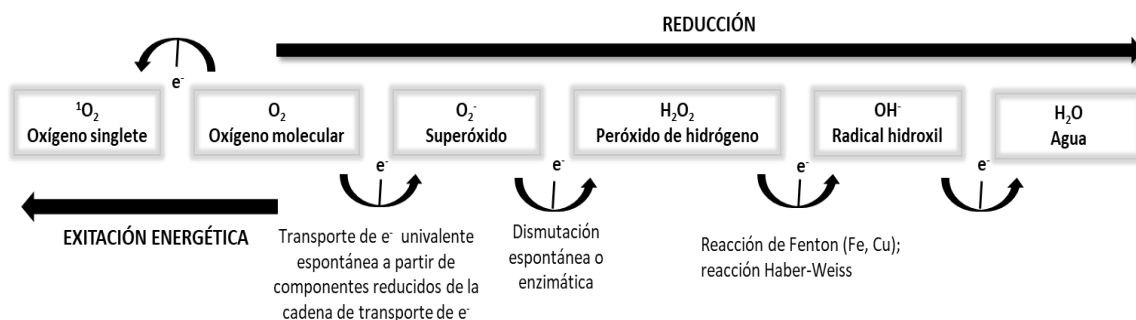


Fig. 21. Formación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) a través de transferencia de electrones (e^-) o de energía.

En los sistemas marinos, la absorción de la radiación solar y especialmente de sus longitudes de onda UV por la materia orgánica disuelta en el agua del mar conduce a la producción fotoquímica de diversos reactivos transitorios, incluidas ROS. Además, los respiraderos hidrotermales también producen ROS. La abundancia de sulfuro de hidrógeno (H_2S) y O_2 cerca de los respiraderos dan lugar a la oxidación del H_2S en el agua marina y a la producción tanto de radicales de oxígeno como de sulfuro (Lesser, 2006). Esto conlleva a que muchas bacterias marinas hayan desarrollado sistemas de defensa antioxidantes para lidiar con el estrés oxidativo a través de enzimas como la superóxido dismutasa, la peroxirredoxina y la catalasa. De hecho, los resultados obtenidos en el análisis metagenómico de muestras oceánicas realizado por Bengtsson-Palme (2014) revelaron que las bacterias marinas poseen un mayor número de enzimas involucradas en la defensa frente al estrés oxidativo, concretamente de peroxidasas, en comparación con las presentes en los genomas bacterianos en general (Seo *et al.*, 2015).

En la mayoría de las bacterias Gram negativas, dos factores de transcripción son inducidos bajo condiciones de estrés oxidativo: el sistema OxyR que responde al peróxido de hidrogeno y el sistema SoxRS que responde a los compuestos activos redox. Asimismo, el factor de transcripción RpoS también regula la expresión de varios genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo. El regulón OxyR incluye genes que están involucrados en la eliminación del oxidante (*katG*; catalasa bifuncional con acción peroxidasa, *ahpC*; alquil-hidroperóxido reductasa), en el mantenimiento del balance entre los grupos tiol y los enlaces disulfuro (*gorA*; glutatión reductasa, *grxA*; glutarredoxina y *trxC*: tiorredoxina), y en la limitación de la disponibilidad de Fe^{2+} (*dps*; *DNA protection during starvation protein* y *fur*; *ferric uptake regulation protein*) para minimizar la ocurrencia de la reacción de Fenton. Por lo que respecta al regulón SoxRS, una vez que la proteína SoxR se haya activado por O_2^- , estimulará directamente la transcripción de SoxS. Ésta actúa en una segunda cascada de la respuesta transcripcional a O_2^- para activar directamente la transcripción génica. El regulón SoxRS incluye genes involucrados en la eliminación de O_2^- (SOD; superóxido dismutasa), reparación de ADN (endonucleasa IV) y en el aumento de reservas celulares de nucleótidos de piridina reducidos para reacciones de reparación dependientes de glutatión (*zwf*; glucosa-6-fosfato deshidrogenasa). Miembros adicionales del regulón SoxRS incluyen *fur*, isoenzimas resistentes a superóxido de fumarasa (*fumC*) y aconitasa (*acnA*), que permiten la función continua del ciclo de Krebs, y varios genes de flavodoxina (*fpr*, *fldA* y *fldB*), los productos de los cuales son probablemente importantes para reducir los clústeres Fe-S. Los regulones OxyR y SoxRS también protegen a las células de otros productos químicos nocivos, incluidas las especies de nitrógeno reactivo y los disolventes orgánicos (Ziegelhoffer & Donohue, 2009).

Los principales constituyentes para ambos regulones fueron identificados en todos los genomas de *Rhodobacteraceae* (Tabla 22). Esta riqueza de genes involucrados en la defensa frente al estrés oxidativo era predecible puesto que los miembros de *Rhodobacteraceae* están descritos como organismos aerobios que requieren sistemas de detoxificación eficientes que les permitan la supervivencia. Además, muchas de estas proteínas como por ejemplo las tiorredoxinas, glutatión peroxidasa y peroxirredoxinas son, aparte de una defensa frente al estrés oxidativo, importantes en otros aspectos de la fisiología celular además de en la detoxificación (Bengtsson-Palme *et al.*, 2014). Por otra parte, esta abundancia de enzimas detoxificantes de ROS concuerda con los resultados previos obtenidos en este trabajo respecto a la preferencia de *Rhodobacteraceae* a la hora de catalizar los carbohidratos mediante la ruta de Entner-Doudoroff, ya que tal y como se ha comentado anteriormente esta ruta produce una mayor cantidad de NADPH, el cual además de servir como donante de H para reacciones biosintéticas, es un cofactor esencial para varias enzimas involucradas en actividades protectoras y/o antioxidantes entre las que se incluyen varios componentes de los sistemas OxyR y SoxRS, tales como la glutatión reductasa, la tiorredoxina reductasa, la alquil-hidroperoxidasa dependiente de NADPH y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa entre otras (Krapp *et al.*, 2011).

Tabla 22. Predicción de genes relacionados con la respuesta frente al estrés oxidativo analizados en los genomas de *Rhodobacteraceae*. Abreviaciones: *katG*, catalasa bifuncional con acción peroxidasa, *ahpC*, alquil-hidroperóxido reductasa; *gorA*, glutatión reductasa; *grxA*, glutarredoxina; *trxC*, tiorredoxina; *dps*, DNA protection during starvation protein; *fur*, ferric uptake regulation protein; SOD, superóxido dismutasa; ENDO IV, endonucleasa IV; *zwf*, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; *fumC*, superóxido de fumarasa; *acnA*, aconitasa. +, presencia; -, ausencia.

	Regulón OxyR									Regulón SoxRS				
	Catalasa	Peroxidasa	<i>katG</i>	<i>ahpC</i>	<i>gorA</i>	<i>grxA</i>	<i>trxC</i>	<i>dps</i>	<i>fur</i>	SOD	Endo IV	<i>zwf</i>	<i>fumC</i>	<i>acnA</i>
<i>Al. pelagivivens</i> CECT 8811 ^T	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>Aq. soesokkakensis</i> CECT 8620 ^T	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>As. donghaensis</i> CECT 8599 ^T	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>B. aestuarii</i> CECT 8489 ^T	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>C. lipolyticum</i> CECT 8621 ^T	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>D. aquaemixtae</i> CECT 8626 ^T	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>F. marinus</i> CECT 8899 ^T	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>L. soesokkakensis</i> CECT 8367 ^T	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>Ml. aquimaris</i> CECT 8898 ^T	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>Mr. algicola</i> CECT 5396 ^T	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>O. ascidiaceicola</i> CECT 8868 ^T	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>P. marinus</i> CECT 7971 ^T	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>Pa. lutimaris</i> CECT 8525 ^T	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>Pc. litorisediminis</i> CECT 8287 ^T	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>Pd. jejudonensis</i> CECT 8397 ^T	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>Pg. aquimaris</i> CECT 7680 ^T	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>Pl. abyssalis</i> CECT 8504 ^T	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>Pl. marisminoris</i> CECT 7066 ^T	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>Pm. varians</i> CECT 8663 ^T	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>Po. insulae</i> CECT 8812 ^T	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>Pr. insulae</i> CECT 8871 ^T	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>Ps. marinus</i> CECT 7751 ^T	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>Py. aestuarii</i> CECT 9025 ^T	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+

	Regulón OxyR									Regulón SoxRS				
	Catalasa	Peroxidasa	<i>katG</i>	<i>ahpC</i>	<i>gorA</i>	<i>grxA</i>	<i>trxC</i>	<i>dps</i>	<i>fur</i>	SOD	Endo IV	<i>zwf</i>	<i>fumC</i>	<i>acnA</i>
<i>R. aestuarii</i> CECT 7745 ^T	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>Rb. antarcticus</i> CECT 7023 ^T	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>Rb. ekhonensis</i> CECT 7235 ^T	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>Ru. arenilitoris</i> CECT 8715 ^T	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>Ru. litorea</i> CECT 7639 ^T	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>Ru. mediterranea</i> CECT 7615 ^T	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>Ru. meonggei</i> CECT 8411 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>Rv. albus</i> CECT 7450 ^T	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
<i>Rv. gaetbuli</i> CECT 8370 ^T	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>Rv. halotolerans</i> CECT 8110 ^T	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>Rx. jejudonensis</i> CECT 8625 ^T	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>Tr. phthalicus</i> CECT 8649 ^T	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>Y. sediminilitoris</i> CECT 8284 ^T	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+

Dos aspectos interesantes se pueden apreciar en la tabla. El primero, es la gran representación de la catalasa bifuncional con acción peroxidasa (KatG) en comparación con las clásicas enzimas monofuncionales, catalasa (EC 1.11.1.6) y peroxidasa (EC 1.11.1.7) en los genomas de *Rhodobacteraceae*. El segundo, es que la familia de las catalasas parece estar más representada que la familia de las peroxidasas. Estas observaciones sugieren que la protección contra el H₂O₂ podría ser conferida por catalasas en lugar de peroxidasas en bacterias marinas dominantes, lo que contradice los estudios previos de Bernroitner (2009) para las cianobacterias *Synechococcus* y *Synechocystis*, y los de Bengtsson-Palme (2014) para diversas bacterias marinas. Asimismo, en la literatura (Seo *et al.*, 2015) se ha reportado que, bajo condiciones estresantes las enzimas detoxificantes pueden ser insuficientes para proteger a las células de las ROS endógenas y, por tanto, cuando los cambios ambientales elevan la captación de ROS y las tasas de formación intracelular, estos sistemas de defensa basal pueden volverse insuficiente. Sin embargo, este no parece ser el caso para *Rhodobacteraceae* ya que como se observa en la tabla existe una carencia de genes involucrados en la reparación del daño oxidativo (endonucleasa IV y Dps) en comparación con el resto de los genes cuya actividad está relacionada con la prevención frente al estrés oxidativo.

Cabe señalar que la respuesta al estrés oxidativo también conlleva la producción de antioxidantes no enzimáticos, tales como la biosíntesis de ácido ascórbico (vitamina C), glutatión, α -tocoferol (vitamina E) o carotenoides. No obstante, en ninguno de los genomas analizados se han detectado genes codificantes para la vitamina C que detoxifica el H₂O₂, O₂⁻ y el OH⁻, ni para la vitamina E que reprime tanto ¹O₂ como peróxidos (Lesser, 2006). Tampoco se ha encontrado la producción de β -carotenos que sirven como atenuadores de las ROS (Soora *et al.*, 2015). Sin embargo, sí que se han encontrado genes para la biosíntesis de glutatión (glutamato-cisteína ligasa, *gshA*; glutatión sintetasa, *gshB*; glutatión reductasa, *gor*; glutatión peroxidasa, *gpo*) y algunas glutatión transferasas (Tabla 23) en los genomas analizados, sugiriendo posibles roles del glutatión en la reducción del estrés oxidativo en *Rhodobacteraceae* (Tang *et al.*, 2009; Lesser, 2006).

Tabla 23. Exploración de los genes involucrados en la ruta de biosíntesis del glutatión presentes en los genomas de *Rhodobacteraceae*. Abreviaciones: *gshA*, glutamato-cisteína ligasa; *gshB*, glutatión sintetasa; *gor*, glutatión reductasa; *gpo*, glutatión peroxidasa. +, presencia; -, ausencia.

Cepa	<i>gshA</i>	<i>gshB</i>	<i>gor</i>	<i>gpo</i>	Glutatión transferasa
<i>Al. pelagivivens</i> CECT 8811 ^T	+	+	+	-	+
<i>Aq. soesokkakensis</i> CECT 8620 ^T	+	+	+	-	+
<i>As. donghaensis</i> CECT 8599 ^T	+	+	+	+	+
<i>B. aestuarii</i> CECT 8489 ^T	+	+	+	-	+
<i>C. lipolyticum</i> CECT 8621 ^T	+	+	+	-	+
<i>D. aquaemixtae</i> CECT 8626 ^T	+	+	+	-	+
<i>F. marinus</i> CECT 8899 ^T	+	+	+	-	+
<i>L. soesokkakensis</i> CECT 8367 ^T	+	+	+	-	+
<i>Ml. aquimaris</i> CECT 8898 ^T	+	+	+	+	+
<i>Mr. algicola</i> CECT 5396 ^T	+	+	+	-	+
<i>O. ascidiaceicola</i> CECT 8868 ^T	+	+	+	-	+
<i>P. marinus</i> CECT 7971 ^T	+	+	+	-	+
<i>Pa. lutimaris</i> CECT 8525 ^T	+	+	+	-	+
<i>Pc. litorisediminis</i> CECT 8287 ^T	+	+	+	+	+
<i>Pd. jejudonensis</i> CECT 8397 ^T	+	+	+	-	+
<i>Pg. aquimaris</i> CECT 7680 ^T	+	+	+	-	+
<i>Pl. abyssalis</i> CECT 8504 ^T	+	+	+	-	+
<i>Pl. marisminoris</i> CECT 7066 ^T	+	+	+	-	+

Cepa	<i>gshA</i>	<i>gshB</i>	<i>gor</i>	<i>gpo</i>	Glutación transferasa
<i>Pm. varians</i> CECT 8663 ^T	+	+	+	-	+
<i>Po. insulae</i> CECT 8812 ^T	+	+	+	-	+
<i>Pr. insulae</i> CECT 8871 ^T	+	+	+	-	+
<i>Ps. marinus</i> CECT 7751 ^T	+	+	+	-	+
<i>Py. aestuarii</i> CECT 9025 ^T	+	+	+	-	+
<i>Rb. ekhonensis</i> CECT 7235 ^T	+	+	+	+	+
<i>Rs. antarcticus</i> CECT 7023 ^T	+	+	+	+	+
<i>Ru. arenilitoris</i> CECT 8715 ^T	+	+	+	+	+
<i>Ru. litorea</i> CECT 7639 ^T	+	+	+	+	+
<i>Ru. mediterranea</i> CECT 7615 ^T	+	+	+	+	+
<i>Ru. meonggei</i> CECT 8411 ^T	+	+	+	-	+
<i>Rv. aestuarii</i> CECT 7745 ^T	+	+	+	-	+
<i>Rv. albus</i> CECT 7450 ^T	+	+	+	-	+
<i>Rv. gaetbuli</i> CECT 8370 ^T	+	+	+	+	+
<i>Rv. halotolerans</i> CECT 8110 ^T	+	+	+	+	+
<i>Rx. jejudonensis</i> CECT 8625 ^T	+	+	+	+	+
<i>Tr. phthalicicus</i> CECT 8649 ^T	+	+	+	-	+
<i>Y. sediminilitoris</i> CECT 8284 ^T	+	+	+	+	+

▪ **Mecanismos de defensa frente a bajas temperaturas**

La reducción de la temperatura (T^a) provoca a nivel celular una disminución de la fluidez de las membranas celulares, afectando al transporte y a la secreción de proteínas. También provoca una reducción de la eficiencia de los procesos de transducción y transcripción, debido a la estabilización de las estructuras secundarias de DNA y RNA, el plegamiento ineficiente de las proteínas y a que los ribosomas deben adaptarse al frío antes de que puedan funcionar adecuadamente (Phadtare, 2004).

Las bacterias responden a la disminución rápida de la T^a (choque frío), mediante la inducción transitoria de proteínas inducidas por el frío, cuya producción aumenta con la severidad del frío, y que están constituidas por una gran variedad de tipos proteicos, entre los que destacan las proteínas de choque frío (Csp). Las Csp forman una familia altamente conservada de proteínas de unión a ácidos nucleicos, relacionadas estructuralmente, que contrarrestan algunos efectos nocivos de la reducción de la temperatura, ayudando a la célula a adaptarse. Estructuralmente, son pequeñas proteínas (65-75 aminoácidos) con una masa molecular de aproximadamente 7.4 KDa, que contienen el dominio típico de choque frío. Todas se unen a DNA o RNA monocatenario (ssDNA/ssRNA) pero no a DNA bicatenario (dsDNA), y su distribución es muy amplia, habiéndose encontrado en bacterias psicrófilas, mesófilas, termófilas e incluso hipertermófilas (Horn *et al.*, 2007; Beckering *et al.*, 2002).

El primer miembro de la familia Csp descrito fue la proteína CspA aislada de la bacteria mesófila *E. coli* (Goldstein *et al.*, 1990). Más tarde, se ha descubierto que la familia Csp consiste en nueve proteínas homólogas denominadas en orden alfabético CspA – CspI, que actúan como chaperonas del RNA desestabilizando las estructuras secundarias del RNA diana a bajas temperaturas, de modo que se mantienen el estado monocatenario del RNA diana, permitiendo una transcripción y transducción eficiente. Debido a su función de chaperona, las Csp también pueden actuar como antiterminadores de la transcripción al evitar la formación de estructuras en horquilla, que pueden actuar como sitios de terminación de la transcripción o de pausa en el RNA diana a baja temperatura. Aunque estas proteínas se describieron originalmente en conexión con funciones de adaptación al frío, posteriormente también se han relacionado con

roles en el crecimiento normal de la célula, así como la regulación a la adaptación al estrés y las respuestas asociadas a la virulencia en diferentes bacterias (Eshwar, *et al.*, 2017; Keto-Timonen *et al.*, 2016). Recientemente, también se ha demostrado que las Csps pueden amortiguar mutaciones deletéreas, dado que la sobreexpresión de la proteína CspA han mejorado la aptitud de cepas de *E. coli* que habían acumulado mutaciones deletéreas durante experimentos de laboratorio a largo plazo (Rudan *et al.*, 2015). Así estos autores, sugieren que la proteína CspA y otras chaperonas del RNA pueden ayudar a que el RNA plegado de forma incorrecta adopte una conformación funcional y así suprimir las mutaciones dañinas que afectan a la estructura del RNA.

De las proteínas que conforman la familia Csp, solamente 5 (CspA, CspB, CspE, CspG y CspI) son inducidas por el choque frío ya que la proteína CspC participa en la regulación de la expresión de las proteínas de respuesta al estrés RpoS y UspA implicadas en la regulación del crecimiento, la expresión de la proteína CspD se induce por el crecimiento en fase estacionaria y la inanición de nutrientes y su función se relaciona con la formación de esporas, el desarrollo de biofilms y la inhibición de la replicación del DNA. Por último, las proteínas CspC y CspH se expresan a un nivel muy bajo y su función es todavía desconocida (Keto-Timonen *et al.*, 2016). Xia *et al.* (2001) descubrió que de las cinco proteínas inducidas por el frío en *E. coli*, únicamente cuatro (CspA, CspB, CspE y CspG) eran las responsables del fenotipo sensible al frío. Además, descubrió que la ausencia de uno o dos de estos genes, aumentó y prolongó la expresión de los genes inducidos por el frío restantes lo que indica que las funciones de los miembros de la familia Csp se superponen y pueden compensarse entre sí.

La exploración de los genomas a través de la plataforma RAST mostraron que todos los genomas de *Rhodobacteraceae* analizados contenían los genes codificantes para las proteínas de choque al frío CspA y CspB. La única excepción fue el genoma de la cepa *Pd. jejudonensis* CECT 8397^T, en el que solo se halló el gen *cspA* codificante para la proteína CspA. El hallazgo de estos genes, sugiere que los miembros de *Rhodobacteraceae* podrían sobrevivir en un ambiente polar extremadamente frío a través de la expresión de las proteínas inducidas por el frío (Csps). Esta idea queda apoyada por el elevado número de cepas de *Rhodobacteraceae* aisladas a partir de regiones polares, incluyendo hielos marinos (Wagner-Döbler *et al.*, 2006; Selje *et al.*, 2004; Brinkmeyer *et al.*, 2003; Brown & Bowman, 2001; González *et al.*, 2000).

- **Mecanismos de defensa frente a altas temperaturas**

El conjunto de chaperonas y proteasas moleculares constituyen el sistema celular para el plegamiento *de novo* y el control de calidad de las proteínas (Mogk *et al.*, 2003). Este sistema es funcional a temperaturas óptimas de crecimiento, pero se vuelve especialmente importante durante condiciones de estrés producidas por choque térmico, ya que el principal daño celular que produce la exposición a elevadas temperaturas es la desnaturalización y el despliegue de las proteínas celulares (Phadtare, 2004).

El modelo donde mejor se ha estudiado la respuesta al estrés por calor, lo constituye la bacteria *E. coli*. En este organismo, la respuesta al choque térmico está controlada por el factor transcripcional δ^{32} (RpoH), que se une como una subunidad alternativa a la enzima RNA polimerasa, dirigiendo la síntesis de los genes codificantes de proteínas de choque térmico (HSPs). Entre las proteínas que constituyen las HSPs destaca la familia de chaperonas dependientes de ATP, que recibe el nombre de HSP70 (High Shock Protein of 70 KDa). En *E. coli*, la proteína multifuncional HSP70, denominada DnaK, actúa junto a las chaperonas DnaJ y GrpE (en conjunto denominadas como DnaKJE) para asistir al plegamiento, desagregación, selección

y translocación a través de las membranas celulares de las proteínas desnaturalizadas, así como al remodelamiento de los conjuntos proteicos. Además, DnaKJE regula negativamente la respuesta al choque térmico por interacción directa con δ^{32} , al facilitar su degradación por la proteasa FtsH. En este escenario, la proteína DnaK ejerce un importante papel en la respuesta de choque térmico, ya que su asociación con el factor δ^{32} a la T^a óptima de crecimiento impide la formación del complejo RNA polimerasa–factor δ^{32} . Por tanto, la expresión de las HSPs está regulada por un equilibrio homeostático entre la proteína DnaK unida a proteínas desnaturalizadas y DnaK interactuando con el factor transcripcional δ^{32} . Debido a que la proteína DnaK se une preferiblemente a proteínas desnaturalizadas, durante el choque térmico, el factor δ^{32} puede unirse a la RNA polimerasa, comenzando la transcripción específica de los genes de choque térmico, que a su vez aumenta la concentración de HSPs, incluida la de DnaK. En cambio, cuando se vuelve a la T^a óptima de crecimiento, la concentración de proteínas desnaturalizadas es mínima, por lo que las proteínas DnaK libres se unirán al factor δ^{32} , deteniendo así la transcripción de las HSPs (Rodríguez *et al.*, 2008; Seyer *et al.*, 2003).

Todos los genomas analizados presentaron el sistema de protección frente al choque térmico mediado por DnaK, sugiriendo que *Rhodobacteraceae* también es capaz de sobrevivir en ambientes de elevada temperatura como pueden ser las aguas tropicales, subtropicales y los respiraderos hidrotermales, tal y como se ha observado en anteriores publicaciones (Lenk *et al.*, 2012; Giebel *et al.*, 2009; Prabakaran *et al.*, 2007; Buchan *et al.*, 2005; Sleje *et al.*, 2004).

▪ Mecanismos de defensa frente al estrés osmótico

Los entornos marinos están expuestos a condiciones de salinidad variables, producidas por los periodos prolongados de lluvia y sequía, que conducen a un cambio en las condiciones osmóticas externas al generarse gradientes de salinidad. Este cambio provoca un efecto directo e inmediato sobre el volumen celular, y consecuentemente, también sobre la forma y las funciones fisiológicas de la célula. Por tanto, la tolerancia al estrés osmótico es un requisito previo para la supervivencia de aquellos microorganismos que habitan en ambientes de tales características (Rubiano-Labrador *et al.*, 2015; Krämer, 2010).

En muchas proteobacterias, la respuesta al estrés osmótico, concretamente al choque hiperosmótico, presenta dos estrategias generales. La primera de ellas es una respuesta a corto plazo que resulta en una estimulación de la captación intracelular de iones potasio (K^+) que garantiza el mantenimiento de una presión osmótica favorable. Mientras que la segunda estrategia, más a largo plazo, implica la acumulación y/o síntesis de solutos compatibles que, en contraste con los osmolitos iónicos, pueden acumularse en el citoplasma en grandes concentraciones sin alterar las funciones celulares vitales (Yaakop *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2013; Sleator & Hill, 2002). Los mecanismos de absorción de K^+ implicados en la respuesta a corto plazo, los conforman los sistemas de transporte de K^+ de baja afinidad: Ktr, Trk (TrkA, TrkE, TrkG y TrkH) y Kup (o TrkD); así como el sistema de transporte de alta afinidad Kdp (KdpFABCDE). Ninguno de los genomas de *Rhodobacteraceae* analizados presentó estos sistemas de transporte. Sin embargo, todos los genomas contenían dos genes codificantes de las proteínas de absorción de potasio, TrkA y TrkG, del sistema Trk de baja afinidad. Además, el genoma de la cepa *Py. aestuarii* CECT 9025^T presentó de forma incompleta el sistema de transporte Kdp, puesto que solo se halló la presencia de los genes codificantes para las proteínas KdpA, KdpB, KdpC y KdpD. Por el contrario, respecto a la absorción y a la síntesis *de novo* de solutos compatibles, se ha encontrado que todos los genomas presentan los sistemas de absorción de alta afinidad de colina y betaina, codificados por los genes *betT* y *proU*, respectivamente. Por tanto, pueden adquirir ambos compuestos del medio y utilizarlos como osmorreguladores.

Además, tal y como se comentó en el apartado de **Metabolismo de C1** los miembros de *Rhodobacteraceae* contienen también el potencial genético para la síntesis de glicina-betaína y dimetilglicina, ambas moléculas con funciones osmoprotectoras. También son capaces de realizar la síntesis *de novo* de compuestos como el glutamato (glutamato sintasa, EC 1.14.1.13), la glutamina (glutamina sintasa, EC 6.3.1.2) y la prolina (glutamato 5-kinasa (ProB), EC 2.7.2.11; λ -glutamil fosfato reductasa (ProA), EC 1.2.1.41; pirrolina-5-carboxilato reductasa (ProC), EC 1.5.1.2) que constituyen los principales osmorreguladores utilizados por las bacterias para contrarrestar el estrés osmótico. Además, en 8 cepas (dato no mostrado) también se encontraron los genes necesarios para la síntesis de treonina que junto a los compuestos anteriores también puede ser utilizada como osmolito. Estos resultados sugieren que los miembros de *Rhodobacteraceae* no responden al estrés osmótico mediante la activación rápida de los sistemas de transporte de alta y baja afinidad de osmolitos iónicos, sino que prefieren utilizar una estrategia, más favorable a largo plazo, que involucra la acumulación de compuestos orgánicos en el interior citoplasmático que contrarrestan el choque hiperosmótico producido por el aumento de salinidad en el ambiente circundante. Además, todos los genomas también contenían los genes *mdoH* y *mdoG* responsable de la síntesis de los glucanos periplásmicos osmorregulados (OPGs) que protegen la superficie externa de la membrana celular (así como el espacio periplasmático y la membrana externa) de los cambios en las condiciones osmóticas. Estos OPGs son oligosacáridos altamente aniónicos, formados por unidades repetidas de glucosa, que generan un potencial de Donnan a través de la membrana externa, lo que conduce a una acumulación de cationes a una concentración más elevada en el periplasma que en el medio externo, y consecuentemente a un aumento de la presión hidrostática en el espacio periplasmático (Bontemps-Gallo *et al.*, 2016; Sleator & Hill, 2002). Por último, todas las cepas analizadas también presentaron en sus respectivos genomas, genes codificantes de acuaporinas (OmpA), las cuales son canales transmembrana que facilitan de forma específica la entrada y salida de agua, aliviando el estrés osmótico sin dispersar el potencial transmembrana, por lo que no solo juegan un importante papel en la respuesta frente al choque hiperosmótico, sino también frente al choque hipoosmótico.

2.11 Producción de metabolitos secundarios

Es conocido que los miembros del grupo *Roseobacter* tienen un gran potencial para la producción de metabolitos secundarios (Cude *et al.*, 2012; Martens *et al.*, 2007). Estos compuestos son biosintetizados previo y posterior a la fase estacionaria y su función se relaciona con las interacciones ecológicas entre el ambiente y el organismo. Por tanto, en ambientes naturales, estos metabolitos secundarios desempeñan papeles importantes como moléculas señal facilitando la interacción intra- o interespecífica dentro de la comunidad microbiana en relación con la virulencia, colonización, movilidad, respuesta al estrés y/o formación de biofilms. Asimismo, también se ha esclarecido que tienen un papel importante en el descubrimiento de nuevos fármacos. Tal es así, que el 78% de los antibióticos comercializados entre 1982 y 2002 se originaron a partir de estos compuestos naturales (Undabarrena *et al.*, 2017).

Los policétidos (PK) y los péptidos no ribosómicos (NRP) representan una de las clases más grandes de metabolitos secundarios de origen marino con importantes impactos a nivel clínico y ecológico, pudiendo ser utilizados como fuentes de agentes farmacéuticos, agroquímicos y antimicrobianos. Aunque son diferentes a nivel estructural, exhiben importantes semejanzas en sus mecanismos de ensamblaje biosintético. Las policétidos sintasas (PKS) y las péptidos no ribosomales sintasas (NRPS) son grandes enzimas modulares, responsables de la síntesis de los PK y de los NRP, respectivamente. Se originan a partir de clústeres de genes biosintéticos (BCG) y están constituidos por unidades funcionales denominadas módulos. El módulo iniciador comienza la síntesis de una cadena de peptidilo/acilo, que posteriormente se alarga con otros módulos, agregando un solo monómero hasta la liberación final del producto. Dentro de cada módulo, tanto para las NRPS como las PKS, existen al menos tres dominios esenciales: un dominio catalítico para la selección de monómeros, un dominio de proteína transportadora que facilita la unión del monómero después de la tioesterificación y un segundo dominio catalítico responsable del alargamiento de la cadena (Fig. 22). En la biosíntesis de las PKS, estos dominios están representados por una aciltransferasa (AT), una proteína transportadora de acilo (ACP) y una β -cetoacil sintasa (KS). Mientras que los tres dominios centrales que constituyen un módulo funcional en la biosíntesis de los NRPS son un dominio de adenilación (A), una proteína transportadora de peptidilo (PCP) y un dominio de condensación (C). Además, las grandes similitudes a nivel estructural y catalítico entre las PKS y las NRPS, permiten la formación de clústeres híbridos que contienen elementos de cada clase, estos clústeres se conocen como PKS-NRPS híbridos, y proporcionan una mayor variedad de metabolitos secundarios potenciales que pueden ser producidos por los microorganismos (Naughton *et al.*, 2017; Mizuno *et al.*, 2013; Martens *et al.*, 2007).

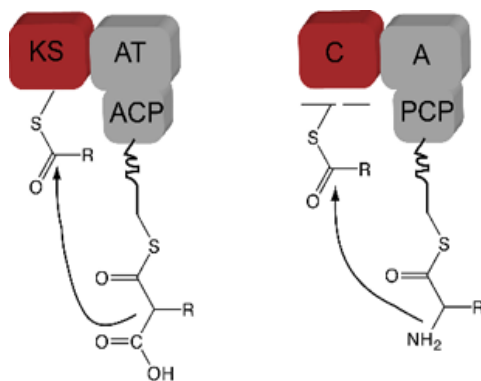


Fig. 22. Dominios de PKS (Izqda.) y NRPS (Dcha.). En las NRPS el dominio A activa un aminoácido específico y lo transfiere a la PCP que se adhiere al péptido en crecimiento como un tioéster. El dominio C forma un enlace peptídico entre el siguiente aminoacilo y la unidad peptidilo. Las PKS se ensamblan a partir de unidades de acilo. La selección de monómeros se realiza mediante los dominios AT y los responsables del paso de elongación son KS. Imagen de www.napdos.ucsd.edu.

Los genomas fueron analizados con herramientas bioinformáticas para la identificación de BGC involucrados en el metabolismo secundario. Las herramientas escogidas fueron AntiSMASH (Weber *et al.*, 2015), NaPDoS (Ziemert *et al.*, 2012), BAGEL4 (Van Heel *et al.*, 2018) y PRISM 3 (Skinnider *et al.*, 2017). AntiSMASH 4.1.0 permite la identificación de BGC de metabolitos secundarios, como PKS de tipo I, II y III, NRPS, y BGC de otros compuestos antimicrobianos. La función de BAGEL4 es detectar CDS de péptidos modificados postransduccionalmente y sintetizados por ribosomas (RIPP) y bacteriocinas (no modificadas). PRISM 3 analiza la presencia de NRPS, PKS, híbridos, y otros productos naturales como: aminocoumarinas, bisindoles, productos naturales que contienen fosfonato y antimetabolitos. Por último, NaPDoS identifica dominios de cetosintasas (dominios KS) y dominios de condensación (dominios C) que pueden predecir la presencia de PKS y NRPS putativas, respectivamente.

El análisis a través de AntiSMASH permitió detectar en los genomas de *Rhodobacteraceae* un total de 193 BCGs involucrados en la síntesis de varios metabolitos secundarios (Tabla S3; Anexo II). El número medio de BCG encontrados por genoma (5) fue similar al obtenido en otros estudios de *Rhodobacteraceae* publicados en la bibliografía (Kanukollu *et al.*, 2016; Rodrigo-Torres *et al.*, 2016b; Machado *et al.*, 2015; Crowley *et al.*, 2014). Algunos artículos (Udwary *et al.*, 2007; Bentley *et al.*, 2002; Omura *et al.*, 2001) han planteado la existencia de una correlación positiva entre el tamaño del genoma y el potencial para la producción de metabolitos secundarios. Sin embargo, en la tabla 4 se puede observar que cepas cuyos genomas presentan tamaños muy diferentes entre sí, contienen un número muy similar de BCG, como por ejemplo las cepas *O. ascidiaceicola* CECT 8868^T y *Ml. aquimaris* CECT 8898^T con tamaños genómicos de 3.2 Mb y 5.3 Mb respectivamente. Este resultado queda reforzado por el estudio de Machado (2015), y muestra que la correlación entre el tamaño del genoma y el metabolismo secundario no es tan clara como se pensaba en un primer momento.

Examinando con más detalle los resultados para los clústeres de metabolitos secundarios se puede apreciar que el clúster más abundante (83 BCG de 193 detectados; 43%) pertenece a la vía de síntesis de moléculas autoinducidas del tipo N-acil homoserina lactonas (AHL). Las AHL son moléculas orgánicas de bajo peso molecular que actúan como mediadoras químicas en los sistemas de *quorum sensing* para regular la expresión génica de diversos fenotipos de una manera dependiente de la densidad de población (Gallardo, 2009). Por tanto, la alta frecuencia de BCG involucrados en la síntesis de AHL encontrados en los genomas analizados, sugiere, tal y como se ha evidenciado en resultados previos de esta tesis, que los miembros de *Rhodobacteraceae* poseen sistemas de QS basados en la molécula señal AHL para relacionarse entre sí. Esto está conforme a la bibliografía (Romero & Otero, 2010) dado que el grupo Roseobacter se ha propuesto como el linaje marino más numeroso de entre las bacterias productoras de AHL en el hábitat marino, al menos dentro de los grupos bacterianos cultivables. El segundo clúster más abundante fue el relacionado con la síntesis de bacteriocinas (30 BCG de 193; 15%). Las bacteriocinas son un grupo de péptidos antimicrobianos sintetizados ribosomalmente que pueden inhibir cepas bacterianas estrechamente relacionadas o no con las bacterias productoras (Rather *et al.*, 2017; Collins *et al.*, 2015).

El análisis con AntiSMASH detectó al menos un clúster de bacteriocina en la mayoría de los genomas estudiados. Sin embargo, cuando los genomas fueron analizados mediante BAGEL4, la presencia de genes relacionados con la síntesis de bacteriocinas se confirmó en

un número menor de cepas (Tabla 24). Probablemente esto es debido a que las herramientas de predicción específicas son más precisas. Por tanto, el resultado obtenido con BAGEL4 probablemente refleje de forma más fiable el contenido de genes relacionados con bacteriocinas que el obtenido mediante AntiSMASH. No obstante, la exploración de las anotaciones obtenidas con RAST mostró que todos los genomas, a excepción de *Pa. lutimaris* CECT 8525^T y *Po. insulae* CECT 8812^T, contenían el gen codificante para la proteína DedE necesaria para la producción de la bacteriocina colicina V que es un antibiótico peptídico secretado por algunas bacterias que inhibe bacterias estrechamente relacionadas, lo que reduce la competencia por nutrientes esenciales (Nazir, 2012). También se encontraron otros genes relacionados con la producción de otros tipos de bacteriocinas (*r1*, *r3*, *r4*, *r5*, *purf*, y *dedA*). Otros clústeres de genes biosintéticos bastante distribuidos entre los genomas de *Rhodobacteraceae* fueron los involucrados en la síntesis de terpenos (28 BCG de 193; 14%) y de ectoína (19 BCG de 193; 10%). El potencial para la síntesis de terpenos está presente en muchos genomas de plantas y hongos, pero recientemente se ha propuesto que también se encuentra ampliamente distribuido por los genomas bacterianos (Yamada *et al.*, 2014), por lo que pueden representar una fuente fructífera de nuevos productos naturales, todavía infravalorados. Por otra parte, la ectoína es un tipo de compuesto orgánico altamente soluble en agua que puede acumularse en la célula sin efectos significativos sobre el metabolismo de la célula, incluso a elevadas concentraciones, por lo que es utilizado como soluto compatible (Gan *et al.*, 2013). Por tanto, la biosíntesis de este compuesto proporciona a *Rhodobacteraceae* una respuesta fisiológica flexible tanto a un entorno de alta salinidad como a cambios osmóticos en aquellos ecosistemas donde la salinidad fluctúe más a menudo (Widderich *et al.*, 2016).

Tabla 24. Potencial para la producción de metabolitos secundarios bioactivos en los genomas de *Rhodobacteraceae*. El análisis se realizó mediante los programas online: AntiSMASH, BAGEL4, NaPDoS y PRISM3. Abreviaciones: PKS, policétidos sintasa; NRPS, péptidos no ribosomales sintasa; PKS-NRPS, híbridos PKS-NRPS; Dominios-KS, dominios β-cetoacil sintasa; dominios-C, dominios condensación.

Cepa	AntiSMASH (hits total)	BAGEL4	NaPDoS		PRISM3			
			Dominios- KS	Dominios- C	PKS	NRPS	PKS- NRPS	Otros
<i>Mr. algicola</i> CECT 5396 ^T	6	0	4	0	1	0	1	1
<i>Rs. antarcticus</i> CECT 7023 ^T	8	2	3	0	1	0	0	1
<i>Pl. marisminoris</i> CECT 7066 ^T	4	0	3	1	1	1	0	1
<i>Rv. albus</i> CECT 7450 ^T	5	1	3	0	1	0	0	0
<i>Ru. litorea</i> CECT 7639 ^T	7	3	4	0	1	0	1	1
<i>Pg. aquimaris</i> CECT 7680 ^T	4	1	4	0	1	0	0	0
<i>Rv. aestuarii</i> CECT 7745 ^T	11	2	5	0	1	0	0	0
<i>Ps. marinus</i> CECT 7751 ^T	4	0	4	0	2	0	0	0
<i>P. marinus</i> CECT 7971 ^T	6	0	3	0	1	0	0	0

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cepa	AntiSMASH (hits total)	BAGEL4	NaPDoS		PRISM3			
			Dominios- KS	Dominios- C	PKS	NRPS	PKS- NRPS	Otros
<i>Rv. halotolerans</i> CECT 8110 ^T	7	1	4	0	1	0	0	0
<i>Pc. litorisediminis</i> CECT 8287 ^T	7	0	3	0	1	0	0	0
<i>L. soesokkakensis</i> CECT 8367 ^T	4	0	4	0	1	0	1	1
<i>Rv. gaetbuli</i> CECT 8370 ^T	6	1	4	0	1	0	1	0
<i>Pd. jejudonensis</i> CECT 8397 ^T	6	0	4	0	1	0	0	0
<i>Ru. meonggei</i> CECT 8411 ^T	5	0	5	0	1	0	0	1
<i>B. aestuarii</i> CECT 8489 ^T	4	0	3	0	1	0	0	0
<i>Aq. soesokkakensis</i> CECT 8620 ^T	4	0	3	1	1	1	0	0
<i>C. lipolyticum</i> CECT 8621 ^T	5	0	6	0	2	0	0	0
<i>Rx. jejudonensis</i> CECT 8625 ^T	6	0	4	0	0	0	1	0
<i>Tr. phthalicus</i> CECT 8649 ^T	6	0	8	0	1	1	0	0
<i>Pm. varians</i> CECT 8663 ^T	6	0	5	0	0	0	1	0
<i>Ru. arenilitoris</i> CECT 8715 ^T	7	1	4	0	1	0	0	0
<i>O. ascidiaceicola</i> CECT 8868 ^T	4	0	4	0	0	0	1	0
<i>Ml. aquimaris</i> CECT 8898 ^T	5	0	4	0	0	0	1	0
<i>F. marinnus</i> CECT 8899 ^T	7	0	6	0	2	0	1	0
<i>Ru. mediterranea</i> CECT 7615 ^T	8	1	4	0	1	1	1	3
<i>Pl. abyssalis</i> CECT 8504 ^T	5	0	5	0	1	0	0	1
<i>As. donghaensis</i> CECT 8599 ^T	4	0	4	0	1	0	0	0
<i>D. aquaemixtae</i> CECT 8626 ^T	4	0	3	0	1	0	0	0
<i>Al. pelagivivens</i> CECT 8811 ^T	2	0	4	0	1	0	0	0
<i>Po. insulae</i> CECT 8812 ^T	4	2	3	0	1	1	0	0
<i>Pr. insulae</i> CECT 8871 ^T	2	0	7	0	1	0	0	1
<i>Y. sediminilitoris</i> CECT 8284 ^T	5	0	3	0	1	0	0	0
<i>Pa. lutimaris</i> CECT 8525 ^T	6	2	7	2	0	1	2	1
<i>Py. aestuarii</i> CECT 9025 ^T	5	0	3	1	0	1	0	0
<i>Rb. ekhonensis</i> CECT 7235 ^T	4	0	6	0	0	0	1	1

Collins (2015) también estudio la capacidad *Rhodobacteraceae* para la producción de metabolitos secundarios mediante el análisis de 12 genomas pertenecientes a tres géneros: *Leisingera*, *Ruegeria* y *Tateyamaria*. Sus resultados mostraron que todos los genomas contenían un clúster génico PKS-NRPS conservado que había sido caracterizado previamente (Martens *et al.*, 2006). Este clúster está formado por cuatro genes: una polipéptido no ribosómico sintasa, una policétido sintasa, una glicosiltransferasa y una fosfopanteteinil transferasa, y parece estar conservado en grupo de Roseobacter. Sin embargo, el análisis realizado por AntiSMASH no identificó ningún híbrido PKS-NRPS, pese a encontrar 23 PKS (17 de clase I y 6 de clase III) y 4 NRPS. No obstante, PRISM 3 sí que detectó la presencia de híbridos PKS-NRPS en el 34% de las cepas (Tabla 24). Esto muestra que el resultado obtenido por una única herramienta de análisis puede no reflejar todo el potencial del organismo a estudio, por lo que es necesario realizar un análisis complementario para asegurar el descubrimiento del potencial bioactivo completo.

El potencial genómico de *Rhodobacteraceae* para el descubrimiento de nuevos productos naturales quedó también reflejado en los resultados obtenidos con NaPDoS, ya que esta plataforma predijo la existencia de clústeres génicos codificantes para un conjunto de 18 clases diferentes de compuestos antibacterianos y antifúngicos (Tabla 25) junto con otros clústeres para la síntesis de ácidos grasos.

Tabla 25. Conjunto total de productos naturales predichos en los genomas de *Rhodobacteraceae* a partir de la herramienta NaPDoS.

Epotilona	Nidamicina
Nistatina	Alquilresorcinol
Avermectina	Dinemicina
Concanamicina	Ascomicina
Picromicina	Tetranomicina
Kromicin	Piramicina
Mixalamida	Megalomicina
Stigmatelina	Bacillibacteina
Candidicina	<i>Heat-stable antifungal factor</i> (H-SAF)

Entre la variedad de metabolitos secundarios producidos por los miembros del grupo Roseobacter destaca la producción de ácido tropodietético o TDA, el cual es producido por organismos como *Silicibacter* sp. TM1040 (Geng *et al.*, 2008), *Ruegeria mobilis* NBRC 101030^T (Sonnenschein *et al.*, 2017a) o *Tritonibacter horizontalis* O3.65^T (Giebel *et al.*, 2016). El TDA es un compuesto antibiótico cuyo esqueleto químico es un anillo aromático de tropolona, siendo altamente significativo ya que los derivados de tropolona, en particular las formas hidroxiladas, son ampliamente consideradas como importantes fuentes de antibacterianos, antifúngicos, antivirales y antiparasitarios (Geng *et al.*, 2008). *Tritonibacter horizontalis* O3.65^T, junto a *Leisingeria aquaemixtae* CECT 8399^T (Rodrigo-Torres *et al.*, 2016b) y *Phaeobacter daeponensis* TF-218^T (Dogs *et al.*, 2013) también producen indigoidina, un pigmento azul antimicrobiano, que se sintetiza a partir de un único clúster génico PKS-NRPS e inhibe a varias bacterias marinas, incluyendo *Vibrio fischeri* (Collins *et al.*, 2015). En ninguno de los genomas analizados se encontró la ruta completa de biosíntesis de

indigoidina (Rodrigo-Torres *et al.*, 2016b) como tampoco se halló el operón *tda* responsable de la producción de TDA y de roseobactericidas; principales compuestos antibacterianos del género *Phaeobacter* (Wang *et al.*, 2016). Este resultado está conforme a la bibliografía puesto que a pesar de que la capacidad de sintetizar TDA ha sido demostrada en varios géneros del grupo Roseobacter, los recientes estudios genómicos han demostrado que la mayoría de los miembros pertenecientes a este grupo carecen de esta vía metabólica (Cude *et al.*, 2012).

2.12 Resistencia a metales y otros elementos tóxicos

▪ Resistencia a metales pesados

Los metales pesados son aquellos elementos metálicos cuya densidad es superior a 5 g/cm³. Se consideran tóxicos debido a su persistencia en la naturaleza, no biodegradabilidad, bioacumulación y biomagnificación a través de la cadena alimentaria (Tutic *et al.*, 2015; Tchounwou *et al.*, 2014). No obstante, también pueden considerarse oligoelementos dada su presencia en concentraciones traza (< 10 ppb) en varias matrices ambientales. Algunos de ellos como el cobalto (Co), cobre (Cu), cromo (Cr), molibdeno (Mo) o el zinc (Zn) son nutrientes esenciales necesarios para diversas funciones bioquímicas y fisiológicas, ya que actúan como cofactores de numerosas enzimas o en varias reacciones redox. Sin embargo, concentraciones elevadas de tales metales, también pueden causar efectos adversos en las células, principalmente por interacción con macromoléculas fundamentales y estrés oxidativo. Otros muchos metales como el aluminio (Al), arsénico (As), cadmio (Cd) o bario (Ba) no tienen funciones biológicas establecidas y son considerados metales no esenciales (Undabarrena *et al.*, 2017; Tchounwou *et al.*, 2014).

Los ecosistemas marinos han sufrido durante los últimos tiempos un incremento exponencial de la contaminación producida por metales pesados, dada la rápida industrialización y desarrollo económico que se ha producido en las regiones costeras durante el último siglo (Qian *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2008). En este contexto, las bacterias marinas han desarrollado diversos mecanismos genéticos de resistencia a estos metales tóxicos; el principal mecanismo de defensa entre los procariontes es la exportación de los cationes metálicos al exterior celular mediante transportadores, siendo también los factores de unión y las transformaciones enzimáticas (oxidación, reducción, metilación y desmetilación) importantes mecanismos de defensa (Hynninen, 2010). Esta capacidad que presentan los microorganismos para eliminar eficientemente los metales pesados junto a su elevada ratio volumen/superficie y a su disponibilidad en grandes cantidades a bajo coste ha provocado que la biorremediación microbiana sea considerada una alternativa de restauración de los ecosistemas acuáticos frente a las técnicas clásicas de remediación, consideradas costosas y menos respetuosas con el medio ambiente (Li *et al.*, 2017a).

La mayor parte de las cepas analizadas en el presente estudio han sido aisladas de regiones costeras de Corea del Sur donde más del 40% de la industria nacional se encuentra concentrada a lo largo de la costa del país (Ra *et al.*, 2013). Por ello, se ha investigado la posible resistencia y consecuentemente su uso potencial en aplicaciones de biorremediación de las cepas objeto de estudio al As, Cu, Co, Zn, Cd, Cr y mercurio (Hg), dado que son los metales tóxicos más comunes.

Resistencia al arsénico

El As puede provenir tanto de fuentes naturales como antropogénicas, constituyendo así uno de los principales contaminantes de los ecosistemas acuáticos en todo el mundo (Kurth *et al.*, 2017). En la naturaleza se puede encontrar en cuatro estados de oxidación: arseniato (As⁵⁺), arsenito (As³⁺), arsénico elemental (As⁰) y arseniuro (As³⁻). Las dos primeras formas constituyen las formas del arsénico más comunes y tóxicas en la naturaleza, mientras que las dos últimas son más difíciles de encontrar.

La resistencia/tolerancia microbiana al As viene codificada por los genes de resistencia al As, los cuales se agrupan en el operón *ars* y están implicados en la reducción del As^{5+} a As^{3+} a través de la enzima arseniato reductasa y la posterior expulsión del As^{3+} al exterior por una bomba de expulsión del arsénico (Montoya *et al.*, 2015). Este operón se ha encontrado en casi todas las especies bacterianas secuenciadas hasta el momento, presenta una localización muy variada, pudiendo ser codificado tanto en regiones cromosómicas como en plásmidos y además aparece co-transcrito en una gran variedad de configuraciones genéticas, dependiendo de cada cepa específica (Wang *et al.*, 2009). Pese a ello, los constituyentes mínimos del operón *ars* son normalmente un represor transcripcional (ArsR) que responde al As^{3+} , un complejo de oxidación-translocación (ArsAB) donde ArsA funciona como una ATPasa estimulada por el As^{3+} , mientras que la permeasa de eflujo de As^{3+} (ArsB) funciona como una bomba de expulsión del arsenito citoplasmático. La proteína ArsB también puede funcionar sin ArsA junto a una arseniato reductasa citoplasmática (ArsC) que reduce el As^{5+} a As^{3+} para su posterior expulsión. Además, a este operón siempre se le encuentra asociada una metalchaperona de As^{3+} (ArsD) que parece ser una adaptación que aumenta la capacidad de extrusión de ArsB, incrementando por tanto la resistencia al arsénico de aquellos organismos que la presenten (Yang & Rosen, 2016).

Un segundo sistema enzimático para la resistencia al arsénico, encontrado en un gran número de bacterias, es la enzima arsenito oxidasa (EC 1.20.9.1) responsable de la oxidación del As^{3+} a As^{5+} . En este sistema están involucrados los genes *aioA* y *aioB*, codificantes de la subunidad grande catalítica molibdopterina y la subunidad pequeña de tipo Rieske de la enzima arsenito oxidasa (AioAB), respectivamente (Teoh *et al.*, 2017).

Tabla 26. Presencia de genes implicados en la resistencia al arsénico en los genomas de *Rhodobacteraceae* analizados. Abreviaciones: *arsR*, represor transcripcional; *arsA*, ATPasa; *arsB/ACR3*, transportador de eflujo; *arsC*, arseniato reductasa; *arsD*, metalchaperona de arsenito; *arsH*, proteína de resistencia al arsénico ArsH; *aioAB*, arsenito oxidasa. +, presencia; -, ausencia.

	<i>arsR</i>	<i>arsA</i>	<i>arsB/ACR3</i>	<i>arsC</i>	<i>arsD</i>	<i>arsH</i>	<i>aioAB</i>
<i>Al. pelagivivens</i> CECT 8811 ^T	+	-	+	+	-	-	-
<i>Aq. soesokkakensis</i> CECT 8620 ^T	+	-	+	+	-	+	-
<i>As. donghaensis</i> CECT 8599 ^T	+	-	-	+	-	+	-
<i>B. aestuarii</i> CECT 8489 ^T	+	-	+	+	-	-	-
<i>C. lipolyticum</i> CECT 8621 ^T	+	-	+	+	-	-	-
<i>D. aquaemixtae</i> CECT 8626 ^T	+	-	-	+	-	-	-
<i>F. marinus</i> CECT 8899 ^T	+	-	-	+	-	+	-
<i>L. soesokkakensis</i> CECT 8367 ^T	+	-	+	+	-	+	-
<i>Ml. aquimaris</i> CECT 8898 ^T	+	-	+	+	-	-	-
<i>Mr. algicola</i> CECT 5396 ^T	+	-	+	+	-	+	-
<i>O. ascidiaceicola</i> CECT 8868 ^T	+	-	-	+	-	+	-
<i>P. marinus</i> CECT 7971 ^T	+	-	+	+	-	+	-
<i>Pa. lutimaris</i> CECT 8525 ^T	+	-	+	+	-	+	-
<i>Pc. litorisediminis</i> CECT 8287 ^T	+	-	+	+	-	+	+
<i>Pd. jejudonensis</i> CECT 8397 ^T	+	-	-	+	-	+	-
<i>Pg. aquimaris</i> CECT 7680 ^T	+	-	+	+	-	+	-
<i>Pl. abyssalis</i> CECT 8504 ^T	+	-	+	+	-	+	-
<i>Pl. marisminoris</i> CECT 7066 ^T	+	-	+	+	-	+	-
<i>Pm. varians</i> CECT 8663 ^T	+	-	-	+	-	-	+
<i>Po. insulae</i> CECT 8812 ^T	+	-	-	-	-	+	-
<i>Pr. insulae</i> CECT 8871 ^T	+	-	-	-	-	-	-
<i>Ps. marinus</i> CECT 7751 ^T	+	-	+	+	-	-	-

	<i>arsR</i>	<i>arsA</i>	<i>arsB/ACR3</i>	<i>arsC</i>	<i>arsD</i>	<i>arsH</i>	<i>aioAB</i>
<i>Py. aestuarii</i> CECT 9025 ^T	-	-	+	+	-	-	-
<i>Rb. ekhonensis</i> CECT 7235 ^T	+	-	+	+	-	+	-
<i>Rs. antarcticus</i> CECT 7023 ^T	+	-	-	+	-	-	-
<i>Ru. arenilitoris</i> CECT 8715 ^T	+	-	+	+	-	-	-
<i>Ru. litorea</i> CECT 7639 ^T	+	-	-	+	-	+	-
<i>Ru. mediterranea</i> CECT 7615 ^T	+	-	-	+	-	+	-
<i>Ru. meonggei</i> CECT 8411 ^T	+	-	+	+	-	-	-
<i>Rv. aestuarii</i> CECT 7745 ^T	+	-	-	+	-	-	-
<i>Rv. albus</i> CECT 7450 ^T	+	-	-	+	-	+	-
<i>Rv. gaetbuli</i> CECT 8370 ^T	+	-	+	+	-	-	+
<i>Rv. halotolerans</i> CECT 8110 ^T	+	-	+	+	-	+	-
<i>Rx. jejudonensis</i> CECT 8625 ^T	+	-	+	+	-	-	-
<i>Tr. phthalicus</i> CECT 8649 ^T	+	-	-	+	-	-	-
<i>Y. sediminilitoris</i> CECT 8284 ^T	+	-	+	+	-	-	-

La mayor parte de las cepas analizadas (61%; 22 de 36) son capaces de llevar a cabo la reducción del As⁵⁺ a As³⁺ y su posterior eliminación (Tabla 26), dado que sus genomas contienen el gen codificante para la arseniato reductasa (*arsC*) y pese a no hallarse el gen *arsB* codificante para el transportador de eflujo del arsenito, sí que se encontró el gen de la familia de transportadores del arsenito ACR3, que realiza la misma función que *ArsB*. Esto era de esperar ya que se ha observado que existe una clara prevalencia de los genes *arsB* en *Firmicutes* y *Gammaproteobacteria*, mientras que ACR3 se encuentra mayoritariamente distribuido en *Actinobacteria* y *Alphaproteobacteria* (Achour *et al.*, 2007). Las demás cepas, excepto *Po. insulae* CECT 8812^T y *Pr. insulae* CECT 8871^T, también presentaron el gen *arsC*, por lo que podrían reducir el As⁵⁺ a As³⁺, pero carecían de los genes codificantes para los transportadores de eflujo del arsenito.

También se detectó la capacidad de oxidar el arsenito en los genomas de *Rhodobacteraceae*, ya sea por acción de la arseniato oxidasa (AioAB) o por acción de la proteína *ArsH* que se ha visto que es capaz de oxidar los compuestos arseniales orgánicos tóxicos (MA III) hacia formas pentavalentes no tóxicas (MA V) (Yang & Rosen, 2016; Chen *et al.*, 2015). Asimismo, en 7 cepas (dato no mostrado) se detectó el gen *arsM* codificante para la enzima S-adenosilmetionina metiltransferasa, responsable de la metilación del As³⁺ a trimetilarsina volátil, contribuyendo también a la detoxificación del arsénico en bacterias.

Estos resultados sugieren que los miembros de *Rhodobacteraceae* pueden ser capaces de resistir el arsénico, pudiendo ser de especial interés en la biorremediación de aguas residuales contaminadas por arsénico dado su capacidad de transformar el arsénico, y en particular por su capacidad de oxidar el As³⁺ (Chaturvedi *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012b).

Resistencia al mercurio

El Hg es uno de los metales pesados más tóxicos debido a su alta afinidad por los grupos sulfhídricos de los aminoácidos que, al unirse a ellos, produce un cambio en la estructura proteica y a menudo una pérdida de la función (Boyd & Barkay, 2012). En los ecosistemas marinos, el mercurio se deposita en los sedimentos, donde es metilado (MeHg) por bacterias anaerobias, y posteriormente bioacumulado y biomagnificado a través de la cadena trófica produciendo graves consecuencias para la salud humana y ambiental (Dranguet *et al.*, 2017).

Al igual que ocurre con el As, el Hg también puede derivar tanto de fuentes antropogénicas como naturales, pudiéndose encontrar en varias formas químicas: mercurio en estado de oxidación cero (Hg^0) en forma de líquido o vapor; estado mercurioso (Hg_2^{2+}) en forma de sales inorgánicas; y estado mercúrico (Hg^{2+}) como compuestos de sales inorgánicas o compuestos organomercuriales, siendo el estado más tóxico para los seres vivos (Mahbub *et al.*, 2016).

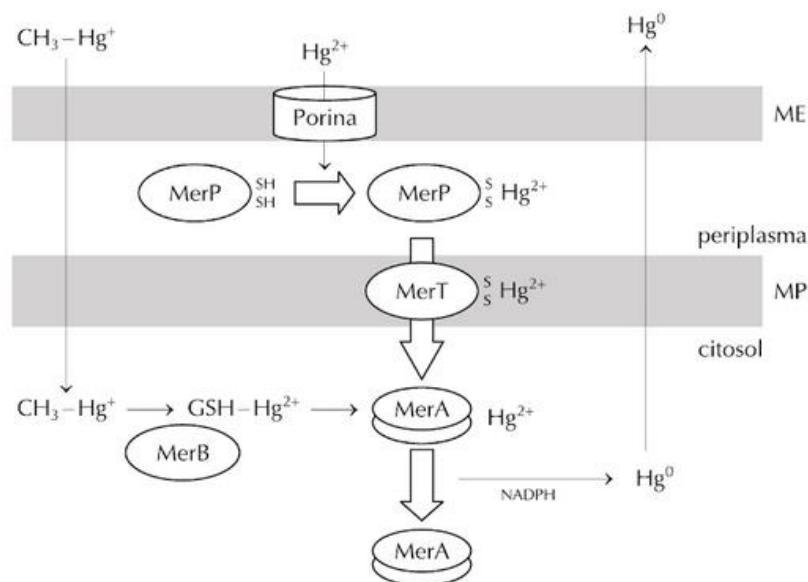


Fig. 23. Mecanismo molecular de la resistencia a mercurio en bacterias Gram negativas. Abreviaciones: ME; membrana externa; MP, membrana plasmática; GSH, glutatión reducido. Adaptación Castillo (2005).

Algunas bacterias y arqueas aerobias han desarrollado mecanismos de resistencia que funcionan degradando los compuestos organomercuriales o reduciendo las concentraciones locales de mercurio inorgánico (Hg^{2+}) a mercurio gaseoso (Hg^0) que, dado la elevada presión de vapor y su baja solubilidad en agua, será vaporizado de la célula. El sistema de resistencia al Hg está codificado por el operón *mer* formado por la enzima mercurio reductasa (MerA), una flavina oxidorreductasa dependiente de la reducción de Hg^{2+} a su forma elemental Hg^0 (Freedman *et al.*, 2012). El operón también puede codificar para una liasa organomercuríca (MerB) que cataliza la ruptura de los enlaces Hg-C de los compuestos orgánicos generando Hg^{2+} y su correspondiente residuo orgánico. Por ello, la acción combinada de MerAB genera un mecanismo de detoxificación del Hg de amplio espectro (Lu *et al.*, 2016). Asimismo, el operón también codifica para una proteína periplasmática (MerP) y una o varias proteínas de membrana interna (MerT, MerC, MerE, MerF, MerG) que transportan el Hg^{2+} al citoplasma donde es reducido por acción de MerA (Fig. 23). La expresión global del operón está regulada por MerR, actuando como represor transcripcional o activador en ausencia o presencia de Hg^{2+} , respectivamente. Y, por último, varias proteobacterias codifican también la proteína MerD que regula negativamente la expresión del operón (Boyd & Barkay, 2012).

Tabla 27. Predicción del operón *mer*, de resistencia al mercurio, en los genomas de *Rhodobacteraceae*. Abreviaciones: *merR*, regulador transcripcional; *merA*, mercurio reductasa;

merP, proteína de transporte periplasmática; *merT* y *merC*, proteínas de transporte de membrana; *merD*, regulador transcripcional negativo. +, presencia; -, ausencia.

	<i>merR</i>	<i>merA</i>	<i>merP</i>	<i>merT</i>	<i>merC</i>	<i>merD</i>
<i>Al. pelagivivens</i> CECT 8811 ^T	-	+	-	-	-	-
<i>Aq. soesokkakensis</i> CECT 8620 ^T	-	-	-	-	-	-
<i>As. donghaensis</i> CECT 8599 ^T	+	+	-	-	-	-
<i>B. aestuarii</i> CECT 8489 ^T	-	+	-	-	-	-
<i>C. lipolyticum</i> CECT 8621 ^T	+	+	-	-	-	-
<i>D. aquaemixtae</i> CECT 8626 ^T	-	-	-	-	-	-
<i>F. marinus</i> CECT 8899 ^T	-	+	-	-	-	-
<i>L. soesokkakensis</i> CECT 8367 ^T	-	+	-	+	-	-
<i>Ml. aquimaris</i> CECT 8898 ^T	-	+	+	+	-	-
<i>Mr. algicola</i> CECT 5396 ^T	+	+	-	+	-	-
<i>O. ascidiaceicola</i> CECT 8868 ^T	+	+	-	-	-	-
<i>P. marinus</i> CECT 7971 ^T	-	+	-	-	-	-
<i>Pa. lutimaris</i> CECT 8525 ^T	+	-	-	-	-	-
<i>Pc. litorisediminis</i> CECT 8287 ^T	-	+	-	-	-	-
<i>Pd. jejudonensis</i> CECT 8397 ^T	+	+	-	-	-	-
<i>Pg. aquimaris</i> CECT 7680 ^T	-	+	+	+	-	-
<i>Pl. abyssalis</i> CECT 8504 ^T	-	+	-	+	-	-
<i>Pl. marisminoris</i> CECT 7066 ^T	-	+	-	-	-	-
<i>Pm. varians</i> CECT 8663 ^T	-	+	-	-	-	-
<i>Po. insulae</i> CECT 8812 ^T	+	+	-	-	-	-
<i>Pr. insulae</i> CECT 8871 ^T	-	+	-	-	-	-
<i>Ps. marinus</i> CECT 7751 ^T	-	-	-	-	-	-
<i>Py. aestuarii</i> CECT 9025 ^T	-	+	-	-	-	-
<i>Rb. ekhonensis</i> CECT 7235 ^T	-	+	+	+	-	-
<i>Rs. antarcticus</i> CECT 7023 ^T	-	+	+	+	-	-
<i>Ru. arenilitoris</i> CECT 8715 ^T	-	+	-	-	-	-
<i>Ru. litorea</i> CECT 7639 ^T	-	+	-	-	-	-
<i>Ru. mediterranea</i> CECT 7615 ^T	-	+	-	-	-	-
<i>Ru. meonggei</i> CECT 8411 ^T	-	+	-	-	-	-
<i>Rv. aestuarii</i> CECT 7745 ^T	-	+	-	-	-	-
<i>Rv. albus</i> CECT 7450 ^T	-	+	-	-	-	-
<i>Rv. gaetbuli</i> CECT 8370 ^T	-	+	-	-	-	-
<i>Rv. halotolerans</i> CECT 8110 ^T	+	+	-	-	-	-
<i>Rx. jejudonensis</i> CECT 8625 ^T	-	+	-	-	-	-
<i>Tr. phthalicus</i> CECT 8649 ^T	-	+	-	+	-	-
<i>Y. sediminilitoris</i> CECT 8284 ^T	-	+	-	-	-	-

Todos los genomas analizados, a excepción de *Aq. soesokkakensis* CECT 8620^T, *Ps. marinus* CECT 7751^T, *D. aquaemixtae* CECT 8626^T y *Pa. lutimaris* CECT 8525^T, contienen el gen *merA* codificante para la mercurio reductasa (Tabla 27). Sin embargo, en ninguno de ellos se halló el gen codificante para la liasa organomercuríca (MerB) responsable de la degradación de los compuestos orgánicos de mercurio, esto implica que los genomas de *Rhodobacteraceae* no contienen el operón *mer* de amplio espectro que confiere resistencia a diferentes compuestos organomercuriales como puede ser el metilmercurio.

Por otro lado, de todas las cepas en las que se encontró el gen *merA* (80%, 32 de 36) únicamente cuatro: *Rs. antarcticus* CECT 7023^T, *Pg. aquimaris* CECT 7680^T, *Ml. aquimaris* CECT 8898^T y *Rb. ekhonensis* CECT 7235^T contenían el operón *mer* de espectro limitado en sus genomas, otorgándoles la capacidad de detoxificar Hg²⁺ (y, en algunos casos, un número

limitado de organomercuriales) al presentar tanto los genes requeridos para la enzima mercurio reductasa como los genes codificantes (*merT* y *merP*) para las proteínas transportadoras de Hg^{2+} desde el medio externo hasta el interior celular.

Estos resultados sugieren que entre los miembros de *Rhodobacteraceae*, pese a no poseer un mecanismo de detoxificación de mercurio de amplio espectro, algunas cepas sí son capaces de transformar las formas iónicas o inorgánicas del mercurio a formas menos tóxicas, como es el mercurio elemental, pudiendo ser absorbido e inmovilizado más fácilmente, por lo que podrían ofrecer una posible aplicación para la biorremediación de aguas residuales contaminadas con mercurio.

Resistencia al cobalto, zinc y cadmio

Tanto el Zn como el Co están involucrados en una amplia variedad de procesos celulares, siendo necesarios para el mantenimiento estructural de las macromoléculas y como cofactores de una amplia variedad de enzimas implicadas en diversas rutas metabólicas. No obstante, un exceso en las concentraciones intracelulares de dichos metales puede provocar efectos adversos en la célula por inhibición de la cadena respiratoria o interacción con enzimas (Yazdankhah *et al.*, 2014; Ranquet *et al.*, 2007). Por el contrario, el Cd no desempeña ninguna función biológica, por lo que está considerado un elemento no esencial, siendo tóxico en niveles muy pequeños tanto en procariotas como en eucariotas (Hu *et al.*, 2007).

La principal estrategia usada por los procariotas, para evitar el daño por las altas concentraciones de dichos cationes metálicos, reside en la utilización de proteínas transportadoras o quelantes de metales. Se han identificado tres sistemas principales de exportación (Fig. 24): I) los facilitadores de difusión de cationes (CDF) que actúan como intercambiadores de H^+ quimiosmóticos; II) las ATPasas de tipo P que atraviesan la membrana interna y usan ATP para bombear los iones metálicos del citoplasma al periplasma y; III) los transportadores de tres componentes CBA (también conocidos como RND), que actúan como antiportes quimiosmóticos (Hynninen, 2010).

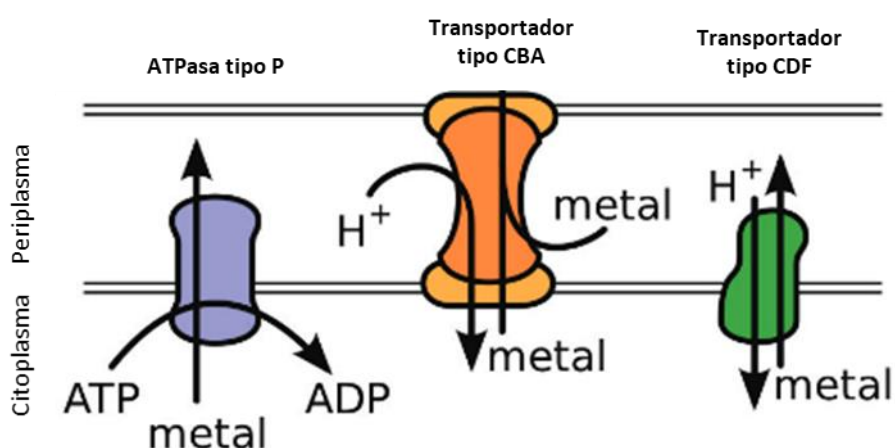


Fig. 24. Principales familias de transportadores involucrados en la resistencia a metales pesados. Las ATPasas de tipo P bombean sus sustratos del citoplasma al periplasma utilizando la energía proporcionada por la hidrólisis del ATP. Los transportadores CBA son complejos de tres componentes que abarcan toda la pared celular de las bacterias Gram negativas y expulsan iones del citoplasma y periplasma al exterior usando un gradiente quimiosmótico. Los transportadores CDF son impulsados

por una fuerza motriz de protones y expulsan los iones metálicos del citoplasma al periplasma. Adaptación de Hynninen (2010).

Las ATPasas de tipo P son proteínas integrales de membrana que utilizan energía derivada de la hidrólisis del ATP para transportar una gran variedad de iones metálicos a través de las bicapas lipídicas (Smith *et al.*, 2017). Los miembros de la familia CDF generalmente transportan Zn, pero al igual que las ATPasas también pueden expulsar otros iones, como el Cd, Co, níquel o incluso hierro, en este caso utilizando la fuerza motriz protón (Zeytuni *et al.*, 2014). Ambos tipos deben asociar su función con proteínas de la membrana externa (porinas) para lograr expulsar de forma eficiente el sustrato tóxico hasta el exterior celular. Por último, los transportadores CBA se localizan en la membrana interna asociados a una pareja de polipéptidos auxiliares: una proteína que pertenece a la familia de factores de membrana externa y una segunda proteína miembro de la familia de proteínas adaptadoras periplasmáticas que une la membrana interna con la externa. Estas tres proteínas forman un complejo de proteína de eflujo que permite expulsar directamente los iones metálicos desde el citoplasma, la membrana citoplasmática o el periplasma, a través de la membrana externa directamente al exterior (Leedjäv *et al.*, 2008; Nies, 2003). Con respecto a su distribución, los transportadores CBA solo se encuentran en unas pocas bacterias Gram negativas, las ATPasas se encuentran ampliamente distribuidas en plantas y bacterias, mientras que los transportadores CDF forman una familia ubicua de proteínas que se encuentran en todos los filos principales de organismos vivos, ya que estos dos últimos forman parte de un sistema de homeostasis celular y de ahí su amplia distribución (Kolaj-Robin *et al.*, 2015)

Como era de esperar debido a su limitada distribución, ninguno de los genomas analizados de *Rhodobacteraceae* presentó transportadores de tipo CBA, ya que carecían de los genes *czcABC* que constituyen el modelo mejor estudiado de transportadores de tipo CBA, interviniendo en la resistencia de alto nivel frente a los cationes Cd^{2+} , Zn^{2+} y Co^{+} (Munkelt *et al.*, 2004). Tampoco se encontraron ATPasas de tipo P. Por el contrario, en todos los genomas, menos en *Rv. aestuarii* CECT 7745^T, se halló la presencia del gen *czcD*, primer miembro caracterizado de la familia de transportadores CDF, codificante para un antiportador divalente de metales/ H^{+} que posee una amplia especificidad de sustratos metálicos y que desempeñan papeles importantes en la homeostasis intracelular de metales en bacterias (Martin & Giedroc, 2016). Aunque no hay muchas referencias en la literatura sobre la resistencia de *Rhodobacteraceae* a los metales pesados a través del sistema *CzcD*, también se ha encontrado en algunos miembros de la familia, como *Roseobacter litoralis* (Kalhoefer *et al.*, 2011) sugiriendo que los transportadores de tipo CDF pueden ser el principal mecanismo de resistencia frente a algunos metales pesados como son el zinc, cadmio, cobalto, níquel y hierro.

Resistencia al cobre

El Cu es un oligoelemento esencial para la mayoría de los organismos vivos, conociéndose más de 30 tipos de proteínas que lo utilizan como cofactor. Además, es necesario para muchos procesos celulares fundamentales como son la fosforilación oxidativa, la fotosíntesis o el control de radicales libres (Li *et al.*, 2015). Sin embargo, en concentraciones elevadas es un compuesto tóxico debido a que degrada los grupos Fe-S de las enzimas deshidratadas a través del desplazamiento del Fe, lo que causa la inactivación de estas enzimas. Y, además, el Fe liberado de estos grupos, puede desencadenar posteriormente la

reacción de Fenton que conduce a la producción de daño oxidativo dentro de la célula (Macomber & Imlay, 2009).

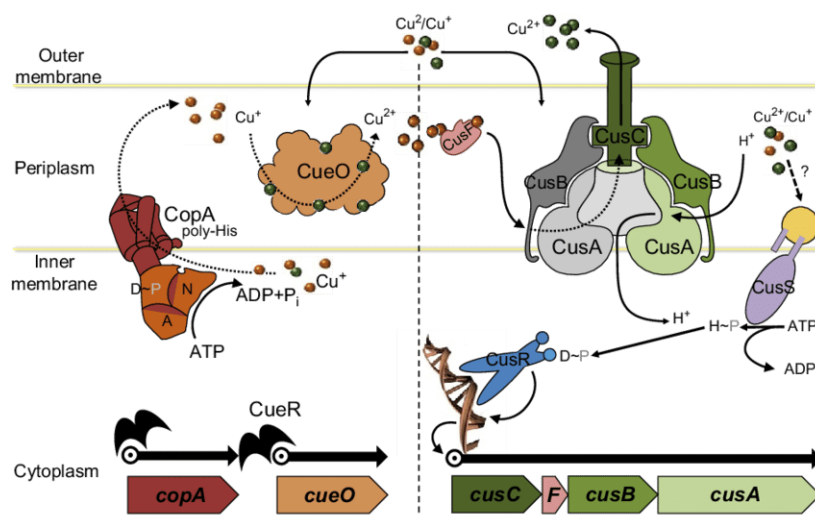


Fig. 25. Los mecanismos homeostáticos de cobre detoxifican la célula, utilizando los sistemas cromosómicos de eflujo de cobre; *cus-cue*. El cobre probablemente penetre en la célula a través de porinas (OmpC y OmpF), y entre en el citoplasma. CopA es una ATPasa tipo P de translocación de Cu⁺ y CueO una oxidasa multicobre. La expresión de *copA* y *cueO* es activada por CueR, un regulador de la familia MerR. CusCFBA forma una bomba de eflujo de cobre de cuatro componentes en la que CusF es una metalchaperona de unión al Cu⁺ y CusCBA forma un complejo de eflujo de la familia CBA. La transcripción de estas proteínas está regulada por CusS, una histidina quinasa que detecta el cobre y posteriormente fosforila a *cusR*, un regulador de respuesta. Figura obtenida de Pal *et al.* (2017).

Para mantener la homeostasis del cobre y prevenir su toxicidad, las bacterias han desarrollado dos sistemas reguladores sensibles al Cu (Fig. 25) El primero es un sistema de transducción de señales de dos componentes designado como *Cu-sensing* o locus *cus*. En este locus, los genes *cusRS* constituyen un regulador transcripcional que activa unos genes adyacentes pero transcritos de manera divergente, *cusCFBA*, los cuales codifican un complejo de eflujo antiporte de H⁺/cationes implicados en la exportación de iones metálicos, xenobióticos y fármacos, y que abarca ambas membranas. En este locus también se encuentra el gen *cusF* que codifica para una chaperona de unión al Cu periplasmático, actuando junto a CusCFBA para excretar el Cu desde el citoplasma y el periplasma (Shafeeq *et al.*, 2011; Rensing & Grass, 2003). En ninguno de los genomas analizados se encontraron genes pertenecientes al operón *cus*, y por tanto a este sistema regulador. El segundo sistema regulador sensible al Cu, denominado *cue* (Cu eflujo) y que está regulado por *cueR*, un activador transcripcional inducido por Cu y que regula dos genes; *copA*, una ATPasa de tipo P, que transloca el cobre desde el citoplasma hasta el periplasma, y; *cueO*, una multicobre oxidasa que detoxifica el periplasma del exceso de cobre oxidando diferentes substratos. Primero CueO oxida el Cu⁺ a Cu²⁺, menos tóxico, y en segundo lugar oxida la enterobactina siderofica, evitando la reducción mediada por la enterobactina de Cu²⁺ a Cu⁺. Además, se cree que la enterobactina forma polímeros quelantes del cobre en el periplasma (Resing & Grass, 2003). Todos los genomas de *Rhodobacteraceae* presentaron el gen codificante para la ATPasa de tipo P translocante de Cu. Se encontró también, el gen necesario para la enzima multicobre oxidasa (CueO) en todos los genomas, excepto en seis cepas; *Pd. jejundonensis* CECT 8397^T, *Aq. soesokkakensis* CECT 8620^T, *O. ascidiaceicola* CECT

8868^T, *F. marinus* CECT 8899^T, *Py. aestuarii* CECT 9025^T y *Pr. insulae* CECT 8871^T, sugiriendo que el principal mecanismo para controlar la homeostasis de cobre en *Rhodobacteraceae* es el sistema *cue*. En los genomas también se encontraron otros genes implicados en los niveles de resistencia al cobre, como son el gen *cutE*, codificante para una apolipoproteína N-aciltransferasa que puede funcionar en la acilación de otras apolipoproteínas requeridas para la tolerancia al Cu, o el gen *corC* para el que se ha demostrado recientemente que es crucial para la resistencia al Cu⁺ y Zn²⁺ (Vaccaro *et al.*, 2016).

Resistencia a los compuestos cromados

El Cromo (Cr) puede derivar de fuentes naturales como son las erupciones volcánicas, incendios forestales o la meteorización. Sin embargo, la mayor contribución a la deposición de Cr en la biosfera es el resultado de diversas actividades antropogénicas (Vitti *et al.*, 2014). Al igual que los anteriores metales, el cromo existe en diferentes estados de oxidación, pero las dos formas más estables en la naturaleza son su forma hexavalente (Cr⁶⁺) y su forma trivalente (Cr³⁺). El Cr⁶⁺ es soluble en agua y altamente tóxico para la mayoría de los organismos, debido a su alto poder de oxidación. Usualmente se encuentra en forma de iones cromato (CrO₄²⁻) o dicromato (Cr₂O₇²⁻) que pueden atravesar fácilmente las membranas biológicas, incrementando así su peligrosidad. Por el contrario, el Cr³⁺ es menos tóxico, y forma óxidos e hidróxidos insolubles por encima de pH 5 siendo impermeable a las membranas biológicas (Pal & Paul, 2004).

La resistencia microbiana al cromo se consigue principalmente por dos mecanismos: I) la extrusión de iones CrO₄²⁻ del citoplasma celular mediante un sistema de eflujo específico, disminuyendo así la concentración intracelular y; II) la reducción directa del Cr⁶⁺ a Cr³⁺ a través de una flavinamononucleótido reductasa (FMN) dependiente de NADPH. La expulsión de los iones CrO₄²⁻ hacia el exterior celular, es realizada por el transportador de membrana de cromato, ChrA. Esta proteína está codificada por el operón de resistencia al cromato (operón *chr*) que codifica también para la proteína reguladora ChrB junto a las proteínas ChrC y ChrF, que parecen ser superóxidos dismutasas putativas. Respecto a la capacidad de reducción de la forma hexavalente a la trivalente, se han identificado varios genes que parecen llevar a cabo dicha reacción, como son los genes codificantes para las proteínas ChrR de *Pseudomonas putida*, YieF de *E. coli* y ChrT de *Serratia* sp. CQMUS2, siendo todas ellas miembros de la familia de proteínas FMN (Deng *et al.*, 2015; Branco & Morais, 2013).

En ninguno de los genomas analizados se encontraron genes relacionados con la reducción del Cr⁶⁺ al Cr³⁺. Sin embargo, todos salvo *P. marinus* CECT 7971^T, *Aq. soesokkakensis* CECT 8620^T, *B. aestuarii* CECT 8489^T y *F. marinus* CECT 8899^T, presentaron el gen *chrA* codificante del transportador de cromato que parece ser el principal mecanismo de tolerancia/resistencia al cromo en *Rhodobacteraceae*.

En general, los resultados obtenidos a través del estudio de los diferentes metales pesados, nos informan que los sistemas de eflujo son de vital importancia en *Rhodobacteraceae* para mantener el equilibrio quimiosmótico y controlar la toxicidad que dicho metales pueden causar. También se ha puesto en evidencia, el posible uso potencial que podrían tener algunas cepas de *Rhodobacteraceae* en biorremediación de metales pesados.

- **Resistencia a antimicrobianos**

Numerosos estudios han indicado que la presencia de resistencia a metales pesados contribuye a incrementar la resistencia a compuestos antimicrobianos (Pal *et al.*, 2017; Knapp *et al.*, 2016; Oves & Hussain, 2016) debido a que esta última resistencia no se produce solo por la presión selectiva causada por los antibióticos, sino también por los contaminantes que promueven la diseminación de elementos genéticos mediante procesos de resistencia cruzada y co-resistencia. Esta hipótesis queda avalada por los resultados obtenidos en la presente tesis, donde se ha observado que todas las cepas a estudio parecen ser resistentes a la acción de β -lactámicos y a la fosfomicina, mediante la utilización de enzimas que inactivan los fármacos y que utilizan metales como cofactores.

Resistencia a los β -lactámicos

Los β -lactámicos son un grupo de antibióticos entre los que se incluyen, derivados de la penicilina, cefalosporina, cefamicina, monobactámicos y carbapenémicos, teniendo todos como estructura básica el anillo β -lactámico, esencial para su actividad antimicrobiana. Su mecanismo de acción consiste en el bloqueo de la actividad transpeptidasa, carboxipeptidasa, endopeptidasa o transglucosilasa de las proteínas que se unen a penicilina (PBPs) con la consiguiente inhibición o disminución de la síntesis de peptidoglicano (Bush, 2011). Para contrarrestar este efecto bactericida, los microorganismos producen β -lactamasas (Zeng & Lin 2013). El mecanismo de acción de estas enzimas consiste básicamente en hidrolizar el anillo β -lactámico.

Según el esquema de clasificación de Ambler, las β -lactamasas se pueden dividir en cuatro grupos de acuerdo con la homología de la secuencia proteica. Las β -lactamasas de clase A, C y D son serina β -lactamasas, mientras que las enzimas de clase B son metalolactamasas (Shaikh *et al.*, 2015). La investigación referente a la producción de β -lactamasas, ha revelado que todas las cepas de *Rhodobacteraceae* estudiadas pueden ser capaces de producir metalolactamasas de clase B, las cuales necesitan Zn^{2+} como cofactor para ser activas, lo que explica por qué la resistencia antimicrobiana es dependiente de la presencia de metales. Asimismo, los resultados obtenidos también mostraron que la mayor parte de cepas (61%, 22 de 36) tiene el potencial genético para la producción de β -lactamasas de clase C, las cuales inhiben la acción de las cefalosporinas.

Resistencia a la fosfomicina

La fosfomicina es un antibiótico de amplio espectro que no se relaciona con ningún otro de los conocidos, deriva del ácido fosfónico y se caracteriza por la presencia de un enlace C-P y un anillo epóxido. La fosfomicina al igual que los β -lactámicos inhibe la síntesis de peptidoglicano, pero en esta ocasión debido a la inhibición de la enzima MurA, que cataliza el primer paso en la síntesis de peptidoglicano. Para protegerse de la acción de dicho fármaco, las bacterias utilizan una serie de enzimas que abren el anillo epóxido (anillo de oxirano) mediante la acción de diversos substratos. Las principales enzimas descritas para realizar esta acción son tres metaloenzimas: FosA, una glutatión S-transferasa que utiliza Mn^{2+} y K^+ como cofactores de metal; FosB, una metalotiol S-transferasa que utiliza como cofactor Mg^{2+} , y FosX, un hidróxido de epóxido dependiente de Mn^{2+} que utiliza agua para romper el anillo (Silver, 2017).

De las cepas analizadas, únicamente siete resultaron ser resistentes a la acción de la fosfomicina, puesto que sus genomas contenían el gen codificante para FosA, como es el caso de *Pl. marisminoris* CECT 7066^T, *Rb. ekhonensis* CECT 7235^T, *Al. pelagivivens* CECT 8811^T

y *Po. insulae* CECT 8812^T, o el gen codificante para FosX como *Rv. albus* CECT 7450^T, *Rv. aestuarii* CECT 7745^T y *Pc. litorisediminis* CECT 8287^T. La proteína FosB solo ha sido detectada en Gram positivos, lo que explica su ausencia en las cepas analizadas (Fu *et al.*, 2016).

Resistencia a otros agentes antimicrobianos

Los genomas también fueron analizados mediante la herramienta RGI, de predicción de agentes de resistencia antimicrobiana, integrada en la base de datos CARD (Jia *et al.*, 2017a) que incluye más de 1.600 genes de resistencia a antibióticos conocidos. El análisis mediante esta herramienta reportó los siguientes resultados: 7 cepas de las analizadas (Tabla 28) presentaron en sus genomas la subunidad AdeF de la bomba de efusión (AdeFGH) de la superfamilia RND con una importante función en la resistencia a múltiples agentes antimicrobianos (Yoon *et al.*, 2013). Pese a que el resultado de RGI no informó de la existencia de las subunidades AdeG y AdeH, su presencia también fue corroborada a través de un análisis BLASTp utilizando como secuencia de consulta las secuencias traducidas de los genes *adeG* (gb|CAJ77857.1) y *adeH* (gb|CAJ77855.1) descritos en *Acinetobacter baumannii* AYE (Tabla 28). Asimismo, RGI también detectó la presencia del gen codificante para la enzima aminoglucósido 6’N-acetiltransferasa tipo Ib (ACC(6’)-ib7) responsable de la modificación de los antibióticos aminoglucósidos (Ramirez *et al.*, 2013) en las cepas *Rs. antarcticus* CECT 7023^T y *Ps. marinus* CECT 7751^T. Por último, se encontró el gen *aadA15* con una función similar a la proteína ACC(6’)-ib7 en las cepas de *Rv. aestuarii* CECT 7745^T y *Rx. jejudonensis* CECT 8625^T, y un gen (*recp-1*) codificante de una β-lactamasa en *Ps. marinus* CECT 7751^T.

Tabla 28. Estudio de la presencia de las subunidades AdeG y AdeH en las siete cepas en las que se halló la proteína AdeF a partir de la exploración con CARD. Las proteínas homologas fueron identificadas BLASTp utilizando las secuencias gb|CAJ77857.1 (AdeG) y gb|CAJ77855.1 (AdeH) de *Acinetobacter baumannii* AYE como query.

	Proteína	Cobertura (%)	Valor E	Identidad (%)
<i>Pg. aquimaris</i> CECT 7680 ^T	AdeG	87	3e ⁻⁴⁸	33
	AdeH	97	13 ⁻²⁵	25
<i>Pm. varians</i> CECT 8663 ^T	AdeG	80	4e ⁻⁴⁹	35
	AdeH	47	4e ⁻⁷	26
<i>Ru. arenilitoris</i> CECT 8715 ^T	AdeG	80	8e ⁻⁵²	35
	AdeH	97	3e ⁻⁵¹	31
<i>Ru. mediterranea</i> CECT 7615 ^T	AdeG	83	7e ⁻⁵⁷	36
	AdeH	95	2e ⁻²⁰	27
<i>Ru. meonggei</i> CECT 8411 ^T	AdeG	80	4e ⁻⁵⁴	37
	AdeH	97	4e ⁻⁵⁵	32
<i>Rv. aestuarii</i> CECT 7745 ^T	AdeG	90	2e ⁻⁷⁶	38
	AdeH	91	3e ⁻²⁷	27
<i>Rv. albus</i> CECT 7450 ^T	AdeG	90	2e ⁻⁵¹	35
	AdeH	92	2e ⁻²⁵	27

3. VALIDACIÓN DE LA INFERENCIA FENOTÍPICA

3.1 Determinación de la resistencia a metales pesados a través del análisis de concentraciones mínimas inhibitorias

La validación experimental de la resistencia a metales pesados inferida en base al genoma, se centró en el estudio del arsénico. Tras realizar la caracterización de los determinantes genéticos que otorgan la resistencia al As, se seleccionaron aquellas cepas que contuvieron un mayor número de ellos (Tabla 26) para realizar análisis posteriores. Así, con el fin de corroborar la capacidad de *Rhodobacteraceae* para tolerar la presencia de los iones arseniato y arsenito en el medio de cultivo (MA) y por consiguiente evaluar su potencial para la biorremediación de arsénico, se determinaron experimentalmente las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) para el conjunto de las 10 cepas seleccionadas, mediante la exposición de las células durante cinco días a concentraciones crecientes de Na_3AsO_4 y NaAsO_2 , que oscilaron de 0 a 15.600 $\mu\text{g/ml}$ (50 mM) y de 0 a 2.598 $\mu\text{g/ml}$ (20 mM), respectivamente. Las MIC obtenidas variaron desde 156 (0,5 mM) a 9.360 $\mu\text{g/ml}$ (30 mM) de arseniato de sodio, mientras que las cepas *Ml. aquimaris* CECT 8898^T, *Rv. albus* CECT 7450^T, *Rs. antarcticus* CECT 7023^T y *Rb. ekhonensis* CECT 7235^T no fueron capaces de crecer en ninguna de las concentraciones de arsénico probadas. Estos resultados se representan en la figura 26 como un histograma que muestra cómo varía el número de células viables de cada cepa estudiada respecto al incremento en la concentración de Na_3AsO_4 .

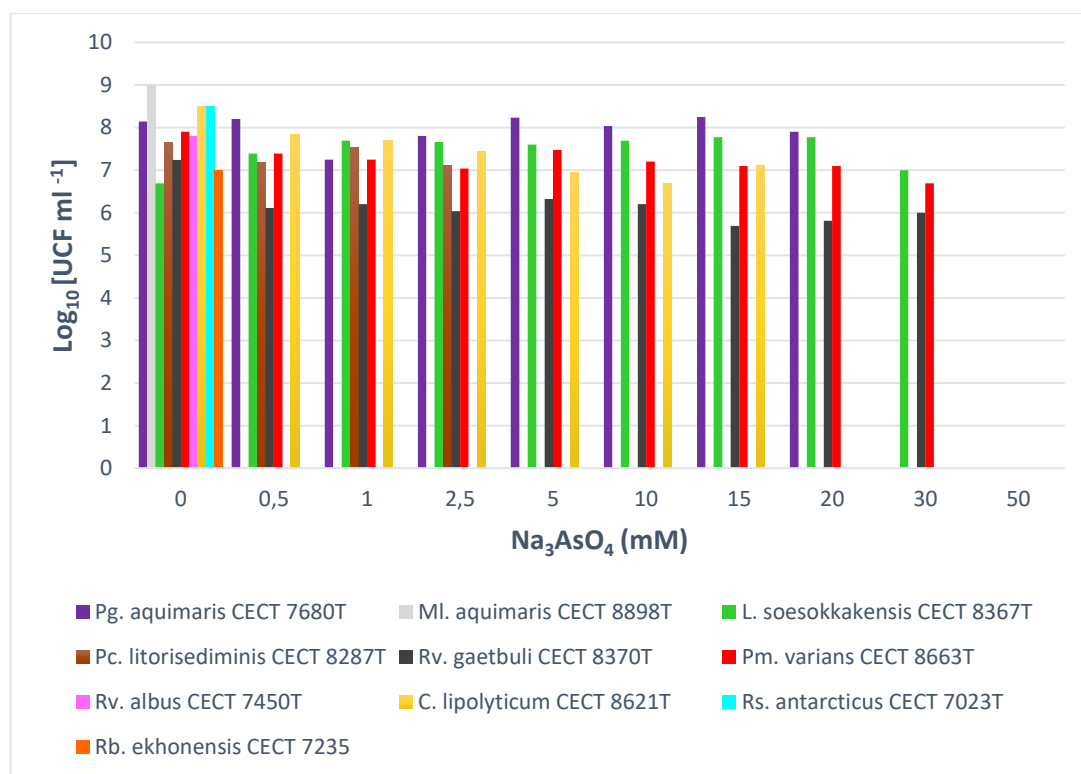


Fig. 26. Ensayo de concentraciones mínimas inhibitorias de las diez cepas analizadas de *Rhodobacteraceae* expuestas durante 5 días a concentraciones crecientes de Na_3AsO_4 . En abscisas están las concentraciones de Na_3AsO_4 probadas, mientras que en ordenadas está la viabilidad expresada como el logaritmo del número de UFC/ml. La afiliación de cada cepa se encuentra disponible en la leyenda.

Como se puede apreciar en el gráfico, las cepas con mayor resistencia al As^{5+} fueron *Rv. gaetbuli* CECT 8370^T, *L. soesokkakensis* CECT 8367^T y *Pm. varians* CECT 8663^T al tolerar una concentración máxima de 9.360 $\mu\text{g/ml}$ de As^{5+} en el medio de cultivo (30 mM), seguida de la cepa *Pg. aquimaris* CECT 7680^T con una concentración máxima de 6.240 $\mu\text{g/ml}$ (20 mM). Al comparar los resultados obtenidos con respecto a la inferencia genómica realizada para los determinantes genéticos de resistencia al As, los datos concuerdan, excepto en tres cepas, dado que *Ml. aquimaris* CECT 8898^T y *Rb. ekhonensis* CECT 7235^T no muestran resistencia pero sí que contienen todos los genes que aportan la resistencia al As^{5+} . Esta incongruencia puede sugerir que los genes del operón *ars* no son funcionales en estas cepas o bien que no se han activado en las condiciones bajo las cuales se ha realizado el experimento. En situación opuesta encontramos a la cepa *Pm. varians* CECT 8663^T que pese a carecer de la bomba de eflujo del As^{3+} (ACR3) presenta uno de los niveles más altos de resistencia encontrada. Esto puede deberse a que el gen no se haya anotado correctamente debido al hecho de que se está trabajando con genomas incompletos o bien que la función de este transportador esté suplida por otro transportador celular. Pero independientemente de ello, los valores resultantes sugieren que las cepas estudiadas presentan una alta resistencia al arsénico en comparación con las bacterias pertenecientes a la familia *Rhodobacteraceae* que están descritas en la literatura por su capacidad para crecer aeróbicamente en presencia de Na_3AsO_4 . De esta manera, diferentes especies pertenecientes al género *Rhodobacter* han sido descritas por su tolerancia al As^{5+} con valores de $\text{MIC}^{\text{As}^{5+}}$ inferiores a 2 mM (Lv *et al.*, 2012), y por consiguiente, con una tolerancia 15 veces menor de la que muestran algunas de las cepas examinadas. No obstante, los valores obtenidos se encuentran muy por debajo del valor observado para la cepa *Pannonibacter indica* HT23^T ($\text{MIC}^{\text{As}^{5+}} = 500$ mM; Bandyopadhyay *et al.*, 2013). Sin embargo, dado que esta especie pertenece al grupo Stappia, este trabajo describe la primera evidencia de la biotransformación del arsénico por parte de algunos miembros del grupo Roseobacter. Respecto a la capacidad de tolerancia al As^{3+} , las MIC solo se realizaron en tres de las diez cepas seleccionadas; *Rv. gaetbuli* CECT 8370^T, *Pm. varians* CECT 8663^T y *Rv. albus* CECT 7450^T, cuyo valor máximo de tolerancia fue de 25 $\mu\text{g/ml}$ (0,2 mM) para las tres cepas ensayadas (dato no mostrado). Pese a que estas cepas no se encuentren entre los microorganismos más resistentes informados hasta el momento en la literatura, los valores obtenidos se encuentran dentro del rango de concentración de As^{3+} tolerados por *Rhodobacter* spp. (Lv *et al.*, 2012) y representan la primera prueba de la capacidad de oxidación del arsénico en el grupo Roseobacter. En resumen, los resultados obtenidos para la resistencia al arsénico indican que los miembros de *Rhodobacteraceae* son capaces de reducir el As^{5+} , y en menor medida oxidar el As^{3+} , afectando a través de estas reacciones redox, a la especiación, toxicidad y a la movilidad del arsénico dentro de los ecosistemas. De este modo, desempeñan funciones importantes en el ciclo biogeoquímico del As, siendo el conocimiento de esta información de vital importancia, puesto que la eficacia de las tecnologías de biorremediación *in situ* depende de las actividades de las comunidades microbianas autóctonas presentes en los lugares contaminados (Satyapal *et al.*, 2018). Además, la capacidad de algunos miembros de *Rhodobacteraceae* para crecer en presencia de arsénico podría resultar útil en el tratamiento de aguas contaminadas, donde los microorganismos están directamente involucrados en la descomposición de la materia orgánica, tal como queda reportado para *Rhodobacteraceae* (Suárez, 2013; Harwati *et al.*, 2007), ya que en este proceso biológico los metales pesados a menudo tienen un efecto inhibitorio, tal como indica Filali *et al.* (2000), por lo que los tratamientos aplicados de la remoción de As podrían optimizarse con la utilización de estos microorganismos, con el fin

de obtener mejor rendimiento. No obstante, sería necesario realizar futuros estudios para determinar el verdadero potencial de *Rhodobacteraceae* en la biorremediación del As.

En paralelo a los ensayos de tolerancia al As, también se estudió experimentalmente la resistencia hacia el telurio en las diez cepas seleccionadas. Para ello, las cepas fueron expuestas, bajo las mismas condiciones que en el ensayo anterior, a concentraciones crecientes de K_2TeO_3 que variaron de 0 a 5.120 $\mu\text{g/ml}$ (0–20 mM). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 27.

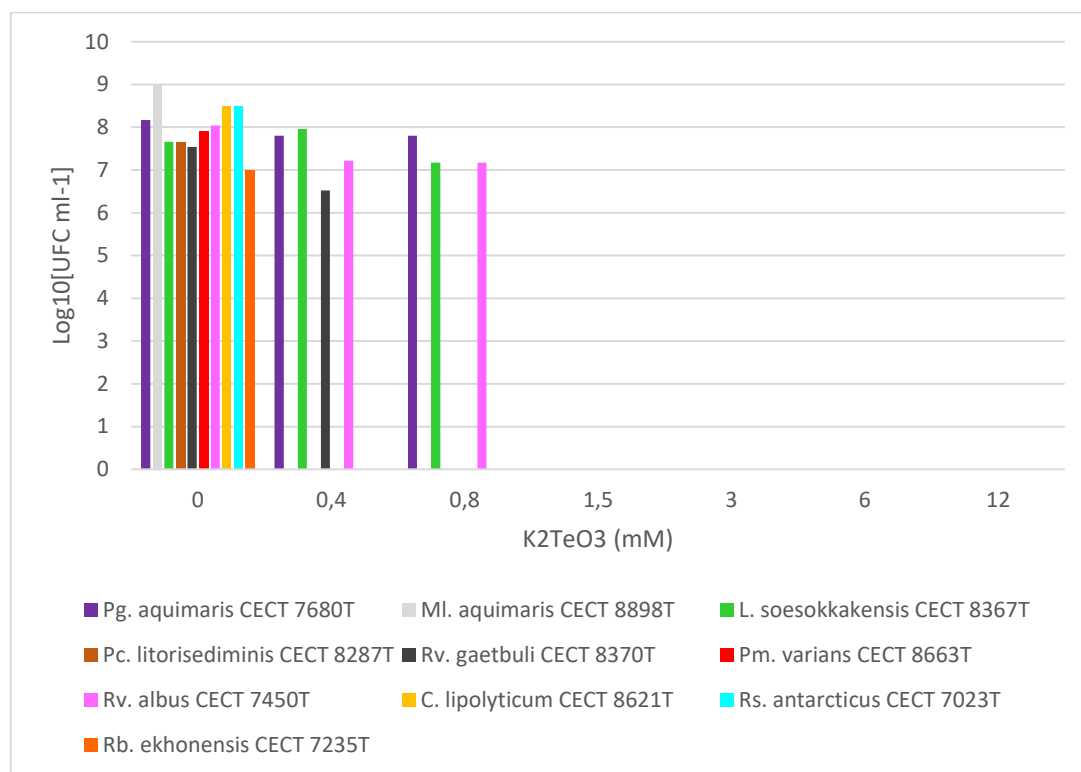


Fig. 27. Ensayo de concentraciones mínimas inhibitorias de las diez cepas analizadas de *Rhodobacteraceae* expuestas durante 5 días a concentraciones crecientes de K_2TeO_3 . En abcisas están las concentraciones de K_2TeO_3 probadas, mientras que en ordenadas está la viabilidad expresada como el logaritmo del número de UFC/ml. La afiliación de cada cepa se encuentra disponible en la leyenda.

Como se observa en la figura 27, solo cuatro de las diez cepas analizadas (*Rv. gaetbuli* CECT 8370^T, *Rv. albus* CECT 7450^T, *Pg. aquimaris* CECT 7680^T y *Rs. antarcticus* CECT 7023^T) fueron capaces de crecer en presencia de telurito potásico en un rango de concentraciones que oscilaban entre 102,4 $\mu\text{g/ml}$ (0,4 mM) y 204,8 $\mu\text{g/ml}$ (0,8 mM), dando lugar a la formación de colonias negras debido a la acumulación interna de cristales de Te^0 generados por la reducción del TeO_3^{2-} . La comparación entre la resistencia de las cepas de *Rhodobacteraceae* analizadas y las bacterias descritas en la literatura por su capacidad para crecer en presencia de K_2TeO_3 señala que el nivel de resistencia de *Rhodobacteraceae* al telurio es equivalente al de otras muchas bacterias Gram positivas y negativas (Lewis *et al.*, 2018; Arenas *et al.*, 2014; Zare *et al.*, 2012). A la vista de que el telurito es especialmente nocivo para las bacterias Gram negativas a concentraciones inferiores a 1 $\mu\text{g/ml}$ (Arenas *et al.*, 2014; Zanaroli *et al.*, 2002), los valores obtenidos en las cepas analizadas reflejarían una alta resistencia de *Rhodobacteraceae* frente a este oxoanión. No obstante, estas cepas tampoco se encuentran entre los microorganismos pertenecientes a *Rhodobacteraceae* más

resistentes al telurio reportados hasta el momento. Ejemplo de ello son los niveles de tolerancia al telurio que llegan a soportar dos cepas de *Rhodobacter capsulatus* y *Rhodobacter sphaeroides* ($MIC^{Te} \sim 800 \mu\text{g/ml}$). Después de analizar experimentalmente la resistencia al Te por parte de las cepas seleccionadas, se investigó si sus genomas contenían o no los determinantes genéticos descritos como responsables de la resistencia al Te en bacterias. Todos los genomas analizados, a excepción de *Rb. ekhonensis* CECT 7235^T, presentaron los genes *trgAB*, *cysK* y *telA* (dato no mostrado) involucrados en la resistencia al Te en *R. sphaeroides* (Taylor, 1999), por lo que su presencia no se relaciona con la capacidad de resistencia encontrada. De esta manera, los resultados obtenidos confirman la hipótesis de que la resistencia al Te actualmente no se encuentra relacionada con productos específicos de genes, si no que más bien representa una respuesta multifactorial que puede estar directa o indirectamente relacionada con diferentes rutas metabólicas, sus genes o productos (Arenas *et al.*, 2014). Por último, este análisis también describe por primera vez en la literatura la capacidad de algunos miembros del grupo Roseobacter de reducir el telurio a telurio elemental, contribuyendo así a la detoxificación del telurio en el ecosistema.

3.2 Análisis Phenotype Microarray

La validación experimental de algunas de las capacidades metabólicas de *Rhodobacteraceae* inferidas sobre la base del genoma, se determinó a través del análisis BIOLOG *Phenotype Microarray*. Esta tecnología emplea el colorante violeta de tetrazolio para detectar colorimétricamente la respiración celular y, por consiguiente, determinar si el microorganismo es capaz de metabolizar o no el sustrato estudiado en cuestión (Bochner *et al.*, 2001). Las cepas utilizadas en este análisis fueron *Rv. gaetbuli* CECT 8370^T, *Pm. varians* CECT 8663^T y *Rv. albus* CECT 7450^T, ya que fueron las únicas que crecieron en medios mínimos, condición requerida para llevar a cabo el experimento.

Las placas utilizadas para llevar a cabo este análisis fueron GEN III, las cuales permiten testar 94 condiciones experimentales diferentes, como son la utilización de fuentes de carbono diversas y la tolerancia o sensibilidad a diferentes compuestos químicos (metales y antibióticos), condiciones de pH y salinidad. Las 71 fuentes de carbono que nos permite probar GEN III se dividen en diferentes categorías químicas, incluyendo carbohidratos (26), compuestos de nitrógeno (4), ácidos carboxílicos (22), alcoholes (5), ésteres (3), amida (1) y aminoácidos (10). Como se muestra en la tabla 29, las tres cepas de *Rhodobacteraceae* analizadas fueron metabólicamente activas para casi todas las fuentes de carbono ensayadas: *Rv. albus* CECT 7450^T fue capaz de oxidar todos los sustratos utilizados, mientras que *Rv. gaetbuli* CECT 8370^T y *Pm. varians* CECT 8663^T únicamente no pudieron oxidar el ácido málico. Además, es posible apreciar que de los diferentes compuestos ensayados, los utilizados con mayor eficiencia en las tres cepas fueron: los carbohidratos, sacarosa, turanosa, métil-D-glucósido, glucosa, manosa, fructosa, galactosa y pectina; el compuesto nitrogenado inosina; los polialcoholes sorbitol, manitol, arabitol y glicerol; los aminoácidos alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, histidina y serina; los ácidos carboxílicos glucónico, láctico, cítrico, cetoglutámico, málico, succínico, hidroxibutírico, cetobutírico, aceto acético, acético y fórmico; y por último los ésteres metil piruvato y ácido láctico metil éster. Estos datos concuerdan con los resultados derivados de la inferencia basada en el genoma, obtenidos en la presente tesis, sobre el elevado número de genes involucrados en las rutas metabólicas centrales para el catabolismo de carbohidratos como son la vía de

Entner-Doudoroff, la ruta de las pentosa fosfato, el ciclo del TCA o la ruta del Etilmalonil-CoA responsable de la asimilación de compuestos de dos carbonos. Del mismo modo, la exploración a través de RAST ha demostrado que las tres cepas contienen el complejo piruvato deshidrogenasa, responsable de la oxidación del piruvato para su posterior entrada al ciclo del TCA. También, se ha encontrado la presencia del gen codificante para la enzima acetil-CoA sintasa, que permite la asimilación del ácido acético. Por último, este gran metabolismo catabólico es respaldado por el hallazgo en los genomas de diferentes tipos de transportadores para glucósidos, monosacáridos y alcoholes, así como también del sistema tripartito del carboxilato y el transportador tripartito independiente de ATP para la absorción de ácidos orgánicos (sección 2.2 Metabolismo central de carbohidratos).

Tabla 29. Fuentes de carbono utilizadas por las tres cepas de *Rhodobacteraceae* estudiadas en el análisis de *Phenotype Microarray*. La altura máxima de la curva cinética (A) relativa a la utilización de cada compuesto se calculó mediante el programa opm y los valores obtenidos para cada compuesto se clasificaron mediante el método de agrupación de *k-medias*, así el rango de valores A comprendido entre 184–275 Unidades Omnilog se usó para discriminar entre compuestos utilizados intensamente (>275 Unidades Omnilog) y no utilizados (<184 Unidades Omnilog). Para representar gráficamente los valores obtenidos se empleó una escala de color de verde (>275 Unidades Omnilog), amarillo (184–275 Unidades Omnilog) y rojo (<184 Unidades Omnilog). Cepas: 1, *Rv. albus* CECT 7450^T; 2, *Rv. gaetbuli* CECT 8370^T; 3, *Pm. varians* CECT 8663^T.

Sustrato	Cepas		
Dextrina	1	2	3
D-Maltosa	1	2	3
D-Trehalosa	1	2	3
D-Celobiosa	1	2	3
Gentiobiosa	1	2	3
Sacarosa	1	2	3
D-Turanosa	1	2	3
Estaquiosa	1	2	3
D-Rafinosa	1	2	3
α-D-Lactosa	1	2	3
D-Melibiosa	1	2	3
β-Metil D-glucósido	1	2	3
D-Salicina	1	2	3
N-Acetil glucosamina	1	2	3
N-Acetil manosamina	1	2	3
N-Acetil galactosamina	1	2	3
Ácido N-acetil neuramínico	1	2	3
D-Glucosa	1	2	3
D-Manosa	1	2	3
D-Fructosa	1	2	3
D-Galactosa	1	2	3
3-Metil glucosa	1	2	3
D-Fucosa	1	2	3
L-Fucosa	1	2	3
L-Ramnosa	1	2	3
Inosina	1	2	3
D-Sorbitol	1	2	3
D-Manitol	1	2	3
D-Arabitol	1	2	3
Inositol	1	2	3
Glicerol	1	2	3
D-Glucosa 6 fosfato	1	2	3
D-Fructosa 6 fosfato	1	2	3
D-Ácido aspártico	1	2	3
D-serina	1	2	3
Gelatina	1	2	3
Glicilprolina	1	2	3
L-Alanina	1	2	3
L-Arginina	1	2	3
L-Ácido aspártico	1	2	3
L-Ácido glutámico	1	2	3
L-Histidina	1	2	3
Ácido piroglutámico	1	2	3
L-Serina	1	2	3
Pectina	1	2	3
D-Ácido galacturónico	1	2	3
L-Lactona de ácido galactónico	1	2	3
D-Ácido glucónico	1	2	3
D-Ácido glucorónico	1	2	3
Glucuronamida	1	2	3
Ácido múxico	1	2	3
Ácido quínico	1	2	3
D-Ácido sacárido	1	2	3
Ácido fenilacético	1	2	3
Metil piruvato	1	2	3
D-Ácido láctico metil éster	1	2	3
L-Ácido láctico	1	2	3

Ácido cítrico	1	2	3
Ácido cetoglutárico	1	2	3
Ácido D-málico	1	2	3
Ácido L-málico	1	2	3
Ácido bromosuccínico	1	2	3
Tween 40	1	2	3
Ácido γ -aminobutírico	1	2	3
Ácido α -hidroxibutírico	1	2	3

Ácido β -hidroxi D,L-butírico	1	2	3
Ácido cetobutírico	1	2	3
Ácido aceto acético	1	2	3
Ácido propiónico	1	2	3
Ácido acético	1	2	3
Ácido fórmico	1	2	3

El análisis de *Phenotype Microarray* también permitió determinar el grado de tolerancia o sensibilidad que muestran las tres cepas seleccionadas de *Rhodobacteraceae* hacia 23 compuestos químicos presentes en la placa GEN III. Los resultados para este ensayo de sensibilidad química muestran un patrón muy similar al obtenido en los resultados de la utilización de las fuentes de carbono. Así, *Rv. albus* CECT 7450^T además de ser la cepa con una mayor capacidad de metabolización de fuentes de carbono, también parece exhibir un mayor grado de resistencia en comparación con las otras dos cepas analizadas, dado que su crecimiento es inhibido únicamente por el detergente Niaproof 4 y el desnaturalizante proteico guanidina HCl, siendo estos dos sustratos los únicos ensayados que inhiben el crecimiento en las tres cepas estudiadas (Tabla 30).

Tabla 30. Nivel de resistencia o sensibilidad a los diferentes compuestos químicos utilizados en el análisis de *Phenotype Microarray* por las tres cepas de *Rhodobacteraceae* estudiadas. Aquellos sustratos con un valor de área bajo la curva (AUC), obtenido en la curva cinética relativa a la utilización de cada compuesto generada mediante Omnilog-PM, superior a la concentración inhibitoria media máxima (IC₅₀) del control positivo (IC₅₀ placa *Rv. albus* CECT 7450^T = 30480 unidades, IC₅₀ placa *Rv. gaetbuli* CECT 8370^T = 30249 unidades, IC₅₀ placa *Pm. varians* CECT 8663^T = 28894 unidades) se consideraron inocuos para el microorganismo (color verde), mientras que aquellos otros con un valor inferior, fueron considerados tóxicos (color rojo). Cepas: 1, *Rv. albus* CECT 7450^T; 2, *Rv. gaetbuli* CECT 8370^T; 3, *Pm. varians* CECT 8663^T.

Sustrato	Cepas		
pH 6	1	2	3
pH 5	1	2	3
1% NaCl	1	2	3
4% NaCl	1	2	3
8% NaCl	1	2	3
1% Lactato de sodio	1	2	3
Ácido fusídico	1	2	3
D-serina	1	2	3
Troleandomicina	1	2	3
Rifamicina	1	2	3
Minociclina	1	2	3
Lincomicina	1	2	3
Guanidina HCl	1	2	3
Niaproof 4	1	2	3
Vancomicina	1	2	3
Violeta de tetrazolio	1	2	3
Azul de tetrazolio	1	2	3
Ácido nalidíxico	1	2	3

Cloruro de litio	1	2	3
Telurito potásico	1	2	3
Aztreonam	1	2	3
Butirato de sodio	1	2	3
Bromato de sodio	1	2	3

Las cepas mostraron una alta tolerancia a las sales; lactato, butirato y bromato de sodio; a los inhibidores de la respiración, azul y violeta de tetrazolio; y a las sales metálicas, cloruro de litio y telurio de potasio. Este metabolismo activo en presencia de telurio entra en contradicción con los resultados aquí obtenidos para el análisis de la concentración mínima inhibitoria en presencia de telurio potásico, ya que dicho análisis manifestó que la cepa *Pm. varians* CECT 8663^T fue incapaz de crecer en presencia de dicho compuesto. Esta contradicción puede deberse a dos motivos; el primero, que la concentración de telurio potásico utilizada en el análisis de *Phenotype Microarray* sea menor a la mínima establecida para los análisis MIC; y la segunda, que las medidas respiratorias sean más sensibles que las medidas basadas en el crecimiento bacteriano. Asimismo, las tres cepas analizadas de *Rhodobacteraceae* fueron activas metabólicamente a pH de 5 y 6, lo que sugiere que presentan mecanismos para contrarrestar la acidez. Respecto, al grado de resistencia hacia las diferentes clases de antimicrobianos ensayados, los datos resultantes muestran que los únicos antibióticos donde no se vio inhibido el metabolismo de ninguna de las tres cepas examinadas fueron los pertenecientes a las categorías de los β -lactámicos (Aztreonam), de los glucopéptidos (Vancomicina), de las quinolonas (Ácido nalidíxico), de los macrólidos (Troleandomicina) y de la tetraciclina (Minociclina) (tabla 30). Estos resultados están respaldados por los datos de la inferencia genómica (Sección 2.12 Resistencia a metales y otros elementos tóxicos), ya que todas las cepas analizadas presentan los genes codificantes para las bombas de expulsión multidrogas de la familia RND (*CmeABC*) y de la familia MATE que permiten la extrusión de diferentes tipos de antimicrobianos y otros compuestos tóxicos. Asimismo, también presentan la bomba de resistencia multidroga AdeFGH, relacionada con la resistencia a las fluoroquinolonas y diferentes colorantes (Amin *et al.*, 2013), como representan en este estudio los compuestos azul y violeta de tetrazolio. Por otro lado, también contienen el potencial genético de producir betalactamasas. No obstante, pese a que todas fueron resistentes a la troleandomicina, la única cepa donde se encontraron los genes codificantes para la bomba de extrusión de macrólidos (*mecA* y *mecB*) fue *Rv. gaetbuli* CECT 8370^T. Por otra parte, esta cepa junto con *Rv. albus* CECT 7450^T fueron sensibles a la rifamicina y a la lincomicina.

Por último, los datos obtenidos a partir de este ensayo de sensibilidad química también permiten corroborar el estilo de vida halófilo/halotolerante descrito para la mayoría de los miembros del grupo *Roseobacter* (Pujalte *et al.*, 2014) puesto que las tres cepas analizadas fueron metabólicamente activas en la máxima concentración de salinidad ensayada (8% NaCl; tabla 30). Esta observación es acorde a la determinación de que sus genomas contienen determinantes genéticos involucrados en la acumulación y/o síntesis de solutos compatibles que permiten hacer frente a condiciones de salinidad fluctuantes (sección 2.10 Mecanismos de defensa frente a diferentes condiciones de estrés), como son los genes relacionados con la síntesis de glicilbetaína (*betABC*) y dimetilglicina (*bhmT*) y el sistema de absorción de betaína (*proU*), todos ellos compuestos que pueden ser utilizados como importantes osmoprotectores. Además, también se encontraron genes responsable de la síntesis de los glucanos periplásmicos osmorregulados (*mdoH* y *mdoG*) y acuaporinas (*ompA*) que protegen a las células de cambios en las condiciones osmóticas.

4. ANÁLISIS FILOGENÓMICO DE LA FAMILIA *RHODOBACTERACEAE*

Desde una perspectiva taxonómica, la distinción principal entre los miembros de la familia *Rhodobacteraceae* se ha establecido en base a la similitud de la secuencia del gen 16S rRNA. Sin embargo, los últimos estudios filogenómicos realizados sobre esta familia han demostrado que las secuencias del gen 16S rRNA carecen de resolución suficiente como para reconstruir de forma adecuada la historia evolutiva de este linaje. Así, se observa que las reconstrucciones filogenéticas contienen nodos de baja confianza lo que se traduce en que algunos géneros pueden aparecer como polifiléticos en función del conjunto de secuencias empleado y/o el método de inferencia (Wirth & Whitman, 2018) y, por consiguiente, es necesario revisar con mayor profundidad la taxonomía y sistemática de la familia *Rhodobacteraceae*.

Para ello, en el presente trabajo se ha explorado la estructura taxonómica de *Rhodobacteraceae* utilizando un enfoque filogenómico basado en las secuencias del genoma de 224 cepas tipo pertenecientes a dicha familia. Mediante este enfoque se construyó un árbol filogenómico a partir del programa UBCG cuya exploración planteó la existencia de tres posibles casos de sinonimia a nivel intra- e intergénero (Fig. S1; Anexo II). Concretamente, la exploración de la topología del árbol resultante sugirió que las cepas *Roseivivax atlanticus* 22II-S10s^T y *Roseivivax marinus* DSM 27511^T se encontraban muy cercanas filogenéticamente (La Mura *et al.*, 2018). Para determinar si se trataba de la misma especie, los valores de ANI y de isDDH, entre todos los miembros del género *Roseivivax* con genoma disponible, fueron calculados mediante las herramientas web JSpeciesWS y GGDC 2.1, utilizando la fórmula 2 recomendada, respectivamente. Como se muestra en la tabla 31, los resultados obtenidos para ambos parámetros fueron significativamente superiores a los umbrales del 96 y 70% de ANI y isDDH, respectivamente, para la demarcación de especies procariontas, lo que sugiere que ambas cepas deben permanecer a la misma especie genómica. Por tanto, teniendo en cuenta la evidencia genética comentada previamente y el elevado grado de similitud fenotípica que comparten, no hay justificación para separar estas cepas en dos especies diferentes. Las publicaciones que describen ambas especies son muy cercanas en el tiempo, *Rx. atlanticus* de mayo de 2014 (Li *et al.*, 2014b) y *Rx. marinus* de agosto del mismo año (Dai *et al.*, 2014). No obstante, la validación de *Rx. marinus* era automática pues se había publicado en el *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, mientras que la de *Rx. atlanticus* tuvo lugar al incluirse en una lista de validación (número 161, de 2015). Por tanto, *Rx. marinus* tiene prioridad sobre *Rx. atlanticus*, y de acuerdo con la regla 24a del ICNP (Parker *et al.*, 2019) la especie *Rx. atlanticus* debe considerarse como sinónimo heterotípico posterior de *Rx. marinus* (La Mura *et al.*, 2018).

Tabla 31. Valores ANIb e isDDH entre los genomas disponibles del género *Roseivivax*. La negrita indica aquellos valores por encima de los umbrales de especie.

ANIb	1	2	3	4	5	6	7	8
1. <i>Roseivivax atlanticus</i> 22II-s10s ^T	*	97.40	77.56	77.82	77.06	74.99	73.30	74.15
2. <i>Roseivivax marinus</i> DSM 27511 ^T	96.95	*	77.73	77.89	77.24	75.15	73.15	74.40
3. <i>Roseivivax halodurans</i> JCM 10272 ^T	77.64	78.16	*	78.24	77.11	75.35	73.04	74.40
4. <i>Roseivivax jejudonensis</i> CECT 8625 ^T	77.52	77.83	78.04	*	77.42	75.22	72.94	74.43
5. <i>Roseivivax isopora</i> e LMG 25204 ^T	77.15	77.40	77.05	77.73	*	75.83	73.14	74.52
6. <i>Roseivivax lentus</i> DSM 29430 ^T	74.84	75.02	74.96	75.18	75.54	*	72.39	77.20
7. <i>Roseivivax roseus</i> DSM 23042 ^T	73.12	73.26	73.03	73.19	73.05	72.64	*	71.87
8. <i>Roseivivax halotolerans</i> DSM 15490 ^T	74.08	74.59	74.70	74.65	74.45	77.30	71.75	*
isDDH								
1. <i>Roseivivax atlanticus</i> 22II-s10s ^T	*	82.80	22.00	21.80	21.40	20.30	20.70	20.30
2. <i>Roseivivax marinus</i> DSM 27511 ^T	82.80	*	22.00	21.70	21.30	20.40	20.20	20.50
3. <i>Roseivivax halodurans</i> JCM 10272 ^T	22.00	22.00	*	22.10	21.40	20.30	19.90	20.70
4. <i>Roseivivax jejudonensis</i> CECT 8625 ^T	21.80	21.70	22.10	*	21.40	20.30	19.60	20.20
5. <i>Roseivivax isopora</i> e LMG 25204 ^T	21.40	21.30	21.40	21.40	*	20.50	19.70	19.80
6. <i>Roseivivax lentus</i> DSM 29430 ^T	20.30	20.40	20.30	20.30	20.50	*	19.10	21.20
7. <i>Roseivivax roseus</i> DSM 23042 ^T	20.70	20.20	19.90	19.60	19.70	19.10	*	19.30
8. <i>Roseivivax halotolerans</i> DSM 15490 ^T	20.30	20.50	20.70	20.20	19.80	21.20	19.30	*

La topología del árbol de *Rhodobacteraceae* también indicó una relación muy estrecha entre las especies *Brevirhabdus pacifica* y *Xuhuaishuia manganoxidans*, por un lado, y entre *Mameliella atlántica*, *Alkalimicrobium pacificum*, *Mameliella phaeodactyli*, *Mameliella alba* y *Ponticoccus lacteus*, por otro, siendo confirmada por los valores de ANI e isDDH (dato no mostrado) tal y como queda reflejado en las publicaciones de Liu *et al.*, (2017b) y Liu *et al.*, (2018b).

La confirmación de dichas sinonimias, permitió eliminar del análisis filogenómico las especies sinónimas posteriores, quedando incluidas las especies *Roseivivax marinus*, *Brevirhabdus pacifica* y *Mameliella alba*. Esto redujo el conjunto de cepas a analizar de 224 a 218. A continuación, se obtuvieron dos árboles filogenómicos con cada programa utilizado en la reconstrucción filogenómica (Fig. S1, S2, S3, S4; Anexo II) y, a partir de ellos se calcularon los árboles de consenso mayoritario (Fig. S5; Anexo II) y consenso estricto (Fig. S6; Anexo II) con el objetivo de analizar si la topología se mantiene en todos los árboles. Dado que los árboles derivados del programa UBCG presentan apoyo estadístico en sus nodos y que la secuencia de aminoácidos exhibe una tasa de evolución menor que la secuencia de nucleótidos, el árbol filogenómico generado mediante la secuencia aminoacídica a través de UBCG (Fig. S1; Anexo II) ha sido el seleccionado para reflejar gráficamente la información obtenida a partir de los árboles consenso y, por lo tanto, representar la taxonomía de *Rhodobacteraceae*.

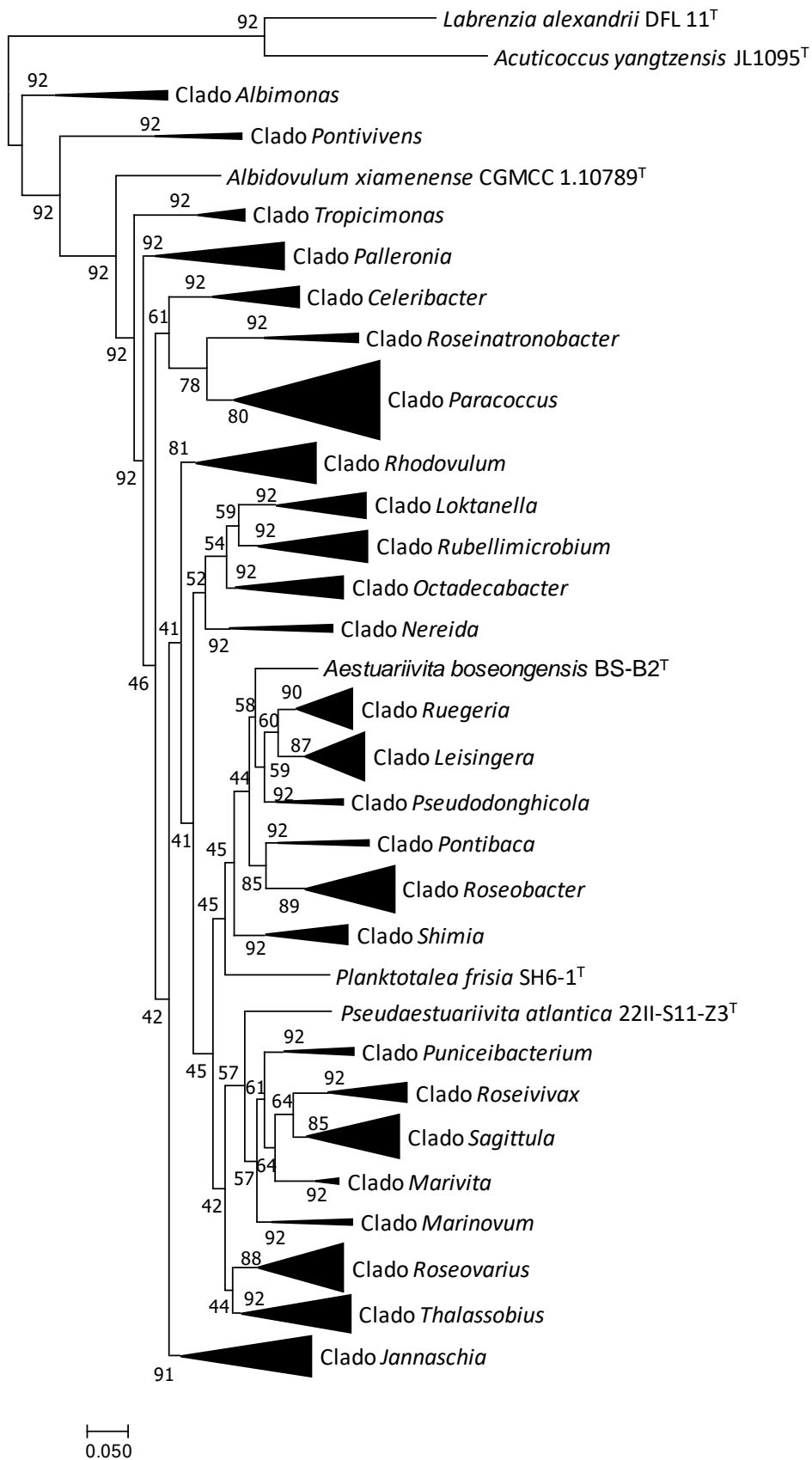


Fig. 28. Árbol filogenómico compactado por clados de la familia *Rhodobacteraceae* generado con el programa UBCG utilizando las secuencias de aminoácidos. El número de los nodos indica el índice de soporte génico (máximo valor es 92). Escala, 0.05 sustituciones por posición.

La topología del árbol es congruente con los estudios filogenómicos realizados anteriormente en *Rhodobacteraceae* (Brinkmann *et al.*, 2018; Michael *et al.*, 2016; Voget *et al.*, 2015; Newton *et al.*, 2010), mostrando alguna diferencia debida a la introducción de nuevas secuencias genómicas respecto a los anteriores estudios realizados. Basándose en el patrón de ramificación (Fig. 28), se distinguen 26 clados con un valor de soporte máximo para la mayoría de ellos (>80/92 GSI), y se derivan tres anotaciones de interés. Primero, se observa (Fig. S1; Anexo II) que el clado *Paracoccus* alberga algunos géneros como son *Paracoccus*, *Rhodobacter*, *Pseudorhodobacter* y *Gemmobacter* que pese a estar considerados filogenéticamente alejados del grupo *Roseobacter* (Pujalte *et al.*, 2014), se anidan dentro de él. Este hecho respalda el estudio de Simon *et al.* (2017) en el que se propone que el clado *Roseobacter* es parafilético y, en consecuencia, el término ‘clado *Roseobacter*’ debe ser sustituido por ‘grupo *Roseobacter*’. Segundo, se encuentra que varias especies de los géneros *Sulfitobacter*, *Gemmobacter*, *Pseudoceanicola*, *Pseudorhodobacter*, *Pseudoruegeria*, *Rhodobacter*, *Roseivivax* y *Thalassobius* se ramifican por separado de otros miembros de sus respectivos géneros, lo que hace que estos géneros sean polifiléticos y taxonómicamente problemáticos. Por último, otra observación importante respaldada por los árboles de consenso, es la estrecha relación encontrada en algunas especies (*Yangia pacifica* DSM 26849^T, *Pelagimonas varians* CECT 8663^T y *Tropicimonas isoalkanivorans* DSM 19548^T) con diferentes géneros en clados con un valor de soporte máximo. Estas observaciones encontradas ponen en evidencia la presencia de inconsistencias entre la filogenia y la taxonomía de la familia *Rhodobacteraceae* y sugieren la necesidad de realizar una revisión taxonómica en la familia.

4.1 Delimitación de los géneros de *Rhodobacteraceae*

A pesar de que el árbol filogenómico de *Rhodobacteraceae* (Anexo II) proporciona una buena medida de las relaciones filogenéticas dentro de esta familia, la revisión de la taxonomía requiere establecer criterios que indiquen la cantidad de diversidad permitida dentro de los diferentes niveles taxonómicos. Los principales índices genómicos para la demarcación de los géneros procariontes son los índices POCP y AAI. La delimitación de los géneros de *Rhodobacteraceae* realizada en este trabajo se ha llevado a cabo mediante el cálculo del índice AAI ya que, tal y como han señalado Wirth y Whitman (2018) en su estudio filogenómico sobre el grupo *Roseobacter*, el punto de corte (50%) establecido para la circunscripción de los géneros mediante POCP es muy conservador y, por consiguiente, no es adecuada su utilización para el estudio taxonómico de *Rhodobacteraceae*; esta limitación también se ha encontrado en otras familias bacterianas (Li *et al.*, 2017b; Aliyu *et al.*, 2016). En cuanto al índice AAI, se ha propuesto que aquellas cepas pertenecientes a un mismo género comparten una identidad aminoacídica promedio que oscila entre el 60 y 80% (Luo *et al.*, 2014). Sin embargo, de las 820 comparaciones intergenéricas por pares realizadas de forma independiente entre las cepas tipo de todos los géneros que componen cada uno de los diferentes clados derivados del análisis filogenómico efectuado, 791 (96,4%) comparaciones presentaban valores dentro del rango del 60–80% de AAI. Este elevado porcentaje implica que si se tiene en cuenta el rango propuesto por Luo *et al.* (2014) para la circunscripción de los géneros, cada uno de los clados obtenidos en el árbol filogenómico

englobaría a un único género procariota. Por lo tanto, el umbral del 60–80% de AAI también parece ser demasiado conservador para la circunscripción a nivel de género y, por consiguiente, inadecuado para aplicarlo en la presente revisión taxonómica de *Rhodobacteraceae*. Por esta razón, después de la exploración de la distribución de los valores AAI obtenidos en las 1.220 comparaciones a nivel intra- e intergenérico realizadas en este estudio, se propone utilizar un rango de corte más estricto, del 68–71% de AAI, para la demarcación a nivel de género en la familia *Rhodobacteraceae*, donde por debajo del mínimo las especies deben separarse en géneros diferentes y por encima del máximo las especies deben agruparse en el mismo género. En apoyo a este nuevo criterio establecido, los resultados derivados del mismo fueron consistentes con los recientes reordenamientos taxonómicos propuestos por Wirth y Whitman (2018) y Liu *et al.* (2017a).

▪ **Reclasificación taxonómica de los géneros de la familia *Rhodobacteraceae* en los clados obtenidos**

Todos los cambios taxonómicos planteados en el presente trabajo se han propuesto teniendo en cuenta los siguientes factores. En primer lugar, un valor de AAI inferior al 68% se tomó como evidencia de que las cepas comparadas debían pertenecer a géneros diferentes. En aquellos casos en los que se obtuviese valores de AAI dentro del límite del 68-71% se examinaron las características fenotípicas para poder decidir se pertenecen o no al mismo taxón. Además, todos los cambios taxonómicos propuestos debían ser congruentes con la filogenia derivada del árbol basado en las secuencias genómicas construido; y a su vez con los árboles consenso (Fig. S5 y S6; Anexo II). Por último, si tras analizar los valores de AAI y las características fenotípicas no se llegaba a una conclusión clara sobre la posición taxonómica de una cepa en cuestión, se priorizó preservar la clasificación actual. Teniendo en cuenta estos criterios, a continuación, se proponen los siguientes reordenamientos taxonómicos.

○ **Análisis clado *Tropicimonas***

El clado *Tropicimonas* (Fig. 29) está compuesto por la especie tipo del género *Tropicimonas*, *T. isoalkalinivorans*, y tres especies pertenecientes al género *Pseudoruegeria*, ninguna de ellas la especie tipo del género, lo que indica que *Pseudoruegeria* es polifilético y, por consiguiente, es susceptible a reclasificación. Además, este clado conforma una unidad filogenómica compacta con un valor de soporte máximo (92), corroborada por los árboles consenso, y un valor mínimo de AAI para el conjunto del 71% (Tabla 32), sugiriendo que las 4 cepas que componen dicho clado podrían pertenecer al mismo género.

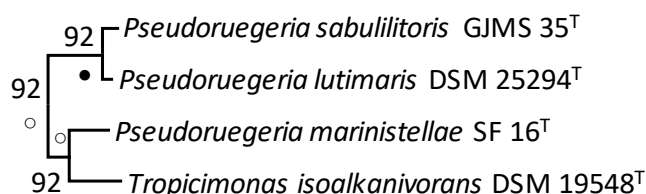


Fig. 29. Clado *Tropicimonas* extraído de la reconstrucción filogenómica de *Rhodobacteraceae* realizada mediante el programa UBCG utilizando las secuencias de aminoácidos. Circulo negro, respaldado por el árbol de consenso estricto; Circulo blanco, respaldado por el árbol de consenso mayoritario

Tabla 32. Valores de AAI entre los genomas que conforman el clado *Tropicimonas* del árbol filogenómico de *Rhodobacteraceae*. Las especies tipo se señalan en negrita. Las celdas con valores superiores al umbral considerado para la demarcación de géneros en la presente tesis están sombreadas en verde.

AAI	1	2	3	4
1. <i>Tropicimonas isoalkanivorans</i> DSM 19548^T	*			
2. <i>Pseudoruegeria marinistellae</i> SF-16 ^T	76	*		
3. <i>Pseudoruegeria sabulilitoris</i> GJMS_35 ^T	71	73	*	
4. <i>Pseudoruegeria lutimaris</i> DSM 25294 ^T	71	73	92	*

Sobre esta base, y pese a localizar diferencias fenotípicas, como son la disparidad en cuanto a la presencia de flagelos respecto a las especies del género *Tropicimonas*, el carácter halófilo no obligado y la presencia de la enzima catalasa en la especie *P. marinistellae* y, por último, la pigmentación de las colonias (amarillas grisáceas) de *P. lutimaris* respecto a las especies de *Tropicimonas* (colonias de color blanco), se propone, trasladar las especies *P. marinistellae*, *P. sabulilitoris* y *P. lutimaris* al género *Tropicimonas* y nombrarlas como *Tropicimonas marinistellae* comb. nov., *Tropicimonas sabulilitoris* comb. nov. y *Tropicimonas lutimaris* comb. nov. con la necesidad de enmendar la descripción del género *Tropicimonas*.

○ **Análisis clado *Palleronia***

De manera similar, en el clado *Palleronia* formado por las especies tipo de los géneros *Palleronia*, *Maribius*, *Tranquillimonas*, *Oceanivalibus*, *Brevirhabdus* y *Boseongicola* junto a las especies *Palleronia abyssalis*, *Maribius pelagius* y *Roseivivax roseus*, la posición filogenética de esta última especie sugiere también la necesidad de una clasificación adicional. Dicha especie se aleja del resto de miembros de su género y se agrupa junto a la especie tipo *Tranquillimonas alkanivorans* con un valor de GSI máximo y con el respaldo del árbol de consenso mayoritario (Fig. 30). La identidad aminoacídica promedio entre ambas especies se encuentra dentro del rango propuesto en el presente trabajo para la delimitación de géneros en *Rhodobacteraceae* con un valor del 69% (Tabla 33). Por ello, para poder decidir si las especies *T. alkanivorans* y *R. roseus* deben reclasificarse en un mismo género, es necesario recurrir a la información fenotípica. Aunque la comparación fenotípica entre ambas especies muestra algunas disconformidades en cuanto a la movilidad, el requerimiento obligado de Na⁺ y la actividad de la enzima oxidasa, no existe suficiente diversidad fenotípica ni genotípica para considerar a la especie *R. roseus* miembro de un nuevo género. Por lo tanto, se plantea transferir la especie *Roseivivax roseus* al género *Tranquillimonas* como *Tranquillimonas rosea* comb. nov., con la necesidad de enmendar el género *Tranquillimonas*. Dentro de este clado, también se encuentran otros dos valores de AAI comprendidos dentro del rango propuesto del 68-71% para la demarcación de los géneros, los cuales hacen referencia a la relación entre las especies *Palleronia abyssalis* y *Maribius salinus* por un lado, y *Palleronia abyssalis* y *Maribius pelagius* por el otro (Tabla 33). No obstante, dado que ninguna de estas dos relaciones queda apoyada por la filogenia de *Rhodobacteraceae*, la posible agrupación bajo el mismo género queda descartada.

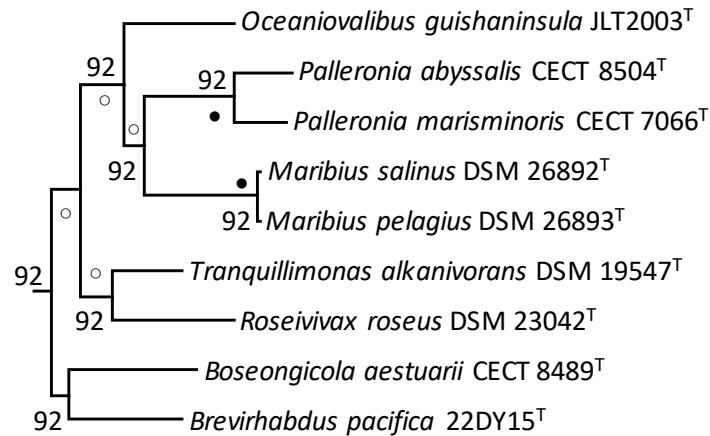


Fig. 30. Clado *Palleronia* extraído de la reconstrucción filogenómica de *Rhodobacteraceae* realizada mediante el programa UBCG utilizando las secuencias de aminoácidos. Circulo negro, respaldado por el árbol de consenso estricto; Circulo blanco, respaldado por el árbol de consenso mayoritario.

Tabla 33. Valores de AAI entre los genomas que conforman el clado *Palleronia* del árbol filogenómico de *Rhodobacteraceae*. Las especies tipo se señalan en negrita. Las celdas con valores superiores al umbral considerado para la demarcación de géneros en la presente tesis están sombreadas en verde, mientras que los que quedan dentro del rango de incertidumbre aparecen en amarillo.

AAI	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. <i>Palleronia marisminoris</i> CECT 7066^T	*								
2. <i>Palleronia abyssalis</i> CECT 8504 ^T	74	*							
3. <i>Maribius salinus</i> DSM 26892^T	66	68	*						
4. <i>Maribius pelagius</i> DSM 26893 ^T	66	69	97	*					
5. <i>Tranquillimonas alkanivorans</i> DSM 19547^T	65	64	66	66	*				
6. <i>Roseivivax roseus</i> DSM 23042 ^T	65	64	65	65	69	*			
7. <i>Oceaniovalibus guishaninsula</i> JLT2003^T	66	65	67	57	65	65	*		
8. <i>Brevirhabdus pacifica</i> 22DY15^T	61	62	63	63	65	63	63	*	
9. <i>Boseongicola aestuarii</i> CECT 8489^T	60	60	63	63	63	61	62	62	*

○ **Análisis clado *Shimia***

Por otro lado, la filogenia del coregenoma (Fig. 31) y los datos fenotípicos también indican que la especie tipo *Pseudopelagicola gijangensis* debe incluirse dentro del género *Shimia*. Asimismo, esta posible reclasificación queda sustentada por el índice AAI ya que, cuando dicha especie se analiza junto a *Shimia*, la identidad aminoacídica promedio obtenida, es del 70% mientras que la identidad aminoacídica promedio entre las especies que comprenden el género *Shimia* es del 73% (Tabla 34). En consecuencia, se propone trasladar *Pseudopelagicola gijangensis* al género *Shimia* como *Shimia gijangensis* comb. nov. (Arahal et al., 2019) y enmendar el género. Esta reclasificación elimina la especie tipo, y única hasta la fecha, del género *Pseudopelagicola*. Por otra parte, se observa que la especie *Thalassobius activus* comparte un elevado índice de identidad aminoacídica (78%) con la

especie tipo *Cognatishimia maritima*, hecho evidente teniendo en cuenta que esta última especie pertenecía al género *Thalassobius* antes de ser reclasificada por Wirth y Whitman (2018). Por lo tanto y para preservar la propuesta de estos autores, se propone reclasificar la especie *Thalassobius activus* dentro de *Cognatishimia* como *Cognatishimia activa* comb. nov. y enmendar el género. (Arahal *et al.*, 2019). Además, con esta nueva propuesta se soluciona el carácter polifilético del género *Thalassobius*, que pasa así a formar una unidad monofilética con un soporte de nodo del 100%.

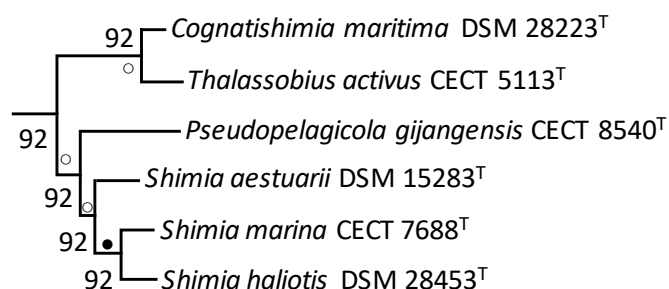


Fig. 31. Clado *Shimia* extraído de la reconstrucción filogenómica de *Rhodobacteraceae* realizada mediante el programa UBCG utilizando las secuencias de aminoácidos. Circulo negro, respaldado por el árbol de consenso estricto; Circulo blanco, respaldado por el árbol de consenso mayoritario.

Tabla 34. Valores de AAI entre los genomas que conforman el clado *Shimia* del árbol filogenómico de *Rhodobacteraceae*. Las especies tipo se señalan en negrita. Las celdas con valores superiores al umbral considerado para la demarcación de géneros en la presente tesis están sombreadas en verde, mientras que los que quedan dentro del rango de incertidumbre aparecen en amarillo.

AAI	1	2	3	4	5	6
1. <i>Shimia marina</i> CECT 7688^T	*					
2. <i>Shimia haliotis</i> DSM 28453^T	75	*				
3. <i>Shimia aestuarii</i> DSM 15283^T	73	74	*			
4. <i>Pseudopelagicola gijangensis</i> CECT 8540^T	70	71	73	*		
5. <i>Cognatishimia maritima</i> DSM 28223^T	68	67	68	67	*	
6. <i>Thalassobius activus</i> CECT 5113^T	67	67	67	68	78	*

○ **Análisis clado *Octadecabacter***

Otro clado susceptible a nuevas propuestas taxonómicas es el clado *Octadecabacter* (Fig. 32). Respecto a este clado, se observa que las especies tipo *Roseisalinus antarcticus* y *Oceanicola granulosus* comparten un valor límite del 70% de AAI (Tabla 35), lo que sugiere su posible agrupación en un mismo género. Respecto a las diferencias fenotípicas entre ambas especies, se observa que la especie *R. antarcticus* presenta capacidad de movilidad, producción de bacterioclorofila *a* y pigmentación rosada mientras que las especies afiliadas a *Oceanicola* producen colonias de color amarillo débil y no se ha observado en ellas capacidad de movilidad o producción de bacterioclorofila. Analizando dichas discrepancias se considera que no existen marcadas diferencias que se opongan a la inclusión de la especie *R. antarcticus* en el género *Oceanicola*, por lo que se propone transferir la especie *Roseisalinus antarcticus* al género *Oceanicola* bajo el nombre de *Oceanicola antarcticus* comb. nov. con la consecuente necesidad de enmendar el género *Oceanicola*. Asimismo, en la filogenia de *Rhodobacteraceae* es posible apreciar una estrecha relación entre la especie *Pseudooctadecabacter jejudonensis* y el género *Octadecabacter*, el cual alcanza un valor

mínimo de AAI del 74% (Tabla 35; color verde) cuando comprende a la especie *P. jejudonensis*. Aunque, Billerbeck *et al.* (2015) propusieron la reclasificación de *Octadecabacter jejudonensis* como *Pseudooctadecabacter jejudonensis* gen. nov., comb. nov., en base a los presentes datos comentados, se debe considerar que dicha reclasificación no supone una mejora taxonómica y es, por tanto, preferible emplear el nombre *Octadecabacter jejudonensis*.

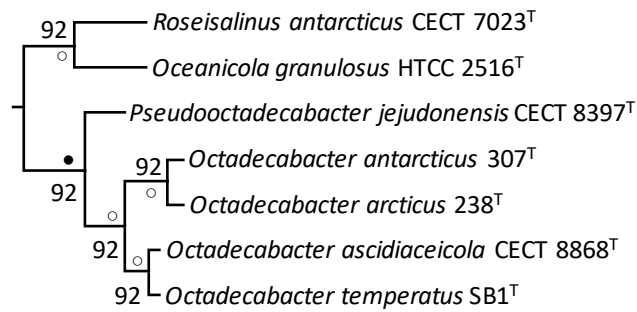


Fig. 32. Clado *Octadecabacter* extraído de la reconstrucción filogenómica de *Rhodobacteraceae* realizada mediante el programa UBCG utilizando las secuencias de aminoácidos. Circulo negro, respaldado por el árbol de consenso estricto; Circulo blanco, respaldado por el árbol de consenso mayoritario.

Tabla 35. Valores de AAI entre los genomas que conforman el clado *Octadecabacter* del árbol filogenómico de *Rhodobacteraceae*. Las especies tipo se señalan en negrita. Las celdas con valores superiores al umbral considerado para la demarcación de géneros en la presente tesis están sombreadas en verde.

AAI	1	2	3	4	5	6	7
1. <i>Roseisalinus antarcticus</i> CECT 7023^T	*						
2. <i>Oceanicola granulosus</i> HTCC 2516^T	70	*					
3. <i>Pseudooctadecabacter jejudonensis</i> CECT 8397^T	64	64	*				
4. <i>Octadecabacter arcticus</i> 238^T	63	62	74	*			
5. <i>Octadecabacter temperatus</i> SB1^T	63	63	75	78	*		
6. <i>Octadecabacter antarcticus</i> 307^T	63	63	75	78	100	*	
7. <i>Octadecabacter ascidiaceicola</i> CECT 8868^T	64	64	76	78	88	88	*

○ **Análisis clado *Rhodovulum***

Analizando el clado *Rhodovulum*, se aprecia que las especies clasificadas como *Halocynthiibacter namhaensis* y *Halocynthiibacter arcticus*, pese a ramificarse juntas, exhiben una baja identidad aminoacídica (61%; Tabla 36). Puesto que *H. namhaensis* es la especie tipo del género, se propone que la especie *H. arcticus* debe constituir un género nuevo. Por otra parte, se observa que la especie *Confluentimicrobium lipolyticum* comparte con las especies afiliadas al género *Actibacterium*, salvo una excepción del 66%, una identidad aminoacídica suficiente como para poder reunificar los dos géneros en uno, pese a existir también una excepción intragenérica del 67% en *Actibacterium*. Sin embargo, los datos filogenómicos no respaldan dicha reunificación (Fig. 33) y, por consiguiente, dichas

asignaciones taxonómicas mantienen su clasificación actual. Las especies restantes del clado también conservan su asignación taxonómica actual.

Tabla 36. Valores de AAI entre los genomas que conforman el clado *Rhodovulum* del árbol filogenómico de *Rhodobacteraceae*. Las especies tipo se señalan en negrita. Las celdas con valores superiores al umbral considerado para la demarcación de géneros en la presente tesis están sombreadas en verde, mientras que los que quedan dentro del rango de incertidumbre aparecen en amarillo.

AAI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. <i>Halocynthiibacter namhaensis</i> RA2_3 ^T	*												
2. <i>Halocynthiibacter arcticus</i> PAMC 20958 ^T	61	*											
3. <i>Pseudoruegeria aquimaris</i> CECT 7680 ^T	63	64	*										
4. <i>Actibacterium pelagium</i> JN33 ^T	62	61	65	*									
5. <i>Confluentimicrobium lipolyticum</i> CECT 8621 ^T	63	63	67	68	*								
6. <i>Actibacterium ureilyticum</i> LS_811 ^T	62	61	67	68	70	*							
7. <i>Actibacterium atlanticum</i> 22II_S11_z10 ^T	62	61	65	68	70	69	*						
8. <i>Actibacterium mucosum</i> KCTC 23349 ^T	62	61	65	66	68	67	68	*					
9. <i>Rhodovulum sulfidophilum</i> DSM 1374 ^T	60	59	64	63	66	65	65	63	*				
10. <i>Aliiroseovarius sediminilitoris</i> DSM 29439 ^T	63	62	65	64	65	65	64	63	62	*			
11. <i>Aliiroseovarius pelagivivens</i> CECT 8811 ^T	63	61	65	64	64	64	64	63	61	77	*		
12. <i>Aliiroseovarius crassostreae</i> DSM 16950 ^T	62	62	64	63	63	63	63	63	61	73	74	*	
13. <i>Maritimibacter alkaliphilus</i> HTCC 2654 ^T	60	59	63	62	63	64	63	61	61	65	65	65	*

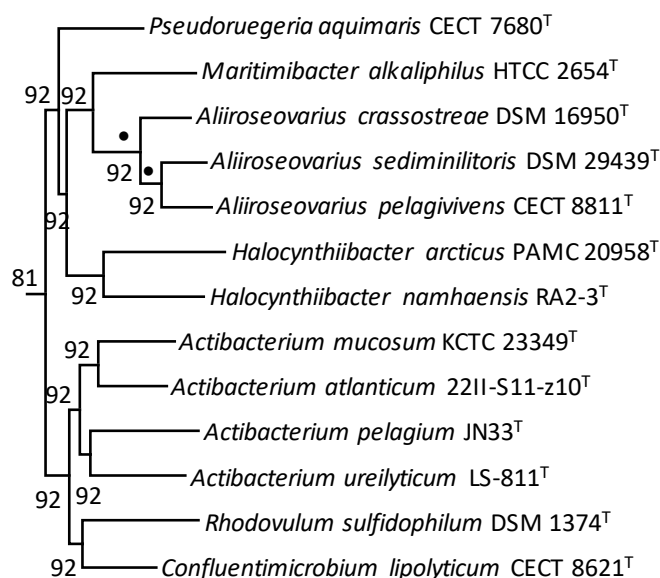


Fig. 33. Clado *Rhodovulum* extraído de la reconstrucción filogenómica de *Rhodobacteraceae* realizada mediante el programa UBCG utilizando las secuencias de aminoácidos. Circulo negro, respaldado por el árbol de consenso estricto; Circulo blanco, respaldado por el árbol de consenso mayoritario.

○ **Análisis clado *Thalassobius***

Asimismo, los resultados de las comparaciones del índice AAI en el clado *Thalassobius* (Tabla 37), sugieren que las especies *Pseudoceanicola batsensis*, *Pseudoceanicola atlanticus* (especie tipo), *Pseudoceanicola nitratireducens* y *Pseudoceanicola nanhaiensis* podrían formar un género separado respecto a *Pseudoceanicola marinus* y *Pseudoceanicola antarcticus*, puesto que estas dos últimas especies exhiben entre sí un valor de identidad aminoacídica (79%) significativamente superior al valor umbral para la demarcación de géneros propuesto, indicando que ambas especies se afilian al mismo género procariota. Sin embargo, cuando estas dos especies se analizan junto al resto de especies del género *Pseudoceanicola*, el valor de AAI para dicho género disminuye del 68 al 66%. Por consiguiente, en base a esta observación y al patrón de ramificación de las cepas en cuestión, se concluye que las especies *Pseudoceanicola marinus* y *Pseudoceanicola antarcticus* deben representar un nuevo género de la familia *Rhodobacteraceae*. Por otro lado, en la tabla 37 también se ha encontrado un porcentaje del 70% de AAI entre las especies tipo *Sediminimonas qiaohouensis* y *Lutimaribacter saemankumensis*. Sin embargo, este valor de AAI no está apoyado por la información filogenómica, por lo que para estas dos especies se sugiere mantener la clasificación actual. Finalmente, de igual forma se observa que la especie tipo *Litorimicrobium taeanense* se agrupa al género *Thalassobius* con un valor mínimo de identidad aminoacídica del 71%, lo que sugiere una nueva propuesta de reclasificación. En esta ocasión, este porcentaje aminoacídico sí que es congruente con el fenotipo y con la información derivada del árbol filogenómico (Fig. 34) y, por consiguiente, se postula transferir la especie tipo *Litorimicrobium taeanense* al género *Thalassobius* bajo el nombre de *Thalassobius taeanense* comb. nov., con la necesidad de enmendar el género *Thalassobius* respecto al contenido G+C.

Tabla 37. Valores de AAI entre los genomas que conforman el clado *Thalassobius* del árbol filogenómico de *Rhodobacteraceae*. Las especies tipo se señalan en negrita. Las celdas con valores superiores al umbral considerado para la demarcación de géneros en la presente tesis están sombreadas en verde, mientras que los que quedan dentro del rango de incertidumbre aparecen en amarillo.

AAI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. <i>Pseudoceanicola batsensis</i> HTCC 2597 ^T	*											
2. <i>Pseudoceanicola atlanticus</i> 22II_s11g ^T	78	*										
3. <i>Pseudoceanicola nitratireducens</i> CGMCC 1.7292 ^T	77	75	*									
4. <i>Pseudoceanicola nanhaiensis</i> DSM 18065 ^T	71	71	68	*								
5. <i>Pseudoceanicola marinus</i> CECT 7751 ^T	66	67	66	67	*							
6. <i>Pseudoceanicola antarcticus</i> CGMCC 1.12662 ^T	66	67	66	67	79	*						
7. <i>Sediminimonas qiaohouensis</i> DSM 21189 ^T	67	67	65	66	64	64	*					
8. <i>Lutimaribacter saemankumensis</i> DSM 28010 ^T	65	66	65	66	65	65	70	*				
9. <i>Litorimicrobium taeanense</i> DSM 22007 ^T	67	67	66	67	65	66	70	70	*			
10. <i>Thalassobius gelatinovorvus</i> CECT 4357 ^T	65	65	65	65	64	64	68	69	73	*		
11. <i>Thalassobius mediterraneus</i> CECT 5383 ^T	65	65	65	65	64	64	67	67	71	72	*	
12. <i>Thalassobius autumnalis</i> CECT 5118 ^T	65	65	65	65	64	64	67	67	71	72	100	*

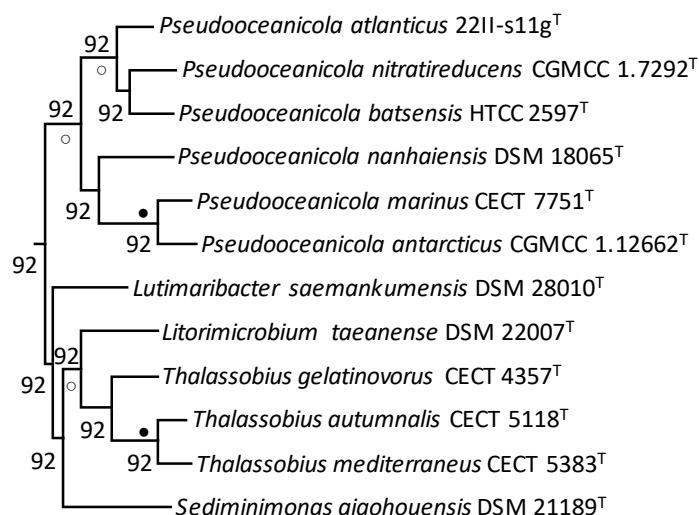


Fig. 34. Clado *Thalassobius* extraído de la reconstrucción filogenómica de *Rhodobacteraceae* realizada mediante el programa UBCG utilizando las secuencias de aminoácidos. Circulo negro, respaldado por el árbol de consenso estricto; Circulo blanco, respaldado por el árbol de consenso mayoritario.

○ **Análisis clado *Roseobacter***

Los resultados para el cálculo del índice AAI muestran que todas las especies que componen el clado *Roseobacter* están relacionadas de forma muy cercana, puesto que el valor mínimo de identidad aminoacídica para todo el conjunto es de un 67% (Tabla 38). Este porcentaje puede sugerir que todos los miembros de este clado podrían ser agrupados dentro del mismo género procarionta, aunque al recurrir al análisis filogenómico de *Rhodobacteraceae* (Fig. 35), pese a que refleja la estrecha relación entre los géneros observada a partir del AAI, se distinguen claramente dos unidades monofiléticas con un valor de soporte máximo, las cuales se corresponden con los géneros *Sulfitobacter* y *Roseobacter*, respectivamente. Del mismo modo, se distingue una tercera ramificación con un valor porcentual de soporte del 100% que se encuentra separada de los demás integrantes del género *Sulfitobacter* y que agrupa a la especie *Sulfitobacter pseudonitzschiae* con la especie tipo *Ascidiaaceihabitans donghaensis*, lo cual sugiere la reclasificación de *S. pseudonitzschiae* solucionando así la condición polifilética de este género. El valor de AAI entre estas dos especies es del 70% (Tabla 38) y los datos fenotípicos muestran que la especie *S. pseudonitzschiae* exhibe rasgos fenotípicos descritos para el género *Sulfitobacter*, pero difiere respecto a él en la capacidad para reducir nitrato. Así pues, considerando estos resultados fenotípicos y filogenómicos, se propone que la especie *Sulfitobacter pseudonitzschiae* se traslade al género *Ascidiaaceihabitans* y se le cambie el nombre por *Ascidiaaceihabitans pseudonitzschiae* comb. nov. con la necesidad de enmendar el género *Ascidiaaceihabitans*.

Tabla 38. Valores de AAI entre los genomas que conforman el clado *Roseobacter* del árbol filogenómico de *Rhodobacteraceae*. Las especies tipo se señalan en negrita. Las celdas con valores superiores al umbral considerado para la demarcación de géneros en la presente tesis están sombreadas en verde, mientras que los que quedan dentro del rango de incertidumbre aparecen en amarillo.

AAI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. <i>Sulfitobacter pseudonitzschiae</i> DSM 26824 ^T	*														
2. <i>Asciadiaceihabitans donghaensis</i> CECT 8599^T	70 *														
3. <i>Sulfitobacter donghicola</i> DSW_25 ^T	68	69 *													
4. <i>Sulfitobacter marinus</i> DSM 23422 ^T	69	68	71 *												
5. <i>Sulfitobacter litoralis</i> DSM 17584 ^T	70	68	71	79 *											
6. <i>Sulfitobacter pontiacus</i> DSM 10014^T	69	68	71	80	92 *										
7. <i>Sulfitobacter geojensis</i> MM_124 ^T	69	69	72	72	73	73 *									
8. <i>Sulfitobacter noctilucicola</i> NB_77 ^T	69	69	72	73	72	72	80 *								
9. <i>Sulfitobacter noctilucae</i> NB_68 ^T	69	69	72	73	72	72	79	81 *							
10. <i>Sulfitobacter brevis</i> DSM 11443 ^T	69	68	70	73	73	73	74	74	74 *						
11. <i>Sulfitobacter delicatus</i> DSM 16477 ^T	70	68	70	73	73	74	73	73	73	74 *					
12. <i>Sulfitobacter indolifex</i> HEL_45 ^T	70	68	70	73	73	73	73	73	73	75	88 *				
13. <i>Sulfitobacter dubius</i> DSM16472 ^T	69	68	70	72	73	73	73	73	73	74	88	92 *			
14. <i>Roseobacter denitrificans</i> Och_114 ^T	67	69	68	69	67	67	69	68	69	67	68	67	67 *		
15. <i>Roseobacter litoralis</i> Och_149^T	67	69	68	68	67	67	68	68	68	67	68	67	67	92 *	

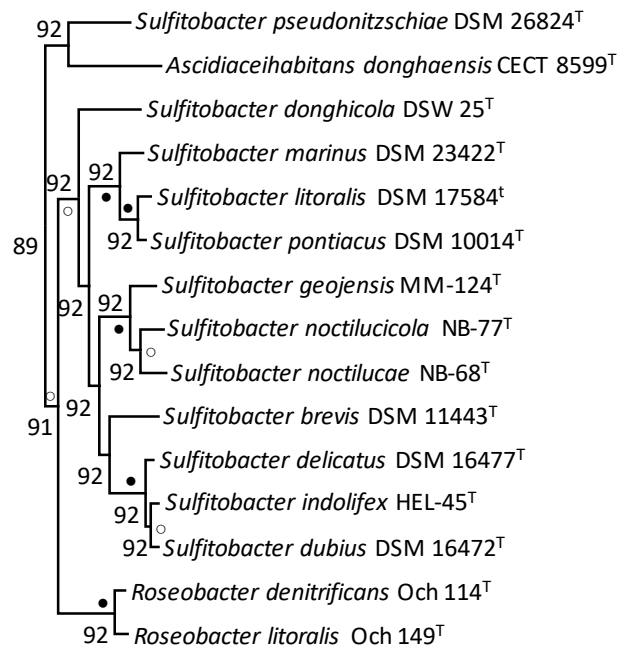


Fig. 35. Clado *Roseobacter* extraído de la reconstrucción filogenómica de *Rhodobacteraceae* realizada mediante el programa UBCG utilizando las secuencias de aminoácidos. Circulo negro, respaldado por el árbol de consenso estricto; Circulo blanco, respaldado por el árbol de consenso mayoritario.

○ **Análisis clado *Leisingera***

Un caso similar al anterior lo constituye el clado *Leisingera* (Fig. 36). Este clado está compuesto por especies asignadas a los géneros *Epibacterium*, *Pseudophaeobacter*, *Phaeobacter* y *Leisingera*; que comparten entre sí una elevada identidad aminoacídica que varía en un rango del 67–95% (Tabla 39), sugiriendo la reunificación de las especies en un mismo género que correspondería a *Leisingera* por ser el género más antiguo. Respecto a esta posible propuesta taxonómica, la información fenotípica muestra que la especie tipo del género *Epibacterium*, *E. ulvae*, a excepción del positivo en la galactosidasa, la utilización del manitol y la resistencia a la estreptomina presenta los mismos rasgos fenotípicos que las especies descritas en el género *Leisingera*. Así bien, la especie *E. multivorans* difiere respecto a la capacidad de hidrolizar el DNA, las actividades de la galactosidasa, la fosfatasa ácida y la α -glucosamina, la utilización de la manosa, la presencia del ácido graso fosfatidilcolina y, por último, junto a *E. mobile* en la actividad ureasa y la utilización del manitol. Asimismo, las especies *Pseudophaeobacter leonis* y *Pseudophaeobacter antarcticus*, anteriormente clasificadas como miembros del género *Phaeobacter*, al igual que las especies *Leisingera aquaemixtae*, *Leisingera caerulea* y *Leisingera daeponensis* (Breider *et al.*, 2014), discrepan respecto a la utilización del ácido cáprico y el ácido adípico, la actividad de la N-acetil-glucosidasa y la presencia de la fosfatidilcolina, además junto a las especies del género *Phaeobacter* difieren en la utilización de la maltosa, manosa y manitol y, la actividad esterasa lipasa. Por otra parte, las especies *P. piscinae* y *P. italicus*, también se diferencian respecto a *Leisingera* en cuanto a la actividad glucosidasa y la presencia en *P. piscinae* de la fosfatidilcolina. Por último, *P. inhibens* a diferencia del género *Leisingera* presenta una actividad débil de la fosfatasa ácida y la α -glucosidasa y muestra resistencia a la tetraciclina. Además, no es capaz de crecer sobre haluros de metilo y/o compuestos metilados y, puesto que ésta es la principal discrepancia fenotípica encontrada, se considera que los datos fenotípicos sustentan la nueva propuesta taxonómica. Además, la propuesta está avalada por el análisis de AAI puesto que, si en base a las diferencias fenotípicas encontradas, se mantiene la clasificación actual se encontrarían un alto número de excepciones (69 – 76% AAI) que no apoyarían dicha clasificación (Tabla 39), mientras que la clasificación en un mismo género solo presentaría 3 excepciones del 67%. Por tanto, considerando lo anterior y la congruencia con la filogenia de *Rhodobacteraceae*, se plantea agrupar los cuatro géneros del clado *Leisingera* bajo *Leisingera*, de forma que las especies *E. ulvae*, *E. mobile*, *E. multivorans*, *P. italicus*, *P. porticola*, *P. inhibens*, *P. piscinae*, *P. gallaeciensis*, *P. arcticus* y *P. leonis* se transfieran al género *Leisingera* como *Leisingera ulvae* comb. nov., *Leisingera mobilis* comb. nov., *Leisingera multivorans* comb. nov., *Leisingera italica* comb. nov., *Leisingera porticola* comb. nov., *Leisingera inhibens* comb. nov., *Leisingera piscinae* comb. nov., *Leisingera gallaeciensis* comb. nov., *Leisingera arctica* comb. nov. y *Leisingera leonis* comb. nov., con la necesidad de enmendar el género *Leisingera*.

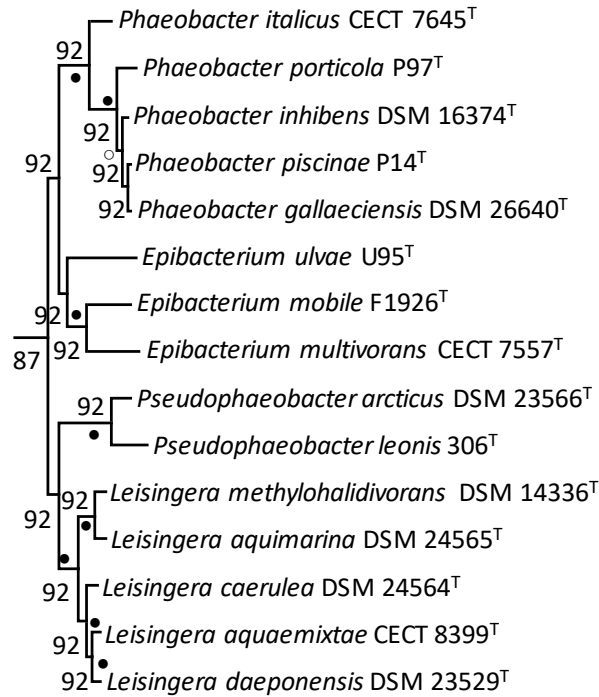


Fig. 36. Clado *Leisingera* extraído de la reconstrucción filogenómica de *Rhodobacteraceae* realizada mediante el programa UBCG utilizando las secuencias de aminoácidos. Circulo negro, respaldado por el árbol de consenso estricto; Circulo blanco, respaldado por el árbol de consenso mayoritario.

Tabla 39. Valores de AAI entre los genomas que conforman el clado *Leisingera* del árbol filogenómico de *Rhodobacteraceae*. Las especies tipo se señalan en negrita. Las celdas con valores superiores al umbral considerado para la demarcación de géneros en la presente tesis están sombreadas en verde, mientras que los que quedan dentro del rango de incertidumbre aparecen en amarillo.

AAI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. <i>Epibacterium multivorans</i> CECT 7757 ^T	*														
2. <i>Epibacterium mobile</i> F1926 ^T	73	*													
3. <i>Epibacterium ulvae</i> U95 ^T	69	68	*												
4. <i>Pseudophaeobacter leonis</i> 306 ^T	67	67	67	*											
5. <i>Pseudophaeobacter arcticus</i> DSM 23566 ^T	70	71	69	80	*										
6. <i>Phaeobacter piscinae</i> P14	71	72	70	72	74	*									
7. <i>Phaeobacter gallaeciensis</i> DSM 26640 ^T	71	71	70	71	74	95	*								
8. <i>Phaeobacter inhibens</i> DSM 16374 ^T	71	71	70	72	74	95	94	*							
9. <i>Phaeobacter porticola</i> P97 ^T	70	71	70	71	73	89	88	90	*						
10. <i>Phaeobacter italicus</i> CECT 7645 ^T	71	73	71	71	75	84	84	84	83	*					
11. <i>Leisingera methylohalidivorans</i> DSM 14336 ^T	71	71	70	72	74	76	74	75	75	75	*				
12. <i>Leisingera aquimarina</i> DSM 24567 ^T	70	71	70	72	73	75	75	75	75	75	91	*			
13. <i>Leisingera daeponensis</i> DSM 23529 ^T	71	72	70	72	74	75	75	75	75	75	87	86	*		
14. <i>Leisingera aquaemixtae</i> CECT 8399 ^T	71	72	70	72	74	75	75	75	75	76	87	87	96	*	
15. <i>Leisingera caerulea</i> DSM 24564 ^T	70	71	70	72	73	75	74	75	74	75	86	87	93	93	*

○ **Análisis clado *Roseovarius***

En la filogenia de *Rhodobacteraceae* también es posible contemplar que la especie tipo *Pelagicola litorisediminis* se ramifica dentro del clado formado por el género *Roseovarius* con el máximo valor de soporte (Fig. 37). Del mismo modo, esta asociación filogenómica está respaldada por los altos valores de AAI obtenidos entre las diferentes especies de *Roseovarius* y la especie *P. litorisediminis*, donde el mínimo valor de identidad aminoacídica obtenido para las diferentes comparaciones es del 68% (Tabla 40), lo que sugiere que todas las especies de este clado deben asignarse al género *Roseovarius*, pese a haberse encontrado algunas excepciones intragenéricas del 66-67%. En efecto, los datos fenotípicos avalan la reclasificación de la especie *Pelagimonas litorisediminis* en el género *Roseovarius*, puesto que únicamente exhiben discrepancias fenotípicas en cuanto a la capacidad de crecimiento a 45 °C y pH 5, que pasaría a nombrarse como *Roseovarius litorisediminis* comb. nov. con la necesidad de enmendar el género *Roseovarius*.

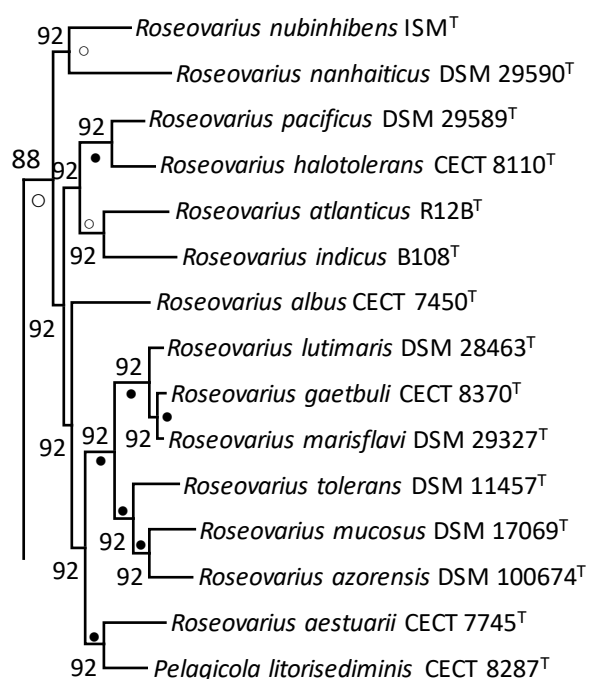


Fig. 37. Clado *Roseovarius* extraído de la reconstrucción filogenómica de *Rhodobacteraceae* realizada mediante el programa UBCG utilizando las secuencias de aminoácidos. Círculo negro, respaldado por el árbol de consenso estricto; Círculo blanco, respaldado por el árbol de consenso mayoritario.

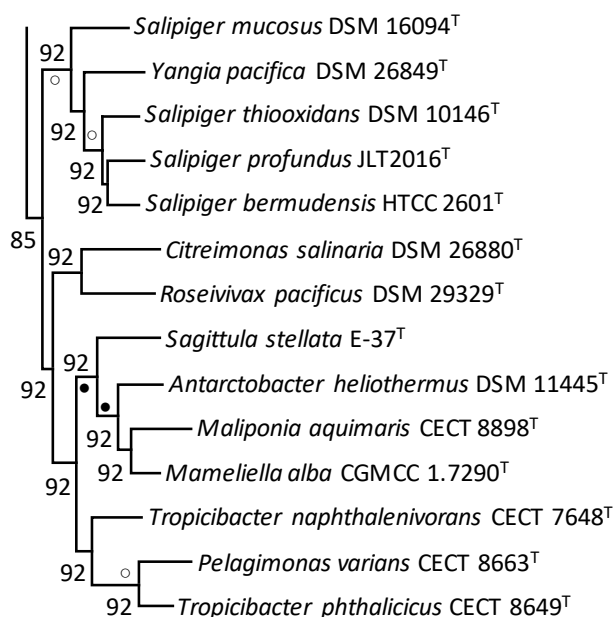
Tabla 40. Valores de AAI entre los genomas que conforman el clado *Roseovarius* del árbol filogenómico de *Rhodobacteraceae*. Las especies tipo se señalan en negrita. Las celdas con valores superiores al umbral considerado para la demarcación de géneros en la presente tesis están sombreadas en verde, mientras que los que quedan dentro del rango de incertidumbre aparecen en amarillo.

AAI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. <i>Roseovarius aestuarii</i> CECT 7745 ^T	*														
2. <i>Pelagicola litorisediminis</i> CECT 8287 ^T	75 *														
3. <i>Roseovarius albus</i> CECT 7450 ^T	70	70 *													
4. <i>Roseovarius nubinhibens</i> ISM ^T	70	70	68 *												
5. <i>Roseovarius nanhaiticus</i> DSM29590 ^T	67	68	66	69 *											
6. <i>Roseovarius indicus</i> B108 ^T	68	70	67	69	67 *										
7. <i>Roseovarius atlanticus</i> R12B ^T	69	70	67	69	67	72 *									
8. <i>Roseovarius pacificus</i> DSM 29589 ^T	69	72	68	69	68	70	70 *								
9. <i>Roseovarius halotolerans</i> CECT 8110 ^T	70	72	69	70	69	72	71	78 *							
10. <i>Roseovarius mucosus</i> DSM 17069 ^T	69	72	67	70	69	70	70	71	73 *						
11. <i>Roseovarius azorensis</i> DSM 100674 ^T	70	73	68	69	69	70	70	72	72	80 *					
12. <i>Roseovarius tolerans</i> DSM 11457 ^T	70	72	68	69	68	70	70	72	73	80	79 *				
13. <i>Roseovarius marisflavi</i> DSM 29327 ^T	71	75	68	69	69	70	69	71	72	77	78	77 *			
14. <i>Roseovarius gaetbuli</i> CECT 8370 ^T	71	76	69	69	69	70	69	72	73	78	78	77	93 *		
15. <i>Roseovaris lutimaris</i> DSM 28463 ^T	70	74	68	69	69	70	70	72	73	73	77	76	89	89 *	

○ **Análisis clado *Sagittula***

Respecto a las comparaciones de los cálculos del índice AAI derivados del clado *Sagittula* (Fig. 38), los resultados obtenidos muestran la presencia de cuatro grupos de organismos que deben ser separados en dos géneros diferentes (Tabla 41). La primera agrupación contiene valores de AAI comprendidos entre el 70-80% y está constituida por las especies descritas en el género *Salipiger* y la especie tipo *Yangia pacifica*. El valor mínimo de identidad aminoacídica de este grupo lo constituye el 70% que procede de la comparación entre las especies tipo *Y. pacifica* y *S. mucosus*, mientras que los resultados de las comparaciones con el resto de las especies de *Salipiger* son del 72% de AAI. Estos porcentajes sugieren la unión de la especie *Y. pacifica* en el género *Salipiger*. La información filogenómica y fenotípica, avala claramente dicha reunificación, puesto que no se han encontrado ninguna diferencia fenotípica, por lo que se sugiere trasladar la especie *Yangia pacifica* al género *Salipiger* como *Salipiger pacificus* comb. nov. La segunda agrupación que parece comprender un único género, en función de los valores obtenidos del índice AAI, es un caso llamativo puesto que alberga cuatro géneros diferentes actualmente descritos. Esta agrupación la forman las especies tipo, *Sagittulla stellata*, *Mameliella alba*, *Antarctobacter heliothermus* y *Maliponia aquimaris* con elevados valores de identidad aminoacídica que oscilan entre el 71 y el 80% (Tabla 41). Como en la agrupación anterior, tanto la filogenia de *Rhodobacteraceae* como los datos fenotípicos sugieren la unificación de las cinco especies bacterianas en un mismo género, siendo este *Sagittula*. Los datos fenotípicos muestran que dichas especies exhiben diferencias respecto al género *Sagittula* en cuanto a la formación de agregados o rosetas, excepto *M. alba*, y a la variación en el contenido G+C mol% (62,7 - 67,2). Otra diferencia encontrada es que *M. aquimaris* no es halófilo obligado. Por tanto,

sobre esta base y dado que las diferencias no son determinantes, se propone mover las especies *Mameliella alba*, *Antarctobacter heliothermus*, *Maliponia aquimaris*, al género *Sagittula* y nombrarlas como *Sagittula alba* comb. nov., *Sagittula heliotherma* comb. nov., y *Sagittula aquimaris* comb. nov., con la necesidad de enmendar el género *Sagittula*. Asimismo, la topología del árbol y los resultados del índice AAI también respaldan la agrupación de las especies *Pelagimonas varians* y *Tropicibacter phthalicus* bajo un mismo género, siendo este *Pelagimonas*, al exhibir un valor de soporte del 100% y un 76% de identidad aminoacídica. Por ello, se plantea reclasificar la especie *Tropicibacter phthalicus* al género *Pelagimonas*, siendo nombrada como *Pelagimonas phthalica* comb. nov. con la necesidad de enmendar el género *Pelagimonas*. Por último, la filogenia de *Rhodobacteraceae* también muestra que en este clado se ramifica la especie *Roseivivax pacificus* con *Citreimonas salinaria* con un valor porcentual de soporte del 100% en una rama independiente a las dos anteriores agrupaciones y con un 69% de AAI. *R. pacificus*, a excepción del resultado positivo en la prueba de la oxidasa y el contenido G+C mol%, comparte el resto de los rasgos fenotípicos de las especies asignadas al género *Citreimonas*, por lo que se propone transferir la especie *Roseivivax pacificus* al género *Citreicella* bajo el nombre de *Citreimonas pacifica* comb. nov., con la necesidad de enmendar el género *Citreimonas*. Dichas reclasificaciones solucionan el carácter polifilético del género *Roseivivax* y eliminan las especies tipo de los géneros *Yangia*, *Mameliella*, *Antarctobacter* y



Maliponia.

Fig. 38. Clado *Sagittula* extraído de la reconstrucción filogenómica de *Rhodobacteraceae* realizada mediante el programa UBCG utilizando las secuencias de aminoácidos. Circulo negro, respaldado por el árbol de consenso estricto; Circulo blanco, respaldado por el árbol de consenso mayoritario.

Tabla 41. Valores de AAI entre los genomas que conforman el clado *Sagittula* del árbol filogenómico de *Rhodobacteraceae*. Las especies tipo se señalan en negrita. Las celdas con valores superiores al umbral considerado para la demarcación de géneros en la presente tesis están sombreadas en verde, mientras que los que quedan dentro del rango de incertidumbre aparecen en amarillo.

AAI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. <i>Tropicibacter naphthalenivorans</i> CECT 7648 ^T	*													
2. <i>Sagittula stellata</i> E_37 ^T	72 *													
3. <i>Mameliella alba</i> CGMCC 1.7290 ^T	72	72 *												
4. <i>Antarctobacter heliothermus</i> DSM 11445 ^T	72	72	80 *											
5. <i>Maliponia aquimaris</i> CECT 8898 ^T	71	71	78	77 *										
6. <i>Tropicibacter phthalicus</i> CECT 8649 ^T	70	68	69	69	68 *									
7. <i>Pelagimonas varians</i> CECT 8663 ^T	70	67	68	69	68	76 *								
8. <i>Roseivivax pacificus</i> DSM 29329 ^T	68	66	68	67	67	65	65 *							
9. <i>Citreimonas salinaria</i> DSM 26880 ^T	68	67	69	68	68	66	66	69 *						
10. <i>Yangia pacifica</i> DSM 26849 ^T	67	66	66	66	65	65	64	67	65 *					
11. <i>Salipiger mucosus</i> DSM 16094 ^T	67	67	68	66	66	65	64	68	67	70 *				
12. <i>Salipiger profundus</i> JLT2016 ^T	69	67	68	67	66	66	66	69	66	72	74 *			
13. <i>Salipiger bermudensis</i> HTCC 2601 ^T	69	67	68	67	67	67	65	67	66	72	72	80 *		
14. <i>Salipiger thiooxidans</i> DSM 10146 ^T	68	67	67	67	66	66	65	67	66	72	72	79	79 *	

○ **Análisis clado *Paracoccus***

Por último, los resultados derivados de las comparaciones de identidad aminoacídica entre las cepas que conforman el clado *Paracoccus* (Fig. 39) junto con el análisis filogenómico de *Rhodobacteraceae*, sugieren que las cepas bacterianas numeradas del 1 al 9 en la tabla 42, deben asignarse cada una de ellas a géneros diferentes. En base a esto, las especies *Paenirhodobacter enshiensis* y *Gemmobacter aquatilis* mantendrían su clasificación actual puesto que son las especies tipo de sus respectivos géneros. Así bien, las dos especies del género *Rhodobacter*, *R. maris* y *R. vinaykumarii* se ramifican de forma separada entre sí, con un valor de soporte máximo, y de las otras dos especies restantes del género, las cuales se agrupan juntas, lo que indica la necesidad de reclasificar el género. Sin embargo, dado que el análisis filogenómico no cuenta con la especie tipo del género *Rhodobacter* (*R. capsulatus*), no se puede establecer una conclusión taxonómica para dicho género, por lo que por el momento mantendrá la clasificación actual. De igual forma sucede en las especies de los géneros *Paracoccus* y *Defluviimonas*. Por otra parte, la especie *Pseudorhodobacter psychrotolerans* se agrupa con un valor de soporte máximo con la especie tipo *Gemmobacter aquatilis* y con un porcentaje de AAI del 69%. Así pues, dado que dicho valor se encuentra dentro del rango establecido para la demarcación de los géneros y ambas cepas comparten los mismos rasgos fenotípicos, a excepción del contenido G+C mol%, se propone transferir la especie *Pseudorhodobacter psychrotolerans* al género *Gemmobacter* y nombrarla como *Gemmobacter psychrotolerans* comb. nov. con la necesidad de enmendar el género *Gemmobacter*. Por otro lado, la baja identidad aminoacídica (< 68%; muestra una excepción del 70%) de la especie restante del género *Gemmobacter*, *G. nectariphilus*, con respecto a los demás miembros del clado y su ramificación de forma aislada, sugiere que dicha especie debe reclasificarse en un nuevo género. No obstante, *G. nectariphilus*

anteriormente era la especie tipo del género *Catellibacterium* (Tanaka *et al.*, 2004), por lo que, teniendo en cuenta las observaciones comentadas, se propone no utilizar la reclasificación de Chen *et al.* (2013) y considerarla por tanto dentro del género *Catellibacterium*. Finalmente, los géneros restantes que conforman el clado; *Haematobacter*, *Pseudorhodobacter* y *Thioclava*, forman unidades monofiléticas con un 100% de soporte y una identidad aminoacídica promedio significativamente superior al rango del 68-71% para la delimitación de los géneros (Tabla 42) por lo que mantienen su clasificación actual. Para finalizar, también mantienen su clasificación actual, las asignaciones taxonómicas de los restantes clados que conforman el presente análisis filogenómico de *Rhodobacteraceae* (Fig. S1; Anexo II) ya que a pesar de haber encontrados valores de AAI a nivel intergénero incluidos en el rango 68-71%, los datos filogenómicos confirman la preservación de la taxonomía actual.

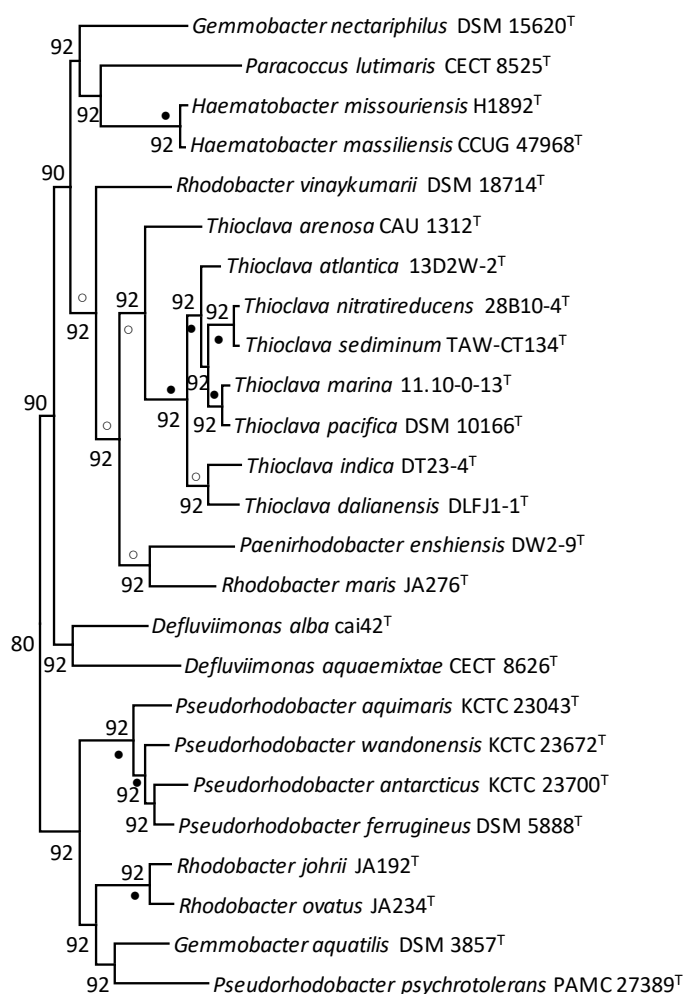


Fig. 39. Clado *Paracoccus* extraído de la reconstrucción filogenómica de *Rhodobacteraceae* realizada mediante el programa UBCG utilizando las secuencias de aminoácidos. Circulo negro, respaldado por el árbol de consenso estricto; Circulo blanco, respaldado por el árbol de consenso mayoritario.

Tabla 42. Valores de AAI entre los genomas que conforman el clado *Paracoccus* del árbol filogenómico de *Rhodobacteraceae*. Las especies tipo se señalan en negrita. Las celdas con valores superiores al umbral considerado para la demarcación de géneros en la presente tesis están sombreadas en verde, mientras que los que quedan dentro del rango de incertidumbre aparecen en amarillo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1. <i>Rhodobacter maris</i> JA276 ^T	*																								
2. <i>Rhodobacter vinaykumarii</i> DSM 18714 ^T	68	*																							
3. <i>Paenirhodobacter enshiensis</i> DW2-9 ^T	68	64	*																						
4. <i>Paracoccus lutimaris</i> CECT 8525 ^T	62	63	61	*																					
5. <i>Pseudorhodobacter psychrotolerans</i> PAMC 27389 ^T	61	62	60	59	*																				
6. <i>Gemmobacter aquatilis</i> DSM 3857 ^T	64	65	63	62	69	*																			
7. <i>Gemmobacter nectariphilus</i> DSM 15620 ^T	63	65	62	62	63	66	*																		
8. <i>Defluviimonas aquaemixtae</i> CECT 8626 ^T	63	64	61	61	62	64	63	*																	
9. <i>Defluviimonas alba</i> cai42 ^T	65	67	64	62	63	67	65	65	*																
10. <i>Rhodobacter ovatus</i> JA234 ^T	65	67	63	63	66	70	68	65	67	*															
11. <i>Rhodobacter johrii</i> JA192 ^T	64	65	62	62	64	68	65	63	66	81	*														
12. <i>Haematobacter massiliensis</i> CCUG 47968 ^T	61	63	62	61	60	63	63	61	64	64	63	*													
13. <i>Haematobacter missouriensis</i> H1892 ^T	61	62	62	61	60	63	62	61	64	65	63	92	*												
14. <i>Pseudorhodobacter wandonensis</i> KCTC 23672 ^T	62	63	60	60	66	68	64	64	64	67	66	61	61	*											
15. <i>Pseudorhodobacter ferrugineus</i> DSM 5888 ^T	63	63	60	60	66	68	64	65	64	68	66	61	61	82	*										
16. <i>Pseudorhodobacter antarcticus</i> HCTC 23700 ^T	62	63	60	60	65	67	64	64	63	67	65	61	61	77	70	*									
17. <i>Pseudorhodobacter aquimaris</i> KCTC 23043 ^T	62	63	60	60	64	67	64	63	63	67	65	61	61	76	76	76	*								
18. <i>Thioclava pacifica</i> DSM 10166 ^T	69	68	66	62	61	64	63	64	65	64	63	62	62	62	62	62	62	*							
19. <i>Thioclava marina</i> 11.10_0_13 ^T	69	67	66	62	61	64	63	64	65	64	63	61	61	62	63	62	62	93	*						
20. <i>Thioclava atlantica</i> 13D2W_2 ^T	68	68	66	61	61	64	63	63	65	63	63	62	62	62	62	62	62	83	83	*					
21. <i>Thioclava sediminum</i> TAW_CT134 ^T	68	66	65	61	60	63	62	63	64	63	62	60	60	62	61	61	61	84	84	81	*				
22. <i>Thioclava nitratireducens</i> 28B10_4 ^T	67	66	65	61	60	63	61	63	63	63	62	60	60	61	61	62	62	83	83	81	94	*			
23. <i>Thioclava indica</i> DT23_4 ^T	68	66	65	61	61	63	62	63	64	63	62	61	60	62	62	62	62	79	79	78	77	77	*		
24. <i>Thioclava dalianensis</i> DLFJ1_1 ^T	66	66	64	60	60	62	62	62	64	62	61	60	60	62	61	61	62	77	76	77	76	76	79	*	
25. <i>Thioclava arenosa</i> CAU 1312 ^T	71	69	67	63	63	66	65	66	67	65	65	63	62	64	63	63	64	73	73	72	71	71	71	70	*

ENMIENDA DEL GÉNERO *TROPICIMONAS* HARWATI ET AL. 2009 EMEND. OH ET AL. 2012.

La descripción es la misma que dan Harwati *et al.* (2009) y Oh *et al.* (2012) con las siguientes enmiendas. La mayoría de las especies son móviles mediante flagelos peritricos, pero algunas especies pueden ser no flageladas. La mayoría de las especies requieren iones de sodio para el crecimiento, pero algunas especies pueden crecer en ausencia de iones de sodio. Actividad de la catalasa variable. Las colonias son blancas o amarillas grisáceas en MA. El contenido G+C basado en el genoma es 62,3-66,4 mol%. La especie tipo es *Tropicimonas isoalkanivorans*.

DESCRIPCIÓN DE *TROPICIMONAS LUTIMARIS* COMB. NOV.

Tropicimonas lutimaris (*lu.ti.ma'ris*. L. n. *lutum* fango; L. gen. n. *maris* del mar, marino; N.L. gen. n. *lutimaris* de un fango marino).

Basónimo: *Pseudoruegeria lutimaris* Jung *et al.* 2010.

La descripción de la especie es la misma que la de *Pseudoruegeria lutimaris* (Jung *et al.*, 2010). La cepa tipo es HD-43^T (=CCUG 57754^T =DSM 25294^T =KCTC 22690^T).

DESCRIPCIÓN DE *TROPICIMONAS MARINISTELLAE* COMB. NOV.

Tropicimonas marinistellae (*ma.ri.ni.stel'lae*. L. adj, *marinus* del mar; L. fem. n. *stella* estrella; N.L. gen. n. *marinistellae* de una estrella del mar).

Basónimo: *Pseudoruegeria marinistellae* Zhang *et al.*, 2017.

La descripción de la especie es la misma que la de *Pseudoruegeria marinistellae* (Zhang *et al.*, 2017). La cepa tipo es SF-16^T (=KCTC 42910^T =MCCC 1K01155^T).

DESCRIPCIÓN DE *TROPICIMONAS SABULILITORIS* COMB. NOV.

Tropicimonas sabulilitoris (*sa.bu.li.li.to'ris*. L. n. *sabulum* arena; L. n. *litus -oris* de la orilla del mar, costa; N.L. gen. n. *sabulilitoris* de la arena de la orilla del mar).

Basónimo: *Pseudoruegeria sabulilitoris* Park *et al.* 2014.

La descripción de la especie es la misma que la de *Pseudoruegeria sabulilitoris* (Park *et al.*, 2014a). La cepa tipo es GJMS-35^T (=KCTC 42111^T =NBRC 110380^T).

ENMIENDA DEL GÉNERO *TRANQUILLIMONAS* HARWATI ET AL. 2008

La descripción es la misma que da Harwati *et al.* (2008) con las siguientes enmiendas. Las especies pueden ser móviles mediante flagelo subpolar. Principalmente halófilas obligadas; algunas pueden sustituir el NaCl por KCl o MgCl₂. Actividad oxidasa variable. El contenido G+C es 67,2-67,8 mol%. La especie tipo es *Tranquillimonas alkalivorans*.

DESCRIPCIÓN DE *TRANQUILLIMONAS ROSEA* COMB. NOV.

Tranquillimonas rosea (*ro.se'a*. L. fem. adj. *rosea*, color rosa o rosado, refiriéndose al color rosado de las colonias).

Basónimo: *Roseivivax roseus* Zhang *et al.* 2014.

La descripción de la especie es la misma que la de *Roseivivax roseus* (Zhang *et al.*, 2014). La cepa tipo es BH87090^T (=DSM 23042^T =KCTC 22650^T).

ENMIENDA DEL GÉNERO *SHIMIA* CHOI & CHO 2006 EMEND. HAMEED ET AL. 2013

La descripción es la misma que la de Choi & Cho (2006a), Hameed *et al.* (2013) con la siguiente enmienda. El contenido G+C es 54,9-60,4 mol%. La especie tipo es *Shimia marina*.

DESCRIPCIÓN DE *SHIMIA GIJANGENSIS* COMB. NOV.

Shimia gijangensis (gi.jang.en'sis. N.L. masc. adj. *gijangensis* perteneciente a Gijang, la ubicación del Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, donde se caracterizó la cepa tipo).

Basónimo: *Pseudopelagicola gijangensis* Kim *et al.* 2014.

La descripción de la especie es la misma que la de *Pseudopelagicola gijangensis* (Kim *et al.*, 2014c). La cepa tipo es YSS-7^T (=CECT 8540^T =KCTC 42049^T).

ENMIENDA DEL GÉNERO *COGNATISHIMIA* WIRTH & WHITMAN 2018

La descripción es la misma que la de Wirth y Whitman (2018) con las siguientes enmiendas. Las células son cocoides o en forma bacilar. El requerimiento de Na⁺ y la reducción de nitrato son variables. El contenido G+C es 54,5-57,0 mol%. La cepa tipo es *Cognatishimia marítima*.

DESCRIPCIÓN DE *COGNATISHIMIA ACTIVA* COMB. NOV.

Cognatishimia activa (ac.ti'va. L. fem. adj. *activa*, referido al potencial metabólico de la cepa tipo).

Basónimo: *Thalassobius activus* Pujalte *et al.* 2018.

La descripción de la especie es la misma que la de *Thalassobius activus* (Pujalte *et al.*, 2018). La cepa tipo es 11SM13^T (=CECT 5113^T =LMG 29900^T).

ENMIENDA DEL GÉNERO *OCEANICOLA* CHO & GIOVANNONI 2004

La descripción es la misma que la de Cho y Giovannoni (2004) con las siguientes enmiendas. Algunas especies pueden producir bacterioclorofila *a* y ser móviles. La pigmentación de la colonia es rojiza o amarillenta. El contenido G+C basado en el genoma es 66,7 -70,3 mol%. La especie tipo es *Oceanicola granulatus*.

DESCRIPCIÓN DE *OCEANICOLA ANTARCTICUS* COMB. NOV.

Oceanicola antarcticus (ant.arc.'ti.cus. N. L. adj. *antarcticus*, perteneciente a la Antártida).

Basónimo: *Roseisalinus antarcticus* Labrenz *et al.* 2005.

La descripción de la especie es la misma que la de *Roseisalinus antarcticus* (Labrenz *et al.*, 2005). La cepa tipo es EL-88^T (=CECT 7023^T =DSM 11466^T).

ENMIENDA DEL GÉNERO *THALASSOBIUS* ARAHAL ET AL. 2005

La descripción es la misma que dan Arahal *et al.* (2005) con la siguiente enmienda. El contenido G+C basado en el genoma es 54,5-60,5 mol%. La especie tipo es *Thalassobius mediterraneus*.

DESCRIPCIÓN DE *THALASSOBIUS TAEANENSE* COMB. NOV.

Thalassobius taeanense (ta.e.a.nen'se. N.L. neut. adj. *taeanense* o perteneciente a Taean, donde se aisló el organismo).

Basónimo: *Litorimicrobium taeanense* Jin *et al.* 2011.

La descripción de la especie es la misma que *Litorimicrobium taeanense* (Jin *et al.*, 2011). La cepa tipo es G4^T (=DSM 22007^T = KACC 13706^T).

ENMIENDA DEL GÉNERO ASCIDIACEIHABITANS KIM ET AL. 2014

La descripción es la misma que dan Kim *et al.* (2014d) con las siguientes enmiendas. La reducción de nitrato es variable. El contenido G+C es 55,3-60,5 mol%. La especie tipo es *Ascidiaceihabitans donghaensis*.

DESCRIPCIÓN DE ASCIDIACEIHABITANS PSEUDONITZSCHIAE COMB. NOV.

Ascidiaceihabitans pseudonitzschiae (pseu.do.nitz'schi.ae. N.L. gen. n. *pseudonitzschiae* que se refiere a la diatomea *Pseudo-nitzschia multiseriata*, a partir de la cual se aisló la cepa tipo).

Basónimo: *Sulfitobacter pseudonitzschiae* Hong *et al.* 2015.

La descripción de la especie es la misma que *Sulfitobacter pseudonitzschiae* Hong *et al.* (2015). La cepa tipo es H3^T (=DSM 26824^T =MCCC 1A00686^T).

ENMIENDA DEL GÉNERO LEISINGERA SCHÄFER ET AL. 2002 EMEND. MARTENS ET AL. 2006 EMEND. VANDECANDELAERE ET AL. 2008 EMEND. BREIDER ET AL. 2014

La descripción es la misma que la que dan Schaefer *et al.*, (2002), Martens *et al.* (2006), Vandecandelaere *et al.*, (2008) y Breider *et al.* (2014) con las siguientes enmiendas. Algunas especies pueden hidrolizar el DNA. La actividad de la ureasa, galactosidasa, glucosidasa fosfatasa ácida, α -glucosamina, N-acetil- β -glucosaminidasa, esterasa y lipasa es variable. Algunas especies son capaces de utilizar la manosa, la maltosa, el manitol, el ácido cáprico y el ácido adípico. Pueden presentar resistencia a la estreptomycin y fosfatidilcolina como ácido graso. El contenido G+C es 52,9-64,4 mol%. La especie tipo es *Leisingera methylohalidivorans*.

DESCRIPCIÓN DE LEISINGERA ARCTICA COMB. NOV.

Leisingera arctica (arc'ti.ca. L. fem. adj. *arctica* del Ártico, referido al lugar donde se aisló la cepa).

Basónimo: *Phaeobacter arcticus* Zhang *et al.* 2008.

Otro sinónimo: *Pseudophaeobacter arcticus* (Zhang *et al.* 2008) Breider *et al.* 2014.

La descripción es la misma que *Phaeobacter arcticus* (Zhang *et al.*, 2008) y *Pseudophaeobacter arcticus* (Breider *et al.*, 2014). La cepa tipo es, 20188^T (=CGMCC 1.6500^T =DSM 23566^T =JCM 14644^T).

DESCRIPCIÓN DE LEISINGERA GALLAECIENSIS COMB. NOV.

Leisingera gallaeciensis (gal.lae.ci.en'sis. L. fem. adj. *gallaeciensis* perteneciente a *Gallaecia* el nombre romano de Galicia, region de España).

Basónimo: *Roseobacter gallaeciensis* Ruiz-Ponte *et al.* 1998.

Otro sinónimo: *Phaeobacter gallaeciensis* (Ruiz-Ponte *et al.* 1998) Martens *et al.* 2006.

La descripción es la misma que *Roseobacter gallaeciensis* (Ruiz-Ponte *et al.*, 1998) y *Phaobacter gallaeciensis* (Martens *et al.*, 2006). La cepa tipo es BS 107^T (=CIP 105210^T =DSM 26640^T =IAM 14812^T).

DESCRIPCIÓN DE *LEISINGERA INHIBENS* COMB. NOV.

Leisingera inhibens (in.hi'bens. L. part. adj. *inhibens* inhibiendo).

Basónimo: *Phaeobacter inhibens* Martens *et al.* 2006.

La descripción es la misma que *Phaeobacter inhibens* (Martens *et al.*, 2006) emend. (Vandecandelaere *et al.*, 2008). La cepa tipo es T5^T (=DSM 16374^T =LMG 22475^T).

DESCRIPCIÓN DE *LEISINGERA ITALICA* COMB. NOV.

Leisingera italica (i.ta'li.ca. L. fem. adj. *italica* de Italia, lugar donde aisló la cepa).

Basónimo: *Nautella italica* Vandecandelaere *et al.* 2009.

Otro sinónimo: *Phaeobacter italicus* (Vandecandelaere *et al.* 2009) Wirth & Whitman 2018.

La descripción es la misma que *Nautella italica* (Vandecandelaere *et al.*, 2009) y *Phaeobacter italicus* (Wirth & Whitman 2018). La cepa tipo es CCUG 55857^T (=CECT 7645^T =LMG 24365^T).

DESCRIPCIÓN DE *LEISINGERA LEONIS* COMB. NOV.

Leisingera leonis (le.o'nis., L. gen n. *leonis*, de un leon, nombrado así por el seno Leonis, el nombre en latín mediieval del Golfo de los Leones, en referencia al origen de la cepa).

Basónimo: *Phaeobacter leonis* Gaboyer *et al.* 2013.

Otro sinónimo: *Pseudophaeobacter leonis* (Gaboyer *et al.* 2013) Breider *et al.* 2014.

La descripción es la misma que *Phaeobacter leonis* (Gaboyer *et al.*, 2013) y *Pseudophaeobacter leonis* (Breider *et al.*, 2014). La cepa tipo es 306^T (=CIP 110369^T =DSM 25627^T).

DESCRIPCIÓN DE *LEISINGERA MOBILIS* COMB. NOV.

Phaeobacter mobilis (mo`bi.lis. L. adj. *mobilis* móvil).

Basónimo: *Ruegeria mobilis* Muramatsu *et al.* 2007

Otro sinónimo: *Epibacterium mobile* (Muramatsu *et al.* 2007) Wirth & Whitman 2018.

La descripción de la especie es la misma que *Ruegeria mobilis* (Muramatsu *et al.*, 2007) y *Epibacterium mobile* (Wirth & Whitman, 2018). La cepa tipo es F1926^T (=CIP 109181^T =DSM 23403^T =MBIC 01146^T =NBRC 101030^T).

DESCRIPCIÓN DE *LEISINGERA MULTIVORANS* COMB. NOV.

Leisingera multivorans (mul'ti.vor'ans. L. adj. *multi* mucho, numerosos; L. v. *vorare* de devorar; N.L. part. adj. *multivorans* que devora mucho, referido a la utilización de múltiples sustratos para crecer).

Basónimo: *Tropicibacter multivorans* Lucena *et al.* 2012.

Otro sinónimo: *Epibacterium multivorans* (Lucena *et al.* 2012) Wirth & Whitman 2018.

La descripción es la misma que *Tropicibacter multivorans* (Lucena *et al.*, 2012) y *Epibacterium multivorans* (Wirth & Whitman). La cepa tipo es MD5^T (=CECT 7557^T =KCTC 23350^T).

DESCRIPCIÓN DE *LEISINGERA PISCINAE* COMB. NOV.

Leisingera piscinae (pis.ci'nae. L. gen. n. *piscinae* de un estanque de peces, acuicultura).

Basónimo: *Phaeobacter piscinae* Sonnenschein *et al.* 2017.

La descripción es la misma que *Phaeobacter piscinae* (Sonnenschein *et al.*, 2017b). La cepa tipo es P14^T (=27-4^T =DSM 103509^T =LMG 29708^T).

DESCRIPCIÓN DE *LEISINGERA PORTICOLA* COMB. NOV.

Leisingera porticola (por.ti'co.la. L. n. *portus* puerto; L. suff. *-cola* derivado de L. n. *incola* habitante; N.L. masc. n. *porticola* un habitante de un puerto).

Basónimo: *Phaeobacter porticola* Breider *et al.* 2017.

La descripción es la misma que *Phaeobacter porticola* (Breider *et al.*, 2017). La cepa tipo es P97^T (=DSM 103148^T =LMG 29594^T).

DESCRIPCIÓN DE *LEISINGERA ULVAE* COMB. NOV.

Phaeobacter ulvae (ul'va.e. N.L. gen. n. *ulvae* de/a partir de *Ulva*, aislada a partir del alga marina *Ulva australis*).

Basónimo: *Epibacterium ulvae* Penesyan *et al.* 2013.

La descripción de la especie es la misma que *Epibacterium ulvae* (Penesyan *et al.*, 2013). La cepa tipo es U95^T (=DSM 24752^T =LMG 26464^T).

ENMIENDA DEL GÉNERO *ROSEOVARIUS* LABRENZ ET AL. 1999

La descripción es la misma que la que dan Labrenz *et al.* (1999) con las siguientes enmiendas. La capacidad de crecimiento a 45 °C es variable. El crecimiento óptimo se produce en un rango de pH 5-9. El ácido graso predominante es C_{18:1} ω7c. La especie tipo es *Roseovarius tolerans*.

DESCRIPCIÓN DE *ROSEOVARIUS LITORISEDIMINIS* COMB. NOV.

Roseovarius litorisediminis (li.to.ri.se.di'mi.nis. L. n. *litus -oris* orilla del mar, costa; L. n. *sedimen -inis* sedimento; N.L. gen. n. *litorisediminis* de un sedimento de la costa del mar).

Basónimo: *Pelagicola litorisediminis* Park *et al.* 2013.

La descripción es la misma que *Pelagicola litorisediminis* (Park *et al.*, 2013a). La cepa tipo es D1-W8^T (=CECT 8287^T =KCTC 32327^T).

DESCRIPCIÓN DE *SALIPIGER PACIFICUS* COMB. NOV.

Salipiger pacificus (pa.cí.fi.cus. M.L. masc. adj. *pacificus* del Pacífico, perteneciente al sitio de su primer aislamiento).

Basónimo: *Yangia pacifica* Dai *et al.* 2006.

La descripción de la especie es la misma que *Yangia pacifica* (Dai *et al.*, 2006). La cepa tipo es X5-10^T (=CGMCC 1.3455^T =DSM 26849^T =JCM 12573^T).

ENMIENDA DEL GÉNERO *SAGITTULA* GONZÁLEZ *ET AL.* 1997 EMEND. LEE *ET AL.* 2013

La descripción es la misma que dan González *et al.* (1997) y Lee *et al.* (2013a) con las siguientes enmiendas. Las células pueden o no formar agregados o rosetas en medio líquido. La mayoría son halófilas obligadas; algunas de ellas pueden crecer en ausencia de NaCl. El contenido G+C basado en el genoma es 62,7-67,2 mol%. La especie tipo es *Sagittula stellata*.

DESCRIPCIÓN DE *SAGITTULA ALBA* COMB. NOV.

Sagittula alba (al'ba. L. fem. adj. *alba* blanco).

Basónimo: *Mameliella alba* Zheng *et al.* 2010.

La descripción es la misma que la de *Mameliella alba* (Zheng *et al.*, 2010) emend. (Liu *et al.*, 2018b). La cepa tipo es JLT354-W^T (=CGMCC 1.7290^T =LMG 24665^T).

DESCRIPCIÓN DE *SAGITTULA HELIOTHERMA* COMB. NOV.

Sagittula heliotherma (he.li.o.ther'ma. Gr. n. *helios* sol; Gr. adj. *thermos* caliente; M.L. fem. adj. *heliotherma* calentado por el sol, en referencia a las aguas del lago Ekho, dónde la especie se aisló).

Basónimo: *Antarctobacter heliothermus* Labrenz *et al.* 1998.

La descripción es la misma que la de *Antarctobacter heliothermus* (Labrenz *et al.*, 1998). La cepa tipo es EL-219^T (=CIP 106394^T =DSM 11445^T).

DESCRIPCIÓN DE *SAGITTULA AQUIMARIS* COMB. NOV.

Sagittula aquimaris (a.qui.ma'ris. L. n. aqua *agua*; L. gen. n. *maris* del mar, marino; N.L. gen. n. *aquimaris* del agua del mar).

Basónimo: *Maliponia aquimaris* Jung *et al.* 2016.

La descripción de la especie es la misma que la de *Maliponia aquimaris* (Jung *et al.*, 2016a). La cepa tipo es MM-10^T (=CECT 8898^T =KCTC 42721^T).

ENMIENDA DEL GÉNERO *PELAGIMONAS* HAHNKE *ET AL.* 2013

La descripción es la misma que dan Hahnke *et al.* (2013) con las siguientes enmiendas. Las células pueden presentar pigmentación y la actividad oxidasa es variable. El contenido G+C basado en el genoma es 55,2-57,9 mol%. La cepa tipo es *Pelagimonas varians*.

DESCRIPCIÓN DE *PELAGIMONAS PHTHALICA* COMB. NOV.

Pelagimonas phthalica (ph.tha.li'ca. N.L. n. *acidum phthalicum*, ácido ftálico; L. fem. suff. -ca, sufijo usado con el sentido de pertenencia a; N.L. fem. adj. *phthalica* referente al sustrato ácido ftálico que puede ser utilizado por las especies).

Basónimo: *Tropicibacter phthalicus* Iwaki *et al.* 2012.

La descripción es la misma que la de *Tropicibacter phthalicus* (Iwaki *et al.*, 2012). La cepa tipo es KU27E1^T (=CECT 8649^T =JCM 17793^T =KCTC 23703^T).

ENMIENDA DEL GÉNERO *CITREIMONAS* CHOI & CHO 2006

La descripción es la misma que dan Choi y Cho (2006b) con las siguientes enmiendas. La prueba de la oxidasa es variable. Los principales ácidos grasos son C_{18:1} ω7c, C_{19:0} ciclo ω8c y 11 metil C_{18:1} ω7c. El contenido G+C es 66,2-67,1 mol%. La especie tipo es *Citreimonas salinaria*.

DESCRIPCIÓN DE *CITREIMONAS PACIFICA* COMB. NOV.

Citreimonas pacifica (pa.ci'fi.ca. L. fem. adj. *pacifica* pacífica, en referencia al Océano Pacífico donde la cepa fue aislada).

Basónimo: *Roseivivax pacificus* Wu *et al.* 2013.

La descripción de la especie es la misma que la de *Roseivivax pacificus* (Wu *et al.*, 2013). La cepa tipo es 22DY03^T (=CECT 8898^T =CGMCC 1.12410^T=JCM 18866^T).

ENMIENDA DEL GÉNERO *GEMMOBACTER* ROTHE *ET AL.* 1987 EMEND. CHEN *ET AL.* 2013

La descripción es la misma que dan Rothe *et al.* (1988) y Chen *et al.* (2013) con las siguientes enmiendas. Los principales ácidos grasos son C_{18:1} ω7c y C_{18:1} ω6c y 11 metil C_{18:1} ω7c. El contenido G+C basado en el genoma es 60,3-64,7 mol%. La especie tipo es *Gemmobacter aquatilis*.

DESCRIPCIÓN DE *GEMMOBACTER PSYCHROTOLERANS* COMB. NOV.

Gemmobacter psychrotolerans (psy.chro.to`ler.ans. Gr. adj. *psychros* frío; L. pres. part. *tolerans* tolerante; N.L. part. adj. *psychrotolerans* tolerante al frío).

Basónimo: *Pseudorhodobacter psychrotolerans* Lee *et al.* 2016.

La descripción es la misma que la de *Pseudorhodobacter psychrotolerans* (Lee *et al.*, 2016b). La cepa tipo es JCM 30764^T (=KCTC 42640^T = PAMC 27389^T).

CONCLUSIONES

Tras los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral se puede concluir lo siguiente:

1. La secuenciación genómica de las 36 cepas tipo de *Rhodobacteraceae* realizada en este estudio ha constatado que las especies pertenecientes a dicha familia se caracterizan por poseer genomas de gran tamaño con una alta variabilidad a nivel de organización genómica, tal y como sugiere la presencia de las diversas replicasas encontradas.
2. Asimismo, los 36 genomas secuenciados también exhiben una elevada plasticidad a nivel genético como muestra el hallazgo de secuencias de transposasas, integrasas, plásmidos conjugativos, profagos y agentes de transferencia de genes (GTAs), estos últimos presentes en el 89 % de los genomas.
3. A nivel metabólico este estudio ha permitido constatar la diversidad metabólica que presentan las 36 cepas analizadas, en cuyos genomas se han visto mecanismos de obtención de energía complementarios a la quimioheterotrofia: fototrofia aerobia anoxigénica (31 %), oxidación de CO (81 %) y oxidación compuestos inorgánicos azufrados (69 %), siendo habitual que presenten al menos uno de ellos (94 %).
4. Estas cepas presentan múltiples mecanismos (tales como asimilación de fósforo, utilización de compuestos C1 y compuestos aromáticos) para superar la limitación existente en el entorno marino de diferentes nutrientes que, en conjunto, le permiten adaptarse con éxito a aguas oligotróficas.
5. La movilidad debida a flagelos y la quimiotaxis no son rasgos determinantes para el éxito ecológico de las cepas estudiadas: Por contra, el 97 % de los genomas analizados presenta el sistema regulatorio chv de dos componentes además de un clúster génico de alta adherencia (TAD), lo que refleja una estrategia de vida sésil donde los flagelos son utilizados para la adherencia celular y la formación de biopelículas.
6. Los 36 genomas analizados exhiben genes de tolerancia a condiciones fisicoquímicas de estrés, así como genes de resistencia frente a diversos metales pesados (arsénico, mercurio, cobre y cromo) y antibióticos (especialmente β -lactámicos) que le permiten una adaptación exitosa hacia entornos marinos fluctuantes.
7. Los análisis MIC realizados en este estudio con una selección de diez cepas han puesto de manifiesto una elevada resistencia frente al arsénico en comparación con otros miembros pertenecientes a la familia *Rhodobacteraceae* descritos en la literatura, constituyendo la primera evidencia de la capacidad de biotransformación del As en el grupo *Roseobacter*.
8. Respecto a la resistencia al telurio se ha confirmado que no existe una relación directa entre la presencia de determinantes genéticos que confieren resistencia al Te y la capacidad de crecer ante este compuesto. Asimismo, este estudio también representa la primera evidencia del potencial para la reducción del Te en el grupo *Roseobacter*.
9. El análisis filogenómico realizado con 224 genomas de cepas tipo de la familia *Rhodobacteraceae*, junto con el cálculo de índices de semejanza genómica (isDDH y ANI), ha permitido detectar seis casos de sinonimia, incluyendo la publicada por

CONCLUSIONES

nuestro grupo de investigación sobre las especies *Roseivivax atlanticus* y *Roseivivax marinus*.

10. Los análisis filogenómicos (mediante CVTree y UBCG, con secuencias génicas y de proteínas) han permitido establecer las relaciones evolutivas en el conjunto de 224 genomas. Además, el estudio de los valores AAI obtenidos para cada uno de los clados ha permitido afinar el rango utilizado (67 – 71% AAI) para la circunscripción de géneros dentro de la familia *Rhodobacteraceae*.
11. La aplicación de los criterios anteriores ha permitido detectar la necesidad de considerar 32 reclasificaciones que afectan a especies de *Antarctobacter*, *Epibacterium*, *Gemmobacter*, *Halocynthiibacter*, *Litorimicrobium*, *Maliponia*, *Mameliella*, *Nautella*, *Pelagicola*, *Phaeobacter*, *Pseudophaeobacter*, *Pseudoceanicola*, *Pseudooctadecabacter*, *Pseudopelagicola*, *Pseudorhodobacter*, *Pseudoruegeria*, *Roseisalinus*, *Roseivivax*, *Sulfitobacter*, *Thalassobius*, *Tropicibacter* y *Yangia*.
12. El análisis taxogenómico realizado en este trabajo supone una importante revisión taxonómica y además representa el estudio de genómica comparada más amplio hecho hasta el momento en *Rhodobacteraceae*.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelhamed H, Lu J, Lawrence M L, Karsi A.** (2016). Ferric hydroxamate uptake system contributes to *Edwardsiella ictalurid* virulence. *Microb Pathog.* **100**, 195-200.
- Achour A R, Bauda P, Billard P.** (2007). Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Res Microbiol.* **158**, 128-137.
- Achtman M, Wagner M.** (2008). Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat Rev Microbiol.* **6**, 431-440.
- Ahmed E, Holmström SJ,** (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microb Biotechnol.* **7**, 196-208.
- Alber BE, Spanheimer R, Ebenau-Jehle C, Fuchs G.** (2006). Study of an alternate glyoxylate cycle for acetate assimilation by *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol.* **61**, 297-309.
- Albuquerque L, França L, Taborda M, La Cono V, Yakimov M, da Costa MS.** (2015). *Palleronia abyssalis* sp. nov., isolated from the deep Mediterranean Sea and the emended description of the genus *Palleronia* and of the species *Palleronia marisminoris*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **107**, 633-642.
- Alejandro-Marín CM, Bosch R, Nogales B.** (2014). Comparative genomics of the protocatechuate branch of the beta-ketoadipate pathway in the Roseobacter lineage. *Mar Genomics.* **17**, 25-33.
- Aliyu H, Lebre P, Blom J, Cowan D, De Maayer P.** (2016) Phylogenomic assessment of the thermophilic genus *Geobacillus*. *Syst Appl Microbiol.* **39**, 527-533.
- Allen AE, Booth MG, Frischer ME, Verity PG, Zehr J P, Zani S.** (2001). Diversity and detection of nitrate assimilation genes in marine bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **67**, 5343-5348.
- Amaral GR, Dias GM, Wellington-Oquri M, Chimento L, Campeão ME, Thompson FL, Thompson CC.** (2014). Genotype to phenotype: identification of diagnostic *Vibrio* phenotypes using whole genome sequences. *Int J Syst Evol Microbiol.* **64**, 357-365.
- Amin IM, Richmond GE, Sen P, Koh TH, Piddock LJ, Chua KL.** (2013). A method for generating marker-less gene deletions in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol.* **13**, 1-14.
- Amin SA, Green DH, Hart MC, Küpper FC, Sunda WG, Carrano CJ.** (2009). Photolysis of iron-siderophore chelates promotes bacterial-algal mutualism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 17071-17076.
- Amin S, Van Tol H, Hmelo L, Durham BP.** (2015). Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. *Nature.* **522**, 98- 101.
- Andrews S.** (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc
- Arahal, DR.** (2014). Whole-genome analyses: average nucleotide identity. In: *Methods in Microbiology*, vol. 41. (New Approaches to Prokaryotic Systematics), pp. 103-122. Edited by M. Goodfellow, I. Sutcliffe I and J. Chun. Oxford, UK: Academic Press
- Arahal DR, La Mura A, Lucena T, Rodrigo-Torres L, Aznar R, Pujalte MJ.** (2019). *Shimia thalassica* sp. nov., and reclassification of *Pseudopelagicola gijangensis* as *Shimia gijangensis* comb. nov. and *Thalassobius activus* as *Cognatishimia activa* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* **69**, 3405-3413.
- Arahal DR, Lucena T, Rodrigo-Torres L, Pujalte MJ.** (2018). *Ruegeria denitrificans* sp. nov., a marine bacterium in the family *Rhodobacteraceae* with the potential ability for cyanophycin synthesis. *Int J Syst Evol Microbiol.* **68**, 2515-2522.

- Arahal DR, Macián MC, Garay E, Pujalte MJ.** (2005). *Thalassobius mediterraneus* gen. nov., sp. nov., and reclassification of *Ruegeria gelatinovorans* as *Thalassobius gelatinovorans* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* **55**, 2371-2376.
- Arata H, Shimizu M, Takamiya K.** (1992). Purification and properties of trimethylamine N-oxide reductase from aerobic photosynthetic bacterium *Roseobacter denitrificans*. *J Biochem.* **112**, 470-475.
- Arco Y, Llamas I, Martínez-Checa F, Argandoña M, Quesada E, del Moral A.** (2005). *epsABCJ* genes are involved in the biosynthesis of the exopolysaccharide mauran produced by *Halomonas maura*. *Microbiology.* **151**, 2841-2851.
- Arenas FA, Pugin B, Henríquez NA, Arenas-Salinas MA, Díaz-Vázquez WA, Pozo MF, Muñoz CM, Chasteen TG, et al.** (2014). Isolation, identification and characterization of highly tellurite-resistant, tellurite-reducing bacteria from Antarctica. *Polar Sci.* **8**, 40-52.
- Armitage JP, Schmitt R.** (1997). Bacterial chemotaxis: *Rhodobacter sphaeroides* and *Sinorhizobium meliloti* - variations on a theme? *Microbiol.* **143**, 3671-3682.
- Athey J, Alexaki A, Osipova E, Rostovtsev A, Santana-Quintero LV, Katneni U, Simonyan V, Kimchi-Sarfaty C.** (2017). A new and update resource for codon usage tables. **18**, 1-10.
- Auch AF, von Jan M, Klenk HP, Göker M.** (2010). Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Standards in Genomic Sciences.* **2**, 117-134.
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJong M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, et al.** (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics.* **9**, 1-15.
- Badger JH, Eisen JA, Ward NL.** (2005). Genomic analysis of *Hyphomonas neptunium* contradicts 16S rRNA gene-based phylogenetic analysis: implications for the taxonomy of the orders 'Rhodobacterales' and 'Caulobacterales'. *Int J Syst Evol Microbiol.* **55**, 1021-1026.
- Bahassi M, Stambrook PJ.** (2014). Next-generation sequencing technologies: breaking the sound barrier of human genetics. *Mutagenesis.* **29**, 303-310.
- Bahir I, Fromer M, Prat Y, Linial M.** (2009). Viral adaptation to host: a proteome-based analyses of codon usage and aminoacid preferences. *Mol syst Biol.* **5**, 1-14.
- Bakenhus I, Voget S, Poehlein A, Brinkhoff T, Daniel R, Simon M.** (2018). Genome sequence of *Planktotalea frisia* type strain (SH6-1T), a representative of the *Roseobacter* group isolated from the North Sea during a phytoplankton bloom. *Stand Genomic Sci.* **13**, 1-9.
- Bandyopadhyay S, Schumann P, Das SK.** (2013). *Pannonibacter indica* sp. nov., a highly arsenate-tolerant bacterium isolated from a hot spring in India. *Arch Microbiol.* **195**, 1-8.
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, et al.** (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* **19**, 455-477.
- Barra L, Fontenelle C, Ermel G, Trautwetter A, Walker GC, Blanco C.** (2006). Interrelations between glycine betaine catabolism and methionine biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti* strain 102F34. *J Bacteriol.* **188**, 7195-7204.
- Bartling P, Brinkmann H, Bunk B, Overmann J, Göker M, Patersen J.** (2017). The composite 259-kb plasmid of *Martelella mediterranea* DSM 17316^T – A natural replicon with functional RepABC modules from *Rhodobacteraceae* and *Rhizobiaceae*. *Front Microbiol.* **8**, 1-16.
- Bastard K, Smith AA, Vergne-Vaxelaire C, Perre A, Zaparucha A, De Melo-Minardi R, Mariage A, Boutard M, et al.** (2014). Revealing the hidden functional diversity of an enzyme family. *Nat Chem Biol.* **10**, 42-49.

- Beale R, Airs R.** (2016). Quantification of glycine betaine, choline and trimethylamine N-oxide in seawater particulates: Minimisation of seawater associated ion suppression. *Anal Chim Acta.* **938**, 114-122.
- Beckering CL, Steil L, Weber MHW, Völker U, Marahiel MA.** (2002). Genomewide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **184**, 6395-6402.
- Bee M, Fahsi N, Raoult D, Fournier PE.** (2018). Careful use of 16S rRNA gene sequence similarity values for the identification of *Mycobacterium* species. *New Microbes New Infect.* **22**, 24-29.
- Behura SK, Severson DW.** (2013). Codon usage bias: causative factors, quantification methods and genome-wide patterns: with emphasis on insect genomes. *Biol Rev Camb Philos Soc.* **88**, 49-61.
- Belas R, Horikawa E, Aizawa S, Suvanasuthi R.** (2009). Genetic determinants of *Silicibacter* sp. TM1040 motility. *J Bacteriol.* **191**, 4502-4512.
- Bengtsson-Palme J, Rosenblad AM, Molin M, Bloberg A.** (2014). Metagenomics reveals that detoxification systems are underrepresented in marine bacterial communities. *BMC Genomics.* **15**, 1-17.
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, et al.** (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* **417**, 141-147.
- Berger A, Dohnt K, Tielen P, Jahn D, Becker J, Wittmann C.** (2014). Robustness and plasticity of metabolic pathway flux among uropathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One.* **9**, 1-14.
- Berghoff BA, Glaeser J, Nuss AM, Zobawa M, Lottspeich F, Klug G.** (2011). Anoxygenic photosynthesis and photooxidative stress: a particular challenge for *Roseobacter*. *Environ Microbiol.* **13**, 775-791.
- Bernroither M, Tangl D, Lucini C, Furtmüller PG, Peschek GA, Obinger C.** (2009). Cyanobacterial cytochrome C_M: Probing its role as electron donor for C_UA of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* **1787**, 135-143.
- Biers EJ, Wang K, Pannington C, Belas R, Chen F, Moran MA.** (2008). Occurrence and expression of gene transfer agent (GTA) genes in marine bacterioplankton. *Appl Environ Microbiol.* **74**, 2933-2939.
- Billerbeck S, Orchard J, Tindall BJ, Giebel HA, Brinkhoff T, Simon M.** (2015). Description of *Octadecabacter temperatus* sp. nov., isolated from the southern North Sea, emended descriptions of the genus *Octadecabacter* and its species and reclassification of *Octadecabacter jejudonensis* Park and Yoon 2014 as *Pseudoctadecabacter jejudonensis* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* **65**, 1967-1974.
- Blanchet E, Prado S, Stien D, da Silva JO, Ferandin Y, Batailler N, Intertaglia L, Escargueil A, Lami R.** (2017). Quorum sensing and quorum quenching in the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica* microbiota. *Front Mar Sci.* **4**, 1-10.
- Bochner BR, Gadzinski P, Panomitros E.** (2001). Phenotype microarray for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. *Genome Res.* **11**, 1246-1255.
- Bonaglia S, Nascimento FJ, Bartoli M, Klawonn I, Brünchert, V.** (2014). Meiofauna increases bacterial denitrification in marine sediments. *Nat Commun.* **5**, 1-9.

- Bontemps-Gallo, S, Madec E, Robbe-Masselot C, Souche E, Dondeyne J, Lacroix JM.** (2016). The *opgC* gene is required for OPGs succinylation and is osmoregulated through RcsCDB and EnvZ/OmpR in the phytopathogen *Dickeya dadantii*. *Sci Rep.* **6**, 1-14.
- Borris R, Rueckert C, Blom J, Bezuidt O, Reva O, Klenk HP.** (2011). Taxonomy of prokaryotes: Whole genome sequence comparisons in taxonomy. *Methods Microbiol.* **38**, 409-436.
- Boudewijns M, Bakkers JM, Sturm PDJ, Melchers WJG.** (2006). 16S rRNA Gene Sequencing and the routine clinical microbiology laboratory: a perfect marriage? *J Clin Microbiol.* **44**, 3469-3470.
- Boukhvalova MS, Dahlquist F W, Stewart R C.** (2002). CheW binding interactions with CheA and Tar. Importance for chemotaxis signaling in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **277**, 22251-22259.
- Boyd ES, Barkay, T.** (2012). The mercury resistance operon: from an origin in a geothermal environment to an efficient detoxification machine. *Front Microbiol.* **3**, 1-13.
- Braker G, Zhou J, Wu L, Devol AH, Tiedje JM.** (2000). Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities. *Appl Environ Microbiol.* **66**, 2096-2104.
- Branco R, Morais PV.** (2013). Identification and characterization of the transcriptional regulator ChrB in the chromate resistance determinant of *Ochrobactrum tritici* 5bv11. *PLoS One.* **8**, 1-12.
- Brbić M, Piškorec M, Vidulin V, Kriško A, Šmuc T, Supek F.** (2016). The landscape of microbial phenotypic traits and associated genes. *Nucleic Acids Res.* **44**, 10074-10090.
- Breider S, Freese HM, Spröer C, Simon M, Overmann J, Brinkhoff T.** (2017). *Phaeobacter porticola* sp. nov., an antibiotic-producing bacterium isolated from a sea harbour. *Int J Syst Evol Microbiol.* **67**, 2153-2159.
- Breider S, Scheuner C, Schumann P, Fiebig A, Petersen J, Pradella S, Klenk HP, Brinkhoff T, Göker M.** (2014). Genome-scale data suggest reclassifications in the *Leisingera-Phaeobacter* cluster including proposals for *Sedimentitalea* gen. nov. and *Pseudophaeobacter* gen. nov. *Front Microbiol.* **5**, 1-13.
- Brinkhoff T, Giebel HA, Simon M.** (2008). Diversity, ecology, and genomics of the *Roseobacter* clade: a short overview. *Arch Microbiol.* **189**, 531-539.
- Brinkmann H, Göker M, Koblížek M, Wagner-Döbler I, Petersen, J.** (2018). Horizontal operon transfer, plasmids, and the evolution of photosynthesis in *Rhodobacteraceae*. *ISME J.* **12**, 1994-2010.
- Brinkmeyer R, Knittel K, Jürgens J, Weyland H, Amann R, Helmke, E.** (2003). Diversity and structure of bacterial communities in Arctic versus Antarctic pack ice. *Appl Environ Microbiol.* **69**, 6610-6619.
- Brown JS, Gilliland SM, Ruiz-Albert J, Holden DW.** (2004). Characterization of Pit, a *Streptococcus pneumoniae* Iron Uptake ABC transporter. *Infect Immun.* **70**, 4389-4398.
- Brown MV, Bowman JP.** (2001). A molecular phylogenetic survey of sea-ice microbial communities (SIMCO). *FEMS Microbiol Ecol.* **35**, 267-275.
- Bruhn JB, Gram L, Belas R.** (2007). Production of antibacterial compounds and biofilm formation by *Roseobacter* species are influenced by culture conditions. *Appl Environ Microbiol.* **73**, 442-450.

- Bu C, Wang Y, Ge C, Ahmad HA, Gao B, Ni SQ.** (2017). Dissimilatory nitrate reduction to ammonium in the yellow river estuary: Rates, abundance, and community diversity. *Sci Rep.* **7**, 1-11.
- Buchan A, González J.** (2010). *Roseobacter*. In: *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. 1 edn, pp. 1335-1343. Edited by K. N. Timmis, T. J. McGenity, J. R. van der Meer and V. de Lorenzo. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Buchan A, González JM, Moran MA.** (2005). Overview of the Marine *Roseobacter* Lineage. *Appl Environ Microbiol.* **71**, 5665-5677.
- Buchan A, Neidle EL, Moran MA.** (2004). Diverse organization of genes of the beta-ketoadipate pathway in members of the marine *Roseobacter* lineage. *Appl Environ Microbiol.* **70**, 1658-1668.
- Bullock HA, Luo H, Whitman WB.** (2017). Evolution of dimethylsulfoniopropionate metabolism in marine phytoplankton and bacteria. *Front Microbiol.* **8**, 1-17.
- Bullock HA, Reisch CR, Burns AS, Moran MA, Whitman WB.** (2014). Regulatory and functional diversity of Methylmercaptopropionate coenzyme A ligases from the Dimethylsulfoniopropionate demethylation pathway in *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 and other proteobacteria. *J Bacteriol.* **196**, 1275-1285.
- Burgin AJ, Hamilton SK.** (2007). Have we overemphasized the role of denitrification in aquatic ecosystems? A review of nitrate removal pathways. *Front Ecol Environ.* **5**, 89-96.
- Burkhardt I, Lauterbach L, Brock NL, Dickschat JS.** (2017). Chemical differentiation of three DMSP lyases from the marine *Roseobacter* group. *Org Biomol Chem.* **15**, 4432-4439.
- Bush K.** (2011). Section 2: Agents. Chapter 15 – Other β -lactam antibiotics. In *Antibiotic and Chemotherapy*, 9th edn, pp. 226-244. Edited by R. G. Finch, D. Greenwood, S. R. Norrby, R. J. Whitley. Elsevier.
- Busse HJ, Denner EBM, Lubitz W.** (1996). Classification and identification of bacteria: Current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *J Biotech.* **47**, 3-38.
- Butler WR, Floyd MM, Brown JM, Toney SR, Daneshvar MI, Cooksey RC, Steigerwalt AG, Charles N.** (2005). Novel mycolic acid-containing bacteria in the family *Segniliparaceae* fam. nov., including the genus *Segniliparus* gen. nov., with descriptions of *Segniliparus rotundus* sp. nov. and *Segniliparus rugosus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* **55**, 1615-1624.
- Cabal A, Jun SR, Jenjaroenpun P, Wanchai V, Nookaew I, Wongsurawat T, Burgess MJ, Kothari A, Wassenaar TM, Ussery DW.** (2018). Genome-based comparison of *Clostridioides difficile*: Average amino acid identity analysis of core genomes. *Microb Ecol.* **76**, 801-813.
- Cabello P, Roldán MD, Castillo F, Moreno-Vivián C.** (2009). Nitrogen cycle. In: *Encyclopedia of Microbiology*, 3 edn, vol 1, pp. 229-322. Edited by M. Schaechter. Elsevier.
- Cabello P, Roldán MD, Moreno-Vivián C.** (2004). Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. *Microbiology.* **150**, 3527-3546.
- Cáceres R, Malińska K, Marfà O.** (2018). Nitrification within composting: A review. *Waste Manag.* **72**, 119-137.
- Caputo A, Merhej V, Georgiades K, Fournier PE, Croce P, Robert C, Raoult D.** (2015). Pan-genome analysis to redefine species and subspecies based on quantum discontinuous variation: the *Klebsiella* paradigm. *Biol Direct.* **10**, 1-12.
- Castillo F.** (2005). Capítulo 6. Ciclos biogeoquímicos III. In *Biotecnología ambiental*. pp. 151-254. Edited by M. D. Roldán, R. Blasco, M. J. Huertas, F. J. Caballero, C. Moreno-Vivián and M. Martínez. Editorial Tébar S. L.

- Chaturvedi N, Singh VK, Pandey PN.** (2013). Computational identification and analysis of arsenate reductase protein in *Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894 suggests potential microorganism for reducing arsenate. *J Struct Funct Genomics*. **14**, 37-45.
- Chavarría M, Nikel PI, Pérez-Pantoja D, de Lorenzo V.** (2013). The Entner-Doudoroff pathway empowers *Pseudomonas putida* KT2440 with a high tolerance to oxidative stress. *Environ Microbiol*. **15**, 1772-1785.
- Chawla V, Kumar R, Shanker R.** (2016). Identifying wrong assemblies in de novo short read primary sequences assembly contigs. *J Biosci*. **41**, 455-474.
- Chen J, Bhattacharjee H, Rosen BP.** (2015). ArsH is an organoarsenical oxidase that confers resistance to trivalent forms of the herbicide monosodium methylarsenate and the poultry growth promoter roxarsone. *Mol Microbiol*. **96**, 1042-1052.
- Chen WM, Cho NT, Huang WC, Young CC, Sheu SY.** (2013) Description of *Gemmobacter fontiphilus* sp. nov., isolated from a freshwater spring, reclassification of *Catellibacterium nectariphilum* as *Gemmobacter nectariphilus* comb. nov., *Catellibacterium changlense* as *Gemmobacter changlensis* comb. nov., *Catellibacterium aquatile* as *Gemmobacter aquaticus* nom. nov., *Catellibacterium caeni* as *Gemmobacter caeni* comb. nov., *Catellibacterium nanjingense* as *Gemmobacter nanjingensis* comb. nov., and emended description of the genus *Gemmobacter* and of *Gemmobacter aquatilis*. *Int J Syst Evol Microbiol*. **63**, 470-478.
- Chen Y, Patel NA, Crombie A, Scrivens JH, Murrell JC.** (2011). Bacterial flavin-containing monooxygenase is trimethylamine monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **108**, 17791-17796.
- Chen Y.** (2012). Comparative genomics of methylated amine utilization by marine Roseobacter clade bacteria and development of functional gene markers (*tmm*, *gmaS*). *Environ Microbiol*. **14**, 2308-2322.
- Cheng HP, Yao SY.** (2004). The key *Sinorhizobium meliloti* succinoglycan biosynthesis gene *exoY* is expressed from two promoters. *FEMS Microbiol Lett*. **231**, 131-136.
- Chi W, Zheng L, He C, Han B, Zheng M, Gao W, Sun C, Zhou G, Gao X.** (2017). Quorum sensing of microalgae associated marine *Ponticoccus* sp. PD-2 and its algicidal function regulation. *AMB Express*. **7**, 1-10.
- Chistoserdova L, Kalyuzhnaya MG, Lidstrom ME.** (2009). The expanding world of methylotrophic metabolism. *Annu Rev Microbiol*. **63**, 477-499.
- Chistoserdova L, Vorholt JA, Lidstrom ME.** (2005). A genomic view of methane oxidation by aerobic bacteria and anaerobic archaea. *Genome Biol*. **6**, 1-6.
- Chistoserdova L.** (2011). Modularity of methylotrophy, revisited. *Environ Microbiol*. **13**, 2603-2622.
- Cho JC, Giovannoni SJ.** (2004). *Oceanicola granulosus* gen. nov., sp. nov. and *Oceanicola batsensis* sp. nov., poly-beta-hydroxybutyrate-producing marine bacteria in the order "Rhodobacterales". *Int J Syst Evo Microbiol*. **54**, 1129-1136.
- Choi DH, Cho BC.** (2006a). *Shimia marina* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium of the Roseobacter clade isolated from biofilm in a coastal fish farm. *Int J Syst Evol Microbiol*. **56**, 1869-1873.
- Choi DH, Cho BC.** (2006b). *Citreimonas salinaria* gen. nov., sp. nov., a member of the Roseobacter clade isolated from a solar saltern. *Int J syst Evol Microbiol*. **56**, 2799-2803.

- Christie PJ, Atmakuri K, Krishnamoorthy V, Jakubowski S, Cascales E.** (2005). Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol.* **59**, 451-485.
- Christie-Oleza J A, Piña-Villalonga JM, Bosch R, Nogales B, Armengaud J.** (2012). Comparative proteogenomics of twelve *Roseobacter* exoproteomes reveals different adaptive strategies among these marine bacteria. *Mol Cell Proteomics.* **11**, 1-12.
- Chu F, Lidstrom ME.** (2016). Xoxf acts as the predominant methanol dehydrogenase in the type I methanotroph *Methylobacterium buryatense*. *J Bacteriol.* **198**, 1317-1325.
- Chun J, Oren A, Ventosa A, Christensen H, Arahall DR, da Costa MS, Rooney AP, Yi H, et al.** (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol.* **68**, 461-466.
- Chun J, Rainey FA.** (2014). Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the *Bacteria* and *Archaea*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **64**, 316-324.
- Clayton RA, Sutton G, Hinkle PSJR, Bult C, Fields C.** (1995). Intraspecific variation in small-Subunit rRNA sequences in GenBank: Why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. *Int J Syst Evol Microbiol.* **45**, 595-599.
- Coenye T, Gevers D, Van de Peer Y, Vandamme P, Swings J.** (2005). Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMs Microbiol Rev.* **29**, 147-167.
- Coenye T, Vandamme P.** (2003). Extracting phylogenetic information from whole-genome sequencing projects: the lactic acid bacteria as a test case. *Microbiology.* **149**, 3507-3517.
- Cole JK, Morton BR, Cardamone HC, Lake HRR, Dohnalkova AC, Kim YM, Kyle JE, Maezato Y, et al.** (2018). *Salinivirga fredricksonii* gen. nov., sp. nov., a heterotrophic halophile isolated from a photosynthetic mat, a member of a novel lineage (*Salinarimonadaceae* fam. nov.) within the order *Rhizobiales*, and reclassification of the genus *Salinarimonas* Liu et al. 2010 into *Salinarimonadaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **68**, 1591-1598.
- Collins AJ, Fullmer MS, Gogarten JP, Nyholm SV.** (2015). Comparative genomics of *Roseobacter* clade bacteria isolated from the accessory nidamental gland of *Euprymna scolopes*. *Front Microbiol.* **6**, 1-14.
- Colston SM, Fullmer MS, Beka L, Lamy B, Gogarten JP, Graf J.** (2014). Bioinformatic genome comparisons for taxonomic and phylogenetic assignments using *Aeromonas* as a test case. *MBio.* **5**, 1-13.
- Colwell RR.** (1970). Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: Numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *J Bacteriol.* **104**, 410-433.
- Corral P, de la Haba RR, Infante-Domínguez C, Sánchez-Porro C, Amozegar MA, Papke R T, Ventosa A.** (2018). *Halorubrum chaoviator* Mancinelli et al. 2009 is a later, heterotypic synonym of *Halorubrum ezzemoulense* Kharroub et al. 2006. Emended description of *Halorubrum ezzemoulense* Kharroub et al. 2006. *Int J Syst Evol Microbiol.* **68**, 3657-3665.
- Covelli JM.** (2013). Biofertilización con *Bradyrhizobium japonicum* para la agricultura sustentable: Aspectos ecofisiológicos del problema de la competición para la nodulación. Universidad Nacional de La Plata. Tesis doctoral.
- Crowley SP, O’Gara F, O’Sullivan O, Cotter PD, Dobson ADW.** (2014). Marine *Pseudovibrio* sp. as a novel source of antimicrobials. *Mar Drugs.* **12**, 5916-5929.
- Cude WN, Buchan A.** (2013). Acyl-homoserine lactone-based quorum sensing in the *Roseobacter* clade: complex cell-to-cell communication controls multiple physiologies. *Front Microbiol.* **4**, 1-12.

- Cude WN, Mooney J, Tavanaei AA, Hadden MK, Frank AM, Gulvik CA, May AL, Buchan A.** (2012). Production of the antimicrobial secondary metabolite indigoidine contributes to competitive surface colonization by the marine *Roseobacter Phaeobacter* sp. strain Y4I. *Appl Environ Microbiol.* **78**, 1-10.
- Cunliffe M, Upstill-Goddard RC, Murrell JC.** (2011). Microbiology of aquatic surface microlayers. *FEMS Microbiol Rev.* **35**, 233-246.
- Cunliffe M.** (2011). Correlating carbon monoxide oxidation with cox genes in the abundant *Roseobacter* clade. *ISME J.* **5**, 685-691.
- D'Alvise PW, Magdenoska O, Melchiorson J, Nielsen KF, Gram L.** (2014). Biofilm formation and antibiotic production in *Ruegeria mobilis* are influenced by intracellular concentrations of cyclic dimeric guanosinmonophosphate. *Environ Microbiol.* **16**, 1252-1266.
- Dai X, Shi X, Gao X, Liu J, Zhang XH.** (2014). *Roseivivax marinus* sp. nov., isolated from deep water. *Int J Syst Evol Microbiol.* **64**, 2540-2544.
- Dai X, Wang BJ, Yang QX, Jiao NZ, Liu SJ.** (2006). *Yangia pacifica* gen. nov., sp. nov., a novel member of the *Roseobacter* clade from coastal sediment of the East China Sea. *Int J Syst Evol Microbiol.* **56**, 529-533.
- Daims H, Lebedeva EV, Pjevac P, Han P, Herbold C, Albertssen M, Jehmlich N, Palatinszky M, et al.** (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature.* **528**, 504-509.
- Daniel R, Simon M, Wemheuer B.** (2018). Editorial: Molecular ecology and genetic diversity of the *Roseobacter* clade. *Front Microbiol.* **9**, 1-3.
- Davis K E, Joseph SJ, Janssen PH.** (2005). Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **71**, 826-834.
- Del Fabbro C, Scalabrin S, Morgante M, Giorgi FM.** (2013). An extensive evaluation of read trimming effects on Illumina NGS data analysis. *PLoS One.* **8**, 1-13.
- Deloger M, El Karoui M, Petit MA.** (2009). A genomic distance based on MUM indicates discontinuity between most bacterial species and genera. *J Bacteriol.* **191**, 91-99.
- DeLoney-Marino CR, Wolfe AJ, Visick KL.** (2003). Chemoattraction of *Vibrio fischeri* to serine, nucleosides, and N-acetylneuraminic acid, a component of squid light-organ mucus. *Appl Environ Microbiol.* **69**, 7527-7530.
- Deng P, Tan X, Wu Y, Bai Q, Jia Y, Xiao H.** (2015). Cloning and sequence analysis demonstrate the chromate reduction ability of a novel chromate reductase gene from *Serratia* sp. *Exp Ther Med.* **9**, 795-800.
- Devol AH.** (2015). Denitrification, anammox, and N₂ production in marine sediments. *Ann Rev Mar Sci.* **7**, 403-423.
- Diao J, Bouwman C, Yan D, Kang J, Katakam AK, Liu P, Pantua H, Abbas AR, et al.** (2017). Peptidoglycan association of murein lipoprotein is required for KpsD-dependent group 2 capsular polysaccharide expression and serum resistance in a uropathogenic *Escherichia coli* isolate. *mBio.* **8**, 1-15.
- Dickschat JS, Zell C, Brock NL.** (2010). Pathways and substrate specificity of DMSP catabolism in marine bacteria of the *Roseobacter* clade. *Chembiochem.* **11**, 417-425.
- Ding W, Baumdicker F, Neher RA.** (2018). PanX: pan-genome analysis and exploration. *Nucleic Acids Res.* **9**, 1-12.
- Dogs M, Teshima H, Petersen J, Fiebig A, Chertkov O, Dalingault H, Chan A, Pati A, et al.** (2013). Genome sequence of *Phaeobacter daeponensis* type strain (DSM 23529T), a

facultatively anaerobic bacterium isolated from marine sediment, and emendation of *Phaeobacter daeponensis*. *Stand Genomic Sci.* **9**, 142-159.

Dong LF, Sobey MN, Smith CJ, Rusmana I, Philips W, Stott A, Osborn AM, Nedwell DB. (2011). Dissimilatory reduction of nitrate to ammonium, not denitrification or anammox, dominates benthic nitrate reduction in tropical estuaries. *Limnol Oceanogr.* **56**, 279-291.

Dranguet P, Le Faucheur S, Slaveykova VI. (2017). Mercury bioavailability, transformations, and effects on freshwater biofilms. *Environ Toxicol Chem.* **36**, 3194-3205.

Drews G. (2000). The roots of microbiology and the influence of Ferdinand Cohn on microbiology of the 19th century. *FEMS Microbiol Rev.* **24**, 225-249.

Dunn MF, Ramírez-Trujillo J A, Hernández-Lucas I. (2009). Major roles of isocitrate lyase and malate synthase in bacterial and fungal pathogenesis. *Microbiology.* **155**, 3166-3175.

Durham BP, Grote J, Whittaker KA, Bender SJ, Luo H, Grim SL, Brown JM, Casey JR, et al. (2014). Draft genome sequence of marine alphaproteobacterial strain HIMB11, the first cultivated representative of a unique lineage within the *Roseobacter* clade possessing an unusually small genome. *Stand Genomic Sci.* **9**, 632-645.

Durham BP, Sharma S, Luo H, Smith CB, Amin SA, Bender SJ, Dearth SP, Van Mooy BAS, et al. (2015). Cryptic carbon and sulfur cycling between surface ocean plankton. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **112**, 453-457.

Eshwar AK, Guldimann C, Oevermann A, Tasara T. (2017). Cold-shock domain family proteins (Csps) are involved in regulation of virulence, cellular aggregation, and flagella-based motility in *Listeria monocytogenes*. *Front Cell Infect Microbiol.* **7**, 1-15.

Fang CH, Chang YJ, Chung WC, Hsieh PH, Lin CY, Ho JM. (2015). Subset selection of high-depth next generation sequencing reads for de novo genome assembly using MapReduce framework. *BMC Genomics.* **16**, 1-8.

Feng H, Zhang W, Zhang L, Wang XC, Yu L, Yu D. (2008). Heavy metal contamination in selected urban coastal regions in US and China. *Causes and Effects of Heavy Metal Pollution.* 265-286.

Filali BK, Taoufik J, Zeroual Y, Dzairi FZ, Talbi M, Blaghen M. (2000). Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. *Curr Microbiol.* **41**, 151-156.

Fitz-Gibbons ST, House CH. (1999). Whole genome-based phylogenetic analyses of the free-living microorganisms. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4218-4222.

Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, et al. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science.* **269**, 496-512.

Fournier PE, Raoult D. (2017). Bacterial genomes. In *Infectious Diseases*, vol 1. (ed. J. Cohen, W. G. Powderly and S. M. Opal), pp. 62-67. Elsevier.

Fournier PE, Suhre K, Fournous G, Raoult D. (2006). Estimation of prokaryote genomic DNA G+C content by sequencing universally conserved genes. *Int J Syst Evol Microbiol.* **56**, 1025-1029.

Frank O, Michael V, Päuker O, Boedeker C, Jogler C, Rohde M, Petersen J. (2015). Plasmid curing and the loss of grip – The 65-kb replicon of *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 is required for biofilm formation, motility and the colonization of marine algae. *Syst Appl Microbiol.* **38**, 120-127.

Frank O, Pradella S, Rohde M, Scheuner C, Klenk HP, Göker M, Petersen J. (2014). Complete genome sequence of the *Phaeobacter gallaeciensis* type strain CIP 105210^T (= DSM 26640^T = BS107^T). *Stand Genomic Sci.* **9**, 914-932.

- Freedman Z, Zhu C, Barkay T.** (2012). Mercury resistance and mercuric reductase activities and expression among chemotrophic *Aquificae*. *Appl Environ Microbiol.* **78**, 6568-6575.
- Fu Y, Keats KF, Rivkin RB, Lang AS.** (2013). Water mass and depth determine the distribution and diversity of *Rhodobacterales* in an Arctic marine system. *FEMS Microbiol Eco.* **84**, 564-576.
- Fu Z, Liu Y, Chen, C, Guo Y, Ma Y, Yang Y, Hu F, Xu X, Wang M.** (2016). Characterization of fosfomycin resistance gene, *fosB*, in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *PLoS One.* **11**, 1-8.
- Fuchs G, Boll M, Heider J.** (2011). Microbial degradation of aromatic compounds – from one strategy to four. *Nat Rev Microbiol.* **9**, 803-816.
- Fuhrer T, Fischer E, Sauer U.** (2005). Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *J Bacteriol.* **187**, 1581-1590.
- Gaboyer F, Tindall BJ, Ciobanu MC, Duthoit F, Le Romancer M, Alain K.** (2013). *Phaeobacter leonis* sp. nov., an alphaproteobacterium from Mediterranean Sea sediments. *Int J Syst Evol Microbiol.* **63**, 3301-3306.
- Galisteo C, Sámchez-Porro C, de la Haba RR, López-Hermoso C, Fernández AB, Farias ME, Ventosa A.** (2019). Characterization of *Salinivibrio socompensis* sp. nov., a new halophilic bacterium isolated from the high-altitude hypersaline lake Socompa, Argentina. *Microorganisms.* **7**, 1-11.
- Gallacher S, Flynn KJ, Franco JM, Brueggemann E, Hines GB.** (1997). Evidence for the production of paralytic shellfish toxins by bacteria associated with *Alexandrium* spp. (*Dinophyta*) in culture. *Appl Environ Microbiol.* **63**, 239-245.
- Gallardo MJ.** (2009). Búsqueda del regulón “Quorum Sensing” de *Acidithiobacillus ferrooxidans* mediante estudios proteómicos y determinación del efecto del Fe²⁺ sobre las AHLs producidas por la bacteria. Universidad de Chile. Tesis doctoral.
- Gan HM, Hudson AO, Rahman AY, Chan KG, Savka MA.** (2013). Comparative genomic analysis of six bacteria belonging to the genus *Novosphingobium*: insights into marine adaptation, cell-cell signaling and bioremediation. *BMC Genomics.* **14**, 1-14.
- Gao B, Gupta RS.** (2012). Microbial systematics in the post-genomics era. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **101**, 45-54.
- García MJ, Gola S.** (2016). Gene and whole genome analyses reveal that the mycobacterial strain JS623 is not a member of the species *Mycobacterium smegmatis*. *Microb Biotechnol.* **9**, 269-274.
- Garcillán-Barcia MP, Francia MV, de la Cruz F.** (2009). The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev.* **33**, 657-687.
- Garrity GM, Bell JA, Lilburn T.** (2005). Family I. *Rhodobacteraceae* fam. Nov. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edn, vol. 2 (The Proteobacteria), part C (The Alpha-, Beta-, Delta-, and *Epsilonproteobacteria*), pp. 161-228. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley and G. M. Garrity. New York: Springer.
- Garrity GM.** (2016). A new genomics-driven taxonomy of *Bacteria* and *Archea*: are we there yet? *J. Clin. Microbiol.* **54**, 1-8.
- Geng H, Bruhn JB, Nielsen KF, Gram L, Belas R.** (2008). Genetic dissection of tropodithietic acid biosynthesis by marine roseobacters. *Appl Environ Microbiol.* **74**, 1535-1545.
- Gibb SW, Hatton AD.** (2004). The occurrence and distribution of trimethylamine-N-oxide in Antarctic coastal waters. *Mar Chem.* **91**, 65-75.

- Giblin AE, Tobias CR, Song B, Weston N, Banta GT, Rivera-Monroy VH.** (2013). The importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) in the nitrogen cycle of coastal ecosystems. *Oceanography*. **26**, 124–131.
- Giblin AE, Weston NB, Banta GT, Tucker J, Hopkinson CS.** (2010). The effects of salinity on nitrogen losses from an oligohaline estuarine sediment. *Estuaries Coast*. **33**, 1054-1068.
- Giebel HA, Brinkhoff T, Zwisler W, Selje N, Simon M.** (2009). Distribution of Roseobacter RCA and SAR11 lineages and distinct bacterial communities from the subtropics to the Southern Ocean. *Environ Microbiol*. **11**, 2164-2178.
- Giebel HA, Klotz F, Voget S, Poehlein A, Grosser K, Teske A, Brinkhoff T.** (2016). Draft genome sequence of the marine *Rhodobacteraceae* strain O3.65, cultivated from oil-polluted seawater of the Deepwater Horizon oil spill. *Stand Genomic Sci*. **11**, 1-12.
- Gilbert JA, Thomas S, Cooley NA, Kulakova A, Field D, Booth T, McGrath JW, Quinn JP, Joint I.** (2009). Potential for phosphonoacetate utilization by marine bacteria in temperate coastal waters. *Environ Microbiol*. **11**, 111-125.
- Glaeser S, Kämpfer P.** (2015). Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Syst Appl Microbiol*. **38**, 237-245.
- Glick R, Gilmour C, Tremblay J, Satanower S, Avidan O, Dézel E, Greenberg E P, Poole K, Banin E.** (2010). Increase in rhamnolipid synthesis under iron-limiting conditions influences surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. **192**, 2973-2980.
- Goenrich M, Bartoschek S, Hagemeyer CH, Griesinger C, Vorholt JA.** (2001). A glutathione-dependent formaldehyde-activating enzyme (gfa) from *Paracoccus denitrificans* detected and purified via two-dimensional proton exchange NMR spectrometry. *J Biol Chem*. **277**, 3069-3072.
- Goldstein J, Pollitt NS, Inouye M.** (1990). Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **87**, 283-287.
- González CM.** (2007). Diversidad de las especies desnitrificantes del género *Halomonas*. Universidad de Granada. Tesis doctoral.
- González JM, Mayer F, Moran MA, Hodson RE, Whitman WB.** (1997). *Sagittula stellate* gen. nov., sp. nov., a lignin-transforming bacterium from a coastal environment. *Int J Syst Bacteriol*. **47**, 773-780.
- González JM, Simó R, Massana R, Covert JS, Casamayor EO, Pedrós-Alió C, Moran MA.** (2000). Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing North Atlantic algal bloom. *Appl Environ Microbiol*. **66**, 4237-4246.
- Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM.** (2007). DNA to DNA hybridisation values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol*. **57**, 81-91.
- Grabarczyk DB, Berks BC.** (2017). Intermediates in the Sox sulfur oxidation pathway are bound to a sulfane conjugate of the carrier protein SoxYZ. *PLoS One*. **12**, 1-15.
- Gram L, Grossart HP, Schlingloff A, Kiørboe T.** (2002). Possible quorum sensing in marine snow bacteria: production of acylated homoserine lactones by *Roseobacter* strains isolated from marine snow. *Appl Environ Microbiol*. **68**, 4111-4116.
- Grantham R, Gautier C, Gouy M, Mercier R, Pavé A.** (1980). Codon catalog usage and the genome hypothesis. *Nucleic Acids Res*. **8**, 1-14.

- Gribskov M, Devereux J, Burgess RR.** (1984). The codon preference plot: graphic analysis of protein coding sequences and prediction of gene expression. *Nucleic Acids Res.* **12**, 539-549.
- Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C.** (2007). CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res.* **35**, 52-57.
- Gromek SM, Suria AM, Fullmer MS, Garcia JL, Gogarten JP, Nyholm SV, Balunas MJ.** (2016). *Leisingera* sp. JC1, a bacterial isolate from hawaiian bobtail squid eggs, produces indigoidine and differentially inhibits *Vibrios*. *Front Microbiol.* **7**, 1-16.
- Guerrero G, Peralta H, Aquilar A, Díaz R, Villalobos MA, Medrano-Soto A, Mora J.** (2005). Evolutionary, structural and functional relationships revealed by comparative analysis of syntenic genes in *Rhizobiales*. *BMC Evol Biol.* **17**, 1-19.
- Guerrero R.** (2001). Bergey's manuals and the classification of prokaryotes. *Int Microbiol.* **4**, 103-109.
- Guglielmini J, Néron B, Abby SS, Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F, Rocha EP.** (2014). Key components of the eight classes of type IV secretion systems involved in bacterial conjugation or protein secretion. *Nucleic Acids Res.* **42**, 5715-5727.
- Gulvik CA, Buchan, A.** (2013). Simultaneous catabolism of plant-derived aromatic compounds results in enhanced growth for members of the *Roseobacter* lineage. *Appl Environ Microbiol.* **79**, 3716-3723.
- Gupta RS.** (2001). The branching order and phylogenetic placement of species from completed bacterial genomes, based on conserved indels found in various proteins. *Int Microbiol.* **4**, 187-202.
- Guttenplan SB, Kearns DB.** (2013). Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiol Rev.* **37**, 849-871.
- Guverich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G.** (2013). QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics.* **29**, 1072-1075.
- Hameed A, Shahina M, Lin S Y, Lai WA, Hsu YH, Liu YC, Huang YM, Young CC.** (2013). *Shimia biformata* sp. nov., isolated from surface seawater, and emended description of the genus *Shimia* Choi and Cho 2006. *Int J Syst Evol Microbiol.* **63**, 4533-4539.
- Hahnke S, Tindall BJ, Schumann P, Simon M, Brinkhoff T.** (2013). *Pelagimonas varians* gen. nov., sp. nov., isolated from the southern North Sea. *Int J Syst Evol Microbiol.* **63**, 835-843.
- Hao BL, Qi J, Wang B.** (2003). Prokaryote phylogeny based on complete genomes without sequence alignment. *Mod Phys Lett B.* **17**, 91-94.
- Haq IU, Graupner K, Nazir R, van Elsas JD.** (2014). The genome of the fungal-interactive soil bacterium *Burkholderia terrae* BS001-a plethora of outstanding interactive capabilities unveiled. *Genome Biol Evol.* **6**, 1652-1668.
- Harighi B.** (2009). Genetic evidence for CheB- and CheR-dependent chemotaxis system in *A. tumefaciens* toward acetosyringone. *Microbiol Res.* **164**, 634-641.
- Harris RM, Webb DC, Howitt SM, Cox GB.** (2001). Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **183**, 5008-5014.
- Harwati TU, Kasai Y, Kodama Y, Susilaningsih D, Watanabe K.** (2007). Characterization of diverse hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Indonesian seawater. *Microbes Environ.* **22**, 412-415.
- Harwati TU, Kasai Y, Kodama Y, Susilaningsih D, Watanabe K.** (2009). *Tropicibacter naphthalenivorans* gen. nov., sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from Semarang Port in Indonesia. *Int J Syst Evol Microbiol.* **59**, 392-396.

- Harwati TU, Kasai Y, Kodoma Y, Susilaningih D, Watanabe K.** (2008). *Tranquillimonas alkanivorans* gen. nov., sp. nov., an alkane-degrading bacterium isolated from Semarang Port in Indonesia. *Int Syst Evol Microbiol.* **58**, 2118-2121.
- Headd B, Engel AS.** (2014). Biogeographic congruency among bacterial communities from terrestrial sulfidic springs. *Front Microbiol.* **5**, 1-13.
- Hehemann JH, Law A, Redecke L, Boraston AB.** (2014). The structure of RdDddP from *Roseobacter denitrificans* reveals that DMSP lyases in the DddP-family are metalloenzymes. *PLoS One.* **9**, 1-8.
- Heijthuisen JHFG, Hansen TA.** (1989). Anaerobic degradation of betaine by marine *Desulfobacterium* strains. *Arch Microbiol.* **152**, 393-396.
- Henz SR, Auch AF, Huson DH, Nieselt-Struwe K, Schuster SC.** (2003). Whole genome-based prokaryotic phylogeny. *ECCB Conference Proceedings.* 23-25.
- Hernández F, Rodríguez E.** (1993). El fenómeno del 'swarming' y otros tipos de desplazamiento bacteriano. *Rev Cost Cienc Med.* **14**, 45-51.
- Hille F, Charpentier E.** (2016). CrISPR-Cas: biology, mechanism and relevance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **371**, 1-12.
- Hogle SL, Brahamsha B, Barbeau KA.** (2017). Direct heme uptake by phytoplankton-associated *Roseobacter* bacteria. *mSystems.* **2**, 1-15.
- Hogle SL, Thrash JC, Dupont CL, Barbeau KA.** (2016). Trace metal acquisition by marine heterotrophic bacterioplankton with contrasting trophic strategies. *Appl Environ Microbiol.* **82**, 1613-1624.
- Hong SH, Kim TY, Lee SY.** (2004). Phylogenetic analysis based on genome-scale metabolic pathway reaction content. *Appl Microbiol Biotechnol.* **65**, 203-210.
- Hong Z, Lai Q, Luo Q, Jiang S, Zhu R, Liang J, Gao Y.** (2015). *Sulfitobacter pseudonitzschiae* sp. nov., isolated from the toxic diatom *Pseudo-nitzschia multiseriata*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **65**, 95-100.
- Horn G, Hofwebwe R, Kremer W, Kalbitzer HR.** (2007). Structure and function of bacterial cold shock proteins. *Cell Mol Life Sci.* **64**, 1457-1470.
- Hoshino T, Inagaki F.** (2017). Distribution of anaerobic carbon monoxide dehydrogenase genes in deep seafloor sediments. *Lett Appl Microbiol.* **64**, 355-363.
- Howat AM, Vollmers J, Taubert M, Grob C, Dixon JL, Todd JD, Chen Y, Kaster AK, Murrell JC.** (2018). Comparative genomics and mutational analysis reveals a novel XoxF-Utilizing methylotroph in the *Roseobacter* group isolated from the marine environment. *Front Microbiol.* **9**, 1-12.
- Hu Q, Qi H, Bai Z, Dou M, Zeng J, Zhang F, Zhang H.** (2007). Biosorption of cadmium by a Cd²⁺-hyperresistant *Bacillus cereus* strain HQ-1 newly isolated from a lead and zinc mine. *World J Microbiol Biotechnol.* **23**, 971-976.
- Huang C, Zhang Y, Jiao N.** (2010). Phage resistance of a marine bacterium, *Roseobacter denitrificans* OCh114, as revealed by comparative proteomics. *Curr Microbiol.* **61**, 141-147.
- Huq MA.** (2018). *Microvirga rosea* sp. nov.: a nanoparticle producing bacterium isolated from soil of rose garden. *Arch Microbiol.* **200**, 1439-1445.
- Huson DH, Richter DC, Rausch C, DeZulian T, Franz M, Rupp R.** (2007). Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics.* **8**, 1-6.
- Huson DH, Steel M.** (2004). Phylogenetic trees based on gene content. *Bioinformatic.* **20**, 2044-2049.

- Hyatt D, Chen GL, Locascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ.** (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BCM Bioinformatics*. **11**, 1-11.
- Hynninen A.** (2010). Zinc, cadmium and lead resistance mechanisms in bacteria and their contribution to biosensing. University of Helsinki. Tesis doctoral.
- Ibarra CL.** (2010). Diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de suelo de chinampa y su efecto en plantas de interés agrícola. Instituto Politécnico Nacional (México, D. F.). Tesis de maestría en ciencias.
- Ikemura T.** (1981). Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* translational system. *J Mol Biol*. **151**, 389-409.
- Ivanova EP, Flavier S, Christen R.** (2004). Phylogenetic relationships among marine *Alteromonas*-like proteobacteria: emended description of the family *Alteromonadaceae* and proposal of *Pseudoalteromonadaceae* fam. nov., *Colwelliaceae* fam. nov., *Shewanellaceae* fam. nov., *Moritellaceae* fam. nov., *Ferrimonadaceae* fam. nov., *Idiomarinaceae* fam. nov. and *Psychromonadaceae* fam. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. **54**, 1773-1788.
- Iwaki H, Nishimura A, Hasegawa Y.** (2012). *Tropicibacter phthalicus* sp. nov., a phthalate-degrading bacterium from seawater. *Curr Microbiol*. **64**, 392-396.
- Janda JM, Abbott SL.** (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol*. **45**, 2761-2764.
- Jeon YJ, Fong JC, Riyanti EL, Neilan BA, Rogers PL, Svenson CJ.** (2008). Heterologous expression of the alcohol dehydrogenase (*adhI*) gene from *Geobacillus thermoglucosidasius* strain M10EXG. *J Biotechnol*. **135**, 127-133.
- Jeoung JH, Fessler J, Goetzl S, Dobbek H.** (2014). Carbon monoxide. Toxic gas and fuel for anaerobes and aerobes: Carbon monoxide dehydrogenases. *Met Ions Life Sci*. **14**, 37-69.
- Jia B, Raphenva AR, Alcock B, Wagglechner N, Guo P, Tsang KK, Lago BA, Dave BM, et al.** (2017a). CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res*. **45**, 566-573.
- Jia J, King JE, Goldrick MC, Aldawood E, Roberts IS.** (2017b). Three tandem promoters, together with IHF, regulate growth phase dependent expression of the *Escherichia coli* *kps* capsule gene cluster. *Sci Rep*. **7**, 1-7.
- Jiang X, Dang H, Jiao N.** (2015). Ubiquity and diversity of heterotrophic bacterial *nasA* genes in diverse marine environments. *PLoS One*. **10**, 1-16.
- Jiang X, Jiao N.** (2016). Nitrate assimilation by marine heterotrophic bacteria. *Sci China Earth Sci*. **59**, 477-483.
- Jiménez L.** (2009). Caracterización biológica del biofouling marino mediante métodos moleculares. Aislamiento y determinación de actividad quorum sensing de las especies implicadas en el proceso. Universidad de Cádiz. Tesis doctoral.
- Jin HM, Lee HJ, Kim JM, Park MS, Lee K, Jeon CO.** (2011). *Litorimicrobium taeanense* gen. nov., isolated from a sandy beach. *Int J Syst Evol Microbiol*. **61**, 1392-1396.
- Johnson CN.** (2014). Polyphasic taxonomy: A tool to identify and characterize members of complex microbial communities. University of Oklahoma. Tesis doctoral.
- Johnson JL, Ordal EJ.** (1968). Deoxyribonucleic acid homology in bacterial taxonomy: effect of incubation temperature on reaction specificity. *J Bacteriol*. **95**, 893-900.

- Johnson JR, O'Bryan TT.** (2004). Detection of the *Escherichia coli* group 2 polysaccharide capsule synthesis gene *kpsM* by a rapid and specific PCR-based assay. *J Clin Microbiol.* **42**, 1773-1776.
- Jung YT, Kim BH, Oh TK, Yoon JH.** (2010). *Pseudoruegeria lutimaris* sp. nov. isolated from a tidal flat sediment, and emended description of the genus *Pseudoruegeria*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **60**, 1177-1181.
- Jung YT, Lee JS, Oh KH, Oh TK, Yoon JH.** (2011). *Roseovarius marinus* sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol.* **61**, 427-432.
- Jung YT, Lee JS, Yoon JH.** (2014a). *Rosevivax jejudonensis* sp. nov., isolated from the junction between the ocean and a freshwater spring at Jeju Island, South Korea. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **106**, 959-967.
- Jung YT, Lee JS, Yoon JH.** (2016a). *Maliponia aquimaris* gen. nov., sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol.* **66**, 2271-2277.
- Jung YT, Park S, Lee JS, Yoon JH.** (2014b). *Paracoccus lutimaris* sp. nov., isolated from a tidal flat sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.* **64**, 2763-2769.
- Jung YT, Park S, Lee JS, Yoon JH.** (2014c). *Defluviimonas aquaemixtae* sp. nov., isolated from the junction between a freshwater spring and the ocean. *Int J Syst Evol Microbiol.* **64**, 4191-4197.
- Jung YT, Park S, Lee JS, Yoon JH.** (2016b). *Loktanella marina* sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol.* **66**, 2528-2533.
- Kalhoefer D, Thole S, Voget S, Lehmann R, Liesegang H, Wollher A, Daniel R, Simon M, Brinkhoff T.** (2011). Comparative genome analysis and genome-guided physiological analysis of *Roseobacter litoralis*. *BMC Genomic.* **12**, 1-16.
- Kamatani T, Shirota T.** (2018). Analysis of factors affecting codon usage bias in human papillomavirus. *Journal of Bioinformatics and Sequence Analysis.* **9**, 1-9.
- Kämpfer P, Glaeser SP.** (2012). Prokaryotic taxonomy in the sequencing era – the polyphasic approach revisited. *Environ Microbiol.* **14**, 291-317.
- Kanukollu S, Voget S, Pohlner M, Vandieken V, Petersen J, Kyrpides N C, Woyke T, Shapiro N, et al.** (2016). Genome sequence of *Shimia* str. SK013, a representative of the *Roseobacter* group isolated from marine sediment. *Stand Genomic Sci.* **11**, 1-10.
- Keto-Timonen R, Hietala N, Palonen E, Hakakorpi A, Lindström M, Korkeala H.** (2016). Cold shock proteins: A minireview with special emphasis on Csp-family of enteropathogenic *Yersinia*. *Front Microbiol.* **7**, 1-7.
- Kim M, Oh HS, Park S C, Chun J.** (2014a). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol.* **64**, 346–351.
- Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, Park SC, Jeon YS, et al.** (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol.* **62**, 716-721.
- Kim SY, Kim JG, Lee BM, Cho JY.** (2009). Mutational analysis of the gum gene cluster required for xanthan biosynthesis in *Xanthomonas oryzae pv oryzae*. *Biotechnol Lett.* **31**, 265-270.
- Kim YO, Park S, Nam BH, Jung YT, Kim DG, Yoon JH.** (2014b). *Ruegeria meonggei* sp. nov., an *Alphaproteobacterium* isolated from ascidian *Halocynthia roretzi*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **105**, 551-558.

- Kim YO, Park S, Nam BH, Kim DG, Yoon JH.** (2014c). *Pseudopelagicola gijangensis* gen. nov., sp. nov., isolated from the sea squirt *Halocynthia roretzi*.
- Kim YO, Park S, Nam BH, Lee C, Park JM, Kim DG, Yoon JH.** (2014d). *Asciaceihabitans donghaensis* gen. nov., sp. nov., isolated from the golden sea squirt *Halocynthia aurantium*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **64**, 3970-3975.
- King GM.** (2003). Molecular and culture-based analyses of aerobic carbon monoxide oxidizer diversity. *Appl Environ Microbiol.* **69**, 7257-7265.
- Kirchman DL.** (2000). Uptake and regeneration of inorganic nutrients by marine heterotrophic bacteria. In: *Microbial ecology of the oceans*, pp. 261-268. Edited by D. L. Kirchman. John Wiley & Sons, New York.
- Klassen JL, Currie CR.** (2012). Gene fragmentation in bacterial draft genomes: extent, consequences and mitigation. *BMC Genomics.* **13**, 1-11.
- Klenk HP, Göker M.** (2010). En route to a genome-based classification of *Archea* and *Bacteria*? *Syst Appl Microbiol.* **33**, 175-182.
- Klingner A, Bartsch A, Dogs M, Wagner-Döbler I, Jahn D, Simon M, Brinkhoff T, Becker J, Wittmann C.** (2015). Large-scale ¹³C flux profiling reveals conservation of the Entner-Doudoroff pathway as a glycolytic strategy among marine bacteria that use glucose. *Appl Environ Microbiol.* **81**, 2408-2422.
- Knapp CW, Callan AC, Aitken B, Shearn R, Koenders A, Hinwood A.** (2017). Relationship between antibiotic resistance genes and metals in residential soil samples from Western Australia. *Environ Sci Pollut Res Int.* **24**, 2484-2494.
- Kolaj-Robin O, Russell D, Hayes KA, Pembroke JT, Soulimane T.** (2015). Cation diffusion facilitator family: Structure and function. *FEBS Lett.* **589**, 1283-1295.
- Kolbe DL, Eddy SR.** (2011). Fast filtering for RNA homology search. *Bioinformatics.* **27**, 3102-3109.
- Kolowitz LC, Ingall ED, Benner R.** (2001). Composition and cycling of marine organic phosphorus. *Limnol Oceanogr.* **46**, 309-320.
- Konstantinidis KT, Tiedje JM.** (2007). Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead. *Curre Opin Microbiol.* **10**, 504-509.
- Konstantinidis KT, Tiedje MJ.** (2005). Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. *J Bacteriol.* **187**, 6258-6264.
- Köster W.** (2001). ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Res Microbiol.* **152**, 291-301.
- Köster W.** (2004). Transport of solutes across biological membranes: Prokaryotes. In: *Physicochemical kinetics and transport at biointerfaces*, vol. 9, pp. 271-377. Edited by H. P. Van Leeuwen and W. Köster. John Wiley & Sons, LTD.
- Kotilainen P, Heiro M, Jalava J, Rantakokko V, Nikoskelainen J, Nikkari S, Rantakokko-Jalava K.** (2006). Aetiological diagnosis of infective endocarditis by direct amplification of rRNA genes from surgically removed valve tissue. An 11-year experience in a Finnish teaching hospital. *Ann Med* **38**, 263-273.
- Kraft B, Tegetmeyer HE, Sharma R, Klotz MG, Ferdelman TG, Hettich RL, Geelhoed JS, Strous M.** (2014). The environmental controls that govern the end-product of bacterial nitrate respiration. *Science.* **345**, 676-679.
- Krämer R.** (2010). Bacterial stimulus perception and signal transduction: Response to osmotic stress. *Chem Rec.* **10**, 217-229.

- Krapp AR, Humbert MV, Carrillo N.** (2011). The soxRS response of *Escherichia coli* can be induced in the absence of oxidative stress and oxygen by modulation of NADPH content. *Microbiology*. **157**, 957-965.
- Krasteva PV, Bernal-Bayard J, Trevier L, Martin FA, Kaminski PA, Karimova G, Fronzes R, Ghigo JM.** (2017). Insights into the structure and assembly of a bacterial cellulose secretion system. *Nat Commun*. **8**, 1-10.
- Krewulak KD, Vogel HJ.** (2008). Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim Biophys Acta*. **1778**, 1781-1804.
- Kurth D, Amadio A, Ordoñez OF, Albarracín VH, Gärtner W, Farías ME.** (2017). Arsenic metabolism in high altitude modern stromatolites revealed by metagenomic analysis. *Sci Rep*. **7**, 1-16.
- Kyrpides NC, Woyke T, Eisen JA, Garrity G, Liburn TG, Beck BJ, Whitman WB, Hugenholtz P, Klenk HP.** (2014). Genomic encyclopedia of type strains. Phase I: the one thousand microbial genomes (KMG-I) project. *Stand Genomic Sci*. **9**, 1278-1284.
- La Mura A, Arahall DR, Pujalte MJ.** (2018). *Rosevivax atlanticus* (Li, Lai, Liu, Sun and Shao, 2015) is a later heterotypic synonym of *Rosevivax marinus* (Dai, Shi, Gao, Liu and Zhang, 2014). *Int J Syst Evol Microbiol*. **68**, 2650-2652.
- La Mura A.** (2015). Análisis genómico comparado en la familia "Stappiaceae". Universitat de València. Tesis de máster.
- Laass S, Kleist S, Bill N, Drueppel K, Kossmehl S, Woehlbrand L, Rabus R, Klein J, et al.** (2014). Gene regulatory and metabolic adaptation processes of *Dinoroseobacter shibae* DFL12^T during oxygen depletion. *J Biol Chem*. **289**, 13219-13231.
- Labrenz M, Collins MD, Lawson PA, Tindall BJ, Braker G, Hirsch P.** (1998). *Antarctobacter heliothermus* gen. nov., sp. nov., a budding bacterium from hypersaline and heliothermal Ekho Lake. *Int J Syst Bacteriol*. **48**, 1363-1372.
- Labrenz M, Collins MD, Lawson PA, Tindall BJ, Schumann P, Hirsch P.** (1999). *Roseovarius tolerans* gen. nov., sp. nov., a budding bacterium with variable bacteriochlorophyll a production from hypersaline Ekho Lake. *Int J Syst Bacteriol*. **49**, 137-147.
- Labrenz M, Lawson PA, Tindall BJ, Collins MD, Hirsch P.** (2005). *Roseisalinus antarcticus* gen. nov., sp. nov., a novel aerobic bacteriochlorophyll a-producing alpha-proteobacterium isolated from hypersaline Ekho Lake, Antarctica. *Int J Syst Evol Microbiol*. **55**, 41-47.
- Labrenz M, Lawson PA, Tindall BJ, Hirsch P.** (2009). *Roseibaca ekhonensis* gen. nov., sp. nov., an alkalitolerant and aerobic bacteriochlorophyll a-producing *Alphaproteobacterium* from hypersaline Ekho Lake. *Int J Syst Evol Microbiol*. **59**, 1935-1940.
- Lafay B, Ruimy R, Rausch de Traubenberg C, Breittmayer V, Gauthier MJ, Christen R.** (1995). *Roseobacter algicola* sp. nov., a new marine bacterium isolated from the phycosphere of the toxin-producing dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Int J Syst Bacteriol*. **45**, 290-296.
- Lagesen K, Hallin P, Rødland EA, Staerfeldt HH, Rognes T, Ussery DW.** (2007). RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Res*. **35**, 3100-32008.
- Lang AS, Beatty JT.** (2000). Genetic analysis of a bacterial genetic exchange element: the gene transfer agent of *Rhodobacter capsulatus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 859-864.
- Laslett D, Canback B.** (2004). ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res*. **32**, 11-16.

- Latypova E, Yang S, Wang YS, Wang T, Chavkin TA, Hackett M, Schäfer H, Kalyuzhnaya MG.** (2010). Genetics of the glutamate-mediated methylamine utilization pathway in the facultative methylotrophic beta-proteobacterium *Methyloversatilis universalis* FAM5. *Mol Microbiol.* **75**, 426-439.
- Lazdunski AM, Ventre I, Sturgis JN.** (2004). Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* **2**, 581-592.
- Lee DH, Cho S J, Kim SM, Lee SB.** (2013a). *Sagittula marina* sp. nov., isolated from seawater and emended description of the genus *Sagittula*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **63**, 2101-2107.
- Lee I, Kim OY, Park SC, Chun J.** (2016a). OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *Int J Syst Evol Microbiol.* **66**, 1100-1103.
- Lee TF, Lee H, Chen CM, Du SH, Hsu CC, Chung MY, Chun SH, Teng LJ, Hsueh PR.** (2013b). Comparison of the accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with that of other commercial identification systems for identifying *Staphylococcus saprophyticus* in urine. *J Clin Microbiol.* **51**, 1563-1566.
- Lee YM, Yang JY, Baek K, Han SJ, Shin SC, Hwang CY, Hong SG, Lee HK.** (2016b). *Pseudorhodobacter psychrotolerans* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from terrestrial soil, and emended description of the genus *Pseudorhodobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **66**, 1068-1073.
- Leedjäv A, Ivask A, Virta M.** (2008). Interplay of different transporters in the mediation of divalent heavy metal resistance in *Pseudomonas putida* KT2440. *J Bacteriol.* **190**, 2680-2689.
- Lenk S, Moraru C, Hahnke S, Arnds J, Richter M, Kube M, Reinhardt R, Brinkhoff T, et al.** (2012). *Roseobacter* clade bacteria are abundant in coastal sediments and encode a novel combination of sulfur oxidation genes. *ISME J.* **6**, 2178-2187.
- Lesser MP.** (2006). Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology. *Annu Rev Physiol.* **68**, 253-278.
- Lewis GL, Jorgensen QR, Loy JD, Moxley RA.** (2018). Tellurite resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Curr Microbiol.* **75**, 752-759.
- Li G, Lai Q, Liu X, Sun F, Shao Z.** (2014). *Roseivivax atlanticus* sp. nov., isolated from surface seawater of the Atlantic Ocean. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **105**, 863-869.
- Li HW, Zhi XY, Yao JC, Zhou Y, Tang SK, Klenk HP, Zhao J, Li WJ.** (2013). Comparative genomics analysis of the genus *Nocardioopsis* provides new insights into its genetic mechanism of environmental adaptability. *PLoS One.* **8**, 1-10.
- Li N, Kojima S, Homma M.** (2011). Sodium-driven motor of the polar flagellum in marine bacteria *Vibrio*. *Genes Cells.* **16**, 985-999.
- Li X, Peng W, Jia Y, Lu L, Fan W.** (2017a). Removal of cadmium and zinc from contaminated wastewater using *Rhodobacter sphaeroides*. *Water Sci Technol* **75**, 2489-2498.
- Li X, Zhu YG, Shaban B, Bruxner TJ, Bond PL, Huang L.** (2015). Assessing the genetic diversity of Cu resistance in mine tailings through high-throughput recovery of full-length *copA* genes. *Sci Rep.* **5**, 1-11.
- Li Y, Xue H, Sang SQ, Lin CL, Wang XZ.** (2017b) Phylogenetic analysis of family *Neisseriaceae* based on genome sequences and description of *Populibacter corticis* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Neisseriaceae*, isolated from symptomatic bark of *Populus euramericana* canker. *PLoS One.* **12**, 1-10.
- Lidbury ID, Murrell JC, Chen Y.** (2015a). Trimethylamine and trimethylamine N-oxide are supplementary energy sources for a marine heterotrophic bacterium: implications for marine carbon and nitrogen cycling. *ISME J.* **9**, 760-769.

- Lidbury I, Kimberley G, Scanlan DJ, Murrell JC, Chen Y.** (2015b). Comparative genomics and mutagenesis analyses of choline metabolism in the marine *Roseobacter* clade. *Environ Microbiol.* **17**, 5048-5062.
- Lidbury I, Mausz MA, Scanlan DJ, Chen Y.** (2017). Identification of dimethylamine monooxygenase in marine bacteria reveals a metabolic bottleneck in the methylated amine degradation pathway. *ISME J.* **11**, 1592-1601.
- Lidbury I, Murrell JC, Chen Y.** (2014). Trimethylamine N-oxide metabolism by abundant marine heterotrophic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **111**, 2710-2715.
- Lin KY, Sheu SY, Chang PS, Cho JC, Chen WM.** (2007). *Oceanicola marinus* sp. nov., a marine Alphaproteobacterium isolated from seawater collected off Taiwan. *Int J Syst Evol Microbiol.* **57**, 1625-1629.
- Liotenberg S, Steunou AS, Picaud M, Reiss-Husson F, Astier C, Ouchane S.** (2008). Organization and expression of photosynthesis genes and operons in anoxygenic photosynthetic proteobacteria. *Environ Microbiol.* **10**, 2267-2276.
- Liu J, Wang Y, Liu Y, Zhang XH.** (2016). *Ahrensia marina* sp. nov., a dimethylsulfoniopropionate-cleaving bacterium isolated from seawater, and emended descriptions of the genus *Ahrensia* and *Ahrensia kielensis*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **66**, 874-880.
- Liu R, Ochman H.** (2007). Stepwise formation of the bacterial flagellar system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **24**, 7116-7121.
- Liu X, Dong Y, Zhang J, Zhang A, Wang L, Fang L.** (2009). Two novel metal-independent long-chain alkyl alcohol dehydrogenases from *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2. *Microbiology.* **155**, 2078-2085.
- Liu Y, Lai Q, Göker M, Meier-Kolthoff JP, Wang M, Sun Y, Wang L, Shao Z.** (2015). Genomics insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Sci Rep.* **5**, 1-11.
- Liu Y, Lai Q, Shao Z.** (2017a). Proposal for transfer of *Oceanibulbus indolifex* Wagner-Döbler et al. 2004 to the genus *Sulfitobacter* as *Suñfitobacter indolifex* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* **67**, 2328-2331.
- Liu Y, Lai Q, Shao Z.** (2018a). Genome-based analysis reveals the taxonomy and diversity of the family *Idiomarinaceae*. *Front Microbiol.* **9**, 1-15.
- Liu Y, Lai Q, Xu X, Wu Y H, Cheng H, Zhang XH, Wang L, Shao Z.** (2017b). Reclassification of *Xuhuaishuia manganoxidans* Wang et al. 2015 as a later heterotypic synonym of *Brevirhabdus pacifica* Wu et al. 2015 and emendation of the species description. *Int J Syst Evol Microbiol.* **67**, 3095-3098.
- Liu Y, Zhang X, Lai Q, Shao Z.** (2018b). Reclassification of *Mameliella phaeodactyli*, *Mameliella atlantica*, *Ponticoccus lacteus* and *Alkalimicrobium pacificum* as later heterotypic synonyms of *Mameliella alba* and an emended description of *Mameliella alba*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **68**, 1047-1051.
- López-López M, López AU, Sainz T, Rosales AN.** (2005). ¿Qué sabe usted acerca de...Genómica? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* **36**, 42-44.
- Lu X, Liu Y, Johs A, Zhao L, Wang T, Yang Z, Lin H, Elias DA, et al.** (2016). Anaerobic mercury methylation and demethylation by *Geobacter bemidjiensis* Bem. *Environ Sci Technol.* **50**, 4366-4373.
- Lucena T, Arahal DR, Ruvira MA, Navarro-Torre S, Mesa J, Pajuelo E, Rodríguez-Llorente I D, Rodrigo-Torres L, et al.** (2017a) *Vibrio palustris* sp. nov. and *Vibrio spartinae* sp. nov., two

novel members of the *Gazogenes* clade, isolated from salt-marsh plants (*Arthrocnemum macrostachyum* and *Spartina maritima*). *Int J Syst Evol Microbiol.* **67**, 3506-3512.

Lucena T, Macián MC, Arahal DR, Rodrigo-Torres L, Pujalte MJ. (2017b) Whole genome sequences reveal *Vibrio hemicentroti* Kim *et al.* 2013 as a later heterotypic synonym of *Vibrio splendidus* (Beijerinck 1900) Baumann *et al.* 1981. *Int J Syst Evol Microbiol.* **67**, 1669-1671.

Lucena T, Pujalte MJ, Ruvira MA, Garay E, Macián MC, Arahal DR. (2012). *Tropicibacter multivorans* sp. nov., an aerobic alphaproteobacterium isolated from surface seawater. *Int J Syst Evol Microbiol.* **62**, 844-848.

Lucena T, Ruvira MA, Macián MC, Pujalte M J, Arahal DR. (2013). Description of *Tropicibacter mediterraneus* sp. nov. and *Tropicibacter litoreus* sp. nov. *Syst Appl Microbiol.* **36**, 325-329.

Lucena T, Ruvira MA, Macián MC, Pujalte MJ, Arahal DR. (2014). *Roseovarius albus* sp. nov., a new Alphaproteobacterium isolated from the Mediterranean Sea. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **105**, 671-678.

Luo C, Rodríguez RLM, Konstantinidis KT. (2014). MyTaxa: an advanced taxonomic classifier for genomic and metagenomic sequences. *Nucleic Acids Res.* **42**, 1-12.

Luo H, Benner R, Long RA, Hu J. (2009). Subcellular localization of marine bacterial alkaline phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 21219-21223.

Luo H, Moran MA. (2014). Evolutionary ecology of the marine *Roseobacter* clade. *Microbiol Mol Biol Rev.* **78**, 573-587.

Luo H, Zhang H, Long RA, Benner R. (2011). Depth distributions of alkaline phosphatase and phosphonate utilization genes in the North Pacific Subtropical Gyre. *AME.* **62**, 61-69.

Luque-Almagro VM, Gates AJ, Moreno-Vivián C, Ferguson SJ, Richardson DJ, Roldán MD. (2011). Bacterial nitrate assimilation: gene distribution and regulation. *Biochem Soc Trans.* **39**, 1838-1843.

Lv C, Zhao C, Yang S, Qu Y. (2012). Arsenic metabolism in purple nonsulfur bacteria. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* **52**, 1497-1507.

Machado H, Sonnenschein EC, Melchiorson J, Gram L. (2015). Genome mining reveals unlocked bioactive potential of marine Gram-negative bacteria. *BMC Genomics.* **16**, 1-12.

Macomber L, Imlay J A. (2009). The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 8344-8349.

Mahadevan P, Seto D. (2010). Rapid pairwise synteny analyses of large bacterial genomes using web-based GeneOrder4.0. *BMC Research Notes.* **3**, 1-5.

Mahato NK, Gupta V, Singh P, Kumari R, Verma H, Tripathi C, Rani P, Sharma A, et al. (2017). Microbial taxonomy in the era of OMICS: application of DNA sequences, computational tools and techniques. *Antonie van Leeuwenhoek.* **110**, 1357-1371.

Mahub KR, Krishnan K, Megharaj M, Naidu R. (2016). Mercury inhibits soil enzyme activity in a lower concentration than the guideline value. **96**, 76-82. *Bull Environ Contam.* **96**, 76-82.

Marçais G, Yorke JA, Zimin A. (2015). QuorUM: An error corrector for Illumina reads. *PLoS One.* **10**, 1-13.

Mardis ER. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* **9**, 387-402.

- Markowitz VM, Chen IM, Palaniappan K, Chu K, Szeto E, Pillay M, Ratner A, Huang J, et al.** (2014). IMG 4 version of the integrated microbial genomes comparative analysis system. *Nucleic Acids Res.* **42**, 560-567.
- Marques JC, Lamosa P, Russell C, Ventura R, Maycock C, Semmelhack MF, Miller ST, Xavier KB.** (2011). Processing the interspecies quorum-sensing signal autoinducer-2 (AI-2): characterization of phospho-(S)-4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione isomerization by LsrG protein. *J Biol Chem.* **286**, 18331-18343.
- Marschall T, Marz M, Abeel T, Dijkstra L, Dutilh BE, Ghaffaari A, Kersey P, Kloosterman WP, et al.** (2018). Computational pan-genomics: status, promises and challenges. *Brief Bioinform.* **19**, 118-135.
- Martens T, Gram L, Grossart HP, Kessler D, Müller R, Simon M, Wenzel SC, Brinkhoff T.** (2007). Bacteria of the *Roseobacter* clade show potential for secondary metabolite production. *Microb Ecol.* **54**, 31-42.
- Martens T, Heidorn T, Pukall R, Simon M, Tindall BJ, Brinkhoff T.** (2006). Reclassification of *Roseobacter gallaeciensis* Ruiz-Ponte et al. 1998 as *Phaeobacter gallaeciensis* gen. nov., comb. nov., description of *Phaeobacter inhibens* sp. nov., reclassification of *Ruegeria algicola* (Lafay et al. 1995) Uchino et al. 1999 as *Marinovum algicola* gen. nov., comb. nov., and emended descriptions of the genera *Roseobacter*, *Ruegeria* and *Leisingera*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **56**, 1293-1304.
- Martin JE, Giedroc DP.** (2016). Functional determinants of metal ion transport and selectivity in paralogous cation diffusion facilitator transporters CzcD and MntE in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* **198**, 1066-1076.
- Martínez A, Tyson GW, Delong EF.** (2010). Widespread known and novel phosphonate utilization pathways in marine bacteria revealed by functional screening and metagenomic analyses. *Environ Microbiol.* **12**, 222-238.
- Martínez-Checa F, Quesada E, Martínez-Cánovas MJ, Llamas I, Béjar V.** (2005). *Palleronia marismenoris* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium belonging to the 'Alphaproteobacteria', isolated from a saline soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* **55**, 2525-2530.
- Mas M.** (2017). Proteogenomic and physiologic characterization of new members of *Roseobacter* lineage from Mallorca harbors. Tesis doctoral. Universitat de les Illes Balears.
- Mas-LLadó M, Piña-Villalonga JM, Brunet-Galmés I, Nogales B, Bosch R.** (2015). Draft genome sequences of *Thalassobacter* strains 1CONIMARR09 and 16PALIMAR09, two members of *Roseobacter* lineage isolated from coastal areas of the Mediterranean Sea around Mallorca island. *Genome Announc.* **3**, 1-2.
- Masuda S, Nagashima KVP, Shimada K, Matsuura K.** (2000). Transcriptional control of expression of genes for photosynthetic reaction center and light-harvesting proteins in the purple bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*. *J Bacteriol.* **182**, 2778-2786.
- McLachlan AD, Staden R, Boswell DR.** (1984). A method for measuring the non-random bias of a codon usage table. *Nucleic Acids Res.* **12**, 9567-9575.
- Medema MH, Blin K, Cimermancic P, de Jager V, Zakrzewski P, Fischbach MA, Weber T, Takano E, Breitling R.** (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res.* **39**, 339-346.
- Meier-Kolthoff JP, Klenk HP, Göker M.** (2014). Taxonomic use of DNA G+C content and DNA-DNA hybridization in the genomic age. *Int J syst Evol Microbiol.* **64**, 352-356.

- Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, Göker M.** (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinform.* **14**, 1-14.
- Méric G, Yahara K, Mageiros L, Pascoe B, Maiden MCJ, Jolley KA, Sheppard SM.** (2014). A reference pan-genome approach to comparative bacterial genomics: Identification of novel epidemiological markers in pathogenic *Campylobacter*. *PLoS One.* **9**, 1-12.
- Meyer B, Imhoff JF, Kuever J.** (2007). Molecular analysis of the distribution and phylogeny of the *soxB* gene among sulfur-oxidizing bacteria—evolution of the Sox sulfur oxidation enzyme system. *Environ Microbiol.* **9**, 2957-2977.
- Michael V, Frank O, Bartling P, Scheuner C, Göker M, Brinkmann H, Petersen J.** (2016). Biofilm plasmids with a rhamnose operon are widely distributed determinants of the 'swim-or-stick' lifestyle in roseobacters. *ISME J.* **10**, 2498-2513.
- Mignard S, Flandrois JP.** (2006). 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. *J Microbiol Methods.* **63**, 574-581.
- Miller TR, Belas R.** (2004). Dimethylsulfoniopropionate metabolism by *Pfiesteria*-associated *Roseobacter* clade. *Appl Environ Microbiol.* **70**, 3383-3391.
- Miller TR, Hnilicka K, Dziedzic A, Desplats P, Belas R.** (2004). Chemotaxis of *Silicibacter* sp. strain TM1040 toward dinoflagellate products. *Appl Environ Microbiol.* **70**, 4692-4701.
- Minamino T, Morimoto YV, Kinoshita M, Aldridge PD, Namba K.** (2014). The bacterial flagellar protein export apparatus processively transports flagellar proteins even with extremely infrequent ATP hydrolysis. *Sci Rep.* **4**, 1-8.
- Mizuno CM, Kimes N E, López-Pérez M, Ausó E, Rodríguez-Valera F, Ghai R.** (2013). A hybrid NRPS/PKS gene cluster related to the bleomicyn family of antitumor antibiotics in *Alteromonas macleodii* strains. *PLoS One.* **8**, 1-12.
- Mogk A, Deuerling E, Vorderwülbecke S, Vierling E, Bukau B.** (2003). Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Mol Microbiol.* **50**, 585-595.
- Mohamed NM, Cicirelli EM, Kan J, Chen F, Fuqua C, Hill RT.** (2008). Diversity and quorum-sensing signal production of *Proteobacteria* associated with marine sponges. *Environ Microbiol.* **10**, 75-86.
- Mongiardini EJ, Parisi GD, Quelas JI, Lodeiro AR.** (2016). The tight-adhesion proteins TadGEF of *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110 are involved in cell adhesion and infectivity on soybean roots. *Microbiol Res.* **182**, 80-88.
- Montoya EAR, Montañez LE, Luévanos MP, Balagurusamy N.** (2015). Impacto del arsénico en el ambiente y su transformación por microorganismos. *Terra Latinoam.* **33**, 103-118.
- Moore ERB, Mihaylova SA, Vandamme P, Krichevsky MI, Dijkshoorn L.** (2010). Microbial systematics and taxonomy: relevance for a microbial commons. *Res Microbiol.* **161**, 430-438.
- Moran MA, Belas R, Schell MA, González JM, Sun F, Sun S, Binder BJ, Edmonds J, et al.** (2007). Ecological genomics of marine Roseobacters. *Appl Environ Microbiol.* **73**, 4559-4569.
- Moran MA, Buchan A, González JM, Heidelberg JF, Whitman WB, Kiene RP, Henriksen JR, King GM, et al.** (2004). Genome sequence of *Silicibacter pomeroyi* reveals adaptations to the marine environment. *Nature.* **432**, 910-913.
- Moran MA, Miller W.** (2007). Resourceful heterotrophs make the most of light in the coastal ocean. *Nat Rev Micro.* **5**, 792-800.

- Moran MA, Reisch CR, Kiene RP, Whitman WB.** (2012). Genomic insights into bacterial DMSP transformations. *Ann Rev Mar Sci.* **4**, 523-542.
- Moreno-Vivián C, Cabello P, Martínez-Luque M, Blasco R, Castillo F.** (1999). Prokaryotic nitrate reduction: Molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *J Bacteriol.* **181**, 6573-6584.
- Muhammadi, Ahmed N.** (2007). Genetics of bacterial alginate: alginate genes distribution, organization and biosynthesis in bacteria. *Curr Genomics.* **8**, 191-202.
- Munkelt D, Grass G, Nies DH.** (2004). The chromosomally encoded cation diffusion facilitator proteins DmeF and FieF from *Wautersia metallidurans* CH34 are transporters of broad metal specificity. *J Bacteriol.* **186**, 8036-8043.
- Muramatsu Y, Uchino Y, Kasai H, Suzuki K, Nakagawa Y.** (2007). *Ruegeria mobilis* sp. nov., a member of the *Alphaproteobacteria* isolated in Japan and Palau. *Int J Syst Evol Microbiol.* **57**, 1304-1309.
- Muras A, López-Pérez M, Mayer C, Parga A, Amaro-Blanco J, Otero A.** (2018). High prevalence of Quorum-Sensing and Quorum-Quenching activity among cultivable bacteria and metagenomic sequences in the Mediterranean sea. *Genes.* **9**, 1-20.
- Muthusamy S, Baltar F, González JM, Pinhassi J.** (2014). Dynamics of metabolic activities and gene expression in the *Roseobacter* clade bacterium *Phaeobacter* sp. strain MED193 during growth with thiosulfate. *Appl Environ Microbiol.* **80**, 6933-6942.
- Na SI, Kim YO, Yoon SH, Ha S, Baek I, Chun J.** (2018). UBCG: Up-to-date bacterial core gene set and pipeline for phylogenomic tree reconstruction. *J Microbiol.* **56**, 280-285.
- Naughton LM, Romano S, O’Gara F, Dobson ADW.** (2017). Identification of secondary metabolite gene clusters in *Pseudovibrio* genus reveals encouraging biosynthetic potential toward the production of novel bioactive compounds. *Front Microbiol.* **8**, 1-15.
- Nazir R.** (2012). The ecological success of *Burkholderia terrae* BS001 and related strains in the mycosphere. University of Groningen. Tesis doctoral.
- Newton RJ, Griffin LE, Bowles KM, Meile C, Gifford S, Givens CE, Howard EC, King E, et al.** (2010). Genome characteristics of a generalist marine bacterial lineage. *ISME J.* **4**, 784-798.
- Nie Y, Chi CQ, Fang H, Liang JL, Lu SL, Lai GL, Tang YQ, Wu XL.** (2014). Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments. *Sci Rep.* **4**, 1-11.
- Nies DH.** (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.* **27**, 313-339.
- Nogales B, Alejandro-Marín C, Piña-Villalonga J, Mas-Lladó M, Galmés-Brunet I, Bosch R.** (2013). Comparative genomics of aromatic compounds degradation pathways in the marine *Roseobacter* clade. *Rapp Comm int Mer Médit.* **40**, 400.
- Norman AF, Regnery R, Jameson P, Greene C, Krause DC.** (1995). Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *J Clin Microbiol.* **33**, 1797-1803.
- Nowka B, Daims H, Spieck E.** (2015). Comparison of oxidation kinetics of nitrite-oxidizing bacteria: Nitrite availability as a key factor in niche differentiation. *Appl Environ Microbiol.* **81**, 745-753.
- Oberto J.** (2013). SyntTax: a web server linking synteny to prokaryotic taxonomy. *BMC Bioinformatics.* **14**, 1-10.
- Oh KH, Choi WC, Jung YT, Kang SJ, Oh TK, Yoon JH.** (2012). *Tropicimonas aquimaris* sp. nov., isolated from seawater, and emended description of the genus *Tropicimonas* Harwati et al., 2009. *Int J Syst Evol Microbiol.* **62**, 688-692.

- Oh YS, Lim HJ, Cha IT, Im WT, Yoo JS, Kang UG, Rhee SK, Roh DH.** (2009). *Roseovarius halotolerans* sp. nov., isolated from deep seawater. *Int J Syst Evol Microbiol.* **59**, 2718-2723.
- Omura S, Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Takahashi C, Shinose M, Takahashi Y, Horikawa H, et al.** (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 12215-12220.
- Onda DF, Azanza RV, Lluisma AO.** (2015). Potential DMSP-degrading *Roseobacter* clade dominates endosymbiotic microflora of *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* (*Dinophyceae*) in vitro. *Arch Microbiol.* **197**, 965-971.
- Orchard ED, Ammerman JW, Lomas MW, Dyhrman ST.** (2010). Dissolved inorganic and organic phosphorus uptake in *Trichodesmium* and the microbial community: The importance of phosphorus ester in the Sargasso Sea. *Limnol Oceanogr.* **55**, 1390-1399.
- Orita I, Sato T, Yurimoto H, Kato N, Atomi H, Imanaka T, Sakai Y.** (2006). The ribulose monophosphate pathway substitutes for the missing pentose phosphate pathway in the archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *J Bacteriol.* **188**, 4698-4704.
- Oves M, Hussain FM.** (2016). Antibiotics and heavy metal resistance emergence in water borne bacteria. *J Investig Genomics.* **3**, 23-25.
- Owen RJ.** (2004). Bacterial taxonomic: finding the wood through the phylogenetic trees. *Methods Mol Biol.* **266**, 353-383.
- Oz A, Sabehi G, Koblížek M, Massana R, Béjà O.** (2005). *Roseobacter*-like bacteria in red and Mediterranean Sea aerobic anoxygenic photosynthetic populations. *Appl Environ Microbiol.* **71**, 344-353.
- Pal A, Paul AK.** (2004). Aerobic chromate reduction by chromium-resistant bacteria isolated from serpentine soil. *Microbiol Res.* 347-354.
- Pal C, Asiani K, Arya S, Rensing C, Stekel DJ, Larsson DGJ, Hobman JL.** (2017). Metal resistance and its association with antibiotic resistance. *Adv Microb Physiol.* **70**, 261-313.
- Palleroni NJ.** (2003). Prokaryote taxonomy of the 20 th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view. *Microbiology*, **149**, 1-7.
- Pan YJ, Lin TL, Chen CT, Chen YY, Hsieh PF, Hsu CR, Wu MC, Wang JT.** (2015). Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp. *Sci Rep.* **5**, 1-10.
- Park S, Choi J, Choi S J, Yoon JH.** (2018). *Pseudobizionia ponticola* gen. nov., sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol.* **68**, 1467-1473.
- Park S, Jung YT, Won SM, Yoon JH.** (2014a). *Pseudoruegeria sabulilitoris* sp. nov., isolated from seashore. *Int J Syst Evol Microbiol.* **64**, 3276-3281.
- Park S, Jung YT, Yoon JH.** (2013a). *Pelagicola litorisediminis* sp. nov., a novel *Alphaproteobacterium* isolated from tidal flat sediment. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **104**, 103-110.
- Park S, Jung YT, Yoon JH.** (2013b). *Loktanella sediminilitoris* sp. nov., isolated from tidal flat sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.* **63**, 4118-4123.
- Park S, Jung YT, Yoon JH.** (2016). *Pseudoroseicyclus aestuarii* gen. nov., sp. nov., isolated from a tidal flat. *Int J Syst Evol Microbiol.* **66**, 2165-2171.
- Park S, Kang CH, Park JM, Yoon JH.** (2014b). *Aquimixticola soesokkakensis* gen. nov., sp. nov., a novel lipolytic *Alphaproteobacterium* isolated from the junction between the ocean and a freshwater spring, and reclassification of *Roseovarius marinus* as *Pacificibacter*

- marinus* comb. nov. and emended description of the genus *Pacificibacter*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **106**, 647-655.
- Park S, Lee JS, Lee KC, Yoon JH.** (2013c). *Loktanella soesokkakensis* sp. nov., isolated from the junction between the North Pacific Ocean and a freshwater spring. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **104**, 397-404.
- Park S, Park JM, Jung YT, Won SM, Yoon JH.** (2015a). *Primorskyibacter insulae* sp. nov., isolated from the junction between the ocean and a freshwater spring. *Int J Syst Evol Microbiol*. **65**, 3971-3976.
- Park S, Park JM, Kang CH, Yoon JH.** (2014c). *Roseovarius gaetbuli* sp. nov., a novel Alphaproteobacterium isolated from a tidal flat sediment. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **105**, 723-730.
- Park S, Park JM, Kang CH, Yoon JH.** (2014d). *Confluentimicrobium lipolyticum* gen. nov., sp. nov., a novel lipolytic Alphaproteobacterium isolated from the junction between the ocean and a freshwater spring, and emended description of *Actibacterium mucosum* Lucena et al. 2012. *Antonie Van Leeuwenhoek*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **106**, 969-977.
- Park S, Park JM, Kang CH, Yoon JH.** (2015b). *Aliiroseovarius pelagivivens* gen. nov., sp. nov., isolated from seawater, and reclassification of three species of the genus *Roseovarius* as *Aliiroseovarius crassostreae* comb. nov., *Aliiroseovarius halocynthiae* comb. nov. and *Aliiroseovarius sediminilitoris* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. **65**, 2646-2652.
- Park S, Park JM, Lee KC, Bae KS, Yoon JH.** (2014e). *Boseongicola aestuarii* gen. nov., sp. nov., isolated from a tidal flat sediment. *Int J Syst Evol Microbiol*. **64**, 2618-2624.
- Park S, Won SM, Park JM, Jung YT, Yoon JH.** (2015c). *Pontivivens insulae* gen. nov., sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol*. **65**, 2896-2902.
- Park S, Yoon JH.** (2014). *Octadecabacter jejudonensis* sp. nov., isolated from the junction between the ocean and a freshwater spring and emended description of the genus *Octadecabacter*. *Int J Syst Evol Microbiol*. **64**, 719-724.
- Parker CT, Tindall BJ, Garrity GM.** (2019). International Code of Nomenclature of Prokaryotes. *Int J Syst Evol Bacteriol*. **69**, 1-111.
- Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW.** (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res*. **25**, 1043-1055.
- Pascual JM.** (2010). Taxonomía molecular del clado central del género *Vibrio* y otras *Vibrionaceae*. Universidad de Valencia. Tesis doctoral.
- Patel RK, Jain M.** (2012). NGS QC Toolkit: A toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PLoS One*. **7**, 1-7.
- Patey MD, Rijkenberg MJA, Statham PJ, Stinchcombe MC, Achterberg EP, Mowlem M.** (2008). Determination of nitrate and phosphate in seawater at nanomolar concentrations. *Trends Analyt Chem*. **27**, 169-182.
- Patzelt D, Michael V, Päuker O, Ebert M, Tielen P, Jahn D, Tomasch J, Petersen J, Wagner-Döbler I.** (2016). Gene flow across genus barriers - conjugation of *Dinoroseobacter shibae*'s 191-kb killer plasmid into *Phaeobacter inhibens* and AHL-mediated expression of type IV secretion systems. *Front Microbiol*. **7**, 1-12.
- Penesyan A, Breider S, Schumann P, Tindall B J, Brinkhoff T.** (2013). *Epibacterium ulvae* gen. nov., sp. nov., epibiotic bacteria isolated from the surface of a marine alga. *Int J Syst Evol Microbiol*. **63**, 1589-1596.

- Persson OP, Pinhassi J, Riemann L, Marklund BI, Rhen M, Normark S, González JM, Hagström Å.** (2009). High abundance of virulence gene homologues in marine bacteria. *Environ Microbiol.* **11**, 1348-1357.
- Petersen J, Brinkmann H, Berger M, Brinkhoff T, Päuker O, Pradella S.** (2011a). Origin and evolution of a novel DnaA-Like plasmid replication type in *Rhodobacterales*. *Mol Biol Evol.* **28**, 1229-1240.
- Petersen J, Brinkmann H, Bunk B, Michael V, Päuker O, Pradella S.** (2012). Think pink: photosynthesis, plasmids and the *Roseobacter* clade. *Environ Microbiol.* **14**, 2661-2672.
- Petersen J, Brinkmann H, Pradella S.** (2009). Diversity and evolution of *repABC* type plasmid in *Rhodobacterales*. *Environ Microbiol.* **11**, 2627-2638.
- Petersen J, Frank O, Göker M, Pradella S.** (2013). Extrachromosomal, extraordinary and essential - the plasmids of the *Roseobacter* clade. *Appl Microbiol Biotechnol.* **97**, 2805-2815.
- Petersen J, Wagner-Döbler I.** (2017). Plasmid transfer in the ocean – A case study from *Roseobacter* group. *Front Microbiol.* **8**, 1-6.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H.** (2011b). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods.* **8**, 785-786.
- Phadtare S.** (2004). Recent developments in bacterial cold-shock response. *Curr Issues Mol Biol.* **6**, 125-136.
- Piekarski T, Buchholz I, Drepper T, Schobert M, Wagner-Doebler I, Tielen P, Jahn D.** (2009). Genetic tools for the investigation of *Roseobacter* clade bacteria. *BMC Microbiol.* **9**, 1-12.
- Pillonel T, Bertelli C, Salamin N, Greub G.** (2015) Taxogenomics of the order Chlamydiales. *Int J Syst Evol Microbiol.* **65**, 1381-1393.
- Piña JM.** (2012). Diversidad e importancia ecológica del grupo *Roseobacter* en aguas costeras sometidas a impacto antropogénico. Universitat de les Illes Balears. Tesis doctoral.
- Planas M, Pérez-Lorenzo M, Hjelm M, Gram L, Uglenes FI, Bergh Ø, Pintado J.** (2006). Probiotic effect in vivo of *Roseobacter* strain 27-4 against *Vibrio (Listonella) anguillarum* infections in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Aquaculture.* **255**, 323-333.
- Pohlner M, Degenhardt J, von Hoyningen-Huene AJE, Wemheuer B, Erlmann N, Schnetger B, Bedewin TH, Engelen B.** (2017a). The biogeographical distribution of benthic *Roseobacter* group members along a Pacific transect is structured by nutrient availability within the sediments and primary production in different oceanic provinces. *Front Microbiol.* **8**, 1-14.
- Pohlner M, Marshall I, Schreiber L, Cypionka H, Engelen B.** (2017b). Draft genome sequence of *Pseudoruegeria* sp. SK021, a representative of the marine *Roseobacter* group, isolated from North Sea sediment. *Genome Announc.* **5**, 1-2.
- Polcyn W, Podeszwa J.** (2009). Coordinate induction of dissimilatory ammonification and fermentative pathways in rhizobia. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **96**, 79-87.
- Porsby CH, Nielsen KF, Gram L.** (2008). *Phaeobacter* and *Ruegeria* species of the *Roseobacter* clade colonize separate niches in a Danish turbot (*Scophthalmus maximus*)-rearing farm and antagonize *Vibrio anguillarum* under different growth conditions. *Appl Environ Microbiol.* **74**, 7356-7364.
- Prabakaran SR, Manorama R, Delille D, Shivaji S.** (2007). Predominance of *Roseobacter*, *Sulfitobacter*, *Glaciecola* and *Psychrobacter* in seawater collected off Ushuaia, Argentina, Sub-Antartica. *FEMS Microbiol Ecol.* **59**, 342-355.
- Pradella S, Päuker O, Petersen J.** (2010). Genome organization of the marine *Roseobacter* clade member *Marinovum algicola*. *Arch Microbiol.* **192**, 115-126.

- Prakash O, Verma M, Sharma P, Kumar M, Kumari K, Singh A, Kumari H, Jit S, et al.** (2007). Polyphasic approach of bacterial classification – An overview of recent advances. *Indian J Microbiol.* **47**, 98-108.
- Priyanka J, Koel M.** (2015). Diversity study of nitrate reducing bacteria from soil samples - A metagenomics approach. *J Comput Sci Syst Biol.* **8**, 191-198.
- Proost S, Fostier J, De Witte D, Dhoedt B, Demeester P, Van de Peer Y, Vandepoele K.** (2012). *Nucleic Acids Res.* **40**, e11.
- Pujalte MJ, Lucena T, Rodrigo-Torres L, Arahál DR.** (2018). Comparative genomics of *Thalassobius* including the description of *Thalassobius activus* sp. nov., and *Thalassobius autumnalis* sp. nov. *Front Microbiol.* **8**, 1-15.
- Pujalte MJ, Lucena T, Ruvira MA, Arahál DR, Macián MC.** (2014). The family *Rhodobacteraceae*. In: *The Prokaryotes*, 4th edn, vol. 8. (*Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria*), pp. 439-512. Edited by E. Rosenberg, E. F. DeLong, E. Stackebrandt, S. Lory and F. Thompson. Berlin, Germany: Springer Verlag.
- Qi J, Wang B, Hao BL.** (2004). Whole proteome prokaryote phylogeny without sequence alignment: a K-string composition approach. *J Mol Evol.* **58**, 1-11.
- Qian Y, Zhang W, Yu L, Feng H.** (2015). Metal pollution in coastal sediments. *Curr Pollut Rep.* **1**, 203-219.
- Qin QL, Xie BB, Zhang XY, Chen XL, Zhou BC, Zhou J, Zhang YZ.** (2014). A proposed genus boundary for the prokaryotes based on genomics insights. *J Bacteriol.* **196**, 2210-2215.
- Ra K, Kim ES, Kim KT, Kim JK, Lee JM, Choi JY.** (2013). Assessment of heavy metal contamination and its ecological risk in the surface sediments along the coast of Korea. *J Coast Res.* **1**, 105-110.
- Radianingtyas H, Wright PC.** (2003). Alcohol dehydrogenases from thermophilic and hyperthermophilic archaea and bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* **27**, 593-616.
- Raina V, Nayak T, Ray L, Kumari K, Suar M.** (2018). Chapter 9 – A polyphasic taxonomic approach for designation and description of novel microbial species. In *Microbial diversity in the genomic era.* (ed. S. Das and H. R. Dash), pp. 137-152. Academic Press.
- Rajendhran J, Gunasekaran P.** (2011). Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiol Res.* **166**, 99-110.
- Ramachandran A, Walsh DA.** (2015). Investigation of XoxF methanol dehydrogenases reveals new methylotrophic bacteria in pelagic marine and freshwater ecosystems. *FEMS Microbiol Ecol.* **91**, 1-10.
- Ramasamy D, Mishra AK, Lagier JC, Padhmanabhan R, Rossi M, Sentausa E, Raoult D, Fournier PE.** (2014). A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacteria species. *Int J Syst Evol Microbiol.* **64**, 384-391.
- Ramirez MS, Nikolaidis N, Tolmasky ME.** (2013). Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: the *aac(6′)-Ib* paradigm. *Front Microbiol.* **4**, 1-13.
- Ranquet C, Ollagnier-de-Choudens S, Loiseau L, Barras F, Fontecave M.** (2007). Cobalt stress in *Escherichia coli*: The effect on the iron-sulfur proteins. *J Biol Chem.* **282**, 30442-30451.
- Rather IA, Galope R, Bajpai VK, Lim J, Paek WK, Park YH.** (2017). Diversity of marine bacteria and their bacteriocins: applications in aquaculture. *Rev Fish Aquac.* **25**, 257-269.
- Reckseidler S L, DeShazer D, Sokol PA, Woods DE.** (2001). Detection of bacterial virulence genes by subtractive hybridization: Identification of capsular polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* as a major virulence determinant. *Infect Immun.* **69**, 34.44.

- Reid AN, Whitfield C.** (2005). Functional analysis of conserved gene products involved in assembly of *Escherichia coli* capsules and exopolysaccharides: Evidence for molecular recognition between Wza and Wzc for colanic acid biosynthesis. *J Bacteriol.* **187**, 5470-5481.
- Reisch CR, Crabb WM, Gifford SM, Teng Q, Stoudemayer MJ, Moran MA, Whitman WB.** (2013). Metabolism of dimethylsulphoniopropionate by *Ruegeria pomeroyi* DSS-3. *Mol Microbiol.* **89**, 774-791.
- Reisch CR, Moran MA, Whitman W.** (2011a). Bacterial catabolism of Dimethylsulfonylpropionate (DMSP). *Front Microbiol.* **2**, 1-12.
- Reisch CR, Stoudemayer MJ, Varaljay VA, Amster IJ, Moran MA, Whitman WB.** (2011b). Novel pathway for assimilation of dimethylsulphoniopropionate widespread in marine bacteria. *Nature.* **473**, 208-211.
- Rensing C, Grass G.** (2003). *Escherichia coli* mechanism of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev.* **27**, 197-213.
- Rich JJ, Heichen RS, Bottomley PJ, Cromarck KJr, Myrold DD.** (2003). Community composition and functioning of denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soils. *Appl Environ Microbiol.* **69**, 5974-5982.
- Richter M, Rosselló-Móra R, Glöckner FO, Peplies J.** (2016). JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics.* **32**, 929-931.
- Richter M, Rosselló-Móra R.** (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci USA.* **106**, 19126-19131.
- Ricker N, Qian H, Fulthorpe RR.** (2012). The limitations of draft assemblies for understanding prokaryotic adaptation and evolution. *Genomics.* **100**, 167-175.
- Riedel T, Spring S, Fiebig A, Petersen J, Kyrpides NC, Göker M, Klenk HP.** (2014). Genome sequence of the exopolysaccharide-producing *Salipiger mucosus* type strain (DSM 16094^T), a moderately halophilic member of the *Roseobacter* clade. *Stand Genomic Sci.* **9**, 1331-1343.
- Riedel T, Teshima H, Petersen J, Fiebig A, Davenport K, Daligault H, Erkkilä T, Gu W, et al.** (2013). Genome sequence of the *Leisingera aquimarina* type strain (DSM 24565^T), a member of the marine *Roseobacter* clade rich in extrachromosomal elements. *Stand Genomic Sci.* **8**, 389-402.
- Riesco R, Carro L, Román-Ponce B, Prieto C, Blom J, Klenk HP, Normand P, Trujillo ME.** (2018). Defining the species *Micromonospora saelicesensis* and *Micromonospora noduli* under the framework of genomics. *Front Microbiol.* **9**, 1-16.
- Rodrigo-Torres L, Pujalte MJ, Arahal DR.** (2016a). Draft genomes of *Nautella italica* strains CECT 7645^T and CECT 7321^T: Two roseobacters with potential pathogenic and biotechnological traits. *Mar Genomics.* **26**, 73-80.
- Rodrigo-Torres L, Pujalte MJ, Arahal DR.** (2016b). Draft genome of *Leisingera aquaemixtae* CECT 8399^T, a member of the *Roseobacter* clade isolated from a junction of fresh and ocean water in Jeju Island, South Korea. *Genom Data.* **7**, 233-236.
- Rodrigo-Torres L, Pujalte MJ, Arahal DR.** (2017). Draft genome sequence of *Thalassobius gelatinovor* CECT 4357^T, a roseobacter with the potential ability to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons. *Gene Reports.* **9**, 32-36.
- Rodríguez F, Arsène-Ploetze F, Rist W, Rüdiger S, Schneider-Mergener J, Mayer MP, Bukau B.** (2008). Molecular basis for regulation of the heat shock transcription factor sigma32 by the DnaK and DnaJ chaperones. *Mol Cell.* **32**, 347-358.

- Roe K L, Barbeau K, Mann EL, Haygood MG.** (2012). Acquisition of iron by *Trichodesmium* and associated bacteria in culture. *Environ Microbiol.* **14**, 1681-1695.
- Roe K L, Hogle SL, Barbeau KA.** (2013). Utilization of heme as iron source by marine *Alphaproteobacteria* in the *Roseobacter* clade. *Appl Environ Microbiol.* **79**, 5753-5762.
- Rojas DF.** (2008). Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium sp.* Pontificia Universidad Javeriana. Tesis doctoral.
- Rokas A, Holland PWH.** (2000). Rare genomic changes as a tool for phylogenetics. *Trends Ecol. Evol.* **15**, 454-459.
- Romano S, Bondarev V, Kölling M, Dittmar T, Schulz-Vogt HN.** (2017). Phosphate limitation triggers the dissolution of precipitated iron by the marine bacterium *Pseudovibrio sp.* FO-BEG1. *Front Microbiol.* **8**, 1-11.
- Romero M, Otero A.** (2010). Interceptación de señales de comunicación bacteriana en bacterias aisladas del medio marino. *Revista Real Academia Galega de Ciencias.* **29**, 129-206.
- Römling U, Galperin MY.** (2015). Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. *Trends Microbiol.* **23**, 545-557.
- Rosselló-Móra R, Amann R.** (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.* **1**, 39-67.
- Rosselló-Móra R, Amann R.** (2015). Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. *Syst Appl Microbiol.* **38**, 209-216.
- Rosselló-Móra R.** (2005). Updating prokaryotic taxonomy. *J. Bacteriol.* **187**, 6255-6257.
- Rosselló-Móra R.** (2006). DNA-DNA Reassociation methods applied to microbial taxonomy and their critical evaluation. In *Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes.* (ed. E. Stackebrandt), pp. 23-50. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Rosselló-Móra R.** (2012). Towards a taxonomy of *Bacteria* and *Archea* based on interactive and cumulative data repositories. *Environ Microbiol.* **14**, 318-334.
- Rossi-Tamisier M, Benamar S, Raoult D, Fournier PE.** (2015). Cautionary tale of using 16S rRNA gene sequence similarity values in identification of human-associated bacterial species. *Int J Syst Evol Microbiol.* **65**, 1929-1934.
- Roth A, Fischer M, Hamid ME, Michalke S, Ludwig W, Mauch H.** (1998). Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacterial based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J Clin Microbiol* **36**, 139-147.
- Rothe B, Fischer A, Hirsch P, Sittig M, Stackebrandt E.** (1987). The phylogenetic position of the budding bacteria *Blastobacter aggregatus* and *Gemmobacter aquatilis* gen. nov., sp. nov. *Arch Microbiol.* **147**, 92-99.
- Roux V, Rydkina E, Ereemeeva M, Raoult D.** (1997). Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int J Syst Bacteriol.* **47**, 252-261.
- Rowe S, Hodson N, Griffiths G, Roberts IS.** (2000). Regulation of the *Escherichia coli* K5 capsule gene cluster: evidence for the roles of H-NS, BipA, and integration host factor in regulation of group 2 capsule gene clusters in pathogenic *E. coli*. *J Bacteriol.* **182**, 2741-2745.
- Rubiano-Labrador C, Bland C, Miotello G, Armengaud J, Baena S.** (2015). Salt stress induced changes in the exoproteome of the halotolerant bacterium *Tistlia consotensis* deciphered by proteogenomics. *PLoS One.* **10**, 1-16.
- Rudan M, Schneider D, Warnecke T, Krisko A.** (2015). RNA chaperones buffer deleterious mutations in *E. coli*. *eLife.* **4**, 1-16.

- Ruiz-Ponte C, Cilia V, Lambert C, Nicolas JL.** (1998). *Roseobacter gallaeciensis* sp. nov., a new marine bacterium isolated from rearings and collectors of the scallop *Pecten maximus*. *Int J Syst Bacteriol.* **48**, 537-542.
- Rütting T, Boeckx P, Müller C, Klemedtsson L.** (2011). Assessment of the importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium for the terrestrial nitrogen cycle. *Biogeosciences.* **8**, 1779-1791.
- Sachdeva S, Palur RV, Sudhakar KU, Rathinavelan T.** (2017). *E. coli* group 1 capsular polysaccharide exportation nanomachinery as a plausible antivirulence target in the perspective of emerging antimicrobial resistance. *Front Microbiol.* **8**, 1-19.
- Saha M, Sarkar S, Sarkar B, Sharma BK, Bhattacharjee S, Tribedi P.** (2016). Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environ Sci Pollut Res Int.* **23**, 3984-3999.
- Salazar AN, Abeel T.** (2018). Approximate, simultaneous comparison of microbial genome architectures via syntenic anchoring of quiver representations. *Bioinformatics.* **34**, 732-742.
- Salim HM, Ring KL, Cavalcanti AR.** (2008). Patterns of codon usage in two ciliates that reassign the genetic code: *Tetrahymena thermophila* and *Paramecium tetraurelia*. *Protist.* **159**, 283-298.
- Sangal V, Goodfellow M, Jones AL, Schwalbe EC, Blom J, Hoskisson PA, Sutcliffe IC.** (2016) Next-generation systematic: an innovative approach to resolve the structure of complex prokaryotic taxa. *Sci Rep.* **6**, 1-12.
- Sangal V, Nieminen L, Tucker NP, Hoskisson PA.** (2014) Revolutionizing prokaryotic systematic through next-generation sequencing. In: *Methods in Microbiology*, vol. 41, New Approaches to Prokaryotic Systematics, pp. 75-101. Edited by M. Goodfellow, I. Sutcliffe I and J. Chun. Oxford, UK: Academic Press.
- Satyapal GK, Mishra SK, Srivastava A, Ranjan RK, Prakash K, Haque R, Kumar N.** (2018). Possible bioremediation of arsenic toxicity by isolating indigenous bacteria from the middle Gangetic plain of Bihar, India. *Biotechnol Rep.* **17**, 117-125.
- Schäfer H, McDonald IR, Nightingale PD, Murrell JC.** (2005). Evidence for the presence of a CmuA methyltransferase pathway in novel marine methyl halide-oxidizing bacteria. *Environ Microbiol.* **7**, 839-852.
- Schäfer JK, Goodwin KD, McDonald IR, Murrell JC, Oremland RS.** (2002). *Leisingera methylhalidivorans* gen. nov., sp. nov., a marine methylotroph that grows on methyl bromide. *Int J Syst Evol Microbiol.* **52**, 851-859.
- Schleifer KH.** (2009). Classification of *Bacteria* and *Archea*: Past, present and future. *Syst Appl Microbiol.* **32**, 533-542.
- Schneider K, Asao M, Carter MS, Alber BE.** (2011). *Rhodobacter spaeroides* uses a reductive route via propionyl coenzyme A to assimilate 3-hydroxypropionate. *J Microbiol.* **194**, 225-232.
- Schurr MJ.** (2013). Which bacterial biofilm exopolysaccharide is preferred, Psl or Alginate? *J Bacteriol.* **195**, 1623-1626.
- Seemann T.** (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* **30**, 2068-2069.
- Segev E, Tellez A, Vlamakis H, Kolter R.** (2015). Morphological heterogeneity and attachment of *Phaeobacter inhibens*. *PLoS ONE.* **10**, 1-12.
- Selje N, Simon M, Brinkhoff T.** (2004). A newly discovered *Roseobacter* cluster in temperate and polar oceans. *Nature.* **427**, 445-448.

- Sentausa E, Fournier PE.** (2013). Advantages and limitations of genomics in prokaryotic taxonomy. *Clin Microbiol Infect.* **9**, 790-795.
- Seo SW, Kim D, Szubin R, Palsson BO.** (2015). Genome-wide reconstruction of OxyR and SoxRS transcriptional regulatory networks under oxidative stress in *Escherichia coli* K-12 MG1655. *Cell Rep.* **12**, 1289-1299.
- Serra DO, Richter AM, Klauck G, Mika F, Hengge R.** (2013). Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. *mBio.* **4**, 1-12.
- Seuylemezian A, Aronson HS, Tan J, Lin M, Schubert W, Vaishampayan P.** (2018). Development of a custom MALDI-TOF MS Database for Species-Level Identification of bacterial isolates collected from spacecraft and associated surfaces. *Front Microbiol.* **9**, 1-8.
- Seyedsayamdost MR, Case RJ, Kolter R, Clardy J.** (2011). The Jekyll-and-Hyde chemistry of *Phaobacter gallaeciensis*. *Nat Chem.* **3**, 331-335.
- Seyer K, Lessard M, Piette G, Lacroix M, Saucier L.** (2003). *Escherichia coli* heat shock protein DnaK: Production and consequences in terms of monitoring cooking. *Appl Environ Microbiol.* **69**, 3231-3237.
- Seymour JR, Ahmed T, Stocker MR.** (2008). A microfluidic chemotaxis assay to study microbial behavior in diffusing nutrient patches. *Limnol Oceanogr. Methods.* **6**, 477-488.
- Shafeeq S, Yesilkaya H, Kloosterman TG, Narayanan G, Wandel M, Andrew PW, Kuipers OP, Morrissey JA.** (2011). The cop operon is required for copper homeostasis and contributes to virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **81**, 1255-1270.
- Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SM, Kamal MA.** (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci.* **22**, 90-101.
- Shakya M, Soucy SM, Zhaxybayeva O.** (2017). Insights into origin and evolution of α -proteobacterial gene transfer agents. *Virus Evol.* **3**, 1-13.
- Shapleigh JP.** (2009) Dissimilatory and assimilatory nitrate reduction in the purple photosynthetic bacteria. In: *The Purple Phototrophic Bacteria. Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol. 28, pp. 623-642. Edited by C. N. Hunter, F. Daldal, M. C. Thurnauer and J. T. Beatty. Springer Dordrecht.
- Shapleigh JP.** (2013). The denitrifying prokaryotes. In: *The Prokaryotes*, 4 edn, pp. 769-792. Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schlieger and E. Stackebrandt. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Sharifah NE, Eguchi M.** (2011). The phytoplankton *Nannochloropsis oculata* enhances the ability of *Roseobacter* clade bacteria to inhibit the growth of fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *PLoS One.* **6**, 1-8.
- Sharp PM, Li WH.** (1987). The codon adaptation index - a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res.* **15**, 1281-1295.
- Sharp PM, Tuohy TM, Mosurski KR.** (1986). Codon usage in yeast: cluster analyses clearly differentiates highly and lowly expressed genes. *Nucleic Acids Res.* **14**, 5125-5143.
- Shiro Y.** (2012). Structure and function of bacterial nitric oxide reductases: nitric oxide reductase, anaerobic enzymes. *Biochim Biophys Acta.* **1817**, 1907-1913.
- Silver LL.** (2017). Fosfomicin: Mechanism and resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **7**, 1-12.
- Simon J.** (2002). Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. *FEMS Microbiol Rev.* **26**, 285-309.

- Simon M, Scheuner C, Meier-Kolthoff JP, Brinkhoff T, Wagner-Döbler I, Ulbrich M, Klenk HP, Schomburg D, Petersen J, Göker M.** (2017). Phylogenomics of *Rhodobacteraceae* reveals evolutionary adaptation to marine and non-marine habitats. *ISME J.* **11**, 1483-1499.
- Skininder MA, Merwin NJ, Johnston CW, Magarvey NA.** (2017). PRISM 3: expanded prediction of natural product chemical structures from microbial genomes. *Nucleic Acids Res.* **45**, 49-54.
- Sleator RD, Hill C.** (2002). Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol Rev.* **26**, 49-71.
- Sleje N, Simon M, Brinkhoff T.** (2004). A newly discovered *Roseobacter* cluster in temperate and polar oceans. *Nature.* **427**, 445-448.
- Slightom RN, Buchan A.** (2009). Surface colonization by marine *Roseobacters*: Integrating genotype and phenotype. *Appl Environ Microbiol.* **75**, 6027-6037.
- Slightom RN.** (2008). Characterization of motility and surface attachment in thirteen members of the *Roseobacter* clade. University of Tennessee-Knoxville. Tesis de master.
- Smillie C, Garcillán-Barcia MP, Francia MV, Rocha EP, de la Cruz F.** (2010). Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev.* **74**, 434-452.
- Smith AT, Ross MO, Hoffman BM, Rosenzweig AC.** (2017). Metal Selectivity of a Cd-, Co-, and Zn-Transporting P1B-type ATPase. *Biochemistry.* **56**, 85-95.
- Sneath PHA.** (1989). Predictivity in taxonomy and the probability of a tree. *Plant Syst Evol.* **167**, 43-57.
- Snel B, Bork P, Huynen MA.** (1999). Genome phylogeny based on gene content. *Nature.* **21**, 108-110.
- Snir S.** (2016). Ordered orthology as a tool in prokaryotic evolutionary inference. *Mob Genet Elements.* **6**, 1-10.
- Soderlund C, Bomhoff M, Nelson WM.** (2011). SyMAP v3.4: a turnkey synteny system with application to plant genomes. *Nucleic Acids Res.* **39**, 1-9.
- Sokolova TG, Yakimov MM, Chernyh NA, Lun'kova EY, Kostrikina NA, Taranov EA, Lebedinskii AV, Bonch-Osmolovskaya EA.** (2017). Aerobic carbon monoxide oxidation in the course of growth of a hyperthermophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. ETSY. *Microbiol.* **86**, 539-548.
- Solano C, Echeverz M, Lasa I.** (2014). Biofilm dispersión and quorum sensing. *Curr Opin Microbiol.* **18**, 96-104.
- Sonnenschein EC, Nielsen KF, D'Alvise P, Porsby CH, Melchiorsen J, Heilmann J, Kalatzis P G, López-Pérez M, et al.** (2017a). Global occurrence and heterogeneity of the *Roseobacter*-clade species *Ruegeria mobilis*. *ISME J.* **11**, 569-583.
- Sonnenschein EC, Phippen CBW, Bentzon-Tilia M, Rasmussen SA, Nielsen KF, Gram L.** (2018). Phylogenetic distribution of roseobacticides in the *Roseobacter* group and their effect on microalgae. *Environ Microbiol Rep.* **10**, 383-393.
- Sonnenschein EC, Phippen CBW, Nielsen KF, Mateiu RV, Melchiorsen J, Gram L, Overmann J, Freese HM.** (2017b). *Phaeobacter piscinae* sp. nov., a species of the *Roseobacter* group and potential aquaculture probiont. *Int J Syst Evol Microbiol.* **67**, 4559-4564.
- Soora M, Tomasch J, Wang H, Michael V, Petersen J, Engelen B, Wagner-Döbler I, Cypionka H.** (2015). Oxidative stress and starvation in *Dinoroseobacter shibae*: the role of extrachromosomal elements. *Front Microbiol.* **6**, 1-12.

- Sosa OA, Repeta DJ, Ferrón S, Bryant JA, Mende DR, Karl DM, DeLong EF.** (2017). Isolation and characterization of bacteria that degrade phosphonates in marine dissolved organic matter. *Front Microbiol.* **8**, 1-16.
- Soutourina OA, Bertin PN.** (2003). Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* **27**, 505-523.
- Sparacino-Watkins C, Stolz JF, Basu P.** (2014). Nitrate and periplasmic nitrate reductases. *Chem Soc Rev.* **43**, 676-706.
- Stackebrandt E, Ebers J.** (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today.* **33**, 152-155.
- 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 Bact.* **44**, 846-849.
- Stackebrandt E, Schumann P.** (2000) Description of *Bogoriellaceae* fam. nov., *Dermacoccaceae* fam. nov., *Rarobacteraceae* fam. nov. and *Sanguibacteraceae* fam. nov. and emendation of some families of the suborder *Micrococcineae*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **50**, 1279-1285.
- Staley JT.** (2006). The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **361**, 1899-1909.
- Starkenburg SR, Chain PS, Sayavedra-Soto LA, Hauser L, Land ML, Larimer FW, Malfatti S A, Klotz MG, et al.** (2006). Genomic sequence of the chemolithoautotrophic nitrite-oxidizing bacterium *Nitrobacter winogradsky* NB-255. *Appl Environ Microbiol.* **72**, 2050-2063.
- Stewart LC, Jung JH, Kim YT, Know SW, Park CS, Holden JF.** (2015). *Methanocaldococcus bathoardescens* sp. nov., a hyperthermophilic methanogen isolated from a volcanically active deep-sea hydrothermal vent. *Int J syst Evol Microbiol.* **65**, 1280-1283.
- Stingel F, Neeser J R, Mollet B.** (1996). Identification and characterization of the eps (Exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *J Bacteriol.* **178**, 1680-1690.
- Stojiljkovic I, Hantke K.** (1992). Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB-dependent system in gram-negative bacteria. *EMBO J.* **11**, 4359-4367.
- Su AM, Wang A, Yeo L.** (2017). Deletion of the group 1 capsular gene *wza* in *Escherichia coli* e69 confers resistance to the antibiotic erythromycin on solid media but not in liquid media. *JEMI+*. **3**, 1-8.
- Suárez LY.** (2013). Caracterización genómica y fisiológica de la capacidad degradadora de hidrocarburos aromáticos de *Citricella aestuarii* 357. Universitat de les Illes Balears. Tesis doctoral.
- Sule P, Belas R.** (2013). A novel inducer of *Roseobacter* motility is also a disruptor of algal symbiosis. *J Bacteriol.* **195**, 637-646.
- Sun FL, Wang YS, Wu ML, Jiang ZY, Sun CC, Cheng H.** (2014). Genetic diversity of bacterial communities and gene transfer agents in northern south China Sea. *PLoS One.* **3**, 1-9.
- Sun J, Steindler L, Thrash JC, Halsey KH, Smith DP, Carter AE, Landry ZC, Giovannoni SJ.** (2011). One carbon metabolism in SAR11 pelagic marine bacteria. *PLoS One.* **6**, 1-12.
- Sun J.** (2014). Metabolism of one carbon (C1) and methylated compounds in SAR11 bacteria. Oregon State University. Tesis doctoral.

- Sun Z, Lv Y, Liu Y, Ren R.** (2016). Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a novel metal resistant bacterium *Cupriavidus* sp. S1. *Bioresour Technol.* **220**, 142-150.
- Swingley WD, Sadekar S, Mastrian SD, Matthies HJ, Hao J, Ramos H, Acharya CR, Conrad AL, et al.** (2007). The complete genome sequence of *Roseobacter denitrificans* reveals a mixotrophic rather than photosynthetic metabolism. *J Bacteriol.* **183**, 683-690.
- T042 – Technical bulletin NanoDrop Spectrophotometers.** 260/280 and 260/230 Ratios. www.nanodrop.com
- Tanaka M, Mino S, Ogura Y, Hayashi T, Sawabe T.** (2018). Availability of Nanopore sequences in the genome taxonomy for *Vibrionaceae* systematics: Rumoiensis clade species as a test case. *PeerJ.* **6**, 1-12.
- Tanaka Y, Hanada S, Manome A, Tsuchida T, Kurane R, Nakamura K, Kamagata Y.** (2004). *Catellibacterium nectarophilum* gen. nov., sp. nov., which requires a diffusible compound from a strain related to the genus *Sphingomonas* for vigorous growth. *Int J Syst Evol Microbiol.* **54**, 955-959.
- Tang H, Bomhoff MD, Briones E, Zhang L, Schnable JC, Lyons E.** (2015). SynFind: Compiling syntenic regions across any set of genomes on demand. *Genome Biol Evol.* **7**, 3286-3298.
- Tang KH, Feng X, Tang YJ, Blankenship RE.** (2009). Carbohydrate metabolism and carbon fixation in *Roseobacter denitrificans* Och114. *PLoS One.* **4**, 1-12.
- Tang K, Huang H, Jiao N, Wu CH.** (2010). *Phylogenomics analysis of marine roseobacters.* *PLoS One.* **5**, 1-9.
- Tang K, Yang Y, Li S, Zhou W, Han Y, Liu K, Jiao N.** (2016). Genomic, physiologic, and proteomic insights into metabolic versatility in *Roseobacter* clade bacteria isolated from deep-sea water. *Sci Rep.* **6**, 1-12.
- Tawa P, Stewart RC.** (1994). Kinetics of CheA autophosphorylation and dephosphorylation reactions. *Biochem.* **33**, 7917-7924.
- Taylor D E.** (1999). Bacterial tellurite resistance. *Trends Microbiol.* **7**, 111-115.
- Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ.** (2012). Heavy metals toxicity and the environment. *EXS.* **101**, 133-164.
- Teng JLL, Tang Y, Huang Y, Guo F B, Wei W, Chen JHK, Wong SSY, Lau SKP, Woo PCY.** (2016). Phylogenomics analyses and reclassification of species within the genus *Tsukamurella*: Insights to species definition in the post-genomic era. *Front Microbiol.* **7**, 1-12.
- Teoh WK, Salleh FM, Shahir S.** (2017). Characterization of *Thiomonas delicata* arsenite oxidase expressed in *Escherichia coli*. **7**, 1-7.
- Terashima H, Kojima S, Homma M.** (2008). Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. *Int Rev Cell Mol Biol.* **270**, 39-85.
- Tettellin H, Massignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, Angioli SV, Crabtree J, et al.** (2005). Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 13950-13955.
- Thompson CC, Amaral GR, Campeao M, Edwards RA, Polz MF, Dutilh BE, Ussery DW, Sawabe T, Swings J, Thompson F L.** (2014). Microbial taxonomy in the post-genomic era: Rebuilding from scratch? *Arch microbiol.* **197**, 359-370.
- Thompson CC, Chimetto L, Edwards RA, Swings J, Stackebrandt E, Thompson FL.** (2013). Microbial genomic taxonomy. *BMC Genomics.* **14**, 1-8.

- Thompson CC, Vieira NM, Vicente AC, Thompson FL.** (2011). Towards a genome based taxonomy of Mycoplasmas. *Infect Genet Evol.* **11**, 1798-1804.
- Thrash JC, Cho J C, Ferriera S, Johnson J, Vergin KL, Giovannoni SJ.** (2010). Genome sequences of *Pelagibaca bermudensis* HTCC2601T and *Maritimibacter alkaliphilus* HTCC2654T, the type strains of two marine *Roseobacter* genera. *J Bacteriol.* **192**, 5552-5553.
- Tian RM, Lin C, Zhang WP, Cao HL, Qian PY.** (2015). Rare events of intragenus and intraspecies horizontal transfer of the 16S rRNA gene. *Genome Biol Evol.* **7**, 2310-2320.
- Tindall BJ, Rosselló-Móra R, Busse HJ, Ludwig W, Kampf P.** (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol.* **60**, 249-266.
- Todd JD, Kirkwood M, Newton-Payne S, Johnston AWB.** (2012). DddW, a third DMSP lyase in a model *Roseobacter* marine bacterium, *Ruegeria pomeroyi* DSS-3. *ISME J.* **6**, 223-226.
- Tolli JD, Sievert SM, Taylor CD.** (2006). Unexpected diversity of bacterial capable of carbon monoxide oxidation in a coastal marine environment, and contribution of the *Roseobacter* associated clade to the total CO oxidation. *Appl Environ Microbiol.* **72**, 1966-1973.
- Tolli JD, Taylor CD.** (2005). Biological CO-oxidation in the Sargasso Sea and in Vineyard Sound, Massachusetts. *Limnol Oceanogr.* **50**, 1205-1212.
- Tomasch J, Wang H, Hall ATK, Patzelt D, Preusse M, Petersen J, Brinkmann H, Bunk B, et al.** (2018). Packaging of *Dinoroseobacter shibae* DNA into gene transfer agent particles is not random. *Genome Biol Evol.* **10**, 359-369.
- Tomich M, Planet PJ, Figurski DH.** (2007). The tad locus postcards from the widespread colonization island. *Nat Rev Microbiol.* **5**, 363-375.
- Tout J, Jeffries TC, Petrou K, Tyson GW, Webster NS, Garren M, Stocker R, Ralph PJ, Seymour JR.** (2015). Chemotaxis by natural populations of coral reef bacteria. *ISME J.* **9**, 1764-1777.
- Trapet P, Avoscan L, Klinguer A, Pateyron S, Citerne S, Chervin C, Mazurier S, Lemanceau P, Wendehenne D, Besson-Bard A.** (2016). The *Pseudomonas fluorescens* siderophore pyoverdine weakens *Arabidopsis thaliana* defense in favor of growth in iron-deficient conditions. *Plant Physiol.* **171**, 675-693.
- Tseng CH, Tang SL.** (2014). Marine microbial metagenomics: From individual to the environment. *Int J Mol Sci.* **15**, 8878-8892.
- Tu Q, Lin L.** (2016). Gene content dissimilarity for subclassification of highly similar microbial strains. *BMC Genomics.* **17**:647, 1-11.
- Tutic A, Novakovic S, Lutovac M, Biocanin R, Ketin S, Omerovic N.** (2015). The heavy metals in agrosystems and impact on health and quality of life. *Open Access Maced J Med Sci.* **3**, 345-355.
- Udwary DW, Zeigler L, Asolkar RN, Singan V, Lapidus A, Fenical W, Jensen PR, Moore BS.** (2007). Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 10376-10381.
- Undabarrena A, Ugalde JA, Seeger M, Cámara B.** (2017). Genomic data mining of the marine actinobacteria *Streptomyces* sp H-KF8 unveils insights into multi-stress related genes and metabolic pathways involved in antimicrobial synthesis. *Peer J.* **5**, 1-35.
- Vaccaro BJ, Lancaster WA, Thorgersen MP, Zane GM, Younkin AD, Kazakov AE, Wetmore KM, Deutschbauer A, et al.** (2016). Novel metal resistance system from mutant fitness analyses of denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. *Appl Environ Microbiol.* **82**, 6046-6056.

- Van der Maarel MJ, Jansen M, Haanstra R, Meijer WG, Hansen TA.** (1996). Demethylation of dimethylsulfoniopropionate to 3-S-methylmercaptopropionate by marine sulfate-reducing bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **62**, 3978-3984.
- Van Heel AJ, de Jong A, Montalbán-López M, Kok J, Kuipers OP.** (2013). BAGEL3: Automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-)bactericidal posttranslationally modified peptides. *Nucleic Acids Res.* **41**, 448-453.
- Van Heel AJ, de Jong A, Song C, Viel JH, Kok J, Kuipers OP.** (2018). BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. *Nucleic Acids Res.* **46**, 278-281.
- Van Kessel MA, Speth DR, Albertsen M, Nielsen PH, Op den Camp HJ, Kartal B, Jetten MS, Lücker S.** (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature.* **528**, 555-559.
- Vandamme P, Peeters C.** (2014). Time to revisit polyphasic taxonomy. *Antonie van Leeuwenhoek.* **106**, 57-65.
- Vandecastelaere I, Necessian O, Segart E, Achouak W, Mollica A, Faimali M, Vandamme P.** (2009). *Nautella italica* gen. nov., sp. nov., isolated from a marine electroactive biofilm. *Int J Syst Evol Microbiol.* **59**, 811-817.
- Vandecastelaere I, Segart E, Faimali M, Vandamme P.** (2008). *Leisingera aquimarina* sp. nov., isolated from a marine electroactive biofilm, and emended descriptions of *Leisingera methylolhalidivorans* Schaefer et al., 2002, *Phaeobacter daeponensis* Yoon et al., 2007 and *Phaeobacter inhibens* Martens et al., 2006. *Int J Syst Evol Microbiol.* **58**, 2788-2793.
- Vann WF, Daines DA, Murkin AS, Tanner ME, Chaffin DO, Rubens CE, Vionnet J, Silver RP.** (2004). The NeuC Protein of *Escherichia coli* K1 Is a UDP N-Acetylglucosamine 2-Epimerase. *J Bacteriol.* **186**, 706-712.
- Vass L A, Sikorski J, Hofner B, Fiebig A, Buddruhs N, Klenk HP, Göker M.** (2013). Opm: an R package for analysing Omnilog[®] phenotype microarray data. *Bioinformatics.* **29**, 1823-1824.
- Veltri D, Wight MM, Crouch JA.** (2016). SimpleSynteny: a web-based tool for visualization of microsynteny across multiple species. *Nucleic Acids Res.* **44**, 41-45.
- Venkata RV, Kalyana CS, Ramaprasad EV, Thiel V, Imhoff JF, Sasikala C, Ramana ChV.** (2013). Emended description of the genus *Rhodothalassium* Imhoff et al., 1998 and proposal of *Rhodothallassiaceae* fam. nov. and *Rhodothallassiales* ord. nov. *Syst Appl Microbiol.* **36**, 28-32.
- Verma A, Ojha AK, Pal Y, Kumari P, Schumann P, Gruber-Vodicka H, Dastager SG, Natarajan RK, Mayilraj S, Krishnamurthi S.** (2017). An investigation into the taxonomy of "*Bacillus aminovorans*" and its reclassification to the genus *Domibacillus* as *Domibacillus aminovorans* sp. nov. *Syst Appl Microbiol.* **40**, 458-467.
- Vernikos G, Medini D, Riley DR, Tettelin H.** (2015). Ten years of pan-genome analyses. *Curr Opin Microbiol.* **23**, 148-154.
- Villareal-Chiu JF, Quinn JP, McGrath JW.** (2012). The genes and enzymes of phosphonate metabolism by bacteria, and their distribution in the marine environment. *Front Microbiol.* **3**, 1-13.
- Vitti C, Marchi E, Decorosi D, Giovannetti L.** (2014). Molecular mechanisms of Cr(VI) resistance in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol Rev.* **38**, 633-659.
- Vogel S, Wemheuer B, Brinkhoff T, Vollmers J, Dietrich S, Giebel HA, Berardsley C, Sardemann C, et al.** (2015). Adaptation of an abundant *Roseobacter* RCA organism to pelagic systems revealed by genomic and transcriptomic analyses. *ISME J.* **9**, 371-384.

- Voss M, Bange HW, Dippner JW, Middelburg JJ, Montoya JP, Ward B.** (2013). The marine nitrogen cycle: recent discoveries, uncertainties and the potential relevance of climate change. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **368**, 1-11.
- Wagner-Döbler I, Biebl H.** (2006). Environmental biology of the marine *Roseobacter* lineage. *Annu Rev Microbiol.* **60**, 255-280.
- Wagner-Döbler I, Thiel V, Eberl L, Allgaier M, Bodor A, Meyer S, Ebner S, Henning A, Pukall R, Schulz S.** (2005). Discovery of complex mixtures of novel long-chain quorum sensing signals in free-living and host-associated marine alphaproteobacteria. *Chembiochem.* **6**, 2195-2206.
- Wallden K, Rivera-Calzada A, Waksman G.** (2010). Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. *Cell Microbiol.* **12**, 1203-1212.
- Wandersman C, Delepelaire P.** (2004). Bacterial Iron sources: From siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol.* **58**, 611-647.
- Wang H, Chen S, Zhang J, Rothenbacher FP, Jiang T, Kan B, Zhong Z, Zhu J.** (2012a). Catalases promote resistance of oxidative stress in *Vibrio cholerae*. *PLoS One.* **7**, 1-8.
- Wang H, Nasser N, Chen Y, Zhu A Y, Kuai X, Galagedera N, Liu Z, Zhu J.** (2017). OxyR2 modulates OxyR1 activity and *Vibrio cholerae* oxidative stress response. *Infect Immun.* **85**, 1-11.
- Wang L, Jeon B, Sahin O, Zhang Q.** (2009). Identification of an arsenic resistance and arsenic-sensing system in *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol.* **75**, 5064-5073.
- Wang R, Gallant É, Seyedsayamdost MR.** (2016). Investigation of the genetics and biochemistry of roseobacticide production in the *Roseobacter* clade bacterium *Phaeobacter inhibens*. *mBio.* **7**, 1-10.
- Wang SL, Xu XR, Sun YX, Liu JL, Li HB.** (2013). Heavy metal pollution in coastal areas of South China: A review. *Mar Pollut Bull.* **76**, 7-15.
- Wang X, Rathinasabapathi B, de Oliveira LM, Guilherme LR, Ma LQ.** (2012b). Bacteria-mediated arsenic oxidation and reduction in the growth media of arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Environ Sci Technol.* **46**, 11259-11266.
- Wang Y, Tang H, Debarry JD, Tan X, Li J, Wang X, Lee TH, Jin H, et al.** (2012c). MCSanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity. *Nucleic Acids Res.* **40**, 1-14.
- Ward BB.** (2013). Nitrification. In: *Encyclopedia of ecology*, 2nd edn, vol. 2, pp. 351-358. Elsevier.
- Wasmund K, Cooper M, Schreiber L, Lloyd KG, Baker BJ, Petersen DG, Jørgensen BB, Stepanauskas R, et al.** (2016). Single-cell genome and group-specific *dsrAB* sequencing implicate marine members of the class *Dehalococcoidia* (phylum *Chloroflexi*) in sulfur cycling. *mBio.* **7**, 1-15.
- Watkins AJ, Roussel EG, Parkes RJ, Sass H.** (2014). Glycine betaine as a direct substrate for methanogens. *Appl Environ Microbiol.* **80**, 289-293.
- Wawrik B, Boling WB, Van Nostrand JD, Xie J, Zhou J, Bronk DA.** (2011). Assimilatory nitrate utilization by bacteria on the west florida shelf as determined by stable isotope probing and functional microarray analysis. *FEMS Microbiol Ecol.* **79**, 400-411.
- Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore WEC, Murray RGE, et al.** (1987) International Committee on Systematic Bacteriology. Report of

the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol.* **37**, 463-464.

Weber T, Blin K, Duddela S, Krung D, Kim HU, Bruccoleri R, Lee SY, Fischbach MA, et al. (2015). antiSMASH 3.0-a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res.* **43**, 237-243.

Weimann A. (2016). From genotype to phenotype: inferring relationships between microbial traits and genomic components. University of Düsseldorf. Tesis doctoral.

Wells TJr, Ragauskas AJ. (2012). Biotechnological opportunities with the β -ketoadipate pathway. *Trends Biotechnol* **30**, 627-637.

Whitman WB, Woyke T, Klenk HP, Zhou Y, Lilburn TG, Beck BJ, De Vos P, Vandamme P, et al. (2015). Genomic encyclopedia of bacterial and archeal type strains, phase III: the genomes of soil and plant-associated and newly described type strains. *Stand Genomic Sci.* **10**, 1 – 6.

Whitman WB. (2015). Genome sequences as the type material for taxonomic description of prokaryotes. *Syst appl Microbiol.* **38**, 217-222.

Widderich N, Czech L, Elling FJ, Könneke M, Stöveken N, Pittelkow M, Riclea R, Dickschat JS, Heider J, Bremer E. (2016). Stranger in the archeal Word: osmostress-responsive biosynthesis of ectoine and hidroxyectoine by the marine thaumarcheon *Nitrosopumilus maritimus*. *Environ Microbiol.* **18**, 1227-1248.

Willenbrock H, Friss C, Juncker AS, Ussery DW. (2006). An environmental signature for 323 microbial genomes based on codon adaptation indices. *Genome Biol.* **7**, 1-9.

Wirth JS, Whitman WB. (2018). Phylogenomic analyses of a clade within the Roseobacter group suggest taxonomic reassignments of species of the genera *Aestuariivita*, *Citricella*, *Loktanella*, *Nautella*, *Pelagibaca*, *Ruegeria*, *Thalassobius*, *Thiobacimonas* and *Tropicibacter*, and the proposal of six novel genera. *Int J Syst Evol Microbiol.* **68**, 2397-2411.

Wolf YI, Rogozin IB, Grishin NV, Koonin EV. (2002). Genome trees and the Tree of Life. *Trends Genet.* **18**, 472-479.

Wright F. (1990). The 'effective number of codons' used in a gene. *Gene.* **87**, 23-29.

Wu L, McCluskey K, Desmeth P, Liu S, Hideaki S, Yin Y, Moriya O, Itoh T, et al. (2018). The global catalogue of microorganisms 10K type strain sequencing project: closing the genomic gaps for the validly published prokaryotic and fungi species. *Gigascience.* **7**, 1-4.

Wu Q, Tun HM, Leung FC, Shah NP. (2014). Genomic insights into high exopolysaccharide-producing dairy starter bacterium *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. *Sci Rep.* **4**, 1-8.

Wu YH, Meng FX, Xu L, Zhang XQ, Wang CS, Oren A, Wu M, Xu XW. (2013). *Roseivivax pacificus* sp. nov., isolated from deep-sea sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.* **63**, 4574-4579.

Wyman M, Hodgson S, Bird C. (2013). Denitrifying alphaproteobacteria from the Arabian Sea that express *nosZ*, the gene encoding nitrous oxide reductase, in oxic and suboxic waters. *Appl Environ Microbiol.* **79**, 2670-2681.

Xavier KB, Miller ST, Lu W, Kim JH, Rabinowitz J, Pelczar I, Semmelhack MF, Bassler BL. (2007). Phosphorylation and processing of the quorum-sensing molecule autoinducer-2 in enteric bacteria. *ACS Chem Biol.* **2**, 128-136.

Xia B, Ke H, Inouye M. (2001). Acquirement of cold sensitivity by quadruple deletion of the *cspA* family and its suppression by PNPase S1 domain in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **40**, 179-188.

Xiao J, Zhang Z, Wu J, Yu J. (2015). A brief review of software tools for pangenomics. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* **13**, 73-76.

- Yaakop AS, Chan KG, Ee R, Lim YL, Lee SK, Manan FA, Goh KM.** (2016). Characterization of the mechanism of prolonged adaptation to osmotic stress of *Jeotgalibacillus malaysiensis* via genome and transcriptome sequencing analyses. *Sci Rep.* **6**, 1-14.
- Yamada Y, Kuzuyama T, Komatsu M, Shin-ya K, Omura S, Cane DE, Ikeda H.** (2014). Terpene synthases are widely distributed in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **112**, 857-862.
- Yan Q, Power KA, Cooney S, Fox E, Gopinath GR, Grim CJ, Tall BD, McCusker MP, Fanning S.** (2013). Complete genome sequence and phenotype microarray analysis of *Cronobacter sakazakii*SP291: a persistent isolate cultured from a powdered infant formula production facility. *Front Microbiol.* **4**, 1-20.
- Yang HC, Rosen BP.** (2016). New mechanisms of bacterial arsenic resistance. *Biomedical J.* **39**, 5-13.
- Yassin AF, Langenberg S, Huntemann M, Clum A, Pillay M, Palaniappan K, Varghese N, Mikhailova N, et al.** (2017). Draft genome sequence of *Actinotignum schaalii* DSM 15541T: Genetic insights into the lifestyle, cell fitness and virulence. *PLoS One.* **12**, 1-27.
- Yazdankhah S, Rudi K, Bernhoft A.** (2014). Zinc and copper in animal feed – development of resistance and co-resistance to antimicrobial agents in bacteria of animal origin. *Microb Ecol Health Dis.* **25**, 1-7.
- Yin H, Zhang X, Li X, He Z, Liang Y, Guo X, Hu Q, Xiao Y, et al.** (2014). Whole-genome sequencing reveals novel insights into sulfur oxidation in the extremophile *Acidithiobacillus thiooxidans*. *BMC Microbiol.* **14**, 1-14.
- Yin Q, Zhang W, Li X, Zhou L, Qi X, Zhang C, Wu LF.** (2018). The occurrence and distribution of trimethylamine-N-oxide (TMAO) in Antarctic coastal waters. *J Ocean Limnol.* **343**, 1-13.
- Yoon E J, Courvalin P, Grillot-Courvalin C.** (2013). RND-Type efflux pumps in multidrug-resistant clinical isolates of *Acinobacter baumannii*: Major role for AdeABC overexpression and AdeRS mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* **57**, 2989-2995.
- Yoon SH, Ha SM, Lim J, Kwon S, Chun J.** (2017). A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **110**, 1281-1286.
- Yoon JH, Lee SY, Kang SJ, Lee CH, Oh TK.** (2007). *Pseudoruegeria aquimaris* gen. nov., sp. nov., isolated from seawater of the East Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol.* **57**, 542-547.
- Zan J, Liu Y, Fuqua C, Hill RT.** (2014). Acyl-homoserine lactone quorum sensing in the *Roseobacter* clade. *Int J Mol Sci.* **15**, 654-669.
- Zanaroli G, Fedi S, Carnevali M, Fava F, Zannoni D.** (2002). Use of potassium tellurite for testing the survival and viability of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 in soil microcosms contaminated with polychlorinated biphenyls. *Res Microbiol.* **153**, 353-360.
- Zare B, Faramarzi MA, Sephehrizadeh Z, Shakibaie M, Rezaie S, Shahverdi AR.** (2012). Biosynthesis and recovery of rod-shaped tellurium nanoparticles and their bactericidal activities. *Material Researc Bulletin.* **47**, 3719-3725.
- Zeeberg B.** (2002). Shannon information theoretic computation of synonymous codon usage biases in coding regions of human and mouse genomes. *Genome Res.* **12**, 944-955.
- Zehr JP, Jenkins BD, Short SM, Steward GF.** (2003). Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ Microbiol.* **5**, 539-554.
- Zehr JP, Ward BB.** (2002). Nitrogen cycling in the ocean: new perspectives on processes and paradigms. *Appl Environ Microbiol.* **68**, 1015-1024.
- Zeigler DR.** (2003). Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol.* **53**, 1893-1900.

- Zeng X, Lin J.** (2013). Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Front Microbiol.* **128**, 1-9.
- Zeyaulah Md, Ahmad R, Naseem A, Islam B, Hasan HMI, Abdelkafe AS, Benkhayal FA, Rizvi MA, Ali A.** (2009). Catechol biodegradation by *Pseudomonas* strain: a critical analysis. *Int J Chem Sci.* **7**, 2211-2221.
- Zeytuni N, Uebe R, Maes M, Davidov G, Baram M, Raschdorf O, Nadav-Tsubery M, Kolusheva S, et al.** (2014). Cation diffusion facilitators transport initiation and regulation is mediated by cation induced conformational changes of the cytoplasmic domain. *PLoS One.* **9**, 1-14.
- Zhan Y, Huang S, Voget S, Simon M, Chen F.** (2016). A novel roseobacter phage possesses features of podoviruses, siphoviruses, prophages and gene transfer agents. *Sci Rept.* **6**, 1-8.
- Zhang DC, Li HR, Xin YH, Liu HC, Chi ZM, Zhou PJ, Yu Y.** (2008). *Phaeobacter arcticus* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from the Arctic. *Int J Syst Evol Microbiol.* **58**, 1384-1387.
- Zhang J, Wu P, Hao B, Yu Z.** (2011). Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001. *Bioresour Technol.* **102**, 9866-9869.
- Zhang X, Tu B, Dai LR, Lawson PA, Zheng ZZ, Liu LY, Deng Y, Zhang H, Cheng L.** (2018). *Petroclostridium xylanilyticum* gen. nov., sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from an oilfield, and reclassification of clostridial cluster III members into four novel genera in a new *Hungateiclostridiaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* **68**, 3197-3211.
- Zhang YQ, Lee JC, Park DJ, Lu XX, Mou XZ, Kim CJ.** (2014). *Roseivivax roseus* sp. nov., an alphaproteobacterium isolated from a solar saltern soil sample. *Int J Syst Evol Microbiol.* **64**, 1743-1746.
- Zhang Y, Sun Y, Jiao N, Stepanauskas R, Luo H.** (2016). Ecological genomics of the uncultivated marine *Roseobacter* lineage CHAB-I-5. *Appl Environ Microbiol.* **82**, 2100-2111.
- Zhang Y, Xu Y, Fang W, Wang X, Fang Z, Xiao Y.** (2017). *Pseudoruegeria marinistellae* sp. nov., isolated from an unidentified starfish in Sanya, China. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **110**, 187-194.
- Zhao Y, Wang K, Budinoff C, Buchan A, Lang A, Jiao N, Chen F.** (2009). Gene transfer agent (GTA) genes reveal diverse and dynamic *Roseobacter* and *Rhodobacter* populations in the Chesapeake Bay. *ISME J.* **3**, 364-373.
- Zheng L, Cui Z, Xu L, Sun C, Powell RJ, Hill RT.** (2015). Draft genome sequence of Rhodobacteraceae Strain PD-2, an algicidal bacterium *Genome Announc.* **3**, 1-2.
- Zheng Q, Chen C, Yan XJ, Wang YN, Zeng YH, Hao LK, He WH, Jiao NZ.** (2010). *Mameliella alba* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium of the *Roseobacter* clade in the order *Rhodobacterales*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **60**, 953-957.
- Zhi XY, Zhao W, Li WJ, Zhao GP.** (2012). Prokaryotic systematic in the genomic era. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **101**, 21-34.
- Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS.** (2011). PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res.* **39**, 347-352.
- Zhu Y, Jameson E, Parslow RA, Lidbury I, Fu T, Dafforn TR, Schäfer H, Chen Y.** (2014). Identification and characterization of trimethylamine N-oxide (TMAO) demethylase and TMAO permease in *Methylocella silvestris* BL2. *Environ Microbiol.* **16**, 3318-3330.
- Ziegelhoffer EC, Donohue TJ.** (2009). Bacterial responses to photo-oxidative stress. *Nat Rev Microbiol.* **7**, 856-863.

- Ziemert N, Podell S, Penn K, Badger JH, Allen E, Jensen PR.** (2012). The Natural Product Domain Seeker NaPDoS: A Phylogeny Based Bioinformatic Tool to Classify Secondary Metabolite Gene Diversity. *PLoS One.* **7**, 1-9.
- Zong R, Jiao N.** (2012). Proteomic responses of *Roseobacter litoralis* OCh149 to starvation and light regimen. *Microbes Environ.* **27**, 430-442.
- Zuo G, Hao B.** (2015). CVTree3 Web Server for Whole-genome-based and Alignment-free Prokaryotic Phylogeny and Taxonomy. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* **13**, 321-331.

ANEXO I

ANEXO I

A- Condiciones de cultivo de las cepas de interés para el estudio seleccionadas a partir del catálogo de la CECT

	Medio de Cultivo	Tª óptima (°C)	Tiempo de incubación (días)
<i>Aliiroseovarius pelagivivens</i> CECT 8811 ^T	Agar Marino	26	5
<i>Aquimixticola soesokkakensis</i> CECT 8620 ^T	Agar Marino	30	3
<i>Asciidiaceihabitans donghaensis</i> CECT 8599 ^T	Agar Marino	30	5
<i>Boseongicola aestuarii</i> CECT 8489 ^T	Agar Marino	26	7
<i>Confluentimicrobium lipolyticum</i> CECT 8621 ^T	Agar Marino	30	3
<i>Defluviimonas aquaemixtae</i> CECT 8626 ^T	Agar Marino	30	4
<i>Flavimaricola marinus</i> CECT 8899 ^T	Agar Marino	30	3
<i>Yoonia sediminilitoris</i> CECT 8284 ^T	Agar Marino	30	3
<i>Limimaricola soesokkakensis</i> CECT 8367 ^T	Agar Marino	30	3
<i>Maliponia aquimaris</i> CECT 8898 ^T	Agar Marino	30	3
<i>Marinovum algicola</i> CECT 5396 ^T	Agar Marino	26	1
<i>Pseudoceanicola marinus</i> CECT 7751 ^T	Agar Marino	26	1
<i>Octadecabacter asciidiaceicola</i> CECT 8868 ^T	Agar Marino	26	7
<i>Palleronia abyssalys</i> CECT 8504 ^T	Agar Marino	30	3
<i>Palleronia marisminoris</i> CECT 7066 ^T	My medium	30	1
<i>Paracoccus lutimaris</i> CECT 8525 ^T	Agar Marino	30	1
<i>Pelagicola litorisediminis</i> CECT 8287 ^T	Agar Marino	30	5
<i>Pelagimonas varians</i> CECT 8663 ^T	Agar Marino	30	5
<i>Pontivivens insulae</i> CECT 8812 ^T	Agar Marino	26	5
<i>Primorskyibacter insulae</i> CECT 8871 ^T	Agar Marino	30	5
<i>Pseudooctadecabacter jejudonensis</i> CECT 8397 ^T	Agar Marino	30	7
<i>Pseudoroseicyclus aestuarii</i> CECT 9025 ^T	Agar Marino	30	5
<i>Pseudoruegeria aquimaris</i> CECT 7680 ^T	Agar Marino	37	1
<i>Roseibaca ekhonensis</i> CECT 7235 ^T	Agar Marino	20	10
<i>Roseisalinus antarcticus</i> CECT 7023 ^T	Agar Marino	26	3
<i>Roseivivax jejudonensis</i> CECT 8625 ^T	Agar Marino	30	2
<i>Roseovarius aestuarii</i> CECT 7745 ^T	Agar Marino	30	2
<i>Roseovarius albus</i> CECT 7450 ^T	Agar Marino	26	2
<i>Roseovarius gaetbuli</i> CECT 8370 ^T	Agar Marino	30	5
<i>Roseovarius halotolerans</i> CECT 8110 ^T	Agar Marino	30	1
<i>Pacificibacter marinus</i> CECT 7971 ^T	Agar Marino	30	1
<i>Ruegeria arenilitoris</i> CECT 8715 ^T	Agar Marino	30	2
<i>Ruegeria meonggei</i> CECT 8411 ^T	Agar Marino	30	1
<i>Ruegeria litorea</i> CECT 7639 ^T	Agar Marino	26	2
<i>Ruegeria mediterranea</i> CECT 7615 ^T	Agar Marino	26	2
<i>Tropicibacter phthalicus</i> CECT 8649 ^T	Agar Marino	26	2

B- Preparación medios de cultivo

- **Caldo Marino (MB)**

- Marine broth deshidratado (Difco 2216) 37,4 g.
 - Agua destilada 1000 ml.
- Ajustar a pH 7,6 ± 0.2 y esterilizar a 121 °C, 20 min.

- **Agar Marino (MA)**

- MB 1000 ml.
 - Agar bacteriológico 15,0 g.
- Ajustar a pH 7,6 ± 0.2 y esterilizar a 121 °C, 20 min.

- **My medium**

- Extracto de malta 3,0 g.
 - Extracto de levadura 3,0 g.
 - Glucosa 10,0 g.
 - Peptona 5,0 g.
 - NaCl₂ 51,3 g.
 - MgCl₂.6H₂O 9,0 g.
 - MgSO₄. 7H₂O 13,0 g.
 - CaCl₂.2H₂O 0,2 g.
 - KCl 1,3 g.
 - NaCO₃H 0,05 g.
 - NaBr 0,15 g.
 - FeCl₃.6H₂O 3, 25 mg.
 - Agar bacteriológico 15,0 g.
 - Agua destilada 1000 ml.
- Ajustar a pH 7,0 y esterilizar a 121 °C, 20 min.

C- Reactivos utilizados**Para electroforesis**

- **TBE 10x**

- Tris base 108 g.
 - Ácido bórico 55 g.
 - EDTA 7,44 g.
 - Agua Mili-Q 1000 ml.
- Ajustar a pH 8,3.

Para análisis *Phenotype Microarray*

- **MIX ensayo fuentes de carbono**

- IF-0a (1.2x) 28.4 ml.
- Dye G (100x) 340 µl.
- Agua destilada 5.26 ml.

- **MIX ensayo resistencias**

- IF-10b (1.2x) 10 ml.
- Peptona 20% 600 µl.
- Dye G (100x) 120 µl.
- Agua destilada 1.28 ml.

D- Comandos utilizados en entorno Linux

- **FASTA/Q-Trimmer**

\$ fastx_trimmer -h

Uso: fastx_trimmer [-f N] [-l N] [-i INFILE] [-o OUTFILE]

Versión 0.0.14

[-f N] = Primera base a mantener. El valor predeterminado es 1 (= primera base).

[-l N] = Última base a mantener. El valor predeterminado es la lectura completa.

[-i INFILE] = Archivo de entrada FASTA/Q. El predeterminado es STDIN.

[-o OUTFILE] = Archivo de salida FASTA/Q. El predeterminado es STDOUT.

- **Fastq-mcf**

Primero es necesario crear un fichero en formato FASTA que contenga todas las secuencias de adaptadores encontradas en los dos ficheros (R₁ y R₂) de lecturas.

\$ fastq-mcf -h

Uso: fastq-mcf [adaptadores.fasta] [INFILE-R₁] [INFILE-R₂] [-o OUTFILE-R₁] [-o OUTFILE-R₂]

Versión 1.04.676

[adaptadores.fasta] = Archivo con las secuencias de adaptadores creado por nosotros.

[INFILE-R₁] = Archivo de entrada R₁ en formato FASTQ.

[INFILE-R₂] = Archivo de entrada R₂ en formato FASTQ.

[-o OUTFILE-R₁] = Archivo de salida R₁ en formato FASTQ.

[-o OUTFILE-R₂] = Archivo de salida R₂ en formato FASTQ.

- **SPADes**

\$ spades.py -h

Uso: spades.py [-k *k-mers*] [--careful] [-1 INFILE-R₁] [-2 INFILE-R₂] [-o OUTFILE]

Versión 3.9.0

[-k *k-mers*] = Valores *k-mers* especificados. En el estudio se han utilizado 77, 99 y 127.

[--careful] = Trata de reducir el número de *mismatches* e indels cortos. También ejecuta *MismatchCorrector*, una herramienta de procesamiento posterior que utiliza la herramienta BWA (viene con SPADes). Esta opción se recomienda para el ensamblaje de un solo genoma.

[-1 INFILE-R₁] = Archivo de entrada R₁ en formato FASTQ.

[-2 INFILE-R₂] = Archivo de entrada R₂ en formato FASTQ.

[-o OUTFILE] = Directorio de salida.

- **FILTRADO DE *CONTIGS* POR TAMAÑO Y COBERTURA**

Primero utilizamos en comando de Linux *grep* para extraer los encabezamientos de los *contigs* resultantes del ensamblado.

Uso: \$ grep ">" contigs.fasta > headings

Contigs. fasta = Fichero en formato FASTA derivado de SPADes que contiene los *contigs* resultantes del ensamblado.

Headings = Fichero que contendrá el resultado del comando. En su interior encontramos los encabezamientos de los *contigs*.

A continuación, el fichero headings se abre con Excel para representar gráficamente los *contigs* en función de su tamaño y cobertura. La gráfica resultante nos indica los valores de tamaño y cobertura a tomar para filtrar con el comando siguiente:

```
Uso (1): $ grep -F ">" contigs.fasta | sed -e 's/_/_/g' | awk '$6>=[valor de corte para filtrar por cobertura] && $4>=[valor de corte para filtrar por tamaño] {print $0}' | sed -e 's/_/_/g' | sed -e 's/>/>/g' > contigs.fasta.txt
```

```
Uso (2): $ ./fastagrep.pl -f contigs.fasta.txt contigs.fasta > HCOV_HLEN.contigs.fasta
```

- **QUAST**

```
$ quast.py -h
```

```
Uso: quast.py [-o OUTFILE] [-R genoma de referencia] [INFILE]
```

Versión 4.3.0

[-o OUTFILE] = Directorio de salida.

[-R genoma de referencia] = Genoma de referencia en formato FASTA. La referencia proporcionada se corresponde con un genoma de la misma especie o una lo más cercana posible a la especie del genoma a estudiar.

[INFILE] = Archivo final de los *contigs* filtrados en formato FASTA. En este estudio se corresponde al archivo HCOV_HLEN.contigs.fasta.

- **CheckM**

```
$ checkm -h
```

```
Uso: checkm lineage_wf [--reduced_tree] [INFILE] [OUTFILE]
```

Versión 1.0.7

[--reduced_tree] = Utiliza un árbol reducido para determinar el linaje de genoma (aconsejable para ordenadores de 16 GB).

[INFILE] = Archivo de entrada en formato FASTA.

[OUTFILE] = Directorio de salida.

- **Prokka**

```
$ prokka -h
```

```
Uso: prokka [--compliant] [--centre X] [--locustag M] [--outdir OUTDIR] [--force] [--prefix A] [--addgenes] [--genus GÉNERO] [--species ESPECIE] [--strain CEPA] [--rfam] [INFILE]
```

Versión 1.12

[--compliant] = Forzar el cumplimiento de Genbank/ENA/DDJB : --genes --mincontiglen 200 --centre XXX (predeterminado OFF).

[--centre] = ID del centro de secuenciación (por defecto "").

[--locustag] = Prefijo de locus tag (por defecto "PROKKA").

[--outdir] = Carpeta de salida.

[--force] = Fuerza sobrescribir la carpeta de salida existente (predeterminado OFF)

[--prefix] = Prefijo de salida del nombre de archivo (por defecto "").

[--addgenes] = Agrega la característica "gene" para cada característica "CDS" (predeterminado OFF).

[--genus] = Especificar el nombre del género estudiado.

[--species] = Especificar el nombre de la especie estudiada.

[--strain] = Especificar el nombre de la cepa estudiada.

[--rfam] = Permite buscar ncRNAs con Infernal + Rfam (valor predeterminado "0").
 [INFILE] = Archivo de los *contigs* filtrados en formato FASTA para anotar. En este estudio se corresponde al archivo HCOV_HLEN.contigs.fasta.

- **UBCG**

\$ java -jar UBCG.jar -h

PASO 1. Conversión de los archivos de *contigs* (FASTA) a archivos bcg

Uso (1): java -jar UBCG.jar extract [-bcg_dir OUTDIR] [-i Archivo de entrada] [-label Nombre]

Versión 3.0

[-bcg_dir] = Directorio de salida.

[-i] = Ruta de acceso del archivo de entrada de los *contigs* ensamblado en formato FASTA.

[-label] = Especificar el nombre del organismo con el que se está trabajando.

PASO 2. Generación de alineamientos múltiples a partir de los archivos bcg

Uso (2): java -jar UBCG.jar align [-bcg_dir] [-out_dir] [-a]

[-bcg_dir] = Directorio para los archivos BCG que se deseen incluir en el alineamiento.

[-out_dir] = Directorio de salida.

[-a] = Metodo de alineación (por defecto "codon"). Las opciones son: nt (alineación de secuencia de nucleótidos), aa (alineación de secuencia de aminoácidos), codon (alineamiento basado en codones), codon12 (lo mismo que la opción anterior, pero solo se seleccionan el 1º y 2º nucleótido de un codón)

C- SUSTRATOS UTILIZADOS EN EL ANÁLISIS DE *PHENOTYPE MICROARRAY*

Pocillo	Sustrato	Nº	Sustrato	Nº	Sustrato	Nº	Sustrato
A1	Control negativo	C1	Glucosa	E1	Gelatina	G1	Ácido fenil acético
A2	Dextrina	C2	Mamosa	E2	Glicilprolina	G2	Metil piruvato
A3	D-Maltosa	C3	Fructosa	E3	L-alanina	G3	Ácido láctico metil éster
A4	D-Trehalosa	C4	Galactosa	E4	L-arginina	G4	Ácido láctico
A5	D-Celobiosa	C5	3-metil-glucosa	E5	L-Ácido aspartico	G5	Ácido cítrico
A6	Gentiobiosa	C6	D-fucosa	E6	Ácido glutámico	G6	α-Ácido cetoglutárico
A7	Sacarosa	C7	L-fucosa	E7	L-Histidina	G7	D-Ácido málico
A8	D-Turanosa	C8	L-Ramnosa	E8	Ácido piroglutámico	G8	L-Ácido málico
A9	Estaquiosa	C9	Inosina	E9	L-serina	G9	Ácido succínico Br
A10	Control positivo	C10	1% Lactato de sodio	E10	Lincominina	G10	Ácido nalidíxico
A11	pH 6	C11	Ácido fusídico	E11	Guanidina HCl	G11	Cloruro de litio
A12	pH 5	C12	L-serina	E12	Niaproof 4	G12	Telurito potásico
B1	D-Rafinosa	D1	Sorbitol	F1	Pectina	H1	Tween 40

ANEXO I

B2	α -D-lactosa	D2	Manitol	F2	Ácido galacturónico	H2	Ácido aminobutírico
B3	D-Melobiosa	D3	Arabitol	F3	Lactona de ácido galactónico	H3	Ácido hidroxibutírico
B4	β -Metil-D-Glucósido	D4	Inositol	F4	Ácido glucónico	H4	β -hidroxi-D,L-Ácido butírico
B5	D-Salicina	D5	Glucérol	F5	Ácido glucorónico	H5	Ácido cetobutírico
B6	N-Acetilglucosamina	D6	Glucosa-6P	F6	Glucuronamida	H6	Ácido aceto acético
B7	N-acetilmanosamina	D7	Fructosa-6P	F7	Ácido mícico	H7	Ácido propiónico
B8	N-acetilgalactosamina	D8	D-Ácido aspártico	F8	Ácido quínico	H8	Ácido acético
B9	N-acetil-ácido neuramínico	D9	D-serina	F9	Ácido sacárido	H9	Ácido fórmico
B10	1% NaCl	D10	Troleandomicina	F10	Vancomicina	H10	Aztreonam
B11	4% NaCl	D11	Rifamicina	F11	Violeta de tetrazolio	H11	Butirato de sodio
B12	8% NaCl	D12	Minociclina	F12	Azul de tetrazolio	H12	Bromato de sodio

ANEXO II

FIGURAS Y TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla S1. Resultados del análisis de calidad del DNA extraído de las cepas de interés con indicación de la concentración de DNA y ratio A_{260nm}/A_{230nm} .

Cepa	[DNA (ng/ μ l)]	Ratio A_{260nm}/A_{230nm}
<i>Al. pelagivivens</i> CECT 8811 ^T	607,4	2,01
<i>Aq. soesokkakensis</i> CECT 8620 ^T	231	2,11
<i>As. donghaensis</i> CECT 8599 ^T	722,6	1,95
<i>B. aestuarii</i> CECT 8489 ^T	390	2,06
<i>C. lipolyticum</i> CECT 8621 ^T	1551,8	2,05
<i>D. aquaemixtae</i> CECT 8626 ^T	130,1	2,04
<i>F. marinus</i> CECT 8899 ^T	502,2	2,11
<i>L. soesokkakensis</i> CECT 8367 ^T	702,2	1,72
<i>Ml. aquimaris</i> CECT 8898 ^T	3239,8	2,13
<i>Mr. algicola</i> CECT 5396 ^T	1047,2	1,85
<i>O. ascidiaceicola</i> CECT 8868 ^T	708,7	2,12
<i>P. marinus</i> CECT 7971 ^T	1932,7	2,02
<i>Pc. litorisediminis</i> CECT 8287 ^T	245,4	1,99
<i>Pd. jejudonensis</i> CECT 8397 ^T	824,4	1,94
<i>Pg. aquimaris</i> CECT 7680 ^T	924,8	1,93
<i>Pl. abyssalis</i> CECT 8504 ^T	182,5	2,09
<i>Pl. marisminoris</i> CECT 7066 ^T	1297,1	2,01
<i>Pm. varians</i> CECT 8663 ^T	1264,8	1,99
<i>Po. insulae</i> CECT 8812 ^T	491,6	1,96
<i>Pr. insulae</i> CECT 8871 ^T	129,3	1,93
<i>Ps. marinus</i> CECT 7751 ^T	1524,6	1,95
<i>Rb. ekhonensis</i> CECT 7235 ^T	346,5	1,66
<i>Rs. antarcticus</i> CECT 7023 ^T	290,5	2,05
<i>Ru. arenilitoris</i> CECT 8715 ^T	666,6	1,96
<i>Ru. litorea</i> CECT 7639 ^T	115,3	1,72
<i>Ru. mediterranea</i> CECT 7615 ^T	197,1	1,73
<i>Ru. meonggei</i> CECT 8411 ^T	271,4	1,92
<i>Rv. aestuarii</i> CECT 7745 ^T	1250,3	2,03
<i>Rv. albus</i> CECT 7450 ^T	593,7	1,86
<i>Rv. gaetbuli</i> CECT 8370 ^T	7779,6	1,92
<i>Rv. halotolerans</i> CECT 8110 ^T	1327,4	1,94
<i>Rx. jejudonensis</i> CECT 8625 ^T	444,4	1,61
<i>Tr. phthalicus</i> CECT 8649 ^T	2302,8	1,98

Tabla S2. Listado de las cepas tipo (mostrado en seis páginas) utilizadas para el análisis filogenómico de la familia *Rhodobacteraceae* con indicación del número de acceso de las secuencias genómicas. *Genomas secuenciados para la presente tesis.

Cepa	Nº Acceso
<i>Actibacterium atlanticum</i> 22II-S11-Z10 ^T	AQQY01
<i>Actibacterium mucosum</i> KCTC 23349 ^T	JFKE01
<i>Actibacterium pelagium</i> JN33 ^T	NSBU01
<i>Actibacterium ureilyticum</i> LS-811 ^T	NSBT01
<i>Acuticoccus yangtzensis</i> JL1095 ^T	MJUX01
<i>Aestuariivita boseongensis</i> BS-B2 ^T	JXYH01
<i>Albidovulum xiamenense</i> CGMCC 1.10789 ^T	FNFV01
<i>Albimonas donghaensis</i> DSM 17890 ^T	FNMZ01
<i>Albimonas pacifica</i> CGMCC 1.11030 ^T	FOQH01
<i>Aliiroseovarius crassostreae</i> DSM 29439 ^T	FOJB01
<i>Aliiroseovarius pelagivivens</i> CECT 8811 ^T	OMOI01*
<i>Aliiroseovarius sediminilitoris</i> DSM 29439 ^T	FOJB01
<i>Alkalimicrobium pacificum</i> F15 ^T	NIWB01
<i>Antarctobacter heliothermus</i> DSM 11445 ^T	FZON01
<i>Aquimixticola soesokkakensis</i> CECT 8620 ^T	FWFS01*
<i>Ascidiaehabitans donghaensis</i> CECT 8599 ^T	OMOR01*
<i>Boseongicola aestuarii</i> CECT 8489 ^T	FXXQ01*
<i>Brevirhabdus pacifica</i> 22DY15 ^T	MTCO01
<i>Celeribacter baekdonensis</i> DSM 27375 ^T	FNBL01
<i>Celeribacter ethanolicus</i> NH195 ^T	LRUC01
<i>Celeribacter halophilus</i> ZX137 ^T	LRUD01
<i>Celeribacter indicus</i> P73 ^T	NZ_CP004393
<i>Celeribacter neptunius</i> DSM 26471 ^T	FORH01
<i>Citreimonas salinaria</i> DSM 26880 ^T	FNPF01
<i>Cognatishimia maritima</i> DSM 28223 ^T	FQWM01
<i>Cognatiyoonia koreensis</i> DSM 17925 ^T	FOIZ01
<i>Cognatiyoonia sediminum</i> DSM 28715 ^T	FQXB01
<i>Confluentimicrobium lipolyticum</i> CECT 8621 ^T	FXYE01*
<i>Defluviimonas alba</i> cai42 ^T	NZ_CP012661
<i>Defluviimonas aquaemixtae</i> CECT 8626 ^T	OMOQ01*
<i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL-12 ^T	NC_009952.1
<i>Epibacterium mobile</i> F1926 ^T	NZ_CP015230.1
<i>Epibacterium multivorans</i> CECT 7557 ^T	CYSD01
<i>Epibacterium ulvae</i> U95 ^T	PHJF01
<i>Flavimaricola marinus</i> CECT 8899 ^T	FXZK0.1*

Cepa	Nº Acceso
<i>Gemmobacter aquatilis</i> DSM 3857 ^T	FOCE01
<i>Gemmobacter nectariphilus</i> DSM 15620 ^T	AUCM01
<i>Haematobacter massiliensis</i> CCUG 47968 ^T	JGYG01
<i>Haematobacter missouriensis</i> H1892 ^T	JFGS01
<i>Halocynthiibacter arcticus</i> PAMC 20958 ^T	NZ_CP014327.1
<i>Halocynthiibacter namhaensis</i> RA2-3 ^T	JWIF01
<i>Jannaschia aquimarina</i> GSW-M26 ^T	JYFE01
<i>Jannaschia helgolandensis</i> DSM 14858 ^T	FNZQ01
<i>Jannaschia pohangensis</i> DSM 19073 ^T	FORA01
<i>Jannaschia rubra</i> CECT 5088 ^T	CXPG01
<i>Leisingera aquaemixtae</i> CECT 8399 ^T	CYSR01
<i>Leisingera aquimarina</i> DSM 24565 ^T	AXBE01
<i>Leisingera caerulea</i> DSM 24564 ^T	AXBI01
<i>Leisingera daeponensis</i> DSM 23529 ^T	AXBD01
<i>Leisingera methylohalidivorans</i> DSM 14336 ^T	NC_023135.1
<i>Limimanicola cinnabarinus</i> LL-001 ^T	BATB01
<i>Limimanicola hongkongensis</i> DSM 17492 ^T	APGJ01
<i>Limimanicola pyoseonensis</i> DSM 21424 ^T	FNAT01
<i>Limimanicola soesokkakensis</i> CECT 8367 ^T	FWFY01*
<i>Litoreibacter albidus</i> DSM 26922 ^T	FNOI01
<i>Litoreibacter arenae</i> DSM 19593 ^T	AONI01
<i>Litoreibacter ascidiaceicola</i> CECT 8539 ^T	FQUV01
<i>Litoreibacter janthinus</i> DSM 26921 ^T	FOYO01
<i>Litorimicrobium taeanense</i> DSM 22007 ^T	FOEP01
<i>Loktanella fryxellensis</i> DSM 16213 ^T	FOCIO1
<i>Loktanella salsilacus</i> DSM 16199 ^T	FOTF01
<i>Lutimaribacter saemankumemsis</i> DSM 28010 ^T	FNEB01
<i>Maliponia aquimaris</i> CECT 8898 ^T	FXYF01*
<i>Mameliella alba</i> CGMCC 1.7290 ^T	FMZI01
<i>Mameliella atlantica</i> L6M1-5 ^T	NIVZ01
<i>Mameliella phaeodactyli</i> KD-53 ^T	NIWC01
<i>Maribius pelagius</i> DSM 26893 ^T	FOCM01
<i>Maribius salinus</i> DSM 26892 ^T	FQZA01
<i>Marinibacterium profundimaris</i> 22II1_22F33 ^T	AQQR01
<i>Marinovum algicola</i> CECT 5396 ^T	FWFM01*
<i>Maritimibacter alkaliphilus</i> HTCC 2654 ^T	AAMT01
<i>Marivita cryptomonadis</i> CL-SK44 ^T	JFKD01
<i>Marivita geojedonensis</i> DPG138 ^T	JFKC01

Cepa	Nº Acceso
<i>Monaibacterium marinum</i> C7 ^T	OCTN01
<i>Nereida ignava</i> CECT 5292 ^T	CVPC01
<i>Nioella nitratreducens</i> SSW136 ^T	MNBW01
<i>Nioella sediminis</i> JS7-11 ^T	MNBL01
<i>Oceanicella actignis</i> CGMCC 1.10808 ^T	FRDL01
<i>Oceanicola granulosus</i> HTCC8397 ^T	AAOT01
<i>Oceaniovalibus guishaninsula</i> JLT2003 ^T	AMGO01
<i>Octadecabacter antarcticus</i> 307 ^T	GCA_000155675.2
<i>Octadecabacter arcticus</i> 238 ^T	GCA_000155735.2
<i>Octadecabacter ascidiaceicola</i> CECT 8868 ^T	FXYD01*
<i>Octadecabacter temperatus</i> SB1 ^T	NZ_CP012160.1
<i>Pacificibacter marinus</i> CECT 7971 ^T	FWFW01*
<i>Paenirhodobacter enshiensis</i> DW2-9 ^T	JFZB01
<i>Palleronia abyssalis</i> CECT 8504 ^T	ONZF01*
<i>Palleronia marisminoris</i> CECT 7066 ^T	FWFV01*
<i>Paracoccus lutimaris</i> CECT 8525 ^T	QPJL01*
<i>Pelagicola litorisediminis</i> CECT 8287 ^T	FWFL01*
<i>Pelagimonas varians</i> CECT 8663 ^T	FXYH01*
<i>Phaeobacter gallaeciensis</i> DSM 26640 ^T	NC_023137.1
<i>Phaeobacter inhibens</i> DSM 16374 ^T	AXBB01
<i>Phaeobacter italicus</i> CECT 7645 ^T	CVRM01
<i>Phaeobacter piscinae</i> P14 ^T	NZ_CP010681
<i>Phaeobacter porticola</i> P97 ^T	NZ_CP016364.1
<i>Planktomarina temperata</i> RCA23 ^T	NZ_CP003984.1
<i>Planktotalea frisia</i> SH6-1 ^T	MLCB01
<i>Pontibaca methylaminivorans</i> DSM 21219 ^T	FTPS01
<i>Ponticoccus lacteus</i> JL351 ^T	NIWA01
<i>Pontivivens insulae</i> CECT 8812 ^T	OMKW01*
<i>Primorskyibacter insulae</i> CECT 8871 ^T	OMOJ01*
<i>Pseudaestuariaivita atlantica</i> 22II-S11-Z3 ^T	AQQZ01
<i>Pseudodonghicola xiamenensis</i> DSM 18339 ^T	AUBS01
<i>Pseudoceanicola antarcticus</i> CGMCC 1.12662 ^T	OBEA01
<i>Pseudoceanicola atlanticus</i> 22II-s11g ^T	AQQX01
<i>Pseudoceanicola batsensis</i> HTCC 2597 ^T	AAMO01
<i>Pseudoceanicola flagellatus</i> CGMCC 1.12644 ^T	FWYD01
<i>Pseudoceanicola marinus</i> CECT 7751 ^T	FWFN01*
<i>Pseudoceanicola nanhaiensis</i> DSM 18065 ^T	JHZF01
<i>Pseudoceanicola nitratreducens</i> CGMCC 1.7292 ^T	FNZG01

Cepa	Nº Acceso
<i>Pseudooctadecabacter jejudonensis</i> CECT 8397 ^T	FWFT01*
<i>Pseudopelagicola gijangensis</i> CECT 8540 ^T	FQZQ01
<i>Pseudophaeobacter arcticus</i> DSM 23566 ^T	AXBF01
<i>Pseudophaeobacter leonis</i> 306 ^T	WVJ01
<i>Pseudorhodobacter antarcticus</i> KCTC 23700 ^T	LGHU01
<i>Pseudorhodobacter aquimaris</i> KCTC 23043 ^T	LGHS01
<i>Pseudorhodobacter ferrugineus</i> DSM 5888 ^T	ATVN01
<i>Pseudorhodobacter psychrotolerans</i> PAMC 27389 ^T	LGIC01
<i>Pseudorhodobacter wandonensis</i> KCTC 23672 ^T	LGHT01
<i>Pseudoroseicyclus aestuarii</i> CECT 9025 ^T	QPTE01*
<i>Pseudoruegeria aquimaris</i> CECT 7680 ^T	FWFQ01*
<i>Pseudoruegeria lutimaris</i> DSM 25294 ^T	FNEK01
<i>Pseudoruegeria marinistellae</i> SF-16 ^T	LNCI01
<i>Pseudoruegeria sabulilitoris</i> GJMS-35 ^T	LOAS01
<i>Puniceibacterium sediminis</i> DSM 29052 ^T	FZNN01
<i>Rhodobacter johrii</i> JA192 ^T	MABH01
<i>Rhodobacter maris</i> JA276 ^T	OBMT01
<i>Rhodobacter ovatus</i> JA234 ^T	OAOQ01
<i>Rhodobacter vinaykumarii</i> DSM 18714 ^T	FTOM01
<i>Rhodovulum sulfidophilum</i> DSM 1374 ^T	NZ_CP015418.1
<i>Roseibaca ekhonensis</i> CECT 7235 ^T	UIHC01*
<i>Roseicitreum antarcticum</i> CGMCC 1.8894 ^T	FNOM01
<i>Roseinatronobacter thiooxidans</i> ALG1 ^T	MEHT01
<i>Roseisalinus antarcticus</i> CECT 7023 ^T	FWFZ01*
<i>Roseivivax atlanticus</i> 22II-s10s ^T	AQQW01
<i>Roseivivax halodurans</i> JCM 10272 ^T	JALZ01
<i>Roseivivax halotolerans</i> DSM 15490 ^T	FOXV01
<i>Roseivivax isopora</i> LMG 25204 ^T	JAME01
<i>Roseivivax jejudonensis</i> CECT 8625 ^T	FWFK01*
<i>Roseivivax lentus</i> DSM 29430 ^T	FTOQ01
<i>Roseivivax marinus</i> DSM 27511 ^T	FOAI01
<i>Roseivivax pacificus</i> DSM 29329 ^T	QBKN01
<i>Roseivivax roseus</i> DSM 23042 ^T	FOGU01
<i>Roseobacter denitrificans</i> Och-114 ^T	NZ_CP008209.1
<i>Roseobacter litoralis</i> Och-149 ^T	NC_015730.1
<i>Roseobacterium elongatum</i> DSM 19469 ^T	NZ_CP004372.1
<i>Roseovaris azorensis</i> DSM 100674 ^T	FOAG01
<i>Roseovaris marisflavi</i> DSM 29327 ^T	FRBN01

Cepa	Nº Acceso
<i>Roseovarius aestuarii</i> CECT 7745 ^T	FWXB01*
<i>Roseovarius albus</i> CECT 7450 ^T	FWFX01*
<i>Roseovarius atlanticus</i> R12B ^T	LAXJ01
<i>Roseovarius gaetbuli</i> CECT 8370 ^T	FWFJ01*
<i>Roseovarius halotolerans</i> CECT 8110 ^T	FWFU01*
<i>Roseovarius indicus</i> B108 ^T	LAXI01
<i>Roseovarius lutimaris</i> DSM 28463 ^T	FOVP01
<i>Roseovarius mucosus</i> DSM 17069 ^T	CP020474.1
<i>Roseovarius nanhaiticus</i> DSM 29590 ^T	FTNV01
<i>Roseovarius nubinhibens</i> ISM ^T	AALY01
<i>Roseovarius pacificus</i> DSM 29589 ^T	FRBR01
<i>Roseovarius tolerans</i> DSM 11457 ^T	FOBO01
<i>Rubellimicrobium mesophilum</i> DSM 19309 ^T	AOSK01
<i>Rubellimicrobium thermophilum</i> DSM 16684 ^T	AOLV01
<i>Ruegeria arenilitoris</i> CECT 8715 ^T	FXYG01
<i>Ruegeria atlantica</i> CECT 4292 ^T	CYPU01
<i>Ruegeria conchae</i> TW15 ^T	AEYW01
<i>Ruegeria denitrificans</i> CECT 5091 ^T	CYUD01
<i>Ruegeria halocynthiae</i> MOLA R1/13b ^T	JQEZ01
<i>Ruegeria lacuscaerulensis</i> ITI-1157 ^T	ACNX01
<i>Ruegeria litorea</i> CECT 7639 ^T	FWFO01*
<i>Ruegeria marina</i> CGMCC 1.9108 ^T	FMZV01
<i>Ruegeria marisrubri</i> ZGT118 ^T	LQBQ01
<i>Ruegeria mediterranea</i> CECT 7615 ^T	ONZG01*
<i>Ruegeria meonggei</i> CECT 8411 ^T	FWFP01*
<i>Ruegeria pomeroyi</i> DSS-3 ^T	NC_003911.12
<i>Ruegeria profundus</i> ZGT108 ^T	LQBP01
<i>Sagittula stellata</i> E-37 ^T	AAYA01
<i>Salipiger bermudensis</i> HTCC 2601 ^T	AATQ01
<i>Salipiger mucosus</i> DSM 16094 ^T	APVH01
<i>Salipiger profundus</i> JLT2016 ^T	NZ_CP014796
<i>Salipiger thiooxidans</i> DSM 10146 ^T	FNAV01
<i>Sedimentitalea nanhaiensis</i> DSM 24252 ^T	AXBG01
<i>Sediminimonas qiaohouensis</i> DSM 21189 ^T	AUIJ01
<i>Shimia aestuarii</i> DSM 15283 ^T	FOTQ01
<i>Shimia haliotis</i> DSM 28453 ^T	FOSZ01
<i>Shimia marina</i> CECT 7688 ^T	CYPW01
<i>Sulfitobacter brevis</i> DSM 11443 ^T	FOMW01

Cepa	Nº Acceso
<i>Sulfitobacter delicatus</i> DSM 16477 ^T	FNBP01
<i>Sulfitobacter donghicola</i> DSW-25 ^T	JASF01
<i>Sulfitobacter dubius</i> DSM 16472 ^T	FOPG01
<i>Sulfitobacter geojensis</i> MM-124 ^T	JASE01
<i>Sulfitobacter indolifex</i> HEL-45 ^T	ABID01
<i>Sulfitobacter litoralis</i> DSM 17584 ^T	FNJD01
<i>Sulfitobacter marinus</i> DSM 23422 ^T	FPAJ01
<i>Sulfitobacter noctilucae</i> NB-68 ^T	JASC01
<i>Sulfitobacter noctilucicola</i> NB-77 ^T	JASD01
<i>Sulfitobacter pontiacus</i> DSM 10014 ^T	FNNB01
<i>Sulfitobacter pseudonitschiae</i> DSM 26824 ^T	NZ_CP022415.1
<i>Thalassobacter stenotrophicus</i> CECT 5294 ^T	CYRX01
<i>Thalassobius activus</i> CECT 5113 ^T	CYTO01
<i>Thalassobius autumnalis</i> CECT 5118 ^T	CYSB01
<i>Thalassobius galatinovorans</i> CECT 4357 ^T	CYSA01
<i>Thalassobius mediterraneus</i> CECT 5383 ^T	CYSF01
<i>Thioclava arenosa</i> CAU 1312 ^T	NTJD01
<i>Thioclava atlantica</i> 13D2W-2 ^T	AQRC01
<i>Thioclava dalianensis</i> DLFJ1-1 ^T	JHEH01
<i>Thioclava indica</i> DT23-4 ^T	AUNB01
<i>Thioclava marina</i> 11.10-0-13 ^T	MPZS01
<i>Thioclava nitratireducens</i> 28B10_4 ^T	GCF_001940525.2
<i>Thioclava pacifica</i> DSM 10166 ^T	AUND01
<i>Thioclava sediminum</i> TAW-CT134 ^T	MPZV01
<i>Tranquillimonas alkanivorans</i> DSM 19547 ^T	FOXA01
<i>Tropicibacter naphthalenivorans</i> CECT 7648 ^T	CYSE01
<i>Tropicibacter phthalicicus</i> CECT 8649 ^T	FXXP01*
<i>Tropiciminas isoalkanivorans</i> DSM 19548 ^T	FOLG01
<i>Wenxinia marina</i> DSM 24838 ^T	ARAY01
<i>Wenxinia saemankumensis</i> CECT 8456 ^T	FQYO01
<i>Xuhuaishuia manganoxidans</i> DY6-4 ^T	NZ_CP019124
<i>Yangia pacifica</i> DSM 26894 ^T	FOZW01
<i>Yoonia rosea</i> DSM 29591 ^T	FTPR01
<i>Yoonia sediminilitoris</i> CECT 8284 ^T	QPJP01*
<i>Yoonia tamlensis</i> DSM 26879 ^T	FOYP01
<i>Yoonia vestfoldensis</i> SMR4r ^T	NZ_CP021431.1

Tabla S3. Clústeres genéticos (mostrados en cuatro páginas) involucrados en la producción de metabolitos secundarios determinados en los genomas analizados de *Rhodobacteraceae* con identificación del tipo de clúster descrito y anotación de las coordenadas nucleotídicas en las que se sitúan mediante la herramienta antiSMASH

Cepa	Clúster identificado	Coordenadas (nn)
<i>Marinovum algicola</i> CECT 5396 ^T	Bacteriocina	45.811-56.668
	Homoserina lactona	800.259-821.017
	Ectoína	15.168-25.563
	Homoserina lactona	221.049-241.681
	Tipo I PKS	1-50.518
	Tipo III PKS	1.582-4.2643
<i>Roseisalinus antarcticus</i> CECT 7023 ^T	Indol	131.533-152.999
	Homoserina lactona	171.794-192.429
	Terpeno	54.445-75.464
	Ectoína	1-9.575
	Bacteriocina	162.707-173.558
	Ectoína	145.363-155.755
<i>Palleronia marisminoris</i> CECT 7066 ^T	Homoserina lactona	83.608-104.285
	Tipo III PKS	1-13.504
	Homoserina lactona	217.207-237.842
	Terpeno	122.442-144.174
	NRPS	81.093-126.856
	Homoserina lactona	144.186-165.013
<i>Roseovarius albus</i> CECT 7450 ^T	Homoserina lactona	477.089-497.835
	Bacteriocina	81.428-92.291
	Homoserina lactona	118.150-138.926
	Terpeno	160.987-181.754
	Ectoína	59.637-70.020
	Ectoína	340.033-350.413
<i>Ruegeria litorea</i> CECT 7639 ^T	Homoserina lactona	2.360.808-2.381.553
	Homoserina lactona	2.460.277-2.481.158
	Tipo I PKS	18.902-70.989
	Bacteriocina	382.313-393.170
	Homoserina lactona	141.454-162.092
	Bacteriocina	1-11.751
<i>Pseudoruegeria aquimaris</i> CECT 7680 ^T	Terpeno	76.051-96.809
	Homoserina lactona	197.701-218.462
	Bacteriocina	1-6.395
	Homoserina lactona	14.450-35.082
	Homoserina lactona	9.637-30.221
	Ectoína	342.342-352.728
<i>Roseovarius aestuarii</i> CECT 7745 ^T	Terpeno	233.175-253.948
	Homoserina lactona	214.721-235.533
	Homoserina lactona	48.716-69.336
	Bacteriocina	21.838-32.695
	Bacteriocina-Lantipéptido	27.386-50.765
	Homoserina lactona	25.175-45.855
<i>Pseudoceanicola marinus</i> CECT 7751 ^T	Homoserina lactona	49.730-70.491
	Otros	78.797-123.038
	Homoserina lactona	1-11.637
	Tipo I PKS	232.632-280.065
	Homoserina lactona	457.293-478.153
	Bacteriocina	258.888-269.739

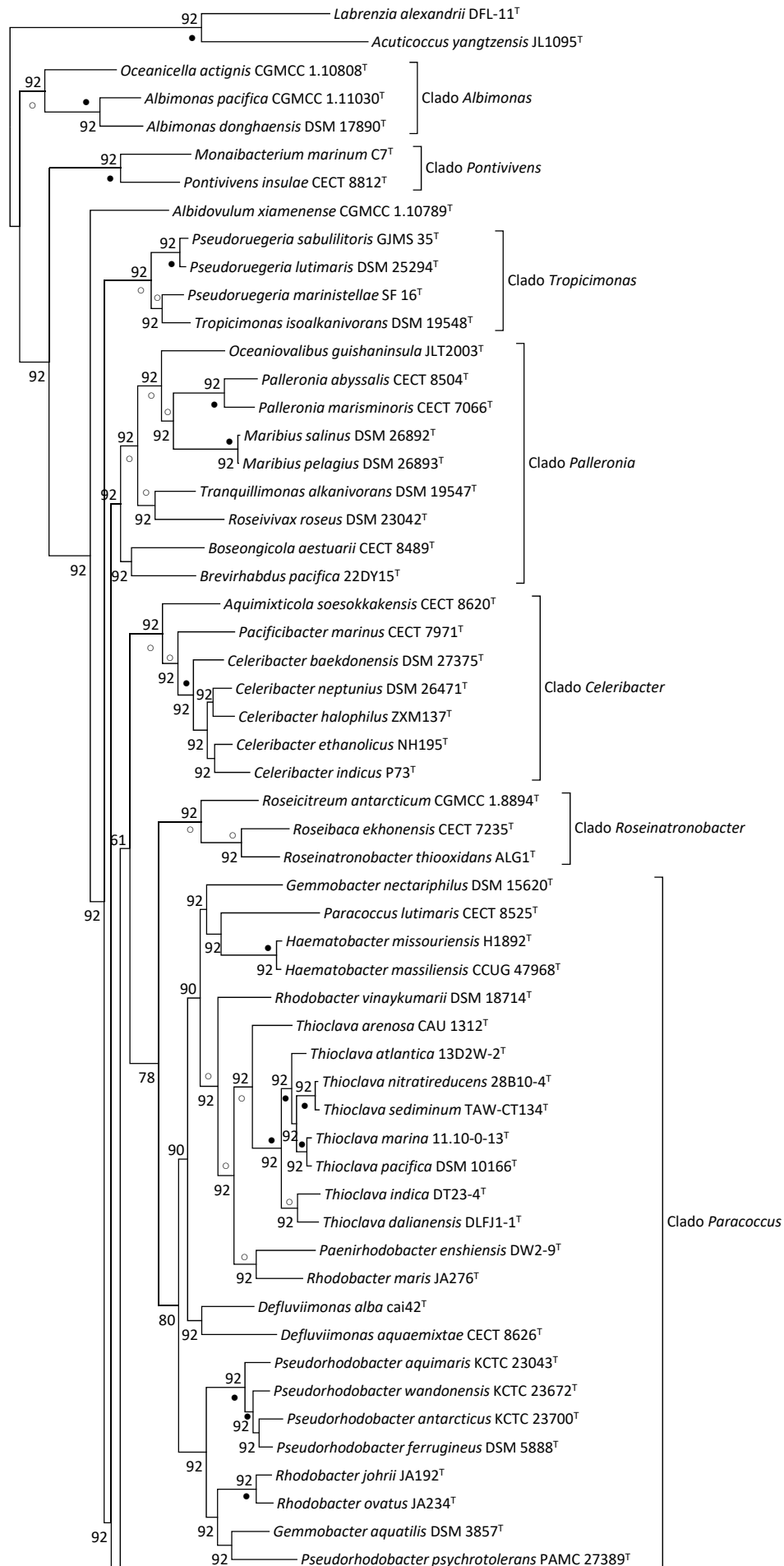
Cepa	Clúster identificado	Coordenadas (nn)
<i>Pacificibacter marinus</i> CECT 7971 ^T	Ectoína	318.652-328.507
	Homoserina lactona	48.590-69.375
	Homoserina lactona	99.410-120.195
	Homoserina lactona	264.604-285.191
	Homoserina lactona	48.147-68.800
	Bacteriocina	168.435-179.283
	Homoserina lactona	66.737-87.369
<i>Roseovarius halotolerans</i> CECT 8110 ^T	Homoserina lactona	304.268-325.011
	Homoserina lactona	781.038-801.832
	Terpeno	809.906-830.691
	Homoserina lactona	133.6148-1.360.525
	Ectoína	209.485-219.877
	Otros	608.104-650.713
	Bacteriocina	193.131-203.988
<i>Pelagicola litorisediminis</i> CECT 8287 ^T	Terpeno	7.7342-98.115
	Homoserina lactona	486.611-507.354
	Homoserina lactona	289.998-310.474
	Ectoína	269.185-279.571
	Ectoína	124.699-135.079
	Homoserina lactona	57.570-78.376
	Otros	1-60.90
<i>Limimanicola soesokkakensis</i> CECT 8367 ^T	Tipo III PKS	212.823-253.884
	Tipo I PKS	366.232-418.065
	Terpeno	56.941-78.667
	Otros	119.697-162.474
<i>Roseovarius gaetbuli</i> CECT 8370 ^T	Homoserina lactona	72.028-92.837
	Tipo I PKS	1-49.818
	Homoserina lactona	29.382-46.139
	Ectoína	20.351-30.743
	Homoserina lactona	1-16.013
<i>Pseudooctadecabacter jejudonensis</i> CECT 8397 ^T	Ectoína	1-5.971
	Terpeno	271.512-292.252
	Bacteriocina	854.048-864.896
	Homoserina lactona	2.259-22.897
	Terpeno	503.570-524.592
	Homoserina lactona	110.758-131.372
	Tipo III PKS	71.959-113.023
<i>Ruegeria meonggei</i> CECT 8411 ^T	Homoserina lactona	227.523-248.257
	Homoserina lactona	32.6042-346.899
	Bacteriocina	419.265-430.122
	Homoserina lactona	109.636-130.274
	Bacteriocina	135.768-146.037
<i>Boseongicola aestuarii</i> CECT 8489 ^T	Terpeno	234.581-255.339
	Bacteriocina	154.509-165.369
	Homoserina lactona	269.763-290.404
	Homoserina lactona	27.678-48.010
<i>Aquimixticola soesokkakensis</i> CECT 8620 ^T	Bacteriocina	14.858-25.709
	Homoserina lactona	37.921-58.508
	Homoserina lactona	120.713-141.348
	NRPS	98.137-143.977
<i>Confluentimicrobium aestuarii</i> CECT 8621 ^T	Homoserina lactona	190.953-211.540
	Homoserina lactona	901.869-912.729
	Homoserina lactona-Tipo I PKS-Otros	1408960-1463726

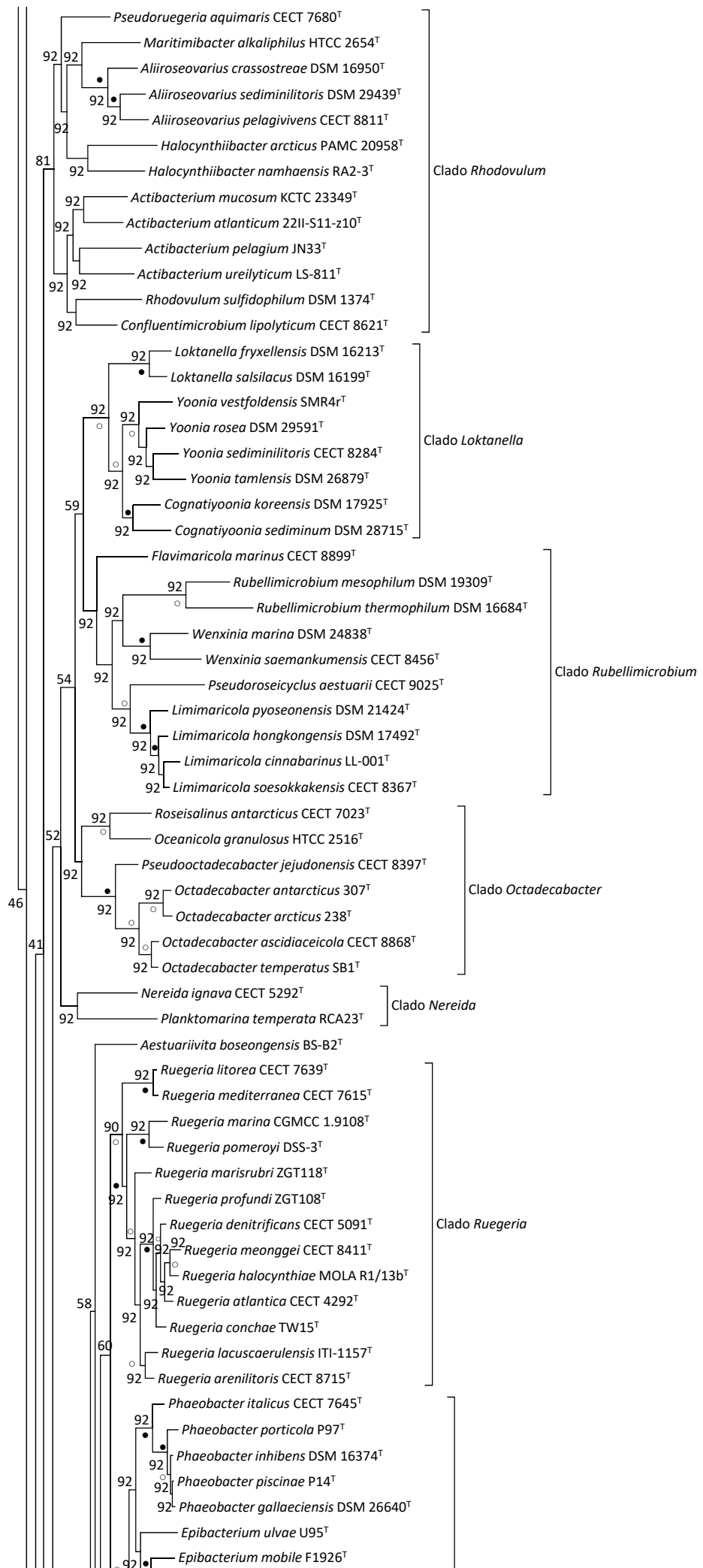
Cepa	Clúster identificado	Coordenadas (nn)
	Terpeno	40.133-60.900
	Ectoína	388.495-398.893
<i>Roseivivax jejudonensis</i> CECT 8625 ^T	Tipo I PKS	841.843-893.801
	Homoserina lactona	321.386-342.276
	Bacteriocina	335.154-346.002
	Terpeno	57.108-78.145
	Homoserina lactona	262.844-283.551
	Ectoína	236.571-246.963
<i>Tropicibacter phthalicus</i> CECT 8649 ^T	Homoserina lactona	48.225-69.085
	Homoserina lactona	63.124-120.710
	Tipo I PKS	559.066-611.043
	Homoserina lactona	1.263.197-1.283.862
	Homoserina lactona	1.385.809-1.406.411
	Bacteriocina	1.117.761-1.128.609
	Homoserina lactona	83.893-104.558
	Homoserina lactona	281.527-302.267
<i>Pelagimonas varians</i> CECT 8663 ^T	Terpeno	190.116-210.898
	Tipo I PKS	78.010-129.987
	Otros	92.959-135.742
	Bacteriocina	35.551-46.399
	Terpeno	617.745-638.521
	Homoserina lactona	793.402-814.142
	Homoserina lactona	911.404-932.267
<i>Ruegeria arenilitoris</i> CECT 8715 ^T	Bacteriocina	1.082.509-1.093.366
	Bacteriocina	44.911-56.773
	Homoserina lactona	509.444-530.082
	Homoserina lactona	55.420-76.061
	Homoserina lactona	575.630-596.406
	Homoserina lactona	677.284-697.910
<i>Octadecabacter ascidiaceicola</i> CECT 8868 ^T	Bacteriocina	392.040-402.888
	Otro	309.130-351.958
	Terpeno-Tipo I PKS	360.447-423.450
<i>Maliponia aquimaris</i> CECT 8898 ^T	Bacteriocina	10.826-21.674
	Homoserina lactona	40.216-60.851
	Terpeno	33.623-54.393
	Ectoína	42.891-53.292
	Homoserina lactona	160.403-181.035
<i>Flavimaricola marinus</i> CECT 8899 ^T	Tipo I PKS	996.560-1.048.572
	Terpeno	1.229.070-1.250.083
	Homoserina lactona	1-17.139
	Homoserina lactona	14.825-35.475
	Tipo I PKS-Otros	35.750-88.927
	Bacteriocina	12.295-23.152
	Ectoína	174.739-185.125
<i>Roseibaca ekhonensis</i> CECT 7235 ^T	Tipo III PKS	62.330-103.370
	Tipo I PKS	5.329-57.183
	Terpeno	31.203-52.219
	Bacteriocina	367.904-378.761
<i>Ruegeria mediterránea</i> CECT 7615 ^T	Ectoína	480.515-490.919
	Homoserina lactona	141.216-161.854
	Tipo I PKS-Sacáridos	384.683-449.945
	Homoserina lactona-posible ácidos grasos	180.457-216.594

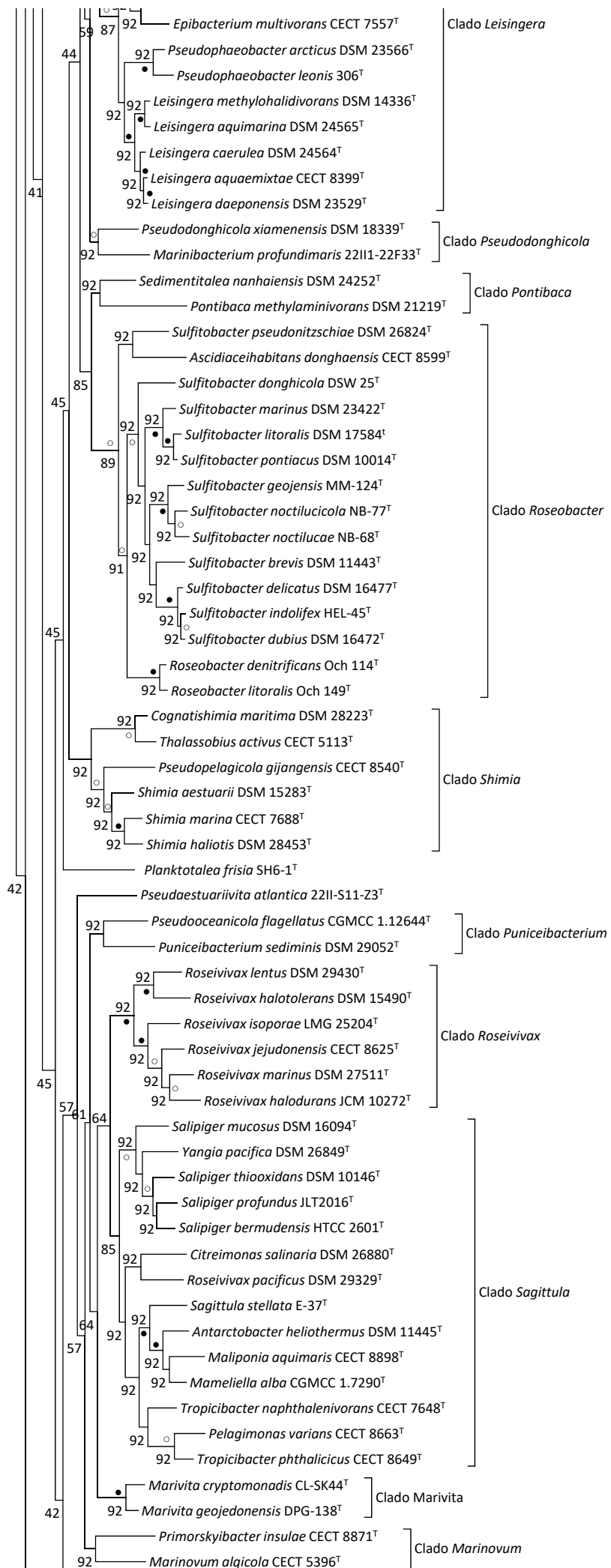
Cepa	Clúster identificado	Coordenadas (nn)
	Homoserina lactona-posible ácidos grasos	22.293-46.753
	Homoserina lactona	1-16.949
	Ectoína	47.191-57.571
<i>Yoonia sediminilitoris</i> CECT 8284^T	Terpeno	913.777-934.544
	Terpeno	448.173-469.209
	Homoserina lactona	21.545-235.780
	Homoserina lactona	76.035-96.712
	Ectoína	3.161-11.424
<i>Palleronia abyssalis</i> CECT 8504^T	Terpeno	160.147-181.160
	Homoserina lactona	60.213-81.043
	Terpeno	59.251-81.007
	Homoserina lactona-Sacáridos-Lasso péptido	89.450-175.568
<i>Paracoccus lutimaris</i> CECT 8525^T	Homoserina lactona	29.480-50.049
	Bacteriocina	198.443-20.9297
	Tipo I PKS-Sacáridos	72.220-128.398
	Homoserina lactona	153.924-174.592
	Tipo I PKS	19.006-69.602
	NRPS	72.637-115.759
	Bacteriocina	25.826-36.629
<i>Ascidiaceihabitans donghaensis</i> CECT 8599^T	Homoserina lactona	968.428-98.9066
	Homoserina lactona-ácidos grasos	2.302.990-2.327.334
	Bacteriocina	2.635.739-2.659.609
	Terpeno	14.968-49.134
<i>Defluviimonas aquaemixtae</i> CECT 8626^T	Homoserina lactona	8.717-29.307
	Bacteriocina	577.494-588.348
	Homoserina lactona	929.697-950.305
	Homoserina lactona	564.458-585.090
<i>Aliiroseovarius pelagivivens</i> CECT 8811^T	Homoserina lactona-ácidos grasos	1.701.204-1.725.902
	Homoserina lactona-Sacáridos	1.940.011-2.013.389
<i>Pontivivens insulae</i> CECT 8812^T	Lantipéptido	1.053.331-1.076.186
	Terpeno	203.190-251.322
	Terpeno	932.234-953.040
	Homoserina lactona-ácidos grasos	70.166-102.001
<i>Primorskyibacter insulae</i> CECT 8871^T	Bacteriocina	962.362-973.210
	Tipo I PKS-Sacáridos	115.809-181.888
<i>Pseudoroseicyclus aestuarii</i> CECT 9025^T	Homoserina lactona	150.557-171.180
	Terpeno	766.904-787.662
	NRPS	248.908-294.589
	Tipo III PKS	594.467-635.540
	Terpeno	13.657-35.362

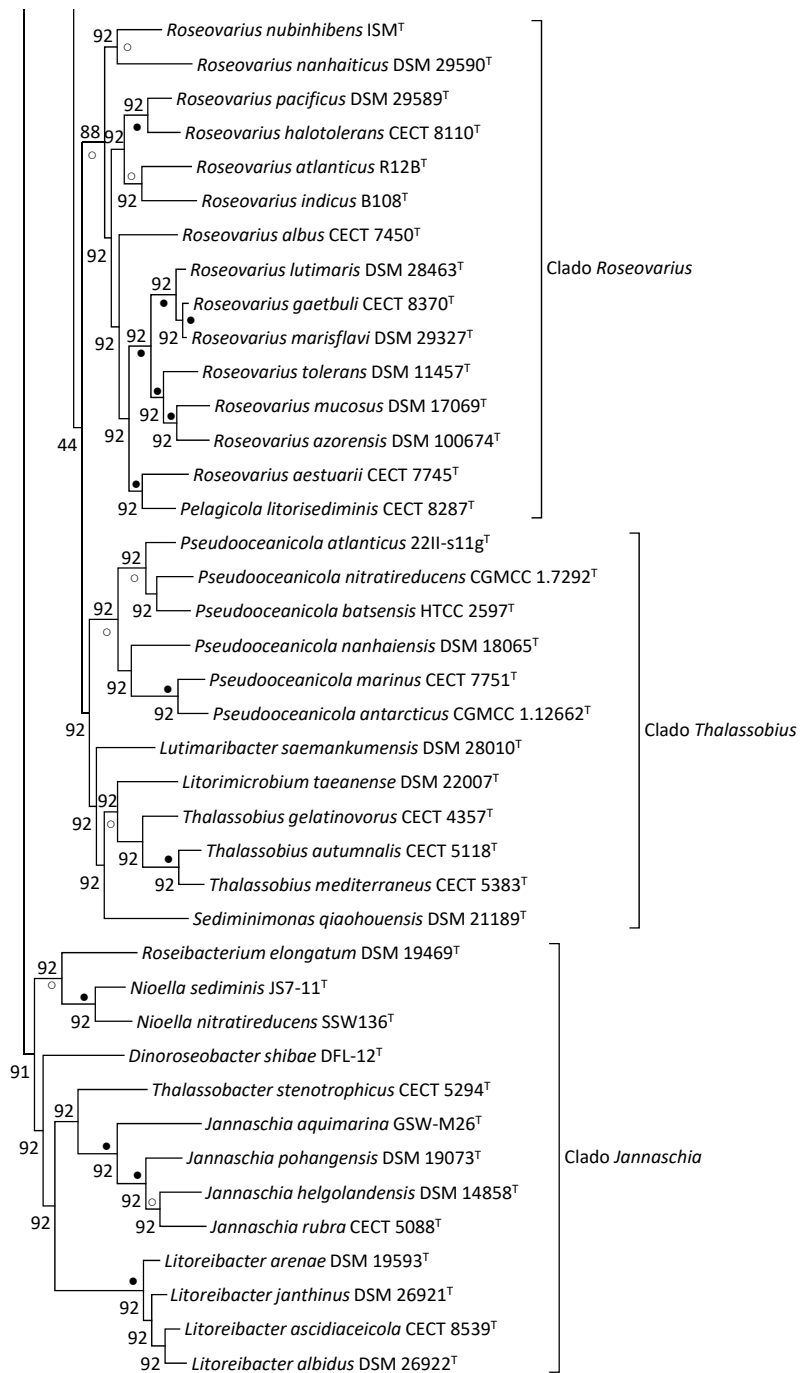
Figura S1. Árbol filogenómico (mostrado en cuatro páginas) de *Rhodobacteraceae* generado con la herramienta UBCG mediante el uso de las secuencias de aminoácidos. Los números en los nodos indican el índice de soporte genético (valor máximo 92). Barra, 0.05 sustituciones por posición. Circulo negro, respaldado por el árbol de consenso estricto; Circulo blanco, respaldado por el árbol de consenso mayoritario.

○ Consenso mayoritario
● Consenso estricto





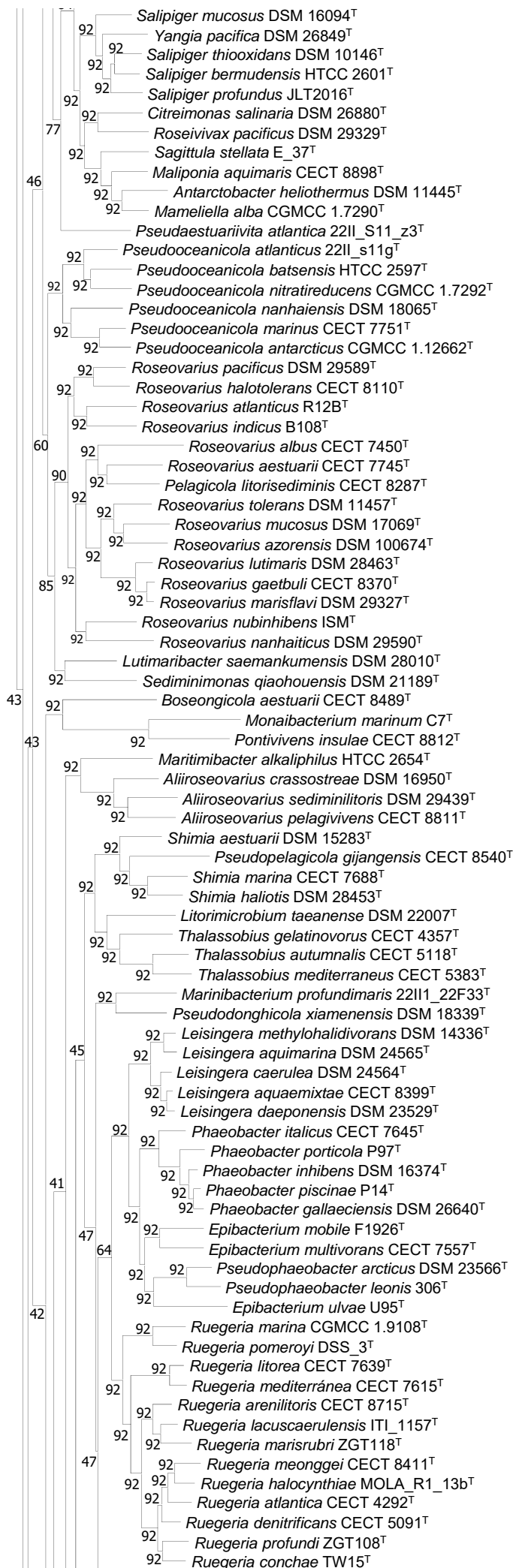


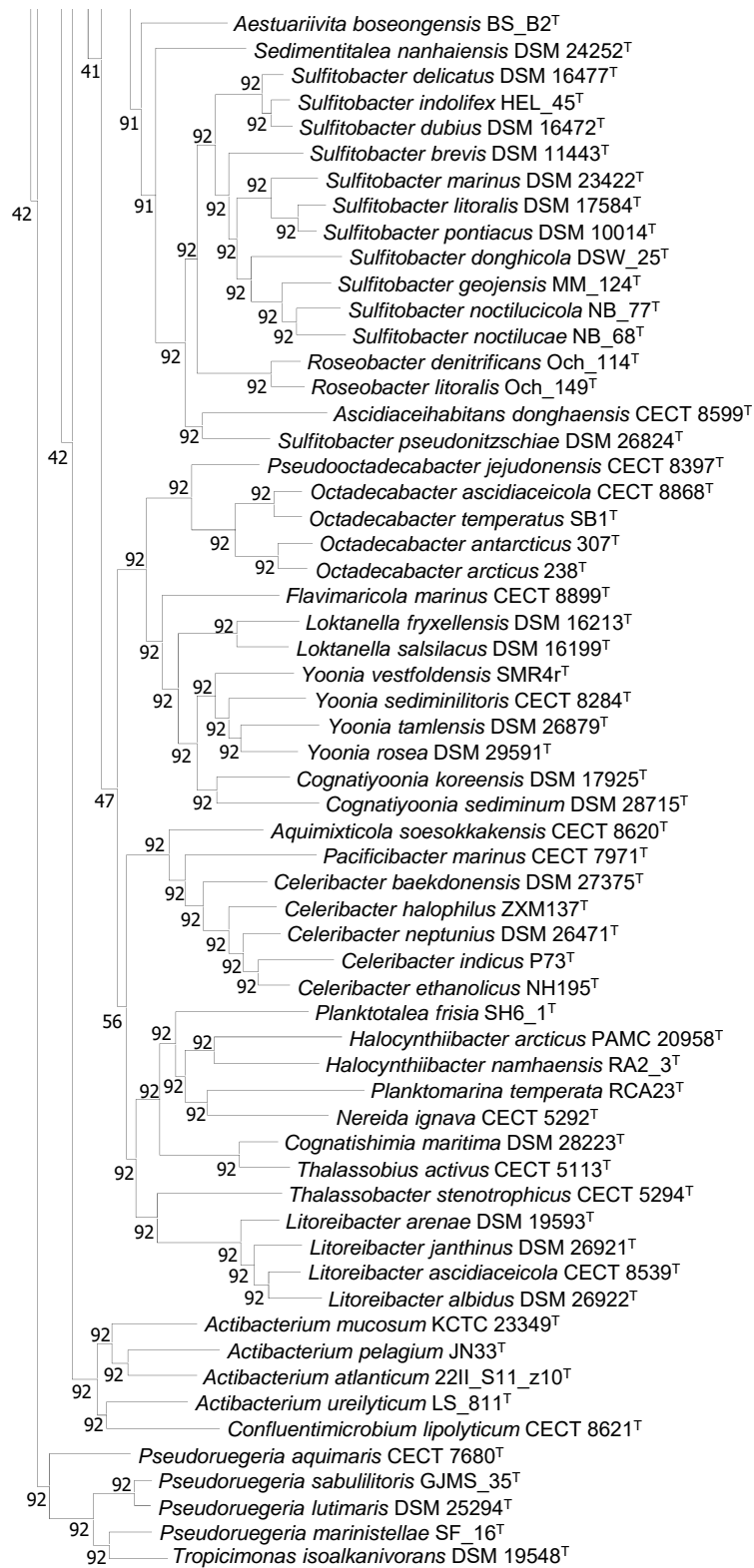


0.050

Figura S2. Árbol filogenómico (mostrado en tres páginas) de *Rhodobacteraceae* generado con la herramienta UBCG mediante el uso de las secuencias de nucleótidos. Los números en los nodos indican el índice de soporte genético (valor máximo 92). Barra, 0.05 sustituciones por posición.

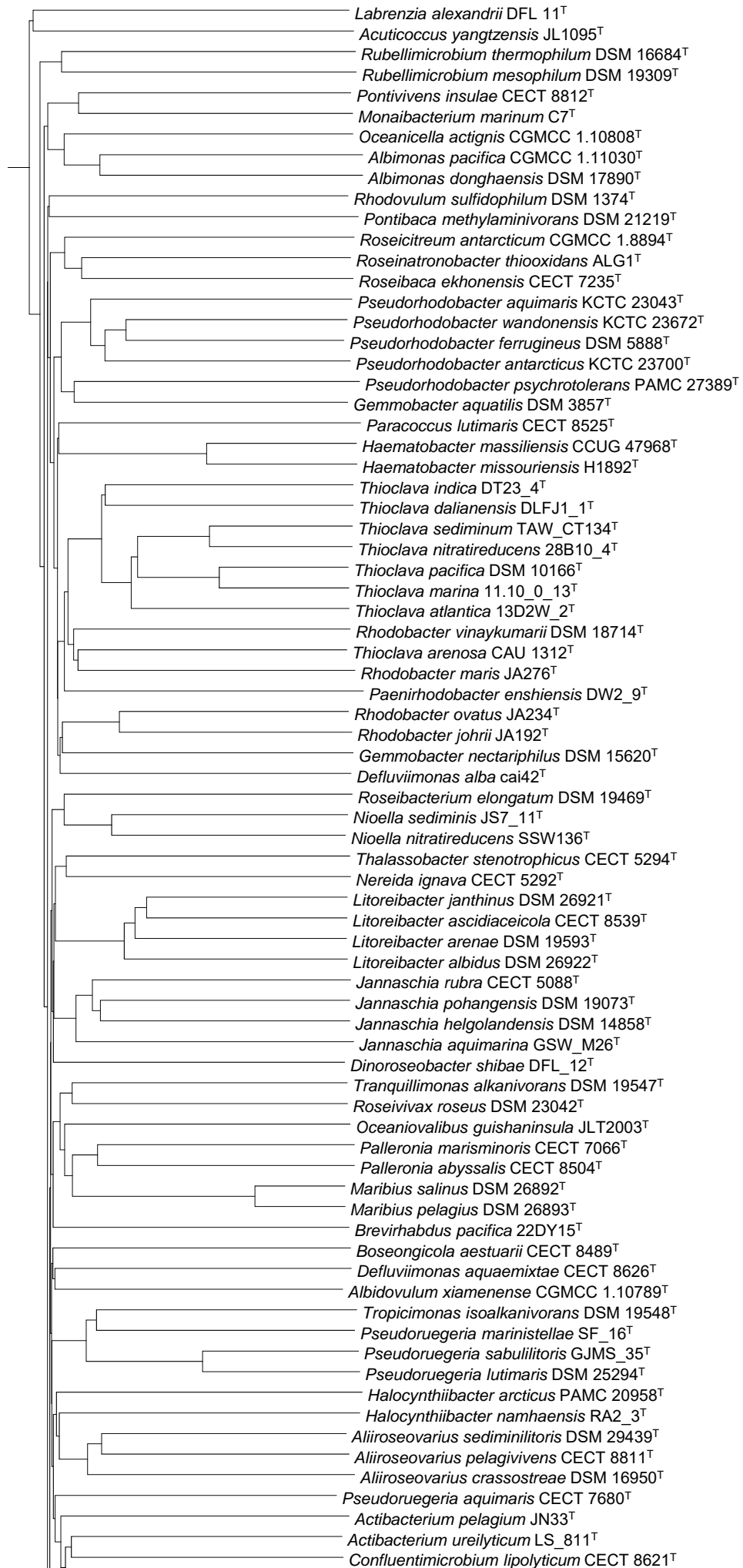


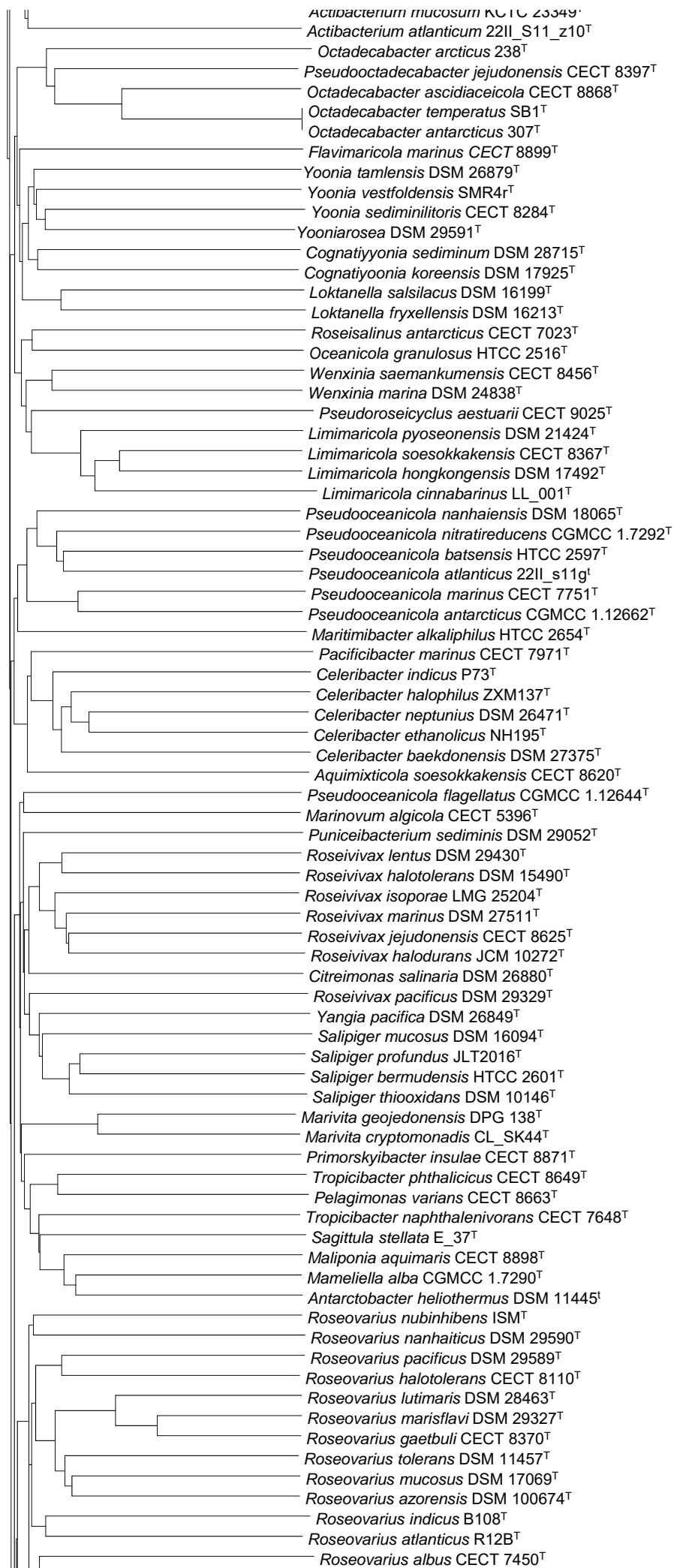


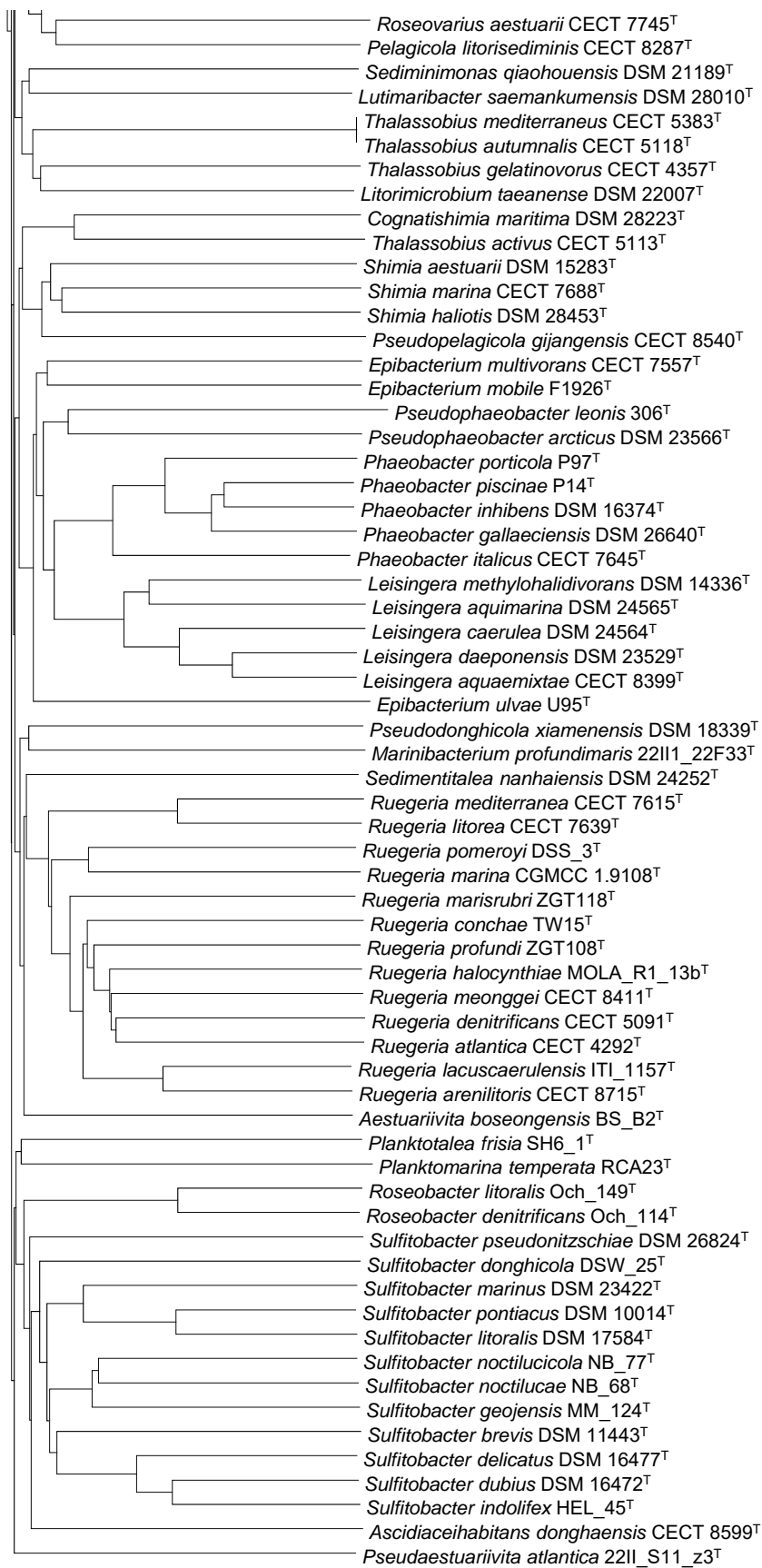


0.050

Figura S3. Árbol filogenómico (mostrado en tres páginas) de *Rhodobacteraceae* generado con la herramienta CTree 3.0 mediante el uso de las secuencias de aminoácidos. Barra, 0.05 sustituciones por posición.

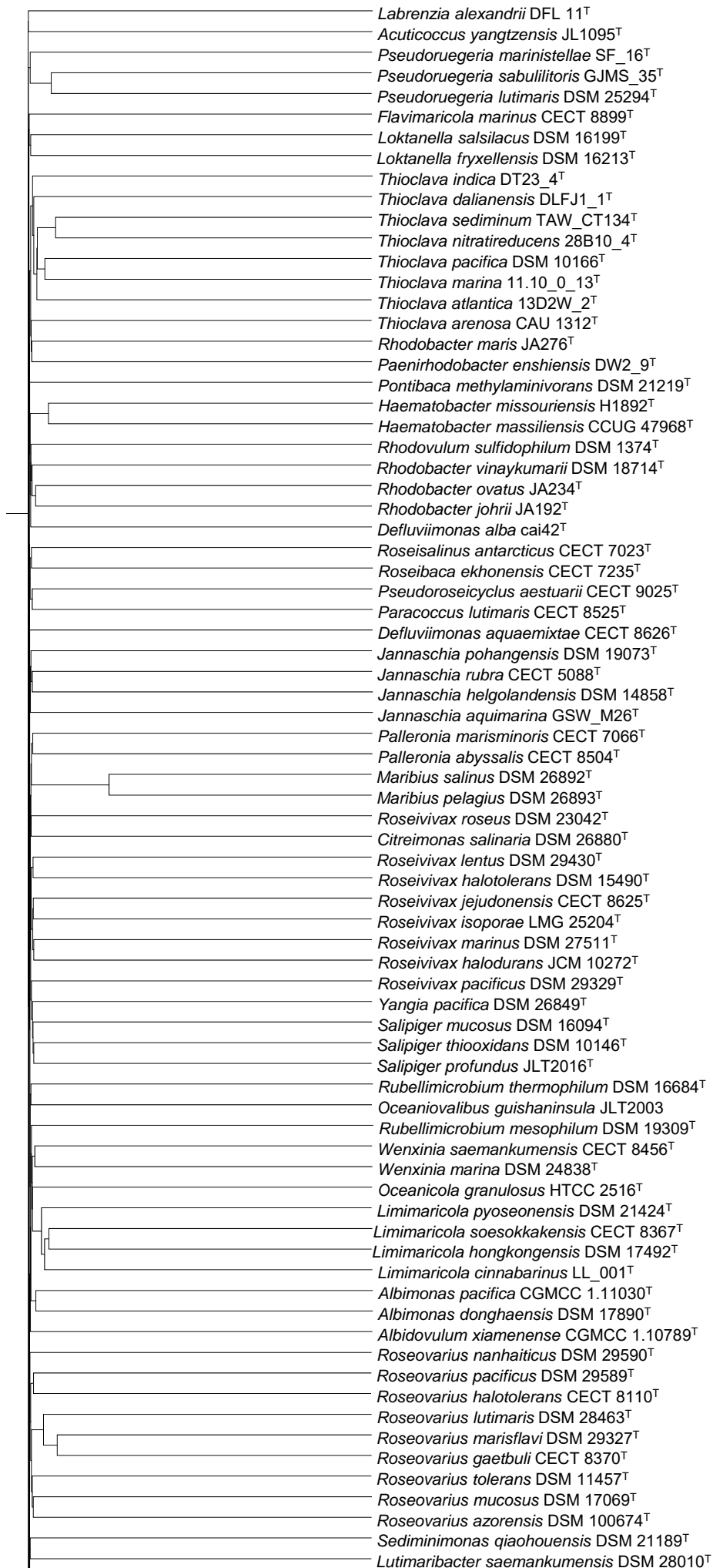




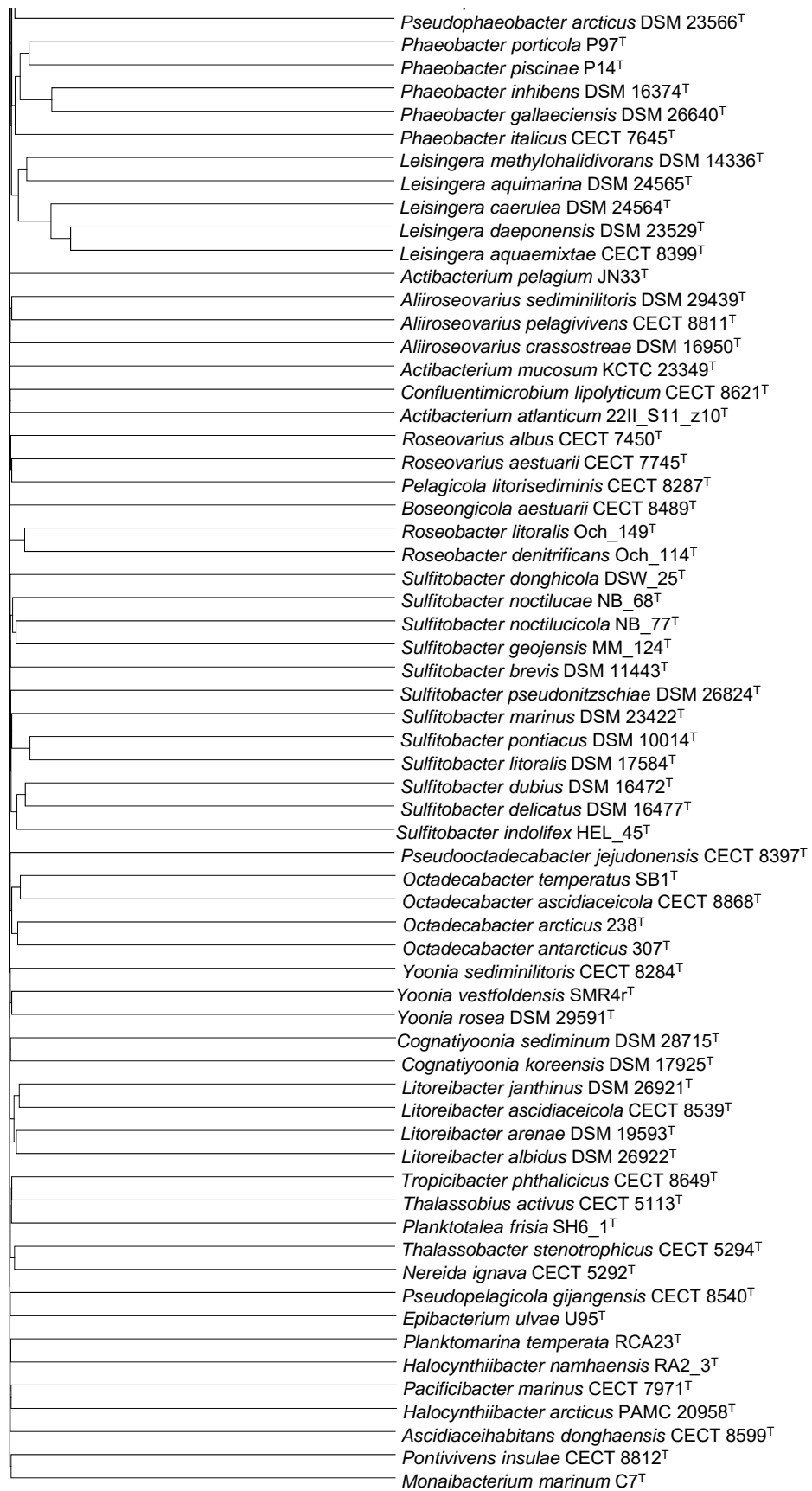


0.050

Figura S4. Árbol filogenómico (mostrado en tres páginas) de *Rhodobacteraceae* generado con la herramienta CTree 3.0 mediante el uso de las secuencias de nucleótidos. Barra, 0.05 sustituciones por posición.

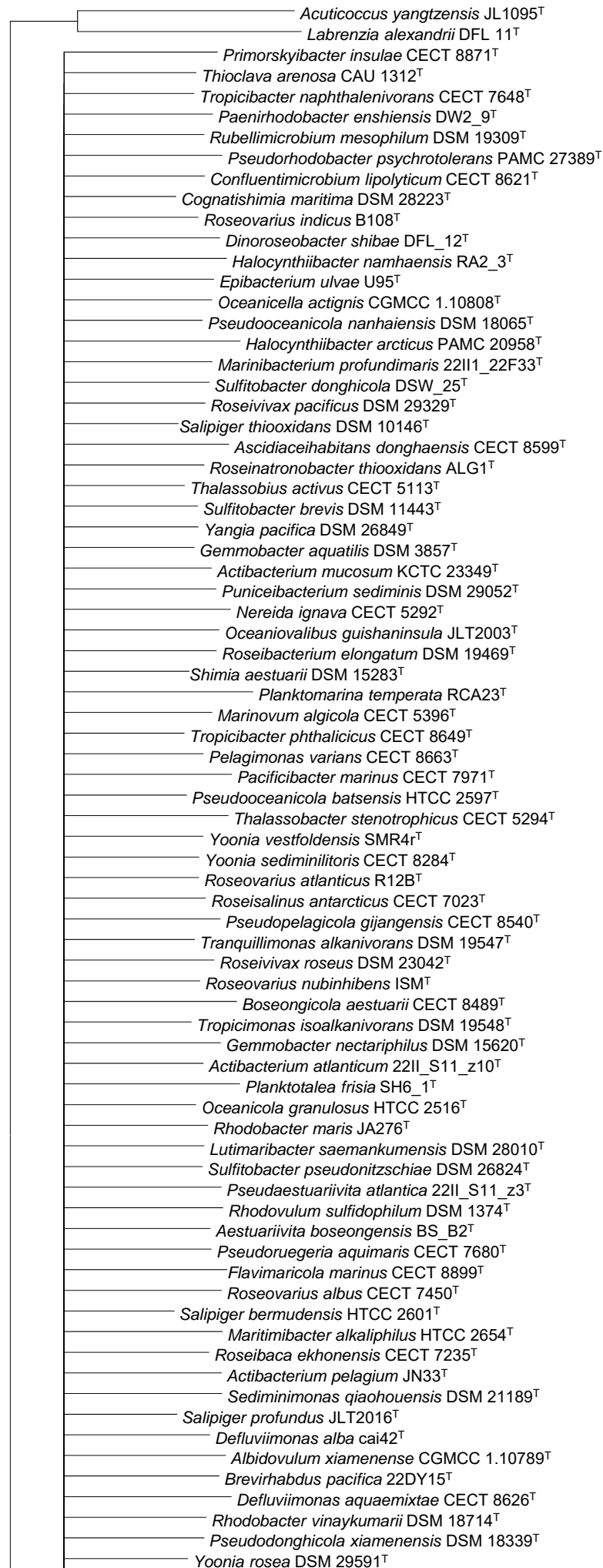


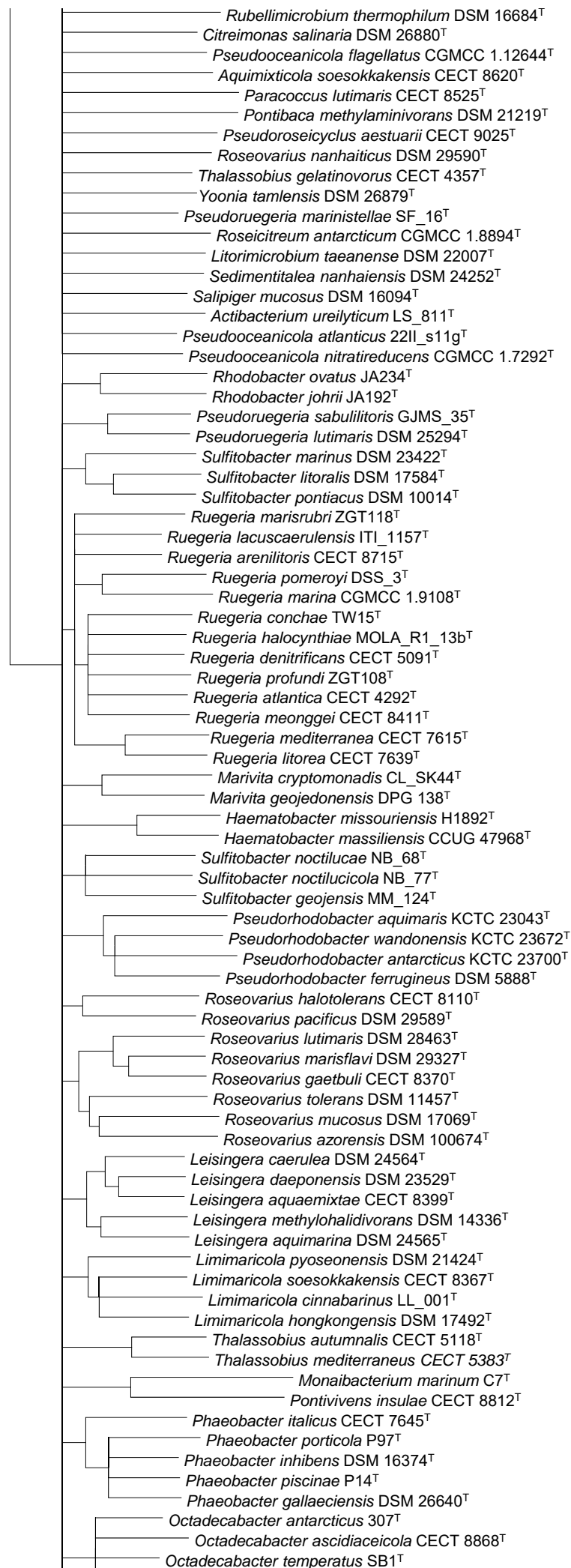
Roseibacterium elongatum DSM 19469^T
Nioella sediminis JS7_11^T
Nioella nitratireducens SSW136^T
Brevirhabdus pacifica 22DY15^T
Pseudodonghicola xiamenensis DSM 18339^T
Yoonia tamlensis DSM 26879^T
Gemmobacter nectarophilus DSM 15620^T
Tranquillimonas alkanivorans DSM 19547^T
Roseovarius indicus B108^T
Roseovarius atlanticus R12B^T
Sedimentitalea nanhaiensis DSM 24252^T
Cognatishimia maritima DSM 28223^T
Oceanicella actignis CGMCC 1.10808^T
Gemmobacter aquatilis DSM 3857^T
Tropicibacter naphthalenivorans CECT 7648^T
Sagittula stellata E_37^T
Mameliella alba CGMCC 1.7290^T
Maliponia aquimaris CECT 8898^T
Antarctobacter heliothermus DSM 11445^T
Pseudoceanicola marinus CECT 7751^T
Pseudoceanicola antarcticus CGMCC 1.12662^T
Pseudoceanicola nitratireducens CGMCC 1.7292^T
Pseudoceanicola batsensis HTCC 2597^T
Pseudoceanicola nanhaiensis DSM 18065^T
Pseudoceanicola atlanticus 22II_s11g^T
Marinibacterium profundimaris 22II1_22F33^T
Roseovarius nubinhibens ISM^T
Marinovum algicola CECT 5396^T
Pseudoruegeria aquimaris CECT 7680^T
Pseudaestuaria atlantica 22II_S11_z3^T
Tropicimonas isoalkanivorans DSM 19548^T
Salpiger bermudensis HTCC 2601^T
Maritimibacter alkaliphilus HTCC 2654^T
Dinoroseobacter shibae DFL_12^T
Actibacterium ureilyticum LS_811^T
Roseinatronobacter thiooxidans ALG1^T
Roseicitreum antarcticum CGMCC 1.8894^T
Pseudorhodobacter psychrotolerans PAMC 27389^T
Pseudorhodobacter aquimaris KCTC 23043^T
Pseudorhodobacter wandonensis KCTC 23672^T
Pseudorhodobacter ferrugineus DSM 5888^T
Pseudorhodobacter antarcticus KCTC 23700^T
Thalassobius gelatinovorans CECT 4357^T
Pelagimonas varians CECT 8663^T
Litorimicrobium taeanense DSM 22007^T
Celeribacter halophilus ZXM137^T
Celeribacter neptunius DSM 26471^T
Celeribacter indicus P73^T
Celeribacter ethanolicus NH195^T
Celeribacter baekdonensis DSM 27375^T
Aquimixticola soesokkakensis CECT 8620^T
Pseudoceanicola flagellatus CGMCC 1.12644^T
Primorskyibacter insulae CECT 8871^T
Puniceibacterium sediminis DSM 29052^T
Marivita geojedonensis DPG 138^T
Marivita cryptomonadis CL_SK44^T
Aestuariaivita boseongensis BS_B2^T
Thalassobius mediterraneus CECT 5383^T
Thalassobius autumnalis CECT 5118^T
Shimia aestuarii DSM 15283^T
Shimia marina CECT 7688^T
Shimia haliotis DSM 28453^T
Ruegeria meonggei CECT 8411^T
Ruegeria halocynthiae MOLA_R1_13b^T
Ruegeria profundus ZGT108^T
Ruegeria denitrificans CECT 5091^T
Ruegeria conchae TW15^T
Ruegeria atlantica CECT 4292^T
Ruegeria mediterranea CECT 7615^T
Ruegeria litorea CECT 7639^T
Ruegeria pomeroyi DSS_3^T
Ruegeria marina CGMCC 1.9108^T
Ruegeria marisrubri ZGT118^T
Ruegeria lacuscaerulensis ITL_1157^T
Ruegeria arenilitoris CECT 8715^T
Epibacterium multivorans CECT 7557^T
Epibacterium mobile F1926^T
Pseudophaeobacter leonis 306^T

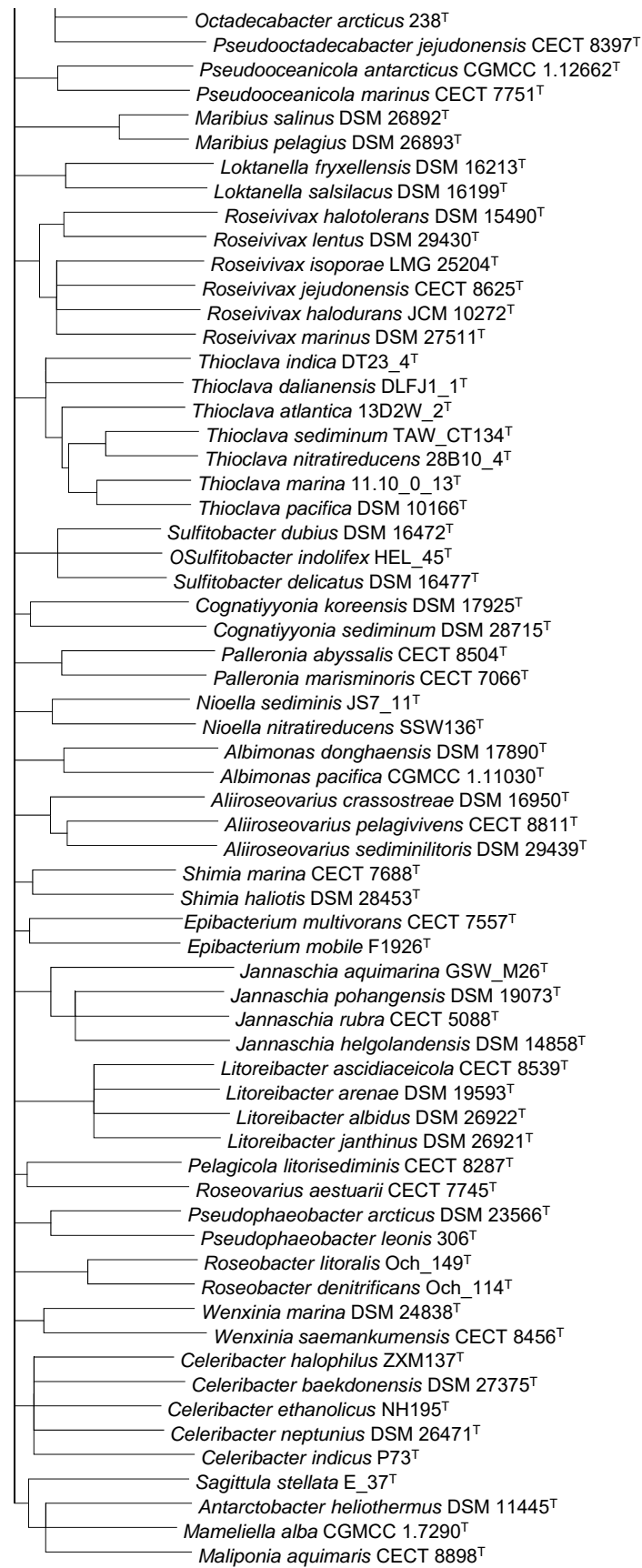


0.050

Figura S5. Árbol filogenómico (mostrado en tres páginas) de consenso mayoritario generado con la herramienta Dendroscope a partir de los cuatro árboles filogenómicos de *Rhodobacteraceae* construidos . Barra, 0.0002 sustituciones por posición.

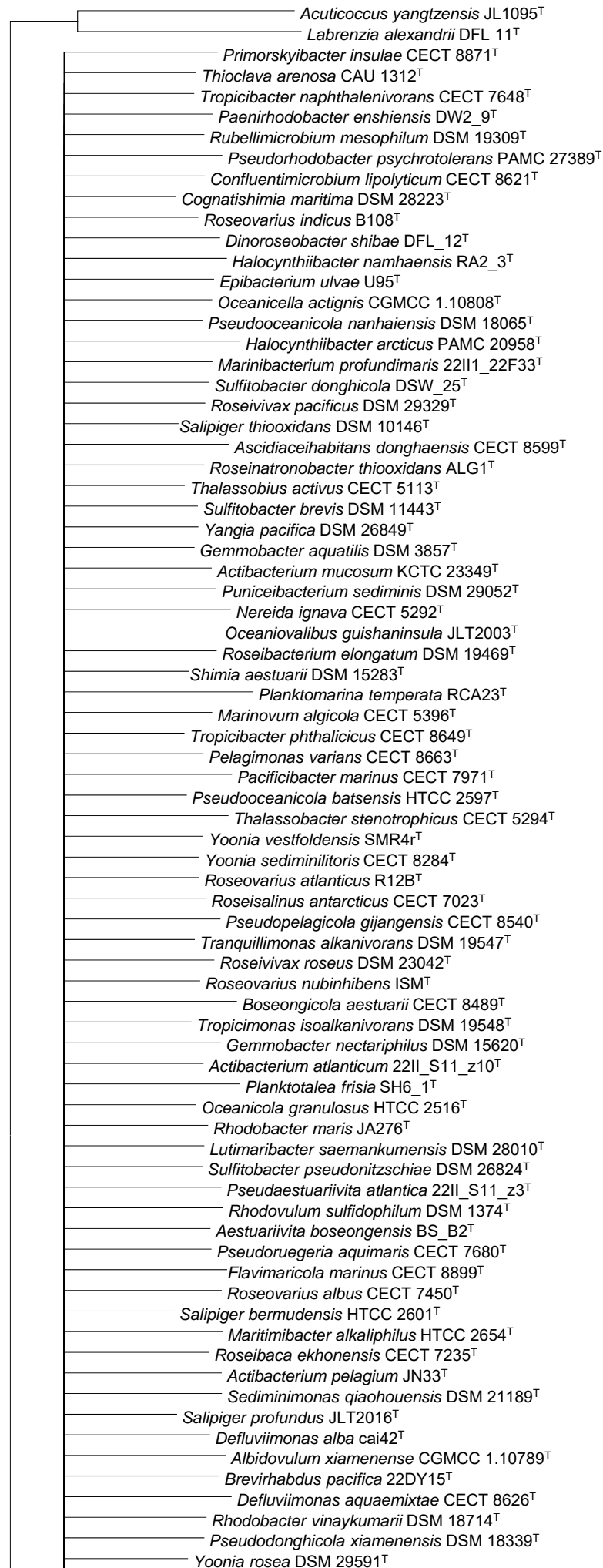


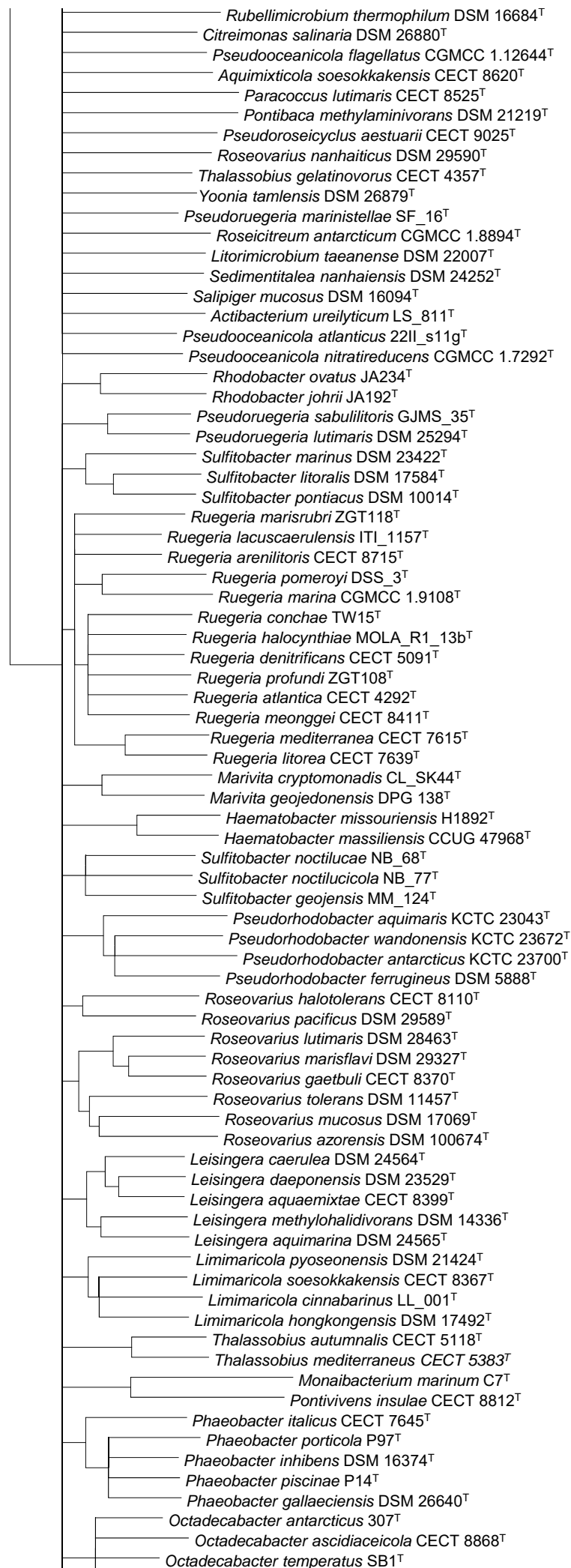


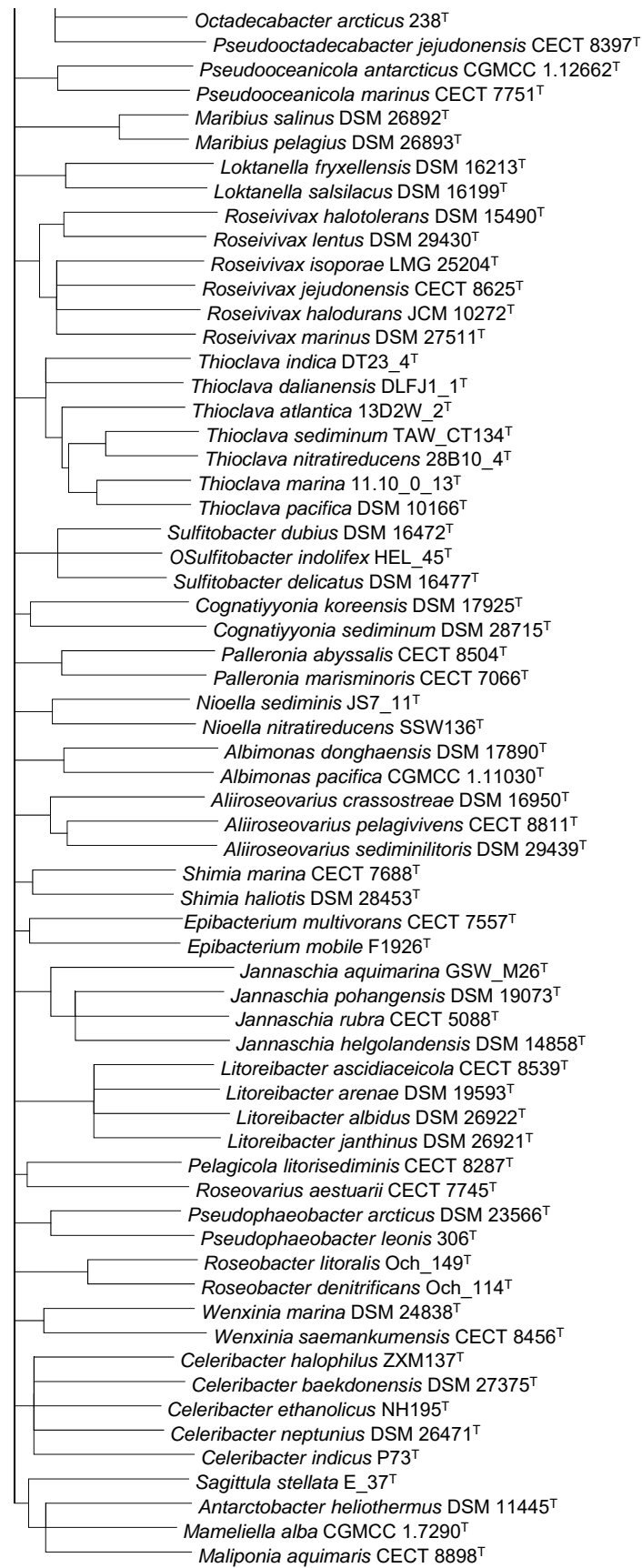


0.00020

Figura S6. Árbol filogenómico (mostrado en tres páginas) de consenso estricto generado con la herramienta Dendroscope a partir de los cuatro árboles filogenómicos de *Rhodobacteraceae* construidos . Barra, 0.0002 sustituciones por posición.







0.00020

