



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA



CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Identificación de bacterias aisladas de ecosistemas glaciares, Andinos y
Antárticos

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Diego Marcelo Palacios Mazón

Tutor: Dr. Carlos Alberto Rodríguez Meza Ph.D

Ambato-Ecuador

Mayo - 2019

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dr. Carlos Alberto Rodríguez Meza Ph.D

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 24 de Abril del 2019



Dr. Carlos Alberto Rodríguez Meza Ph.D

C.I. 180216650-2

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Diego Marcelo Palacios Mazón, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Diego Marcelo Palacios Mazón


C.I. 1804415170

AUTOR


APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.


Para constancia firman:



Presidente del Tribunal



Ing. MSc. Wilson Patricio Orozco Freire
C.I. 1721363008



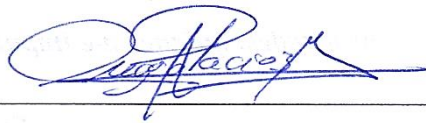
Dra. Mirari Yosune Arancibia Soria Ph.D.
C.I. 1802142461

Ambato, 09 de Mayo del 2019

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Diego Marcelo Palacios Mazón

C.I. 1804415170

AUTOR

DEDICATORIA

Nuestro conocimiento nos ha hecho cínicos.

Nuestra inteligencia, duros y secos.

Pensamos demasiado y sentimos muy poco.

Más que maquinas, necesitamos humanidad.

Más que inteligencia, necesitamos amabilidad y cortesía.

Sin estas cualidades la vida será violenta y todo estará perdido.

The Great Dictator – Charles Chaplin

A Betty, Marcelo, David y Lissette por ser mi apoyo y ánimo incondicional en toda mi vida. Por ustedes, quienes me impulsan e inspiran a ser mejor cada día.

Somos familia, somos un gran equipo.

AGRADECIMIENTOS

El agradecimiento es el primer valor para una vida abundante. Por eso, primero agradezco a Dios, que me regala la vida. Porque por todo lo bueno y lo malo, me ha permitido crecer, aprender y ser una mejor persona cada día.

A mi familia, Betty, Marcelo, David y Lissette por ser ustedes quienes me han cuidado, aconsejado y apoyado incondicionalmente. Especialmente a mis Padres, porque gracias a ustedes he alcanzado esta meta y por ustedes seguiré avanzando día a día. Además, a mis tíos y primos más cercanos por todos sus consejos y enseñanzas.

A mis amigos, Paulo, Ricardo, David, Santiago, Leo, Esteban, Sebas, Ismael y Juan, por su genuina hermandad. Al equipo de tesis, Dr. Carlos, Dianita, Estefy y Mercy, por sus enseñanzas, paciencia y amistad. Además, agradezco especialmente a Belencita por brindarme su amistad, cariño y compañerismo, porque gracias a todo el apoyo mutuo, logramos alcanzar esta meta.

ÍNDICE GENERAL

A. PAGINAS PRELIMINARES

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR.....	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv

B. CONTENIDO

CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Antecedentes investigativos.....	1
1.1.1 Generalidades de las bacterias.....	1
1.1.1.1 Diversidad bacteriana en ecosistemas glaciares y andinos	2
1.1.1.1.1 Los glaciares de la Antártida y de los Andes	3
1.1.2 Métodos de caracterización.....	4
1.1.2.1 Caracterización fenotípica.....	4
1.1.2.2 Caracterización genotípica	5
1.1.2.2.1 Genetic fingerprinting o huellas genéticas	5
1.1.2.2.1.1 rep-PCR.....	6
1.1.2.3 Secuenciación de ADNr 16S.....	6
1.1.2.3.1 Taxonomía polifásica	7
1.1.2.3.2 Construcción de Arboles Filogenéticos.....	9
1.1.2.3.3 Importancia biotecnológica de bacterias proveniente de ecosistemas fríos.	9
1.2 Objetivos	11
1.2.1 Objetivo general	11
1.2.2 Objetivos específicos.....	11
CAPÍTULO II METODOLOGÍA	12
2.1 Origen de material microbiano	12
2.2 Caracterización Molecular	12
2.2.1 Evaluación de calidad del ADN genómico	12

2.2.1.1	Extracción de ADN por el método de fenol cloroformo.....	14
2.2.2	Amplificación de patrones huella genéticas mediante rep-PCR.....	15
2.2.2.1	Taxonomía numérica de patrones de fingerprinting.....	16
2.2.3	Secuenciación del gen del ADNr 16S y análisis filogenético.....	16
2.2.4	Análisis de taxonomía polifásica.....	17
2.3	Caracterización fenotípica.....	17
2.3.1	Caracterización macroscópica	17
2.3.2	Caracterización microscópica	18
2.3.3	Pruebas fisiológicas de crecimiento en bacterias.....	19
2.3.3.1	Determinación del rango de crecimiento en función de la temperatura...19	
2.3.3.2	Determinación del rango de crecimiento en función del pH.....	20
2.3.3.3	Determinación del rango de crecimiento en función de la salinidad.....	21
2.3.3.4	Determinación de la utilización de aminoácidos como fuente única de carbono y nitrógeno	21
2.3.3.5	Determinación de la utilización de aminoácidos como fuente única de nitrógeno.	22
2.3.4	Taxonomía numérica de datos fenotípicos	22
2.4	Hipótesis.....	22
2.4.1.1	Hipótesis nula	22
2.4.1.2	Hipótesis alternativa	22
2.4.2	Señalamiento de variables	23
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		24
3.1	Caracterización molecular.....	24
3.1.1	Evaluación de ADN genómico.....	24
3.1.2	Amplificación de patrones de fingerprinting mediante rep-PCR.....	24
3.1.2.1	Taxonomía numérica de datos basado en patrones de fingerprinting con el primer BOX.....	25
3.1.3	Análisis filogenético del gen del ADNr 16S.....	27
3.1.3.1	Identificación molecular usando el gen del ADNr 16S.....	31
3.1.4	Caracterización fenotípica.....	33
3.1.4.1	Pruebas fisiológicas de crecimiento en bacterias	35
3.1.5	Taxonomía numérica de datos fenotípicos.....	38
3.2	Discusión general del trabajo	40
3.3	Verificación de la hipótesis	42
3.3.1	Hipótesis nula.....	42

3.3.2	Hipótesis alternativa	42
CAPÍTULO IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		43
4.1	Conclusiones	43
4.2	Recomendaciones.....	44
 C. MATERIALES DE REFERENCIA		
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		45
ANEXOS		57
	Anexo A. Datos y resultados	57
	Anexo B. Preparación de soluciones y medios de cultivo.....	84
	Anexo C. Tabla de colores, British Standard specification of colors for identification coding and special purposes.....	86
	Anexo D. Figuras y fotografías	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de evaluación de calidad de ADN genómico.....	13
Tabla 2. Protocolo de programación de termociclador para técnica de rep-PCR, usando el primer BOX.	15
Tabla 3. Clasificación de microorganismos acorde al rango de crecimiento en función de la temperatura.....	20
Tabla 4. Clasificación de microorganismos acorde al rango de crecimiento en función del pH.....	20
Tabla 5. Clasificación de microorganismos acorde al rango de crecimiento en función de la salinidad	21
Tabla 6. Grupos obtenidos a partir del dendrograma de patrones de fingerprinting usando el primer BOX	25
Tabla 7. Grupos formados a partir del dendrograma fenotípico de bacterias identificadas molecularmente	33
Tabla 8. Caracterización macroscópica de la colección de bacterias.....	34
Tabla 9. Caracterización microscópica de la colección de bacterias	35
Tabla 10. Caracterización de la colección de bacterias en función a las pruebas fisiológicas de crecimiento	36
Tabla 11. Utilización de aminoácidos como fuente única de carbono y nitrógeno y fuente única de nitrógeno.....	37
Tabla 12. Grupos fenéticos obtenidos a partir del dendrograma de taxonomía numérica.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Caracterización morfológica de bacterias de acuerdo su forma, elevación y margen	18
Figura 2. Diferentes agrupaciones y variaciones de bacilos y cocos.	19
Figura 3. Patrones de fingerprinting obtenidos por rep-PCR usando el primer BOX	24
Figura 4. Dendrograma de patrones de fingerprinting, construido mediante el coeficiente lineal de Pearson y el algoritmo UPGMA	26
Figura 5. Árbol filogenético de cepas bacterianas aisladas de ecosistemas glaciares, andinos y antárticos.	28
Figura 6. Dendrograma fenotípico de bacterias identificadas molecularmente usando el gen del ADNr 16S, construido mediante el coeficiente lineal de Pearson y el algoritmo UPGMA.	32
Figura 7. Dendrograma de datos fenotípicos construido mediante el coeficiente S_{SM} y el algoritmo UPGMA, con corte al 84,6% de similitud	39

RESUMEN

Se identificaron bacterias aisladas de ecosistemas glaciares, Andinos y Antárticos. Mediante rep-PCR usando el primer BOX, se logró caracterizar genotípicamente 72 cepas y se construyó un dendrograma por taxonomía numérica, usando el coeficiente de Pearson y el algoritmo de UPGMA, obteniendo la formación de 10 grupos. A partir de estos, fueron seleccionados representantes para el secuenciamiento del gen del ADNr 16S y caracterización fenotípica.

El análisis filogenético del gen del ADNr 16S se realizó mediante el cálculo de las distancias evolutivas de Jukes & Cantor y el algoritmo de Neighbour-Joining, permitiendo identificar 11 especies distintas. De las cuales, las cepas DG-222 y DG-203 probablemente pertenezcan a especies nuevas. Sin embargo, es necesario realizar estudios posteriores para demostrar esto.

Mediante la caracterización fenotípica se construyó un dendrograma de taxonomía numérica de datos fenotípicos utilizando el coeficiente S_{SM} y el algoritmo UPGMA, obteniendo la formación de 21 grupos fenéticos al 84,6% de similitud. La mayor parte de la colección se determinó como Gram negativa, psicrótrofa, neutrotolerante, halófila débil o halófila. Además, se descubrió nuevas características fisiológicas de 4 especies distintas.

El análisis de taxonomía polifásica con las cepas que tuvieron patrones de fingerprinting similares a las especies identificadas, logró ubicar 35 cepas en función a la caracterización molecular. Formando 16 grupos fenéticos al 90% de similaridad y determinando la posición taxonómica polifásica del 48,6% de la colección. Probablemente, la diversidad de la colección se encuentra subestimada y podrían existir especies que no se han identificado en este estudio. Es necesario realizar un segundo análisis de las cepas que fueron excluidas en los análisis.

Palabras clave: Bacteria, rep-PCR, gen del ADNr16S, taxonomía numérica, taxonomía polifásica.

ABSTRACT

Bacteria isolated from glacial, Andean and Antarctic ecosystems were identified. By rep-PCR using the BOX primer, 72 strains were genotypically characterized and a dendrogram was constructed by numerical taxonomy, using the Pearson coefficient and the UPGMA algorithm, obtaining the formation of 10 groups. From these, representatives were selected for the sequencing of the 16S rDNA gene and phenotypic characterization.

The phylogenetic analysis of the 16S rDNA gene was performed by calculating the evolutionary distances of Jukes & Cantor and the Neighbor-Joining algorithm, allowing the identification of 11 different species. Of which, strains DG-222 and DG-203 probably belong to new species. However, further studies are necessary to demonstrate this.

Through the phenotypic characterization, a dendrogram of numerical taxonomy of phenotypic data was constructed using the SSM coefficient and the UPGMA algorithm, obtaining the formation of 21 phenetic groups with 84,6% similarity. Most of the collection was determined as Gram negative, psychrotroph, neutrotolerant, weak halophilic or halophilic. In addition, new physiological characteristics of 4 different species were discovered.

The analysis of polyphasic taxonomy with the strains that had fingerprinting patterns similar to the identified species, managed to locate 35 strains according to the molecular characterization. Forming 16 phenetic groups at 90% similarity and determining the polyphase taxonomic position of 48,6% of the collection. Probably, the diversity of the collection is underestimated and there could be species that have not been identified in this study. It is necessary to carry out a second analysis of the strains that were excluded in the analyzes.

Key words: Bacteria, rep-PCR, 16S rDNA gene, numerical taxonomy, polyphasic taxonomy.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

1.1.1 Generalidades de las bacterias

Desde el punto de vista filogenético, existen los dominios *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya*. Los dos primeros representados por células procariotes y el último por células eucariotes (**Singh & Satyanarayana, 2017**). Las células procariotes tienen una estructura interna simple, carentes de orgánulos. En cambio, las células eucariotes por lo general son de mayor tamaño y de estructura más compleja (**Gerardi & Zimmerman, 2005**). Aunque las células procariotes comparten los dominios *Archaea* y *Bacteria*, estas se diferencian notablemente entre sí por su historia evolutiva. Debido a que, se evidencia en las diferencias fenotípicas y genotípicas, que caracterizan a cada uno de los grupos (**Madigan, Martinko, & Parker, 2004**), especialmente aspectos asociados a mecanismos de transcripción y traslación, en la síntesis de proteínas (**Waites, Morgan, Rockey, & Highton, 2001**).

El dominio *Bacteria* contiene una gran diversidad de procariotes, reflejada en términos de tamaño y morfología, adaptación a ambientes extremos, estrategias de supervivencia y metabolismo. El *phylum* Proteobacteria constituye la división más amplia de este dominio porque contiene 384 géneros y alrededor de 1300 especies (**Madigan et al., 2004**). Esta diversidad les ha permitido crecer en múltiples ambientes como los géiseres del Parque Nacional de Yellowstone, donde se alcanzan temperaturas de 65°C, o los Valles Secos de la Antártida a temperaturas de -20°C (**Maloy & Kolter, 2012**). Pueden existir en ambientes con un amplio rango de pH entre 1 a 13 u osmolaridad entre 100-150 g/L de sal. Estas condiciones son posibles de encontrar en estanques salinos, lagos hipersalinos naturales o los entornos de los drenajes ácidos de minas (**Bakermans, 2015**). Además, tienen la capacidad de crecer en medios nutricionalmente ricos que contienen principalmente glucosa, almidones y ciertos polisacáridos o en aquellos con muy pocos nutrientes como agar agua de llave (**Allison & Gilbert, 2007**).

Las bacterias son microorganismos unicelulares que pueden presentar formas de bacilos, cocos o espirilos, con tamaños de células que varían entre 0,1 a 15 µm. Pueden encontrarse en agua, cuerpos vivos de plantas y animales, materia orgánica y suelo (DeBaldo, 2005). El mecanismo principal de reproducción es asexual, generalmente por fisión binaria y pueden encontrarse como células individuales o formando agrupaciones específicas (Gerardi & Zimmerman, 2005).

Las bacterias pueden ser clasificadas de acuerdo con criterios fenotípicos basados en habilidades fisiológicas, características macroscópicas y microscópicas (Sengun & Karabiyikli, 2011) o criterios genotípicos basado en el ADN y ARN (Madigan et al., 2004). Sin embargo, la clasificación que más podría acercarse a la realidad es aquella que combina los dos tipos de datos, es decir mediante taxonomía polifásica (Gillis, Vandamme, Vos, Swings, & Kersters, 2015).

La clasificación más conocida se basa en los requerimientos nutricionales, la cual agrupa a las bacterias en autótrofos, parasitarios y saprófitos (Gerardi & Zimmerman, 2005). Una técnica tradicional que generalmente es uno de los primeros datos a obtener, está relacionado a la tinción de Gram, donde las bacterias se dividen en dos grandes grupos, Gram positivas y Gram negativas. Esta técnica permite identificar diferencias en la composición química de la pared celular (Wassenaar, 2012). Las bacterias Gram positivas contienen entre 60% a 80% de peptidoglicano, y en general suelen tener un espesor aproximado entre 20 y 80 nm. Mientras que, las bacterias Gram negativas contienen entre 10% a 20% de peptidoglicano junto con una membrana externa compuesta principalmente por fosfolípidos, lipoproteínas y lipopolisacáridos, que permiten la formación de una pared de alrededor de 12 a 15 nm de espesor (Allison & Gilbert, 2007).

1.1.1.1 Diversidad bacteriana en ecosistemas glaciares y andinos

Los ambientes helados han aparecido a lo largo de la historia de la Tierra y actualmente se localizan desde las profundidades del mar hasta las regiones montañosas y polares en altas latitudes y grandes altitudes (D'Amico, Collins, Marx, Feller, & Gerday, 2006). Estos ambientes albergan una gama de microbios especializados, asociados a glaciares, lagos cubiertos de hielo, profundidades oceánicas, suelos minerales secos y ornitogénicos (Cowan & Tow, 2004; Neifar, Maktouf, Ghorbel, Jaouani, & Cherif,

2015). Además, las comunidades microbianas desempeñan un papel importante en entornos helados al mediar ciclos biogeoquímicos (**Bakermans, 2015**).

1.1.1.1.1 Los glaciares de la Antártida y de los Andes

La Antártida es uno de los continentes de condiciones ambientales y climáticas más duros de la Tierra. La baja humedad atmosférica, temperaturas extremadamente bajas, poca disponibilidad de agua líquida, además de extensos periodos de radiación solar y absoluta oscuridad, contribuye a que sea un lugar inhóspito para el desarrollo de comunidades biológicas (**Cowan & Tow, 2004**). Sin embargo las bacterias colonizan estos ambientes en todo el continente (**Whyte & Miller, 2012**), gracias a que su metabolismo evolucionó para que la temperatura baja y otros factores extremos no sean un impedimento para su desarrollo y reproducción (**Goo, Tsuda, & Ulanova, 2014**), mediante estrategias como la producción de compuestos antimicrobianos, enzimas activas al frío y producción de proteínas anticongelantes (**Singh, Singh, & Roy, 2016**).

El metabolismo y las capacidades adaptativas de las bacterias que crecen en ambientes de baja temperatura, como el de las regiones polares, han sido una fuente para el desarrollo de diversos estudios que ha llevado al descubrimiento de una gran diversidad bacteriana. Como el aislamiento, clasificación e identificación de bacterias procedentes de muestras de suelo de la isla Greenwich y Dee (**Garzón & Rodríguez, 2013; Navas & Rodríguez, 2016**) o el aislamiento de microbios a partir de sedimentos marítimos de la isla de Bratina (**Sjöling & Cowan, 2003**). Además, se ha aislado cepas microbianas a partir de muestras de suelos litogénicos de la Isla King George, donde más del 60% de la población fueron determinadas como bacterias psicrotolerantes (**Zdanowski & Węgleński, 2001**). Otro estudio similar es, la caracterización genotípica del gen del ARNr 16S y polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de bacterias provenientes del Mar de Ross. Revelando que los grupos de bacterias más representativo fueron los pertenecientes a *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroides* y varias especies de cianobacterias (**Aislabie, Jordan, & Barker, 2008**).

También se ha desarrollado diversos estudios a partir de muestras de suelo provenientes de regiones montañosas y zonas volcánicas. Por ejemplo, investigaciones

se han centrado en caracterizar bacterias provenientes de los volcanes Cotopaxi y Chimborazo, mediante cultivo *in vitro* (Díaz, Estrada, & Rodríguez, 2018). Mientras que, otros estudios han logrado aislar bacterias a partir de ambientes de los Alpes occidentales y orientales en Europa, donde el 77% de las cepas fueron bacterias psicrófilas con capacidad de producción de enzimas extracelulares (Schinner, Margesin, & Pümpel, 1992). Por otro lado, se determinó bacterias psicrófilas del género *Deinococcus* a partir de muestras de suelo de entornos alpinos provenientes del Monte Evans, EE.UU. y Pico de Orizaba, México (Callegan et al., 2008).

1.1.2 Métodos de caracterización

Luego del aislamiento y purificación de cepas bacterianas, se debe realizar procesos de identificación para determinar las relaciones filogenéticas y el posible camino de evolución de los microbios. Para alcanzar éste objetivo, es necesario caracterizar fenotípica y genotípicamente los cultivos aislados, abarcando así tres áreas que se interrelacionan entre sí: clasificación, identificación y nomenclatura (Gillis et al., 2015).

1.1.2.1 Caracterización fenotípica

Los fenotipos de crecimiento son características observables en las células que brinda información útil y adecuada en taxonomía clásica (Donelli, Vuotto, & Mastromarino, 2013) y están directamente involucrados en la evolución del genoma celular (Bochner, 2009). Las características fenotípicas son datos obtenidos por todos los métodos de tipado que no se basan en el ADN o ARN, como características bioquímicas, fisiológicas, y morfológicas (Donelli et al., 2013). Los análisis fisiológicos proporcionan información sobre características físicas y químicas, que influyen en el crecimiento microbiano como concentración de sal, requerimientos nutricionales, requerimiento de oxígeno, temperatura de crecimiento y pH del medio (Bochner, 2009). Los datos morfológicos se obtienen mediante caracterizaciones macroscópicas y microscópicas. La caracterización macroscópica en placas de agar determina el color, borde de las colonias, dimensión y forma. Mientras que, la caracterización microscópica determina la forma celular, los flagelos, organelos de inclusión y estructuras de resistencia (Yang, Cao, Cai, & Terada, 2010).

El conjunto de todas las pruebas fenotípicas son una fuente importante de datos para una descripción preliminar de taxones, desde especies hasta género y familia (**Donelli et al., 2013**). Por ejemplo, se ha determinado la caracterización morfológica, fisiológica y enzimática de bacterias aisladas en agar nutriente (**Zdanowski & Węgleński, 2001**). Además, se caracterizaron cepas bacterianas del género *Acinetobacter* aisladas a partir de muestras acuáticas (**Guardabassi, Dalsgaard, & Olsen, 2001**), y bacterias del género *Arthrobacter* a partir de suelos antárticos (**Dsouza, Taylor, Turner, & Aislabie, 2015**).

1.1.2.2 Caracterización genotípica

Si bien, la caracterización fenotípica brinda información invaluable para determinar la diversidad microbiana, está basada en metodologías que tienen un enfoque muy subjetivo en la interpretación. A diferencia de la caracterización genotípica, que se enfoca en el ADN y ARN, siendo más sensible y confiable (**Donelli et al., 2013**). Sin embargo, se necesita la combinación de los dos enfoques para obtener información de mayor precisión (**Michaud et al., 2004**).

Las técnicas moleculares actualmente disponibles, proporcionan una contribución importante para identificar y clasificar los microorganismos en función de sus características genotípicas (**Donelli et al., 2013**). Se han desarrollado varias técnicas moleculares que permiten describir la diversidad microbiana tales como, clonación y secuenciación, huellas genéticas y técnicas de hibridación (**Fierro Fierro & Vergara Onofre, 2012**). El método de hibridación ADN-ADN permite la estimación de la proporción de nucleótidos de guanina y citosina (G+C% mol) para determinar el porcentaje de similaridad de ADN entre dos cepas muy cercanas de bacterias (**Johnson & Ordal, 1968**). Sin embargo, se requiere de un valor de hibridación de ADN-ADN mayor al 70%, así como características fenotípicas compartidas, para asignar dos bacterias a la misma especie (**Stackebrandt & Ebers, 2006**).

1.1.2.2.1 Genetic fingerprinting o huellas genéticas

En 1991 fue descrito el sistema universal de huellas genéticas o genetic fingerprinting (**Versalovic, Koeuth, & Lupski, 1991**). Ésta técnica molecular permite obtener un patrón de bandas, el cual es característico de cada grupo microbiano y dependiendo

del tipo de primer utilizado, se puede lograr discernir hasta el nivel taxonómico de especie (**Fierro Fierro & Vergara Onofre, 2012**). La obtención de estos patrones se realiza por amplificación de los fragmentos de ADN mediante PCR, que se visualiza por electroforesis.

1.1.2.2.1.1 rep-PCR

La rep-PCR utiliza primers de oligonucleótidos complementarios a secuencias repetitivas en el genoma de la bacteria (**Versalovic et al., 1991**) y se han descrito 4 tipos de secuencias conservadas repetitivas que son REP, ERIC, BOX y GTG (**Versalovic, Schneider, De Bruijn, & Lupski, 1994**).

Las secuencias conservadas intergénicas BOX están ubicados dentro de las regiones no codificantes de las bacterias (**van Belkum & Hermans, 2001**). Son elementos repetitivos en mosaico compuesto por tres secuencias de subunidades, boxA, boxB y boxC, con una longitud de 59, 49 y 50 pb respectivamente (**Martin et al., 1992**).

Varios estudios se han centrado en ésta técnica por ser catalogado como un sistema universal, adecuado para la agrupación de cepas bacterianas y reconstrucción de la filogenia (**Isaeva, Kulikov, Tarasyan, & Letarov, 2010**). Por ejemplo, mediante BOX-PCR y ERIC-PCR se han caracterizado cepas de *Leptospira* patógena en Sarawak, Malasia (**Bilung, Pui, Su'ut, & Apun, 2018**). Además, se caracterizó la estructura genómica de bacterias del género *Pseudoalteromonas* (**Ivanova et al., 2002**). Por otra parte, se evaluó la técnica de BOX-PCR para la discriminación de cepas de *Aeromonas* (**Tacão, Alves, Saavedra, & Correia, 2005**), y se amplificó el ADN genómico de cepas de *Pseudomonas* mediante BOX-PCR, sobresaliendo esta técnica, como la única que permitió identificar cepas bacterianas a nivel de especie (**Marques, Marchaisson, Gardan, & Samson, 2008**).

1.1.2.3 Secuenciación de ADNr 16S

Las primeras técnicas para secuenciar el ADN se desarrollaron en los años 70's por Sanger, Gilbert y Maxam. Posteriormente, Sanger desarrolló un nuevo método que constituye la base del secuenciamiento del ADN al día de hoy (**Brenner, Miller, & Broughton, 2002**). En la actualidad, es una de las técnicas más utilizadas en estudios

de especies, poblaciones y comunidades microbianas (**Fierro Fierro & Vergara Onofre, 2012**). La secuenciación comienza con la amplificación por PCR de un gen específico en el ADN, en regiones genéticas altamente conservadas, seguido de reacciones de secuenciación con los productos de PCR (**Olive & Bean, 1999**).

Los genes que codifican el ARNr, han mostrado ser útiles para establecer relaciones filogenéticas debido a su alto contenido de información, distribución universal, naturaleza conservadora y se encuentran presentes en todos los procariotes y eucariotes (**Lane et al., 1985**). La caracterización genotípica basado en el ADNr 16S permite la identificación de bacterias específicas, debido a la distribución de este gen entre las bacterias y la presencia de varias regiones variables especiales (**Cheng, Sun, Zheng, Wu, & Rui, 2014**). Además, la secuenciación del ADNr 16S se considera la columna vertebral de la taxonomía bacteriana (**Benga et al., 2014**), debido a que ha permitido crear sistemas taxonómicos jerárquicos (**Kämpfer & Glaeser, 2012**).

La caracterización de bacterias mediante la secuenciación del ADN que codifica el ARNr 16S se ha descrito en varios estudios. Por ejemplo, se identificó la diversidad bacteriana de muestras de sedimentos de la isla de Bratina, Antártida, mediante amplificación y secuenciación del gen ADNr 16s (**Sjöling & Cowan, 2003**). Mientras que, en otro estudio se evaluó la capacidad del ADNr 16S para identificar bacterias (**Cheng et al., 2014**). Mediante el secuenciamiento del ADNr 16S se identificaron alfa-, beta- proteobacterias, actinomicetes (**Jouzel et al., 1999**) y bacterias de los géneros *Cytophaga*, *Flavobacterium* y *Bacteroides* (**Christner, Mosley-Thompson, Thompson, & Reeve, 2001**).

1.1.2.3.1 Taxonomía polifásica

La taxonomía se considera como un sinónimo de sistemática (**Vandamme et al., 1996**). Es un área de las ciencias biológicas que comprende tres disciplinas distintas, pero altamente interrelacionadas, que incluyen clasificación, identificación y nomenclatura (**Bisen, 2014**). La clasificación es la organización de los organismos en grupos o taxones según sus rasgos morfológicos, fisiológicos y genéticos similares (**Bisen, 2014**). La nomenclatura es la denominación de los microorganismos de acuerdo con reglas y pautas establecidas en 1987 (**Moore et al., 1987**) y actualizadas en 2002 (**Garrity et al., 2002**). Mientras que, la identificación es el proceso de

determinar si un organismo pertenece a una de las unidades de clasificación y etiquetarla según su nomenclatura (**Vandamme et al., 1996**).

La taxonomía basada en el fenotipo o taxonomía numérica fue uno de los primeros sistemas de clasificación objetiva (**Thompson et al., 2013**). La cual, utiliza agrupaciones por similitud de los miembros con respecto a diversos criterios, que son valorados por código binario. Mediante el uso softwares y el cálculo por diferentes coeficientes de similitud como Jaccard, Pearson o simple similaridad (S_{SM}) se obtendrán valores entre 1 y 0, donde $S=1$ significa 100% de similitud y $S \leq 0,02$ significa falta de relación completa. Estos resultados son utilizados para la construcción de dendrogramas mediante el método de grupo de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA) (**Sokal, 1963**).

Sin embargo, este sistema de clasificación produjo una gran multiplicación de nuevas especies, debido a la utilización de pocas características para describir nuevos taxones, además, es muy subjetivo a la interpretación (**Thompson et al., 2013**). Posteriormente, se desarrolló la hibridación ADN-ADN como estándar de oro para la determinación de especies y la introducción de la taxonomía polifásica (**Zhu, Delmont, Vogel, & Bromberg, 2015**). Gracias a estas metodologías, se realizaron revisiones completas de las especies reconocidas y se incluyeron en listas aprobadas de nombres bacterianos de acuerdo a reglas y pautas establecidas (**Garrity et al., 2002; Moore et al., 1987**).

En 1970 se introdujo el término taxonomía polifásica, el cual comprende niveles de información, desde molecular a ecológico, mediante la combinación de métodos fenotípicos basados en habilidades fisiológicas, quimiotaxonómicas, morfológicas (**Sengun & Karabiyikli, 2011**) y análisis genotípicos basados en el ADN y el ARN (**Q. Wang, Garrity, Tiedje, & Cole, 2007**), para producir una taxonomía multidimensional (**Colwell, 1970**). Cuyo objetivo es utilizar todos los datos disponibles para delinear grupos consenso (**Gillis et al., 2015**), con el fin de deducir relaciones filogenéticas y evolutivas entre bacterias, arqueas u organismos eucariotes (**Weisburg, Barns, Pelletier, & Lane, 1991**).

El concepto más aceptado y útil de especie según **Rosselló-Mora & Amann (2001)** es “Un grupo de organismos individuales monofilético y genómicamente coherente

que muestran un alto grado de similitud general en muchas características independientes, y es diagnosticable por una propiedad fenotípica discriminativa”(p59).

1.1.2.3.2 Construcción de Árboles Filogenéticos

La geometría algebraica es la base para la construcción de árboles filogenéticos. Su objetivo es traducir los conocimientos en nuevas herramientas para resolver problemas de la filogenia, mediante el uso de la estadística (**Bocci, 2007**). Estas herramientas se basan en el cálculo de los generadores del ideal de la variedad algebraica, asociada a un modelo evolutivo estadístico en un árbol filogenético T (**Casanellas & Fernández-Sánchez, 2008**). Los modelos evolutivos estadísticos más estudiados son el modelo general de Markov (**Allman & Rhodes, 2008**), el de Kimura (**Casanellas & Fernández-Sánchez, 2008**) y de Jukes-Cantor (**Jukes & Cantor, 1969**).

1.1.2.3.3 Importancia biotecnológica de bacterias proveniente de ecosistemas fríos.

Las metodologías antes mencionadas, permiten determinar la diversidad microbiológica presente en diferentes ecosistemas, como un paso inicial hacia la descripción de especies y el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas. Por otro lado, pretende generar soluciones ante diferentes problemas como el apareamiento de cepas resistentes a biocidas y antimicrobianos, la contaminación ambiental o la disminución de los recursos no renovables, entre otros (**Babalola, 2010**).

Mientras que, el crecimiento de la mayoría de los microorganismos se detiene o al menos se inhibe severamente a temperaturas bajas, los psicrófilos se desarrollan a estas temperaturas (**Margesin & Feller, 2010**). Estas son de interés, no solo porque contribuyen en la transformación del azufre, carbono orgánico, compuestos nitrogenados, metales (**Sjöling & Cowan, 2003**), o en las redes tróficas polares terrestres y acuáticas (**Junge, Christner, & Staley, 2011**). Sino también, por sus mecanismos biológicos de adaptación y tolerancia a ambientes extremos (**Sjöling & Cowan, 2003**). Siendo capaces de generar compuestos bioactivos como antibióticos, crioprotectores, enzimas activas a temperaturas bajas y proteínas anticongelantes (**Margesin, 2007; Neifar et al., 2015**).

En la agricultura es común utilizar rizobacterias promotoras del crecimiento, que mejoran y aumentan el rendimiento en la planta (**Babalola, 2010**). Por ejemplo, se ha descrito actividad anticongelante y de nucleación en la rizobacterias *Pseudomonas putida*, promotora del crecimiento de plantas del ártico (**Muryoi et al, 2004**). Otra aplicación son los probióticos, que en su mayoría son de origen bacteriano. Son un medio antimicrobiano alternativo contra patógenos, brindan protección y beneficios nutricionales en el huésped (**Hossain, Sadekuzzaman, & Ha, 2017**). Mientras que, las bacterias del género *Burkholderia* se utilizan como biocontrol, biorremediación, fijación de nitrógeno y promotor del crecimiento en plantas (**Bolívar Anillo, Contreras Zentella, & Teherán Sierra, 2016**).

Otra aplicación biotecnológica es la obtención de biomoléculas como las AFP, que son pequeñas glicoproteínas descubiertas por primera vez en peces polares (**Fletcher, Hew, & Davies, 2001**). Las AFP tienen la capacidad de unirse a los cristales de hielo a través de una gran superficie complementaria para crear histéresis térmica y reducir la temperatura a la que un organismo puede crecer (**Jia y Davies, 2002**).

De la misma forma, una aplicación biotecnológica de los psicrófilos es producir de forma eficiente proteínas recombinantes activas a baja temperatura (**Margesin, 2007**). En 2001 se realizó la primera producción de enzima recombinante activa en el frío a partir de la bacteria antártica *Pseudoalteromonas haloplanktis* (**Tutino et al., 2001**). Esta bacteria es una de las psicrófilas modelo más investigadas, debido a su crecimiento extremadamente rápido y su capacidad para sobrevivir a bajas temperaturas, por su amplio rango de temperatura de crecimiento, desde -2.5 a 25 ° C (**Mocali et al., 2017**).

Por otro lado, la biorremediación a partir de bacterias psicrófilas es de gran interés investigativo (**DeBaldo, 2005**). La biodegradación a baja temperatura de contaminantes orgánicos, en ecosistemas fríos, es el resultado de la capacidad de degradación de la población bacteriana psicrófilas. Estas son capaces de transformar o mineralizar contaminantes orgánicos en sustancias menos peligrosas y no peligrosas, que luego se integran en ciclos biogeoquímicos naturales (**Margesin, 2007**). Un ejemplo de esta aplicación, son las bacterias de la especie *Lysinibacillus sphaericus*,

debido a que se utilizan para biorremediación de derrames petroleros y biocontrol de insectos (DeBaldo, 2005).

Gracias a las diferentes estrategias metabólicas desarrollado por las bacterias, estas son capaces de habitar en ecosistemas extremos del planeta Tierra, donde el desarrollo de la vida es muy difícil. Sus estrategias metabólicas son únicas y de interés económico e industrial. Por lo tanto, este estudio busca caracterizar fenotípica y genotípicamente bacterias provenientes de muestras de suelo la Antártida y de los volcanes Cotopaxi y Chimborazo, lo que permitirá identificar géneros y especies bacterianas presentes en estos ecosistemas, como un paso inicial hacia la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos y aplicaciones biotecnológicas.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Identificar bacterias aisladas de ecosistemas glaciares, Andinos y Antárticos.

1.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar genotípica y fenotípicamente bacterias provenientes de suelos glaciares.
- Determinar la diversidad fenotípica y genotípica mediante análisis de taxonomía numérica.
- Identificar molecularmente representantes de los grupos fenéticos definidos en taxonomía numérica.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Origen de material microbiano

En el presente estudio, 100 cepas bacterianas fueron analizadas. De éstas, 67 cepas se seleccionaron a partir del dendrograma de taxonomía numérica de datos fenotípicos, realizado por **Garzón (2013)**. La colección fue recibida en forma de ADN genómico disuelto en búfer TE 1X (Tabla B1, Anexo B). Las restantes 33 cepas fueron recibidas en forma de suspensión de células en glicerol, correspondientes al estudio de **Díaz & Estrada (2018)**. La información acerca del origen, características adicionales referentes al aislamiento de las cepas bacterianas y selección de cepas para la caracterización molecular, se encuentran en la Tabla A1 (Anexo A).

2.2 Caracterización Molecular

2.2.1 Evaluación de calidad del ADN genómico

El ADN genómico de las sesenta y siete muestras, fue extraído ya sea por el método de fenol cloroformo (**Navas & Rodríguez, 2016**) o kit comercial (PureLink Genomic DNA Mini Kit # K1820-02, Invitrogen). Con el fin de determinar si el ADN genómico se encontraba en las condiciones adecuadas para usarlo como template en los estudios de caracterización molecular, se procedió a determinar su calidad, concentración e integridad. Para ello, mediante el uso de un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific Nanodrop 2000) se evaluó la concentración y calidad de los ADNs. Antes de proceder con las lecturas, las superficies ópticas fueron previamente limpiadas y el equipo se calibró con agua ultra pura y búfer TE 1X. Posteriormente, 1,5 µl de ADN genómico fueron colocados en la superficie óptica, la concentración de ADN fue medido por triplicado a una longitud de onda de 260 nm y el promedio fue reportado en ng/µl. Además, los parámetros de calidad de ADN fueron evaluados mediante la relación de absorbancia 260/280, acorde a la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros de evaluación de calidad de ADN genómico.

Radio	Valor	Valoración
260/280	1,8 - 2	Optima
	1,6 - 1,8	Aceptable
	< 1,6	Contaminación con compuestos aromáticos
	>2,1	Contaminación con ARN

(BANCO NACIONAL DE ADN CARLOS III, 2013)

Por otro lado, para evaluar la integridad de los ADNs se preparó un gel de agarosa al 1% (p/v) disuelto en búfer TBE 0,5X (Tabla B2, Anexo B), teñido con 1 µl SYBR Safe (Invitrogen) por cada 10 ml de agarosa líquida. Se cargaron 4 µl de ADN en los pozuelos del gel y 4 µl de marcador de peso molecular de 1 kb (TrackIT-Invitrogen), en un extremo del gel, para obtener un patrón de bandas estándar como se muestra en la Figura D1 (Anexo D). El gel de agarosa se corrió por 35 minutos a 100 voltios. Posteriormente, las bandas de ADN fueron visualizadas con luz ultravioleta en el transiluminador (ChemiDoc TMMP Imaging System – BioRad). Los ADNs que se ubicaron por debajo de la primera banda del marcado molecular y aquellos que presentaron una banda compacta se consideraron como ADN íntegro. Mientras que, los que presentaron un barrido fueron considerados como ADN fragmentado.

Aquellas muestras en las que la concentración de ADN genómico fue superior a 30 ng/µl y con una relación 260/280 entre 1,6 y 2, fueron consideradas como adecuadas para proseguir en el estudio. Además, el ADN debía poseer una sola banda, sin fragmentación, para ser considerado como íntegro. De las 67 muestras solamente 41 cumplieron con estos parámetros de calidad. Las restantes 26 muestras fueron descartadas. Para obtener nuevo ADN genómico se procedió a recuperar los cultivos bacterianos a partir de los stocks de glicerol. Una vez crecidos e identificados como cultivos puros se procedió al aislamiento del ADN genómico. En el caso de las bacterias provenientes del estudio de **Díaz & Estrada (2018)**, luego de cumplir con el proceso de obtención de cultivos puros se realizó la extracción de ADN genómico. La recuperación de los cultivos se realizó a partir de los stocks de suspensión de células almacenados en glicerol, en el banco de germoplasma de la Unidad de Investigación y Desarrollo de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología (UODIDE). Se inocularon 20 µl de las cepas en cajas petri con agar nutriente (AN,

Difco), para realizar estrías compuestas y las cajas fueron incubadas de 3 a 5 días a 26°C. A continuación, las muestras que presentaron características de cultivo puro se almacenaron a -10°C en crioviales con una solución de glicerol al 20% (p/v). También se preparó una caja petri con AN, para crecer cada bacteria de manera abundante, entre 3 a 5 días a 26°C y así obtener una gran cantidad de biomasa para la extracción de ADN genómico.

2.2.1.1 Extracción de ADN por el método de fenol cloroformo

Posterior al proceso de incubación, en un tubo de centrífuga de 1,5 ml, se colocaron 400 µl de búfer de extracción de ADN (Tabla B3, Anexo B) y 0,05 g de microesferas de vidrio (106 µm de diámetro, lavadas en HCl). Con la ayuda de un asa de transferencia, se tomó la biomasa y se colocó en el tubo de centrífuga. Los tubos fueron congelados por 24 horas.

Terminado este tiempo, los tubos descongelados, fueron agitados en un vórtex por 10 minutos a máxima velocidad, para generar lisis celular. La suspensión formada se separó mediante centrifugación a velocidad máxima (15000 rpm) por 20 minutos a 4°C. Inmediatamente, 200 µl del sobrenadante fueron transferidos a un nuevo tubo de centrífuga. Cabe mencionar que, si en la superficie de la solución se observó una capa de grasa, esta fue retirada con la ayuda de una punta estéril de 1000 µl. Al sobrenadante obtenido se le añadieron 200 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), los tubos fueron agitados hasta obtener una solución homogénea blanquecina y centrifugados a velocidad máxima por 15 minutos a 4°C. Se obtuvo dos fases, una orgánica y una acuosa. La fase orgánica fue descartada, mientras que de la fase acuosa se transfirieron 150 µl a un nuevo tubo de centrífuga y se añadieron 300 µl de etanol absoluto (4°C). Estos tubos fueron centrifugados a velocidad máxima por 20 minutos a 4°C para precipitar el ADN. El sobrenadante fue descartado por completo y los tubos fueron lavados dos veces con 500 µl de etanol al 70% (4°C), en cada lavado se centrifugaron a velocidad máxima por 15 y 20 minutos respectivamente a 4°C. Los tubos se secaron por 4 horas a temperatura ambiente y el ADN fue resuspendido en 40 µl de búfer TE 1X. Finalmente, la calidad, concentración e integridad de los ADN extraídos se evaluaron acorde a la metodología antes mencionada. Solamente 12 de 26 cepas recuperadas de la colección de **Garzón (2013)**, se logró extraer ADN de calidad,

lo que totalizo un número de 53 bacterias estudiadas de ésta colección. En relación con las bacterias provenientes del trabajo de **Díaz & Estrada (2018)**, 31 de los 33 cultivos cumplieron los parámetros de calidad. Finalmente, 84 cepas bacterianas fueron caracterizadas molecularmente (Tabla A1, Anexo A).

2.2.2 Amplificación de patrones huella genéticas mediante rep-PCR

Se amplificó los patrones de fingerprinting de 84 muestras de ADN genómico mediante la técnica de rep-PCR utilizando el primer BOX A1R1 (5'CTACGGCAAGGCGACGCTGACG3'). En tubos de PCR de 200 µl, se realizó una reacción final de 22 µl, que estuvo compuesta por 20 µl de Platinum™ PCR SuperMix (Invitrogen), 1 µl de primer BOX y 1 µl de ADN genómico. Además, una gota de aceite mineral estéril se colocó para evitar la evaporación de la mezcla. Posteriormente, los tubos se colocaron en el termociclador (Multigene Optimax Labnet) y el protocolo fue configurado en el equipo, acorde a la Tabla 2.

Finalizada la reacción PCR, se disolvió agarosa al 1,285% (p/v) en búfer TBE 0,5X, teñido con 1 µl SYBRsafe (Invitrogen) por cada 10 ml de agarosa líquida. Se colocaron 18 µl del producto de PCR en los pozuelos del gel. Además, en 3 pozuelos distribuidos en el inicio, medio y final, se colocaron el marcador de peso molecular de 100 bp (TrackIT-Invitrogen), como patrón de estandarización de las bandas (Figura D1, Anexo D). El gel fue corrido a 70 voltios por 4 horas y visualizado mediante luz ultravioleta con un transiluminador (ChemiDoc TMMP Imaging System - BioRad). Las imágenes de los patrones fueron guardadas en formato TIFF para su posterior análisis.

Tabla 2. Protocolo de programación de termociclador para técnica de rep-PCR, usando el primer BOX.

Proceso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Activación de Taq	94	2'	1
Desnaturalización	94	45"	
Amplificación Alineamiento	50	1'15"	35
Elongación	72	8'	
Extensión Final	72	10'	1
Refrigeración	4		∞

(Reinoso & Rodríguez, 2018)

De los 84 ADNs utilizados en la obtención de patrones de fingerprinting, sólo 72 muestras fueron consideradas como adecuadas para continuar con su análisis. Los 12 restantes fueron descartados debido a que el número de bandas amplificadas fueron menor a 3.

2.2.2.1 Taxonomía numérica de patrones de fingerprinting

Los 72 patrones fueron analizados en el software Gel J (**Heras et al., 2015**). Las imágenes fueron importadas al programa con el mismo tamaño, guardados en fondo negro, resolución de 600 dpi. y formato TIFF. Los patrones fueron normalizados con la ayuda de los marcadores de peso molecular de 100 bp (Invitrogen) y su contraste fue modificado manualmente para mayor visualización de las bandas. Posteriormente, la matriz de similitud se generó mediante el coeficiente lineal de Pearson y el dendrograma fue construido a partir del algoritmo de UPGMA. Se determinó la formación coherente de grupos. A partir de estos, cepas representativas fueron seleccionadas para el secuenciamiento del gen del ADNr 16S y la caracterización fenotípica.

2.2.3 Secuenciación del gen del ADNr 16S y análisis filogenético

El ADN genómico de 19 cepas bacterianas, seleccionadas como representantes de los grupos identificados en el dendrograma basado en la taxonomía numérica de patrones de fingerprinting, fue extraído mediante el método de fenol cloroformo antes descrito. Los ADNs se resuspendieron en agua ultra pura y fueron enviados a la empresa MacroGen USA para secuenciar el gen del ADNr 16S. Los primers que se utilizaron para la amplificación del gen fueron el 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT³') y el 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCA³'). Para el secuenciamiento se utilizaron los primers internos 518F (5' CCAGCAGCCGCGGTAATACG³') y 800R (5' TACCAGGGTATCTAATCC³').

Las secuencias del gen del ADNr 16S pertenecientes a cada primer se recibieron en cromatogramas y en formato ABI. Éstas fueron procesadas en el software PHYDIT (**Chun, 1995**) para obtener secuencias consenso de aproximadamente 1400 nucleótidos (nt). En los casos, en donde funcionó un solo primer o solo secciones

cortas por cada primer, se obtuvieron secuencias parciales mediante el alineamiento manual usando la opción “pairwise align”. Las secuencias fueron comparadas con géneros relacionados e identificados mediante el software BLAST-N, disponible en el National Center For Biotechnology Information (NCBI) y en la base de datos del GenBank (**Benson et al., 2012**). Se elaboro el árbol filogenético mediante el algoritmo de Neighbour-Joining (**Saitou & Nei, 1987**) y se calculó las distancias evolutivas mediante **Jukes & Cantor (1969)**.

2.2.4 Análisis de taxonomía polifásica

Una vez establecidas las especies molecularmente a través de la construcción del árbol filogenético, fueron seleccionados en el dendrograma las cepas que tuvieron patrones de fingerprinting similares a las bacterias identificadas. Con el objetivo de establecer una aproximación polifásica y conocer la diversidad de la colección de bacterias.

2.3 Caracterización fenotípica

2.3.1 Caracterización macroscópica

Cincuenta cepas bacterianas representantes, fueron seleccionadas a partir de los grupos de la taxonomía numérica de patrones de fingerprinting para la caracterización fenotípica. Las cepas fueron activadas a partir de los stocks de glicerol almacenados a largo plazo, en cajas petri con AN. Las cajas fueron incubadas de 3 a 5 días a 26°C. Posterior al proceso de incubación, se realizó la caracterización macroscópica de las cepas bacterianas por clasificación en grupos de color, con base en la Tabla British Standard specification of colors for identification coding and special purposes (Anexo C). Mientras que la morfología de las bacterias fue evaluada según su forma, elevación y margen de las colonias, acorde a la Figura 1.





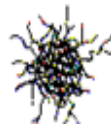






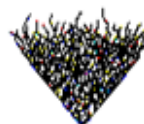

Forma	 Circular	 Irregular	 Lentijuela	 Filamentosa	 Rizoide
Elevación	 Plana	 Convexa	 Umbonada		
Margen	 Entero	 Ondulado	 Lobado	 Filamentoso	 Rizado

Figura 1. Caracterización morfológica de bacterias de acuerdo su forma, elevación y margen

2.3.2 Caracterización microscópica

La caracterización microscópica se realizó con la ayuda de las técnicas de laboratorio de tinción simple, Gram y endosporas.

La tinción simple fue realizada por medio de un frotis de la biomasa bacteriana sin fijación al calor. El portaobjetos fue teñido con safranina durante 1 minuto, se lavó con agua destilada y se secó al ambiente. Posteriormente, la muestra fue observada con la ayuda del lente de inmersión (100X). Se determinó la forma celular acorde a la Figura 2.

La tinción de Gram se realizó mediante un frotis de biomasa de la cepa bacteriana con fijación al calor. El portaobjetos fue teñido con cristal violeta por 1 minuto e inmediatamente lavado con agua destilada. A continuación, se tiñó con lugol por 1 minuto para luego ser lavado con alcohol (96%) por 30 segundos. Seguido esto, el portaobjetos fue teñido con safranina durante 1 minuto, lavado con agua destilada y secado al ambiente. Finalmente, la cepa bacteriana se observó con el lente 100X y se determinó la característica diferencial Gram positiva (color púrpura) o Gram negativa (color rojo).

La tinción de endosporas se realizó a todos los bacilos Gram positivos. Para ello, en un portaobjetos se realizó un frotis de la biomasa con fijación al calor. Seguido esto,

el portaobjetos fue colocado en un flujo de vapor de agua y teñido con verde malaquita por 10 minutos. Para evitar que el colorante se seque, se procedió a la adición constante del mismo. Posteriormente, el portaobjetos fue lavado con agua destilada, teñido con safranina por 1 minuto, lavado nuevamente y secado al ambiente. Al finalizar, la muestra se observó con la ayuda del lente 100X. Se determinó la presencia de endosporas de color verde, mientras que la célula se tiñó de color rojo.

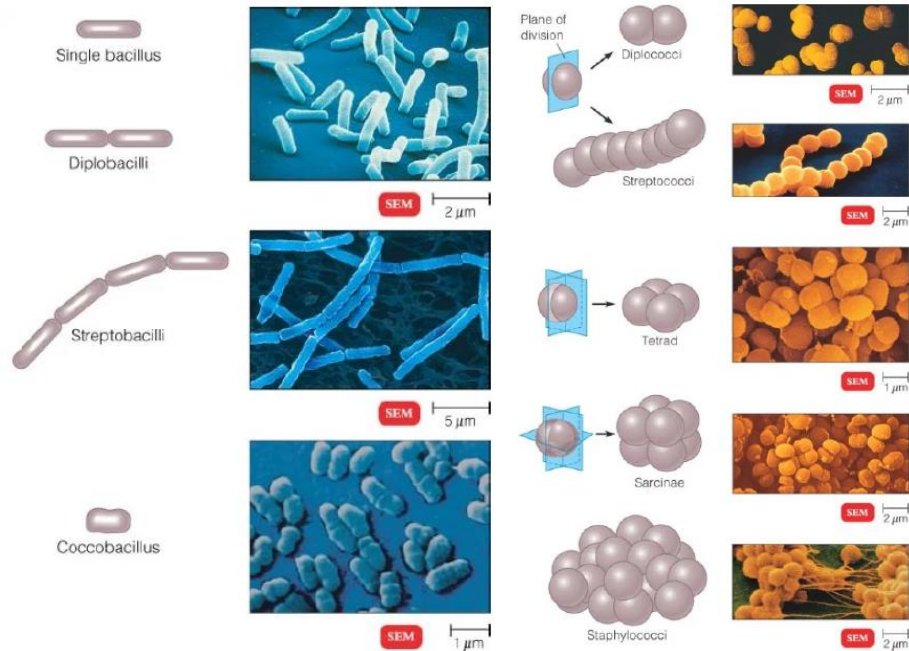


Figura 2. Diferentes agrupaciones y variaciones de bacilos y cocos.
(Martínez, 2016)

2.3.3 Pruebas fisiológicas de crecimiento en bacterias

Se preparó una suspensión de células en 750 μ l de agua de llave estéril, para ello se recogió la mayor cantidad de biomasa de las muestras bacterianas. Las suspensiones se almacenaron en refrigeración a 4°C. Para cada prueba se inocularon 5 μ l de la suspensión de células en cajas petri con AN, las cuales fueron incubadas a 26°C por 5.

2.3.3.1 Determinación del rango de crecimiento en función de la temperatura

Los medios de cultivo con las suspensiones de células fueron incubados a 4°C, 20°C, 26°C, 37°C y 50°C. Las muestras que presentaron crecimiento en los diferentes rangos de temperatura fueron asignados con 1, en el caso contrario, las que no presentaron crecimiento se asignó con 0. Finalmente, se determinó la clasificación de cada muestra acorde a su rango de crecimiento según la Tabla 3.

Tabla 3. Clasificación de microorganismos acorde al rango de crecimiento en función de la temperatura

Clasificación	4°C	20°C	26°C	37°C
Termófilo	-	-	-	+
Mesófilo extremo	+	+	+	+
Mesófilo	-	+	+	+
Psicrótrofo	+	+	+	-
Psicrófilo	+	+	-	-

(Garzón & Rodríguez, 2013)

2.3.3.2 Determinación del rango de crecimiento en función del pH

El pH del medio de cultivo se reguló usando sistema de búfers a 4,5, 5,5, 6,5, 7,5 y 8,5 (Tabla B5, Anexo B). Posteriormente, las muestras que presentaron crecimiento en los diferentes valores de pH fueron asignados con 1, en el caso contrario, las que no presentaron crecimiento se asignaron con 0. Finalmente se determinó la clasificación de las cepas bacterianas acorde a su rango de crecimiento según la Tabla 4.

Tabla 4. Clasificación de microorganismos acorde al rango de crecimiento en función del pH

Clasificación	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5
Acidófilo	+	+	-	-	-
Neutrotolerante	+	+	+	-	-
Neutrotolerante	+	+	+	+	-
Neutrófilo	-	+	+	+	-
Neutrófilo	-	-	+	+	-
Neutrófilo	-	-	+	-	-
Alcalitolerante	-	+	+	+	+
Alcalitolerante	-	-	+	+	+
Alcalófilo	-	-	-	+	+

(Garzón & Rodríguez, 2013)

2.3.3.3 Determinación del rango de crecimiento en función de la salinidad

Las cajas petri con AN fueron suplementadas con NaCl en concentraciones de 1%, 5%, 10% y 15% (p/v). Posteriormente, las muestras que presentaron crecimiento en las diferentes concentraciones de salinidad fueron asignados con 1, en el caso contrario, las que no presentaron crecimiento se asignaron con 0. Finalmente se determinó la clasificación de cada muestra acorde a su rango de crecimiento según la Tabla 5.

Tabla 5. Clasificación de microorganismos acorde al rango de crecimiento en función de la salinidad

Clasificación	1%	5%	10%	15%
Halófilo débil	+	-	-	-
Halófilo	+	+	-	-
Halófilo extremo	-	+	+	+
Halófilo extremo	+	+	+	+
No tolerante	-	-	-	-

(Garzón & Rodríguez, 2013)

2.3.3.4 Determinación de la utilización de aminoácidos como fuente única de carbono y nitrógeno

En cajas petri con medio de cultivo basal (Tabla B5, Anexo B), fueron inoculados 5 µl de las suspensiones de bacterias e incubadas por 5 días a 26°C. Cada medio de cultivo individualmente tuvo 0,1% (p/v) de aminoácidos, entre ellos ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, arginina, asparagina, cisteína, fenilalanina, histidina., leucina, lisina, tirosina, treonina y valina. Posteriormente, se evaluó la capacidad de las bacterias para utilizar diferentes aminoácidos como fuente única de carbono y nitrógeno. Aquellas muestras que presentaron crecimiento en los diferentes tipos de aminoácidos se asignaron como 1, en el caso contrario, los que no presentaron crecimiento se asignaron con 0.

2.3.3.5 Determinación de la utilización de aminoácidos como fuente única de nitrógeno.

En cajas petri con medio de cultivo basal (Tabla B6, Anexo B) fueron inoculados 5 μ l de las suspensiones de bacterias e incubadas por 5 días a 26°C. Individualmente cada medio de cultivo tuvo una solución base de nitrógeno de levadura y cas-aminoácidos y 0,1% (p/v) de aminoácidos, entre ellos ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, arginina, asparagina, cisteína, fenilalanina, histidina., leucina, lisina, tirosina, treonina y valina. Se determinó la capacidad de las bacterias de utilizar diferentes aminoácidos como fuente única de nitrógeno. Aquellas muestras que presentaron crecimiento en los diferentes aminoácidos se asignaron como 1, en el caso contrario, se asignaron con 0 las cepas que no tuvieron crecimiento.

2.3.4 Taxonomía numérica de datos fenotípicos

Los resultados obtenidos de las 50 cepas fueron organizados en una matriz de datos en código binario. La matriz fue procesada en el software NTSys (**Rohlf, 1988**), donde el porcentaje de similitud fue calculado mediante el coeficiente de simple similaridad (S_{SM}). Se construyó el dendrograma de datos fenotípicos, utilizando el algoritmo UPGMA y los grupos fenéticos fueron determinados basados en una similaridad del 85%.

2.4 Hipótesis

2.4.1.1 Hipótesis nula

La caracterización genotípica y fenotípica no permite determinar la diversidad de las cepas bacterianas aisladas de ecosistemas glaciares, andinos y antárticos.

2.4.1.2 Hipótesis alternativa

La caracterización genotípica y fenotípica permite determinar la diversidad de las cepas bacterianas aisladas de ecosistemas glaciares, andinos y antárticos.

2.4.2 Señalamiento de variables

- Concentración e integridad del ADN genómico.
- Patrones de fingerprinting.
- Diversidad fenotípica y genotípica de bacterias.
- Diversidad filogenética de bacterias.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización molecular

3.1.1 Evaluación de ADN genómico

El ADN genómico de las 84 muestras presentó concentraciones suficientes y relaciones 260/280 entre 1,6 y 2. Los datos se encuentran reportados en la Tabla A2 (Anexo A). La integridad de los ADNs fue evaluada mediante electroforesis, como se observa en la Figura D2 (Anexo D), en donde la mayoría presentaron una banda compacta, lo que muestra un ADN íntegro. El ADN genómico que se escogió para los estudios posteriores de caracterización molecular fue aquel que presentó los mejores parámetros de calidad.

3.1.2 Amplificación de patrones de fingerprinting mediante rep-PCR

Los patrones de fingerprinting de 72 muestras de ADN se encuentran reportados en la Figura D3 (Anexo D). La visualización de los patrones de fingerprinting reportó la presencia de 3 a 12 bandas, variando de tamaño entre 100 a 2000 pb, como se observa en la Figura 3. Doce muestras fueron descartadas con el fin de evitar errores en el análisis taxonómico, debido a que se obtuvieron menos de tres bandas en sus patrones. En un estudio similar, fueron excluidas patrones mediante el mismo criterio, debido a que la información taxonómica iba a ser limitada, misma que influye directamente en la obtención del dendrograma genotípico (Vinuela, 2010).

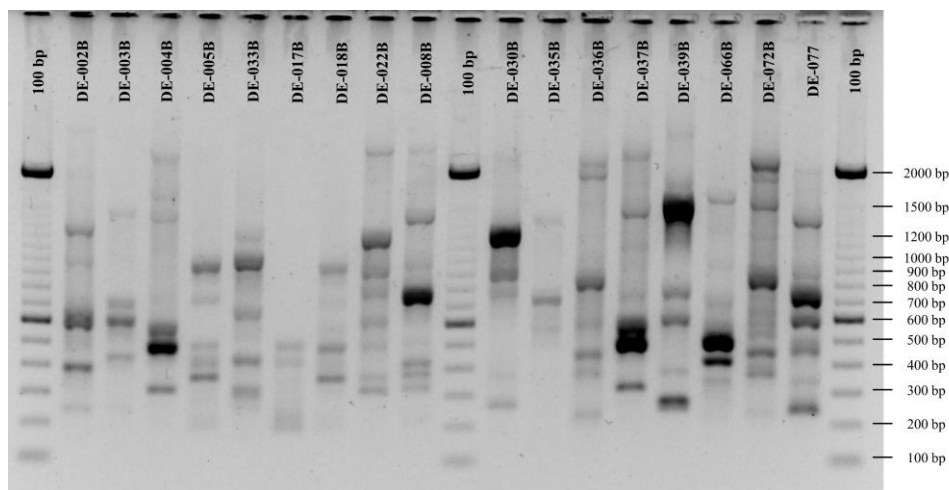


Figura 3. Patrones de fingerprinting obtenidos por rep-PCR usando el primer BOX

3.1.2.1 Taxonomía numérica de datos basado en patrones de fingerprinting con el primer BOX

El dendrograma obtenido mediante el cálculo del coeficiente lineal de Pearson y el algoritmo UPGMA, se visualiza en la Figura 4. En donde, se identificaron 10 grupos. De los cuales, el 3, 5, 6, 7 y 10 tuvieron entre 9 y 17 integrantes (Tabla 6). Probablemente exista gran diversidad genética dentro de la colección de bacterias, debido a la variedad de patrones obtenidos de la amplificación por rep-PCR.

Tabla 6. Grupos obtenidos a partir del dendrograma de patrones de fingerprinting usando el primer BOX

Grupos	Integrantes
1	DG-315*, DE-043B *, DE-039B *
2	DG-222 *++, DE-030B, DE-022B *
3	DE-041B *, DG-300 *++, DG-302, DE-072 *, DE-036B, DG-318 *, DG-187, DG-239 *++, DE-042B *, DG-213, DE-077 *++, DE-035B *, DG-303, DE-028B *
4	DE-018B *++, DE-005B, DG-193*, DG-179 *+, DE-033B *, DG-162 *
5	DE-006B *++, DE-034B *+, DE-027B, DE-038B, DG-244 *, DE-031B *++, DE-066, DE-037B, DG-173 *
6	DG-245 *++, DG-200 *++, DE-003B, DE-002B *, DG-181 *++, DG-130, DG-113 *++, DG-219, DG-203 *++, DG-125
7	DG-229 *, DG-118 *, DG-209 *++, DG-136 *, DG-248 *, DE-004B *, DE-029B, DG-116 *
8	DE-017B
9	DG-164 *+
10	DG-186 *, DG-110, DG-176 *++, DG-104, DG-172 *, DG-186C, DG-140A. *+, DE-040B *, DG-190B *, DG-171 *++, DG-233 *, DG-217 *, DG-140M *, DG-156, DG-117, DG-111 *, DG-102 *

* Muestras utilizadas en caracterización fenotípica final

† Muestras utilizadas en secuenciación del gen del ADNr 16S

†† Muestras utilizadas en la identificación molecular del gen del ADNr 16S

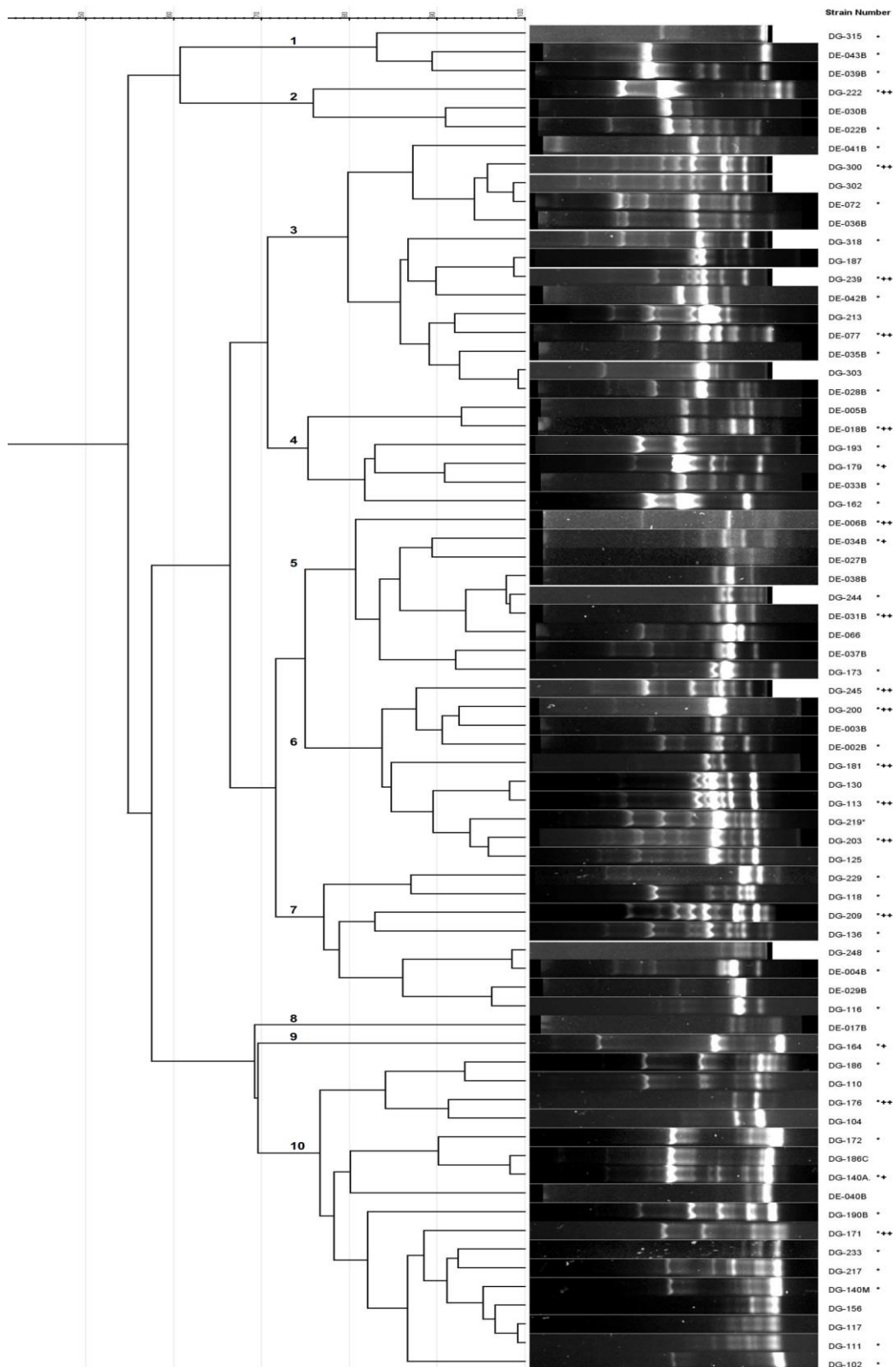


Figura 4. Dendrograma de patrones de fingerprinting, construido mediante el coeficiente lineal de Pearson y el algoritmo UPGMA

* Muestras utilizadas en caracterización fenotípica final

† Muestras utilizadas en secuenciación del gen del ADNr 16S

†† Muestras utilizadas en la identificación molecular del gen del ADNr 16S

3.1.3 Análisis filogenético del gen del ADNr 16S

La concentración y parámetros de calidad de los ADNs seleccionados para secuenciación del gen del ADNr 16S se reporta en la Tabla A3 (Anexo A), mientras que la evaluación de la integridad se observa en la Figura D4 (Anexo D). Posterior al procesamiento de datos en el programa PHYDIT, se determinó que 16 de 19 secuencias obtenidas del gen del ADNr 16S, tuvieron la calidad suficiente para compararse con especies más cercanas (Tabla A4, Anexo A). Las otras 3 fueron eliminados debido a que no se obtuvo cromatogramas de secuenciamiento adecuadas para establecer la molécula del gen del ADNr 16S.

El árbol filogenético, resultado del procesamiento de los cromatogramas de las 16 cepas bacterianas mediante BLAST-N, identificó 11 especies distintas como se muestra en la Figura 5. Además, representantes de 9 géneros han sido identificados dentro de la colección. De estos, el género más diverso fue *Pseudomonas*, con 4 especies, seguidas del resto que solo tiene un representante.

La cepa DG-200 fue identificada como *Arthrobacter psychrochitiniphilus*, con una similitud del 99,38% (Tabla A5, Anexo A). Esta especie fue descrita en el año 2009 como bacilo Gram positivo, forma colonias amarillas, circulares y con elevación convexa. El crecimiento reportado ocurre entre 0°C a 25°C, con temperatura optima de crecimiento de 20°C. Además, es capaz de crecer en medio suplementado con NaCl hasta el 3%, presentando un crecimiento optimo a 1,5% y en función al pH puede crecer entre 6 y 8, con un crecimiento optimo a pH 7 (F. Wang, Gai, Chen, & Xiao, 2009). Características que concuerda con la clasificación determinada a la cepa DG-200, por lo tanto, se confirma la cercanía con la especie *A. psychrochitiniphilus*.

Mediante el análisis filogenético basado en las secuencias del gen del ADNr 16S, reveló que la bacteria DG-179 presentaron similitudes del 99,10% con la especie *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* (Tabla A6, Anexo A). La cual fue descrita como coco Gram positivo, formadora de colonias de color crema-amarillo. Es capaz de crecer entre 4°C y 37°C, con una temperatura optima de crecimiento entre 30°C y 37°C. En función al pH, puede crecer entre 6,5 y 8,5 con un crecimiento óptimo de pH 7,0 a 7,5 (Kallimanis et al., 2011). La bacteria DG-179 compartió algunas características, debido a que se describió como psicrótrofa, alcalitolerante y halófilo.

1 substitutions/site

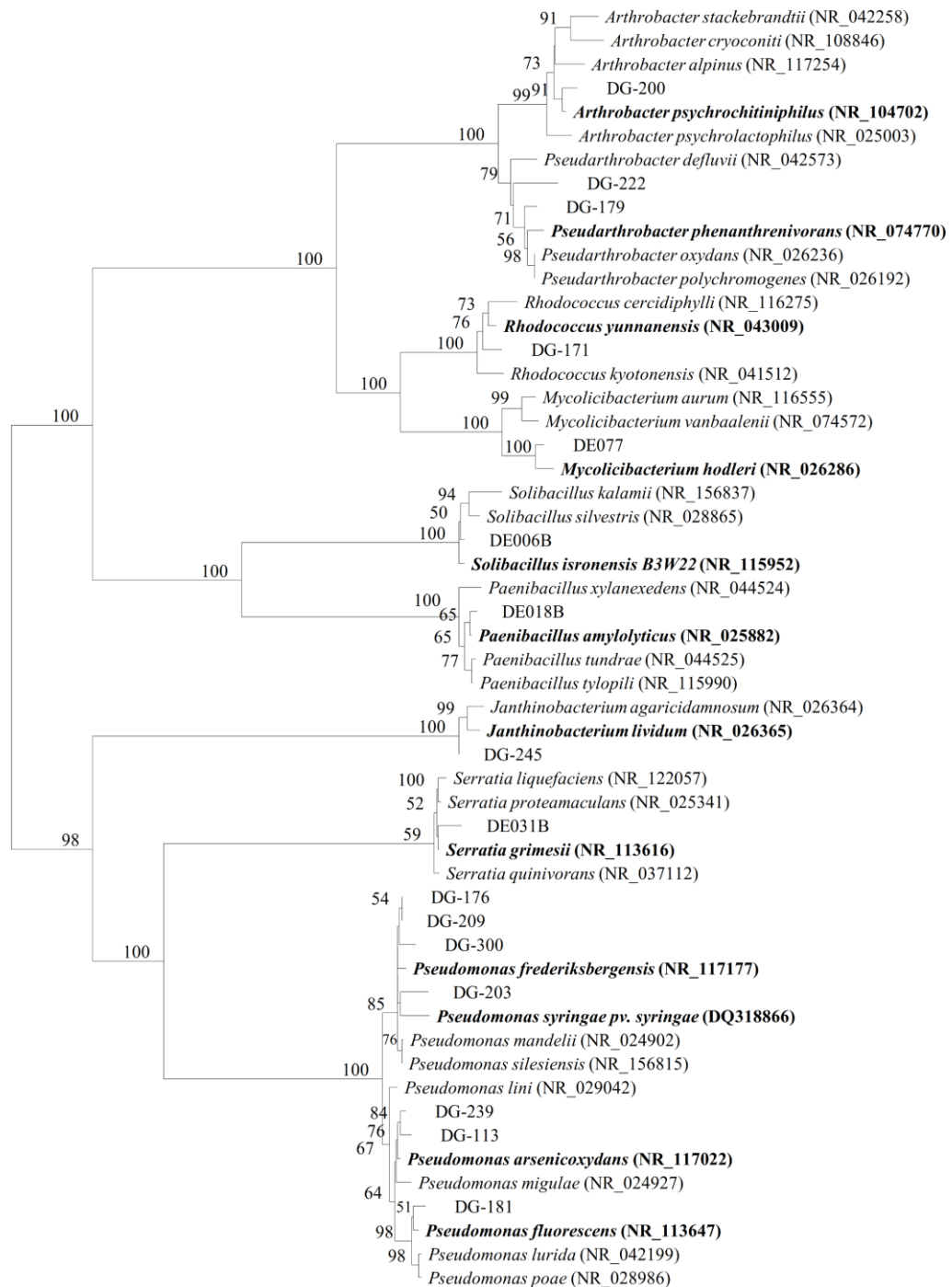


Figura 5. Árbol filogenético de cepas bacterianas aisladas de ecosistemas glaciares, andinos y antárticos.

Construido mediante el algoritmo Neighbour-Joining y el modelo de distancias evolutivas de Jukes & Cantor. La topología se evaluó mediante el análisis de Bootstrap de 1000 subsets.

() Número de acceso a la base de datos del NCBI

Si bien es cierto que, en el árbol filogenético DG-222 tiene como vecino más cercano a *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans*. Sin embargo, debido al porcentaje de similitud del 97,86% y una diferencia de 31 nt con esta especie (Tabla A6, Anexo A), esta cepa probablemente pertenecería a una especie nueva. Con base en los parámetros taxonómicos moleculares, se recomienda realizar experimentos de hibridación ADN-ADN a los aislados que presenten un valor umbral de similitud de la secuencia del gen del ADNr 16S menor al 98,5% (**Stackebrandt, 2011**). Además, se confirma que la bacteria en el estudio es diferente que su vecino más cercano, debido a que solo es capaz de crecer de 4°C a 26°C, pH de 5,5 a 7,5 y tolerar la salinidad hasta 1% (p/v).

Por otro lado, mediante una similitud del 99,09% (Tabla A7, Anexo A), la cepa DG-171 fue identificada como *Rhodococcus yunnanensis*. Esta especie se determinó como coco Gram positivo mesófilo con temperatura de crecimiento óptima entre 28 y 30°C. Además, es capaz de crecer de pH 7,0 a 8,0 y tolerar el NaCl hasta 10% (**Zhang et al., 2005**). Las características de la especie en función a la temperatura y la salinidad concuerdan con las de la bacteria en estudio. Sin embargo, en función del pH la cepa estudio fue capaz de crecer en un rango de pH amplio, de 4,5 a 8,5.

Se determinó que la especie *Mycolicibacterium hodleri* es afín a la cepa DE-077, con una similitud del 99,23% (Tabla A8, Anexo A). Esta especie se aisló de muestras de suelo contaminado con hidrocarburos y fue descrita como bacilo Gram positivo con crecimiento a temperatura entre 18°C y 28°C (**Kleespies, Kroppenstedt, Rainey, Webb, & Stackebrandt, 1996**). Algunas características de la especie descrita concuerdan con lo reportado por la cepa estudio, debido a que se clasificó como una bacteria psicrotrófica, neutrotolerante y halófila débil.

La cepa DE-006B con una similitud de 99,60% fue identificada como *Solibacillus isronensis* (Tabla A9, Anexo A). Esta especie se aisló por primera vez de tubos criogénicos utilizados para recolección de muestras de aire, fue descrita como bacilo Gram positivo que produce endosporas, forma colonias blancas, enteras y redondas. Además, es capaz de crecer entre 5°C y 37°C, pH 6 a 10 y tolerar la salinidad hasta 5,8% (**Shivaji et al., 2009**). Mientras que, la bacteria en estudio presentó crecimiento entre 4°C y 26°C, pH entre 4,5 a 6,5 y una tolerancia a la salinidad del 1% (p/v).

Se logró determinar la afinidad de la especie *Paenibacillus amylolyticus* con la cepa DE-018B, debido a que guardan una similitud del 99,66% (Tabla A10, Anexo A). Esta especie fue descrita por Nakamura en 1984, como bacilo Gram positivo que produce endosporas. La forma de las colonias son planas, lisas y circulares. Además, es capaz de crecer entre 10 y 40°C, en pH de 4,5 a 9,0 y tolerar la salinidad hasta el 2% (**Shida, H., Kadowaki, Nakamura, & Komagata, 1997**). La mayoría de las características morfológicas y fisiológicas concuerdan con la cepa del estudio. Por lo que se confirma que, la cepa DE-018B pertenece a la especie *P. amylolyticus*. En este estudio se determinó que esta cepa es capaz de crecer a 4°C.

Por otro lado, la cepa DG-245 se identificó como *Janthinobacterium lividum*, con similitud del 99,45% (Tabla A11, Anexo A). Fue descubierta por Eisenberg en 1891, descrita como bacilo Gram negativa, con forma colonial circular, elevación convexa y margen liso. Además, es una bacteria psicrófila con crecimiento óptimo a 15°C, capaz de crecer a pH 4 y 9, con crecimiento óptimo a pH 6,8 y tolerancia a la salinidad entre 0,58% y 2,9% (**Shivaji et al., 1991**). Comparando la descripción de la especie con la cepa en el estudio, se descubrió hallazgos muy interesantes debido que la bacteria DG-245 es capaz de crecer entre 20°C y 26°C, pH entre 5,5 a 7,5 y soportar la salinidad hasta 15% (p/v).

La cepa DE-031B fue identificada como *Serratia grimesii*, debido a que guarda una similitud del 99,25% (Tabla A12, Anexo A). Esta especie fue descrita como un bacilo Gram negativo mesofílico, con crecimiento óptimo a 30°C (**Grimont, Grimont, & Irino, 1982**). La mayoría de las características concuerdan con la cepa DE-031B, por lo que se confirma su identificación como *S. grimesii*.

Del clúster formado por las cepas DG-176, DG-209 y DG-300, no fue posible lograr una identificación. La similitud entre las cepas DG-176 y DG-209 fue del 100%, mientras que con la bacteria DG-300 la similitud fue del 99,30% y 99,50% respectivamente (Tabla A13, Anexo A). Al momento no se logró establecer si estas cepas son más cercanas a *Pseudomonas silesiensis*, *Pseudomonas frederiksbergensis*, o *Pseudomonas mandelii*. Por lo tanto, es necesario secuenciar otros genes (multilocus sequencing) para determinar la posición taxonómica de este grupo. Por otro lado,

comparando las características fenotípicas, las cepas son muy cercanas entre sí y se han clasificado como psicrótrofas, neutrófilas y halófilas débiles.

De las especies que pertenecen al género *Pseudomonas*, la cepa DG-203 presento una similitud de 98,3% con *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Tabla A13, Anexo A). La cual, fue descubierta por van Hall 1902, como bacilo Gram negativo mesofílico, con formación de colonias blanco cremosas (**Hoyos & Zapata, 2011; Young, 1977**). Algunas características fenotípicas concuerdan con su vecino más cercano, sin embargo, se podría mencionar que la cepa DG-203 probablemente pertenece a una especie nueva, basándose en lo mencionado por **Stackebrant (2011)**. Por lo tanto, es necesario secuenciar el gen completo del ADNr 16S, debido a que la secuencia obtenida fue de solo 1199 nt.

De la misma forma, las cepas DG-239 y DG-113 con similitudes del 99,57% y 99,47% respectivamente, fueron identificadas como *Pseudomonas arsenicoxydans* (Tabla A13, Anexo A). Esta especie se aisló a partir de muestras de sedimentos del Desierto de Atacama en Chile, descrita como bacilo Gram negativo, con crecimiento a 4°C y 37°C, pH entre 6.0 a 10,5 y capaz de soportar la salinidad hasta 2% (**Campos et al., 2010**). Las características descritas por la especie no concuerdan con las cepas afines, debido a que estas fueron clasificadas como psicrótrofas, neutrotolerantes y halófilas débiles. Es probable que se necesite realizar estudios comparativos con la cepa tipo de la especie y así determinar la diversidad intra-especie de estos organismos.

Por último, la cepa DG-181 se identificó como *Pseudomonas fluorescens*, con un porcentaje de similitud del 99,45% (Tabla A13, Anexo A). La cual fue descrita por primera vez por Migula en 1895, como un bacilo Gram negativo psicrótrofo, capaz de crecer a pH 5,0 (**Rhodes, 1959**). La descripción de esta especie concuerda con la cepa asociada. Sin embargo, en función al pH la cepa DG-181 fue capaz de crecer de 4,5 a 7,5.

3.1.3.1 Identificación molecular usando el gen del ADNr 16S.

Una vez hecho la identificación, a través de la información obtenida del secuenciamiento del gen del ADNr 16S y los patrones de fingerprinting de BOX, se logró identificar molecularmente 35 cepas bacterianas, como se muestra en la Figura

6. Además, se formaron 16 grupos fenéticos a un 90% de similitud con las especies identificadas, reportado en la Tabla 7. Por lo tanto, de 72 cepas estudiadas, se conoce la posición taxonómica del 48,6% de la colección. El resto de la colección se debería hacer un estudio posterior, para determinar su posición exacta dentro del dominio *Bacteria*.

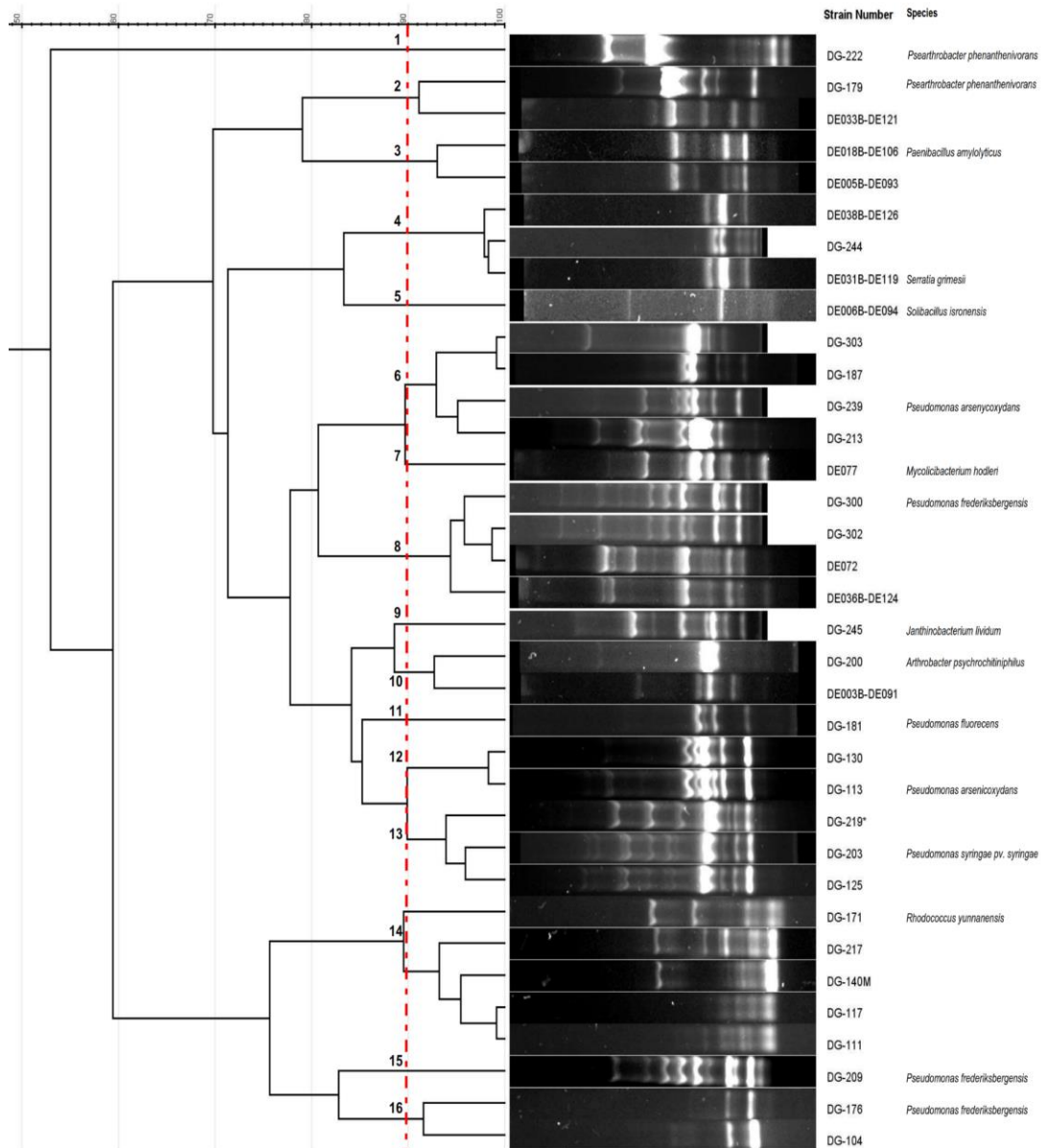


Figura 6. Dendrograma fenotípico de bacterias identificadas molecularmente usando el gen del ADNr 16S, construido mediante el coeficiente lineal de Pearson y el algoritmo UPGMA.

Tabla 7. Grupos formados a partir del dendrograma fenotípico de bacterias identificadas molecularmente

Grupos fenéticos	Integrantes	Especie cercana
1	DG-222 ++	<i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i>
2	DG-179 ++, DE-033B	<i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i>
3	DE-018B ++, DE-005B	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>
4	DE-038B, DG-244, DE-031B ++	<i>Serratia grimesii</i>
5	DE-006B ++	<i>Solibacillus isronensis</i>
6	DG-187, DG-303, DG-239 ++, DG-213	<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i>
7	DE-077 ++	<i>Mycolicibacterium hodleri</i>
8	DG-300 ++, DG-302, DE-072, DE-036B	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> <i>Pseudomonas. mandelii</i> <i>Pseudomonas. silesiensis</i>
9	DG-245 ++	<i>Janthinobacterium lividum</i>
10	DG-200 ++, DE-003B	<i>Arthrobacter psychrochitiniphilus</i>
11	DG-181 ++	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
12	DG-130, DG-113 ++	<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i>
13	DG-219*, DG-203 ++, DG-125	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
14	DG-171 ++, DG-217, DG-140M, DG-117, DG-111	<i>Rhodococcus yunnanensis</i>
15	DG-209 ++	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> <i>Pseudomonas. mandelii</i> <i>Pseudomonas. silesiensis</i>
16	DG-176 ++, DG-104	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> <i>Pseudomonas. mandelii</i> <i>Pseudomonas. silesiensis</i>

†† Muestras utilizadas en la identificación molecular del gen del ADNr 16S

3.1.4 Caracterización fenotípica

La agrupación por color de las 50 cepas bacterianas seleccionadas como representantes se muestra en la Tabla A14 (Anexo A). De la cual, se formaron 8 grupos de color, en donde, 627 Light Aircraft Grey representa el mayor número de miembros, con 24 cepas. Comparado con otras investigaciones se obtuvieron resultados similares, sobresaliendo el color blanco y la mucosidad brillante de la mayoría de las cepas aisladas de muestras de suelo antártico (**Barrientos, Gidekel, & Gutiérrez, 2008**).

Además, los colores 447 Salmon Pink, 366 Light Beige y variaciones del amarillo (309 Canary Yellow, 310 Primrose y 356 Golden Yellow) resaltaron de la colección de bacterias. Lo cual podría atribuirse a lo reportado por otros investigadores, en donde la producción de pigmentos es probablemente un mecanismo de defensa de los microorganismos para prevenir daños letales en el ADN debido a los altos niveles de radiación solar (**Christner et al., 2000**).

La caracterización macroscópica se reporta en la Tabla 8. Las colonias bacterianas presentaron forma circular e irregular, representado cada una con 25 cepas. Mientras que, según el carácter elevación y margen, la mayoría se determinaron como planas y enteras respectivamente.

Tabla 8. Caracterización macroscópica de la colección de bacterias

Caracterización macroscópica		
Forma	Circular	25
	Irregular	25
Elevación	Plana	19
	Convexa	18
	Umbonada	13
Margen	Entero	28
	Ondulado	6
	Lobado	2
	Rizado	14

Los resultados de la caracterización microscópicas se muestran en la Tabla 9. De las bacterias evaluadas en su mayoría se identificaron como Gram negativas, de forma cocoide y con ausencia de endosporas. Los datos reportados coinciden con investigaciones, donde mencionan que las bacterias más reportadas en ambientes fríos son las Gram negativas de las α -, β - y γ -proteobacterias (*Pseudomonas spp.* y *Vibrio spp.*) y el *phylum* Cytophaga, Flavobacterium y Bacteroides (**Barrientos et al., 2008**).

Cabe mencionar que las bacterias DG-190B y DG-193 presentaron forma celular pleomórfica, debido a que no tienen una forma definida o ésta varía a lo largo de su ciclo celular, como por ejemplo *Corynebacterium sp* y *Rhizobium sp* (**Kysela, Randich, Caccamo, & Brun, 2016; Martínez, 2016**). Además, las bacterias Gram

positivas DE-006B y DE-018B fueron las únicas que presentaron formación de estructuras de resistencia como las endosporas.

Tabla 9. Caracterización microscópica de la colección de bacterias

Caracterización microscópica		
Forma	Bacilo	21
	Coco	27
	Pleomórfica	2
Tinción	Gram Positivo	16
	Gram Negativo	34
	Endospora	2

La información en detalle de cada cepa bacteriana según la clasificación macroscópica y microscópica se muestra en la Tabla A15 (Anexo A).

3.1.4.1 Pruebas fisiológicas de crecimiento en bacterias

En la Tabla 10, se resume los resultados de la clasificación de las bacterias según la temperatura, pH y salinidad. Acorde a la clasificación en función a la temperatura de crecimiento, se obtuvo que el 76% de las bacterias fueron psicrótrofas. En estudios relacionados se han encontrado que la mayoría de cepas antárticas son psicrotolerantes (**Barrientos et al., 2008**). La capacidad de crecer a bajas temperaturas es una característica adaptativa de microorganismos para optimizar procesos básicos como el crecimiento y la supervivencia (**Nichols et al., 2001**). Además, es importante mencionar que el 20% de las bacterias analizadas fueron capaces de crecer en el rango de 4°C a 37°C, clasificándolas como mesófilas extremas. Lo que concuerda con investigaciones en donde se han reportado aislamientos de bacterias provenientes de muestras antárticas, con un rango de crecimiento entre 4°C a 30°C (**Montes, 2005**) y en algunos casos de -2,5°C a 42 °C (**Ponder et al., 2005**).

Acorde a la clasificación según el pH, se evidenció que la mayoría de las bacterias fueron neutrotolerantes, representadas por el 62%. Mientras que el 26% de las bacterias se determinaron como neutrófilas. En investigaciones se menciona que el rango específico de pH para el crecimiento de bacterias se encuentra entre 4 y 9 (**Oren, 2007**). Además, se han descrito bacterias antárticas del género *Pseudomonas* con

capacidad de crecimiento a pH entre 4 y 10 (See-Too et al., 2017). Por otro lado, cabe recalcar que la única bacteria acidófila fue la cepa DE-077.

El crecimiento de las bacterias en diferentes concentraciones de salinidad tuvo una distribución uniforme, debido a que la mayoría fueron clasificadas dentro de los grupos de halófilos débiles y halófilos, representados por el 34% cada grupo. La mayoría de las especies procariotas halófilas conocidas pertenecen al dominio *Bacteria* (Oren, 2007), debido a que han desarrollado varios mecanismos de osmoadaptación como la acumulación de concentraciones molares de KCl o la exclusión de la sal del citoplasma mediante la síntesis y acumulación de solutos orgánicos como la glicina betaína, ectoína, entre otros (Kondepudi & Chandra, 2011; Oren, 2008). Un ejemplo de bacteria halófila es *Exiguobacterium* que soporta concentraciones de NaCl hasta el 10% (p/v) (Vaishnav et al., 2013).

Tabla 10. Caracterización de la colección de bacterias en función a las pruebas fisiológicas de crecimiento

Pruebas fisiológicas			
Temperatura	Psicrótrofo	37	76%
	Mesófilo	2	4%
	Mesófilo extremo	10	20%
pH	Acidófilo	1	2%
	Neutrotolerante	32	64%
	Neutrófilo	13	26%
	Alcalitolerante	3	6%
Salinidad	No tolerante	1	2%
	Halófilo débil	17	34%
	Halófilo	17	34%
	Halófilo extremo	14	28%

Los resultados en detalle obtenidos de la clasificación de las bacterias en función al rango de crecimiento de temperatura, pH y salinidad se encuentran reportados respectivamente en la Tabla A16, Tabla A17 y Tabla A18 (Anexo A).

La capacidad de las bacterias de utilizar diferentes aminoácidos como fuente única de carbono y nitrógeno y fuente única de nitrógeno se muestra en la Tabla 11. Más del 72% de las bacterias fueron capaces de utilizar los aminoácidos ácido aspártico,

cisteína, leucina, fenilalanina, lisina, treonina, arginina, valina, asparagina, histidina y tirosina como fuente única de carbono y nitrógeno. Sin embargo, el ácido glutámico fue poco metabolizado, siendo solo el 38% de las bacterias capaces de utilizar este aminoácido. En estudios similares se ha reportado que solo el 36,4% de las bacterias fueron capaces de metabolizar el ácido glutámico (**Reinoso & Rodríguez, 2018**). Por otro lado, se menciona que cepas bacterianas aisladas de suelo tuvieron un desarrollo amplio en los aminoácidos ácido aspártico, alanina, histidina y tirosina. Mientras que, en el ácido glutámico, arginina, fenilalanina y lisina su desarrollo fue moderado. Así como también se determinó que las bacterias crecieron pobremente en cisteína, leucina, treonina y valina (**Halvorson, 1972**).

En función a la capacidad de las bacterias de utilizar diferentes aminoácidos como fuente única de nitrógeno se obtuvo que, nueve de los trece aminoácidos fueron utilizados ampliamente, mientras que menos del 55% de las bacterias fueron capaces de utilizar los aminoácidos ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína y leucina.

Tabla 11. Utilización de aminoácidos como fuente única de carbono y nitrógeno y fuente única de nitrógeno

Aminoácidos	Fuente única de carbono y nitrógeno	Fuente única de nitrógeno
Ácido aspártico	76%	32%
Ácido glutámico	38%	20%
Alanina	90%	96%
Arginina	86%	78%
Asparagina	88%	88%
Cisteína	80%	24%
Fenilalanina	76%	86%
Histidina	90%	90%
Leucina	80%	54%
Lisina	82%	72%
Tirosina	92%	82%
Treonina	84%	70%
Valina	86%	78%

3.1.5 Taxonomía numérica de datos fenotípicos

La información detallada de la matriz de código binario resultado de la caracterización fenotípica de cada muestra se encuentra reportado en la Tabla A19 (Anexo A).

El dendrograma obtenido mediante el análisis de los resultados de caracterización fenotípica se muestra en la Figura 7. Se logró determinar 21 grupos fenéticos a un 84,6% de similitud, siendo los grupos 1 y 6 los que contaron con mayor cantidad de integrantes, además se formaron 11 grupos fenéticos con un solo miembro, como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Grupos fenéticos obtenidos a partir del dendrograma de taxonomía numérica

Grupos fenéticos	Integrantes
1	DG-102, DG-140M, DG-116, DE-034B, DG-181++, DE-039B, DE-004B
2	DG-172, DG-315, DG-245 ++
3	DG-136, DG-173, DG-171 ++
4	DG-164
5	DG-179 ++, DG-222 ++
6	DG-113 ++, DG-203 ++, DG-239++, DG-176 ++, DG-209 ++, DG-300 ++, DE-040B, DE-043B
7	DG-318, DE-022B, DE-033B, DE-035B, DE-002B, DE-031B ++
8	DG-233, DG-244
9	DG-140A., DE-028B
10	DG-186, DE-072, DE-041B, DE-042B
11	DG-229
12	DG-162, DG-200 ++
13	DE-006B ++
14	DE-018B ++
15	DE-077 ++
16	DG-111
17	DG-118
18	DG-248
19	DG-190B
20	DG-193
21	DG-217

++ Muestras utilizadas la identificación molecular del gen del ADNr 16S

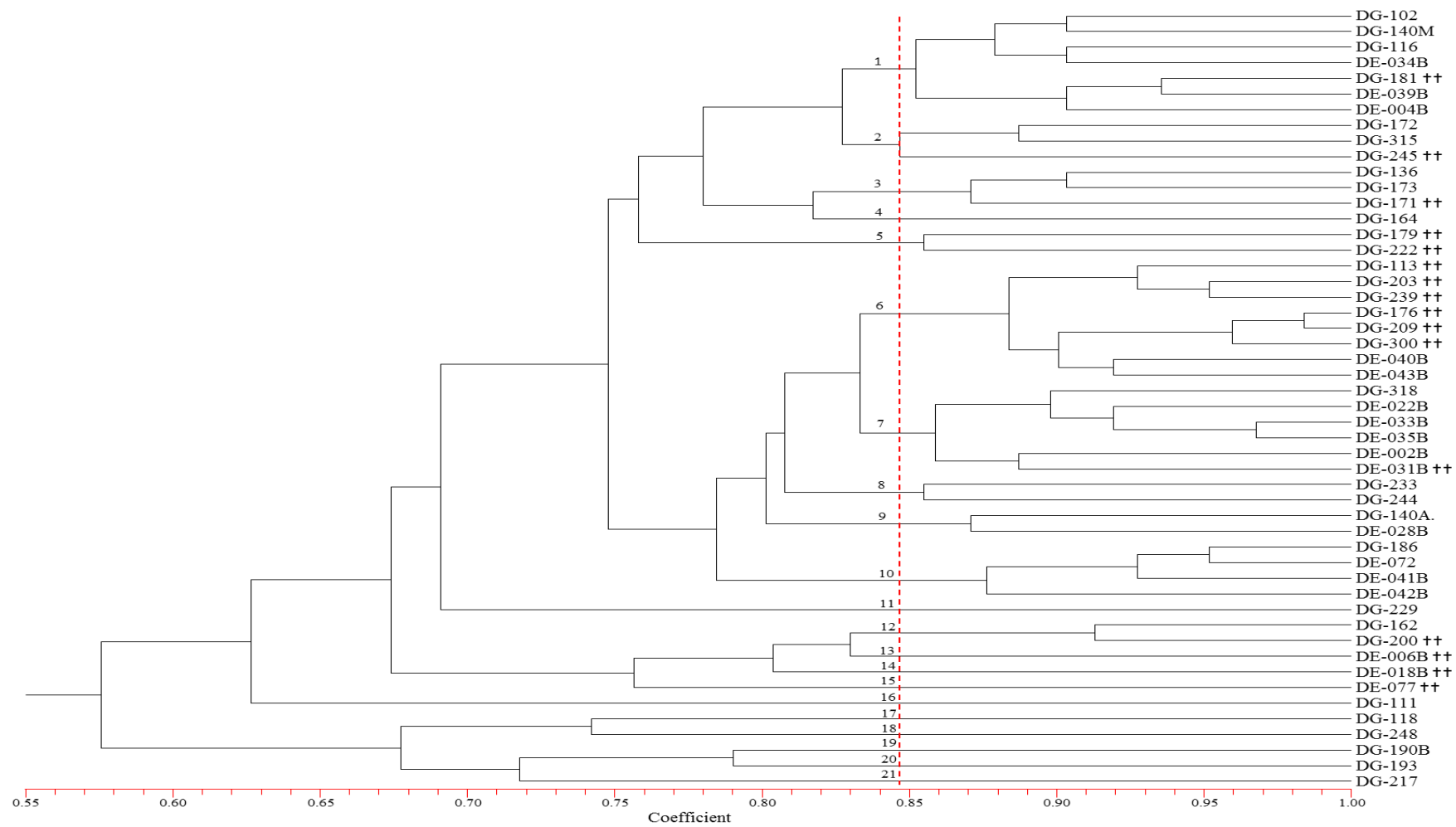


Figura 7. Dendrograma de datos fenotípicos construido mediante el coeficiente S_{SM} y el algoritmo UPGMA, con corte al 84,6% de similitud

†† Muestras utilizadas la identificación molecular del gen del ADNr 16S

3.2 Discusión general del trabajo

El enfoque de este estudio fue identificar cepas bacterianas aisladas de ecosistemas glaciares, andinos y antárticos. Los resultados de la evaluación de los caracteres genotípicos y fenotípicos procesados mediante taxonomía numérica permitieron generar grupos fenéticos, mientras que el secuenciamiento del gen del ADNr 16S y la construcción del árbol filogenético permitieron identificar las especies a las que pertenecen.

Mediante la comparación del dendrograma fenotípico con la agrupación por color, se encontró que, la distribución de 33 cepas bacterianas guardó congruencia entre ambos análisis. Según estudios, este tipo de comparaciones permite mostrar la coherencia entre las agrupaciones por color y los resultados de taxonomía numérica de caracteres fenotípicos, verificando la formación de grupos de colores preliminares de aislamientos para grandes colecciones de microorganismos (**Rodríguez et al., 2018; Vinuesa, 2010**).

De manera general, la mayor parte de la colección de cepas bacterianas se determinó como Gram negativa, psicrotrófica, neutrotolerante, halófila débil y halófila. Comparando los resultados fenotípicos con las características de las especies determinadas, se puede mencionar que las cepas DG-113, DG-200 y DE-006B fueron clasificadas como neutrotolerantes, mientras que la especie *Pseudomonas arsenicoxydans* es alcalófila (**Campos et al., 2010**), *Solibacillus isronensis* es alcalitolerante (**Shivaji et al., 2009**) y *Arthrobacter psychrochitiniphilus* es neutrotolerante (**F. Wang et al., 2009**). Por otra parte, en función a la salinidad las cepas DG-200 y DG-245 se clasificaron respectivamente como halófila extrema y halófila, mientras que las especies *Arthrobacter psychrochitiniphilus* y *Janthinobacterium lividum* son halófilas débiles (**Shivaji et al., 1991; F. Wang et al., 2009**). Esta comparación significa que, se ha descubierto características fisiológicas que no se conocía de las especies antes mencionadas.

La importancia de este estudio radica en la gran diversidad de la colección bacteriana, que proviene de ecosistemas geográficamente distintos, como la Antártida, el Cotopaxi y Chimborazo. Esto se observó debido a que, de las 16 cepas utilizadas en la identificación del gen del ADNr 16S, se pudo determinar la existencia de 11 especies

distintas. De las cuales, dos cepas fueron identificadas como probables especies nuevas. Mientras que de tres cepas no fue posible determinar una especie cercana. Una vez realizado el análisis de taxonomía polifásica, se ubicó 35 cepas bacterianas en función a la caracterización molecular. De 72 cepas estudiadas, solo se pudo ubicar la posición taxonómica polifásica del 48,6%, lo que significa que aún se desconoce la diversidad de la mitad de la colección de bacterias estudiadas.

Adicionalmente, el primer BOX como única prueba discriminatorio no es suficiente para poder encontrar la diversidad real. Por lo tanto, es necesario realizar un segundo análisis de las cepas que no se logró ubicar su posición taxonómica, debido a que, probablemente lo que se conoce en la actualidad está subestimando la diversidad completa de la colección. Además, para obtener una mayor robustez en los resultados de taxonomía numérica mediante rep-PCR se recomienda la utilización de los primers ERIC y REP conjuntamente, por ser efectivos al generar patrones específicos (**Ivanova et al., 2002**).

Finalmente, los 16 grupos finales de taxonomía polifásica asociados a las especies identificadas y la determinación de 21 grupos fenéticos obtenidos a partir de la caracterización fenotípica, deja una puerta abierta para que, el enfoque de futuras investigaciones sea dirigido hacia aplicaciones biotecnológicas, como la utilización de *Pseudomonas arsenicoxydans* en la eliminación del arsénico en el agua potable (**Azua-Bustos & González-Silva, 2014; Valenzuela et al., 2015**), la producción de carotenos a partir de *Arthrobacter psychrochitiniphilus* (**Silva et al., 2019; Vila, Hornero-Méndez, Azziz, Lareo, & Saravia, 2019**) o la evaluación de *Janthinobacterium lividum* como antimicrobiano contra bacterias multirresistentes (**Baricz et al., 2018**).

3.3 Verificación de la hipótesis

3.3.1 Hipótesis nula

La caracterización genotípica y fenotípica no permite determinar la diversidad de las cepas bacterianas aisladas de ecosistemas glaciares, andinos y antárticos.

3.3.2 Hipótesis alternativa

La caracterización genotípica y fenotípica permite determinar la diversidad de las cepas bacterianas aisladas de ecosistemas glaciares, andinos y antárticos

Después de haber analizado los resultados obtenidos y tras identificar 11 especies distintas, ubicar la posición taxonómica polifásica del 48,6% de la colección bacteriana y determinar la formación de 21 grupos fenéticos por caracterización fenotípica, se acepta la hipótesis alternativa. Afirmando que la caracterización genotípica y fenotípica permitieron determinar la diversidad de las cepas bacterianas aisladas de ecosistemas glaciares, andinos y antárticos.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se identificaron 35 de 72 cepas bacterianas, aisladas de ecosistemas glaciares, Andinos y Antárticos, a través de taxonomía polifásica. Logrando determinar la diversidad del 48,6% de la colección de bacterias. Por lo tanto, se concluye que es necesario realizar un segundo análisis con las muestras que no se pudieron secuenciar, debido a que, con la información actual la diversidad de la colección se encuentra subestimada y probablemente existan especies que no se han identificado.
- Se caracterizaron genotípicamente 72 cepas bacterianas mediante rep-PCR y fenotípicamente 50 cepas por análisis morfológicos y pruebas fisiológicas. La variedad de patrones de fingerprinting obtenidos permitió identificar la probable diversidad genética que existió en la colección. Mientras que las pruebas fenotípicas determinaron que la mayor parte de la colección fue Gram negativa, psicrótrofa, neutrotolerante, halófila débil y halófila. Además, mediante la comparación de los resultados fenotípicos experimentales con los descritos de las especies identificadas, se descubrió nuevas características fisiológicas de 4 especies distintas.
- Se determinó la diversidad genotípica, con la formación en primera instancia del dendrograma con 10 grupos coherentes. A partir de los cuales fueron seleccionados las cepas utilizadas para el secuenciamiento del gen del ADNr 16S y la caracterización fenotípica. Mientras que, la diversidad fenotípica se determinó mediante la formación de 21 grupos fenéticos a un corte del 84,6%.
- Se identificaron 16 cepas representantes de los grupos definidos en taxonomía numérica de patrones de fingerprinting. De estas, se logró identificar la presencia de 11 especies distintas, distribuidas en 9 géneros diferentes, siendo *Pseudomonas* el género más diverso. Por otro lado, basado en los parámetros

taxonómicos moleculares, las cepas DG-222 y DG-203 probablemente pertenezcan especies nuevas. Mientras que para las cepas DG-176, DG-209 y DG-300, no fue posible identificar una especie.

4.2 Recomendaciones

- Utilizar los primers BOX, ERIC y REP conjuntamente para obtener resultados más congruentes y robustos en la construcción del dendrograma genotípico.
- Ajustar los tiempos de desnaturalización, alineamiento y elongación del protocolo de patrones de fingerprinting por rep-PCR, para obtener un promedio entre 10 y 30 bandas amplificadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aislabie, J. M., Jordan, S., & Barker, G. M. (2008). Relation between soil classification and bacterial diversity in soils of the Ross Sea region, Antarctica. *Geoderma*, 144(1–2), 9–20. <https://doi.org/10.1016/J.GEODERMA.2007.10.006>
- Allison, D., & Gilbert, P. (2007). Bacteria. Chapter 3. In *Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology* (pp. 23–43). Oxford, UK: Blackwell Science Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470988329.ch3>
- Allman, E. S., & Rhodes, J. A. (2008). Phylogenetic ideals and varieties for the general Markov model. *Advances in Applied Mathematics*, 40(2), 127–148. <https://doi.org/10.1016/J.AAM.2006.10.002>
- Azua-Bustos, A., & González-Silva, C. (2014). Biotechnological applications derived from microorganisms of the Atacama Desert. *BioMed Research International*, 2014, 909312. <https://doi.org/10.1155/2014/909312>
- Babalola, O. O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters*, 32(11), 1559–1570. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0347-0>
- Bakermans, C. (2015). *Microbial evolution under extreme conditions*. (C. Bakermans, Ed.).
- BANCO NACIONAL DE ADN CARLOS III. (2013). *Programa de Control de calidad de muestras*. Salamanca.
- Baricz, A., Teban, A., Chiriac, C. M., Szekeres, E., Farkas, A., Nica, M., ... Coman, C. (2018). Investigating the potential use of an Antarctic variant of *Janthinobacterium lividum* for tackling antimicrobial resistance in a One Health approach. *Scientific Reports*, 8(1), 15272. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33691-6>
- Barrientos, L., Gidekel, M., & Gutiérrez, A. (2008). Characterization of rhizospheric bacteria isolated from *Deschampsia antarctica* Desv. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(10), 2289–2296. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9743-1>
- Benga, L., Benten, W. P. M., Engelhardt, E., Köhrer, K., Gougoula, C., & Sager, M. (2014). 16S ribosomal DNA sequence-based identification of bacteria in laboratory rodents: a practical approach in laboratory animal bacteriology diagnostics. *Laboratory Animals*, 48(4), 305–312. <https://doi.org/10.1177/0023677214538240>

- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2012). GenBank. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), D36–D42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
- Bilung, L. M., Pui, C. F., Su'ut, L., & Apun, K. (2018). Evaluation of BOX-PCR and ERIC-PCR as Molecular Typing Tools for Pathogenic *Leptospira*. *Disease Markers*, *2018*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2018/1351634>
- Bisen, P. (2014). *Microbial Taxonomy*.
- Bocci, C. (2007). Topics on phylogenetic algebraic geometry. *Expositiones Mathematicae*, *25*(3), 235–259. <https://doi.org/10.1016/J.EXMATH.2007.02.001>
- Bochner, B. R. (2009). Global phenotypic characterization of bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *33*(1), 191–205. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00149.x>
- Bolívar Anillo, H., Contreras Zentella, M., & Teherán Sierra, L. (2016). Burkholderia tropica una bacteria con gran potencial para su uso en la agricultura. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, *19*(2).
- Brenner, S., Miller, J. H., & Broughton, W. (William J. . (2002). *Encyclopedia of genetics*. Academic Press.
- Callegan, R. P., Nobre, M. F., McTernan, P. M., Battista, J. R., Navarro-Gonzalez, R., McKay, C. P., ... Rainey, F. A. (2008). Description of four novel psychrophilic, ionizing radiation-sensitive *Deinococcus* species from alpine environments. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, *58*(5), 1252–1258. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65405-0>
- Campos, V. L., Valenzuela, C., Yarza, P., Kämpfer, P., Vidal, R., Zaror, C., ... Rosselló-Móra, R. (2010). *Pseudomonas arsenicoxydans* sp nov., an arsenite-oxidizing strain isolated from the Atacama desert. *Systematic and Applied Microbiology*, *33*(4), 193–197. <https://doi.org/10.1016/J.SYAPM.2010.02.007>
- Casanellas, M., & Fernández-Sánchez, J. (2008). Geometry of the Kimura 3-parameter model. *Advances in Applied Mathematics*, *41*(3), 265–292. <https://doi.org/10.1016/J.AAM.2007.09.003>
- Cheng, C., Sun, J., Zheng, F., Wu, K., & Rui, Y. (2014). Molecular identification of clinical "difficult-to-identify" microbes from sequencing 16S ribosomal DNA and internal transcribed spacer 2. *Annals of Clinical*

- Microbiology and Antimicrobials*, 13, 1. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-13-1>
- Christner, B. C., Mosley-Thompson, E., Thompson, L. G., & Reeve, J. N. (2001). Isolation of bacteria and 16S rDNAs from Lake Vostok accretion ice. *Environmental Microbiology*, 3(9), 570–577. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00226.x>
- Christner, B. C., Mosley-Thompson, E., Thompson, L. G., Zagorodnov, V., Sandman, K., & Reeve, J. N. (2000). Recovery and Identification of Viable Bacteria Immured in Glacial Ice. *Icarus*, 144(2), 479–485. <https://doi.org/10.1006/ICAR.1999.6288>
- Chun, J. (1995). *Computer assisted classification and identification of actinomycetes*. Newcastle University.
- Colwell, R. R. (1970). Polyphasic taxonomy of the genus vibrio: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *Journal of Bacteriology*, 104(1), 410–433.
- Cowan, D. A., & Tow, L. A. (2004). Endangered Antarctic Environments. *Annual Review of Microbiology*, 58(1), 649–690. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090811>
- D’Amico, S., Collins, T., Marx, J.-C., Feller, G., & Gerday, C. (2006). Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Reports*, 7(4), 385–389. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400662>
- DeBaldo, A. C. (2005). Bacteria. In *Van Nostrand’s Scientific Encyclopedia*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471743984.vse0852>
- Díaz, A. P., Estrada, M. C., & Rodríguez, C. A. (2018). *Determinación preliminar de producción de compuestos bioactivos de actinomicetes y bacterias aislados de ecosistemas glaciares andinos y antárticos*. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería Bioquímica.
- Donelli, G., Vuotto, C., & Mastromarino, P. (2013). Phenotyping and genotyping are both essential to identify and classify a probiotic microorganism. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 24. <https://doi.org/10.3402/mehd.v24i0.20105>
- Dsouza, M., Taylor, M. W., Turner, S. J., & Aislabie, J. (2015). Genomic and phenotypic insights into the ecology of *Arthrobacter* from Antarctic soils. *BMC Genomics*, 16(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1220-2>

- Fierro Fierro, F., & Vergara Onofre, M. (2012). *Impacto de la biología molecular y las nuevas tecnologías en el conocimiento de la función celular y sus aplicaciones*.
- Fletcher, G. L., Hew, C. L., & Davies, P. L. (2001). Antifreeze Proteins of Teleost Fishes. *Annual Review of Physiology*, 63(1), 359–390. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.63.1.359>
- Garrity, G. M., Trüper, H. G., Whitman, W. B., Grimont, P. A. D., Nesme, X., Frederiksen, W., ... Swings, J. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(3), 1043–1047. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-3-1043>
- Garzón, D., & Rodríguez, C. A. (2013). *Determinación de la Biodiversidad Bacteriana en Ecosistemas Glaciares de la Antártida*.
- Gerardi, M., & Zimmerman, M. (2005). Chapter 9. Bacteria. In *Wastewater Pathogens* (pp. 53–66). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471710431.ch9>
- Gillis, M., Vandamme, P., Vos, P. De, Swings, J., & Kersters, K. (2015). Polyphasic Taxonomy. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–10). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.bm00021>
- Goo, K.-S., Tsuda, M., & Ulanova, D. (2014). *Salinispora arenicola* from temperate marine sediments: new intra-species variations and atypical distribution of secondary metabolic genes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(1), 207–219. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0067-2>
- Grimont, P. A. D., Grimont, F., & Irino, K. (1982). Biochemical characterization of *Serratia liquefaciens sensu stricto*, *Serratia proteamaculans*, and *Serratia grimesii* sp. nov. *Current Microbiology*, 7(2), 69–74. <https://doi.org/10.1007/BF01568416>
- Guardabassi, L., Dalsgaard, A., & Olsen, J. E. (2001). Phenotypic characterization and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. isolated from aquatic sources. *Journal of Applied Microbiology*, 87(5), 659–667. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00905.x>
- Halvorson, H. (1972). Utilization of single L -amino acids as sole source of carbon

- and nitrogen by bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 18(11), 1647–1650. <https://doi.org/10.1139/m72-255>
- Heras, J., Domínguez, C., Mata, E., Pascual, V., Lozano, C., Torres, C., & Zarazaga, M. (2015). GelJ – a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics*, 16(1), 270. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0703-0>
- Hossain, M. I., Sadekuzzaman, M., & Ha, S.-D. (2017). Probiotics as potential alternative biocontrol agents in the agriculture and food industries: A review. *Food Research International*, 100, 63–73. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2017.07.077>
- Hoyos, L., & Zapata, J. (2011). *ETIOLOGÍA DE LA MUERTE DESCENDENTE DEL DURAZNERO [PRUNUS PERSICA (L.) BATSCH] EN LOS MUNICIPIOS DE MANIZALES Y VILLAMARÍA, DEPARTAMENTO DE CALDAS*. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* (Vol. 35).
- Isaeva, A. S., Kulikov, E. E., Tarasyan, K. K., & Letarov, A. V. (2010). A Novel High-Resolving Method for Genomic PCR-Fingerprinting of Enterobacteria. *Acta Naturae*, 2(1), 82–88.
- Ivanova, E. P., Matte, G. R., Matte, M. H., Coenye, T., Huq, A., & Colwell, R. R. (2002). Characterization of *Pseudoalteromonas citrea* and *P. nigrifaciens* Isolated from Different Ecological Habitats Based on REP-PCR Genomic Fingerprints. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(2), 275–283. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00103>
- Johnson, J. L., & Ordal, E. J. (1968). Deoxyribonucleic acid homology in bacterial taxonomy: effect of incubation temperature on reaction specificity. *Journal of Bacteriology*, 95(3), 893–900.
- Jouzel, J., Petit, J. R., Souchez, R., Barkov, N. I., Lipenkov, V. Y., Raynaud, D., ... Avci, R. (1999). More than 200 meters of lake ice above subglacial Lake Vostok, Antarctica. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5447), 2138–2141. <https://doi.org/10.1126/science.286.5447.2138>
- Jukes, T. H., & Cantor, C. R. (1969). Evolution of Protein Molecules. *Mammalian Protein Metabolism*, 21–132. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-3211-9.50009-7>
- Junge, K., Christner, B., & Staley, J. T. (2011). Diversity of Psychrophilic Bacteria from Sea Ice - and Glacial Ice Communities. In *Extremophiles Handbook* (pp.

- 793–815). Tokyo: Springer Japan. https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1_39
- Kallimanis, A., LaButti, K. M., Lapidus, A., Clum, A., Lykidis, A., Mavromatis, K., ... Drainas, C. (2011). Complete genome sequence of *Arthrobacter phenanthrenivorans* type strain (Sphe3). *Standards in Genomic Sciences*, 4(2), 123–130. <https://doi.org/10.4056/sigs.1393494>
- Kämpfer, P., & Glaeser, S. P. (2012). Prokaryotic taxonomy in the sequencing era - the polyphasic approach revisited. *Environmental Microbiology*, 14(2), 291–317. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02615.x>
- Kleespies, M., Kroppenstedt, R. M., Rainey, F. A., Webb, L. E., & Stackebrandt, E. (1996). *Mycobacterium hodleri* sp. nov., a New Member of the Fast-Growii Mycobacteria Capable of Degrading Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(3), 683–687. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-3-683>
- Kondepudi, K., & Chandra, T. (2011). *Identification of osmolytes from a moderately halophilic and amylolytic Bacillus sp. strain TSCVKK*. *European Journal of Experimental Biology* (Vol. 1). iMedPub.
- Kysela, D. T., Randich, A. M., Caccamo, P. D., & Brun, Y. V. (2016). Diversity Takes Shape: Understanding the Mechanistic and Adaptive Basis of Bacterial Morphology. *PLOS Biology*, 14(10), e1002565. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002565>
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., & Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(20), 6955–6959.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2004). *Biología de los Microorganismos, BROCK* (10th ed.). Pearson Prentice Hall.
- Maloy, S., & Kolter, R. (Eds.). (2012). *Microbes and Evolution*. American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/9781555818470>
- Margesin, R. (2007). Alpine microorganisms: useful tools for low-temperature bioremediation. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 45(4), 281–285.
- Margesin, R., & Feller, G. (2010). Biotechnological applications of psychrophiles. *Environmental Technology*, 31(8–9), 835–844.

<https://doi.org/10.1080/09593331003663328>

- Marques, A. S. A., Marchaisson, A., Gardan, L., & Samson, R. (2008). BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae*: *P. viridiflava* group. *Genetics and Molecular Biology*, *31*(1), 106–115. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572008000100019>
- Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., ... Hakenbeck, R. (1992). A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Research*, *20*(13), 3479–3483.
- Martínez, M. (2016, October 3). MICROBIOLOGÍA BÁSICA (II): MIL Y UNA FORMAS BACTERIANAS. Retrieved November 4, 2018, from <https://allyouneedisbiology.wordpress.com/2016/11/10/microbiologia-forma-bacterias/#comments>
- Michaud, L., Cello, F., Brillì, M., Fani, R., Giudice, A., & Bruni, V. (2004). Biodiversity of cultivable psychrotrophic marine bacteria isolated from Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica). *FEMS Microbiology Letters*, *230*(1), 63–71. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00857-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00857-7)
- Mocali, S., Chiellini, C., Fabiani, A., Decuzzi, S., de Pascale, D., Parrilli, E., ... Fani, R. (2017). Ecology of cold environments: new insights of bacterial metabolic adaptation through an integrated genomic-phenomic approach. *Scientific Reports*, *7*(1), 839. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00876-4>
- Montes, M. J. (2005). *Estudio taxonómico polifásico de bacterias procedentes de ambientes antárticos : descripción de cuatro nuevas especies. Tesis Doctorales en Red*. Universitat de Barcelona.
- Moore, W. E. C., Stackebrandt, E., Kandler, O., Colwell, R. R., Krichevsky, M. I., Truper, H. G., ... Moore, L. H. (1987). Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *37*(4), 463–464. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-463>
- Navas, D., & Rodríguez, C. (2016). *Caracterización molecular de Actinomicetes provenientes de Ecosistemas antárticos*. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería Bioquímica.
- Neifar, M., Maktouf, S., Ghorbel, R. E., Jaouani, A., & Cherif, A. (2015).

- Extremophiles as source of novel bioactive compounds with industrial potential. In *Biotechnology of Bioactive Compounds* (pp. 245–267). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118733103.ch10>
- Nichols, D., Sanderson, K., Buia, A., van de Kamp, J., Holloway, P., Bowman, J., ... McMeekin, T. (2001). Bioprospecting and biotechnology in Antarctica. In J. Jabour-Green & M. Haward (Eds.), *The Antarctic: Past, Present and Future* (pp. 85–105).
- Olive, D. M., & Bean, P. (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1661–1669.
- Oren, A. (2007). Biodiversity in Highly Saline Environments. In *Physiology and Biochemistry of Extremophiles* (pp. 223–231). American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/9781555815813.ch17>
- Oren, A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-4-2>
- Ponder, M. A., Gilmour, S. J., Bergholz, P. W., Mindock, C. A., Hollingsworth, R., Thomashow, M. F., & Tiedje, J. M. (2005). Characterization of potential stress responses in ancient Siberian permafrost psychroactive bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 53(1), 103–115. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.12.003>
- Reinoso, E., & Rodríguez, C. (2018). *Identificación y clasificación de bacterias con potencial en biotecnología vegetal*. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería Bioquímica.
- Rhodes, M. E. (1959). The Characterization of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of General Microbiology*, 21(1), 221–263. <https://doi.org/10.1099/00221287-21-1-221>
- Rodríguez, C. A., Gavilánez, T. C., Chamorro, J. P., Vinueza, A. G., Salazar, D. M., & Arancibia, M. Y. (2018). Selective Isolation and Phenotypic Characterization of Bacteria and Actinomycetes from Oil-contaminated Soils. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 151(1), 012039. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/151/1/012039>
- Rohlf, F. J. (1988). *NTSYS-pc : numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Applied Biostatistics, Inc.

- Rosselló-Mora, R., & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(1), 39–67. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00571.x>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Schinner, F., Margesin, R., & Pümpel, T. (1992). Extracellular Protease-producing Psychrotrophic Bacteria from High Alpine Habitats. *Arctic and Alpine Research*, 24(1), 88–92. <https://doi.org/10.1080/00040851.1992.12002932>
- See-Too, W. S., Salazar, S., Ee, R., Convey, P., Chan, K.-G., & Peix, Á. (2017). *Pseudomonas versuta* sp. nov., isolated from Antarctic soil. *Systematic and Applied Microbiology*, 40(4), 191–198. <https://doi.org/10.1016/J.SYAPM.2017.03.002>
- Sengun, I. Y., & Karabiyikli, S. (2011). Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*, 22(5), 647–656. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2010.11.008>
- Shida, O., H., T., Kadowaki, K., Nakamura, L. K., & Komagata, K. (1997). Emended Description of *Paenibacillus amylolyticus* and Description of *Paenibacillus illinoisensis* sp. nov. and *Paenibacillus chibensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(2), 299–306. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-299>
- Shivaji, S., Chaturvedi, P., Begum, Z., Pindi, P. K., Manorama, R., Padmanaban, D. A., ... Narlikar, J. V. (2009). *Janibacter hoylei* sp. nov., *Bacillus isronensis* sp. nov. and *Bacillus aryabhatai* sp. nov., isolated from cryotubes used for collecting air from the upper atmosphere. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 59(12), 2977–2986. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.002527-0>
- Shivaji, S., Ray, M. K., Kumar, G. S., Reddy, G. S. N., Saisree, L., & Wynn-Williams, D. D. (1991). Identification of *Janthinobacterium lividum* from the soils of the islands of Scotia Ridge and from Antarctic peninsula. *Polar Biology*, 11(4), 267–271. <https://doi.org/10.1007/BF00238461>
- Silva, T. R., Tavares, R. S. N., Canela-Garayoa, R., Eras, J., Rodrigues, M. V. N., Neri-Numa, I. A., ... Oliveira, V. M. (2019). Chemical Characterization and

- Biotechnological Applicability of Pigments Isolated from Antarctic Bacteria. *Marine Biotechnology*, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s10126-019-09892-z>
- Singh, P., Singh, S. M., & Roy, U. (2016). Taxonomic characterization and the bio-potential of bacteria isolated from glacier ice cores in the High Arctic. *Journal of Basic Microbiology*, 56(3), 275–285. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500298>
- Singh, & Satyanarayana. (2017). Basic Microbiology. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 1–31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63668-3.00001-9>
- Sjöling, S., & Cowan, D. A. (2003). High 16S rDNA bacterial diversity in glacial meltwater lake sediment, Bratina Island, Antarctica. *Extremophiles*, 7(4), 275–282. <https://doi.org/10.1007/s00792-003-0321-z>
- Sokal, R. R. (1963). The Principles and Practice of Numerical Taxonomy. *Taxon*, 12(5), 190. <https://doi.org/10.2307/1217562>
- Stackebrandt, E., & Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. In *MICROBIOLOGY TODAY* (Vol. 33, pp. 152–155). Society for General Microbiology.
- Stackebrandt, E. (2011). Molecular taxonomic parameters. *Microbiology Austral*, 32(2), 59–61.
- Tacão, M., Alves, A., Saavedra, M. J., & Correia, A. (2005). BOX-PCR is an Adequate Tool for Typing *Aeromonas* spp. *Antonie van Leeuwenhoek*, 88(2), 173–179. <https://doi.org/10.1007/s10482-005-3450-9>
- ThermoFisher/Scientific. (2017). TrackIt 1 Kb Plus DNA Ladder - Thermo Fisher Scientific. Retrieved January 30, 2019, from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10488085>
- Thompson, C. C., Chimetto, L., Edwards, R. A., Swings, J., Stackebrandt, E., & Thompson, F. L. (2013). Microbial genomic taxonomy. *BMC Genomics*, 14, 913. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-913>
- Tutino, M. L., Duilio, A., Parrilli, R., Remaut, E., Sannia, G., & Marino, G. (2001). A novel replication element from an Antarctic plasmid as a tool for the expression of proteins at low temperature. *Extremophiles : Life under Extreme Conditions*, 5(4), 257–264.
- Vaishnav, D., Parekh, V., Mendpara, J., Vaghela, S., Makasana, A., Kunjadia, P., ... Dave, G. (2013). Isolation and characterization of high salt tolerant bacteria from

- agricultural soil. *European Journal of Experimental Biology*, 3(6), 351–358.
- Valenzuela, C., Moraga, R., Leon, C., Smith, C. T., Mondaca, M.-A., & Campos, V. L. (2015). Arsenite Oxidation by *Pseudomonas arsenicoxydans* Immobilized on Zeolite and Its Potential Biotechnological Application. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 94(5), 667–673. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1495-7>
- van Belkum, A., & Hermans, P. W. M. (2001). BOX PCR Fingerprinting for Molecular Typing of *Streptococcus pneumoniae*. In *Antibiotic Resistance Methods and Protocols* (pp. 159–168). New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-077-2:159>
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, 60(2), 407–438.
- Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19(24), 6823–6831.
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J., & Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5(08987750), 25–44.
- Vila, E., Hornero-Méndez, D., Azziz, G., Lareo, C., & Saravia, V. (2019). Carotenoids from heterotrophic bacteria isolated from Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica. *Biotechnology Reports*, 21, e00306. <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2019.E00306>
- Vinueza, A. G. (2010). *Determinación De La Relación Entre La Caracterización fenotípica y Genotípica de Actinomicetes como mecanismo de dereplicación de microorganismos útiles en biotecnología.*
- Waites, M., Morgan, N., Rockey, J., & Highton, G. (2001). *Industrial Microbiology: An Introduction*. London: Blackwell Science Ltd.
- Wang, F., Gai, Y., Chen, M., & Xiao, X. (2009). *Arthrobacter psychrochitiniphilus* sp. nov., a psychrotrophic bacterium isolated from Antarctica. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 59(11), 2759–2762. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.008912-0>
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier

- for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Wassenaar, T. M. (2012). *Bacteria : the Benign, the Bad, and the Beautiful*. Wiley-Blackwell.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/JB.173.2.697-703.1991>
- Whyte, L. G., & Miller, R. V. (Eds.). (2012). *Polar Microbiology: Life in a Deep Freeze*. American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/9781555817183>
- Yang, J., Cao, Y., Cai, Y., & Terada, F. (2010). Natural populations of lactic acid bacteria isolated from vegetable residues and silage fermentation. *Journal of Dairy Science*, 93(7), 3136–3145. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2898>
- Young, J. M. (1977). Nomenclatural Status of *Pseudomonas barkeri* (Berridge 1924) Dowson 1943 and *Pseudomonas washingtoniae* (Pine 1943) Elliott 1951: Request for an opinion. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 27(3), 300–303. <https://doi.org/10.1099/00207713-27-3-300>
- Zdanowski, M. K., & Węgleński, P. (2001). Ecophysiology of soil bacteria in the vicinity of Henryk Arctowski Station, King George Island, Antarctica. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(6), 819–829. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00230-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00230-3)
- Zhang, Y.-Q., Li, W.-J., Kroppenstedt, R. M., Kim, C.-J., Chen, G.-Z., Park, D.-J., ... Jiang, C.-L. (2005). *Rhodococcus yunnanensis* sp. nov., a mesophilic actinobacterium isolated from forest soil. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 55(3), 1133–1137. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.63390-0>
- Zhu, C., Delmont, T. O., Vogel, T. M., & Bromberg, Y. (2015). Functional Basis of Microorganism Classification. *PLoS Computational Biology*, 11(8), e1004472. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004472>

ANEXOS

Anexo A. Datos y resultados

Tabla A1. Información detallada del origen y características de cepas bacterianas

Origen de cepas de bacterias						
#	ID	ID asignado	ID muestra de suelo	Origen	Medio	Temperatura °C
1	DG-101	DG-101	Arena	Antártida	AN	26
2	DG-102	DG-102	Arena	Antártida	AN	26
3	DG-104	DG-104	Sedimentos	Antártida	AN	26
4	DG-110	DG-110	Suelo	Antártida	AN	26
5	DG-111	DG-111	Suelo	Antártida	AN	26
6	DG-113	DG-113	Suelo	Antártida	AN	26
7	DG-116	DG-116	Suelo	Antártida	AN	26
8	DG-117	DG-117	Suelo	Antártida	AN	26
9	DG-118	DG-118	Arena	Antártida	AN	26
10	DG-124	DG-124	Arena	Antártida	AN	26
11	DG-125	DG-125	Sedimentos	Antártida	AN	26
12	DG-127	DG-127	Sedimentos	Antártida	AN	26
13	DG-130	DG-130	Suelo	Antártida	WA	26
14	DG-136	DG-136	Suelo	Antártida	WA	26
15	DG-140	DG-140A.	Arena	Antártida	WA	26
16	DG-140 Amarillo. Marfil	DG-140M	Arena	Antártida	WA	26
17	DG-141	DG-141	Arena	Antártida	WA	26
18	DG-156	DG-156	Arena	Antártida	AN	26
19	DG-162	DG-162	Arena	Antártida	WA	26
20	DG-163	DG-163	Arena	Antártida	WA	26
21	DG-164	DG-164	Arena	Antártida	WA	26
22	DG-165	DG-165	Arena	Antártida	WA	26
23	DG-171	DG-171	Arena	Antártida	WA	26
24	DG-172	DG-172	Arena	Antártida	WA	26
25	DG-173	DG-173	Arena	Antártida	WA	26
26	DG-176	DG-176	Sedimentos	Antártida	WA	26
27	DG-179	DG-179	Suelo	Antártida	WA	26
28	DG-181	DG-181	Suelo	Antártida	WA	26
29	DG-183B	DG-183B	Sedimentos	Antártida	WA	26
30	DG-186	DG-186	Suelo	Antártida	WA	26
31	DG-186C	DG-186C	Suelo	Antártida	WA	26
32	DG-187	DG-187	Suelo	Antártida	AN	26
33	DG-190B	DG-190B	Arena	Antártida	AN	26
34	DG-190'	DG-190'	Arena	Antártida	AN	26

Tabla A1. Continuación

35	DG-192.	DG-192.	Arena	Antártida	AN	26	*
36	DG-193	DG-193	Sedimentos	Antártida	AN	26	*
37	DG-196	DG-196	Suelo	Antártida	AN	26	
38	DG-200	DG-200	Arena	Antártida	AN	4	*
39	DG-203	DG-203	Arena	Antártida	AN	4	*
40	DG-205	DG-205	Arena	Antártida	AN	4	
41	DG-209	DG-209	Arena	Antártida	AN	4	*
42	DG-213	DG-213	Arena	Antártida	AN	4	*
43	DG-215	DG-215	Arena	Antártida	AN	4	
44	DG-217	DG-217	Arena	Antártida	AN	4	*
45	DG-219*	DG-219*	Suelo	Antártida	AN	4	*
46	DG-221	DG-221	Suelo	Antártida	AN	4	
47	DG-222	DG-222	Suelo	Antártida	AN	4	*
48	DG-229	DG-229	Sedimentos	Antártida	AN	4	*
49	DG-233	DG-233	Sedimentos	Antártida	AN	4	*
50	DG-235	DG-235	Sedimentos	Antártida	AN	4	*
51	DG-236	DG-236	Sedimentos	Antártida	AN	4	*
52	DG-239	DG-239	Suelo	Antártida	AN	4	*
53	DG-243	DG-243	Suelo	Antártida	AN	4	
54	DG-244	DG-244	Suelo	Antártida	AN	4	*
55	DG-245	DG-245	Suelo	Antártida	AN	4	*
56	DG-247	DG-247	Arena	Antártida	AN	4	
57	DG-248	DG-248	Arena	Antártida	AN	4	*
58	DG-300	DG-300	Suelo	Antártida	WA	4	*
59	DG-302	DG-302	Suelo	Antártida	WA	4	*
60	DG-303	DG-303	Sedimentos	Antártida	WA	4	*
61	DG-304	DG-304	Sedimentos	Antártida	WA	4	
62	DG-305	DG-305	Sedimentos	Antártida	WA	4	
63	DG-309	DG-309	Sedimentos	Antártida	WA	4	
64	DG-315	DG-315	Arena	Antártida	WA	4	*
65	DG-316	DG-316	Arena	Antártida	WA	4	
66	DG-318	DG-318	Arena	Antártida	WA	4	*
67	DG-319	DG-319	Arena	Antártida	WA	4	
68	DE-002B	DE 090	DR 031	Antártida	PDA	26	*
69	DE-003B	DE 091	CH0	Chimborazo	AV	26	*
70	DE-004B	DE 092	CH1	Chimborazo	AV	26	*
71	DE-005B	DE 093	CH0	Chimborazo	AV	26	*
72	DE-006B	DE 094	CH3	Chimborazo	AS	26	*
73	DE-007B	DE 095	CH2	Chimborazo	GYM	26	
74	DE-015B	DE 103	CH0	Chimborazo	AV	26	*
75	DE-016	DE 016	CH3	Chimborazo	AV	26	*
76	DE-017B	DE 105	CH3	Chimborazo	AC	8	*

Tabla A1. Continuación

77	DE-018B	DE 106	CH2	Chimborazo	AC	8	*
78	DE-021B	DE 109	CH3	Chimborazo	GYM	8	*
79	DE-022B	DE 110	CH1	Chimborazo	AS	8	*
80	DE-027B	DE 115	CX3	Cotopaxi	GYM	26	*
81	DE-028B	DE 116	CH1	Chimborazo	GYM	8	*
82	DE-029B	DE 117	CH0	Chimborazo	GYM	8	*
83	DE-030B	DE 118	CX3	Cotopaxi	GYM	26	*
84	DE-031B	DE 119	CX3	Cotopaxi	GYM	26	*
85	DE-032B	DE 120	CX3	Cotopaxi	AV	26	*
86	DE-033B	DE 121	CH1	Chimborazo	AC	8	*
87	DE-034B	DE 122	CH1	Chimborazo	AC	8	*
88	DE-035B	DE 123	CX0	Cotopaxi	GYM	8	*
89	DE-036B	DE 124	CX3	Cotopaxi	GYM	26	*
90	DE-037B	DE 125	CH2	Chimborazo	AC	26	*
91	DE-038B	DE 126	CX2	Cotopaxi	AC	26	*
92	DE-039B	DE 127	CX2	Cotopaxi	AC	26	*
93	DE-040B	DE 128	CX2	Cotopaxi	AC	8	*
94	DE-041B	DE 129	CX1	Cotopaxi	AC	8	*
95	DE-042B	DE 130	CX1	Cotopaxi	AC	8	*
96	DE-043B	DE 131	CX2	Cotopaxi	GYM	8	*
97	DE-044B	DE 132	CX3	Cotopaxi	GYM	8	
98	DE-066B	DE 066	CA	Antártida	GYM	26	*
99	DE-072B	DE 072	CX3	Cotopaxi	AV	26	*
100	DE-077B	DE 077	CH3	Chimborazo	AC	26	*

La codificación de las muestras con letras iniciales DG pertenecen al estudio de **Garzón & Rodríguez (2013)**, mientras que las codificaciones DE pertenecen al estudio de **Díaz et al. (2018)**. En la columna ID asignado se muestra las codificaciones utilizadas en los estudios de Garzón, Díaz y Estrada.

* Muestras utilizadas para caracterización molecular.

Tabla A2. Cuantificación de ADN genómico

Cuantificación de ADN bacteriano mediante espectrofotometría						
ID	Extracción por Fenol-Cloroformo			Extracción por kit comercial		
	Concentración (ng/μl)	260/280	260/230	Concentración (ng/μl)	260/280	260/230
DG-102	110,9	1,9	1,5	13,8	1,6	-0,6
DG-104	5,6	1,3	-3,4	9,4	1,4	-0,4
DG-110	6,0	1,6	3,4	144,9	1,8	4,5
DG-111	16,4	1,3	0,4	13,4	1,6	-0,5
DG-113	1622,2	1,8	1,5	-	-	-
DG-116	39,5	1,8	0,8	63,2	1,7	-7,9
DG-117	12,6	1,4	1,2	23,4	1,4	-0,4
DG-118	34,4	1,4	0,6	46,2	1,6	5,2
DG-125	491,5	1,8	1,1	428,6	1,8	2,4
DG-127	4,3	1,7	0,3	24,0	1,5	-1,9
DG-130	1037,2	1,8	1,1	-	-	-
DG-136	0,4	0,6	0,0	25,3	1,5	-45,2
DG-140 A.	7,8	1,4	1,8	32,9	1,7	-2,5
DG-140 M	6,7	2,2	-1,4	11,3	1,2	-1,1
DG-141	10,5	1,6	0,4	13,1	1,4	-0,6
DG-156	91,4	1,3	0,4	-	-	-
DG-162	20,8	2,0	7,8	15,9	1,7	-0,6
DG-163	14,8	1,5	0,8	107,0	1,8	6,4
DG-164	7,4	1,6	0,6	25,3	1,7	-22,0
DG-165	3,1	1,5	1,0	18,2	1,5	-0,8
DG-171	16,9	1,6	1,0	7,5	1,4	-0,3
DG-172	171,5	1,8	1,1	-	-	-
DG-173	7,5	1,7	0,3	28,9	1,7	-1,8
DG-176	26,0	1,5	0,5	16,1	1,6	-0,6
DG-179	59,4	1,8	1,1	-	-	-
DG-181	6,9	1,0	0,2	14,6	1,5	-0,7
DG-183B	10,2	2,2	0,1	4,1	0,7	-0,1
DG-186	3,5	1,7	2,0	24,0	1,8	-1,0
DG-186C	25,4	1,7	1,2	51,1	1,8	-13,2
DG-187	34,2	1,8	2,0	450,8	1,9	2,5
DG-190B	146,8	1,8	1,1	155,5	1,8	3,0
DG-192.	4,5	1,5	0,8	12,2	1,9	-0,3
DG-193	189,2	1,7	1,0	440,9	1,8	2,3
DG-200	23,7	2,2	-9,0	138,0	1,8	4,0
DG-203	142,5	2,0	2,0	39,0	1,7	7,0
DG-209	839,6	1,5	0,6	152,6	1,8	3,0
DG-213	11,7	1,5	1,7	48,4	1,8	-3,6
DG-217	36,1	1,7	1,1	60,2	1,7	-9,2

Tabla A2. Continuación

DG-219*	23,7	1,8	1,5	28,4	1,9	-1,2
DG-222	27,4	1,7	1,0	-	-	-
DG-229	142,4	1,5	0,5	-	-	-
DG-233	1370,7	1,6	0,8	-	-	-
DG-235	150,3	1,6	0,8	48,2	1,7	22,5
DG-236	6,3	1,3	4,2	16,2	1,9	-0,6
DG-239	2,3	1,1	-0,3	23,8	1,7	-1,2
DG-244	233,3	1,8	1,0	-	-	-
DG-245	11,3	1,6	0,7	122,2	1,8	4,1
DG-248	15,6	1,9	2,3	6,4	1,8	-0,2
DG-300	1454,7	1,6	1,0	-	-	-
DG-302	158,0	1,7	0,8	200,7	1,8	3,2
DG-303	332,1	1,9	1,2	-	-	-
DG-315	145,6	1,9	1,5	39,5	1,9	-2,3
DG-318	1553,5	1,8	1,3	-	-	-
DE-002B	357,2	1,5	0,6	-	-	-
DE-003B	67,0	1,5	0,6	-	-	-
DE-004B	411,1	1,7	1,1	-	-	-
DE-005B	13,0	1,5	1,0	-	-	-
DE-006B	29,4	1,8	1,7	-	-	-
DE-015B	121,9	1,7	0,9	-	-	-
DE-016	552,9	1,8	1,6	-	-	-
DE-017B	7,1	1,4	0,5	-	-	-
DE-018B	25,0	1,5	1,3	-	-	-
DE-021B	346,7	1,9	1,2	-	-	-
DE-022B	509,9	1,7	1,0	-	-	-
DE-027B	637,6	1,5	0,5	-	-	-
DE-028B	282,6	1,9	2,1	-	-	-
DE-029B	35,1	1,6	0,8	-	-	-
DE-030B	133,1	1,8	1,1	-	-	-
DE-031B	505,2	1,8	1,3	-	-	-
DE-032B	-	-	-	-	-	-
DE-033B	135,8	1,4	0,6	-	-	-
DE-034B	269,8	1,5	0,5	-	-	-
DE-035B	723,3	1,4	0,5	-	-	-
DE-036B	562,0	1,8	1,2	-	-	-
DE-037B	56,2	1,9	1,6	-	-	-
DE-038B	242,5	1,6	0,6	-	-	-
DE-039B	1347,2	1,7	1,2	-	-	-
DE-040B	441,3	1,6	0,8	-	-	-
DE-041B	575,0	1,9	1,6	-	-	-
DE-042B	568,1	1,9	1,2	-	-	-

Tabla A2. Continuación

DE-043B	1074,2	1,6	0,9	-	-	-
DE-066	63,6	1,8	1,3	-	-	-
DE-072	478,8	1,9	1,5	-	-	-
DE-077	86,1	1,9	1,5	-	-	-

Tabla A3. Concentración ADN genómico de muestras seleccionadas para secuenciación del gen del ADNr 16S

ID	Concentración (ng/μl)	260/280	260/230
DE-006B	142,2	1,58	0,59
DE-018B	102,7	1,25	1,20
DE-031B	322,7	1,62	0,58
DE-034B	485,0	1,50	0,68
DE-077	31,9	1,58	0,98
DG-203	966,3	1,73	0,97
DG -209	368,1	1,64	0,71
DG -245	534,2	1,58	0,75
DG-113	9,5	1,63	0,85
DG-140A.	38,7	1,78	1,25
DG-164	223,2	1,78	0,97
DG-171	532,3	1,38	0,58
DG-176	76,1	1,76	1,11
DG-179	271,9	1,14	0,38
DG-181	240,8	1,58	2,06
DG-200	77,4	1,85	1,31
DG-222	139,9	1,54	0,96
DG-239	904,0	1,55	0,72
DG-300	29,7	1,87	3,65

Tabla A4. Secuencias del gen del ADNr 16S de bacterias

Código	Secuencia del gen del ADNr 16S (5'-3')	Especie cercana	Número de nucleótidos
DG-200	<p>GCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGATCTGGCGCTTGCCTCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTAAC TCTGGGATAAGCCTTGGAAACGGGGTCTAATACTGGATATTGACTTTACCTCGCATGGGGTTTGGTTGAAAGATTTATTGGTTTTGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTG AGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA CAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGTAGGGAACAAGGCCAGCATTTTTGTTGGTTGAGGGTACTTGCAGA AGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTGCCGTGAAAGT CCGGGGCTCAACCCCGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGTGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGC GAAGGCAGGTCTCTGGGCACTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACA TTCCACGTTTTCCGCGCCGTAGCTAACGCAATTAAGTGCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAACAAGCGCGGAGCATGCGG ATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATGAACCGTAATACCTGGAACAGGTGCCCGCTTGCCTGGTTTACAGGTGGTGCA TGGTTGTCGTCAGCTC GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCTATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCATAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGAG GACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTATGCTTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTC GGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATAACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCCGCCGTC AAGTACGAAA GTTGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTTGTGGGAAGGAGCTGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACT</p>	<i>Arthrobacter psychrochitiniphilus</i>	1441
DG-222	<p>GCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCCCGCTTGCGGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTAAC TGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATAACGGATATTACCTCCCGCCGCATGGTGGGGGGTGGAAAGCCTTGTGCGGTTTTGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGG GGTAATGGCCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC AATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGC TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTGCCCCTGAAAAGTCCGGGGCTAAC CCCGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGTGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCT CTGGGCATTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACATTCCACGTTTTCC GCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCAACAAGCGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGC AACCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGAACCGGAAACGCTTGGAAACAGGCGCCCCGCTTGCCTGCGGTTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATG TTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCATGTTGCCAGCGGGTTATGCCGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAAT CATATGCCCTTATGCTTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAGGGTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTG CAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCCGCCGTC AAGTACGAAAAGTTGGTAACACCC GAAGCCGGTGGCCTAACCCCTTGTGGGAAGGAGCTGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACT</p>	<i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i>	1450

Tabla A4. Continuación

DG-179	<p>GCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGTAAACACATGCAAGTCGAACGATGATGCCAGCTTGTCTGGTGGATTAAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGCTGAGTAACCTGCCCTTAACCT TGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATATGACTCCTCATCGCATGGTGGGGGGTGGAAAGCTTTATTGTGGTTTTGGATGGACTCGCGGCCCTATCAGCTTGTGGTGA GGTAATGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC AATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCCGGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGC TAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTAATGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGTTTGTGCGCTTGCCGTGAAAGTCCGGGGCTCAAC TCCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGTAGGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCT CTGGGCATTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACCGTTGGGCACTAGGTGTGGGGACATTCCACGTTTTCC GCGCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGGCGAGCATGCGGATTAATTCGATGC AACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGAACCGGAAATACCTGGAACAGGTGCCCGCTTGCGGTCCGTTTACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATG TTGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCTCGTTTATGTTGCCAGCGCGTTATGGCGGGGACTCATAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAAAT CATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTACGCATGTACAAATGGCCGGTACAAAAGGTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTG CAACTCGACCCCTGAAGTCGGAGTCGTAAGTACGAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCACGAAAGTTGGTAACACCC GAAGCCGGTGGCCTAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGCGAAGGTGGGACTGGCGATTGG</p>	<i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i>	1446
DG-171	<p>GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGTAAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGCTGGGTGATCTGCCCTGCACTCT GGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTGCTCTCGCATGGGGGTGGGTGGAAAAGATTTATCGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCCTATCAGCTTGTGGTGGGG TAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT GGGGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCCGGTGAGGGATGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAACCTTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCAGGCTAA CTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGAGTTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTGTTTGTGAAAACCCGGGGCTCAACTTC GGGCTTGCAGGGCGATACGGGCAGACTTGAAGTGTTCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTG GGAAACAACCTGACGCTGAGGAACGAAAGCGTGGGTAGCAAAACAGGATTAAGTACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTCTTCCACGGAATCTGTG CCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAAC GCGAAGAACCTTACCTGGGTTGACATACACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTCCGTTGACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGG GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTTATGTTGCCAGCGGTTATGCGGGGACTCGTAAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATC ATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGTACAATGGCCAGTACAGAGGGCTGCGAGACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCTGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAA CTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAA GCCGGTGGCCTAACCATTTATGGGGGGAGCCGTGCAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGAA</p>	<i>Rhodococcus yunnanensis</i>	1436
DE-077	<p>CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGTAAACACATGCAAGTCGAACGGAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGCTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCG GGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTGGGATGCAATGCTCTTGGTGGAAAGCTTTTGCGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCCCTATCAGCTTGTGGTGGGGT AAGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATG GGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCCGGTGAGGGACGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTTTTCAGCACAGACGAAGCGCAAGTGACGGTATGTGCAGAAGAAGGACCGGCCAAC TACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTCCGAGCGTTGTCCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTTGTGCGGTTGTTCGTGAAAACCTCAGCTCAACTGTG GGCGTGGGGCGATACGGGCAGACTAGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGG GCAGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGGTGGTACTAGGTGTGGTTTCCCTTGGGATCCGTGC CGTAGCTAACGCATTAAGTACCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGAAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACG CGAAGAACCTTACCTGGGTTTGTACATGCACAGGACGTGCTAGAGATAGGTAATCCCTTGTGGCTGTGTGCAAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGT TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTATGTTGCCAGCGCTCATGGCGGGGACTCGTAAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCAT GCCCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGTACAATGGCCGGTACAAAAGGCTGCGATGCCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACT CGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGTAAGTACGAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAG CGGTGGCCTAACCCCTCGTGGGGAGGGAGCCGTGCAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGAA</p>	<i>Mycolicibacterium hodleri</i>	1437

Tabla A4. Continuación

DE-006B	<p>TGGCTCAGGACGAACCGGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGAAATTTTATTGGTGTTCACCTTTAAAAATTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACCGTGGGTAACC TACCTTATAGATTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATACTTTTAAACACATGTTTAAAAAGTTGAAAAGACGGTGTGCTGTACTATAAGATGGACCCGCGGGC CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA GTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAAGGATTTCGGTTCGTA AAAACTCTGTTGCAAGGGAAGAACAAGTAGCGTAGTAACTGG CGCTACCTTGACGGTACCTTGTAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGTTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTAATGGGCGTAAAAGCGCGCAGGTG GTCCCTAAGTCTGATGTGAAAACCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGAAAACCTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGATAGTGGAAATCCAAGTGTAGCGGTGAAAATGCGTA GAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCACTGTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC GATGAGTGTAAAGTGTGGGGGGTTCCGCCCTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCC GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGGAAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGGTGACCACTATGGAGACATAGTTCCCTTCGGGGGCAACGGTGACA GGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTCTTAGTTGCCATCATTACAGTTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGG TGATAAACCGGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGTACACACGTGTACAATGGACGGTACAAACGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTA ATCCGATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACA CACCGCTCCACACCGAGAGTTGTAAACACCCGAAGTCCGTAGGTAACTTTGGAGCCAGCCGCGAAGGTGGGATGATGATTGGGGTGAAGTCCGTAACA</p>	<i>Solibacillus isronensis</i>	1495
DE-018B	<p>CAGGACGAACGCTGGCGGCATGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACTTGAAGAGAAGCTTGCTTCTGATNGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACCGTAGGCAACCTGCCCTC AAGTTTGGGACAACCTACCGGAAACGGTAGCTAATACCGAATAGTTGTTTTCTTCGCTGAAGAAAACCTGAAAAGACGGAGCAATCTGTACTTTGGGATGGGCCTGCGGCGCATT GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG GAATCTCCGCAATGGGCGAAAAGCCTGACGGGAGCAATGCCGCGTGAAGTGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACCGTTGGGAGAGTAACGCTCTCAA GGTGACGGTACCTGAGAAGAAAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTAATGGGCGTAAAAGCGCGCAGGGCGTCA TTAAGTCTGGTGTAAATCCCGGGGCTCAACCCGGATCGCACTGGAAAACCTGGGTGACTTGAAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCACAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGT GGAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCACTCTCTGGGCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGT GCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCCTGGTGGCGAAGTTAACACATTAAGCACTCCGCCTGGGAGTACGGTGCAGAACTGAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAG CAGTGGAGTATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGCAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTCTGATCGATGCAGAGATGTAATCTTTCCTTCGGGACAGAGGAGACAGGTGGTGCA TGGTTGTCTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATATTAGTTGCCAGCACTTCGGGTGGGCACCTAGATAGACTGCCGGTGACAAAAC CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTAATAAATGGCCGTTACAACGGGCTGCGAAAATCGCGAGATGGAGCCAATCCCAAC AAAGCCGCTCAGTTCGGATTGCAAGCTGCAACTCGCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACCCGC CCGTACACACCAGAGAGTTTATAACACCCGAAGTCCGTGGGGTAACCGCAAGGAGCCAGCCGCGAAGGTGGGATAGATGATTGGGGTGAAGTCCGTAACAGGG</p>	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	1485
DG-245	<p>ACCTCATGCTCGTGGAGCGCCGATATCTGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAAGCCTACCAAGGCATCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACACCAGCCACACTGGAACCTGAGAC ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAAGGAGGCTTCGGGTTGTAAGGCTCTTTTGTCA GGGAAAGAACCGTGGGGGCTAATATCCTTTGCTAATGACGGTACCTGAAGAAATAAGCACCCGGTAACTACGTGCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGAAGCGTTAATCGGA ATTACTGGGCGTAAAAGCGTGGCAGGGCGTTTTTGTAAAGTCTGATGTGAAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTGGAGACTGCAAGGCTAGAATCTGGCAGAGGGGGTAGA ATTCCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGTCAAGATTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTA GATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAAACGATGTCTACTAGTTGTGGGCTTAAATGACTTGGTAACGCAGCTAACCGCGTGAAGTAGACCCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTA AACTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACCGGAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGCTGGAATCCTTGAGAGATTGAGG AGTGCTCGAAAAGAGAACCAGTACACAGGTGCTGATGGCTGTCTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTATTAGTTGCTACGAAAAG GGCCTCTAATGAGACTGCCGGTGAACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGCTACATAATGGTACATACAGAGCGCC GCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCGCAGAAAAGTGTATCGTAGTCCGGATTGATGCTGCAACTCGACTGCAATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGTCCGGGTG AATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCCGCTACACCATGGGAGCGGGTTTTACCAGAAGTAGGTAGCTTAAACCGCAAGGAGGGCGCTTACCACGGTAGGATTCGTACTGGGG TGA</p>	<i>Janthinobacterium lividum</i>	1275

Tabla A4. Continuación

DE-031B	<p>AAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAAGAGAGCTTGCTCTCTGGGTGACGAGCGGGACGGGTGAGTAAT GTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGCTTCCGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTACGCCATCAGATGTGCCAG ATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC AGCAGTGGGGAAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACCTTCAGCGAGGAGGAAGGGTTCAGTGTAAAT AGCACTGTTCAATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACCTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGC AGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGCGCTAACCTGGGAACTGCATTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATG CGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGT AAACGATGTGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGAGCTAACCGCTTAAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGG CCGGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCCACAGAATTCGGCAGAGATGCCTTAGTGCCCTTCGGGAACTGTGAGAC AGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGTCTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCTTTGTTGCCAGCGCTAATGGCGGGAACCTAAAGGAGACTGC CGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGGATGACGTCGAAGTCATCATGGCCCTACGAGTAGGGGTACACACGCTGCTACAATGGCGTATACAAAGAGAAGCGAAGTCCGCGAGAGCCA CGGACCTCATAAAGTACGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTAAGTCCGGAATCGTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGCCCTT GTACACACCGCCCGTACACCATTGGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACTTCGGGAGGGCGCTTACCACCTTTGTGATTATGACTGGGGTGAAGTCGTAACA</p>	<i>Serratia grimesii</i>	1460
DG-176	<p>GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGTACTTGTACTTGGTGGCGAGCGGGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGT AGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATAACGCTTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTCGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGG TGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATTGG ACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTCCGGATTGTAAAGCACTTAAAGTTGGGAGGAAGGGCATTTACCTAATACGTAAGTGTGTTGACGTT ACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTAAAGTTGG ATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAAAAGTGAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTTCCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAA CACCAGTGGCGAAGGCGACCCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCC GTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA GCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAGCATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGT CGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCACCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAG GAAGGTGGGGATGACGTCGAAGTCATCATGGCCCTTACGGCTGGGCTACACACGCTGCTACAATGGTGGTACAGAGGGTGGCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCAGAAAACC GATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTTGTACACACCGCCCTCA CACCATGGGAGTGGGTTGACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTATGACTGGGGTGAAGTCGTA</p>	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	1472
DG-209	<p>GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGTACTTGTACTTGGTGGCGAGCGGGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGT AGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATAACGCTTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTCGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGG TGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATTGG ACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTCCGGATTGTAAAGCACTTAAAGTTGGGAGGAAGGGCATTTACCTAATACGTAAGTGTGTTGACGTT ACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTAAAGTTGG ATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAAAAGTGAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTTCCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAA CACCAGTGGCGAAGGCGACCCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCC GTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA GCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGGGCACCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAG CGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCACCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAG GAAGGTGGGGATGACGTCGAAGTCATCATGGCCCTTACGGCTGGGCTACACACGCTGCTACA</p>	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	1213

Tabla A4. Continuación

DG-300	<p>GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCAACAACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGTACTTGTACCTGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGT AGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACTGCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTCGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGG TGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTACAGACAGGTCACAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATTGG ACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCCTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATAACCTAAATACGTTGGTGTCTTGACGTT ACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGG ATGTGAAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAAACTGACAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAA CACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCCACTAGCC GTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA GCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGT CGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAG GAAGGTGGGGATGACGTCGAAGTCATCATGGCCCTTACGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCAAAAAACC GATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCACAATGTCGCGGTGAAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA ACCATGCGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGCGAGGACG</p>	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	1434
	<i>Pseudomonas. mandelii</i>	1434	
	<i>Pseudomonas. silesiensis</i>	1434	
DG-203	<p>GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCAACAACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGTACTTGTACCTGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGT AGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACTGCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTCGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGG TGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTACAGACAGGTCACAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATTGG ACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCCTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTACCTAAATACGTAAGTGTGTTGACGTT ACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGG ATGTGAAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAAACTGACAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAA CACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCC GTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAANTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA GCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTCTGCTAGAGATAGCGGAGTGCCTTCNGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGT CGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAA GAAGGTGGGGATGACGTCGAAGTCATCATGGCCCTTACGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTACAGAGGGTTGCCAAG</p>	<i>Pseudomonas syringae pv. syringae</i>	1199
	<i>Pseudomonas syringae pv. syringae</i>	1199	
DG-113	<p>GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCAACAACATGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTTGTAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGT GGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACTGCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTCGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGA GGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTACAGACAGGTCACAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATTGGACA ATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCCTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAAATACGTAATCTGTTTTGACGTTACC GACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGT GAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAAACTGACAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACC AGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTG GGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGAGCAT GTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTC AGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAAAGAAA GTGGGGATGACGTCGAAGTCATCATGGCCCTTACGGCTGGGCTACACANNTGCTACAATGGTGGTACAGAAAGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCAAAAAACCGATCG TAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCNTGAAGTCCGAATCGCTAGTAATCGCGAATC</p>	<i>Pseudomonas arsenicoydans</i>	1329
	<i>Pseudomonas arsenicoydans</i>	1329	

Tabla A4. Continuación

DG-239	<p>GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTCTTGAGAGCGGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGT GGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATAACGCTACGGGAGAAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTGA GGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACA ATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTAAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTATCTGTTTTGACGTTACC GACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGT GAAATCCCCGGGCTAACCTGGGAACTGCATTCAAACTGACAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACC AGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGCCACTAGCCGTTG GGAGCCTTGAGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCAT GTGGTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC AGTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTAAGGTGGGCACCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAG GTGGGGATGACGTC AAGTCATCATGGCCCTTACGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATC GTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAATCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCACAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACC ATGGGAGTGGGTTGCACCAGAA</p>	<i>Pseudomonas arsenicoydans</i>	1406
DG-181	<p>CTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTCTTGAGAGCGGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGT GGGGATAACGTTTCGGAACGAACGCTAATACCGCATAACGCTACGGGAGAAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTGA GTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA TGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTAAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGTGTTTACGTTACCG ACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTG AAATCCCCGGGCTAACCTGGGAACTGCATTCAAACTGACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCA GTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTAATACTGACACTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGG AAGCCTTGAGCTTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATG TGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC GCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTCATGGTGGGCACCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAG TGGGGATGACGTC AAGTCATCATGGCCCTTACGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAAACCGATCGT AGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAATCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCAT GGGAGTGGGTTGCACCAGAAAGTAGTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCTACTGGGGT</p>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1456

Tabla A5. Matriz de similaridad y diferencia de nucleótidos de cepas bacterianas secuenciadas del género *Arthrobacter*

Especie	<i>Arthrobacter psychrochitiniphilus</i>	<i>Arthrobacter alpinus</i>	<i>Arthrobacter cryoconiti</i>	<i>Arthrobacter stackebrandtii</i>	<i>Arthrobacter psychrolactophilus</i>	DG-200
<i>Arthrobacter psychrochitiniphilus</i>	---	19/1444	25/1441	27/1440	18/1413	9/1441
<i>Arthrobacter alpinus</i>	98,68	---	32/1524	35/1517	28/1414	23/1465
<i>Arthrobacter cryoconiti</i>	98,27	97,90	---	29/1516	33/1413	34/1461
<i>Arthrobacter stackebrandtii</i>	98,13	97,69	98,09	---	29/1413	33/1460
<i>Arthrobacter psychrolactophilus</i>	98,73	98,02	97,66	97,95	---	26/1414
DG-200	99,38	98,43	97,67	97,74	98,16	---

Tabla A6. Matriz de similaridad y diferencia de nucleótidos de cepas bacterianas secuenciadas del género *Pseudarthrobacter*

Especie	<i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i>	<i>Pseudarthrobacter polychromogenes</i>	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	DG-179	DG-222
<i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i>	---	11/1469	10/1483	13/1446	31/1450
<i>Pseudarthrobacter polychromogenes</i>	99,25	---	1/1468	12/1447	34/1450
<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	99,33	99,93	---	11/1448	35/1451
DG-179	99,10	99,17	99,24	---	26/1447
DG-222	97,86	97,66	97,59	98,20	---

Tabla A7. Matriz de similaridad y diferencia de nucleótidos de cepas bacterianas secuenciadas del género *Rhodococcus*

Especie	<i>Rhodococcus yunnanensis</i>	<i>Rhodococcus cercidiphylli</i>	<i>Rhodococcus kyotonensis</i>	DG-171
<i>Rhodococcus yunnanensis</i>	---	16/1427	20/1392	13/1436
<i>Rhodococcus cercidiphylli</i>	98,88	---	31/1382	25/1426
<i>Rhodococcus kyotonensis</i>	98,56	97,76	---	20/1401
DG-171	99,09	98,25	98,57	---

Tabla A8. Matriz de similaridad y diferencia de nucleótidos de cepas bacterianas secuenciadas del género *Mycolicibacterium*

Especie	<i>Mycolicibacterium hodleri</i>	<i>Mycolicibacterium vanbaalenii</i>	<i>Mycolicibacterium aurum</i>	DE-077
<i>Mycolicibacterium hodleri</i>	---	40/1459	37/1438	11/1437
<i>Mycolicibacterium vanbaalenii</i>	97,26	---	14/1453	31/1444
<i>Mycolicibacterium aurum</i>	97,43	99,04	---	29/1444
DE-077	99,23	97,85	97,99	---

Tabla A9. Matriz de similaridad y diferencia de nucleótidos de cepas bacterianas secuenciadas del género *Solibacillus*

Especie	<i>Solibacillus isronensis</i>	<i>Solibacillus silvestris</i>	<i>Solibacillus kalamii</i>	DE-006B
<i>Solibacillus isronensis</i>	---	13/1505	23/1492	6/1495
<i>Solibacillus silvestris</i>	99,14	---	21/1476	11/1472
<i>Solibacillus kalamii</i>	98,46	98,58	---	21/1480
DE-006B	99,60	99,25	98,58	---

Tabla A10. Matriz de similaridad y diferencia de nucleótidos de cepas bacterianas secuenciadas del género *Paenibacillus*

Especie	<i>Paenibacillus tylopili</i>	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	<i>Paenibacillus xylanexedens</i>	<i>Paenibacillus tundrae</i>	DE-018B
<i>Paenibacillus tylopili</i>	---	11/1467	21/1472	4/1472	9/1454
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	99,25	---	14/1503	9/1503	5/1485
<i>Paenibacillus xylanexedens</i>	98,57	99,07	---	19/1514	14/1490
<i>Paenibacillus tundrae</i>	99,73	99,40	98,75	---	8/1490
DE-018B	99,38	99,66	99,06	99,46	---

Tabla A11. Matriz de similaridad y diferencia de nucleótidos de cepas bacterianas secuenciadas del género *Janthinobacterium*

Espece	<i>Janthinobacterium lividum</i>	<i>Janthinobacterium agaricidamnosum</i>	DG-245
<i>Janthinobacterium lividum</i>	---	13/1468	7/1275
<i>Janthinobacterium agaricidamnosum</i>	99,11	---	11/1274
DG-245	99,45	99,14	---

Tabla A12. Matriz de similaridad y diferencia de nucleótidos de cepas bacterianas secuenciadas del género *Serratia*

Espece	<i>Serratia proteamaculans</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>ISerr.grim</i>	<i>Serr.liqu2</i>	<i>Serratia quinivorans</i>	<i>Serratia grimesii</i>	DE-031B
<i>Serratia proteamaculans</i>	---	5/1502	4/1495	7/1500	6/1502	4/1460	13/1484
<i>Serratia liquefaciens</i>	99,67	---	5/1495	4/1542	9/1508	5/1460	18/1497
<i>ISerr.grim</i>	99,73	99,67	---	3/1493	8/1495	0/1460	13/1480
<i>Serr.liqu2</i>	99,53	99,74	99,80	---	11/1506	2/1458	14/1495
<i>Serratia quinivorans</i>	99,60	99,40	99,46	99,27	---	3/1460	19/1484
<i>Serratia grimesii</i>	99,73	99,66	100,00	99,86	99,79	---	11/1460
DE-031B	99,12	98,80	99,12	99,06	98,72	99,25	---

Tabla A13. Matriz de similitud y diferencia de nucleótidos de cepas bacterianas secuenciadas del género *Pseudomonas*

Especie	<i>Pseudomonas silesiensis</i>	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> ^s	<i>Pseudomonas mandelii</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	<i>Pseudomonas poae</i>	<i>Pseudomonas lurida</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i>	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Pseudomonas lini</i>	DG-203	DG-209	DG-113	DG-176	DG-181	DG-239	DG-300
<i>Pseudomonas silesiensis</i>	---	7/1527	2/1518	15/1480	27/1492	26/1492	27/1462	14/1435	22/1516	13/1516	15/1237	4/1213	20/1329	5/1472	32/1461	19/1406	12/1434
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	99,54	---	7/1518	17/1479	29/1492	29/1492	26/1462	20/1435	26/1516	14/1512	15/1237	4/1213	26/1329	5/1472	31/1461	25/1406	13/1434
<i>Pseudomonas mandelii</i>	99,87	99,54	---	14/1473	28/1492	27/1492	28/1462	15/1435	22/1516	13/1509	15/1237	4/1213	20/1329	6/1472	33/1461	19/1406	13/1434
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	98,99	98,85	99,05	---	35/1460	38/1460	36/1430	29/1396	30/1471	26/1464	20/1199	13/1175	29/1291	17/1434	41/1424	29/1368	23/1396
<i>Pseudomonas poae</i>	98,19	98,06	98,12	97,60	---	3/1492	9/1462	15/1428	19/1492	19/1491	34/1229	27/1205	19/1323	29/1464	9/1456	20/1400	35/1426
<i>Pseudomonas lurida</i>	98,26	98,06	98,19	97,40	99,80	---	10/1462	14/1428	19/1492	18/1491	34/1229	27/1205	18/1323	29/1464	10/1456	19/1400	36/1426
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	98,15	98,22	98,08	97,48	99,38	99,32	---	15/1428	15/1462	19/1461	31/1229	24/1205	20/1323	26/1459	8/1456	20/1400	29/1426
<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i>	99,02	98,61	98,95	97,92	98,95	99,02	98,95	---	9/1435	7/1434	28/1235	17/1211	7/1329	19/1431	20/1430	6/1406	26/1431
<i>Pseudomonas migulae</i>	98,55	98,28	98,55	97,96	98,73	98,73	98,97	99,37	---	13/1509	32/1235	23/1211	12/1329	25/1470	20/1461	12/1406	26/1432
<i>Pseudomonas lini</i>	99,14	99,07	99,14	98,22	98,73	98,79	98,70	99,51	99,14	---	26/1234	16/1210	12/1328	17/1469	22/1460	11/1405	24/1431
DG-203	98,79	98,79	98,79	98,33	97,23	97,23	97,48	97,73	97,41	97,89	---	13/1211	27/1232	13/1236	33/1233	28/1234	17/1236
DG-209	99,67	99,67	99,67	98,89	97,76	97,76	98,01	98,60	98,10	98,68	98,93	---	21/1208	0/1212	27/1209	21/1210	6/1212
DG-113	98,50	98,04	98,50	97,75	98,56	98,64	98,49	99,47	99,10	99,10	97,81	98,26	---	24/1330	21/1329	7/1330	27/1330
DG-176	99,66	99,66	99,59	98,81	98,02	98,02	98,22	98,67	98,30	98,84	98,95	100,00	98,20	---	29/1464	22/1408	10/1437
DG-181	97,81	97,88	97,74	97,12	99,38	99,31	99,45	98,60	98,63	98,49	97,32	97,77	98,42	98,02	---	22/1407	32/1434
DG-239	98,65	98,22	98,65	97,88	98,57	98,64	98,57	99,57	99,15	99,22	97,73	98,26	99,47	98,44	98,44	---	24/1408
DG-300	99,16	99,09	99,09	98,35	97,55	97,48	97,97	98,18	98,18	98,32	98,62	99,50	97,97	99,30	97,77	98,30	---

Tabla A14. Formación de grupos de color de cepas bacterianas

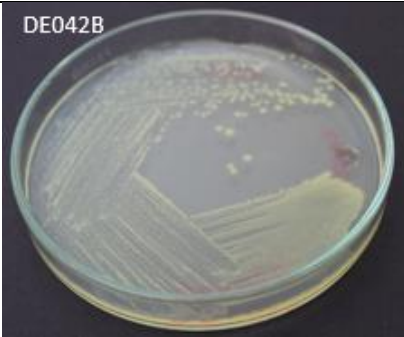

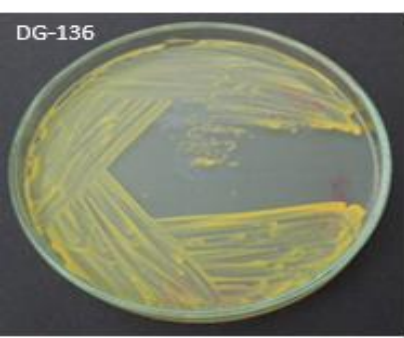
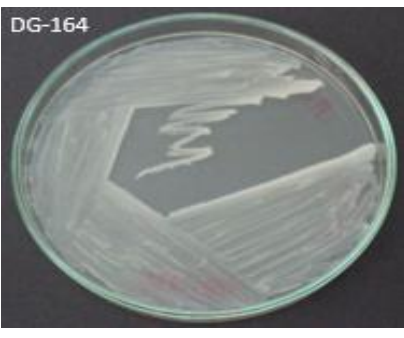
Grupo	Color	ID	Representantes
1	309 Canary Yellow	DE-041B, DE-042B, DE-072, DG-162, DG-186, DG-193	 <p>DE042B</p>
2	310 Primrose	DE-002B, DE-034B, DG-200, DG-229, DG-248	 <p>DG-229</p>
3	356 Golden Yellow	DG-136, DG-171, DG-173, DG-217	 <p>DG-136</p>
4	365 Vellum	DE-004B, DG-116, DG-140M, DG-164, DG-179, DG-222	 <p>DG-164</p>

Tabla A14. Continuación


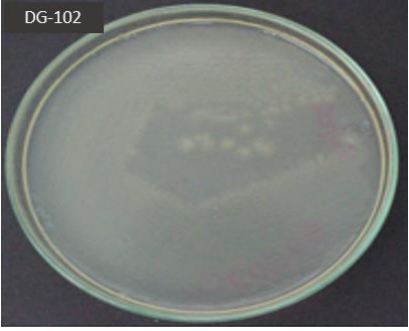
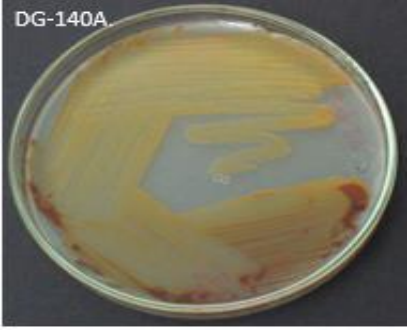

5	366 Light Beige	DG-111	
6	367 Manilla	DG-102	
7	447 Salmon Pink	DE-077, DG140A., DG-190B	
8	627 Light Aircraft Grey	DE-006B, DE-018B, DE-022B, DE-028B, DE-031B, DE-033B, DE-035B, DE-039B, DE-040B, DE-043B, DG-113, DG-118, DG-172, DG-176, DG-181, DG-203, DG-209, DG-233, DG-239, DG-244, DG-245, DG-300, DG-315, DG-318	

Tabla A15. Información detallada de clasificación macroscópica y microscópica de bacterias

ID	Caracterización macroscópica			Caracterización microscópica		
	Forma	Elevación	Margen	Forma	Gram	Endospora
DG-102	irregular	convexa	entero	coco	negativo	no
DG-111	circular	umbonada	entero	coco	positivo	no
DG-113	circular	umbonada	rizado	bacilo	negativo	no
DG-116	irregular	convexa	entero	coco	negativo	no
DG-118	irregular	plana	entero	bacilo	negativo	no
DG-136	irregular	plana	entero	coco	positivo	no
DG140A.	circular	plana	ondulado	coco	negativo	no
DG-140M	irregular	convexa	entero	coco	positivo	no
DG-162	irregular	convexa	entero	bacilo	positivo	no
DG-164	circular	plana	entero	coco	positivo	no
DG-171	circular	plana	ondulado	coco	positivo	no
DG-172	irregular	umbonada	entero	coco	negativo	no
DG-173	irregular	plana	entero	bacilo	positivo	no
DG-176	circular	umbonada	rizado	bacilo	negativo	no
DG-179	irregular	umbonada	entero	coco	positivo	no
DG-181	irregular	convexa	entero	bacilo	negativo	no
DG-186	circular	umbonada	rizado	coco	negativo	no
DG-190B	irregular	convexa	entero	pleomórfica	positivo	no
DG-193	irregular	plana	entero	pleomórfica	negativo	no
DG-200	irregular	convexa	entero	bacilo	positivo	no
DG-203	circular	plana	ondulado	bacilo	negativo	no
DG-209	circular	umbonada	rizado	bacilo	negativo	no
DG-217	irregular	convexa	entero	coco	positivo	no
DG-222	irregular	plana	entero	coco	positivo	no
DG-229	circular	convexa	ondulado	coco	positivo	no
DG-233	circular	convexa	ondulado	coco	negativo	no
DG-239	circular	plana	lobado	bacilo	negativo	no
DG-244	circular	convexa	entero	coco	negativo	no
DG-245	irregular	convexa	entero	bacilo	negativo	no
DG-248	irregular	plana	entero	bacilo	negativo	no
DG-300	circular	plana	rizado	bacilo	negativo	no
DG-315	irregular	plana	entero	coco	negativo	no
DG-318	circular	umbonada	rizado	coco	negativo	no
DE-002B	circular	umbonada	rizado	coco	negativo	no
DE-004B	irregular	convexa	entero	bacilo	negativo	no

Tabla A15. Continuación

DE-006B	irregular	convexa	entero	bacilo	positivo	si
DE-018B	irregular	plana	entero	bacilo	positivo	si
DE-022B	circular	umbonada	rizado	coco	negativo	no
DE-028B	circular	plana	ondulado	coco	negativo	no
DE-031B	circular	umbonada	lobado	bacilo	negativo	no
DE-033B	circular	umbonada	rizado	coco	negativo	no
DE-034B	irregular	convexa	entero	coco	negativo	no
DE-035B	circular	umbonada	rizado	coco	negativo	no
DE-039B	irregular	convexa	entero	bacilo	negativo	no
DE-040B	circular	plana	rizado	bacilo	negativo	no
DE-041B	circular	plana	rizado	coco	negativo	no
DE-042B	irregular	convexa	entero	coco	negativo	no
DE-043B	circular	plana	rizado	bacilo	negativo	no
DE-072	circular	plana	rizado	coco	negativo	no
DE-077	irregular	convexa	entero	bacilo	positivo	no

Tabla A16. Clasificación de bacterias en función al rango de temperatura

ID	Temperatura °C				Clasificación
	4	20	26	37	
DG-102	1	1	1	0	Psicrótrofo
DG-111	1	1	1	0	Psicrótrofo
DG-113	1	1	1	0	Psicrótrofo
DG-116	1	1	1	1	Mesófilo extremo
DG-118	1	1	1	0	Psicrótrofo
DG-136	1	1	1	0	Psicrótrofo
DG140A.	1	1	1	1	Mesófilo extremo
DG-140M	1	1	1	0	Psicrótrofo
DG-162	nd	nd	nd	nd	No definido
DG-164	1	1	1	1	Mesófilo extremo
DG-171	1	1	1	0	Psicrótrofo
DG-172	1	1	1	0	Psicrótrofo
DG-173	1	1	1	1	Mesófilo extremo
DG-176	1	1	1	0	Psicrótrofo
DG-179	1	1	1	0	Psicrótrofo
DG-181	1	1	1	0	Psicrótrofo
DG-186	1	1	1	0	Psicrótrofo
DG-190B	1	1	1	1	Mesófilo extremo
DG-193	1	1	1	0	Psicrótrofo
DG-200	1	1	1	0	Psicrótrofo
DG-203	1	1	1	0	Psicrótrofo
DG-209	1	1	1	0	Psicrótrofo
DG-217	1	1	1	0	Psicrótrofo
DG-222	1	1	1	0	Psicrótrofo
DG-229	1	1	1	0	Psicrótrofo
DG-233	1	1	1	0	Psicrótrofo
DG-239	1	1	1	0	Psicrótrofo
DG-244	1	1	1	0	Psicrótrofo
DG-245	0	1	1	0	Mesófilo
DG-248	1	1	1	1	Mesófilo extremo
DG-300	1	1	1	0	Psicrótrofo
DG-315	1	1	1	1	Mesófilo extremo
DG-318	1	1	1	1	Mesófilo extremo
DE-002B	1	1	1	0	Psicrótrofo
DE-004B	1	1	1	0	Psicrótrofo
DE-006B	1	1	1	0	Psicrótrofo
DE-018B	1	1	1	1	Mesófilo extremo
DE-022B	1	1	1	0	Psicrótrofo
DE-028B	1	1	1	0	Psicrótrofo

Tabla A16. Continuación

DE-031B	1	1	1	0	Psicrótrofo
DE-033B	1	1	1	0	Psicrótrofo
DE-034B	1	1	1	0	Psicrótrofo
DE-035B	1	1	1	1	Mesófilo extremo
DE-039B	1	1	1	0	Psicrótrofo
DE-040B	1	1	1	0	Psicrótrofo
DE-041B	1	1	1	0	Psicrótrofo
DE-042B	1	1	1	0	Psicrótrofo
DE-043B	1	1	1	0	Psicrótrofo
DE-072	1	1	1	0	Psicrótrofo
DE-077	0	0	1	0	Mesófilo

Tabla A17. Clasificación de bacterias en función al rango de pH

ID	pH					Clasificación
	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	
DG-102	1	1	1	1	1	Neutrotolerante
DG-111	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-113	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-116	1	1	1	1	1	Neutrotolerante
DG-118	0	0	1	1	1	Alcalitolerante
DG-136	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG140A.	1	1	1	1	1	Neutrotolerante
DG-140M	1	1	1	1	1	Neutrotolerante
DG-162	nd	nd	nd	nd	nd	No determinado
DG-164	1	1	1	1	1	Neutrotolerante
DG-171	1	1	1	1	1	Neutrotolerante
DG-172	1	1	1	1	1	Neutrotolerante
DG-173	1	1	1	1	1	Neutrotolerante
DG-176	0	1	1	0	0	Neutrófilo
DG-179	0	0	1	1	1	Alcalitolerante
DG-181	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-186	0	1	1	1	0	Neutrófilo
DG-190B	0	1	1	1	0	Neutrófilo
DG-193	1	1	1	1	1	Neutrotolerante
DG-200	1	1	1	1	1	Neutrotolerante
DG-203	0	1	1	1	0	Neutrófilo
DG-209	0	1	1	1	0	Neutrófilo
DG-217	1	1	1	1	1	Neutrotolerante
DG-222	0	1	1	1	0	Neutrófilo
DG-229	1	1	1	1	1	Neutrotolerante
DG-233	0	1	1	1	0	Neutrófilo
DG-239	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-244	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-245	0	1	1	1	0	Neutrófilo
DG-248	1	1	1	1	1	Neutrotolerante
DG-300	0	1	1	1	0	Neutrófilo
DG-315	0	1	1	1	1	Alcalitolerante
DG-318	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE-002B	1	1	1	1	1	Neutrotolerante
DE-004B	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE-006B	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE-018B	1	1	1	1	1	Neutrotolerante
DE-022B	0	1	1	1	0	Neutrófilo
DE-028B	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE-031B	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE-033B	1	1	1	1	0	Neutrotolerante

Tabla A17. Continuación

DE-034B	1	1	1	1	1	Neutrotolerante
DE-035B	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE-039B	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE-040B	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE-041B	0	1	1	1	0	Neutrófilo
DE-042B	0	1	1	1	0	Neutrófilo
DE-043B	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE-072	0	1	1	1	0	Neutrófilo
DE-077	1	1	0	0	0	Acidófilo

Tabla A18. Clasificación de bacterias en función al rango de salinidad

ID	Salinidad				Clasificación
	1%	5%	10%	15%	
DG-102	1	1	0	0	Halófilo
DG-111	1	1	0	0	Halófilo
DG-113	1	0	0	0	Halófilo débil
DG-116	1	1	1	1	Halófilo extremo
DG-118	1	1	0	0	Halófilo
DG-136	1	1	0	0	Halófilo
DG140A.	1	1	0	0	Halófilo
DG-140M	1	1	0	0	Halófilo
DG-162	nd	nd	nd	nd	No definido
DG-164	1	1	1	1	Halófilo extremo
DG-171	1	1	1	0	Halófilo extremo
DG-172	1	1	1	1	Halófilo extremo
DG-173	1	1	1	0	Halófilo extremo
DG-176	1	0	0	0	Halófilo débil
DG-179	1	1	0	0	Halófilo
DG-181	1	1	1	1	Halófilo extremo
DG-186	1	0	0	0	Halófilo débil
DG-190B	1	1	1	1	Halófilo extremo
DG-193	1	1	1	1	Halófilo extremo
DG-200	1	1	0	0	Halófilo
DG-203	1	0	0	0	Halófilo débil
DG-209	1	0	0	0	Halófilo débil
DG-217	1	1	1	1	Halófilo extremo
DG-222	1	0	0	0	Halófilo débil
DG-229	1	1	1	1	Halófilo extremo
DG-233	1	1	0	0	Halófilo
DG-239	1	0	0	0	Halófilo débil
DG-244	1	1	0	0	Halófilo
DG-245	1	1	1	1	Halófilo extremo
DG-248	1	1	1	1	Halófilo extremo
DG-300	1	0	0	0	Halófilo débil
DG-315	1	1	0	0	Halófilo
DG-318	1	1	1	0	Halófilo extremo
DE-002B	1	1	0	0	Halófilo
DE-004B	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-006B	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-018B	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-022B	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-028B	1	1	0	0	Halófilo

Tabla A18. Continuación

DE-031B	1	1	0	0	Halófilo
DE-033B	1	1	0	0	Halófilo
DE-034B	1	1	0	0	Halófilo
DE-035B	1	1	1	0	Halófilo extremo
DE-039B	1	1	0	0	Halófilo
DE-040B	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-041B	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-042B	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-043B	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-072	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-077	0	0	0	0	No tolerante

Anexo B. Preparación de soluciones y medios de cultivo

Tabla B1. Ingredientes del búfer TE 1X

Ingrediente	Concentración (mM)
Tris HCL pH 8	10
EDTA pH 8	1

Tabla B2. Ingredientes del búfer TBE 10X

Ingrediente	Cantidad
Tris Base	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA pH 8	7,4 g
Agua destilada	1000 ml

Tabla B3. Ingredientes para el búfer de extracción de ADN

Ingrediente	Concentración (mM)
Glucosa	50
Tris HCL pH 8	25
EDTA	10

Tabla B4. Solución de sistema de búfers

pH	0,1 M Ácido cítrico (ml)	0,2 M Na₂HPO₄ (ml)
2,6	89,10	10,90
3	79,45	20,55
3,5	69,75	30,25
4	61,45	38,55
4,5	54,57	45,43
5	48,50	51,50
5,5	43,13	56,87
6	36,85	63,15
6,5	29,04	70,96
7	17,65	82,35
7,5	7,62	92,38

En la preparación de medios de cultivo se colocó la mitad del volumen de agua destilada y la diferencia fue compensada con la solución de sistema de búfers.

Tabla B5. Medio de cultivo basal para fuente única de carbono y nitrógeno

Ingrediente	Cantidad
Fosfato ácido de potasio (K ₂ HPO ₄)	0,5 g
Solución de sales traza	1 ml
Agar	15,0 g
Aminoácidos	0,1 %
Agua destilada	1000 ml

Tabla B6. Medio de cultivo basal para fuente única de nitrógeno

Ingrediente	Cantidad
Fosfato ácido de potasio (K ₂ HPO ₄)	0,5 g
Solución de sales traza	1 ml
Agar	15,0 g
Aminoácidos	0,1 %
Solución 10X de base de nitrógeno de levadura y cas-aminoácidos	10 ml
Agua destilada	1000 ml

Tabla B7. Solución sales traza

Ingrediente	Cantidad
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,1 g
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,1 g
CuSO ₄ *4H ₂ O	0,1 g
MnSO ₄ *4H ₂ O	0,1 g
Agua destilada	100 ml































Tabla B8. Preparación de solución 10X de base de nitrógeno de levadura y cas-aminoácidos

Ingrediente	Cantidad
Base de nitrógeno de levadura	67 g
Cas-aminoácidos	100 mg
Agua destilada	1000 ml

Anexo C. Tabla de colores, British Standard specification of colors for identification coding and special purposes

BS 381C Colour Chart

Many other colours and finishes are also available in most of our product ranges including shades matched to customers individual patterns and full details are available on request.

											
101 Sky Blue	103 Peacock Blue	104 Azure Blue	105 Oxford Blue	106 Royal Blue	107 Strong Blue	108 Aircraft Blue	109 Middle Blue	110 Roundel Blue	112 Arctic Blue	113 Deep Saxe Blue	166 French Blue
											
172 Pale Roundel Blue	175 Light French Blue	210 Sky	216 Eau De Nil	217 Sea Green	218 Grass Green	220 Olive Green	221 Brilliant Green	223 Mid Bronze Green	224 Deep Bronze Green	225 Light Brunswick Green	226 Mid Brunswick Green
											
227 Deep Brunswick Green	228 Emerald Green	241 Dark Oak	262 Bold Green	267 Chrome Green	280 Verdignis Green	283 Aircraft Grey Green	284 Spruce Green	285 NATO Green	298 Olive Drab	309 Canary Yellow	310 Primrose
											
315 Grapefruit	320 Light Brown	337 Very Dark Drab	352 Pale Cream	353 Deep Cream	355 Lemon	356 Golden Yellow	358 Light Buff	361 Light Stone	363 Bold Yellow	365 Vellum	366 Light Beige
											
367 Manilla	369 Biscuit	380 Camouflage Desert Sand	384 Light Straw	388 Beige	389 Camouflage Beige	411 Middle Brown	412 Dark Brown	414 Golden Brown	420 Dark Camouflage Desert Sand	436 Dark Camouflage Brown	445 Venetian Red
											
447 Salmon Pink	453 Shell Pink	454 Pale Roundel	499 Service	537 Signal Red	538 Cherry	539 Currant Red	541 Maroon	542 Ruby	557 Light Orange	564 Bold Red	568 Apricot
											
592 International Orange	593 Rail Red	626 Camouflage Grey	627 Light Aircraft Grey	629 Dark Camouflage Grey	630 French Grey	631 Light Grey	632 Dark Admiralty Grey	637 Medium Sea Grey	638 Dark Sea Grey	642 Night	676 Light Weatherwork Grey
											
677 Dark Weatherwork Grey	692 Smoke Grey	693 Aircraft Grey	694 Dove Grey	697 Light Admiralty Grey	796 Dark Violet	797 Light Violet					

Anexo D. Figuras y fotografías

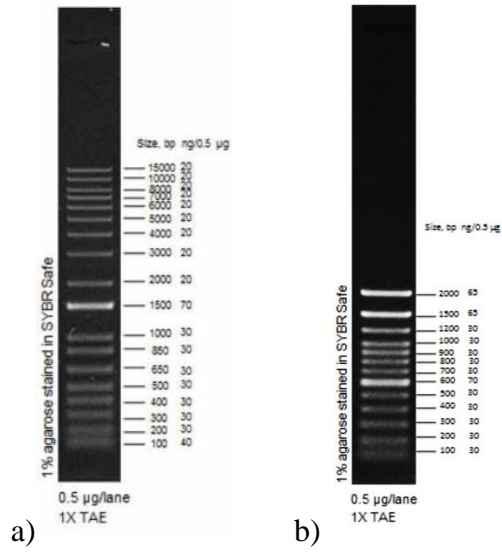


Figura D1. Marcadores de peso molecular

Se muestra los marcados de peso molecular de a) 1 kb y b) 100 bp. (ThermoFisher/Scientific, 2017)

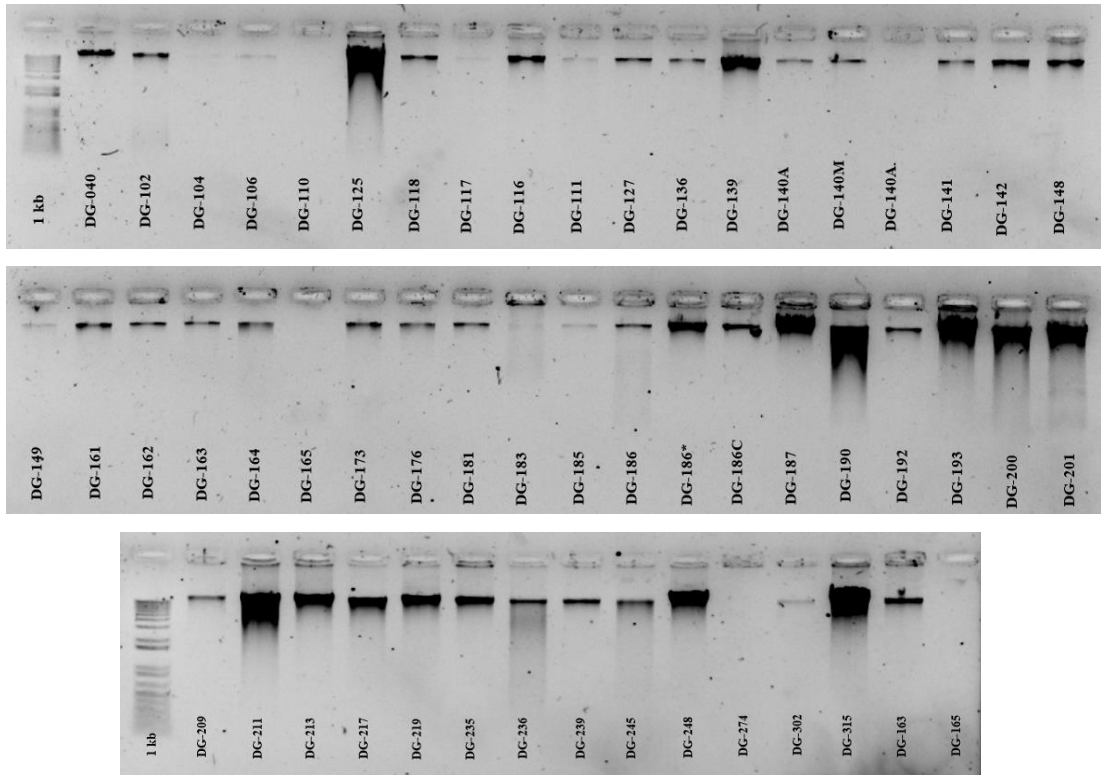


Figura D2. Geles de electroforesis de la evaluación de la integridad de ADN genómico

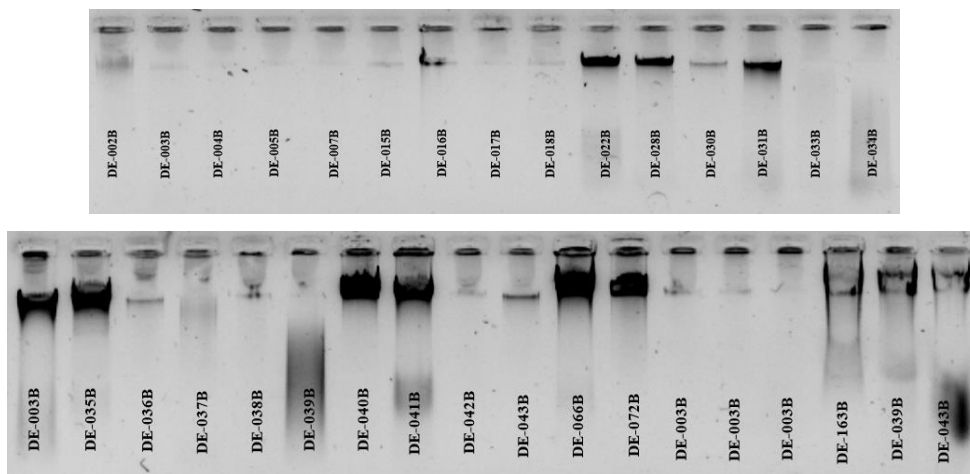


Figura D2. Continuación

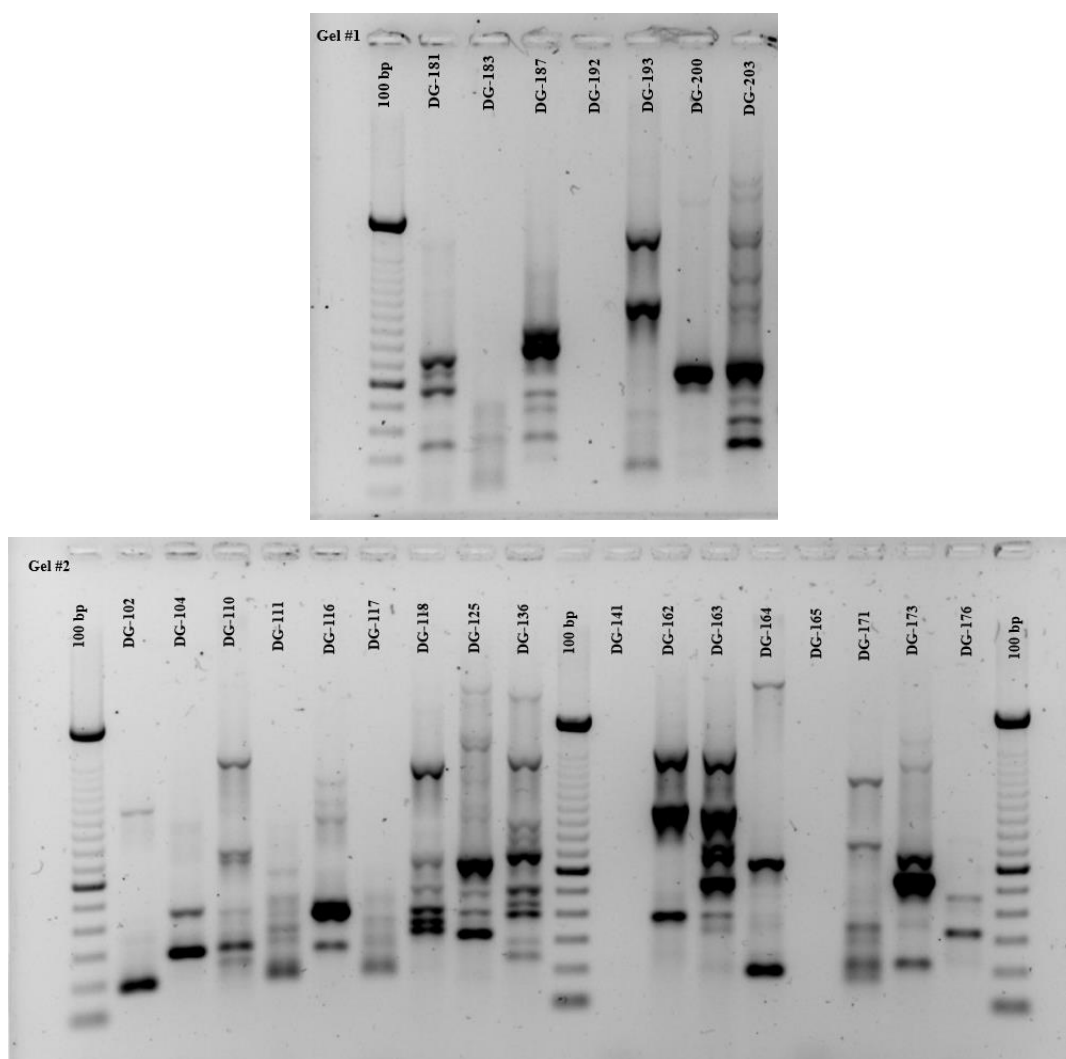


Figura D3. Visualización de patrones de fingerprinting por rep-PCR con primers BOX A1R

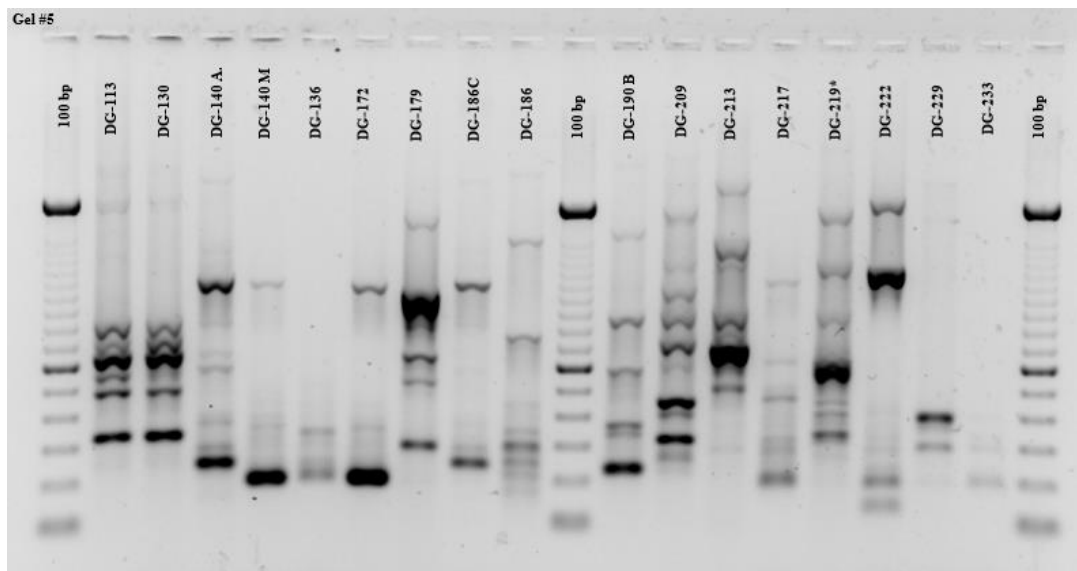
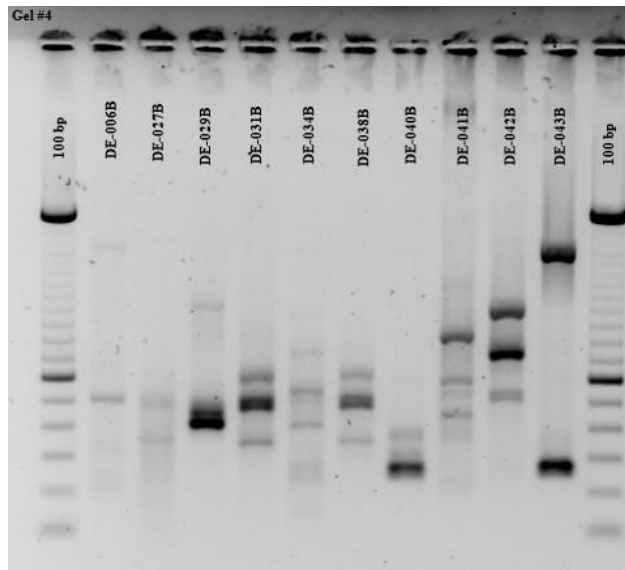
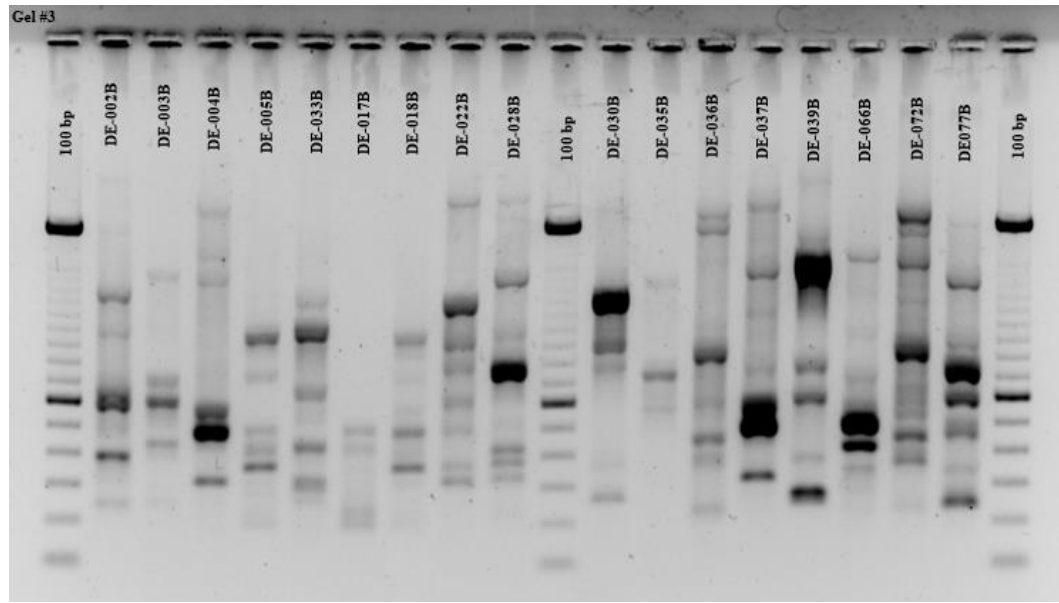


Figura D3. Continuación

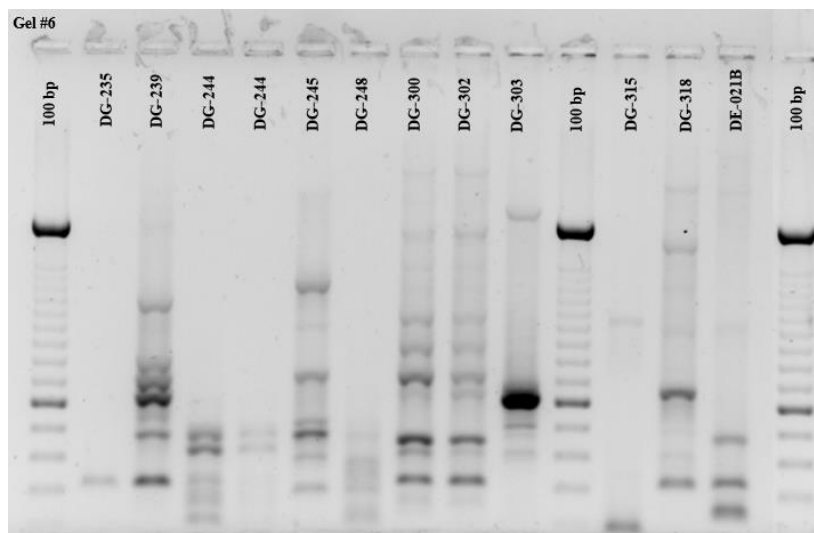


Figura D3. Continuación

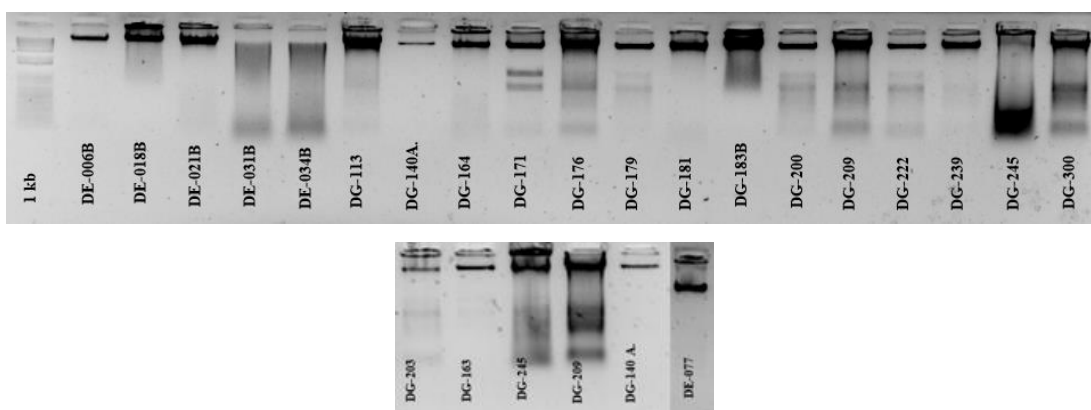


Figura D4. Visualización de ADNs genómico para secuenciación del gen ADNr 16S