

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS OBTENIDAS DE EFLUENTES CAMARONÍCOLAS
MEDIANTE EVIDENCIA FENOTÍPICA Y MOLECULAR



ANA CAROLINA MARTÍNEZ SALIDO

Hermosillo, Sonora

Septiembre de 2014

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la Tesis de Ana Carolina Martínez Salido la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el Título de Licenciado en Biología con Opción en Biotecnología.

M.C. Nolberta Huerta Aldaz
Director de Tesis

Dr. Marco Antonio López Torres
Sinodal Secretario

M. C. Josefina Ramos Paredes
Sinodal

Dr. Alejandro Varela Romero
Sinodal

DEDICATORIA

A mis padres, por su amor incondicional, por el apoyo en mi formación académica, en especial por su comprensión y paciencia.

A mis abuelos por motivarme siempre a estudiar.

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Sonora, en especial al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas por las facilidades otorgadas en mis estudios de licenciatura.

A mis directoras de tesis:

A mi directora M.C Nolberta Huerta Aldaz le estoy plenamente agradecida por la confianza, conocimientos y consejos que me brindó, por dejar que aprendiera con mis errores, por brindarme la oportunidad de participar en su trabajo y abrirme las puertas a la investigación, por escucharme, por los trucos que me enseñó, sobre todo por transmitirme el interés al mundo de la microbiología.

A mi otra directora M.C. Josefina Ramos Paredes por permitir que aprendiera de su experiencia, por brindarme apoyo y creer en mí. Que a pesar de todo el trabajo bajo sus manos, me recibió con los brazos abiertos. Agradezco la dedicación y el empeño en enseñarnos. Por esas pláticas tan amenas, por los consejos y la confianza, sobre todo agradezco la paciencia y a enseñarme a ser paciente (si no se trabaja doble).

De igual forma, agradezco al Doctor Alejandro Varela por darse el tiempo de compartir sus conocimientos en filogenia, por la disposición, dedicación y paciencia que me otorgó para finalizar este proyecto.

Al Doctor Marco Antonio López Torres por brindarme sus valiosos consejos, preguntas y sugerencias.

Al grupo de laboratorio de Biología Molecular, especialmente a Ovidio y Manuel por apoyarme en esta área.

Al laboratorio de análisis químicos y microbiológicos por compartir los últimos momentos de mi estancia.

Estoy sumamente agradecida con las personas que mostraron su apoyo, tiempo y conocimientos para que este proyecto de tesis se llevara a cabo. Agradezco a mis amigos, sobre todo a mi familia por el apoyo y comprensión que me brindaron para finalizar mis estudios.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
II.1. Bacterias Marinas	4
II.1.1. Morfología bacteriana	5
II.1.2. Crecimiento y reproducción bacteriana	7
II.2. Importancia de Bacterias Marinas	7
II.2.1. Aprovechamiento biotecnológico de bacterias marinas	9
II.2.2. Importancia de las bacterias en acuicultura	10
II.3. Métodos de Identificación en Microbiología Tradicional	11
II.4. Técnicas Moleculares para la Identificación Microbiana	13
III. JUSTIFICACIÓN	17
IV. HIPÓTESIS	18
V. OBJETIVOS	18
V.1. Objetivo General	18
V.2. Objetivos Específicos	18
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	19
VI.1. Organismos de Estudio	19
VI.2. Pruebas de Tolerancia a la Temperatura	20
VI.3. Pruebas de Susceptibilidad a Antibióticos	20
VI.4. Tinción Gram	21
VI.5 Pruebas de Catalasa y Oxidasa	21
VI.6. Extracción de ADN de las Cepas Bacterianas	22
VI.6.1 Cuantificación e integridad del ADN	23

VI.6.2 Amplificación del fragmento del 16S del ARNr mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	23
VII.6.3. Electroforesis en gel de agarosa	24
VI.7. Secuenciación	24
VI.7.1. Análisis de secuencias	26
VII. RESULTADOS	28
VII.1. Aislamiento de Cepas Bacterianas	28
VII.1.1. Cepa E-4D	28
VII.1.2. Cepa E-4G	28
VII.1.3. Cepa NFg.12	31
VII.1.4. Cepa 5M7.13	32
VII.1.5. Cepa RoG.13	34
VII.2. Pruebas de Tolerancia a la Temperatura de las Cepas Bacterianas	35
VII.3. Pruebas de Susceptibilidad a Antibióticos	35
VII.4. Extracción de ADN de las Cepas Bacterianas	36
VII.4.1 Amplificación del fragmento 16S ARNr	36
VII.5. Secuencias Analizadas	39
VII.5.1. Cepa E-4D	39
VII.5.2. Cepa E-4G	39
VII.5.3. Cepa NFg.12	40
VII.5.4. Cepa 5M7.13	40
VII.5.5. Cepa RoG.13	41
VII.6. Alineamiento de Secuencias	42
VII.7. Análisis Filogenético del Gen 16S ARNr	42
VIII. DISCUSIONES	46
IX. CONCLUSIONES	58
X. RECOMENDACIONES	60
XI. LITERATURA CITADA	62
XII. APÉNDICES	75

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla I.	Cepas bacterianas de estudio.	19
Tabla II.	Composición nutricional del medio MI-221 utilizado para las cepas nitrificantes.	20
Tabla III.	Programa de amplificación de gradiente para establecer la temperatura óptima de alineamiento de los cebadores.	24
Tabla IV.	Programa de secuenciación cíclica (25 ciclos).	25
Tabla V.	Condiciones de temperatura a la cual se sometieron las cinco cepas bacterianas.	35
Tabla VI.	Secuencias homólogas con la cepa E-4D publicadas en el GenBank.	39
Tabla VII.	Secuencias homólogas con la cepa E-4G publicadas en el GenBank.	40
Tabla VIII.	Secuencias homólogas con la cepa NFg.12 publicadas en el GenBank.	40
Tabla IX.	Secuencias homólogas con la cepa 5M7.13 publicadas en el GenBank.	41
Tabla X.	Secuencias homólogas con la cepa RoG.13 publicadas en el GenBank.	41

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.	6
a) Esquema de una bacteria gram positiva típica, b) Microfotografía electrónica de <i>Bacillus megaterium</i> (x 300, 500). Se observa una gruesa pared celular (PC), «el mesosoma» (M), el nucleoide (N), el cuerpo de inclusión de poli- β -hidroxibutirato (PHB), la membrana plasmática (MP) y los ribosomas (R). Fuente: Prescott et al. (2004).	
Figura 2.	29
Morfología colonial de las cepas E-4D y E-4G. A) Colonia de 48 horas en AM de la cepa E-4D. B) Apariencia de colonias jóvenes de la cepa E-4G en AM. C) Inóculo de la cepa E-4D en una sección de la placa con medio MI-221 que presenta licuefacción del agar. D) Colonias de la cepa E-4G con mayor tiempo de crecimiento en AM. AM=Agar marino.	
Figura 3.	30
Tinción Gram de las cinco cepas de estudio. A) Bacilos cortos, gram negativos de la cepa NFig.12. B) Bacilos gram negativos de la cepa RoG.13. C) Bacilos grandes, gram negativos de la cepa 5M7.13. D) Bacilos grandes, gram negativos de la cepa E-4D. E) Coco bacilos, gram negativos de la cepa E-4G.	
Figura 4.	31
A) Características morfológicas coloniales de la cepa NFig.12 en AM a las 24 horas de cultivo, con coloración tornasol en la zona de descarga, las colonias aisladas presentan un color blanco, puntiformes con un tamaño de 1 mm de diámetro. B) Características morfológicas coloniales de la cepa NFig.12 en AM a los 15 días de incubación. AM=Agar marino.	
Figura 5.	32
Seguimiento de resiembras de la cepa NFig.12 en AM después de inoculación en medio MI-221. A) Colonias de la cepa NFig.12 con más de un mes posterior a la resiembra. B) Colonias de 15 días, en las que se observó un color negro pálido. AM=Agar marino.	

Figura 6.	Cepa bacteriana 5M7.13 cultivada en AM. A) Colonias de 72 horas con las características originales B) Colonias provenientes del medio MI-221, se observan colonias de morfología con “estiramientos” y coloración amarilla cremosa. AM=Agar marino.	33
Figura 7.	Colonias de la cepa bacteriana RoG.13 en cultivo de cinco días en agar marino.	34
Figura 8.	Electroforesis en gel de agarosa al 2%, que muestra el gradiente de temperatura del producto perteneciente a la cepa E-4D. Carril 1: MPM de 50 pb. La temperatura aplicada al carril 2 fue de 48°C, carril 3: 50.5°C, carril 4: 52.2°C, carril 5: 54.4°C, carril 6: 56.9°C, carril 7: 59°C, carril 8: 60.7°C, carril 9: 61.8°C y carril 10: 63°C. MPM=Marcador de peso molecular.	37
Figura 9.	Electroforesis en gel de agarosa al 2% de las cepas E-4G y E-4D. Carril 1: MPM de 50pb. Carriles 2 y 3: cepa E-4G y carril 4: cepa E-4D. MPM=Marcador de peso molecular.	37
Figura 10.	Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de amplificación de las cepas bacterianas NFig.12, RoG.13 y 5M7.13. Carril 1: MPM de 50 pb. Carril 2: cepa RoG.13. Carril 3: cepa NFig.12 y carril 4: cepa 5M7.13. MPM=Marcador de peso molecular.	38
Figura 11.	Árbol filogenético obtenido mediante el criterio de máxima verosimilitud (ML) para 70 secuencias parciales del 16S ARNr. Los números de acceso de la secuencia para el GenBank se encuentran en paréntesis. Los nodos muestran los valores de bootstrap para 1000 réplicas.	44

RESUMEN

Las bacterias tienen una importante participación en la descomposición de materia orgánica y un enorme potencial en el área médica, biotecnológica y biorremediación. Uno de los problemas que enfrenta la microbiología es lograr cultivar a estos microorganismos, además que la información fenotípica existente para la identificación de bacterias es insuficiente. Sin embargo el gen 16S ARNr permite resolver los problemas taxonómicos, el cual es utilizado debido a su universalidad, tamaño y secuencias conservadas. En el presente trabajo se aislaron cepas provenientes de efluentes camaronícolas en el Estado de Sonora con el objetivo de identificarlas. El ADN se obtuvo con el Kit DNeasy Blood & Tissue de QIAGEN. La amplificación del fragmento 16S ARNr se llevó a cabo con la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa. Para la edición de las secuencias se utilizó el programa Chromas-Pro 1.41. Se llevó a cabo un análisis de las secuencias homólogas en el programa Basic Local Alignment Search Tool. Para la construcción del árbol filogenético se utilizó el método de Máxima Verosimilitud con un análisis de bootstrap para 1000 pseudoréplicas, con el software PAUP* 4.0. El análisis en el GenBank arrojó que las secuencias de las cepas E-4G, E-4D, NFG.12 y 5M7.13 tienen una similitud del 99% con los géneros *Halomonas*, *Methylophaga*, *Phaeobacter* y *Muricauda* respectivamente, mientras que la cepa RoG.13 presentó una similitud del 100% con el género *Roseivirga*. Las características fenotípicas de estos géneros coinciden con las cepas bacterianas de estudio. El análisis filogenético confirmó que las cepas E-4G, E-4D, NFG.12, 5M7.13 y RoG.13 mantienen una estrecha relación con los géneros *Halomonas*, *Methylophaga*, *Phaeobacter*, *Muricauda* y *Roseivirga* respectivamente, las topologías demuestran que las familias incluidas que engloban a estas secuencias forman grupos monofiléticos para los filas Proteobacteria (incluyen las cepas E-4G, E-4D y NFG.12) y Bacteroidetes (5M7.13 y RoG.1).

I. INTRODUCCIÓN

El océano es el ecosistema más grande del planeta, abarca un 70% de la superficie y con ello mantiene una abundancia y diversidad de microorganismos considerable. Después de los virus las bacterias son los organismos con mayor riqueza y abundancia (Whitman et al., 1998), tienen una historia evolutiva que abarca unos 4,000 millones de años y probablemente su origen radica en las aguas marinas. Estos ambientes marinos presentan variaciones en cuanto a pH, salinidad, temperatura, entre otros. Incluso los nutrientes no siempre están disponibles, sin embargo, las bacterias se adaptan a estos cambios bruscos y pueden sobrevivir en ambientes extremos donde antes se consideraba imposible vida alguna (Madigan et al., 2012).

Además de su participación en la descomposición de materia orgánica, las bacterias son pieza clave en los ecosistemas, en muchos casos son los únicos en regenerar los elementos para disposición de otros organismos, de igual modo controlan el clima de la tierra. En los ciclos biogeoquímicos las bacterias son indispensables, por ejemplo en el ciclo del carbono, donde se encuentra en circulación tanto en ambientes terrestres como marinos, la producción de carbono depende de plantas y microorganismos fotótrofos. Para el caso del nitrógeno gaseoso, forma más abundante en la tierra, las bacterias fijadoras del nitrógeno son las únicas que lo procesan. El amonio que se produce de la fijación del nitrógeno es asimilado en materia orgánica o se puede oxidar a nitrato. Por ejemplo se conoce que *Halomonas maura*, así como bacterias de los géneros *Nitrobacter* y *Nitrosomonas*, entre otras, tienen una importante participación en el ciclo del nitrógeno (Cervantes-Carrillo et al., 2000; Prescott et al., 2004; Llamas et al., 2005; Mota et al., 2005; Madigan et al., 2012).

Por otra parte, en los últimos 20 años la acuicultura a nivel mundial ha tenido un crecimiento exponencial (FAO, 2010) y en México esta biotecnología ha sido una actividad económicamente importante. Para el Estado de Sonora en el año 2012 se obtuvo un total de 35,305.551 toneladas de camarón (COAES, 2012). Actualmente uno de los grandes dilemas que presenta la acuicultura es la contaminación de compuestos nitrogenados en los estanques, lo que ocasiona que las descargas que se generan de dicha actividad conlleven a la eutrofización de los cuerpos receptores. Al interior de los estanques, los productos del

nitrógeno generan problemas de salud a los organismos en cultivo y con ello una disminución en la producción. Diversas investigaciones en el área de la microbiología tradicional y molecular revelan la existencia de bacterias nitrificantes como *Nitrosomonas*, *Nitrosolobus* y bacterias desnitrificantes como las del género *Halomonas* (Llamas et al., 2005; Zhou et al., 2009; Madigan et al., 2012), por lo anterior es importante identificar estas bacterias con potencial biotecnológico y ecológico.

La microbiología tradicional ha contribuido enormemente a la comprensión de varios aspectos biológicos en bacterias. Algunos estudios revelan que del total de las bacterias existentes, únicamente menos del 1% es posible cultivarlas en el laboratorio (Amman et al., 1995), por lo que uno de los retos en microbiología es mejorar las técnicas de cultivo y así obtener información sobre su ecología, fisiología y evolución. Sin embargo, en el caso de las bacterias marinas los requerimientos nutricionales son muy específicos, incluso algunas investigaciones revelan la necesidad de estos microorganismos de crecer en conjunto con otras bacterias (Kaeberlein et al., 2002), lo que dificulta su identificación mediante pruebas bioquímicas dado que se requieren cepas puras según el Manual de Bacteriología y Sistemática Bergey's. Además de que la base de datos disponibles para pruebas fenotípicas es restringida (Bosshard et al., 2006) y las características pleomórficas de algunas bacterias también dificulta su identificación (Escalante, 2007).

Las técnicas moleculares, basadas en el análisis de ácidos nucleicos, permiten obtener información sobre su ecología, lo que hace posible resolver problemas de identificación y filogenia bacteriana (Caron, 2005; Madigan et al., 2012; Junier et al., 2009). Igualmente, los microorganismos procedentes de ambientes naturales pueden ser identificados mediante la secuenciación de sus genes. En el caso de bacterias, el marcador más utilizado en estudios taxonómicos o filogenéticos debido a su longitud, universalidad y por mantener pocos cambios en sus secuencias a lo largo del tiempo, es la molécula 16S ARNr, transcrito por el gen *rrs* (Rodicio y Mendoza, 2004; Janda y Abbott, 2007).

Pese al gran potencial ecológico y biotecnológico que ofrecen las bacterias marinas, los estudios a este nivel son prácticamente escasos en el estado de Sonora, específicamente en el sector de acuicultura, donde se genera gran cantidad de materia orgánica. En consecuencia es necesario generar conocimiento científico que permita obtener información taxonómica y

filogenética de las bacterias que se encuentran en estos sistemas para entender los procesos que llevan a cabo.

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación es identificar bacterias procedentes de efluentes camaronícolas, mediante evidencia fenotípica y de la secuencia parcial del gen 16S ARNr, con lo cual se pretende generar información básica que sirva de antecedentes a futuras investigaciones en el área de microbiología molecular.

II. ANTECEDENTES

II.1. Bacterias Marinas

En el océano abierto por arriba de los 200 metros se estima que la densidad bacteriana es de 5×10^5 células/mL (Whitman et al., 1998). A comparación de la zona pelágica, las aguas costeras es donde la vida bacteriana se encuentra en mayores cantidades debido a la cantidad de nutrientes. Igualmente los estudios demuestran que la distribución vertical bacteriana es mayor en los fondos marinos, con mayor cantidad a los 5,000 metros conforme se encuentran con los detritos, incluso se han descubierto células bacterianas a los 11,000 metros. Los valores estimados en las profundidades oceánicas son de alrededor de 420 millones de bacterias por gramo de fango (Cifuentes-Lemus et al., 2003). Esta gran diversidad es el producto de 4,000 millones de años de evolución. Además de la diversidad filogenética es posible examinar las variantes de tamaños, formas, fisiología, motilidad, mecanismos de división, patogenicidad, desarrollo biológico y adaptación a ambientes diversos (Delong y Pace, 2001; Madigan et al., 2012).

El filo Proteobacterias es el grupo de bacterias con mayor diversidad, agrupa a 800 géneros y más de 2,000 especies (Willey et al., 2008). Según las secuencias del 16S ARNr estos microorganismos se dividen en 5 clases: Alphaproteobacteria (α), Betaproteobacterias (β), Gammaproteobacteria (γ), Deltaproteobacteria (δ) y Epsilonproteobacteria (ϵ). De éstos, las Gammaproteobacterias es el más numeroso con 280 géneros (Garrity et al., 2005; Kersters et al., 2006; Madigan et al., 2012). Así mismo, el filo de Bacteroidetes es el segundo grupo con mayor abundancia y diversidad en las comunidades bacterianas con 250 géneros, llegando a constituir hasta un 12% de éstos, se les encuentra en todo tipo de sedimentos, suelos, agua de mar y forman parte del tracto digestivo en algunos mamíferos (Kim y Know, 2010; Ludwig et al, 2010, Cho y Hwang 2011; Claros y Conrad, 2013). La clasificación taxonómica de los filo Proteobacteria y Bacteroidetes se detalla en Euzéby, (2014) (Apéndice 16).

II.1.1. Morfología bacteriana

La mayor parte de las bacterias descritas tienen forma de cocos o bacilos, sin embargo se encuentran también las formas ramificadas y esféricas, las que forman filamentos multinucleados o hifas como los actinomicetos, bacterias espirales o pleomórficas, formas pedunculadas y las que producen yemas. Con respecto a su tamaño celular, éste varía desde los 0.5–4.0 μm de ancho por 15 μm de longitud (Madigan et al., 2012).

Las bacterias pueden presentar o no flagelos, estos organelos les permiten moverse, funcionan con un motor en la base del flagelo y el filamento proteico actúa como propulsor. Poseen alrededor de 20 proteínas y miden unos 20 nm de diámetro aproximadamente. Estos organelos de acuerdo a su distribución, pueden ser peritricos, anfotricos, monotricos y lofotricos, aunque puede existir una combinación de formas.

Las bacterias poseen una pared celular, de características bioquímicas específicas, que ha permitido clasificarlas en gram positivas o gram negativas. Las bacterias gram negativas poseen una membrana externa, constituida mayoritariamente por lipopolisacáridos, enseguida le sigue un espacio periplásmico que contiene numerosas proteínas para captar nutrientes, después una capa fina de peptidoglicano de aproximadamente 2 nm, y posteriormente una membrana plasmática. En el caso de las bacterias gram positivas, la pared celular contiene una capa de peptidoglicano de entre 20 y 80 nm de grosor, que representa el 90% del material de la pared celular y el espacio periplasmático es apenas visible. Mientras que el peptidoglicano en las bacterias gram negativas varía entre 1 a 7 nm de grosor. Las bacterias carecen de un núcleo como tal y está localizado en una región llamada nucleoide, que no está separada del resto del citoplasma, en donde se albergan los ribosomas y cuerpos de inclusión, que tienen mayor tamaño (Figura 1) (Prescott et al., 2004; Willey et al., 2008).

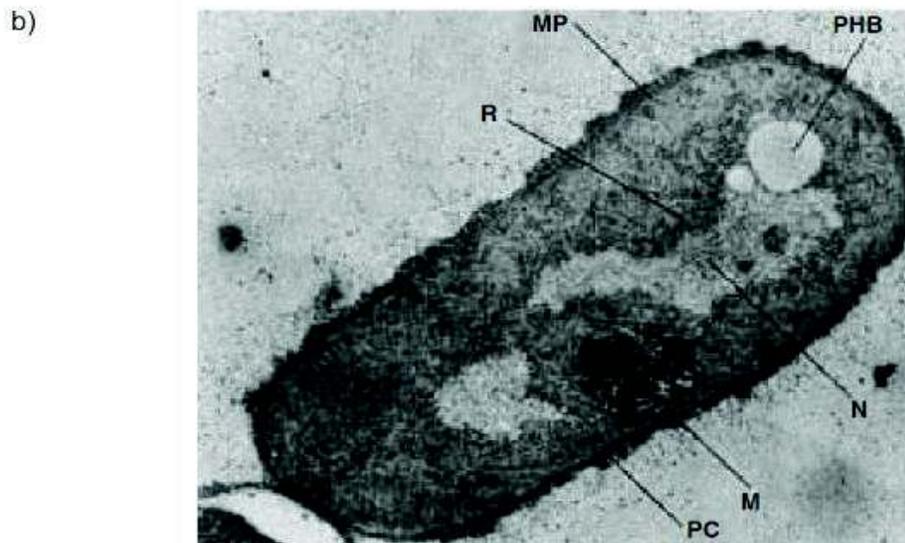
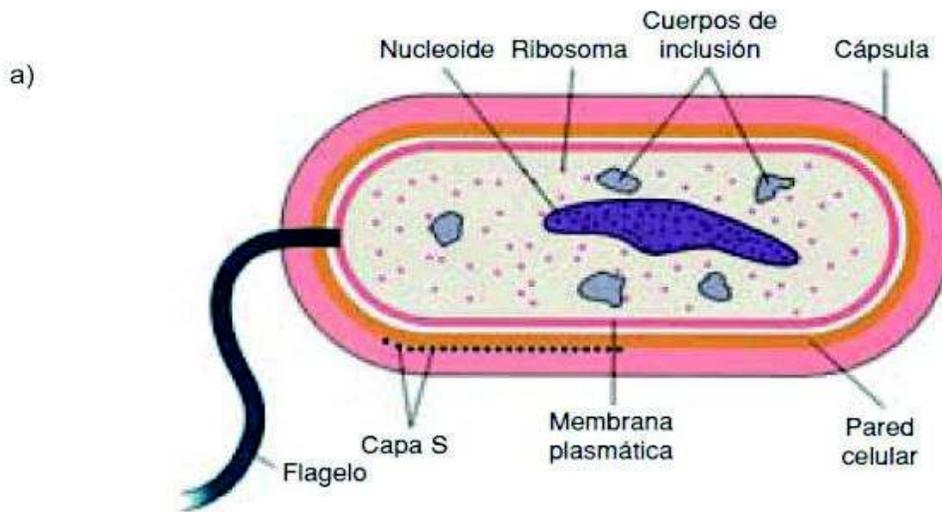


Figura 1. a) Esquema de una bacteria gram positiva típica. b). Microfotografía electrónica de *Bacillus megaterium* (x 300, 500). Se observa una gruesa pared celular (PC), «el mesosoma» (M), el nucleoide (N), el cuerpo de inclusión de poli- β -hidroxibutirato (PHB), la membrana plasmática (MP) y los ribosomas (R). Fuente Prescott et al. (2004).

II.1.2. Crecimiento y reproducción bacteriana

El crecimiento microbiano es el aumento del número celular, las células microbianas pueden tener un lapso de vida ilimitado, puesto que las especies se mantienen como resultado del continuo crecimiento poblacional, que dependerá de las condiciones ambientales en las que se encuentren y las reacciones metabólicas que lleven a cabo (Prescott et al., 2004; Madigan et al., 2012).

Cuando una bacteria se encuentra en etapa de crecimiento, la elongación continúa hasta que la célula se divide en dos, este proceso es denominado fisión binaria. En cultivos de *Escherichia coli*, por ejemplo, se ha determinado que las células duplican su tamaño y se forma una partición transversal llamada septo, que es el responsable del crecimiento hacia el interior de la membrana y de la pared celular. Este proceso de formación del septo continúa hasta que la célula se divide. Durante esta etapa los constituyentes celulares aumentan considerablemente y cada célula hija recibe un cromosoma, copias de ribosomas, complejos macromoleculares e iones (Madigan et al., 2012).

El tiempo de generación en los microorganismos es muy variado, sin embargo *E. coli*, el organismo modelo, en condiciones de laboratorio mantiene un tiempo de generación de 20 minutos, aunque en la mayoría de las bacterias que se encuentran bajo condiciones ambientales, los tiempos de generación son lentos y dependerán de factores como la temperatura, disponibilidad de nutrientes, pH y la carga genética del organismo (Madigan et al., 2012). Se ha estimado que la tasa de crecimiento para bacterias en ambientes marinos varía entre 1 a 10 días (Ducklow, 1983; Kemp et al., 1993).

II.2. Importancia de Bacterias Marinas

Después de los virus, las bacterias heterótrofas constituyen la población más grande (Dortch y Packard, 1989; Suttle, 2007). Las bacterias tienen una importante participación en el flujo de

energía, la dinámica ambiental de la tierra además que controlan la biogeoquímica y la productividad de los océanos (Caron, 2005; Stocker, 2012).

Los avances de la microbiología y estudios de producción primaria han demostrado que los microorganismos son la base de la cadena alimenticia (López-López y Zaballos, 2005). Participan en los ciclos biogeoquímicos del océano, usan la materia orgánica disuelta (MOD), donde la ingesta de la materia orgánica es el primer paso en el bucle microbiano y mineralizan cerca del 50% de la producción primaria (Azam et al, 1983; Jørgensen, 2000; Cifuentes-Lemus et al., 2003).

Las bacterias que se encuentran en un ecosistema, son las más adaptadas a la cantidad de nutrientes así como las condiciones que éste alberga. En los ambientes marinos, la temperatura, el pH, la salinidad, los regímenes de precipitación y el golpeteo de los vientos son condiciones que presentan siempre variabilidad, por lo que factores como la competencia y la cooperación entre microorganismos son muy importantes, en especial la cooperación ya que genera mayor capacidad de sobrevivencia. Por lo que es necesario que estos microorganismos se encuentren en sintrofia, es decir en conjunto; para que las transformaciones sean productivas. La formación de biopelículas contribuye a este hecho, la peculiaridad de ciertas bacterias de contener en pocos centímetros o milímetros un ecosistema de microorganismos de la misma o varias especies unidas por una matriz extracelular de polisacáridos (Madigan et al., 2012). Estas sustancias aumentan el crecimiento y sobrevivencia de bacterias, proveen protección contra depredadores, temperaturas extremas, salinidades altas y permiten la absorción de nutrientes (Mancuso et al., 2005), lo que facilita que las bacterias lleven a cabo reacciones metabólicas complejas en los ciclos biogeoquímicos (Madigan et al., 2012; Dash et al., 2013). En este sentido, se calcula que el carbono orgánico disuelto (COD) en el océano tiene una edad media superior a los 1, 000 años. En el proceso de fijación del carbono intervienen algas verdes, cianobacterias y bacterias fotosintéticas como *Chromatium*. De la misma forma en este ecosistema el azufre se encuentra en grandes cantidades. El dimetil sulfuro es el principal compuesto orgánico del azufre, el cual se puede transmitir a la atmósfera y cuando éste oxida sus productos finales pueden influir en la acidez de la atmósfera, en la temperatura terrestre y la formación de nubes. En el caso del ciclo del nitrógeno, éste se compone de dos procesos principales, la nitrificación, es decir la oxidación del amonio a nitritos y posteriormente a nitratos, el segundo paso es la desnitrificación donde

el nitrato es reducido a nitrógeno molecular. Este proceso es importante ya que contribuye al reciclamiento del nitrógeno en la tierra y la eliminación del exceso de los componentes del nitrógeno que son contraproducentes para los organismos (Prescott et al., 2004).

Recientemente se dio a conocer la función del *Quorum sensing* (QS), las cuales son sustancias químicas extracelulares que liberan las bacterias y van aumentando conforme lo hace la biomasa bacteriana, su funcionalidad involucra varios procesos de regulación fisiológica. Este tipo de comunicación es la encargada de la formación de biopelículas, exopolisacáridos, producción de exoenzimas, transferencia de genes, swarming, maduración de endosporas, bioluminiscencia, competencia, movilidad y mediante estas señales permite al patógeno sobrepasar el sistema inmune del hospedero. Un tipo de QS son las llamadas Acil-homoserín lactonas (AHLs) (Miller y Bassler, 2001; Valenzuela et al., 2007; Romero y Otero, 2010), las cuales se han encontrado en bacterias extremófilas y *Halomonas* sp. (Llamas et al., 2005).

II.2.1. Aprovechamiento biotecnológico de bacterias marinas

En la actualidad uno de los problemas de gran importancia clínica, es la resistencia de bacterias patógenas hacia los fármacos y dado que el QS es responsable de la sobrevivencia de bacterias, ya que regula varias funciones como simbiosis, esporulación, movilidad, virulencia, transferencia de plásmidos (confieren resistencia a cierto tipo de antibióticos), entre otros. Es por ello que algunos estudios se han enfocado en comprender los procesos de comunicación bacteriana y en la búsqueda de moléculas antagonistas que inhiban este proceso de QS. Se ha documentado que la biomasa de la cianobacteria *Anabaena* contiene enzimas acilasas capaces de degradar las moléculas AHL, con lo que se logra mantener un control de la población, que pueden estar involucrada en la interferencia de señales de las comunidades bacterianas vecinas (Miller y Basller 2001; Dong et al., 2007; Romero et al., 2008).

Las bacterias marinas producen metabolitos secundarios que son utilizados como métodos de defensa contra otros microorganismos. Estos metabolitos son fuentes bioactivas con efectos nutritivos, que tienen un gran potencial en la industria y en terapias en humanos.

Estas bacterias, productoras de estos compuestos se desarrollan en ambientes marinos hostiles (Bhatnagar y Se-Kwon, 2010), su producción se ve afectada por el proceso de adaptación al medio y a la presencia de nutrientes que provienen del medio marino (De Carvalho y Fernández, 2010). De igual manera, otros estudios revelan la capacidad que poseen algunas bacterias marinas de degradar compuestos o reducirlos a otros menos tóxicos, incluso de integrarlos a los ciclos biogeoquímicos naturales, como en el caso de la contaminación por petróleo, metales pesados, compuestos recalcitrantes, xenobióticos, entre otros (Martínez-Alonso y Gaju, 2005; Rosa y Triguís, 2007).

En general las bacterias halófilas poseen un gran potencial tanto en ecología como la industria, debido a la gran cantidad de metabolitos que producen. Un ejemplo de ello son los exopolisacáridos que tienen un potencial considerable en la industria farmacéutica por su capacidad inmunomoduladora y efecto antiviral. En el área de biorremediación, algunos exopolisacáridos producidos por la bacteria *Halomonas maura*, le permiten colonizar ambientes salinos debido a su alta capacidad viscosa. Todas estas propiedades los hacen muy útiles a la industria farmacéutica, petrolera y en cosmetología. Además se encontró que estos compuestos funcionan como bioabsorbentes y/o emulsificantes de aceites vegetales y petróleo en ambientes marinos contaminados (Llamas et al., 2005).

II.2.2. Importancia de las bacterias en acuicultura

La diversidad marina, incluidos los distintos climas y hábitats marinos, especialmente los costeros, permiten un avance económico, nutricional y cultural. Con lo cual, la acuicultura a nivel mundial crece rápidamente como industria. Según datos de la Organización de Alimentos y Agricultura (FAO), en el 2010 la acuicultura alcanzó poco más de 60 millones de toneladas, sin incluir las plantas acuícolas y los productos no alimentarios, con un valor total estimado de 119, 000 millones de dólares (FAO, 2010). Específicamente para nuestro país, la producción de camarón en el año 2012, la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) estimó una ganancia total de 7, 629, 994, 358 millones de pesos (SAGARPA, 2012). A pesar de estos beneficios económicos, esta práctica

genera una problemática diversa, como la competencia entre los usuarios por tierra y agua, que propicia un efecto colateral sobre el sistema. Otros efectos negativos provocados son los efluentes de estanques camaronícolas que inciden en la calidad del agua de los cuerpos receptores como lagunas costeras, estuarios, entre otros, debido a los problemas de contaminación y eutroficación, ocasionada por las prácticas inadecuadas de alimentación de los organismos en cultivo en los estanques, lo que ocasiona un exceso de carga orgánica y altas concentraciones de nitrógeno amoniacal (Hopkins et al., 1995; Feng et al., 2004).

En los sistemas acuáticos, así como en los sedimentos, las bacterias y los hongos, son los encargados de descomponer la materia orgánica con la finalidad de que el agua se encuentre limpia y libre de contaminantes. En estos sistemas, la toxicidad del NH_4 se da en la forma ionizada del amoníaco NH_3 (Páez–Osuna, 2005). Sin embargo la oxidación del amonio produce nitritos, que sirven de sustrato para bacterias que los oxidan y transforman a nitratos, que son los compuestos menos tóxicos. Este proceso denominado nitrificación, es realizado por bacterias nitrificantes de diversos géneros como *Nitrosomonas* y *Nitrosolobus* (Zhou et al., 2009).

En los estanques camaronícolas se ha reportado que la presencia de biopelículas reducen de forma importante el amonio y la exportación de fósforo; participan también en los ciclos de nutrientes y contribuyen en la nutrición de los animales en cultivo, ayudan a mantener una buena calidad de agua y con ello un control de las enfermedades, además de reducción del impacto al medio ambiente por los efluentes que se vierten con los recambios (Moriarty, 1997; Lopes–Thompson et al., 2002).

II.3. Métodos de Identificación en Microbiología Tradicional

La microbiología tradicional utiliza cultivos puros para estudiar el desarrollo de los microorganismos, su fisiología y propiedades metabólicas. También emplea microorganismos como modelos de excelencia para comprender procesos celulares en organismos multicelulares (Madigan et al., 2009; Boua et al., 2011).

El Manual Bergey de Bacteriología y Sistemática (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, por sus siglas en inglés) describe las bacterias identificadas en la actualidad,

tomando en consideración características fenotípicas y filogenéticas para determinar la identidad de las diversas especies bacterianas. Desde la primera publicación de este Manual Bergey's se logró un gran avance en la taxonomía bacteriana, a pesar que en esta primera edición fue totalmente fenética (Willey et al., 2008).

Las características fenotípicas que se toman en cuenta para identificar bacterias son las siguientes: pared celular, morfología, movilidad, tamaño celular, formación de cuerpos fructíferos, presencia de esporas, cuerpos de inclusión, distribución de flagelos, características coloniales, entre otras. En cuanto a su fisiología se determinan los rangos de pH, temperatura, salinidad, requerimientos de oxígeno y producción de enzimas. El metabolismo se refiere a los mecanismos de obtención y conservación de energía, los requerimientos de carbono, nitrógeno, azufre, fermentación de carbohidratos. Otras pruebas consisten en la sensibilidad a compuestos antimicrobianos y análisis de compuestos celulares. Según investigaciones realizadas por Amann et al. (1995), muchos de los medios de cultivos empleados funcionan solamente para el cultivo de un mínimo de bacterias aisladas.

Algunas teorías del porqué no es posible cultivar todos los microorganismos, se debe a que algunos compuestos que requieren para su desarrollo, se encuentran solamente en ambientes naturales, también muchos de estos nutrientes son proporcionados por bacterias asociadas, por lo que se crea una dependencia metabólica fuerte. Es por ello que en algunas investigaciones se recurre a la aplicación de técnicas que mejoren la simulación de las condiciones ambientales de las cuales fue aislado el microorganismo (Stevenson et al., 2004). Otra posibilidad es que los medios típicos de crecimiento sean demasiado ricos en nutrientes para las condiciones oligotróficas en la que los microorganismos habitan, incluso de que inhiban el crecimiento de otros (Martínez-Romero y Martínez-Romero, 2001). En este sentido, Kaeberlein et al. (2002), diseñaron una cámara de difusión en donde permitieron que las bacterias no cultivables crecieran en su medio natural y lograron con estas condiciones recuperar el 40% del inóculo original.

Es necesario destacar que los trabajos realizados para la clasificación molecular coinciden con la clasificación fenotípica, aunque en muchos casos no es así (Martínez-Romero y Martínez-Romero, 2001), así mismo la base de datos disponibles para pruebas fenotípicas es restringida (Bosshard et al., 2006). Incluso algunas bacterias son de crecimiento lento y solamente se cuenta con una fracción mínima de bacterias que se

desarrollan en el laboratorio en medios de cultivo, por lo que el complemento ideal para conocer su identidad y estudiar la diversidad microbiana es el estudio de genes (López-López y Zaballos, 2005).

II.4. Técnicas Moleculares para la Identificación Microbiana

Las técnicas en biología molecular han permitido un gran avance en la sistemática microbiana. Algunas de las herramientas que emplea es la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), en esta técnica no es necesario obtener cultivos de microorganismos y se parte directamente de muestras ambientales. Este método implica tener una sonda marcada con un fluorocromo que hibrida a la cadena complementaria, la cual puede ser tan específica como se requiera y es posible obtener información sobre la composición taxonómica de una comunidad (Amman et al., 1995; Madigan et al., 2012).

Definitivamente, uno de los avances con mayor impacto en el área genómica fue el desarrollo de la secuenciación (Xu, 2006), que determina el orden de los nucleótidos de un gen o de un fragmento de gen (a partir de una PCR). Actualmente la secuenciación se basa en el método enzimático o de Sanger. Para ello es necesario el uso de cebadores que hibriden con el extremo 3' de la región a secuenciar, deoxinucleótidos (dNTPs), dideoxinucleótidos (ddNTPs) los cuales son análogos de los dNTPs, que provocan una reacción de alto en la síntesis del ADN, ya que no cuentan con la molécula OH que permite la formación de un enlace fosfodiéster con el siguiente nucleótido. Con el uso de los ddNTPs se generan fragmentos de diferentes tamaños de ADN, los que incorporan al final de este fragmento, un fluorocromo (cada dideoxinucleótido tiene un marcador que emite a diferentes longitudes de onda). Esta mezcla de fragmentos de ADN, es separada por tamaño y peso molecular con la aplicación de electroforesis por capilar. Finalmente un programa computacional determina la secuencia de las bandas que se separaron anteriormente (Luque-Cabrera y Herráez-Sánchez, 2001; Wagenknecht, 2008).

En el caso del uso de la molécula del 16S ARNr resuelve problemas de identificación y filogenia bacteriana, al comparar la secuencia obtenida con bases de datos, como el GenBank

del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) (Altschul et al., 1990), el Proyecto de Base de Datos Ribosomal (RDP), la base de datos del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL), entre otros. Para ello se utiliza la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual amplifica directa o indirectamente un gen o un fragmento de ADN, las cantidades de muestra que se requiere son mínimas y mediante esta técnica se obtienen millones de copias en un tiempo relativamente corto. La PCR es una reacción en cadena de entre 25 a 30 ciclos y en cada ciclo se llevan a cabo 3 reacciones en donde el termociclador controla la temperatura y tiempos adecuados.

La desnaturalización es el primer paso, que consiste en abrir la doble cadena del ADN, se somete para ello a una temperatura de 95°C. El segundo paso es la hibridación, con una temperatura entre los 40 a 65°C, en esta temperatura los nucleótidos más estables se mantienen unidos formando una pequeña región de doble cadena. Finalmente, para que la polimerasa pueda elongar el nuevo ADN a partir de los oligonucleótidos, es necesario que la temperatura se eleve hasta los 70°C. Después de estas 3 etapas, se agrega una etapa previa y una final de todos los ciclos con el objetivo de asegurar la desnaturalización completa del ADN y la extensión final posibilita que se completen todos los fragmentos de ADN (Clark y Pazdernik, 2010).

En estudios taxonómicos y para la reconstrucción filogenética bacteriana, la comparación de las secuencias del ARN ribosomal (ARNr) es el método más empleado. El primero en utilizar al 16S ARNr fue Carl R. Woese, quien determinó las relaciones filogenéticas entre organismos y con ello reclasificó a los organismos en tres dominios, Archaea, Bacteria y Eucarya (Woese et al., 1990). La molécula del 16S ARNr se encuentra distribuida en las bacterias por lo que se considera universal, es estable en cuanto a su función, debido a que se ha conservado a través del tiempo y la longitud de aproximadamente 1,500 (nt) nucleótidos es la adecuada para realizar secuenciaciones y análisis filogenéticos, que permite diferenciar hasta especies bacterianas en diferentes ambientes, que incluyen comunidades microbianas (Boua et al., 2011; Gilbert y Dupont, 2011; Madigan et al., 2012).

Los ribosomas son organelos donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas en todos los organismos y están constituidos de proteínas y ácido ribonucleico. Los ribosomas de procariotas, llamados 70S por su coeficiente de sedimentación (expresado en unidades Svedberg), tienen un tamaño aproximado de 15 nm por 20 nm. Éstos se componen de una

subunidad pequeña y una subunidad grande, 30S y 50S respectivamente, en donde cada uno es un complejo de RNA ribosómico, moléculas de ARNr específicos y proteínas ribosómicas. En la subunidad pequeña 30S, se encuentra la molécula 16S, ésta es un polirribonucleótido de aproximadamente 1,500 nucleótidos codificado por el gen *rrs* también denominado 16S ADN ribosomal (16S ADN_r) (Ludwig y Schleifer, 1994; Rodicio y Mendoza, 2004; Mathews et al., 2006).

En bacterias el ADN_r o gen *rrs* son los que codifican el ARNr, la cual es información que se transcribe pero no se traduce, se encuentran organizados en operones y cada operón ribosómico incluye los genes que codifican para el 23S, 16S y 5S (Hillis y Dixon, 1991; Rodicio y Mendoza, 2004).

El 54% de la molécula del 16S ARNr se encuentra apareado entre si, formando tallos (Voet et al., 2007). El número de hélices en procariontes es por lo general de 50 y la estructura secundaria forma 4 dominios, contiene 9 regiones hipervariables (V1–V9) entre las cuales se intercalan fragmentos conservados (que son importantes para la estructura o función de la molécula del 16S del ARNr) (Van der Peer et al., 1996), regiones comunes entre organismos y el polimorfismo interespecífico que presenta, es suficiente para diferenciar entre géneros de bacterias y subespecies. Con éstas nuevas técnicas de secuenciación de ADN y la disposición de software, es posible obtener una mayor cantidad y disponibilidad de secuencias (Clarridge, 2004; Rodicio y Mendoza, 2004).

El análisis del ADN y/o ARN de las bacterias que a la fecha no se han podido cultivar ha contribuido de manera importante para entender y determinar la diversidad y distribución de los microorganismos en el medio ambiente (Junier et al., 2009; Madigan et al., 2012).

El alineamiento de secuencias mediante programas informáticos permite comparar estas secuencias y determinar el grado de parentesco entre taxones, mediante la construcción de árboles filogenéticos. Actualmente son tres los métodos más utilizados para la construcción de filogenias:

- 1) El método de Neighbor-joining (NJ) no considera cambios mutacionales. Como primer paso se conectan las secuencias (vecinos) con menor distancia génica a un nodo interno, este proceso es repetido hasta unir todos las unidades taxonómicas operacionales (OTUs), por lo que el mejor árbol, es el de menor longitud total.

2) El método de Máxima Parsimonia (MP), cuya topología es explicada por el menor número de cambios de carácter o mutaciones, el cual utiliza los sitios informativos.

3) El método de Máxima Verosimilitud (ML) examina y evalúa el soporte de cada posición de la topología. El algoritmo de ML calcula la probabilidad de cada nucleótido en la estructura y el mejor árbol es el que explica razonablemente estos cambios (Salemi y Vandame, 2003).

III. JUSTIFICACIÓN

Los estudios y nuevas técnicas de identificación y/o caracterización de bacterias marinas, han revelado su gran diversidad y abundancia en los ecosistemas, por lo que el papel que desempeñan es fundamental en el sustento de los mismos. En el caso de la acuicultura, es indispensable la presencia de bacterias, ya que permiten una mejor calidad del agua a través de los procesos biogeoquímicos. Así mismo, son una fuente de nuevas biomoléculas con potencial biológico, ecológico, farmacéutico y económico, por ello se busca aislar e identificar a estas bacterias.

La microbiología tradicional permite obtener información sobre su biología y con ello una identificación, sin embargo la mayoría de las bacterias no crecen en cultivos, por lo que la base de datos para la identificación taxonómica es insuficiente, aunado a la necesidad de estandarizar cuidadosamente las técnicas de crecimiento. Sin embargo el análisis de secuencias nucleotídicas mediante técnicas moleculares, permiten resolver los problemas taxonómicos. Actualmente la molécula 16S ARNr es la más utilizada debido a su universalidad, tamaño y secuencias conservadas.

Los estudios de identificación microbiana en ambientes de acuicultura para el estado de Sonora son mínimos, por lo que la aplicación de técnicas como PCR, secuenciación del gen 16S, en complemento con herramientas bioinformáticas y fenotípicas puede brindar información de identidad, con lo que se pretende generar antecedentes para futuros trabajos en el área.

IV. HIPÓTESIS

Es factible identificar bacterias marinas de efluentes de granjas camaronícolas, mediante evidencia fenotípica y la secuencia parcial del gen 16S del ARN ribosomal.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo General

Identificar bacterias marinas obtenidas de efluentes de granjas camaronícolas, mediante evidencia fenotípica y de la secuencia parcial del gen del 16S del ARN ribosomal.

V.2. Objetivos Específicos

1. Aislar bacterias marinas de efluentes de granjas camaronícolas en medios de cultivos generales y nitrificantes.
2. Determinar características fenotípicas de las bacterias marinas aisladas.
3. Amplificar el gen 16S del ARN ribosomal de bacterias marinas aisladas mediante la PCR y obtener su secuencia.
4. Comparar las secuencias obtenidas de las cepas bacterianas aisladas y las secuencias publicadas en el GenBank del dominio Bacteria, mediante un análisis filogenético utilizando el criterio de Máxima Verosimilitud.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. Organismos de Estudio

Se trabajó con cinco cepas bacterianas: E-4D, E-4G, NFg.12, 5M7.13 y RoG.13. Las cepas E-4D y E-4G, nitrificantes, proporcionadas por el Cepario del Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS), se obtuvieron de efluentes de camarón, de un sistema de alta densidad de cultivo de *Litopenaeus vannamei*, con recirculación (Tabla I). El medio de cultivo en donde se aislaron estas cepas es un medio inorgánico con sulfato de amonio (MI-221) y su formulación se cita en la Tabla II y se conservaron en agar marino (AM) 2216 DIFCO (Apéndice 1). Las otras tres cepas (NFg.12, 5M7.13 y RoG.13; Tabla I) fueron aisladas de efluentes de cultivo de camarón de un sistema de laboratorio y seleccionadas por sus características fenotípicas (tamaño, color) y fácil crecimiento en AM, con excepción de la cepa NFg.12, que presentó dificultades en su aislamiento. Todas las cepas bacterianas se aislaron mediante la técnica de estría cruzada.

Para el medio de cultivo MI-221 se utilizó agua de mar al 35‰ filtrada, posteriormente se sometió a una esterilización en autoclave durante 15 minutos a 121°C y 15 lb de presión. Después se colocaron en cada placa 15 mL de medio. La temperatura de incubación se mantuvo a $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

Tabla I. Cepas bacterianas de estudio.

Cepa	Medio de cultivo donde se aisló	Fecha de aislamiento
E-4D	MI-221	Junio de 2012
E-4G	MI-221	Junio de 2012
NFg.12	AM	Septiembre de 2012
5M7.13	AM	Enero de 2013
RoG.13	AM	Enero de 2013

Tabla II. Composición nutricional del medio de cultivo MI-221 utilizado para las cepas nitrificantes.

Compuesto	Contenido
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	3.0 g
K_2HPO_4	0.5 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.78 g
Solución de Fe/EDTA y metales	1.0 mL
Agar bacteriológico	15 g
Agua de mar filtrada	1000 mL

VI.2. Pruebas de Tolerancia a la Temperatura

Se realizaron pruebas de crecimiento para las cinco cepas en estudio, con temperaturas de incubación de 20°C, 25°C, 30°C, 35°C y 42°C. Para ello, se inoculó cada una de las cepas de prueba en AM, se incubaron a las temperaturas respectivas durante 24-48 horas y se registraron las diferentes temperaturas en las que se presentó crecimiento.

VI.3. Pruebas de Susceptibilidad a Antibióticos

Las pruebas de susceptibilidad a antibióticos se realizaron en agar Mueller Hinton (MH), a partir de cultivos de 18-24 horas inoculados en agar soya tripticasa (AST) a los que se les adicionó 2.5% de NaCl (Apéndices 2 y 3). Se hicieron suspensiones bacterianas de cada cepa en solución salina al 3%, con 4-5 colonias que se homogenizaron con un agitador de vórtice Mca. IKA. Posteriormente, con hisopos humedecidos en la suspensión, se inoculó en placas con agar MH con la técnica de estría simple cerrada, cubriendo uniformemente toda la superficie de la placa. Después se colocó el disco del antibiograma de BIORAD® que contiene a 12 antibióticos: Amikacina (AK), Ampicilina (AM), Carbenicilina (CB),

Cefalotina (CF), Cefotaxima (CTX), Ceftriaxona (CB), Cloranfenicol (CRO), Gentamicina (GE), Netilmicina (NET), Nitrofurantoina (NF), Prefloxacina (PEF), Trimetoprim-Sulfametoxazol (STX). Las placas inoculadas se incubaron a 30°C y se registraron resultados a las 18 y 24 horas. Se utilizó *Vibrio alginolyticus* como microorganismo control.

VI.4. Tinción Gram

Se trabajó con colonias aisladas que provenían de cultivos de 18–24 horas en AM. Se hicieron frotis en portaobjetos, se fijaron con calor y se procedió con la metodología de tinción citada en Brooks et al. (2005). Para ésto, se agregó una solución de cristal violeta sobre la preparación, se dejó un minuto a temperatura ambiente y se lavó el excedente con agua. Posteriormente se agregó lugol por un minuto, que funciona como un mordente el cual forma un complejo entre el cristal violeta y el Iodo que se fija a la pared celular bacteriana con mayor intensidad. Después se agregó alcohol acetona por un minuto, se lavó y agregó safranina por un tiempo igual, seguido de un último lavado con agua corriente. Las observaciones se realizaron en un microscopio compuesto, Carl Zeiss Axiostar Plus a 100X, para determinar el tipo de pared celular, tamaño, disposición y tipo de agrupación que mostraron las células bacterianas (Brooks et al., 2005).

VI.5. Pruebas de Catalasa y Oxidasa

Las pruebas de oxidasa y de catalasa se determinaron con cultivos de 24 horas, con la metodología recomendada por MacFaddin (2003). Para la prueba de oxidasa se tomó una colonia de cada cultivo en AM y se colocaron sobre papel filtro impregnado con el reactivo N–N–N–N–tetrametil–1, 4–fenilendiamina. Esta prueba se basa en la detección de la enzima oxidasa del sistema citocromo oxidasa, que permite a las bacterias utilizar el oxígeno como

aceptor final del hidrógeno y reducirlo a peróxido de hidrógeno. La aparición de un color violeta-púrpura en los primeros 10 a 30 segundos indicó una prueba positiva.

Para la prueba de la catalasa, se colocó una colonia sobre un portaobjetos y se adicionó dos gotas de peróxido de hidrógeno al 3%. La formación inmediata de burbujas es una prueba positiva, e indica la presencia de la enzima catalasa que degrada el peróxido de hidrógeno. En esta reacción se produce agua y oxígeno.

VI.6. Extracción de ADN de las Cepas Bacterianas

Para la extracción de ADN de las cinco cepas de estudio se utilizó el Kit DNeasy Blood & Tissue de Qiagen. Las células bacterianas se colocaron en tubos de 1 mL en una centrífuga marca Eppendorf modelo 5804R durante 10 minutos a 7,500 rpm y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, el botón de bacterias se resuspendió en 180 μ L de PBS. Se modificó el protocolo, ya que en lugar de 20 μ L se agregó 50 μ L de proteinasa K y 200 μ L de Buffer AL (sin etanol), se mezclaron con un agitador mecánico de vórtice durante 15 segundos y se incubó a 56°C durante una hora. A continuación, se adicionó 200 μ L de etanol (96–100%) a cada una de las muestras y se mezcló de nuevo.

Posteriormente se agregó la mezcla a una minicolumna con el tubo colector previamente dispuesto. Se centrifugó a 6,000 x g por 1 minuto y se descartó el sobrenadante. Se agregó 500 μ L de Buffer AW1, se centrifugó por un minuto a 6,000 x g. se descartó el sobrenadante. Después se agregó a la muestra 500 μ L de Buffer AW2 y se centrifugó a 20,000 x g durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se centrifugó de nuevo a 20,000 x g durante 1 minuto. Se descartó el contenido y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL libre de nucleasas. En seguida, se añadió a la minicolumna 200 μ L de Buffer AE directamente sobre la membrana, se incubó a temperatura ambiente durante un minuto y se centrifugó de nuevo a 6,000 x g por 1 minuto.

VI.6.1 Cuantificación e integridad del ADN

Para determinar la concentración y pureza del ADN extraído se midió a 230, 260 y 280 nm en el Nanofotómetro IMPLEN B/BO/ 3004/331. La molécula de ADN tiene una absorbancia máxima a 260 nm y las proteínas a 280 nm. Una razón 260/280 nm entre 1.7 y 2.0 indica que se tiene ADN libre de proteínas. Así mismo, la razón 260/230 nm entre 2.0 y 2.2 señala que el ADN está libre de sales y/o solventes. Una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde aproximadamente a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$.

La integridad del ADN se observó en un Transiluminador UVP TMN-20V. Para esto, 4.0 μL del ADN obtenido de cada cepa de estudio se colocó en los pozos de un gel de agarosa al 2% en amortiguador TAE 1X con 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de bromuro de etidio y después se realizó una electroforesis por 40 minutos a 90V.

VI.6.2 Amplificación del fragmento 16S ARNr mediante la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizó un gradiente de temperatura para nueve reacciones con la muestra E-4D, con el que se determinó la temperatura adecuada a la cual se alinearon los cebadores COM1 CAGCAGCCGCGGTAATAC y COM2 CCGTCAATTCCTTTGAGTTT (Schwieger y Tebbe, 1998), en donde se utilizó 1 μL de cada uno de éstos, 1 μL de muestra, 14.3 μL de agua, 2 μL de buffer, 0.5 μL de mezcla dNTP's y 0.2 μL Taq polimerasa. Se usó un termociclador Bio Rad DNA Engine® con el programa que se muestra en la tabla III. Una vez establecidas las temperaturas de alineamiento de los cebadores, se trabajó con la misma temperatura para todas las muestras. Para el gradiente de temperatura se utilizaron las siguientes temperaturas: 48°C, 50.5°C, 52.3°C, 54.4°C, 56.9°C, 59.0°C, 60.7°C, 61.8°C, 63.0°C y 72.0°C, con una duración de 30 segundos.

Tabla III. Programa de amplificación de gradiente para establecer la temperatura óptima de alineamiento de los cebadores.

Paso	Ciclos	Temperatura (segundos)
Desnaturalización inicial	1	95°C (360)
Desnaturalización		95°C (30)
Alineamiento	40	Gradiente de temperatura
Extensión		72°C (45)
Extensión final	1	72°C (300)
Mantenimiento	∞	15°C

VI.6.3. Electroforesis en gel de agarosa

Las bandas de los productos de PCR se observaron en un Transiluminador UVP TMN-20V, del modo descrito en el apartado VI.6.1.

VI.7. Secuenciación

Para determinar las secuencias de los nucleótidos del gen 16S, se realizaron los siguientes pasos: purificación y cuantificación de los productos de PCR, reacción de secuenciación, purificación de los productos de la reacción de secuenciación y análisis de los productos de la reacción de la secuenciación.

La purificación de los productos de PCR se realizó con el Kit QIAquick de QIAGEN. Para ello, 30 μ L del producto de PCR se mezclaron con 180 μ L buffer PB en un tubo de 1.5 mL libre de nucleasas. La mezcla se colocó en una columna con un tubo colector de 2 mL y se centrifugó por 2 minutos para unir el producto de PCR a la membrana de sílice. La membrana se lavó con 750 μ L de Buffer PE y se centrifugó por dos ocasiones más. Por último, el producto de PCR purificado se recuperó con 50 μ L de agua en un tubo de 1.5 mL libre de

DNAsa. Después se realizó una cuantificación de los productos obtenidos con el Nanofotómetro IMPLEN B/BO/3004/331 a 260 y 280 nm con la finalidad de determinar las cantidades de los reactivos que se utilizaron en las reacciones posteriores.

Para la reacción de secuenciación se utilizó un termociclador APPLIED BIOSYSTEMS 9700. Por cada producto de PCR se realizaron dos reacciones, una para el cebador COM1 y la segunda para el cebador COM2. Para cada reacción se mezclaron 0.32 μL del cebador 10 μM con 4.0 μL del reactivo de BigDye Terminator v.3.1 y 4.0 μL BigDye Sequencing Buffer de Applied Biosystems, después se agregaron 10 ng del producto de PCR purificado y la mezcla se aforó a 20 μL con agua libre de nucleasas. Para la secuenciación se utilizó el programa de amplificación descrito en la tabla IV.

La purificación de los productos de la reacción de secuenciación se realizó en columnas de exclusión Centri-Sep (Princeton Separations). Previamente las columnas se hidrataron a temperatura ambiente por 30 minutos con 800 μL de agua libre de nucleasas. Para descartar el exceso de agua de las columnas hidratadas se centrifugaron a 730 x g por 2 minutos. Posteriormente se colocó la columna en un tubo de 1.5 mL libre de nucleasas. El producto de la secuenciación se colocó en el centro de la columna para recuperarlo por centrifugación a 730 x g por 3 minutos.

El análisis de los productos de la reacción de la secuenciación se realizó después de la electroforesis por capilar, en el analizador genético modelo 3130 de Applied Biosystem. Para obtener cada secuencia, se mezclaron 10 μL de formamida y 10 μL del producto de la reacción de la secuenciación en una placa de reacción. Las secuencias se visualizaron con el software SeqScape versión 2.7.

Tabla IV. Programa de secuenciación cíclica (25 ciclos).

Paso	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (segundos)
Desnaturalización	96	10
Alineación	50	5
Extensión	60	4
Mantenimiento	4	∞

VI.7.1. Análisis de secuencias

La edición de las secuencias de la región 16S ARNr se realizó con el programa Chromas-Pro versión 1.41 (<http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html>). Después se realizaron alineamientos con el paquete Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, para identificar secuencias de genes homólogos que se encuentran depositados en el GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Posteriormente se realizó una búsqueda de secuencias del gen 16S de diferentes especies bacterianas depositadas en la misma base de datos. Las secuencias seleccionadas y las del estudio se alinearon con los programas informáticos Clustal W (Thompson et al., 1994) y DNAMAN (Lynnon Biosoft) para conocer los sitios conservados y variables. En este alineamiento se incluyeron especies de los fila Proteobacteria y Bacteroidetes.

Los análisis filogenéticos se realizaron con el programa PAUP* versión 4.0b10 (Swofford, 2002). Las hipótesis filogenéticas se obtuvieron a partir de los criterios de distancias genéticas por medio de Neighbour-joining (NJ), Máxima Parsimonia (MP) y Máxima Verosimilitud (ML). El análisis de NJ se realizó bajo el criterio de Kimura-2 parámetros (Kimura, 1980), con 1000 réplicas aleatorias de bootstrap hasta encontrar la topología de las relaciones entre los organismos analizados. Para el análisis de MP se obtuvo el árbol más parsimonioso con la técnica de bisección-reconexión de árboles (TBR por sus siglas en inglés) a partir de una búsqueda heurística, donde todos los caracteres fueron igualmente ponderados con 1000 réplicas aleatorias de bootstrap no paramétrico (10 adiciones al azar). Los índices de retención y consistencia para MP se obtuvieron utilizando el programa PAUP* (Swofford, 2002). Previo al análisis de ML, se obtuvo el modelo más óptimo de sustitución de nucleótidos para el análisis mediante las pruebas de tasa jerárquica de verosimilitud (hLRTs por sus siglas en inglés) y el criterio de información de Akaike (AIC, por sus siglas en inglés) (Posada y Buckley, 2004), obtenidos en Model Test 3.2 (Posada y Crandall, 1998). El modelo se utilizó para calcular los valores y la topología del árbol a partir de una búsqueda de Máxima Verosimilitud utilizando el intercambio de ramas (branch-

swapping search) para un árbol de alta verosimilitud con los parámetros recuperados en el programa PAUP* (Swofford, 2002). Este árbol se utilizó como el árbol de inicio para un análisis de bootstrap no paramétrico de 1000 pseudo réplicas para estimar el soporte de nodos en el análisis de ML. Los árboles filogenéticos fueron editados utilizando el programa FigTree versión 1.3.1 (<http://trre.bio.ed.sc.uk/software/figtree/>).

VII. RESULTADOS

VII.1. Aislamiento de Cepas Bacterianas

VII.1.1. Cepa E-4D

La cepa E-4D presentó buen crecimiento a partir de las 24 horas en agar marino 2216 (AM). Las colonias que crecieron en este medio, miden entre 1 y 2 mm de diámetro, con un ligero hundimiento en la parte central de la colonia, así mismo, el medio de cultivo presentó una aclaración, disminuyendo la turbidez propia del mismo. A las 48 horas las colonias desarrolladas fueron de color blanco-cremoso (Figura 2A), de forma cóncava, borde regular, con un diámetro de 2 mm. Entre los cinco y siete días las colonias empiezan a hundirse completamente en el agar y pierden la coloración debido a licuefacción del agar (Figura 2C). El proceso de transferencia de las colonias del medio, se realizó de manera fácil, debido a que el asa penetró sin dificultad en el agar. Sin embargo el manejo de las placas requirió que se sellaran y manejaran con extrema precaución por la presencia de líquidos.

La cepa bacteriana E-4D es oxidasa positiva y catalasa negativa. El proceso de tinción y observaciones microscópicas realizadas mostraron que las células de esta bacteria son bacilos largos, gram (-), delgados y pleomórficos (Figura 3D).

VII.1.2. Cepa E-4G

La cepa E-4G mostró excelente crecimiento a las 24 horas en AM, las colonias en este tiempo presentaron las siguientes características: tamaño de entre 2 y 3 mm, color blanco-cremoso, elevación umbonada, borde entero, colonias casi circulares, debido a un pequeño estiramiento

de la colonia. Con el tiempo llegan a tener un gran desarrollo, la figura 2D muestra colonias de 25 días que llegaron a medir 1 cm de diámetro, con pérdida aparente de la coloración, que al final mostraron un tono transparente, con la parte central de coloración cremosa en forma circular. Esta característica se observó solamente cuando las colonias se encontraron más aisladas. De igual forma se observó algún compuesto que las bacterias excretan y ocasionan turbidez en el medio de cultivo AM. Tanto la cepa E-4D y E-4G crecen en el medio inorgánico MI-221.

Las cepa bacteriana E-4G es positiva para la prueba de catalasa y oxidasa. Las observaciones microscópicas de las células mostraron bacilos gram (-), cortos o cocobacilos, que presentaron agrupación de dos bacilos, como en proceso de división (Figura 3E). Se encontró también algunas formas cocoides (en proporciones insignificantes).

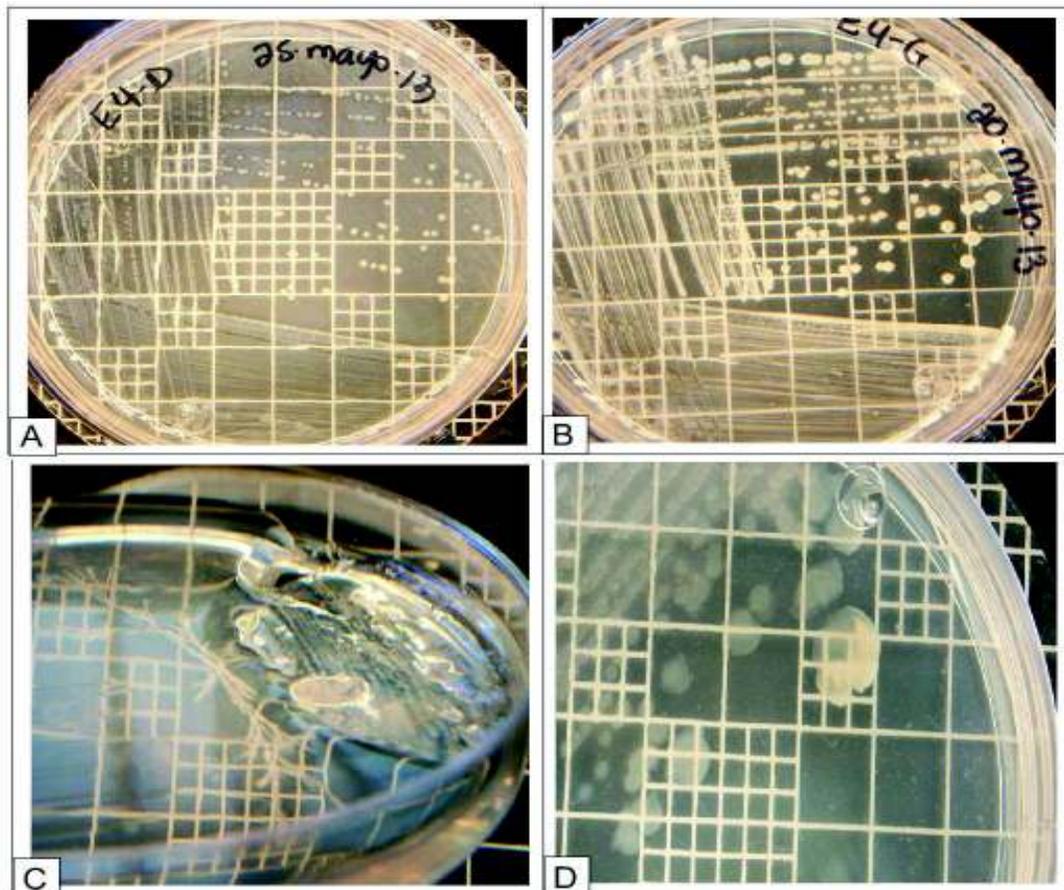


Figura 2. Morfología colonial de las cepas E-4D y E-4G. A) Colonia de 48 horas en AM de la cepa E-4D. B) Apariencia de colonias jóvenes de E-4G en AM. C) Inóculo de la cepa E-4D en una sección de la placa con medio MI-221 que presenta licuefacción del agar. D) Colonias de la cepa E-4G con mayor tiempo de crecimiento en AM. AM=Agar marino.

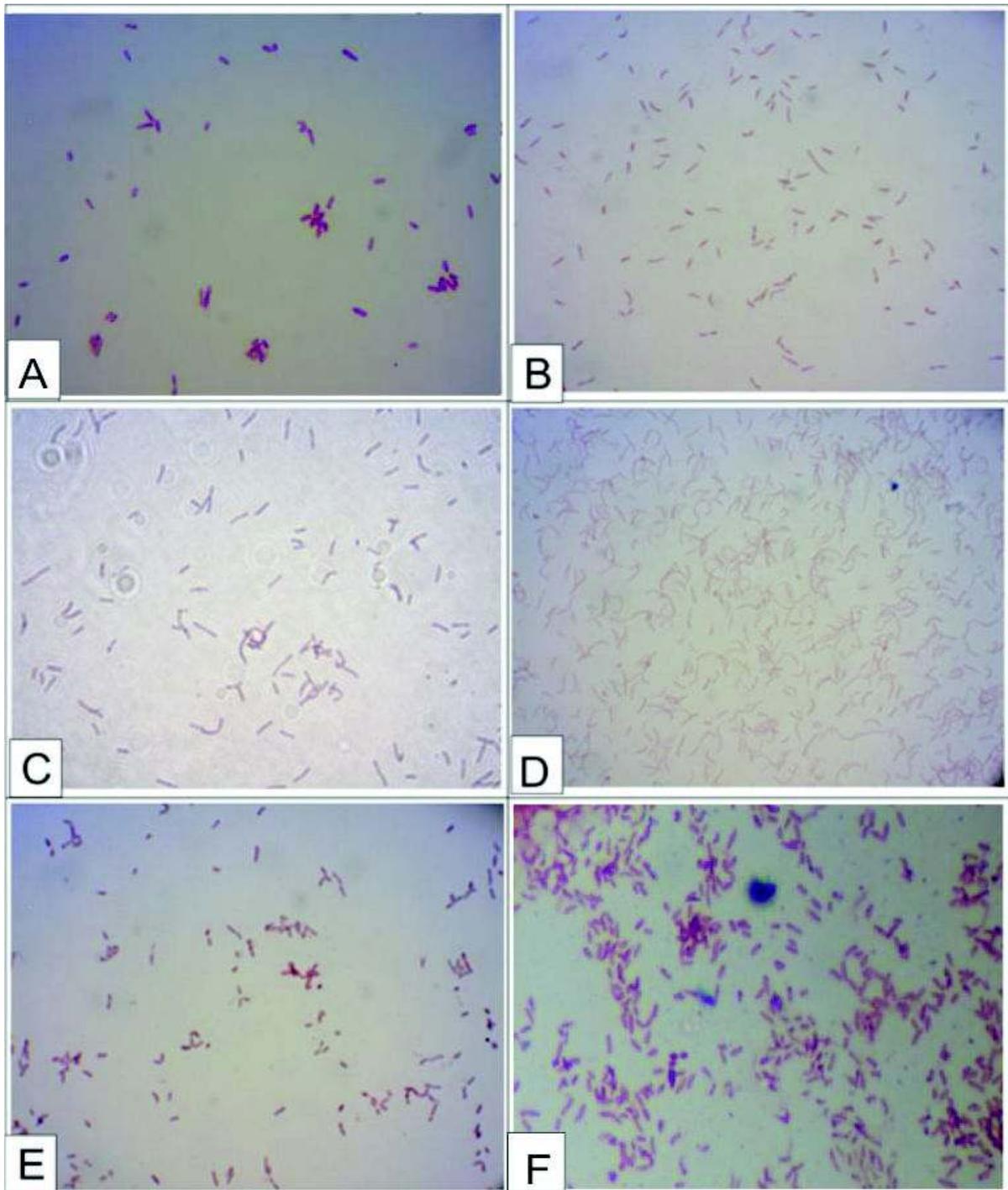


Figura 3. Tinción gram de las cinco cepas de estudio. A) Bacilos cortos, gram negativos de la cepa NFG.12. B) Bacilos gram negativos de la cepa RoG.13. C) Bacilos grandes, gram negativos de la cepa 5M7.13. D) Bacilos grandes, gram negativos de la cepa E-4D. E) y F) Coco-bacilos, gram negativos de la cepa E-4G.

VII.1.3. Cepa NFig.12

El aislamiento de la cepa NFig.12 fue realizado en AM. El crecimiento a las 24 horas de incubación de esta cepa presentó en la zona de aislamiento colonias puntiformes, de color blanco, convexas y de margen entero. Entre las 48 y 72 horas mostró buen crecimiento, con cambios de coloración en la colonia conforme transcurrió el tiempo de incubación. En la zona de descarga se observó un pigmento verde-azulado que se acentuó en presencia de luz, como se observa en la figura 4A. Este pigmento mostró una tendencia a desaparecer cuando las colonias presentaron una tonalidad oscuro intenso, a la vez que la morfología de las colonias se tornaron fusiformes (Figura 4B). Por otro lado, en cultivos de un mes aproximadamente en caldo marino, esta cepa mostró crecimiento en forma de biopelícula con apariencia mucoide, acompañada de turbidez.

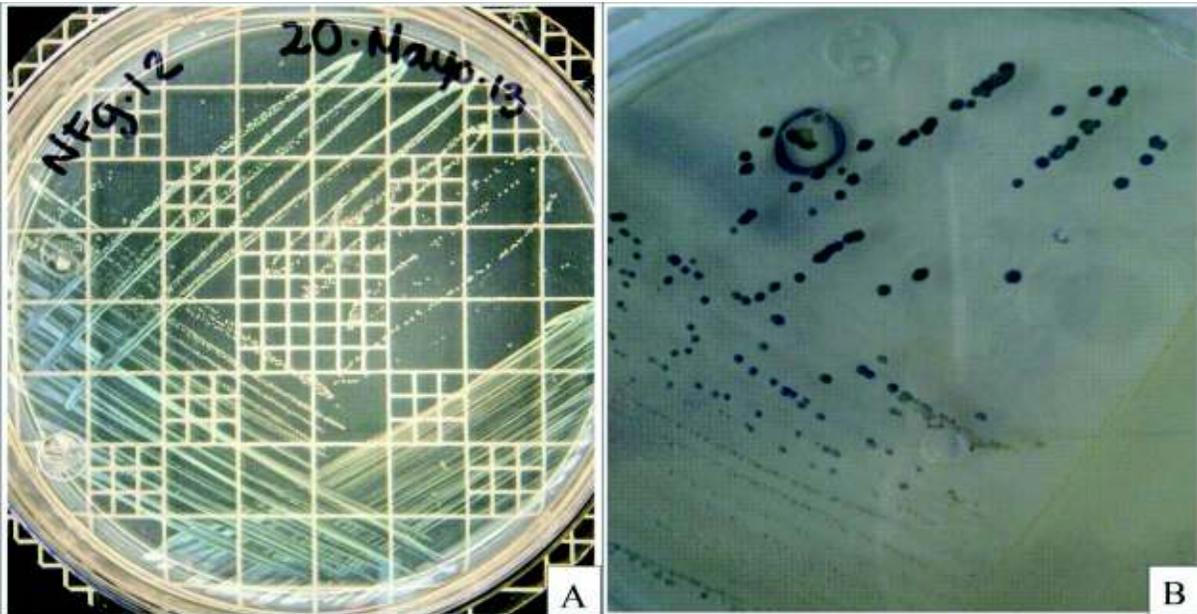


Figura 4. A) Características morfológicas coloniales de la cepa NFig.12 en AM a las 24 horas de cultivo, con coloración tornasol en la zona de descarga, las colonias aisladas presentan un color blanco, puntiformes con un tamaño poco menos de 1 mm de diámetro. B) Características morfológicas coloniales de la cepa NFig.12 en AM a los 15 días de incubación. AM=Agar marino.

Se realizaron pruebas de crecimiento de la cepa NFg.12 en el medio inorgánico MI-221, sin resultados positivos aparentes. Sin embargo cuando se reinoculó la cepa del medio inorgánico MI-221 al medio AM, éste permitió recuperar la cepa con las características morfológicas descritas anteriormente (que no fueron apreciables en el medio MI-221), a pesar que el primer inóculo no presentó las características morfológicas originales hasta después de un mes de inoculación (Figura 5).

La cepa NF.g12 es positiva para la prueba de oxidasa y catalasa. El proceso de tinción gram y las observaciones al microscopio de la cepa NFg.12 denotó células en forma de bacilos cortos, gram (-) con pared celular gruesa (Figura 3A).

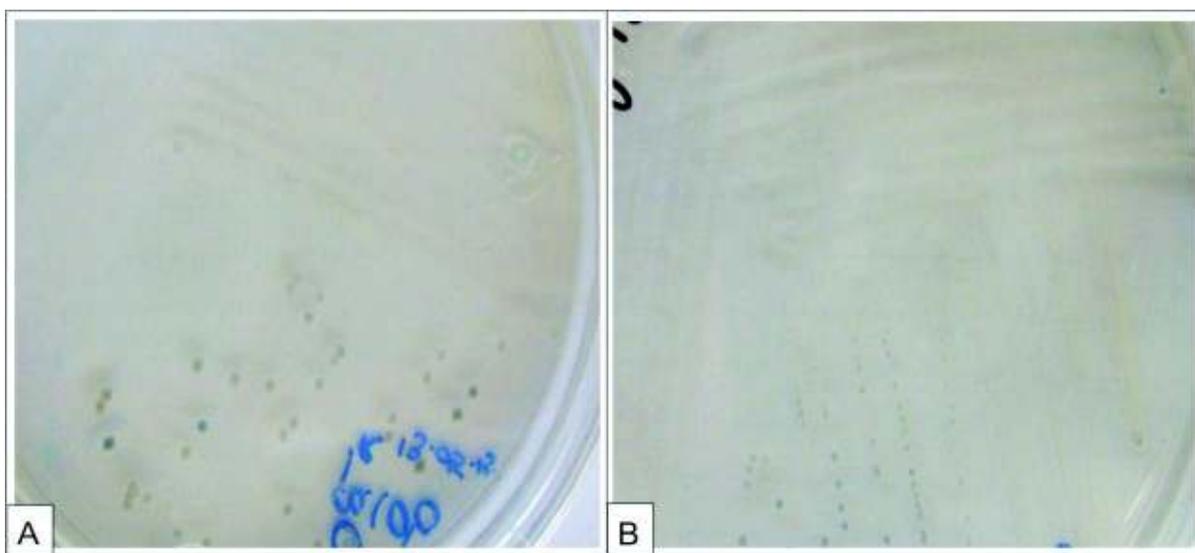


Figura 5. Seguimiento de resiembra de la cepa NFg.12 en AM después de inoculación en medio MI-221. A) Colonias de la cepa NFg.12 con más de un mes posterior a la resiembra. B) Colonias de 15 días, en las que se observó un color negro pálido. AM= Agar marino.

VII.1.4. Cepa 5M7. 13

La cepa 5M7.13 presentó buen crecimiento en AM a las 24 horas, las colonias pequeñas son de color amarillo transparente. A las 48 horas fue posible distinguir con precisión su morfología. Las colonias son de 2 mm de diámetro, con borde regular, forma circular y elevación convexa, el color es amarillo-cremoso. A las 72 horas alcanzaron un tamaño de 3

mm de diámetro y el color amarillo se tornó intenso y brillante (figura 6A), estas características se mantuvieron por alrededor de cinco días. Poco después se observó una serie de diminutas partículas circulares de color café en el centro de la colonia.

Esta bacteria no mostró crecimiento visible en MI-221, sin embargo fue posible recuperar la cepa en AM con ciertos cambios en su morfología, por ejemplo las colonias nuevas fueron más pequeñas, se observó un crecimiento colonial que se desliza por el camino que recorre la estría, esto permitió que se unieran las colonias por la cercanía, lo que pareciese que la cepa no se encontraba del todo pura. También se observó un cambio en la disminución en la tonalidad de la coloración amarilla, además de una opacidad en el medio que pudiese ser de algún compuesto que precipitó del medio o que la bacteria hubiese excretado (Figura 6B). Sin embargo al transferir una cepa obtenida de medio MI-221 a caldo marino y nuevamente a placas con medio de cultivo AM, se observaron las características originales de las colonias.

La cepa 5M7.13 resultó positiva para la prueba de oxisada y catalasa. Las observaciones a las 24 horas mediante tinción gram y microscopía permitió visualizar bacterias gram (-), pleomórficas, con forma de bacilos grandes y otros más cortos, tal vez en proceso de división o formando cadenas cortas. También se encontraron estructuras de forma cocoide en pequeñas proporciones (Figura 3C).

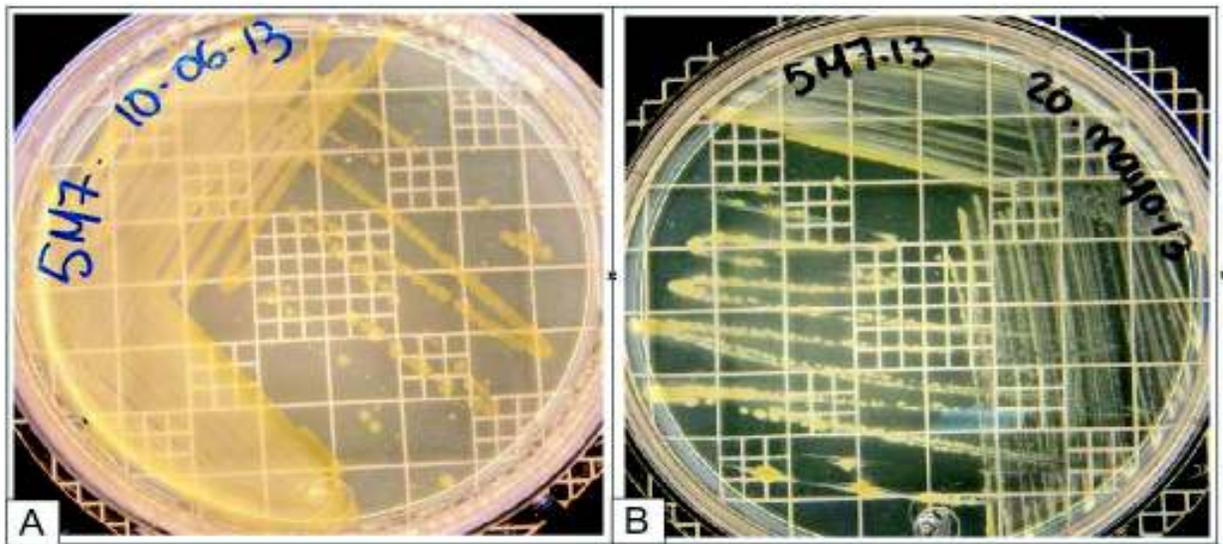


Figura 6. Cepa bacteriana 5M7.13 cultivada en AM. A) Colonias de 72 horas con las características originales B) Colonias provenientes del medio MI-221, se observan colonias de morfología con “estiramientos” y coloración amarilla cremosa. AM=Agar marino.

VII.1.5. Cepa RoG.13

La cepa RoG.13 presentó un crecimiento lento a las primeras 24–48 horas. Las colonias desarrolladas en agar marino fueron, colonias puntiformes y transparentes lo que dificultó la observación morfológica. Sin embargo a las 72 horas las colonias mostraron una forma circular, convexas, de borde entero con una coloración rosa pálido y coalescencia de aspecto mucoso. Con un período de mayor tiempo de incubación las colonias llegaron a medir 3-4 milímetros de diámetro, se modificó su morfología por la coalescencia, además de la pérdida de coloración rosa, tornándose rosa transparente.

Esta cepa, al igual que NFg.12 no se desarrolló en el medio MI-221, aunque fue posible recuperar las cepas inoculadas en este medio inorgánico y resembrarlas de nuevo en AM, en donde no se observó un afecto en el color y/o el crecimiento de la cepa recuperada.

La cepa RoG.13 resultó positiva para la prueba de catalasa y oxidasa. La tinción gram de la cepa permitió visualizar mediante microscopía células de forma de bacilos, gram (-), que forman cadenas cortas (de dos o tres bacilos) (Figura 3B).

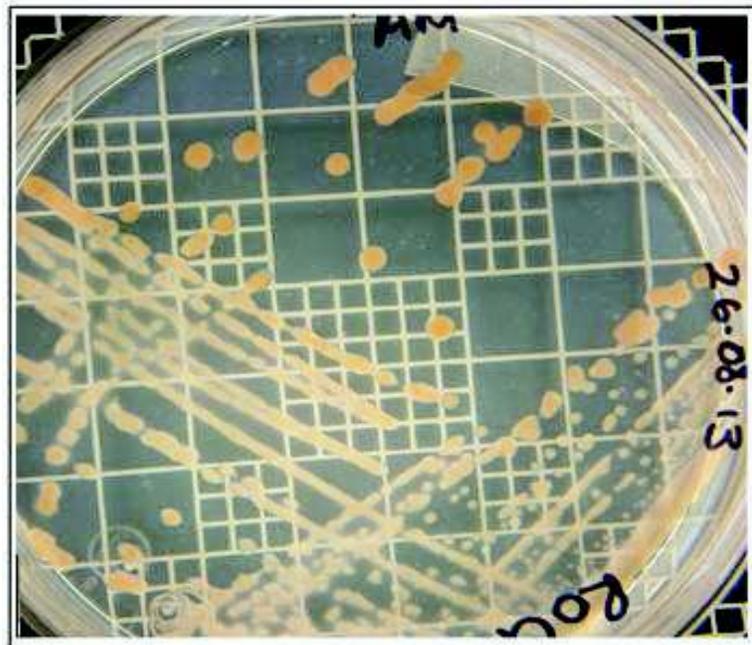


Figura 7. Colonias de la cepa bacteriana RoG.13 en cultivo de cinco días en agar marino.

VII.2. Pruebas de Tolerancia a la Temperatura de las Cepas Bacterianas

Las cinco cepas de estudio mostraron crecimiento a 25°C, 30°C, 35°C y 42°C. A la temperatura más baja (20°C) las cepas Nfg.12, 5M7.13 y RoG.13 tuvieron poco crecimiento. Mientras que las cepas E-4D y E-4G, mostraron excelente crecimiento en todas las temperaturas que se estudiaron (Tabla V).

VII.3. Pruebas de Susceptibilidad a Antibióticos

Las cepas E-4G, E-4D, 5M7.13, Nfg.12 y RoG.13 no mostraron crecimiento en las placas con los discos antimicrobianos aplicados, lo que denotó una gran susceptibilidad a los antibióticos probados. En el caso de la cepa control, *V. alginolyticus* mostró susceptibilidad a los siguientes antibióticos: Ampicilina, Gentamicina, Cefalotina y Cefotaxima.

Tabla V. Condiciones de temperatura a la cual se sometieron las cinco cepas bacterianas.

Cepa	Temperatura (°C)				
	20	25	30	35	42
E-4D	+	+	+	+	+
E-4G	+	+	+	+	+
5M7.13	P	+	+	+	+
Nfg.12	P	P	+	+	+
RoG.13	P	+	+	+	P

P = poco crecimiento

(-) = Sin crecimiento

(+) = Buen crecimiento

 Temperaturas con mejor crecimiento bacteriano

VII.4. Extracción de ADN de las Cepas Bacterianas

La extracción de ADN de las cinco cepas bacterianas (más la cepa control), se realizó con el kit DNeasy Blood & Tissue con las modificaciones mencionadas. Este proceso fue adecuado, dado que no se encontró contaminación por proteínas y se obtuvo una buena calidad en el ADN de todas las cepas (Apéndice 4), con excepción de la cepa RoG.13 en la que el proceso de extracción se realizó dos veces, debido a que se obtuvo muy poca cantidad de ADN.

VII.4.1. Amplificación del fragmento 16S ARNr

Se obtuvieron resultados esperados para todas las amplificaciones del gen 16S realizadas para las cepas, con los cebadores COM1 CAGCAGCCGCGGTAATAC y COM2 CCGTCAATTCCTTTGAGTTT. Para determinar la temperatura correcta de alineamiento se realizó un gradiente de temperatura para la muestra E-4D. La figura 8 muestra la electroforesis en gel de agarosa al 2%, en donde se utilizó un marcador de peso molecular (MPM) de 50 pb. Se obtuvieron bandas esperadas de 450 pb aproximadamente. Por otra parte, la temperatura que mostró menor barrido y mayor cantidad de producto fue la de 48.0°C. Se observaron barridos en todas las temperaturas y se encontró que conforme aumenta la temperatura, éstos fueron más notorios. A partir de la temperatura de 59°C se apreció otra banda de menor tamaño de alrededor de 370 pb y una disminución de la intensidad del ADN en la banda de 450 pb.

La figura 9 muestra la electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR de las cepas E-4G (carril 2 y 3) y E-4D (carril 4). En la electroforesis se observan las bandas de peso molecular de 450 pb, que muestra una excelente cantidad y calidad del producto amplificado, no se observaron barridos u otras bandas que acompañen a las esperadas.

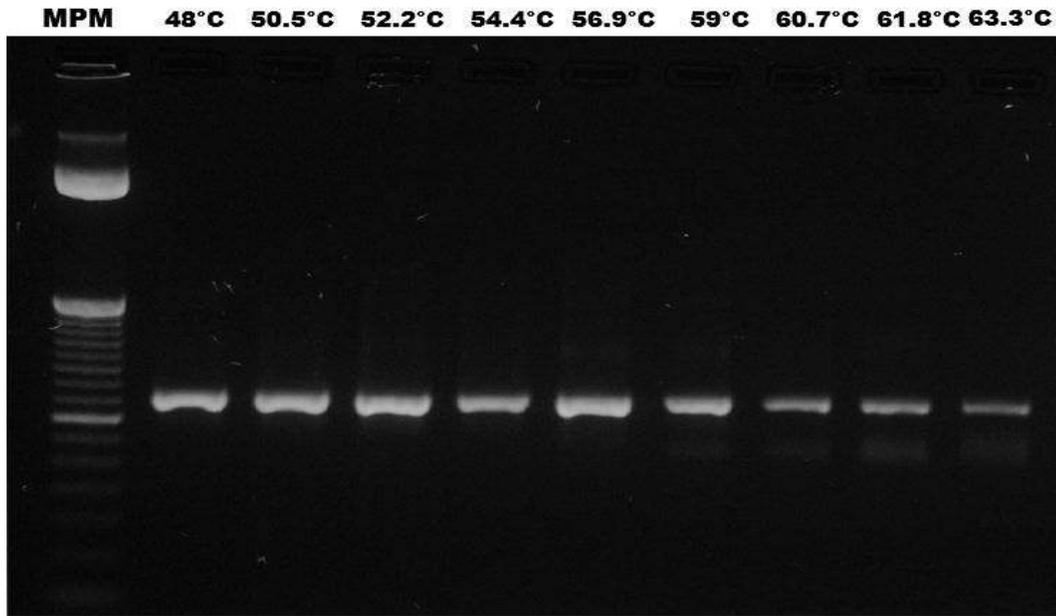


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, que muestra el gradiente de temperatura del producto perteneciente a la cepa E-4D. Carril 1: MPM de 50 pb. La temperatura aplicada al carril 2 fue de 48°C, carril 3: 50.5°C, carril 4: 52.2 °C, carril 5: 54.4°C, carril 6: 56.9°C, carril 7: 59°C, carril 8: 60.7°C, carril 9: 61.8°C y carril 10: 63°C. MPM=Marcador de peso molecular.

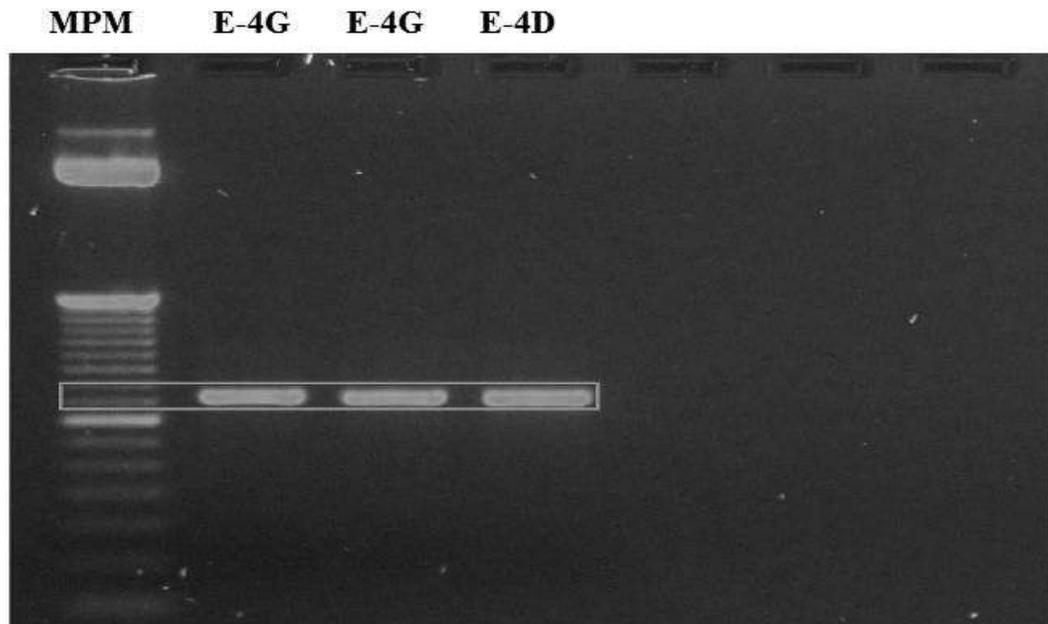


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de las cepas E-4G y E-4D. Carril 1: MPM de 50 pb. Carriles 2 y 3: cepa E-4G y carril 4: cepa E-4D. MPM=Marcador de peso molecular.

Para la amplificación de las muestras pertenecientes a las cepas RoG.13, NFg.12 y 5M7.13, se determinó una temperatura de 58°C (Figura 10). El producto de la amplificación de la muestra perteneciente a la cepa RoG.13, con poca cantidad producto de PCR, sin embargo se encuentra en el rango de 450 pb esperados. Las muestras NFg.12 y 5M7.13, se detectaron ligeros barridos en los productos pero con una excelente cantidad de producto de PCR.

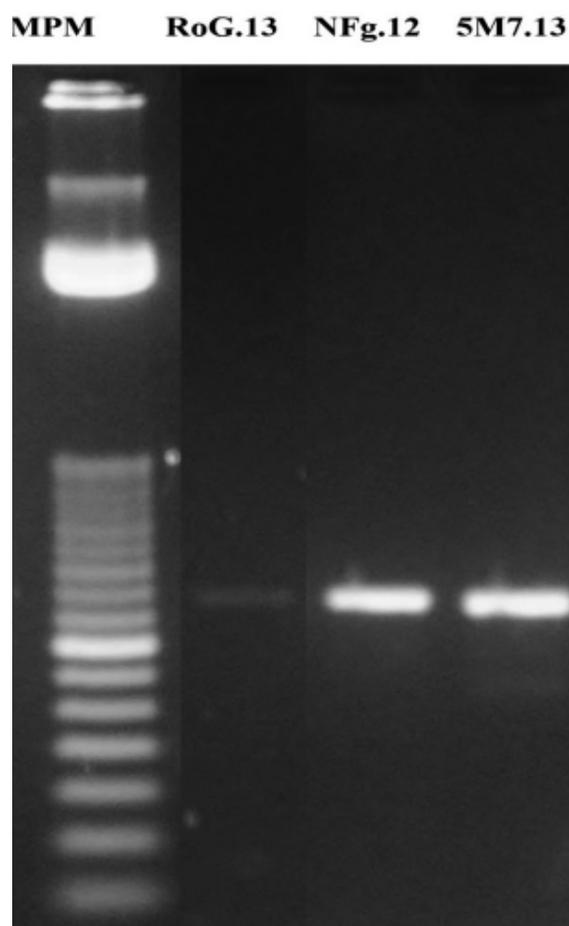


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de amplificación de las cepas bacterianas NFg.12, RoG.13 y 5M7.13. Carril 1: MPM de 50 pb. Carril 2: cepa RoG.13. Carril 3: cepa NFg.12 y carril 4: cepa 5M7.13. MPM=Marcador de peso molecular.

VII.5. Secuencias Analizadas

VII.5.1. Cepa E-4D

La secuencia analizada de la cepa E-4D cuenta con 404 pb y la mayoría de las secuencias homólogas publicadas en el GenBank comparten un 99% de similitud con el género *Methylophaga* (Tabla VI). Algunas secuencias pertenecen a clonas que no se han cultivado y no arrojan información taxonómica. Se encontró similitud en menor cantidad con secuencias de cepas de los géneros *Gordonia* y *Rhodococcus* sp. con un 99% de similitud (Apéndice 6).

Tabla VI. Secuencias homólogas con la cepa E-4D publicadas en el GenBank.

Bacteria	No. de acceso	Similitud	Longitud	Dirección
<i>Methylophaga</i> sp.	HQ268014.1	99% 404/410	1284	Plus-minus
<i>Methylophaga</i> sp. (No cultivada).	AM238581.1	99% 404/410	907	Plus-minus
<i>Methylophaga</i> sp. (No cultivada).	EU328072.1	99% 404/410	1504	Plus-minus

VII.5.2. Cepa E-4G

La secuencia generada de la cepa E-4G cuenta con 409 pb. La mayoría de las secuencias homólogas publicadas a la fecha en el GenBank pertenecen al género *Halomonas* que comparten un 99% de similitud con la cepa bacteriana E-4G de este estudio (Tabla VII), (Apéndice 7).

Tabla VII. Secuencias homólogas con la cepa E-4G publicadas en el GenBank.

Bacteria	No. de acceso	Similitud	Longitud	Dirección
<i>Halomonas organivorans</i>	NR_029029.1	99% 407/409	1472	Plus-minus
<i>Halomonas</i> sp.	GQ384066.1	99% 407/409	1453	Plus-minus
<i>Halomonas salina</i>	AY553073.1	99% 407/409	1489	Plus-minus

VII.5.3. Cepa NFig. 12

La secuencia parcial perteneciente a la cepa bacteriana NFig.12 cuenta con 407 pb. La mayoría de las secuencias homólogas publicadas en el GenBank son clonas sin cultivar. De estas secuencias, cuatro de ellas mantienen un 99% de similitud con el género *Phaeobacter* (Tabla VIII). De igual forma se encuentran secuencias en menor cantidad que pertenecen a otras bacterias como *Tropicibacter* sp., *Poseidonocella sedimentorum* y *Ruegeria* sp., con los que la secuencia de la cepa NFig.12 mantiene una similitud de 99% (Apéndice 8).

Tabla VIII. Secuencias homólogas con la cepa NFig.12 publicadas en el GenBank.

Bacteria	No. de acceso	Similitud	Longitud	Dirección
<i>Phaeobacter</i> sp.	FM196539.1	99% 407/409	1419	Plus-minus
<i>Phaeobacter caeruleus</i>	HM031996.1	99% 407/409	1333	Plus-minus
<i>Phaeobacter caeruleus</i>	NR_042701.1	99% 407/409	1422	Plus-minus

VII.5.4 Cepa 5M7.13

La secuencia de la cepa 5M7.13 mide 409 pb y según el análisis en el GenBank la mayoría de las secuencias publicadas pertenecen al género *Muricauda* con un 99% de similitud (Tabla IX), otras secuencias con el 99% de similitud corresponden a clonas no cultivadas, en menor cantidad secuencias referentes a *Flavobacterium* sp. y *Cytophaga* sp. (Apéndice 9).

Tabla IX. Secuencias homólogas con la cepa 5M7.13 publicadas en el GenBank.

Bacteria	No de acceso	Similitud	Longitud	Dirección
<i>Muricauda lutimaris</i>	KC565606.1	99% 405/407	800	Plus-minus
<i>Muricauda</i> sp.	HQ697918.1	99% 405/407	1488	Plus-minus
<i>Muricauda lutimaris</i>	GQ505255.1	99% 405/407	703	Plus-minus

VII.5.5. Cepa RoG.13

El tamaño de la secuencia de la cepa RoG.13 mide 407 pb. El análisis de la secuencia en el GenBank coincide en un 100% de similitud con 12 secuencias publicadas, de las cuales, 11 pertenecen a clonas que no aportan información sobre la identidad taxonómica, además de que no han sido cultivadas y solamente una secuencia corresponde a una bacteria no cultivada del género *Roseivirga* sp. (Tabla XI). En cuanto a las secuencias publicadas que comparten un 99% de similitud se encuentran de nuevo clonas que en su mayoría no han sido cultivadas y bacterias del género *Roseivirga* (Tabla X). Con un 98% de similitud se encontraron secuencias de los géneros de *Roseivirga*, *Cytophaga* y *Fabibacter* (Apéndice 10).

Tabla X. Secuencias homólogas con la cepa RoG.13 publicadas en el GenBank.

Bacteria	No. de acceso	Similitud	Longitud	Dirección
Bacteria no cultivada	JN547146.1	10% 405/405	891	Plus-minus
<i>Roseivirga</i> sp. (No cultivada)	JN546667.1	10% 405/405	914	Plus-minus
<i>Roseivirga ehrenbergii</i>	KF193941.1	99% 399/405	1242	Plus-minus

VII.6. Alineamiento de Secuencias

Una vez alineadas las cinco secuencias de las cepas de estudio y en conjunto con las secuencias analizadas provenientes del GenBank, se detectó que las secuencias de estudio abarcan aproximadamente desde el nucleótido 550 al nucleótido 980 de las 1500 pb que contiene la molécula del 16S del ARNr.

VII.7. Análisis Filogenético del Gen 16S ARNr

Como resultado de los alineamientos, se obtuvo una matriz de 451 posiciones que se utilizaron para la construcción de filogenias por medio del criterio de Máxima Verosimilitud (ML) con el modelo de evolución GTR+G+I, en el que se utilizaron mil réplicas de bootstrap y presentó una longitud de 7,612 pasos.

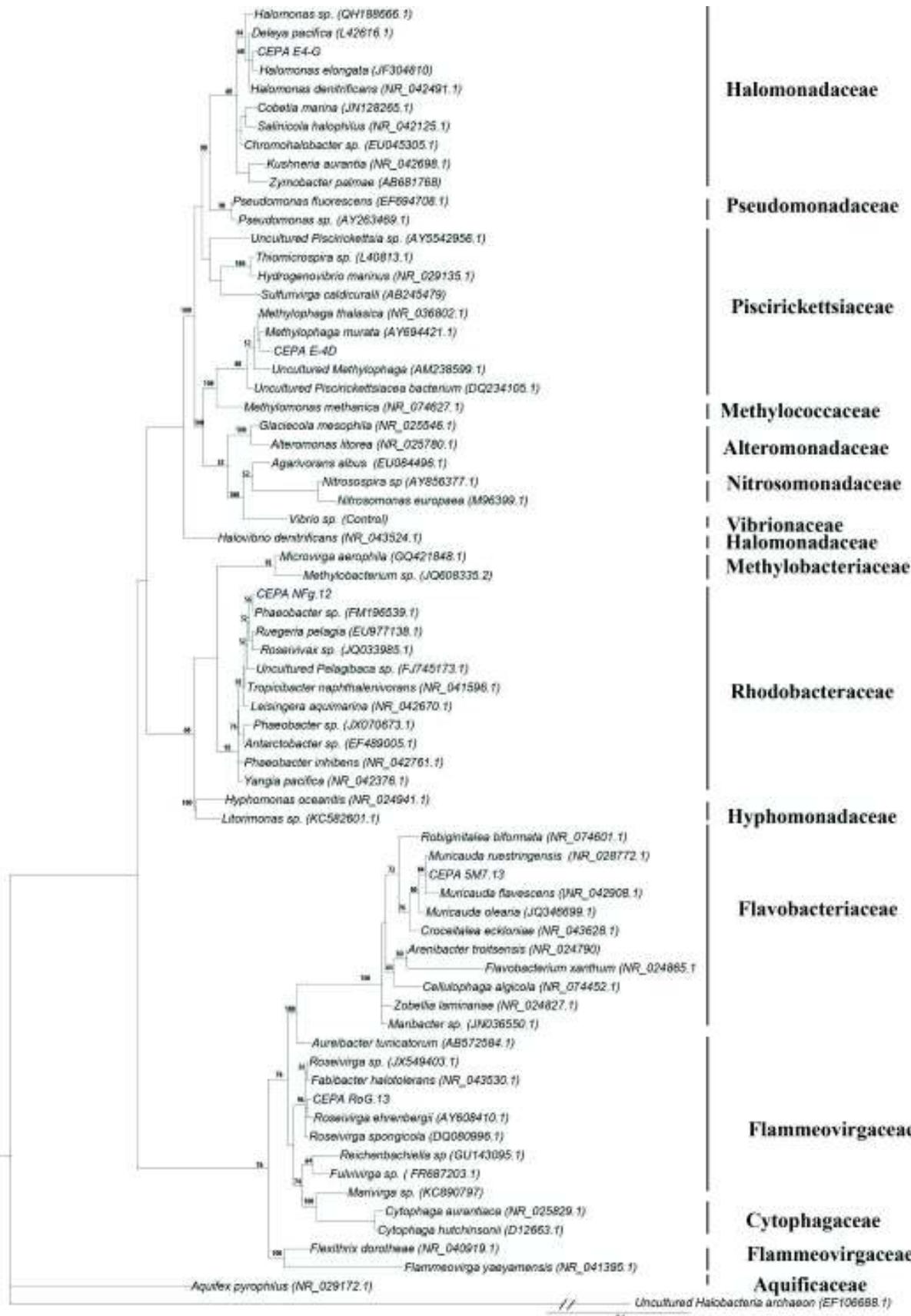
Para el árbol de Máxima Parsimonia (MP) nucleotídica, se obtuvieron valores de longitud de 1,539 pasos, con un índice de consistencia (CI) de 0.327 y un índice de retención (RI) de 0.745. Se encontró que 210 caracteres son sitios parsimoniosamente informativos, mientras que 59 caracteres no mostraron información. Se analizaron 68 secuencias incluidas las cinco cepas de estudio, más dos grupos externos *Aquifex pyrophilus* y *Halobacteria archaeon*. La topología de los tres criterios muestra la monofilia de los filo Proteobacteria y Bacteroidetes como monofiléticos. Además, al interior del filo Proteobacteria, se evidencia la monofilia de las clases Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria y Alphaproteobacteria. En la clase Betaproteobacteria se incluye el análisis al interior de la clase Gammaproteobacteria, lo que podría comprometer los resultados de esta investigación. El análisis con los criterios NJ y ML mostraron pocas diferencias que no comprometen las topologías de las cepas de estudio. La topología al interior de las familias se ven comprometidas en el árbol de MP, mientras que en el análisis de NJ, su topología es muy similar a la encontrada en el de ML, con excepción

de las familias Halomonadaceae, Piscirickettsiaceae y Flammeovirgaceae, donde uno y varios géneros comprometen su monofilia (Figura 11).

Para las cinco cepas de estudio, todas resultaron en clados monofiléticos con las especies hermanas depositadas en el GenBank de acuerdo a la topología del cladograma resuelto bajo el análisis de Máxima Verosimilitud (Figura 11). La cepa E-4G pertenece a la familia Halomonadaceae, con un valor de 68% en el análisis de bootstrap y 64% para el género *Halomonas*. De la misma forma, la cepa E-4D está asociada al género *Methylophaga*, representante de la familia Piscirickettsiaceae, con un valor de bootstrap de 88% y de 100% para la mayoría de las especies de la familia incluidas en el análisis. Estas unidades taxonómicas (E-4G y E-4D) mostraron un valor de 100% en el análisis de bootstrap para la clase Gammaproteobacteria, en donde ambas cepas resultaron miembros de esta clase.

La cepa NFg.12 anida al interior de la familia Rhodobacteraceae contribuyendo a la clara monofilia de esta familia con un valor de bootstrap del 60% (Figura 11). A su vez, la clase Alphaproteobacteria se observa monofilética para las familias Rhodobacteraceae e Hypomonadaceae utilizadas en el análisis. En el caso de la cepa 5M7.13, se encontró que pertenece a la familia Flavobacteriaceae en monofilia clara para todos los géneros utilizados en el análisis con un valor de 100% y esta cepa se relaciona claramente con el género *Muricauda* en un 86% según el análisis de bootstrap (Figura 11).

La cepa RoG.13 forma parte del clado Flammeovirgaceae con un 76% de valor para bootstrap, donde sólo dos géneros (*Flexitrix* y *Flammeovirga*) comprometen su monofilia. La cepa RoG.13 se incluye fuertemente en el género *Rosevirga* con un valor de 96% (Figura 11).



Proteobacteria

Bacteroidetes

Figura 11. Árbol filogenético obtenido mediante el criterio de máxima verosimilitud (ML) para 70 secuencias parciales del 16S ARNr. Los números de acceso de las secuencias para el GenBank se encuentran en paréntesis. Los nodos muestran los valores de bootstrap para 1000 réplicas.

VIII. DISCUSIONES

El aislamiento de cepas bacterianas es de suma importancia, ya que mediante esta técnica se obtienen cultivos axénicos, con lo que se garantiza que el material genético sea el mismo para todas las células y se obtiene una identificación bacteriana correcta, como en el caso de las cepas bacterianas de estudio NFig.12, RoG.13 y 5M7.13, E-4D y E-4G.

Las cepas NFig.12, RoG.13 y 5M7.13 no mostraron crecimiento en el medio inorgánico MI-221, lo que sugiere que estas tres bacterias no tienen la capacidad de utilizar el amonio como fuente de energía. Aunque el hecho de que pudieron recuperarse de este medio, mediante resiembras en agar marino (AM) probablemente indica que estuvieron en una fase de latencia y/o adaptación. Al someter a las cepas NFig.12, 5M7.13 y RoG.13 a un medio de cultivo donde los nutrientes no fueron los adecuados para su crecimiento, generó estrés y por ende un cambio fenotípico que se manifestó en cambios morfológicos y de coloración. Estos resultados concuerdan con investigaciones realizadas en bacterias sometidas a condiciones de estrés como inanición, alta concentración de metales, antibióticos, lo que provocó un lento crecimiento, inactivación celular y morfologías atípicas en cepas de *Escherichia coli* (Hirsch, 1961), *Staphylococcus* sp. (Proctor et al., 1997) y *Nitrosomonas europaea* (Chandran y Love, 2008).

Las bacterias particularmente muestran una alta capacidad de cambio para adaptarse y sobrevivir, sin embargo si la aclimatación fisiológica es insuficiente para mitigar la escasez de recursos, las mutaciones pueden favorecer la capacidad de absorción. La enzima encargada de reconocer estos cambios ambientales es la RNA polimerasa (Boor, 2006; Chou et al., 2009). Además en bacterias como *E. coli* se ha encontrado niveles altos de RpoS (un control transcripcional en respuesta al estrés) (Brown et al., 2002; Battesti et al., 2011) que se encuentra directamente relacionado con *ppGpp*, una alormona que responde al estrés y a la inanición. Altas concentraciones de esta alormona generó dos mutaciones en el gen spot de cepas de *E. coli* que inactivó su crecimiento celular (Spira et al., 2008), lo que pudiera explicar el efecto de inhibición de las cepas NFig.12, RoG.13 y 5M7.13 cuando se les inoculó en el medio de cultivo MI-221.

Las denominadas bacterias fastidiosas, son aquellas que muestran un lento crecimiento (Chesbro, 1988); en este sentido, los estudios realizados en esta investigación con la cepa NFig.12 se observó características de este tipo, ya que al inicio del aislamiento mostró un crecimiento lento con una coloración cristalina, a diferencia del color negro azulado característico. Este comportamiento se detectó durante 7 semanas y probablemente se debió a la falta de algún nutriente del medio de cultivo, que pudiera haber sido sintetizado en su momento por alguna (s) de las diferentes poblaciones bacterianas que se encontraban en el cultivo con AM del aislamiento original, el cual hubiese contribuido para generar un color más brillante, además de mayor crecimiento en la cepa bacteriana NFig.12. De igual forma, pudiera tratarse de una fase de adaptación y/o disponibilidad a los nutrientes existentes en un medio de cultivo artificial. La difusión de nutrientes, su disponibilidad, la quimiotaxia y el *quorum sensing* en bacterias juegan un papel importante en los morfotipos observados (Madigan et al., 2012). En este sentido Davis et al. (2005), demostraron que extendiendo los tiempos de incubación hasta tres meses, en conjunto con medios de cultivo modificados, se obtiene un mejor desarrollo de las cepas e incluso se logra aislar cepas que rara vez son aisladas con las técnicas y tiempos de incubación de cultivo establecidos, lo que coincide con las observaciones en los cultivos de la cepa NFig.12. Por el contrario, las cepas 5M7.13 y RoG.13 mostraron un rápido crecimiento desde las primeras inoculaciones sobre AM, debido a su crecimiento heterotrófico lo que permitió un buen desarrollo y mayor abundancia en las placas de cultivo originales de donde fueron aisladas.

Por otra parte, el gen del 16S ARNr es altamente conservado debido a las funciones esenciales en las que participa. Las regiones variables que lo constituyen son fundamentales, con ellas se puede diseñar oligonucleótidos para PCR y sondas de hibridación, del mismo modo que la alineación de secuencias permite encontrar zonas homólogas en diferentes organismos, la medición de la variación de los nucleótidos estima las distancias evolutivas y con ello es posible realizar árboles filogenéticos (Van der Peer et al., 1996).

Los genes bacterianos del 16S del ARNr abarcan 9 regiones hipervariables, en donde cada especie contiene secuencias específicas dentro de una determinada región y son usadas tanto en diagnósticos clínicos como en investigaciones científicas. El fragmento amplificado del 16S del ARNr de las 5 cepas de estudio, abarcó las regiones hipervariables V4 (nucleótidos 576–682), V5 (nucleótidos 822–879). Donde el intervalo de nucleótidos 650–660

y del 827–855 presenta mayor variabilidad dentro de la región amplificada (Van der Peer et al., 1996; Chakravorty et al., 2007).

El análisis de las secuencias homólogas encontradas en el GenBank relacionó a las cepas, NFG.12, E-4D y E-4G con el filo Proteobacterias, mientras que las cepas RoG.13 y 5M7.13 están relacionadas con el filo Bacteroidetes del dominio Bacteria.

El análisis de las secuencias en BLAST indicó que el 99% de las secuencias perteneciente a E-4G corresponde al género *Halomonas*, familia Halomonadaceae de la clase Gammaproteobacteria. Según la edición más reciente (2^{da}. ed.) del Manual Bergey's de Bacteriología y Sistemática (Garrity et al., 2005), la familia Halomonadaceae agrupa 7 géneros, sin embargo estudios posteriores a la publicación de este manual, unifican al género *Deleya* con el género *Halomonas* (Dobson y Franzmann 1996; Arahal y Ventosa, 2006). De igual forma publicaciones realizadas en la revista Internacional de Sistemática y Microbiología Evolutiva (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, siglas en inglés IJSEM), que tiene validez oficial, incorpora 6 géneros nuevos en la familia Halomonadaceae.

Los integrantes de la familia Halomonadaceae poseen células rectas o curvas, son gram negativas, que presentan una movilidad por medio de flagelos, las colonias que se desarrollan en medios de cultivos son de color blanco o amarillo. La respiración es aeróbica o anaerobia facultativa y cuentan con un metabolismo quimioorganotrófico. Con excepción del género *Zymobacter* todas las especies son halotolerantes (Garrity et al., 2005). La versión actual del Manual Bergey's menciona que el género *Halomonas* cuenta con 21 especies (*H. elongata*, *H. aquamarina*, *H. campisalis*, *H. cupida*, *H. desiderata*, *H. eurihalina*, *H. halmophila*, *H. halodenitrificans*, *H. halodurans*, *H. halophila*, *H. magadiensis*, *H. marina*, *H. maura*, *H. marisflavi*, *H. meridiana*, *H. pacifica*, *H. pantelleriensis*, *H. salina*, *H. subglaciescola*, *H. variabilis*, *H. venusta*), además de los nuevos géneros descritos y publicados en IJSEM después de la publicación del manual Bergey's (*H. alimentaria*, *H. alkaliantarctica*, *H. alkaliphila*, *H. almeriensis*, *H. andesensis*, *H. anticariensis*, *H. arcis*, *H. avicenniae*, *H. axialensis*, *H. beimenensis*, *H. boliviensis*, *H. campaniensis*, *H. canadensis*, *H. caseinilytica*, *H. cerina*, *H. cibimaris*, *H. daqiaonensis*, *H. daqingensis*, *H. denitrificans*, *H. flava*, *H. fontilapidosi*, *H. gomseomensis*, *H. gudaonensis*, *H. halocynthiae*, *H. hamiltonii*, *H. huangheensis*, *H. hydrothermalis*, *H. ilicicola*, *H. indalinina*, *H. israelensis*, *H. janggokensis*,

H. jeotgali, *H. johnsoniae*, *H. kenyensis*, *H. korlensis*, *H. koreensis*, *H. kribbensis*, *H. lutea*, *H. mongoliensis*, *H. nanhaiensis*, *H. muralis*, *H. neptunia*, *H. nitroreducens*, *H. olivaria*, *H. organivorans*, *H. qijiaojingensis*, *H. ramblicola*, *H. sabkhae*, *H. rifensis*, *H. saccharevitans*, *H. salaria*, *H. salifodinae*, *H. shengliensis*, *H. sinaiensis*, *H. smyrnensis*, *H. stenophila*, *H. stevensii*, *H. subterranea*, *H. sulfidaeris*, *H. taeaanensis*, *H. titanicae*, *H. ventosae*, *H. vilamensis*, *H. xianhensis*, *H. xinjiangensis*, *H. zhanjiangensis*, *H. zincidurans*).

Las células bacterianas del género *Halomonas* presentan una morfología bacilar o pleomórfica, elongada de filamentos flexibles dependiendo de las condiciones. Son móviles por la presencia de flagelos laterales, peritricos y/o polares. Las colonias que se desarrollan en medio CAS (cuyo contenido nutricional es similar a AM) pueden ser de colores blancos, amarillos, suaves y brillantes pero nunca de color rojo. En cultivos de 24 horas, las colonias miden 2 mm aproximadamente, aunque con mayor edad pueden ser de color café transparente. Presentan un crecimiento con un intervalo amplio de temperaturas que van de 10°C–45°C. El crecimiento de algunas cepas se puede dar en condiciones anaeróbicas en medios con nitratos. Presenta buen crecimiento en medios con glucosa en condiciones de anaerobiosis sin la presencia de nitratos. La mayoría de las cepas reduce los nitratos a nitritos. Además que el sulfato de amonio puede servir como única fuente de energía. Son bacterias catalasa positiva y la mayoría de las especies son oxidasa positiva (Garrity et al., 2005).

Este grupo de microorganismos se encuentra ampliamente distribuido en ambientes hipersalinos y se les ha encontrado gran potencial biotecnológico como bioabsorbentes, emulsificantes y desnitrificantes (Margesin y Schinner, 2001; Llamas et al., 2005). Las características de crecimiento, morfología celular y colonial que se observaron para la cepa E-4G coinciden con las encontradas para este género bacteriano.

Por otro lado, el análisis filogenético utilizando el criterio de Máxima Verosimilitud (ML) y de Neighbour-joining (NJ) mostró que la cepa E-4G se incorpora en el género de *Halomonas*, formando un solo clado en la familia Halomonadaceae con un valor de 68% en el análisis de bootstrap que incluye a los géneros *Cobetia*, *Salinicola*, *Chromohalobacter*, *Kushneria* y *Zymobacter*. Garrity et al. (2005), así como Arahall y Ventosa, (2006) mencionan que el género *Halomonas* se encuentra dentro de la familia Halomonadaceae e incluye a los géneros utilizados en nuestro análisis como parte de la familia. En este estudio *Deleya pacifica* se incluye en el clado del género de *Halomonas*, en conjunto con la cepa E-4G (Figura 11); sin

embargo, debido a que las características fenotípicas, genotípicas y filogenéticas del género *Deleya*, De Vos y De Ley (1983) y Dobson y Franzmann (1996), indican que este género es sinonimia del género *Halomonas*, lo que se corrobora con los tres criterios usados en este estudio.

La secuencia perteneciente a la cepa E-4D presenta una homología del 99% con las secuencias publicadas pertenecientes al género *Methylophaga*, de la familia Piscirickettsiaceae clase Gammaproteobacteria. Los integrantes de la familia Piscirickettsiaceae presenta un metabolismo aeróbico, son células gram negativas, en forma de bacilos, vibrios o espirales. De acuerdo a la última edición del Manual Bergey's de Bacteriología y Sistemática (Garrity et al., 2005) la familia *Piscirickettsiaceae* incluye a ocho géneros, entre los que se encuentra *Methylophaga* que agrupa a 4 especies: *M. marina*, *M. thalassica*, *M. sulfidovorans* y *M. limanica*. Sin embargo publicaciones recientes en el IJSEM agregan 7 especies nuevas en el género *Methylophaga*: *M. alcalica* (Doronina et al., 2003), *M. aminisulfidivorans* (Kim et al., 2007), *M. murallis* (Doronina et al., 2011), *M. thiooxidans* (Boden et al., 2011) *M. lonarensis* (Chakkiath et al., 2012), *M. frappieri* y *M. nitratireducenticrescens* (Villeneuve et al., 2013).

Las bacterias del género *Methylophaga* tienen forma bacilar, llegan a medir 0.2 y 0.9-1.0 µm, pueden crecer en pares o individualmente, células gram negativas, el movimiento es llevado a cabo por un flagelo polar. El género agrupa bacterias aeróbicas y halófilas. Son positivas en la prueba de oxidasa y catalasa. Las colonias que crecen en agar mineral miden entre 0.5 y 2 mm de diámetro, son de color blanco, ligeramente cremosas, aunque también llegan a tener un color rosa pálido, con margen entero y consistencia cremosa, con un crecimiento óptimo de temperatura que va desde los 22°C hasta los 37°C (Garrity et al., 2005). Presentan un metabolismo quimioheterótrofo, utilizan varias fuentes de nitrógeno, entre las que se incluye el amonio y nitratos (Kimura et al., 1990; Garrity et al., 2005), crecen en condiciones desnitrificantes (Villeneuve et al., 2013) debido a la presencia de dos genes NarG divergentes, que probablemente fueron adquiridos por transferencia horizontal genética (Auclair et al., 2010). Las características fenotípicas que se observaron para la cepa E-4D como crecimiento, morfología colonial y celular, coinciden con las características reportadas para el género *Methylophaga*.

Mediante los criterios de Máxima Verosimilitud (ML) y de Neighbour-joining (NJ) se observó que la cepa E-4D tiene una clara relación con el género *Methylophaga* y con la clona

Piscirickettsiaceae (No. de acceso DQ234105.1) (cuya identificación taxonómica se limita a la familia Piscirickettsiaceae) con un valor de 88% de bootstrap. No obstante, el resto de los miembros de la familia Piscirickettsiaceae, que incluye a los géneros *Thiomicrospira*, *Hydrogenovibrio*, *Sulfuvirga* y *Piscirickettsia* forman otra agrupación que no incorpora a los miembros del clado donde se incluyen secuencias del género *Methylophaga*, la cepa E-4D y la clona perteneciente a la familia Piscirickettsiaceae (No. de acceso DQ234105.1), lo que indica que esta familia resulta polifilética para nuestros análisis (no comparten un ancestro común). Por lo que aparentemente es necesario que se incluyan secuencias pertenecientes a otros géneros de esta familia para encontrar una topología que proporcione mayor información de las relaciones filogenéticas al interior de la familia. Por otro lado, la construcción del árbol de Parsimonia indica una topología adicional para la familia Piscirickettsiaceae, ya que se incluye a los géneros *Glaciacola*, *Alteromonas*, *Agarivorans*, *Nitrospira*, *Nitrosomonas*, *Methylomonas* y *Pseudomonas*, que corresponden a las familias Alteromonadaceae, Methylococcaceae y Pseudomonadaceae (Garrity et al., 2005).

La propiedad de la cepa E-4D de hidrolizar el agar, es una característica que en la literatura no se le encontró referenciada con el género *Methylophaga*. Sin embargo muchas bacterias del ambiente marino como *Glaciacola mesophila*, *Agarivorans* sp., *Vibrio* spp., *Alteromonas* y algunos miembros de la familia Flavobacteriaceae tienen la propiedad de hidrolizar el agar (Romanenko et al., 2003; Wang et al., 2006, Krieg et al., 2010; Long et al., 2010; Liao et al., 2011). En este sentido, las secuencias incorporadas en el estudio filogenético (Figura 11) pertenecientes a las bacterias *Glaciacola mesophila* (No. de acceso NR_025546.1), *Alteromonas litorea* (No. de acceso NR_025780.1), *Agarivorans albus* (No. de acceso EU084496), que se incluyen en la clase Gammaproteobacteria, filo Proteobacteria (Garrity et al., 2005) y que tienen una relación filogenética con la cepa bacteriana E-4D, poseen la capacidad de degradar moléculas de alto peso molecular como agar, gelatina y almidón. Esta característica es compartida con el filo Bacteroidetes, así como con la mayoría de las secuencias de las bacterias pertenecientes a la familia Flavobacteriaceae, incluidas en este estudio: *Robiginitalea biformata* (No. de acceso NR_074601.1), *Croceitalea eckloniae* (No. de acceso NR_043628.1), *Arenibacter troitsensis* (No. de acceso NR_024790), *Flavobacterium xanthum* (No. de acceso NR_024865.1), *Cellulophaga algicola* (No. de acceso NR_074452.1) y *Zobellia laminariae* (No. de acceso 024827.1), *Cytophaga aurantiaca* (No. de acceso

NR_025829.1) y *Cytophaga hutchinsonii* (No. de acceso D12663.1) de la familia Cytophagaceae. Con referencia a lo anterior, se considera hipotetizar que la capacidad de hidrolizar el agar que presenta la cepa E-4D pudiera haber sido adquirida por una posible transferencia horizontal, proceso de conjugación común en bacterias que bajo ciertas condiciones puede ser benéfico (Schmidt y Hansel, 2004; Gal-Mor y Finlay, 2006; Daccord et al., 2013).

Así mismo, las bacterias del género *Methylophaga* utilizan como fuente de energía amonio, nitratos, y una característica especial es que crecen en dimetilsulfóxido (DMSO), metanol y metilamina (Garrity et al., 2005; Kim et al., 2007). La mayor característica que distingue a las bacterias metanótrofas es la capacidad de utilizar el metano como única fuente de carbono (Murrell y Smith, 2010) y las secuencias utilizadas para el estudio filogenético pertenecientes a *M. thalassica* (No. de acceso 036802.1), *M. murata* (No. de acceso AY694421.1), *Methylophaga* sp. (No. de acceso. 238599.1) y *Methylomonas methanica* (No. de acceso NR_074627.1) son capaces de crecer en dimetilsulfóxido, metanol y metilamina, agrupándose en el clado de las gammaproteobacterias (Garrity et al., 2005), al igual que la cepa E-4D (Figura 11). En este sentido las bacterias oxidantes de amonio y los metanótrofos se encuentran relacionados, ya que la enzima monooxigenasa del metano también oxida el amonio (Hanson y Hanson, 1996; Garrity et al., 2005; Madigan et al., 2012) y para que las bacterias alcancen una desnitrificación satisfactoria es necesario una fuente externa de carbono como el metanol (Parent y Morin, 2000). Con referencia a lo anterior, las cepas E-4G y E-4D que crecieron en el medio inorgánico MI-221 mantienen una relación filogenética con las bacterias oxidantes de amonio *Nitrosomonas europaea* (No. de acceso M96399.1) y *Nitrospira* sp. (No. de acceso AY856377.1), las cuales se incluyen en el clado de las Proteobacterias (Figura 11) y su posición taxonómica en la clase Betaproteobacterias es confirmada por Garrity et al. (2005).

Según las secuencias homólogas publicadas en el GenBank, la cepa NFG.12, pertenece con un 99% de similitud al género *Phaeobacter*, familia Rhodobactereaceae, clase Alphaproteobacteria. Los géneros incluidas en la familia Rhodobactereaceae son muy diversos en cuanto a su fisiología, metabolismo y ecología, que incluye microorganismos fotoheterótrofos, fotoautótrofos, quimiorganótrofos, que pueden ser aerobios estrictos o anaerobios facultativos, algunas bacterias pueden desnitrificar, otras son acuáticas, necesitan

NaCl para su desarrollo (Garrity et al., 2005) y forman biopelículas (Elifantz et al., 2013), esta última característica se presentó en la cepa NFig.12 cuando se cultivó en medio líquido. El volumen más reciente del Manual Bergey's (Garrity et al., 2005), contiene 36 géneros, mientras que en el IJSEM se incluyen 68 géneros más. El género *Phaeobacter* no se encontró en la última compilación de las Alphaproteobacterias en el Manual Bergey's de Bacteriología y Sistemática, ya que su identificación por Martens et al. (2006) fue realizada un año después de la publicación de este Manual y reclasifica a *Roseobacter gallaeciensis* (Ruiz-Ponte et al., 1998) y *Ruegeria algicola* (Lafay et al., 1995) como *Phaeobacter gallaeciensis* y *Phaeobacter inhibens* respectivamente. Posteriormente se han descrito y publicado en el IJSEM cinco nuevas especies del género *Phaeobacter*: *P. caeruleus*, *P. daeponensis* (Yoon et al., 2007), *P. articus* (Zhang et al., 2008), (Vandecandelaere et al., 2009), *P. leonis* (Gaboyer et al., 2013) y *P. aquaemixtae* (Park et al., 2014). Las bacterias del género *Phaeobacter* son gram negativos, con morfología ovoide, con uno o varios flagelos polares, contienen cuerpos de inclusión y fosfolípidos. El género *Phaeobacter* son positivos para catalasa y oxidasa. Tienen un desarrollo entre los 4°C y 40°C, con temperaturas óptimas entre 28°C y 37°C. Las colonias de este género que se desarrollan bajo condiciones de cultivo en AM (2216, DIFCO), son circulares y miden unos 2 mm de diámetro, en donde la coloración de las colonias se vuelve azul después de tres días de incubación. Una propiedad del género *Phaeobacter* es la producción de antibióticos (Martens et al., 2006; Yoon et al., 2007; Vandecandelaere et al., 2009). Las características del género *Phaeobacter* concuerdan con las descritas para la cepa NFig.12, además del alto porcentaje de similitud (99%) con las secuencias publicadas en el GenBank.

En el análisis filogenético utilizando los tres criterios, se observa únicamente a una especie de *Phaeobacter* sp. (No. de acceso FM196539.1) en clado con la cepa NFig.12 (56% de bootstrap), mientras que *Phaeobacter inhibens* (No. de acceso NR042761) y *Phaeobacter* sp. (No. de acceso JX070673.1) no se incluyen en el clado anterior comprometiendo la monofilia del género *Phaeobacter*. Por su parte, la secuencia de la bacteria *Ruegeria pelagia* (No. de acceso EU977138.1) mantiene una relación cercana con la secuencia de la cepa de estudio y *Phaeobacter* sp. (No. de acceso FM196539.1), *R. pelagia* comparte algunas características fenotípicas con el género *Phaeobacter*, ambos son gram negativos, no reducen nitratos, la coloración de la colonia es café-oscura, oxidasa y catalasa (-), no contienen

bacterioclorofila α (Variante de la clorofila, cuyo residuo es un alcohol fitilo), sin embargo las bacterias del género *Ruegeria* no necesitan NaCl para su desarrollo (Martens et al., 2006; Vandecandelaere et al., 2009; Lee et al: 2007). Esta inestabilidad con el género *Phaeobacter* es probable que se deba al muestreo de secuencias para el análisis, aunado a que este género es de reciente creación, debido a una reclasificación (Martens et al., 2006) por lo que es necesario se realicen más estudios taxonómicos para resolver inconsistencias jerárquicas, y al igual que para las otras cepas, es necesario se incorporen más secuencias en el estudio para esta familia. Así mismo, la monofilia de la familia Rhodobacteraceae es clara, aunque con un valor de bootstrap de solo 60% (Figura 11).

Por otra parte, el filo Bacteroidetes es muy diverso metabólicamente y fisiológicamente, anteriormente se le denominaba como el grupo *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*. Este filo agrupa a los grupos de Bacteroides, Flavobacteria y Sphingobacteria, los cuales tienen una importante participación en el ciclo del carbono y están ampliamente distribuidos en ambientes marinos (Kim y Know, 2010; Krieg et al., 2010).

La comparación de la secuencia de la cepa 5M7.13 con las secuencias homólogas depositadas en el GenBank, indican que esta bacteria pertenece al filo Bacteroidetes, familia Flavobacteriaceae, género *Muricauda*. Las bacterias de esta familia (54 géneros en la versión actualizada del Manual Bergey's, más 50 géneros nuevos publicados en el journal IJSEM), tienen forma bacilar, Gram negativas, no cuentan con flagelos, aunque algunas especies se mueven por deslizamiento. Son bacterias positivas para las pruebas de catalasa y oxidasa. Bajo condiciones de cultivo en agar marino desarrollan colonias circulares y convexas, con pigmentación de color amarillo, con tonos que van del dorado hasta el naranja. Son microorganismos quimiorganotróficos con crecimiento aeróbico (Krieg et al., 2010).

Según la más reciente compilación del Bergey's (Krieg et al., 2010), el género *Muricauda* agrupa a 3 especies bacterianas (*M. aquimarina*, *M. ruestriengis*, *M. flavescens*), sin embargo publicaciones recientes en el journal IJSEM señalan 7 especies nuevas recién caracterizadas: *M. lutimaris* (Yoon et al., 2008), *M. lutaonensis* (Arun et al., 2009), *M. olearia* (Hwang et al., 2009), *M. beolgyonensis* (Lee et al., 2012), *M. zhangzhouensis* (Yang et al., 2013), *M. antarctica* (Wu et al., 2013) y *M. taeanensis* (Kim et al., 2013). Todas las especies reportadas a la fecha del género *Muricauda* son bacterias de forma bacilar, gram negativas, halófilas que crecen en un rango desde 0.5 a 9.0% de NaCl, y temperatura óptima de

crecimiento de entre 30°C y 37°C, con metabolismo quimiorganotrófico, anaerobios facultativos o aerobios estrictos y no reducen los nitratos. El género *Muricuda* desarrolla apéndices de estructura parecida a vesículas cuando se cultivan en medio líquido que crecen sobre la superficie de la célula bacteriana y otras especies desarrollan además apéndices parecidos a fibrillas a las que están unidas estas vesículas. Esta característica es importante para diferenciar este género de otros géneros de la familia Flavobacteriaceae. Las colonias de *Muricauda* en el medio de cultivo AM, son circulares, ligeramente convexas, miden entre 0.5 y 1.3 mm de diámetro, son de color amarillo para *M. ruestriengis* o doradas para *M. aquamarina* (Krieg et al., 2010). Una característica que comparten los miembros de la familia Flavobacteriaceae es la capacidad de descomponer una amplia variedad de macromoléculas como proteínas (caseína y gelatina, entre otros), carbohidratos (agar y quitina, entre otros.) y lípidos (lecitina y Tween, entre otros), sin embargo algunas especies del género *Muricauda* no son capaces de degradar moléculas de alto peso molecular, tal es el caso de las cepas con secuencias de las bacterias *Muricauda flavescens* (No. de acceso NR_042908.1) y *Muricauda ruestriengis* (No. de acceso NR_0228772.1) que se incluyen en el árbol filogenético (Figura 11) y que coinciden con la cepa 5M7.13, la cual no mostró indicios de hidrólisis en el agar. Las características fenotípicas citadas anteriormente para el género *Muricauda* concuerdan con las características observadas para la cepa 5M7.13, con excepción de la presencia de vesículas y/o apéndices que no fue posible su visualización debido a la limitación del equipo de microscopía existente. Su posición taxonómica se ratifica por el porcentaje de homología de la secuencia de esta cepa con las secuencias publicadas en el GenBank.

La cepa 5M7.13 se relaciona con el género *Muricauda* con 86% del valor bootstrap formando con firmeza y claridad un clado monofilético para la familia Flavobacteriaceae con un bootstrap de 100%. Bruns et al. (2001) ubican al género *Muricauda* en la familia Flavobacteriaceae, junto con los géneros *Croceitalia*, *Flavobacterium*, *Aurenibacter*, *Celulophaga*, *Zopellia* y *Maribacter*, topología que concuerda con los resultados del análisis dentro de la familia (Krieg et al., 2010).

Por último, la cepa bacteriana RoG.13 mostró un 100% de similitud con la secuencia perteneciente al género *Roseivirga*, familia Flammeovirgaceae. La edición actual del Manual de Bergey's de Bacteriología y Sistemática reconoce 9 géneros para esta familia, más 10 géneros nuevos publicados en el IJSEM. Las bacterias que integran esta familia se caracterizan

por ser células que dan una reacción negativa a la tinción gram, son bacilos rectos o curvos y presentan un metabolismo quimiorganotrófico. No poseen flagelos por lo que son inmóviles en medios líquidos, sin embargo se mueven por deslizamiento en sustratos sólidos. Las colonias que desarrollan en agar son de color rosa, rojo o color-albaricoque y la mayoría de las cepas se caracterizan por un crecimiento disperso. Muchas de las especies hidrolizan la esculina, la gelatina y el DNA, son estrictamente aeróbicas, pero algunas son anaerobias facultativas y oxidan a los carbohidratos. Producen oxidasa y catalasa, y algunas cepas reducen los nitratos a nitritos. A todas las especies se les encuentra en diferentes ambientes marinos, agua de mar, sedimentos, macroalgas o animales marinos, entre otros (Krieg et al., 2010). El género *Roseivirga* incluye 4 especies (*R. ehrenbergii*, *R. echinicomitans*, *R. seohaensis*, *R. spongicola*), tienen forma de bacilos, son gram negativos que miden usualmente 0.2–0.5 x 2.0–4.0 µm, con movilidad por deslizamiento, son aerobios estrictos, con un metabolismo quimioheterotrófico, crecen entre el 1.0 y 8.0% de NaCl y con una temperatura óptima de entre 20 y 33°C. Positivos para la prueba de catalasa y oxidasa. Son microorganismos marinos de hábitats costeros. Las colonias que se desarrollan en AM son circulares con bordes enteros, presentan una pigmentación de color rosa o rosa-naranja, brillantes y convexas (Nedashkovskaya et al., 2005a; Nedashkovskaya et al., 2005b y Krieg et al., 2010). Las características fenotípicas coloniales y celulares que se observaron en el laboratorio durante el cultivo para la cepa bacteriana RoG.13, coinciden con las características pertenecientes a *Roseivirga*.

De la misma manera, la cepa RoG.13 forma un grupo monofilético al interior de la familia Flammeovirgaceae en 76% del valor bootstrap, es hermana de las especies de los géneros *Roseivirga* en un 96% y la única especie reportada para el género *Fabibacter* (No. de acceso NR_043530.1), en donde se incluyen estos géneros y muchos más en el mismo clado para esta familia (Krieg et al., 2010). La cepa tipo *Fabibacter halotolerans* mantiene una relación de 93.1–96 % de similitud con la secuencias 16S del ARNr con el género *Roseivirga* (Lau et al., 2006), sin embargo *Roseivirga* se diferencia de *Fabibacter* por la capacidad de hidrolizar almidón y por la composición de sus ácidos grasos (Krieg et al., 2010).

Por otra parte, Nakagawa y Yamasato (1993), sitúan a las especies *Cytophaga aurantiaca* (No. de acceso NR_025829.1) y *Cytophaga hutchinsonii* (No. de acceso D12663.1) como pertenecientes a la familia Cytophagaceae. Sin embargo, estos mismos

investigadores en 1996 enmendaron al género *Cytophaga* y reclasificaron a las especies *Cytophaga salmonicolor* y *Cytophaga agarovorans* (actualmente basónimo) al género *Marinilabilia*, de la familia Marinilabiaceae (Nakagawa y Yamasato, 1996). A su vez los géneros *Flexithrix dorotheae* (No. de acceso NR_040919.1) y *Flammeovirga yaeyamensis* (No. de acceso NR_041395) son ubicados como miembros de la familia Flammeovirgaceae de acuerdo a Krieg et al. (2010), no obstante en el análisis realizado forman un grupo separado del clado de la familia con un bootstrap del 100%. En efecto, Nakagawa et al. (2002), realizó estudios filogenéticos basados en la molécula del 16S ARNr que indican que *Flexithrix dorotheae* (NR_040919.1) mantiene una relación estrecha con *Flexibacter agregans*, la cual pertenece a la familia Cytophagaceae, además que *Flexithrix dorotheae* es la única especie reportada para este género, incluso es muy probable que en un futuro *Flexithrix* y las especies mal clasificadas del género *Flexibacter* formen un nuevo género (Krieg et al., 2010), lo que explicaría la posición de *Flexithrix* y *Flammeovirga* en el estudio filogenético (Figura 11). De igual forma es muy seguro que estas inconsistencias en la topología de los cladogramas obtenidos, se deba a que el grupo es muy heterogéneo y que agrupa una gran diversidad de especies y sea necesario incluir mayor número de secuencias.

De igual forma, existe la posibilidad de que algunas de las secuencias que se encuentren en la base de datos en el GenBank no sean las correctas, debido a errores de edición, falta de interpretación y/o técnicas usadas, las cuales difieren de las técnicas actuales, por lo que es evidente la necesidad de reforzar con más estudios que contribuyan para resolver la problemática de la taxonomía bacteriana. Actualmente el alcance de las nuevas tecnologías, como la secuenciación de ADN, hibridación molecular, PCR, así como la adaptación de técnicas que mejoren el aislamiento bacteriano y desarrollo de métodos bioinformáticos, permiten conocer cada vez más la vasta diversidad existente de microorganismos en los diferentes hábitats.

IX. CONCLUSIONES

Las técnicas en microbiología tradicional permitieron aislar cepas bacterianas de efluentes de cultivo de camarón (E-4G, E-4D, NFg.12, RoG.13 y 5M7.13), que se identificaron taxonómicamente hasta género con la amplificación parcial del gen 16S del ARNr y los cebadores utilizados, COM1 y COM2.

Las secuencias obtenidas de las cepas de estudio E-4D, E-4G, NFg.12 y 5M7.13, comparten un 99% de similitud con las secuencias publicadas de los géneros *Methylophaga*, *Halomonas*, *Phaeobacter* y *Muricauda*, respectivamente. La secuencia perteneciente a la cepa RoG.13 mostró un 100% de similitud con las secuencias publicadas correspondiente al género *Roseivirga*.

Las características fenotípicas que se observaron para las cepas de estudio E-4D, E-4G, NFg.12, 5M7.13 y RoG.13, corresponden a las reportadas para los géneros *Methylophaga*, *Halomonas*, *Phaeobacter*, *Muricauda* y *Roseivirga* respectivamente.

La cepa E-4D demostró una capacidad de hidrolizar el agar, característica no referenciada para el género *Methylophaga*, por lo que se infiere una posible transferencia horizontal del gen implicado por un proceso de conjugación entre bacterias.

Las cepas de estudio NFg.12, 5M7.13 y RoG.13 no fueron capaces de crecer en medio inorgánico MI-221, lo que indica que no son bacterias nitrificantes.

El análisis filogenético del 16S ARNr demostró que las cinco cepas de estudio forman clados monofiléticos a los fila Proteobacterias y Bacteroidetes.

El análisis filogenético relacionó a la secuencia de la cepa E-4D con el género *Methylophaga* en 88% del valor de bootstrap.

El análisis de bootstrap confirmó en un 64%, que la cepa E-4G pertenece al género *Halomonas* y se incluye monofiléticamente a la familia Halomonadacea en un 68% con valor de bootstrap.

La topología realizada con la cepa NFG.12 la relaciona con el género *Phaeobacter* e indica una monofilia para la familia Rhodobacteraceae con un 60% con valor para bootstrap.

El análisis de Máxima Verosimilitud relaciona a la cepa 5M7.13 en un 100% con la familia Flavobacteriaceae y con un 80% con el género *Muricauda*.

El análisis filogenético de la secuencia de la cepa RoG.13, la relaciona en un 76% con la familia Flammeovirgaceae y con un 96% con el género *Roseivirga*.

X. RECOMENDACIONES

Se recomienda secuenciar el gen completo del 16S ARNr para conocer la identidad taxonómica hasta especie de las cepas de estudio.

Se sugiere realizar estudios filogenéticos para cada una de las cepas de estudio, donde se incluya un mayor número de secuencias de nucleótidos con la finalidad de resolver las inconsistencias de la topología en esta investigación.

Se recomienda reforzar los estudios realizados con análisis bioquímicos, fisiológicos y morfológicos para las cepas de estudio.

Debido al potencial nitrificante de las cepas E-4G y E-4D es recomendable secuenciar los genes implicados en este proceso (*amoA*, *narG1* y *narG2*), así como someterlos a un análisis filogenético y comparar estos resultados con el análisis filogenético del gen 16S.

Se sugiere realizar un análisis filogenético del gen implicado en la hidrólisis del agar en la cepa bacteriana E-4D.

Es recomendable someter las secuencias a diferentes bases de datos (El Proyecto de Base de Datos Ribosomal (RDP), el Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL), además del Banco de Genes del NCBI) para obtener mayor información taxonómica.

Se recomienda desarrollar investigaciones sobre el potencial biotecnológico que puedan presentar las cepas de estudio, en las áreas de biorremediación, industrial y farmacéutica.

Es recomendable estudiar la diversidad y abundancia bacteriana en los sistemas de acuicultura debido al potencial biotecnológico que presentan los microorganismos, así como aislar otras cepas bacterianas e incluir estudios taxonómicos completos.

XI. LITERATURA CITADA

- Altschul, F., G. Gish, W. Miller, E. W. Myers y D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.
- Amann, R., W. Ludwig y K. H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews*, 59: 143-169.
- Arahal, D. y A. Ventosa. 2006. The family Halomonadaceae. 811-835 p. En: Dworkin M., F. Stanley, E. Rosenberg, K. H. Schleifer y E. Stackebrandt (Eds.). *The Prokaryotes*. Springer. New York, U.S.A.
- Arun A. B., W. M. Chen, W. A. Lai, J. H. Chao, P. D. Rekha, F. T. Shen, S. Singh y C. C. Young. 2009. *Muricauda lutaonensis* sp. nov., a moderate thermophile isolated from a coastal hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 2738-2742.
- Auclair, J., F. Lepine, S. Parent y R. Villemur. 2010. Dissimilatory reduction of nitrate in seawater by a *Methylophaga* strain containing two highly divergent narG sequences. *International Society for Microbial Ecology*, 4: 1302, 1313.
- Azam, F. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology. Progress Series*, 10: 257-263.
- Battesti, A., N. Majdalani y S. Gottesman. 2011. The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology*, 65: 189-213.
- Bhatnagar, L. y K. Se-Kwon. 2010. Immense essence of excellence: marine microbial bioactive compounds. *Marine Drugs*, 8: 2673-2701.
- Boden, R., D. P. Kelly, J. C. Murrell y H. Schäfer. 2011. Validation List no. 137. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61: 1-3. Oxidation of dimethylsulfide to tetrathionate by *Methylophaga thiooxidans* sp. nov.: a new link in the sulfur cycle. *Environmental Microbiology*, 12: 2688-2699.
- Boor, K. J. 2006. Bacterial stress responses: What doesn't kill them can make them stronger. *PLoS Biol*, 4: e 23.

- Bosshard, P., R. Zbinden, S. Abels, B. Boddington, M. Altwegg y E. C. Bottger. 2006. 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 1359-1366.
- Boua, G., A. Fernández-Olmos, C. García, J. A. Sáez-Nieto y S. Valdezate. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29: 601-608.
- Brooks, G. F., J. S. Butel y S. A. Morse. 2005. *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. El Manual Moderno*. México.
- Brown, L., D. Gentry, T. Elliott y M. Cashel. 2002. DksA affects ppGpp induction of RpoS at a translational level. *Journal of Bacteriology*, 184:4455.
- Bruns, A., M. Rohde y L. Berthe-Corti. 2001. *Muricauda ruestringensis* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, appendaged bacterium from German North sea intertidal sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 1997–2006.
- Caron, D. A. 2005. Marine microbial ecology in a molecular world: What does the future hold?. *Scientia Marina*, 69: 97-110.
- Cervantes-Carrillo, F., J. Pérez y J. Gómez. 2000. Avances en la eliminación biológica del nitrógeno de las aguas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42: 72-82.
- Chakkiath, A. P., N. V. Doronina, R. Boden, Y. A. Trotsenko, Y. S. Shouche y J. C. Murrell. 2012. *Methylophaga lonarensis* sp. nov., a moderately haloalkaliphilic methylotroph isolated from the soda lake sediments of a meteorite impact crater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62: 1613-1618.
- Chakravorty, S., D. Helb, M. Burday, N. Connell y D. Alland. 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 69: 330–339.
- Chandran, K. y N. G. Love. 2008. Physiological state, growth mode, and oxidative stress play a role in Cd (ii)-mediated inhibition of *Nitrosomonas europaea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 2447–2453.
- Chesbro, W. 1988. The domains of slow bacterial growth. *Canadian Journal of Microbiology*, 34: 427-35.

- Cho, B. C. y C. Y. Hwang. 2011. Prokaryotic abundance and 16S rRNA gene sequences detected in marine aerosols on the east sea (Korea). *FEMS Microbiology Ecology*, 76: 327-41.
- Chou, H., J. Berthet y C. J. Marx. 2009. Fast growth increases the selective advantage of a mutation arising recurrently during evolution under metal limitation. *Plos Genet*, 5: e1000652.
- Cifuentes–Lemus, J. L., M. P. Torres-García y M. Frías-Mondragón. 2003. El océano y sus recursos. VII flujos de energía en el mar; reproducción y migraciones. FCE, SEP, CONACyT. 153p.
- Clark, D. P. y Pazdernik N. J. 2010. *Molecular Biology*. Academic Press. Elsevier. USA.
- Claros, M. C. y G. Conrads. 2013. Oral and intestinal bacteroidetes. 87–106 p. En: Filippis, I. y M. L. McKee. (Eds.), *Molecular typing in bacterial infections*. Infections Disease. Springer. New York.
- Clarridge, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology*, 17: 840–862.
- Comité de Sanidad Acuícola en Sonora (COSAES). 2012. Informe final del ciclo 2012. Reporte de actualización Mayo 20, 2014. <http://www.cosaes.com/>.
- Daccord, A., D. Ceccarelli, S. Rodriguez y V. Burrus. 2013. Comparative analysis of mobilizable genomic islands. *Journal of Bacteriology*, 195: 606-614.
- Dash, H. R., N. Mangwani, J. Chakraborty, S. Kumari y Surajit Das. 2013. Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 561–571.
- Davis, K. E., S. J. Joseph y P. H. Janssen. 2005. Effects of growth medium, inoculum size and incubation time on culturability isolation of soil bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 71: 826-834.
- De Carvalho, C. C. R. y P., Fernandes. 2010. Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment. *Marine Drugs*, 8: 705-727.
- Delong, E. F. y N. R. Pace. 2001. Environmental diversity of bacteria and archaea. *Systematic Biology*, 50: 470–478.

- De Vos, P. y J. De Ley. 1983. Intra-and intergeneric similarities of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* ribosomal ribonucleic acid cistrons. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33: 487–509.
- Dobson, S. J. y P. D. Franzmann. 1996. Unification of the genera *Deleya* (Baumann et al. 1983), *Halomonas* (Vreeland et al. 1980), and *Halovibrio* (Fendrich 1988) and the species *Paracoccus halodenitrificans* (Robinson and Gibbons 1952) into a single genus, *Halomonas*, and placement of the genus *Zymobacter* in the family *Halomonadaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46: 550–558
- Dong, Y. H., L. H. Wang y L. H. Zhang. 2007. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Science*, 362: 1201–1211.
- Doronina N. V., T. D. Darmaeva y Y. A. Trotsenko. 2003. *Methylophaga alcalica* sp. nov., a novel alkaliphilic and moderately halophilic, obligately methylotrophic bacterium from an east Mongolian saline soda lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 223–229.
- Doronina, N. V., T. D. Lee, E. G. Ivanova, y Y. A. Trotsenko. 2011. *Methylophaga murata* sp. nov.: a haloalkaliphilic aerobic methylotroph from deteriorating marble. Validation List no. 138. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 475–476.
- Dortch, Q. y P. P. Packard. 1989. Differences in biomass structure between oligotrophic and eutrophic marine ecosystems. *Deep-Sea Research*, 36: 223–240.
- Ducklow, H. W. 1983. Production and fate of bacteria in the oceans. *BioScience*, 33: 494–501.
- Elifantz, H., G. Horn, M. Ayon, Y. Cohen y D. Minz. 2013. Rhodobacteraceae are the key members of the microbial community of the initial biofilm formed in eastern mediterranean coastal seawater. *FEMS Microbiology Ecology*, 85: 348–357.
- Escalante, A. 2007. Ecología molecular en el estudio de comunidades bacterianas. 393-423 p. En: Eguiarte L., V. Souza y X. Aguirre (Eds.), *Ecología Molecular*. CONABIO. SEMARNAT. UNAM. México.
- Euzéby, J. P. 2014. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47, 590–592. Reporte de actualización Marzo 30, 2014. <http://www.bacterio.net>.

- Feng, Y. Y., L. C. Hou, N. X. Pink, T. G. Ling y C. L. Kyo. 2004. Development of mariculture and its impacts in Chinese coastal waters. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 14: 1–10.
- Food and Agriculture Organization. 2010. *El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura*. Roma. 231 p.
- Gaboyer, F., B. J. Tindall, M. C. Ciobanu, F. Duthoit, M. le Romancer y K. Alain. 2013. *Phaeobacter leonis* sp. nov., an alphaproteobacterium from mediterranean sea sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 3301–3306.
- Gal–Mor, O. y B. B. Finlay. 2006. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cellular Microbiology*, 8: 1707–1719.
- Garrity, G. M., D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley y F. A. Rainey. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume Two. The Proteobacteria. Part B. The Gammaproteobacteria. Springer. New York, U.S.A.
- Gilbert, J. A. y C. L. Dupont. 2011. Microbial metagenomics: beyond the genome. *Annual Review of Marine Science*, 3: 347–371.
- Hanson, R. S. y T.E. Hanson. 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 60: 439–471.
- Hillis, D. M. y M. T. Dixon. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*, 66: 411–453.
- Hirsch, H. H. 1961. Smali, colony variants of *Escherichia coli* mode of action of copper in variant recovery and population dynamics of cultures containing variants. *Journal of Bacteriology*, 81: 448–458.
- Hopkins, J. S., P. A. Sandifer y M. R. DeVoe. 1995. Environmental impacts of shrimp farming special reference to the situation in the continental United States. *Estuaries*, 18: 25–42.
- Hwang, C.Y., M. H. Kim, G. D. Bae, G. I. Zhang, J. H. Kim y B. C. Cho. 2009. *Muricauda olearia* sp. nov., isolated from crude-oil-contaminated seawater, and emended description of the genus *Muricauda*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 1856–1861.
- Janda, M. y S. L. Abbott. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 2761–2764.

- Jørgensen, B. B. 2000. Bacteria and marine biogeochemistry. 173–201 p. En. Schulz, H. D. y M. Zabe. (Eds.), Marine Geochemistry. Springer. Berlin, Heidelberg.
- Junier, P., V. Molina., C. Dorador., O. Hadas., O. Kim y T. Junier. 2009. Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in the environment. Applied Microbiology and Biotechnology, 85: 425–440.
- Kaerberlein, T., K. Lewis y S. S. Epstein. 2002. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture. Science, 17: 1127–1129.
- Kemp, P. F., S. Lee y J. LaRoche. 1993. Estimating the growth rate of slowly growing marine bacteria from RNA content. Applied and Environmental Microbiology, 59: 2594–2601.
- Kerstens, K., P. de Vos, M. Gillis, J. Swings, E. Vandamme y E. Starchebrand. 2006. Introduction to the Proteobacteria. Prokaryotes, 5: 3–37.
- Kim, H. G., N. V. Doronina, Y. A. Trotsenko y S. W. Kim. 2007. *Methylophaga aminisulfidivorans* sp. nov., a restricted facultatively methylotrophic marine bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57: 2096–2101.
- Kim, J. M., H. M. Jin y C. O. Jeon. 2013. *Muricauda taeansensis* sp. nov., isolated from a marine tidal flat. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63: 2672–2677.
- Kim, S. J. y K. Know. 2010. Bacteroidetes. 1813–1818 p. En. Timmis, K. N. (Eds.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution, 16: 111–120.
- Kimura, T., I. Sugahara, K. Hayashi, M. Kobayashi y M. Ozeki. 1990. Primary metabolic pathway of methylamine in *Methylophaga* sp. Agricultural and Biological Chemistry, 54: 2819–2826.
- Krieg, N. R., J. T. Staley, D. R. Brown, B. P. Hedlund, B. J. Paster, N. L. Ward, W. Ludwig y W. B. Whitman. 2010. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Vol. 4. Phylum XIV. Bacteroidetes phyl. nov. Springer. New York, U.S.A.
- Lafay, B., R. Ruimy, Rausch, C. de Traubenberg, V. Breittmayer, M. J. Gauthier y R. Christen. 1995. *Roseobacter algicola* sp. nov., a new marine bacterium isolated from the

- phycosphere of the toxin-producing dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45: 290–296.
- Lau, S. C., M. M. Tsoi, X. Li, I. Plakhotnikova, S. Dobretsov, M. Wu, P. K. Wong, J. R. Pawlik y P. Y. Qian. 2006. Description of *Fabibacter halotolerans* gen. nov., sp. nov. and *Roseivirga spongicola* sp. nov., and reclassification of (*Marinicola*) *seohaensis* as *Roseivirga seohaensis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 1059–1065.
- Lee, K., Y. J. Choo, S. J. Giovannoni y J. C. Cho. 2007. *Ruegeria pelagia* sp. nov., isolated from the Sargasso sea, Atlantic Ocean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 1815–1818.
- Lee, S. Y., S. Park, T. K. Oh y J. H. Yoon. 2012. *Muricauda beolgyonensis* sp. nov., isolated from a tidal flat. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 62: 1134-1139.
- Liao, L., X. W. Xu, X. W. Jiang, Y. Cao, N. Yi, Y.Y. Huo, Y. H. Wu, X. F. Zhu, X. Q. Zhang y M. Wu. 2011. Cloning, expression, and characterization of a new β -agarase from *Vibrio* sp. strain CN41. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 7077–7079.
- Llamas, I., A. del Moral, F. Martínez-Checa, Y. Arco, S. Arias y E. Quesada. 2005. *Halomonas maura* is a physiologically versatile bacterium of both ecological and biotechnological interest. *Antonie van Leeuwenhoek*, 89: 395–403.
- Long, M., Z. Yu y X. Xu. 2010. A novel β -agarase with high pH stability from marine *Agarivorans* sp. LQ48. *Marine Biotechnology*, 12: 62–69.
- Lopes–Thompson, F., P. C. Abreu y W. Waislesky. 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture*, 203: 263–278.
- López–López, A. y M. Zaballos. 2005. Diversidad y actividad procariota en ecosistemas marinos. *Ecosistemas*, 14: 30–40.
- Ludwig, W., J. Euzéby y W. B. Whitman. 2010. Road map of the phyla Bacteroidetes, *Spirochaetes*, *Tenericutes (Mollicutes)*, Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. 1–19 p. En: Krieg, N. R., J. T. Staley, D. R. Brown, B. P. Hedlund, B. J. Paster, N. L. Ward, W. Ludwig y W. B. Whitman. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer. New York, U.S.A.

- Ludwig, W. y Schleifer, K. H. 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Review*, 15: 155–73.
- Luque–Cabrera, J. y A. Herráez–Sánchez. 2001. Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Elsevier. Madrid.
- MacFaddin, J. F. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Médica Panamericana, S. A. Buenos Aires, Argentina.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, D. S. Stahl y D. P. Clark. 2012. Brock Biology of Microorganism. Pearson. San Francisco, U.S.A.
- Mancuso, N. C., Guezennec, J. y J. P. Bowman. 2005. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents. *Marine Biotechnology*, 7: 253–271.
- Margesin, R. y F. Shinner. 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5: 75–83.
- Martens, T., T. Heidorn, R. Pukall, M. Simon, B. Tindall y T. Brinkhoff. 2006. Reclassification of *Roseobacter gallaeciensis* Ruiz-Ponte et al. 1998 as *Phaeobacter gallaeciensis* gen. nov., comb. nov., description of *Phaeobacter inhibens* sp. nov., reclassification of *Ruegeria algicola* (Lafay et al. 1995) Uchino et al. 1998 as *Marinovum algicola* gen. nov., comb. nov., and emended descriptions of the genera *Roseobacter*, *Ruegeria* and *Leisingera*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 1293–1304.
- Martínez–Alonso, M. y N. Gaju. 2005. El papel de los tapetes microbianos en la biorrecuperación de zonas litorales sometidas a la contaminación por vertidos de petróleo. *Ecosistemas*, 14: 79–91.
- Martínez–Romero, E y J. C. Martínez-Romero. 2001. Microbios en línea. UNAM. <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/index.html>.
- Mathews, C. K., K. E. Van Holde y K. G. Ahern. 2006. Bioquímica. Pearson Addison Wesley. España.
- Miller, B. y B. L. Bassler. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55: 165–199.

- Moriarty, D. J. W. 1997. The role of microorganism in aquaculture ponds. *Aquaculture*, 15: 333–349.
- Mota, C., J. Ridenoure, D. Cheng y F. De los Reyes. 2005. High levels of nitrifying bacteria in intermittently aerated reactors treating high ammonia wastewater. *FEMS Microbiology Ecology*, 54: 391–400.
- Murrell. J. C. y T. J. Smith. 2010. Biochemistry and molecular biology of methane monooxygenase. En: K. N. Timmis. (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer. Heidelberg, Berlin.
- Nakagawa, Y. y K. Yamasato. 1996. Emendation of the genus *Cytophaga* and transfer of *Cytophaga agarovorans* and *Cytophaga salmonicolor* to *Marinilabilia* gen. nov: phylogenetic analysis of the *Flavobacterium-Cytophaga* complex. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46: 599–603.
- Nakagawa, Y. y K. Yamasato. 1993. Phylogenetic diversity of the genus *Cytophaga* revealed by 16S ribosomal RNA sequencing and menaquinone analysis. *Journal of General Microbiology*, 139: 1155–1161.
- Nakagawa, Y., T. Sakane, M. Suzuki y K. Hatano. 2002. Phylogenetic structure of the genera *Flexibacter*, *Flexithrix*, and *Microscilla* deduced from 16S rRNA sequence analysis. *Journal of General Microbiology*, 48: 155–165.
- Nedashkovskaya, O. I., B. K. Seung, A. M. Lysenko, M. S. Park, V. V. Mikhailov, K. S. Bae y H. Y. Park. 2005a. *Roseivirga echinicomitans* sp. nov., a novel marine bacterium isolated from the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*, and emended description of the genus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: 1797–1800.
- Nedashkovskaya, O. I., B. K. Seung, D. H. Lee, A. M. Lysenko, L. S. Shevchenko, G. M. Frolova., V. V. Mikhailov, K. H. Lee y S. B. Kyung. 2005b. *Roseivirga ehrenbergii* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium of the phylum Bacteroidetes, isolated from the green alga *Ulva fenestrata*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: 231–234.
- Páez-Osuna, F. 2005. Retos y perspectivas de la camaronicultura en la zona costera. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 1: 21–31.

- Parent, S. y M. A. Morin. 2000. N budget as water quality management tool in closed aquatic mesocosms. *Water Research*, 34: 1846–1856.
- Park, S., D. S. Park, K. S. Bae, y J. H. Yoon. 2014. *Phaeobacter aquaemixtae* sp. nov., isolated from the junction between the ocean and a freshwater spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64: 1378–1383.
- Posada, D. y K. A. Crandall. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*; 14: 817–818.
- Posada, D. y T. R. Buckley. 2004. Model Selection and model averaging in phylogenetics advantages of the AIC and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology*, 53: 793–808.
- Prescott, L. M., J. P. Harley y D. A. Klein. 2004. *Microbiología*. McGraw-Hill. Madrid.
- Proctor, R. A., B. Kahl, C. von Eiff, P. E. Vandaux, D. P. Lew y G. Peters. 1997. Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance. *Clinical Infectious Diseases*; 27: 68–74.
- Rodicio, M. R y M. C. Mendoza. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22: 238-245.
- Romanenko, L. A., N. V. Zhukova, M. Rohde, A. M. Lysenko, V. V. Mikhailov y E. Stackebrandt. 2003. *Glaciacola mesophila* sp. nov., a novel marine agar-digesting bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 647–651.
- Romero, M. y A. Otero. 2010. Intercepción de señales de comunicación bacteriana en bacterias aisladas del medio marino. *Real Academia Gallega de Ciencias*, 24: 129–206.
- Romero, M., S. P. Diggle, S. Heeb, M. Cámara y A. Otero. 2008. Quorum quenching activity in *Anabaena* sp. PCC 7120: identification of AiiC, a novel AHL-acylase. *FEMS Microbiology Ecology*, 280: 73–80.
- Rosa, A. P. y J. A. Triguís. 2007. Bioremediation process on Brazil shoreline. *Environmental Science and Pollution Research*, 14: 470–477.
- Ruiz–Ponte, C., V. Cilia, C. Lambert y J. L. Nicolas. 1998. *Roseobacter gallaeciensis* sp. nov., a new marine bacterium isolated from rearings and collectors of the scallop *Pecten*

- maximus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 48: 537–542.
- SAGARPA. 2012. Anuario estadístico de pesca 2012. www.conapesca.sagarpa.gob.mx
- Salemi, M. y A. M. Vandamme. 2003. The phylogenetic handbook: a practical approach to DNA and protein phylogeny. Cambridge University Press. Reino Unido.
- Schmidt, H. y M. Hensel. 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. Clinical Microbiology Reviews, 17: 14–56.
- Schwieger, F. y C. C. Tebbe. 1998. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. Applied and Environmental Microbiology, 64: 4870-4876.
- Spira, B., X. Hu y T. Ferenci. 2008. Strain variation in ppGpp concentration and RpoS levels in laboratory strains of *Escherichia coli* K-12. Microbiology, 154: 2887–2895.
- Stevenson, B. D., S. A. Eichorst, J. T. Wertz, T.M. Schmidt y J. A. Breznak. 2004. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. Applied and Environmental Microbiology, 70: 4748–4755.
- Stocker, R. 2012. Marine microbes see a sea of gradient. Science, 338: 628–633.
- Suttle, C. A. 2007. Marine viruses major players in the global ecosystem. Nature Reviews Microbiology, 5: 801–812.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP* 4.0: Phylogenetic analysis using parsimony and other methods. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins y T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22: 4673–4680.
- Valenzuela, S., A. Banderas, C. A. Jerez y N. Guiliani. 2007. Cell–Cell communication in bacteria. 253–264 p. En: E. Donatti y W. Sand. (Eds.). Microbial processing of metal sulfides. Springer. New York, U.S.A.
- Vandecandelaere, I., E. Segart, A. Mollica, M. Faimali y P. Vandamme. 2009. *Phaeobacter caeruleus* sp. nov., a blue-coloured, colony-forming bacterium isolated from a marine electroactive biofilm. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59: 1209–1214.

- Villeneuve, C., C. Martineau, F. Mauffrey y R. Villemur. 2013. *Methylophaga nitratireducenticrescens* sp. nov. and *Methylophaga frappieri* sp. nov., isolated from the biofilm of the methanol-fed denitrification system treating the seawater at the Montreal biodome. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 2216–2222.
- Van der Peer, I., Chapelle, S. y De Wachter, R. 1996. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Research*, 24: 3381–3391.
- Voet, D., J. G. Voet y C. W. Pratt. 2007. *Fundamentos de Bioquímica*. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires.
- Wagenknecht, H. A. 2008. Fluorescent DNA base modifications and substitutes: multiple fluorophore labeling and the DETEQ concept. *Annals of New York Academic of Science*, 1130: 122–1230.
- Wang, J., H. Mou, X. Jiang y H. Guan. 2006. Characterization of a novel β -agarase from marine *Alteromonas* sp. SY37–12 and its degrading products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71: 833–839.
- Whitman, W., D. Coleman y W. Wiebe. 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 14: 6578–6583.
- Willey, J. M., L. M. Sherwood y C. J. Woolverton. 2008. *Microbiología de Prescott, Harley y Klein*. McGraw Hill International. New York, U.S.A.
- Woese, C. R., O. Kandler y M. L. Wheelis. 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87: 4576–4579.
- Wu, Y. H., P. S. Yu, Y. D. Zhou, L. Xu, C. S. Wang, M. Wu, A. Oren y X. W. Xu. 2013. *Muricauda antarctica* sp. nov., a marine member of the *Flavobacteriaceae* isolated from antarctic seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 3451–3456.
- Xu, J. 2006. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. *Molecular Ecology*, 15: 1713–1731.
- Yang, C., Y. Li, Q. Guo, Q. Lai, J. Wei, T. Zheng y Y. Tian. 2013. *Muricauda zhangzhouensis* sp. nov., isolated from mangrove sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 2320–2325.

- Yoon J. H., S. J. Kang, S. Y. Lee y T. K. Oh. 2007. *Phaeobacter daeponensis* sp. nov., isolated from a tidal flat of the yellow sea in korea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57: 856–861.
- Yoon J. H., S. J. Kang, Y. T. Jung y T. K. Oh. 2008. *Muricauda lutimaris* sp. nov., isolated from a tidal flat of the yellow sea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58: 1603–1607.
- Zhang D. C., H. R. Li, Y. H. Xin, H. C. Liu, Z. M. Chi, P. J. Zhou y Y. Yu. 2008. *Phaeobacter arcticus* sp. nov., a novel psychrophilic bacterium isolated from the arctic. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 58: 1384–1387.
- Zhou, Q., K. Li., X. Jun y L. Bo. 2009. Role and functions of beneficial microorganisms in sustainable aquaculture. Bioresource Technology, 100: 3780–3786.

XII. APÉNDICES

Apéndice 1. Contenido nutricional del medio de cultivo AM 2216 (DIFCO).

Compuesto	Contenido
Peptona	5.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Citrato férrico	0.1 g
Cloruro de sodio	19.45 g
Cloruro de Magnesio	8.8 g
Sulfato de sodio	3.24 g
Cloruro de calcio	1.8 g
Cloruro de potasio	0.55 g
Bicarbonato de sodio	0.16 g
Bromuro de potasio	0.08 g
Agar	15.0 g
Cloruro de estroncio	34.0 mg
Ácido bórico	22.0 mg
Silicato de sodio	4.0 mg
Fluoruro de sodio	2.4 mg
Nitrato de amonio	1.6 mg
Fosfato disódico	8.0 mg

Apéndice 2. Contenido nutricional del medio de cultivo Soya Trypticasa.

Compuesto	Contenido
Peptona de caseína	15.0 g
Peptona harina de soya	5.0 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
Agar bacteriológico	13 g

Apéndice 3. Contenido nutricional del medio de cultivo Mueller Hinton.

Compuesto	Contenido
Peptona ácida de caseína	17.5 g
Extracto de carne	2.0 g
Almidón	1.5 g
Agar bacteriológico	17.0 g

Apéndice 4. Cuantificación de ADN de las cepas de estudio.

Muestra	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	A 260/ A280	A 260/ A230
E-4G	1.5	2.667	0.229
E-4D	2.0	2.333	0.280
NFg.12	4.0	1.143	0.308
5M7.13	18.0	1.565	0.643
RoG.13	13.5	1.929	0.600

Apéndice 5. Cuantificación de producto de PCR de las cepas de estudio.

Muestra	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	A 260/ A280	A 260/ A230
E-4G	4.0	1.6	1.0
E-4D	2.0	1.0	1.0
NFg.12	9	2.0	1.5
5M7.13	13	2.0	2.364
RoG.13	4	2.0	0.471

Apéndice 6. Algunas secuencias homólogas de la cepa E-4D publicadas en el GenBank.

Bacteria	Número de acceso	Similitud	Longitud (pb.)	Fecha	
Bacteria de la clase Gammaproteobacteria (No cultivada)	JN408990.1	99%	404/410	1460	Agosto, 2013
<i>Methylophaga</i> sp. (No cultivada).	EU289633.1	99%	405/410	1064	Agosto, 2013
<i>Methylophaga</i> sp.	KC534309.1	98%	402/410	1405	Agosto, 2013
<i>Rhodococcus</i> sp.	HM246707.1	99%	404/410	1272	Agosto, 2013
<i>Gordonia</i> sp.	JN003575.1	99%	404/410	1509	Agosto, 2013
<i>Gordonia</i> sp.	HM352835.1	99%	404/410	1282	Agosto, 2013

Apéndice 7. Algunas secuencias homólogas de la cepa E-4G publicadas en el GenBank.

Bacteria	Número de acceso	Similitud	Longitud (pb.)	Fecha	
<i>Halophilic bacterium</i>	KC142101.1	99%	407/409	1515	Agosto, 2013
<i>Halomonas</i> sp.	EU931297.1	99%	407/409	1404	Agosto, 2013
<i>Halomonas salina</i>	AM945688.1	99%	407/409	1309	Agosto, 2013
<i>Halomonas halophila</i>	NR_042697.1	99%	406/409	1461	Agosto, 2013
<i>Halomonas denitrificans</i>	HM032832.1	99%	406/409	928	Agosto, 2013
<i>Halomonas koreensis</i>	NR_025773.1	99%	407/410	1399	Agosto, 2013

Apéndice 8. Algunas secuencias homólogas de la cepa NFg.12 publicadas en el GenBank.

Bacteria	Número de acceso	Similitud	Longitud (pb.)	Fecha	
Bacteria no cultivada	HE574910.1	99%	405/409	1319	Agosto, 2013
<i>Ruegeria</i> sp.	GU551937.1	99%	405/409	1337	Agosto, 2013
<i>Phaeobacter</i> sp.	HQ433245.1	99%	404/409	789	Agosto, 2013
<i>Silicibacter</i> sp.	FJ218376.1	99%	404/409	696	Agosto, 2013
<i>Ruegeria</i> sp.	AY241403.1	99%	403/409	582	Agosto, 2013
<i>Tropicibacter</i> sp.	KC534265.2	99%	403/409	1346	Agosto, 2013

Apéndice 9. Algunas secuencias homólogas de la cepa 5M7.13 publicadas en el GenBank.

Bacteria	Número de acceso	Similitud	Longitud (pb.)	Fecha
<i>Muricauda</i> sp.	JQ257008.1	99%	405/407	Agosto, 2013
<i>Muricauda aquimarina</i>	EU440979.1	99%	405/407	Agosto, 2013
<i>Cytophaga</i> sp.	AB073565.2	99%	405/407	Agosto, 2013
<i>Flavobacterium</i> sp.	HM583349.1	99%	405/407	Agosto, 2013
Bacteria no cultivada	HQ326253.1	99%	405/407	Agosto, 2013

Apéndice 10. Algunas secuencias homólogas de la cepa RoG.13 publicadas en el GenBank.

Bacteria	Número de acceso	Similitud	Longitud (pb.)	Fecha
Bacteria no cultivada	JQ032557.1	100%	405/405	Agosto, 2013
<i>Roseivirga ehrenbergii</i>	GQ246639.1	99%	399/405	Agosto, 2013
<i>Roseivirga spongicola</i>	NR_043531.1	98%	398/405	Agosto, 2013
<i>Fabibacter</i> sp.	KC005305.1	98%	398/405	Agosto, 2013
<i>Cytophaga</i> sp. (No cultivada)	AJ487531.1	98%	395/402	Agosto, 2013

Apéndice 11. Jerarquía taxonómica de la cepa bacteriana E-4D obtenida de las secuencias homólogas publicadas en el GenBank.

Filo Proteobacteria
 Clase Gammaproteobacteria
 Orden Thiotrichales
 Familia Piscirickettsiaceae
 Género *Methylophaga*

Apéndice 12. Jerarquía taxonómica de la cepa bacteriana E-4G obtenida de las secuencias homólogas publicadas en el GenBank.

Filo Proteobacteria
 Clase Gammaproteobacteria
 Orden Oceanospirillales
 Familia Halomonadaceae
 Género *Halomonas*

Apéndice 13. Jerarquía taxonómica de la cepa bacteriana NFG.12 obtenida de las secuencias homólogas publicadas en el GenBank.

Filo Proteobacteria
Clase Alphaproteobacteria
Orden Rhodobacterales
Familia Rhodobacteraceae
Género *Phaeobacter*

Apéndice 14. Jerarquía taxonómica de la cepa bacteriana 5M7.13 obtenida de las secuencias homólogas publicadas en el GenBank.

Filo Bacteroidetes
Clase Flavobacteriia
Orden Flavobacteriales
Familia Flavobacteriaceae
Género *Muricauda*

Apéndice 15. Jerarquía taxonómica de la cepa bacteriana RoG.13 obtenida de las secuencias homólogas publicadas en el GenBank.

Filo Bacteroidetes
Clase Cytophagia
Orden Cytophagales
Familia Flammeovirgaceae
Género *Roseivirga*

Apéndice 16. Jerarquía taxonómica de los filo Proteobacteria y Bacteroidetes (Euzéby, 2014).

Filo Proteobacteria

Clase Alphaproteobacteria

Orden Caulobacterales

Familia: Caulobacteraceae: *Asticcacaulis*, *Brevundimonas*, *Caulobacter*, *Phenylobacterium*. **Familia Hyphomonadaceae:** *Algimonas*, *Glycoaulis*, *Hellea*, *Henriciella*, *Hirschia*, *Hyphomonas*, *Litorimonas*, *Maribaculum*, *Maricaulis*, *Marinicauda*, *Oceanicaulis*, *Ponticaulis*, *Robiginitomaculum*, *Woodsholea*.

Orden Kiloniellales

Familia Kiloniellaceae: *Kiloniella*.

Orden Kordiimonadales

Familia: Kordiimonadaceae: *Kordiimonas*.

Orden Magnetococcales

Familia Magnetococcaceae:

Orden Parvularculales

Familia Parvularculaceae: *Parvularcula*.

Orden Rhizobiales

Familia Aurantimonadaceae: *Aurantimonas*, *Aureimonas*, *Fulvimarina*, *Marteella*. **Familia Bartonellaceae:** *Bartonella*, *Grahamella*, *Rochalimaea*. **Familia Beijerinckiaceae:** *Beijerinckia*, *Camelimonas*, *Chelatococcus*, *Methylocapsa*, *Methylocella*, *Methyloferula*, *Methylorosula*, *Methylovirgula*. **Familia Bradyrhizobiaceae:** *Afipia*, *Agromonas*, *Balneimonas*, *Blastobacter*, *Bosea*, *Bradyrhizobium*, *Nitrobacter*, *Oligotropha*, *Rhodoblastus*, *Rhodopseudomonas*, *Salinarimonas*, *Tardiphaga*. **Familia Brucellaceae:** *Brucella*, *Crabtreeella*, *Daeguia*, *Mycoplana*, *Ochrobactrum*, *Paenochrobactrum*, *Pseudochrobactrum*. **Familia Cohaesibacteraceae:** *Cohaesibacter*. **Familia Hyphomicrobiaceae:** *Ancalomicrobium*, *Angulomicrobium*, *Aquabacter*, *Blastochloris*, *Cucumibacter*, *Devosia*, *Dichotomicrobium*, *Filomicrobium*, *Gemmiger*, *Hyphomicrobium*, *Maritalea*, *Methylorhabdus*, *Pedomicrobium*, *Pelagibacterium*, *Prosthecomicrobium*, *Rhodomicrobium*, *Rhodoplanes*, *Seliberia*, *Zhangella*. **Familia Methylobacteriaceae:** *Meganema*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Protomonas*. **Familia Methylocystaceae:** *Albibacter*, *Hansschlegelia*, *Methylocystis*, *Methylopila*, *Methylosinus*, *Pleomorphomonas*, *Terasakiella*. **Familia Methylocystaceae:** *Albibacter*, *Hansschlegelia*, *Methylocystis*, *Methylopila*, *Methylosinus*, *Pleomorphomonas*, *Terasakiella*. **Familia Phyllobacteriaceae:** *Aminobacter*, *Aquamicrobium*, *Chelativorans*, *Defluviibacter*, *Hoeflea*, *Mesorhizobium*, *Nitratireductor*, *Phyllobacterium*, *Pseudaminobacter*, *Pseudahrensia*, *Thermovum*. **Familia Rhizobiaceae:** *Agrobacterium*, *Allorhizobium*, *Carbophilus*, *Chelatobacter*, *Ensifer*, *Kaistia*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Shinella*. **Familia Rhodobiaceae:** *Afifella*, *Anderseniella*, *Lutibaculum*, *Parvibaculum*, *Rhodobium*, *Rhodoligotrophos*, *Roseospirillum*, *Tepidamorphus*. **Familia Xanthobacteraceae:** *Ancylobacter*, *Azorhizobium*, *Labrys*, *Pseudolabrys*, *Pseudoxanthobacter*, *Starkeya*, *Xanthobacter*.

Orden Rhodobacterales

Familia Rhodobacteraceae: *Actibacterium*, *Agaricicola*, *Ahrensia*, *Albimonas*, *Albidovulum*, *Amaricoccus*, *Antarctobacter*, *Catellibacterium*, *Celeribacter*, *Citreicella*, *Citreimonas*, *Defluviimonas*, *Dinoroseobacter*, *Donghicola*, *Epibacterium*, *Falsirhodobacter*,

Gaetbulicola, Gemmobacter, Haematobacter, Hasllibacter, Huaishuia, Hwanghaeicola, Jannaschia, Jhaorihella, Ketogulonicigenium, Labrenzia, Leisingera, Lentibacter, Litoreibacter, Litorimicrobium, Litorisediminicola, Loktanella, Lutimaribacter, Mamelella, Maribius, Marinovum, Maritimibacter, Marivita, Methylarcula, Nautella, Nereida, Nesiotobacter, Oceanibulbus, Oceanicella, Oceanicola, Octadecabacter, Pacificibacter, Palleronia, Pannonibacter, Paracoccus, Pararhodobacter, Pelagibaca, Pelagicola, Pelagimonas, Phaeobacter, Planktotalea, Pleomorphobacterium, Pontibaca, Ponticoccus, Poseidonocella, Primorskyibacter, Profundibacterium, Pseudorhodobacter, Pseudoruegeria, Pseudovibrio, Rhodobaca, Rhodobacter, Rhodothalassium, Rhodovulum, Roseibaca, Roseibacterium, Roseibium, Roseicitreum, Roseicyclus, Roseinatronobacter, Roseisalinus, Rosevivax, Roseobacter, Roseovarius, Rubellimicrobium, Rubribacterium, Rubrimonas, Ruegeria, Sagittula, Salinihabitans, Salipiger, Sediminimonas, Seohaecicola, Shimia, Silicibacter, Staleyia, Stappia, Sulfitobacter, Tateyamaia, Thalassobacter, Thalassobius, Thalassococcus, Thioclava, Thiosphaera, Tranquillimonas, Tropicibacter, Tropicimonas, Vadicella, Wenxinia, Yangia.

Orden Rhodospirales

Familia Acetobacteraceae: *Acetobacter, Acidicaldus, Acidiphilium, Acidisoma, Acidisphaera, Acidocella, Acidomonas, Ameyamaea, Asaia, Belnapia, Craurococcus, Endobacter, Gluconacetobacter, Gluconobacter, Granulibacter, Humitalea, Komagataeibacter, Kozakia, Muricoccus, Neoasaia, Neokomagataea, Paracraurococcus, Rhodopila, Rhodovarius, Roseococcus, Roseomonas, Rubritepida, Saccharibacter, Stella, Swaminathania, Tanticharoenia, Teichococcus, Zavarzinia.* **Familia Rhodospirillaceae:** *Azospirillum, Caenispirillum, Conglomeromonas, Constrictibacter, Defluviococcus, Desertibacter, Dongia, Elstera, Ferrovibrio, Fodinicurvata, Inquilinus, Insolitispirillum, Limimonas, Magnetospira, Magnetospirillum, Magnetovibrio, Marispirillum, Nisaea, Novispirillum, Oceanibaculum, Pelagibius, Phaeospirillum, Phaeovibrio, Rhodocista, Rhodospira, Rhodospirillum, Rhodovibrio, Roseospira, Skermanella, Telmatospirillum, Thalassobaculum, Thalassospira, Tistlia, Tistrella.*

Orden Rickettsiales

Familia Anaplasmataceae: *Aegyptianella, Anaplasma, Cowdria, Ehrlichia, Neorickettsia, Wolbachia.* **Familia Holosporaceae:** *Holospora.* **Familia Rickettsiaceae:** *Orientia, Rickettsia.*

Orden Sneathiellales

Familia Sneathiellaceae: *Sneathiella, Oceanibacterium.*

Orden Sphingomonadales

Familia Erythrobacteraceae: *Altererythrobacter, Croceicoccus, Erythrobacter, Erythromicrobium, Porphyrobacter.* **Familia Sphingomonadaceae:** *Blastomonas, Erythromonas, Novosphingobium, Parasphingopyxis, Rhizomonas, Sandaracinobacter, Sandarakinorhabdus, Sphingobium, Sphingomicrobium, Sphingomonas, Sphingopyxis, Sphingorhabdus, Sphingosinicella, Stakelama, Zymomonas.*

Clase Betaproteobacteria

Orden Burkholderiales

Familia Alcaligenaceae: *Achromobacter, Advenella, Alcaligenes, Azohydromonas, Bordetella, Brackiella, Candidimonas, Castellaniella, Deroxia, Kerstersia, Oligella, Paenalcaligenes, Paralcaligenes, Parapusillimonas, Pelistega, Pigmentiphaga, Pusillimonas, Taylorella, Tetrathiobacter.* **Familia Burkholderiaceae:** *Burkholderia, Chitinimonas,*

Cupriavidus, Lautropia, Limnobacter, Pandoraea, Paucimonas, Polynucleobacter, Ralstonia, Thermothrix, Wautersia. **Familia Comamonadaceae:** *Acidovorax, Albidiferax, Alicyclophilus, Brachymonas, Caenibacterium, Caenimonas, Caldimonas, Comamonas, Curvibacter, Delftia, Diaphorobacter, Extensimonas, Giesbergeria, Hydrogenophaga, Hylemonella, Kinneretia, Lampropedia, Limnohabitans, Macromonas, Malikia, Ottowia, Pelomonas, Polaromonas, Pseudacidovorax, Pseudorhodoferax, Ramlibacter, Rhodoferax, Roseateles, Schlegelella, Simplicispira, Tepidicella, Variovorax, Verminephrobacter, Xenophilus.* **Familia Oxalobacteraceae:** *Collimonas, Duganella, Glaciimonas, Herbaspirillum, Herminiimona, Pseudoduganella, Janthinobacterium, Massilia, Naxibacter, Oxalicibacterium, Oxalobacter, Telluria, Undibacterium.* **Familia Sutterellaceae:** *Parasutterella, Sutterella.*

Orden Hydrogenophilales

Familia Hydrogenophilaceae: *Hydrogenophilus, Petrobacter, Sulfuricella, Tepidiphilus, Thiobacillus.*

Orden Methylophilales

Familia Methylophilaceae: *Methylobacillus, Methylophilus, Methylothermus, Methylovorus.*

Orden Neisseriales

Familia Neisseriaceae: *Alysiella, Amantichitinum, Andreprevotia, Aquaspirillum, Aquitalea, Bergeriella, Chitinibacter, Chitinilyticum, Chitiniphilus, Chromobacterium, Conchiformibius, Deefgea, Eikenella, Formivibrio, Gulbenkiana, Iodobacter, Jeongeupia, Kingella, Laribacter, Leeia, Microvirgula, Morococcus, Neisseria, Paludibacterium, Prolinoborus, Pseudogulbenkiana, Silvimonas, Simonsiella, Snodgrassella, Stenoxybacter, Uruburuella, Vitreoscilla, Vogesella.*

Orden Nitrosomonadales

Familia Gallionellaceae: *Gallionella.* **Familia Nitrosomonadaceae:** *Nitrosolobus, Nitrosomonas, Nitrosospora.* **Familia Spirillaceae:** *Spirillum.*

Orden Rhodocyclales

Familia Rhodocyclaceae: *Azoarcus, Azonexus, Azospira, Azovibrio, Dechloromonas, Dechlorosoma, Denitratisoma, Ferribacterium, Georgfuchsia, Methyloversatilis, Propionibacter, Propionivibrio, Quatrionicoccus, Rhodocyclus, Sterolibacterium, Sulfuritalea, Thauera, Uliginosibacterium, Zoogloea.*

Clase Deltaproteobacteria

Orden Bdellovibrionales

Familia Bacteriovoraceae: *Bacteriovorax, Peredibacter.* **Familia Bdellovibrionaceae:** *Bdellovibrio, Micavibrio, Vampirovibrio.*

Orden Desulfarculales

Familia Desulfarculaceae: *Desulfarculus.*

Orden Desulfobacterales

Familia Desulfobacteraceae: *Desulfatibacillum, Desulfatiferula, Desulfatirhabdium, Desulfatitalea, Desulfobacter, Desulfobacterium, Desulfobacula, Desulfobotulus, Desulfocella, Desulfococcus, Desulfoconvexum, Desulfofaba, Desulfofrigus, Desulfoluna, Desulfomusa, Desulfonatrobacter, Desulfonema, Desulforegula, Desulfosalsimonas, Desulfosarcina, Desulfospira, Desulfotignum, Phorcysia.* **Familia Desulfobulbaceae:** *Desulfobulbus, Desulfocapsa, Desulfofustis, Desulfopila, Desulforhopalus, Desulfotalea, Desulfurivibrio.*

Orden Desulfovibrionales

Familia Desulfohalobiaceae: *Desulfohalobium*, *Desulfonatronospira*, *Desulfonatronovibrio*, *Desulfonauticus*, *Desulfothermus*, *Desulfovermiculus*.

Familia Desulfomicrobiaceae: *Desulfomicrobium*. **Familia Desulfonatronaceae:** *Desulfonatronum*. **Familia Desulfovibrionaceae:** *Bilophila*, *Desulfocurvus*, *Desulfomonas*, *Desulfovibrio*, *Lawsonia*, *Desulfobaculum*.

Orden Desulfurellales

Familia Desulfurellaceae: *Desulfurella*, *Hippea*.

Orden Desulfuromonadales

Familia Desulfuromonadaceae: *Desulfuromonas*, *Desulfuromusa*, *Malonomonas*, *Pelobacter*. **Familia Geobacteraceae:** *Geoalkalibacter*, *Geobacter*, *Geopsychrobacter*, *Geothermobacter*, *Trichlorobacter*.

Orden Myxococcales

Suborden Cystobacterineae

Familia Cystobacteraceae: *Anaeromyxobacter*, *Archangium*, *Cystobacter*, *Hyalangium*, *Melittangium*, *Stigmatella*. **Familia Myxococcaceae:** *Angiococcus*, *Corallococcus*, *Myxococcus*, *Pyxidicoccus*.

Suborden Nannocystineae

Familia Haliangiaceae: *Haliangium*. **Familia Kofleriaceae:** *Kofleria*. **Familia Nannocystaceae:** *Enhygromyxa*, *Nannocystis*, *Plesiocystis*, *Pseudenhygromyxa*.

Suborden Sorangiineae

Familia Phaselicystidaceae: *Phaselicystis*. **Familia Polyangiaceae:** *Byssovorax*, *Chondromyces*, *Jahnella*, *Polyangium*, *Sorangium*.

Orden Syntrophobacterales

Familia Syntrophaceae: *Desulfobacca*, *Desulfomonile*, *Smithella*, *Syntrophus*.

Familia Syntrophobacteraceae: *Desulfacinum*, *Desulfoglaeba*, *Desulforhabdus*, *Desulfosoma*, *Desulfovirga*, *Syntrophobacter*, *Thermodesulforhabdus*. **Familia Sandaracinaceae:** *Sandaracinus*.

Clase Epsilonproteobacteria

Orden Campylobacterales

Familia Campylobacteraceae: *Arcobacter*, *Campylobacter*, *Dehalospirillum*, *Sulfurospirillum*. **Familia Helicobacteraceae:** *Helicobacter*, *Sulfuricurvum*, *Sulfurimonas*, *Sulfurovum*, *Thiovulum*, *Wolinella*. **Familia Hydrogenimonaceae:** *Hydrogenimonas*.

Orden Nautiliales

Familia Nautiliaceae: *Caminibacter*, *Lebetimonas*, *Nautilia*, *Nitratifactor*, *Nitratiruptor*, *Thioreductor*.

Clase Gammaproteobacteria

Orden Acidithiobacillales

Familia Acidithiobacillaceae: *Acidithiobacillus*. **Familia Thermithiobacillaceae:** *Thermithiobacillus*.

Orden Aeromonadales

Familia Aeromonadaceae: *Aeromonas*, *Oceanimonas*, *Oceanisphaera*, *Tolomonas*, *Zobellella*. **Familia Succinivibrionaceae:** *Anaerobiospirillum*, *Ruminobacter*, *Succinatimonas*, *Succinimonas*, *Succinivibrio*.

Orden Alteromonadales

Familia Alteromonadaceae: *Aestuariibacter*, *Agarivorans*, *Aliagarivorans*, *Alishewanella*, *Alteromonas*, *Bowmanella*, *Catenovulum*, *Glacielcola*, *Haliea*, *Marinimicrobium*, *Marinobacter*, *Marinobacterium*, *Melitea*, *Microbulbifer*, *Saccharophagus*, *Salinimonas*. **Familia Celerinatantimonadaceae:** *Celerinatantimonas*. **Familia Colwelliaceae:** *Colwellia*, *Thalassomonas*. **Familia Ferrimonadaceae:** *Ferrimonas*, *Paraferrimonas*. **Familia Idiomarinaceae:** *Idiomarina*, *Pseudidiomarina*. **Familia Moritellaceae:** *Moritella*, *Paramoritella*. **Familia Pseudoalteromonadaceae:** *Algicola*, *Pseudoalteromonas*, *Psychrosphaera*. **Familia Psychromonadaceae:** *Psychromonas*. **Familia Shewanellaceae:** *Shewanella*.

Orden Cardiobacteriales

Familia Cardiobacteriaceae: *Cardiobacterium*, *Dichelobacter*, *Suttonella*.

Orden Chromatiales

Familia Chromatiaceae: *Allochromatium*, *Amoebobacter*, *Chromatium*, *Halochromatium*, *Isochromatium*, *Lamprobacter*, *Lamprocystis*, *Marichromatium*, *Nitrosococcus*, *Pfennigia*, *Phaeochromatium*, *Rhabdochromatium*, *Rheinheimera*, *Thermochromatium*, *Thioalkalicoccus*, *Thiobaca*, *Thiocapsa*, *Thiococcus*, *Thiocystis*, *Thiodictyon*, *Thioflavicoccus*, *Thiohalocapsa*, *Thiolamprovum*, *Thiopedia*, *Thiophageococcus*, *Thiorhodococcus*, *Thiorhodovibrio*, *Thiospirillum*. **Familia Ectothiorhodospiraceae:** *Acidiferrobacter*, *Alkalilimnicola*, *Alkalispirillum*, *Aquisalimonas*, *Arhodomonas*, *Ectothiorhodosinus*, *Ectothiorhodospira*, *Halorhodospira*, *Natronocella*, *Nitrococcus*, *Thioalbus*, *Thioalkalivibrio*, *Thiohalospira*, *Thiorhodospira*.

Familia Granulosicoccaceae: *Granulosicoccus*. **Familia Halothiobacillaceae:** *Halothiobacillus*, *Thioalkalibacter*, *Thiofaba*, *Thiovirga*. **Familia Thioalkalispiraceae:** *Thioalkalispira*, *Thiohalophilus*, *Thiopfundum*.

Orden Enterobacteriales

Familia Enterobacteriaceae: *Arsenophonus*, *Biostraticola*, *Brenneria*, *Buchnera*, *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Calymmatobacterium*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Cosenzaea*, *Cronobacter*, *Dickeya*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Ewingella*, *Gibbsiella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Khuyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Levinea*, *Lonsdalea*, *Mangrovibacter*, *Moellerella*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Phaseolibacter*, *Photorhabdus*, *Plesiomonas*, *Pragia*, *Proteus*, *Providencia*, *Rahnella*, *Raoultella*, *Saccharobacter*, *Salmonella*, *Samsonia*, *Serratia*, *Shigella*, *Shimwellia*, *Sodalis*, *Tatumella*, *Thorsellia*, *Trabulsiella*, *Wigglesworthia*, *Xenorhabdus*, *Yersinia*, *Yokenella*.

Orden Legionellales

Familia Coxiellaceae: *Aquicella*, *Coxiella*, *Diplorickettsia*. **Familia Legionellaceae:** *Fluoribacter*, *Legionella*, *Sarcobium*, *Tatlockia*.

Orden Methylococcales

Familia Crenotrichaceae: *Crenothrix*. **Familia Methylococcaceae:** *Methylobacter*, *Methylocaldum*, *Methylococcus*, *Methylogaea*, *Methylohalobius*, *Methylomarinum*, *Methylomicrobium*, *Methylomonas*, *Methylosarcina*, *Methylosoma*, *Methylosphaera*, *Methylothermus*, *Methylovulum*.

Orden Oceanospirillales

Familia Alcanivoracaceae: *Alcanivorax*, *Fundibacter*, *Kangiella*. **Familia Hahellaceae:** *Endozoicomonas*, *Hahella*, *Halospina*, *Kistimonas*, *Zooshikella*. **Familia Halomonadaceae:** *Aidingimonas*, *Carnimonas*, *Chromohalobacter*, *Cobetia*, *Deleya*, *Halomonas*, *Halotalea*, *Halovibrio*, *Kushneria*, *Modicisalibacter*, *Salinicola*, *Volcaniella*, *Zymbacter*. **Familia Litoricolaceae:** *Litoricola*. **Familia Oceanospirillaceae:** *Amphritea*,

Balneatrix, Bermanella, Corallomonas, Marinomonas, Marinospirillum, Neptuniibacter, Neptunomonas, Nitrincola, Oceaniserpentilla, Oceanobacter, Oceanospirillum, Oleibacter, Oleispira, Pseudospirillum, Reinekea, Sinobacterium, Thalassolituus. Familia Oleiphilaceae: Oleiphilus. Familia Saccharospirillaceae: Saccharospirillum.

Orden Orbales

Familia Orbaceae: *Gilliamella, Orbus.*

Orden Pasteurellales

Familia Pasteurellaceae: *Actinobacillus, Aggregatibacter, Avibacterium, Basfia, Bibersteinia, Bisgaardia, Chelonobacter, Gallibacterium, Haemophilus, Histophilus, Lonepinella, Mannheimia, Necropsobacter, Nicoletella, Pasteurella, Phocoenobacter, Volucribacter.*

Orden Pseudomonadales

Familia Moraxellaceae: *Acinetobacter, Alkanindiges, Branhamella, Enhydrobacter, Moraxella, Paraperlucidibaca, Perlucidibaca, Psychrobacter. Familia Pseudomonadaceae: Azomonas, Azomonotrichon, Azorhizophilus, Azotobacter, Cellvibrio, Chryseomonas, Flavimonas, Mesophilobacter, Pseudomonas, Rhizobacter, Rugamonas, Serpens.*

Orden Salinisphaerales

Familia Salinisphaeraceae: *Salinisphaera.*

Orden Thiotrichales

Familia Francisellaceae: *Francisella. Familia Piscirickettsiaceae: Cycloclasticus, Galenea, Hydrogenovibrio, Methylophaga, Piscirickettsia, Sulfurivirga, Thioalkalimicrobium, Thiomicrospira. Familia Thiotrichaceae: Achromatium, Beggiatoa, Leucothrix, Thiobacterium, Thiomargarita, Thioploc, Thiospira, Thiothrix, Cocleimonas.*

Orden Vibrionales

Familia Vibrionaceae: *Aliivibrio, Allomonas, Beneckea, Catenococcus, Echinimonas, Enterovibrio, Grimontia, Listonella, Lucibacterium, Photobacterium, Salinivibrio, Vibrio.*

Orden Xanthomonadales

Familia Sinobacteraceae: *Alkanibacter, Hydrocarboniphaga, Nevskia, Singularimonas, Sinobacter, Steroidobacter. Familia Algiphilaceae: Algiphilus. Familia Nevskiaceae: Hydrocarboniphaga, Nevskia. Familia Solimonadaceae: Fontimonas, Solimonas. Familia Xanthomonadaceae: Aquimonas, Arenimonas, Aspromonas, Dokdonella, Dyella, Frateuria, Fulvimonas, Ignatzschineria, Luteibacter, Luteimonas, Lysobacter, Metallibacterium, Panacagrionas, Pseudofulvimonas, Pseudoxanthomonas, Rhodanobacter, Rudaea, Silanimonas, Stenotrophomonas, Thermomonas, Wohlfahrtiimonas, Xanthomonas, Xylella.*

Clase Zetaproteobacteria

Orden Mariprofundales

Familia Mariprofundaceae: *Mariprofundus.*

Filo Bacteroidetes

Clase Bacteroidia

Orden Bacteroidales

Familia Bacteroidaceae: *Acetofilamentum, Acetomicrobium, Acetothermus, Anaerorhabdus, Bacteroides, Capsularis. Familia Marinilabiaceae: Alkaliflexus, Alkalitalea, Anaerophaga, Geofilum, Mangroviflexus, Marinilabilia, Natronoflexus,*

Thermophagus. **Familia Porphyromonadaceae:** *Barnesiella*, *Butyricimonas*, *Dysgonomonas*, *Macellibacteroides*, *Odoribacter*, *Oribaculum*, *Paludibacter*, *Parabacteroides*, *Petrimonas*, *Porphyromonas*, *Proteiniphilum*, *Tannerella*. **Familia Prevotellaceae:** *Hallella*, *Paraprevotella*, *Prevotella*, *Xylanibacter*, *Alloprevotella*.

Familia Rikenellaceae: *Alistipes*, *Rikenella*, *Anaerocella*.

Clase Cytophagia

Orden Cytophagales

Familia Catalimonadaceae: *Catalinimonas*. **Familia Cyclobacteriaceae:** *Algoriphagus*, *Aquiflexum*, *Belliella*, *Cecembia*, *Chimaereicella*, *Cyclobacterium*, *Echinicola*, *Fontibacter*, *Hongiella*, *Indibacter*, *Mariniradius*, *Mongoliicoccus*, *Mongoliitalea*, *Nitritalea*, *Shivajiella*. **Familia Cytophagaceae:** *Adhaeribacter*, *Arcicella*, *Cytophaga*, *Dyadobacter*, *Effluviibacter*, *Ekhidna*, *Emticicia*, *Fibrella*, *Fibrisoma*, *Flectobacillus*, *Flexibacter*, *Huanghella*, *Hymenobacter*, *Larkinella*, *Leadbetterella*, *Litoribacter*, *Meniscus*, *Microscilla*, *Persicitalea*, *Pontibacter*, *Pseudarcicella*, *Rhodocytophaga*, *Rhodonellum*, *Rudanella*, *Runella*, *Siphonobacter*, *Spirosoma*, *Sporocytophaga*. **Familia Flammeovirgaceae:** *Aureibacter*, *Cesiribacter*, *Fabibacter*, *Flammeovirga*, *Flexithrix*, *Fulvitalea*, *Fulvivirga*, *Limibacter*, *Marinicola*, *Marinoscillum*, *Marivirga*, *Nafulsella*, *Perexilibacter*, *Persicobacter*, *Rapidithrix*, *Reichenbachella*, *Roseivirga*, *Sedimitomix*, *Thermonema*. **Familia Mooreiaceae:** *Mooreia*. **Familia Rhodothermaceae:** *Rhodothermus*, *Rubricoccus*, *Rubrivirga*, *Salinibacter*, *Salisaeta*.

Clase Flavobacteriia

Orden Flavobacteriales

Familia Blattabacteriaceae: *Blattabacterium*. **Familia Cryomorphaceae:** *Brumimicrobium*, *Crocinitomix*, *Cryomorpha*, *Fluviicola*, *Lishizhenia*, *Owenweeksia*, *Phaeocystidibacter*, *Salinirepens*, *Wandonia*. **Familia Flavobacteriaceae:** *Actibacter*, *Aequorivita*, *Aestuariibaculum*, *Aestuariicola*, *Algibacter*, *Aquimarina*, *Arenibacter*, *Aureicoccus*, *Aureitalea*, *Aureivirga*, *Bergeyella*, *Bizionia*, *Capnocytophaga*, *Cellulophaga*, *Chryseobacterium*, *Cloacibacterium*, *Coenonia*, *Corallibacter*, *Costertonia*, *Croceibacter*, *Croceitalea*, *Cruoricaptor*, *Dokdonia*, *Donghaeana*, *Elizabethkingia*, *Empedobacter*, *Epilithonimonas*, *Eudoraea*, *Euzebyella*, *Flagellimonas*, *Flaviramulus*, *Flavivirga*, *Flavobacterium*, *Formosa*, *Fulvibacter*, *Gaetbulibacter*, *Gaetbulimicrobium*, *Galbibacter*, *Gangjinia*, *Gelidibacter*, *Gillisia*, *Gilvibacter*, *Gramella*, *Hyunsoonleella*, *Imtechella*, *Jejuia*, *Joostella*, *Kaistella*, *Kordia*, *Kriegella*, *Krokinobacter*, *Lacinutrix*, *Leeuwenhoekella*, *Leptobacterium*, *Lutaonella*, *Lutibacter*, *Lutimonas*, *Mangrovimonas*, *Maribacter*, *Mariniflexile*, *Marinivirga*, *Maritimimonas*, *Marixanthomonas*, *Meridianimaribacter*, *Mesoflavibacter*, *Mesonia*, *Muricauda*, *Muriicola*, *Myroides*, *Namhaeicola*, *Nonlabens*, *Olleya*, *Ornithobacterium*, *Persicivirga*, *Pibocella*, *Planobacterium*, *Polaribacter*, *Pontirhabdus*, *Postechiella*, *Pricia*, *Pseudofulvibacter*, *Pseudozobellia*, *Psychroflexus*, *Psychroserpens*, *Riemerella*, *Robiginitalea*, *Salegentibacter*, *Salinimicrobium*, *Sandarakinotalea*, *Sediminibacter*, *Sediminicola*, *Sejongia*, *Siansivirga*, *Sinomicrobium*, *Snuella*, *Soonwooa*, *Spongiibacterium*, *Stanierella*, *Stenothermobacter*, *Subsaxibacter*, *Subsaximicrobium*, *Sungkyunkwania*, *Tamlana*, *Tenacibaculum*, *Ulvibacter*, *Vitellibacter*, *Wautersiella*, *Weeksella*, *Winogradskyella*, *Yeosuana*, *Zeaxanthinibacter*, *Zhouia*.

Clase Spingobacteriia

Orden: Sphingobacteriales

Familia Sphingobacteriaceae: *Arcticibacter*, *Mucilaginibacter*, *Nubsella*, *Olivibacter*, *Parapedobacter*, *Pedobacter*, *Pseudosphingobacterium*, *Solitalea*, *Sphingobacterium*. **Familia Chitinophagaceae:** *Balneola*, *Chitinophaga*, *Ferruginibacter*, *Filimonas*, *Flaviumibacter*, *Flavisolibacter*, *Flavitalea*, *Gracilimonas*, *Hydrotalea*, *Lacibacter*, *Niabella*, *Niastella*, *Parasegetibacter*, *Sediminibacterium*, *Segetibacter*, *Terrimonas*. **Familia Saprospiraceae:** *Aureispira*, *Haliscomenobacter*, *Lewinella*, *Sapros*.

Apéndice 17. Representación de las 70 secuencias alineadas. Los bloques en negro, gris obscuro, gris claro y blanco representan el grado de homología en un 100%, $\geq 75\%$, $\geq 50\%$ y $\geq 33\%$, respectivamente.

HALOMONAS_SP.	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
DELEYA_PACIFICA	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
E-4G/1-411T	CAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	65
HALOMONAS_ELONGATAGTGCCAGCAGCC		GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	68
HALOMONAS_DENITRIFICANS	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
COBETIA_MARINAGTGCCAGCAGCC		GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	68
CHROMOHALOBACTER_SP.	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
SALINICOLA_HALOPHILUS	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
KUSHERIA_AURIANTIA	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
ZYMOBACTER_PALMAE	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
PSEUDOMONAS_SP.	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
UNCULTURED_PISCIRICKETTSIA_SP.	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
PSEUDOMONAS_FLUORESCENSGTGCCAGCAGCC		GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	68
METHYLOBACTERIUM_SP.	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
THIOMICROSPIRA_SP.GTGCCAGCAGCC		GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	68
SULFUVRIGA_CALDICURALLI	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
HYDROGENOVIBRIO_MARINUS	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
METHYLOPHAGA_THALASICA	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
UNCULTURED_METHYLOPHAGA_SP.	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
METHYLOPHAGA_MURATAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	65
E4-D/1-404CC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	58
UNCULTURED_PISCIRICKETTSIACEA_BACTERIUMCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	64
METHYLOMONAS_METHANICA	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
GLACIECOLA_MESOPHILA	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
ALTEROMONAS_LITOREA	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
AGARIVIORANS_ALBUS	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
NITROSOMONAS_EUROPEAGTGCCAGCAGCC		GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	68
HALOVIBRIO_DENITRIFICANS	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
VIBRIO_SP._(CONTROL)T	CAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	65
NITROSOPIRA_SP.	.TGACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
MICROVIRGA_AEROPHILA	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
PHAEObACTER_SP.GTGCCAGCAGCC		GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	50
NFG_12/1-411T	CAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	66
PHAEObACTER_INHIBENS_PHAEOBACTER_SP.	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
RUEGERIA_PELAGICA	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
ROSEIVIRAX_SP.	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
UNCULTURED_PELAGIBACA_SP.	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
TROPICIBACTER_NAPHTHALENIVORANS	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
LEISINGERA_AQUIMARINA	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
YANGIA_PACIFICA	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
HYPHOMONAS_OCEANITIS	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
LITORIMONAS_SP.	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
ROBIGINITALEA_BIFORMATA_SM7_13/1-409CCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	70
ANTARCTOBACTER_SP.T	CAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	66
MURICAUDA_FLAVESCENS	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
MURICAUDA_OLEARIA	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
MURICAUDA_RUESTRINGENSIS	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
CROCEITALEA_ECKLONIAE	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	76
ARENIBACTER_TROITSSENSIS	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
CELLULOPHAGA_ALGICOLA	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
MARIBACTER_SP.	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
AUREIBACTER_TUNICATORUM	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
ROSEIVIRGA_SP.	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
FABIBACTER_HALOTOLERANS	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
ROG_13/1-407T	CAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	65
ROSEIVIRGA_EHRENBERGII	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
ROSEIVIRGA_SPONGICOLA	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
REICHENBACHIELLA_SP.	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
ZOBELLIA_LAMINARIAE	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
MARIVIRGA_SP.	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
FLAVOBACTERIUM_XANTHUM	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
FULVIVIRGA_SP.	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
CYTOPHAGA_HUTCHINSONIIT	CAGCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	71
CYTOPHAGA_AURANTIACAT	CAGCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	71
FLAMMEOVIRGA_YAEYAMENSIST	CAGCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	71
FLEXITHRIX_DOROTHEAE	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
AQUIFEX_PYROPHILUS	.TAACCCGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	75
UNCULTURED_HALOBACTERIA_ARCHAEON	CAAGACCGGTGCCAGCAGCC	GGGTAATACGGAGGTTG	AGCGTT	AATCGGAATTA	CTGGGCGTA	AAGCGCGGT	76

HALOMONAS_SP.	AGGCGCTTGATRAACCGGTTGTGAAAGCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
DELEYA_PACIFICA	AGGCGCTTGATRAACCGGTTGTGAAAGCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
E-4G/1-411	AGGCGCTTGATRAACCGGTTGTGAAAGCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	143
HALOMONAS_ELONGATA	AGGCGCTTGATRAACCGGTTGTGAAAGCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	146
HALOMONAS_DENITRIFICANS	AGGCGCTTGATRAACCGGTTGTGAAAGCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
COBETIA_MARINA	AGGCGCTTAAGTACCCAGTGTGAAAGCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	146
CHROMOHALOBACTER_SP.	AGGCGCGTGTCCCGCGGTTGTGAAAGCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
SALINICOLA_HALOPHILUS	AGGCGCTTGCCACCCAGTGTGAAAGCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
KUSHERIA_AURIANTIA	AGGCGCTTGCCACCCAGTGTGAAAGCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
ZYMOBACTER_PALMAE	AGGCGCTTGCCACCCAGTGTGAAAGCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
PSEUDOMONAS_SP.	AGGCGCTTGCCACCCAGTGTGAAAGCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
UNCULTURED_PISCIRICKETTSIA_SP.	AGGCGCAAGATTAGTGTGATGTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
PSEUDOMONAS_FLUORESCENS	AGGCGCTTGTTAGTGTGATGTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	146
METHYLOBACTERIUM_SP.	AGGCGCTTGTTAGTGTGATGTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
THIOMICROSPIRA_SP.	AGGCGCACTGTTAGTGTGATGTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	146
SULFUVRIGA_CALDICURALLI	AGGCGGATTGTCRAACTGCGGTTGTGAAAGCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
HYDROGENOVIBRIO_MARINUS	AGGCGCACTGTTAGTGTGATGTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
METHYLOPHAGA_THALASICA	AGGCGCTTATTTAAGTCAATGTGAAAGCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
UNCULTURED_METHYLOPHAGA_SP.	AGGCGCATATATTAAGTCAATGTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
METHYLOPHAGA_MURATA	AGGCGCTTATTTAAGTCAATGTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	143
E4-D/1-404	AGGCGCTTATTTAAGTCAATGTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	136
UNCULTURED_PISCIRICKETTSIACEA_BACTERIUM	AGGCGCTTATTTAAGTCAATGTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	142
METHYLOMONAS_METHANICA	AGGCGCTTATTTAAGTCAATGTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
GLACIECOLA_MESOPHILA	AGGCGCTTATTTAAGTCAATGTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
ALTEROMONAS_LITOREA	AGGCGCTTATTTAAGTCAATGTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
AGARIVIVORANS_ALBUS	AGGCGCTTATTTAAGTCAATGTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
NITROSPONAS_EUROPEA	AGGCGCTTATTTAAGTCAATGTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	146
HALOVIBRIO_DENITRIFICANS	AGGCGCTTATTTAAGTCAATGTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
VIBRIO_SP._(CONTROL)	AGGCGCTTATTTAAGTCAATGTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	143
NITROSPIRA_SP.	AGGCGCTTATTTAAGTCAATGTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
MICROVIRGA_AEROPHILA	AGGCGCTTATTTAAGTCAATGTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
PHAEOBACTER_SP.	AGGCGCATTTGTAAGTGTGCGGTTGAAAGCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
NFG_12/1-411	AGGCGCATTTGTAAGTGTGCGGTTGAAAGCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	144
PHAEOBACTER_INHIBENS	AGGCGCATTTGTAAGTGTGCGGTTGAAAGCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
PHAEOBACTER_SP.	AGGCGCATTTGTAAGTGTGCGGTTGAAAGCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	57
RUEGERIA_PELAGICA	AGGCGCACTGGAAAGTTGCGGTTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
ROSEIVIVAX_SP.	AGGCGCACTGGAAAGTTGCGGTTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
UNCULTURED_PELAGIBACA_SP.	AGGCGCATTTAGAAAGTTGCGGTTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
TROPICIBACTER_NAPHTHALENIVORANS	AGGCGCACAGAAAGTTGCGGTTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
LEISINGERA_AQUIMARINA	AGGCGCACAGAAAGTTGCGGTTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
YANGIA_PACIFICA	AGGCGCACAGAAAGTTGCGGTTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	154
HYPHOMONAS_OCEANITIS	AGGCGCACTTTAAGTCAATGTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
LITHORIMONAS_SP.	AGGCGCATTAATAAGTCAATGTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
ROBIGNINITALEA_BIFORMATA	AGGCGCGCAGTAACTCAAGGTTGAAAGTTGCGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	147
SM7_13/1-409	AGGCGCGCAGTAACTCAAGGTTGAAAGTTGCGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	144
ANTARCTOBACTER_SP.	AGGCGCACAGAAAGTTGCGGTTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
MURICAUDA_FLAVESCENS	AGGCGCGCCGTTAAGTCAAGGTTGAAAGTTGCGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
MURICAUDA_OLEARIA	AGGCGCGCCGTTAAGTCAAGGTTGAAAGTTGCGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
MURICAUDA_RUESTRINGENSIS	AGGCGCGCCTGTAAGTCAAGGTTGAAAGTTGCGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	154
CROCEITALEA_ECKLONIAE	AGGCGCGCCTGTAAGTCAAGGTTGAAAGTTGCGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
ARENIBACTER_TROITSSENSIS	AGGCGCGCCTGTAAGTCAAGGTTGAAAGTTGCGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
CELLULOPHAGA_ALGICOLA	AGGCGCGCCTGTAAGTCAAGGTTGAAAGTTGCGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	154
MARIBACTER_SP.	AGGCGCGCCTGTAAGTCAAGGTTGAAAGTTGCGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
AUREIBACTER_TUNICATORUM	AGGCGCGCCTGTAAGTCAAGGTTGAAAGTTGCGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
ROSEIVIRGA_SP.	AGGCGCATCTTTAAGTCAATGTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
FABIABACTER_HALOTOLERANS	AGGCGCATCTTTAAGTCAATGTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
ROG_13/1-407	AGGCGCATCTTTAAGTCAATGTGAAATCCCGGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	143
ROSEIVIRGA_EHRENBERGII	AGGCGCGCCTTTAAGTCAATGTGAAAGTTGCGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
ROSEIVIRGA_SPONGICOLA	AGGCGCATCTTTAAGTCAATGTGAAAGTTGCGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
REICHENBACHIELLA_SP.	AGGCGCATCTTTAAGTCAATGTGAAAGTTGCGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
ZOBELLIA_LAMINARIAE	AGGCGCGCCGATAAGTCAATGTGAAAGTTGCGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
MARIVIRGA_SP.	AGGCGCATCTTTAAGTCAATGTGAAAGTTGCGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
FLAVOBACTERIUM_XANTHUM	AGGCGCATCTTTAAGTCAATGTGAAAGTTGCGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
FULVIVIRGA_SP.	AGGCGCATCTTTAAGTCAATGTGAAAGTTGCGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
CYTOPHAGA_HUTCHINSONII	AGGCGCATCTTTAAGTCAATGTGAAAGTTGCGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	149
CYTOPHAGA_AURANTIACA	AGGCGCATCTTTAAGTCAATGTGAAAGTTGCGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	149
FLAMMOVIRGA_YAEYAMENSIS	AGGCGCATCTTTAAGTCAATGTGAAAGTTGCGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
FLEXITHRIX_DOROTHEAE	AGGCGCATCTTTAAGTCAATGTGAAAGTTGCGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
AQUIFEX_PYROPHILUS	AGGCGCATCTTTAAGTCAATGTGAAAGTTGCGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	153
UNCULTURED_HALOBACTERIA_ARCHAEON	AGGCGCATCTTTAAGTCAATGTGAAAGTTGCGG	CTCAACCTGG	GAGCGCATCCGGACTGCAAGCTAGAGTGCA	155

HALOMONAS_SP.	GGA.GA.SGAAGT.SGAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGAGAT.CGGG.GGAA.TACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
DELEYA_PACIFICA	GGA.GA.SGAAGT.SGAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGAGAT.CGGG.GGAA.TACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
E-4G/1-411	GGA.GA.SGAAGT.SGAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGAGAT.CGGG.GGAA.TACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	221
HALOMONAS_ELONGATA	GGA.GA.SGAAGT.SGAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGAGAT.CGGG.GGAA.TACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	224
HALOMONAS_DENITRIFICANS	GGA.GA.SGAAGT.SGAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGAGAT.CGGG.GGAA.TACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
COBETIA_MARINA	GGA.GA.SGAAGT.SGAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGAGAT.CGGG.GGAA.TACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	224
CHROMOHALOBACTER_SP.	GGA.GA.SGAAGT.SGAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGAGAT.CGGG.GGAA.TACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
SALINICOLA_HALOPHILIUS	GGA.GA.SGAAGT.SGAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGAGAT.CGGG.GGAA.TACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
KUSHERIA_AURIANTIA	GGA.GA.SGAAGT.SGAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGAGAT.CGGG.GGAA.TACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
ZYMOBACTER_PALMAE	GGA.GA.SGAAGT.SGAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGAGAT.CGGG.GGAA.TACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
PSEUDOMONAS_SP.	GTA.GA.SGGTGT.SGAATTC.CC.TGTGACGGT.GAAATG.CTAGATAT.TAGGAGGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
UNCULTURED_PISCIRICKETTSIA_SP.	GTA.GA.SGAAGT.SGAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGAGAT.CGGG.GGAA.TACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
PSEUDOMONAS_FLUORESCENS	GTA.GA.SGGTGT.SGAATTC.CC.TGTGACGGT.GAAATG.CTAGATAT.TAGGAGGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	224
METHYLOBACTERIUM_SP.	GAA.GA.SGACAC.SGAAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGATAT.TCGGAGGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
THIOMICROSPIRA_SP.	AGA.GA.SGGAA.T.SGAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGATAT.TCGGAGGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	224
SULFUVRIGA_CALDICURALLI	GTA.GA.SGGTAC.SGAAATTC.CC.ASTGTAGCGGT.GAAATG.CTAGATAT.TAGGAGGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
HYDROGENOVIBRIO_MARINUS	AGA.GA.SGGAA.T.SGAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGATAT.TCGGAGGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
METHYLOPHAGA_THALASICA	GTA.GA.SGTGAT.SGAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGAGAT.CGGG.GGAA.TACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
UNCULTURED_METHYLOPHAGA_SP.	GTA.GA.SGTGAT.SGAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGAGAT.CGGG.GGAA.TACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
METHYLOPHAGA_MURATA	GTA.GA.SGTGAT.SGAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGAGAT.CGGG.GGAA.TACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	223
E4-D/1-404	GTA.GA.SGTGAT.SGAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGAGAT.CGGG.GGAA.TACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	214
UNCULTURED_PISCIRICKETTSIACEA_BACTERIUM	GTA.GA.SGTGAT.SGAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGAGAT.CGGG.GGAA.TACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	220
METHYLOMONAS_METHANICA	GTA.GA.SGGGAT.SGAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGAGAT.CGGG.GGAA.TACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
GLACIECOLA_MESOPHILA	GGA.GA.SGGGAT.SGAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGATAT.TCGGAGGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
ALTEROMONAS_LITOREA	GGA.GA.SGGGAT.SGAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGATAT.TCGGAGGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
AGARIVIVORANS_ALBUS	GTA.GA.SGGTGT.SGAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGAGAT.CGGG.GGAA.TACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
NITROSOMONAS_EUROPEA	GCA.GA.SGGGAT.SGAATTC.CC.TGTGACGGT.GAAATG.CTAGAGAT.CGGG.GGAA.TACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	224
HALOVIBRIO_DENITRIFICANS	GCA.GA.SGGCAT.SGAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGATAT.TCGGAGGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
VIBRIO_SP._(CONTROL)	GTA.GA.SGGGGT.SGAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGAGAT.CGGG.GGAA.TACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
NITROSOPIRA_SP.	GCA.GA.SGGGGT.SGAATTC.CC.CSTGTAGCGGT.GAAATG.CTAGAGAT.CGGG.GGAA.TACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
MICROVIRGA_AEROPHILA	GAA.GA.SGGTAA.SGAAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGATAT.TCGGAGGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
PHAEOBACTER_SP.	50
NFG_12/1-411	AGA.GA.SGTGAT.SGAATTC.CC.ASTGTAGCGGT.GAAATG.CTAGATAT.TCGGAGGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	222
PHAEOBACTER_INHIBENS_	AGA.GA.SGTGAT.SGAATTC.CC.ASTGTAGCGGT.GAAATG.CTAGATAT.TCGGAGGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
PHAEOBACTER_SP.	57
RUEGERIA_PELAGICA	AGA.GA.SGTGAT.SGAATTC.CC.ASTGTAGCGGT.GAAATG.CTAGATAT.TCGGAGGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
ROSEIVIRAX_SP.	AGA.GA.SGTGAT.SGAATTC.CC.ASTGTAGCGGT.GAAATG.CTAGATAT.TCGGAGGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
UNCULTURED_PELAGIBACA_SP.	AGA.GA.SGTGAT.SGAATTC.CC.ASTGTAGCGGT.GAAATG.CTAGATAT.TCGGAGGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
TROPICIBACTER_NAPHTHALENIVORANS	AGA.GA.SGTGAT.SGAATTC.CC.ASTGTAGCGGT.GAAATG.CTAGATAT.TCGGAGGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
LEISINGERA_AQUIMARINA	AGA.GA.SGTGAT.SGAATTC.CC.ASTGTAGCGGT.GAAATG.CTAGATAT.TCGGAGGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
YANGIA_PACIFICA	AGA.GA.SGTGAT.SGAATTC.CC.ASTGTAGCGGT.GAAATG.CTAGATAT.TCGGAGGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	232
LYPHOMONAS_OCEANITIS	GGA.GA.SGTATC.SGAAATTC.CC.ASTGTAGCGGT.GAAATG.CTAGATAT.TCGGAGGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
LITORIONAS_SP.	GGA.GA.SGTAA.T.SGAATTC.CC.ASTGTAGCGGT.GAAATG.CTAGATAT.TAGGAGGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
ROBIGINITALEA_BIFORMATA_	GGTGAA.G.TGGCC.SGAAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGATAT.CACATAGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	225
5M7_13/1-409	GGTGAA.G.TGGCC.SGAAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGATAT.CACATAGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	222
ANTARCTOBACTER_SP.	AGA.GA.SGTGAT.SGAATTC.CC.ASTGTAGCGGT.GAAATG.CTAGATAT.TCGGAGGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
MURICAUDA_FLAVESCENS	GGTGGG.G.TGGCC.SGAAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGATAT.CACATAGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
MURICAUDA_OLEARIA	GGTGGG.G.TGGCC.SGAAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGATAT.CACATAGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
MURICAUDA_RUESTRINGENSIS	GGTGGG.G.TGGCC.SGAAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGATAT.CACATAGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	233
CROCEITALEA_EKLONIAE	GGTGGG.G.TGGCC.SGAAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGATAT.CACATAGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
ARENIBACTER_TROITSSENSIS	GGTGAAG.TAACTA.SGAAATTC.CC.ASTGTAGCGGT.GAAATG.CTAGATAT.TACATAGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
CELLULOPHAGA_ALGICOLA	AGTGAAG.TGGCTA.SGAAATTC.CC.ASTGTAGCGGT.GAAATG.CTAGATAT.TACTTAGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	232
MARIBACTER_SP._	GGTGAAG.TGGCC.SGAAATTC.CC.ASTGTAGCGGT.GAAATG.CTAGATAT.TACATAGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
AUREIBACTER_TUNICATORUM	GTGAAG.G.TAGCC.SGAAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGATAT.CCAGT.GAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
ROSEIVIRGA_SP.	CTAGAG.G.TAGCC.SGAAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGATAT.CCAGT.GAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
FABIBACTER_HALOTOLERANS	CTAGAG.G.TAGCC.SGAAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGATAT.CCAGT.GAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
ROG_13/1-407	CTAGAG.G.TAGCC.SGAAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGATAT.CCAGT.GAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	221
ROSEIVIRGA_EHRENBERGII	CTAAGG.G.TAGCC.SGAAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGATAT.CCAGT.GAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
ROSEIVIRGA_SPONGICOLA	CTAGAG.G.TAGCC.SGAAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGATAT.CCAGT.GAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
REICHENBACHIELLA_SP.	GTGAGG.G.CAGC.SGAAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGATAT.CCAGT.GAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
ZOBELLIA_LAMINARIAE	AGTGAAG.TGGCC.SGAAATTC.CC.ASTGTAGCGGT.GAAATG.CTAGATAT.TACATAGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
MARIVIRGA_SP._	GTGAA.G.TAGCC.SGAAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGATAT.CCAGT.GAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
FLAVOBACTERIUM_XANTHUM	TAGGAAG.TAACTA.SGAAATTC.CC.ASTGTAGCGGT.GAAATG.CTAGATAT.TACATAGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
FULVIVIRGA_SP.	GACGAG.G.TAGCC.SGAAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGATAT.CCAGT.GAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
CYTOPHAGA_HUTCHINSONII	GATGAG.G.TAGCC.SGAAATTC.CC.ASTGTAGCGGT.GAAATG.CTAGATAT.TGTAGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	227
CYTOPHAGA_AURANTIACA	GTGAGG.G.TAGCC.SGAAATTC.CC.ASTGTAGCGGT.GAAATG.CTAGATAT.TGTAGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	227
FLAMMEOVIRGA_YAEYAMENSIS	GTATGG.G.TAGCC.SGAAATTC.CC.CATGTAGCGGT.GAAATG.CTAGATAT.TAGGAGGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
FLEXITHRIX_DOROTHEAE	GTAGAG.G.TGGCC.SGAAATTC.CC.CATGTAGCGGT.GAAATG.CTAGATAT.TCGGAGGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
AQUIFEX_PYROPHILUS_	GCCCAG.G.CAGC.SGAAATTC.CC.GGTGACGGT.GAAATG.CTAGATAT.CGGG.GGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	231
UNCULTURED_HALOBACTERIA_ARCHAEON	GAA.GACCCAGAGG.TTCCTCC.CGGT.GTAGCGGT.GAAATG.CTAGATAT.CCTGGAGGAA.CACCAGT.GCGGAAGGG.GSCTT	233

HALOMONAS_SP.	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
DELEYA_PACIFICA	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
E-4G/1-411	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	301
HALOMONAS_ELONGATA	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	304
HALOMONAS_DENITRIFICANS	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
COBETIA_MARINA	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	304
CHROMOHALOBACTER_SP.	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
SALINICOLA_HALOPHILUS	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
KUSHERIA_AURIANTIA	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
ZYMOBACTER_PALMAE	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
PSUDOMONAS_SP.	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
UNCULTURED_PISCIRICKETTSIA_SP.	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
PSUDOMONAS_FLUORESCENS	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	304
METHYLOBACTERIUM_SP.	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
METHYLOBACTERIUM_SP.	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
THIOMICROSPIRA_SP.	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	304
SULFUVRIGA_CALDICURALLI	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
HYDROGENOVIBRIO_MARINUS	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
METHYLOPHAGA_THALASICA	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
UNCULTURED_METHYLOPHAGA_SP.	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
METHYLOPHAGA_MURATA	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	302
E4-D/1-404	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	294
UNCULTURED_PISCIRICKETTSIACEA_BACTERIUM	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	300
METHYLOMONAS_METHANICA	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
GLACIECOLA_MESOPHILA	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
ALTEROMONAS_LITOREA	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
AGARIIVORANS_ALBUS	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
NITROSOMONAS_EUROPEA	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	304
HALOVIBRIO_DENITRIFICANS	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
VIBRIO_SP._(CONTROL)	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	301
NITROSOPIRA_SP.	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
MICROVIRGA_AEROPHILA	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
PHAEOBACTER_SP.	CTGGACTGACACTGACACTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
NFG_12/1-411	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	68
PHAEOBACTER_INHIBENS	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	302
PHAEOBACTER_SP.	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	57
RUEGERIA_PELAGICA	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
ROSEIVIVAX_SP.	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
UNCULTURED_PELAGIBACA_SP.	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
TROPICIBACTER_NAPHTHALENIVORANS	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
LEISINGERIA_AQUIMARINA	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
YANGIA_PACIFICA	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	312
HYPHOMONAS_OCEANITIS	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
LITORIMONAS_SP.	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
ROBIGNINITALEA_BIFORMATA	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	305
5M7_13/1-409	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	302
ANTARCTOBACTER_SP.	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
MURICAUDA_FLAVESCENS	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
MURICAUDA_OLEARIA	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
MURICAUDA_RUESTRINGENSIS	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	312
CROCEITALEA_ECKLONIAE	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
ARENIBACTER_TROITSSENSIS	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
CELLULOPHAGA_ALGICOLA	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	312
MARIBACTER_SP.	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
AUREIBACTER_TUNICATORUM	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
ROSEIVIRGA_SP.	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
FABIBACTER_HALOTOLERANS	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
ROG_13/1-407	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	301
ROSEIVIRGA_EHRENBERGII	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
ROSEIVIRGA_SPONGICOLA	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
REICHENBACHIELLA_SP.	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
ZOBELLIA_LAMINARIAE	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
MARIVIRGA_SP.	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
FLAVOBACTERIUM_XANTHUM	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
FULVIVIRGA_SP.	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
CYTOPHAGA_HUTCHINSONII	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	307
CYTOPHAGA_AURANTIACA	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	307
FLAMMEOVIRGA_YAEYAMENSIS	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
FLEXITHRIX_DOROTHEAE	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
AQUIFEX_PYROPHILUS	CTGGCTCGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	311
UNCULTURED_HALOBACTERIA_ARCHAEO	GGAAGACGGATCTGACGCTGAGCGTGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACG	313

HALOMONAS_SP.	ATGTCGACACCCGTGGTGCC..TAGCGC...ACCTTAGCGCGAAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	386
DELEYA_PACIFICA	ATGTCGCGTACCCGTGGGTCC..TTGAGA...CCCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	386
E-4G/1-411	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TCGAGA...CCCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	376
HALOMONAS_ELONGATA	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TCGAGA...CCCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	379
HALOMONAS_DENITRIFICANS	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGA...CCCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	386
COBETTIA_MARINA	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGA...CCCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	379
CHROMOHALOBACTER_SP.	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	386
SALINICOLA_HALOPHILUS	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	386
KUSHERIA_AURIANTIA	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	386
ZYMOBACTER_PALMAE	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	386
PSEUDOMONAS_SP.	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	386
UNCULTURED_PISCIRICKETTSIA_SP.	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	388
PSEUDOMONAS_FLUORESCENS	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	379
METHYLOBACTERIUM_SP.	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	385
THIOMICROSPIRA_SP.	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	380
SULFUVRIGA_CALDICRALLI	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	387
HYDROGENOVIBRIO_MARINUS	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	387
METHYLOPHAGA_THALASICA	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	387
UNCULTURED_METHYLOPHAGA_SP.	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	386
METHYLOPHAGA_MURATA	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	378
E4-D/1-404	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	370
UNCULTURED_PISCIRICKETTSIACEA_BACTERIUM	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	375
METHYLOMONAS_METHANICA	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	386
GLACIIBCOLA_MESOPHILA	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	386
ALTEROMONAS_LITOREA	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	387
AGARIVIVORANS_ALBUS	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	386
NITROSOMONAS_EUROPEA	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	380
HALOVIBRIO_DENITRIFICANS	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	386
VIBRIO_SP._(CONTROL)	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	376
NITROSPIRA_SP.	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	385
MICROVIRGA_AEROPHILA	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	385
PHAEOBACTER_SP.	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	107
NFG 12/1-411	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	376
PHAEOBACTER_INHIBENS_	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	385
PHAEOBACTER_SP.	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	57
RUEGERIA_PELAGICA	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	385
ROSEIVIVAX_SP.	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	385
UNCULTURED_PELAGIBACA_SP.	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	385
TROPICIBACTER_NAPHTHALENIVORANS	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	385
LEISINGERA_AQUIMARINA	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	385
YANGIA_PACIFICA	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	386
HYPHOMONAS_OCEANITIS	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	385
LITORIMONAS_SP.	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	385
ROBIGINITALEA_BIFORMATA_	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	377
SM7 13/1-409	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	374
ANTARCTOBACTER_SP.	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	385
MURICAUDA_FLAVESCENS	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	383
MURICAUDA_OLEARIA	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	382
MURICAUDA_RUESTRINGENSIS	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	384
CROCEITALEA_ECKLONIAE	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	383
ARENIBACTER_TROITSSENSIS	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	383
CELLULOPHAGA_ALGICOLA	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	384
MARIBACTER_SP.	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	386
AUREIBACTER_TUNICATORUM	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	383
ROSEIVIRGA_SP.	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	377
FABIIBACTER_HALOTOLERANS	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	383
ROG 13/1-407	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	373
ROSEIVIRGA_EHRENBERGII	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	383
ROSEIVIRGA_SPONGICOLA	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	383
REICHENBACHIELLA_SP.	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	384
ZOBELLIA_LAMINARIAE	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	386
MARIVIRGA_SP.	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	383
FLAVOBACTERIUM_XANTHUM	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	381
FULVIVIRGA_SP.	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	383
CYTOPHAGA_HUTCHINSONII	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	379
CYTOPHAGA_AURANTIACA	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	379
FLAMMEOVIRGA_YAEYAMENSIS	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	383
FLEXITHRIX_DOROTHEAE	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	383
AQUIIFEX_PYROPHILUS	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	382
UNCULTURED_HALOBACTERIA_ARCHAEON	ATGTCGACTACCCGTGGGTCC..TTGAGG...ACCTTAGCGCGAGTTAACCGGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTAC	392

HALOMONAS SP.	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGA	5	416
DELEYA PACIFICA	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	5	431
E-4G/1-411	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGA	1	411
HALOMONAS ELONGATA	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	5	416
HALOMONAS DENITRIFICANS	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	5	431
COBETIA MARINA	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	5	416
CHROMOHALOBACTER SP.	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	5	431
SALINICOLA HALOPHILUS	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	5	431
KUSERIA AURIANTIA	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	5	431
ZYMOBACTER PALMAE	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	5	431
PSEUDOMONAS SP.	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	5	431
UNCULTURED PISCIRICKETTSIA SP.	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	7	433
PSEUDOMONAS FLUORESCENS	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	5	416
METHYLOBACTERIUM SP.	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	4	430
THIOMICROSPIRA SP.	G						1	381
SULFUUVIRGA CALDICURALLI	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	5	432
HYDROGENOVIBRIO MARINUS	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	5	432
METHYLOPHAGA THALASICA	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	5	432
UNCULTURED METHYLOPHAGA SP.	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCAC	5	429
METHYLOPHAGA MURATA	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	G.....	5	416
E4-D/1-404	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGA	4	404
UNCULTURED PISCIRICKETTSIACEA BACTERIUM	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GC...	4	416
METHYLOMONAS METHANICA	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	5	431
GLACIECOLA MESOPHILA	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	5	431
ALTEROMONAS LITOREA	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	5	432
AGARIVIORANS ALBUS	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	4	430
NITROSOMONAS EUROPEA	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	7	417
HALOVIBRIO DENITRIFICANS	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	5	431
VIBRIO SP. (CONTROL)	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGA	1	411
NITROSOPIRA SP.	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	4	430
MICROVIRGA AEROPHILA	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	4	430
PHAEOBACTER SP.	G						7	107
NFG 12/1-411	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGA	1	411
PHAEOBACTER INHIBENS	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	4	430
PHAEOBACTER SP.	G						7	57
RUEGERIA PELAGICA	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	4	430
ROSEIVIVAX SP.	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	4	430
UNCULTURED PELAGIBACA SP.	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	4	430
TROPICIBACTER NAPHTHALENIVORANS	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	4	430
LEISINGERA AQUIMARINA	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	4	430
YANGIA PACIFICA	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	5	431
HYPHOMONAS OCEANITIS	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	4	430
LITORIMONAS SP.	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	4	430
ROBIGINITALA BIFORMATA	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	5	416
5M7_13/1-409	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGA	9	409
ANTARCTOBACTER SP.	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	4	430
MURICAUDA FLAVESCENS	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	2	428
MURICAUDA OLEARIA	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	1	427
MURICAUDA RUESTRINGENSIS	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	3	429
CROCEITALA ECKLONIAE	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	2	428
ARENIBACTER TROITSSENSIS	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	2	428
CELLULOPHAGA ALGICOLA	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	3	429
MARIBACTER SP.	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	5	431
AUREIBACTER TUNICATORUM	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	2	428
ROSEIVIRGA SP.	G						7	377
FABIBACTER HALOTOLERANS	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	2	428
ROG 13/1-407	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGA	7	407
ROSEIVIRGA EHRENBERGII	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	2	428
ROSEIVIRGA SPONGICOLA	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	2	428
REICHENBACHIELLA SP.	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	3	429
ZOBELLIA LAMINARIAE	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	3	431
MARIVIRGA SP.	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	2	428
FLAVOBACTERIUM XANTHUM	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	0	426
FULVIVIRGA SP.	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	2	428
CYTOPHAGA HUTCHINSONII	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	5	416
CYTOPHAGA AURANTIACA	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	5	416
FLAMMEOVIRGA YAEMYENSIS	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	2	428
FLEXITHRIX DOROTHAE	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	2	428
AQUIFEX PYROPHILUS	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	GCACAA	1	427
UNCULTURED HALOBACTERIA ARCHAEO	GC	CGCAAG	GT	AAAACTCAAA	TGAA	TTGACGGGGGCC	ACTACA	1	437