

11418710



TD



**REVISION TAXONOMICA DEL GENERO *AGROMYCES* GLEDHILL
Y CASIDA, 1969, Y DESCRIPCION DE NUEVAS ESPECIES
AISLADAS DE AMBIENTES HIPOGEOS**

Memoria presentada por la Lda. VALME JURADO LOBO
para optar al grado de Doctor en Biología

Fdo. Valme Jurado Lobo



Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral **Revisión taxonómica del género *Agromyces* Gledhill y Casida, 1969, y descripción de nuevas especies aisladas de ambientes hipogeos**

Sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de usuarios.
- Otros términos.

Firmado:

Sevilla, a 3 de octubre de 2006

REVISION TAXONOMICA DEL GENERO *AGROMYCES* GLEDHILL Y
CASIDA, 1969, Y DESCRIPCION DE NUEVAS ESPECIES AISLADAS
DE AMBIENTES HIPOGEOS

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 092 número 99 del libro
correspondiente.

Sevilla, 31-05-05

El Jefe del Negociado de Tesis.

Francisco Gálvez

Mai

EL DIRECTOR

Prof. Dr. D. Cesáreo Sáiz Jiménez
Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

María Tortolero

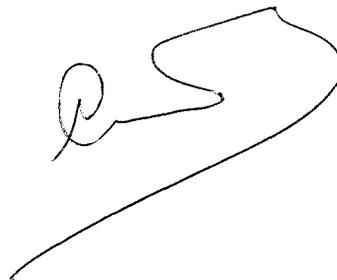
LA TUTORA

Prof. Dra. Dña. María Tortolero García.
Profesora Titular de Microbiología de la Universidad de Sevilla

2005

DOCTOR D. LUIS CLEMENTE SALAS, DIRECTOR DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGIA DE SEVILLA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

CERTIFICA: Que la presente Memoria de Investigación titulada **“REVISION TAXONOMICA DEL GENERO *AGROMYCES* GLEDHILL Y CASIDA, 1969, Y DESCRIPCION DE NUEVAS ESPECIES AISLADAS DE AMBIENTES HIPOGEOS”**, presentada por Dña. Valme Jurado Lobo para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizada en el Departamento de Biogeoquímica y Dinámica de Contaminantes, bajo la dirección del Prof. Dr. D. Cesáreo Sáiz Jiménez, reuniendo todas las condiciones exigidas a los trabajos de Tesis Doctorales



En Sevilla, a mayo de 2005

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al profesor Dr. D. Cesáreo Sáiz Jiménez por su dirección y asesoramiento, gracias a los cuales ha sido posible la realización de la investigación y elaboración de esta Tesis así como por la confianza depositada en mí.

Al Dr. D. Juan Miguel González Grau por su disposición permanente y apoyo que resultaron fundamentales para la realización de este trabajo.

Al Consejo Superior de Investigaciones Científicas por permitir la realización de este trabajo en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, y por la concesión de una beca predoctoral a cargo del Programa I3P.

A la Dra. Ingrid Groth por su constante apoyo y hospitalidad en el Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung, Jena, durante 3 meses.

A la Dra. Ludmila Evtushenko por sus recomendaciones y su amabilidad al darme a conocer la bibliografía de *Agromyces* publicada en su país.

Al Dr. Bernardo Hermosín Campos por compartir su experiencia en técnicas cromatográficas.

Al Dr. Sergio Sanchez y a Soledad Cuezva por su colaboración en este trabajo.

A todos mis compañeros del grupo de Patrimonio: Leonila Laiz, María del Carmen Portillo, María Gaviño, Bernardo Hermosín, Alberto Ortiz, Miguel Rogerio, Johannes Zimmerman, Manuel González, Javier Reyes, por su apoyo y colaboración, y por hacerme sentir entre amigos desde el primer momento.

Al personal administrativo, técnico y científico del IRNAS, quienes facilitaron mi labor en todo momento.

Y muy especialmente a mi familia y a Claudio por su apoyo constante y la enorme paciencia que han demostrado conmigo.

INDICE

CAPITULO 1: MICROBIOLOGIA DE AMBIENTES HIPOGEOS	13-28
1.1. Ecología microbiana en ambientes hipogeos	18-23
1.2. Objetivo de la tesis	23-23
1.3. El género <i>Agromyces</i>	24-27
CAPITULO 2: MATERIALES Y METODOS	29-82
2.1. Muestreo	31-35
2.2. Tratamiento de las muestras	35-37
2.3. Pruebas morfológicas y fisiológicas	37-50
2.3.1. Caracterización morfológica	
2.3.2. Caracterización del cultivo	
2.3.3. Caracterización bioquímica	
2.4. Pruebas quimiotaxonómicas	50-58
2.4.1. Composición de la pared celular	
2.4.2. Lípidos	
2.4.3. Azúcares totales	
2.5. Pruebas moleculares	58-65
2.6. Medios de cultivo	66-73
2.7. Reactivos y solventes	73-75
2.8. Soluciones y tampones	76-81
CAPITULO 3: RECLASIFICACION DE <i>AGROMYCES FUCOSUS</i> SUBESP. <i>HIPPURATUS</i> COMO <i>AGROMYCES HIPPURATUS</i> Y NUEVA DESCRIPCION DE <i>AGROMYCES FUCOSUS</i>	83-92
3.1. Descripción de la nueva especie <i>Agromyces hippuratus</i>	90-91
3.2. Descripción revisada de <i>Agromyces fucosus</i>	91-92

CAPITULO 4: AGROMYCES DE LA CUEVA DE LOS CIERVOS	93-108
4.1. Descripción de <i>Agromyces salentinus</i>	103-105
4.2. Descripción de <i>Agromyces neolithicus</i>	105-107
CAPITULO 5: AGROMYCES DE LA CATACUMBA DE DOMITILA	109-128
5.1. Descripción de <i>Agromyces italicus</i>	120-122
5.2. Descripción de <i>Agromyces humatus</i>	xxx-xxx
5.3. Descripción de <i>Agromyces lapidis</i>	xxx-xxx
CAPITULO 6: AGROMYCES DE LA CUEVA DE LOS MURCIELAGOS	129-140
6.1. Descripción de <i>Agromyces subbeticus</i>	138-140
CAPÍTULO 7: DESCRIPCION MODIFICADA DEL GENERO AGROMYCES (EX ZGURSKAYA Y COL., 1992)	141-150
CAPITULO 8: BIOMINERALIZACIÓN CAUSADA POR AGROMYCES	151-158
CAPITULO 9: CONCLUSIONES GENERALES	159-162
ABSTRACT	163-178
BIBLIOGRAFÍA	179-198

Esta tesis está basada en las siguientes publicaciones:

- Capítulo 3 Ortiz-Martinez, A., Gonzalez, J.M., Evtushenko, L.I., **Jurado, V.**, Laiz, L., Groth, I. y Saiz-Jimenez, C. (2004).
International Journal Systematic Evolutionary Microbiology
54: 1553-1556.
- Capítulo 4 **Jurado, V.**, Groth, I., Gonzalez, J.M., Laiz. L. y Saiz-Jimenez, C. (2005).
International Journal Systematic Evolutionary Microbiology
55: 153-157.
- Capítulo 5 **Jurado, V.**, Groth, I., Gonzalez, J.M., Laiz. L., Schuetze, B. y Saiz-Jimenez, C. (2005).
International Journal Systematic Evolutionary Microbiology
55: 871-875.
- Capítulo 6 **Jurado, V.**, Groth, I., Gonzalez, J.M., Laiz. L. y Saiz-Jimenez, C. (2005).
International Journal Systematic Evolutionary Microbiology
(en prensa).
- Capítulo 8 Sanchez-Moral, S., Bedoya, J., Luque, L., Cañaveras, J.C., **Jurado, V.**, Laiz, L. y Saiz-Jimenez, C. (2003).
En C. Saiz-Jimenez (ed), *Molecular Biology and Cultural Heritage*. Balkema, Lisse, pp. 179-185.
- Sanchez-Moral, S., Luque, L., Cañaveras, J.C., Laiz, L., **Jurado, V.**, Hermosin, B. y Saiz-Jimenez, C. (2004).
Annals of Microbiology 54: 1-12.

CAPITULO 1
MICROBIOLOGIA DE AMBIENTES HIPOGEOS

MICROBIOLOGIA DE AMBIENTES HIPOGEOS

En los últimos años se ha dedicado una atención especial a procesos de biodeterioro derivados del crecimiento de microorganismos en ambientes hipogeos (Albertano y col., 2000; Laiz y col., 2000; Groth y col., 2001; Schabereiter-Gurtner y col., 2002; Urzì y col., 2003; Sanchez-Moral y col., 2005). La amplia distribución de asentamientos arqueológicos en el Sur de Europa, y su gran importancia artística, cultural y religiosa, enfatizan el impacto social que el daño biológico pudiera provocar en sus obras de arte.

Los ambientes hipogeos, del que forman parte las cuevas con pinturas rupestres, necrópolis y catacumbas, se caracterizan por tener temperaturas relativamente bajas y constantes a lo largo del año, elevada humedad relativa, ser relativamente pobres en nutrientes orgánicos, y estar sometidos a una iluminación tenue o nula. Los sistemas de iluminación artificial son utilizados en cuevas, catacumbas y necrópolis para permitir la observación de las pinturas, frescos, estucos y mármoles de alto interés histórico, artístico y turístico (Ariño

y col., 1997; Ghiorse, 1997; Pantazidou y col., 1997; Albertano y Urzì, 1999; Groth y Saiz-Jimenez, 1999)

Recientemente ha habido una serie de trabajos donde se demuestra la existencia de una alta diversidad de microorganismos en estos ambientes (Groth y col., 1999a, 2001; Schabereiter y col., 2002a,b). En estos trabajos se han utilizado técnicas moleculares y microbiológicas permitiendo identificar y caracterizar los microorganismos.

Las técnicas moleculares basadas en la amplificación del ADN, generalmente del gen de ARN ribosómico 16S (Gonzalez, 2003) son valiosas herramientas para caracterizar comunidades microbianas permitiendo detectar los microorganismos sin necesidad de cultivarlos (Rheims y col., 1996; Piñar y col., 2003).

Sin embargo, las técnicas moleculares no proporcionan ningún tipo de información sobre las características fisiológicas y de ahí, la importancia de emplear técnicas microbiológicas que requieran el cultivo de los microorganismos. Estas técnicas de cultivo permiten estudiar las actividades metabólicas de los microorganismos y evaluar el papel que estos microorganismos juegan en la naturaleza (Piñar y col., 2002).

Como ejemplo, en la Cueva de Altamira se identificaron diferentes grupos bacterianos dependiendo del método empleado (Figuras 1.1.A, 1.1.B). Por tanto, la aplicación conjunta de técnicas moleculares y microbiológicas convencionales es muy útil para el estudio de comunidades microbianas en ambientes hipogeos, ya que ambas técnicas se complementan obteniéndose una mayor información sobre la biodiversidad microbiana de estos ambientes (Gurtner y col., 2000; Laiz y col., 2003).

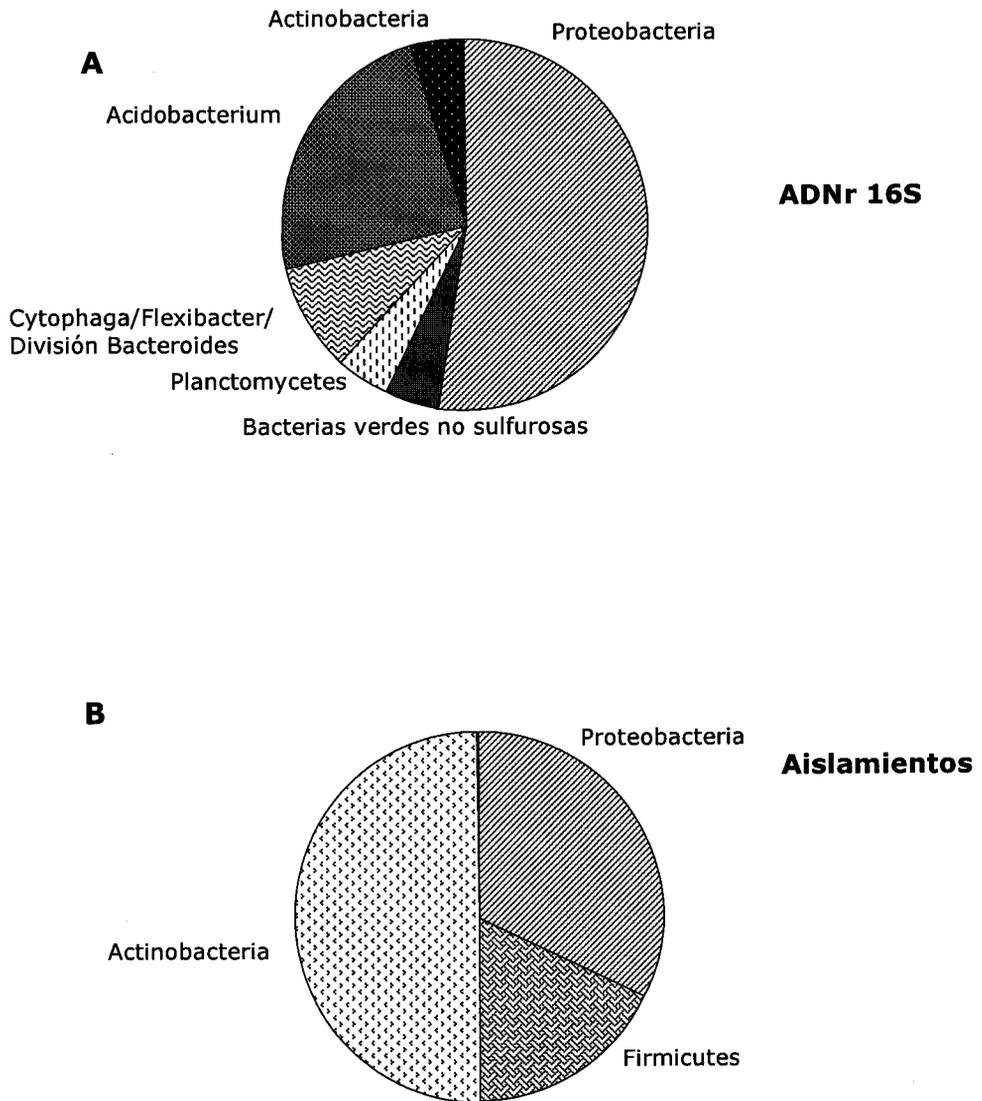


Fig. 1.1. Comparación de grupos bacterianos obtenidos mediante métodos moleculares independientes de cultivo (A) y métodos microbiológicos dependientes de cultivos (B) en la Cueva de Altamira, Cantabria, España.

1.1. ECOLOGIA MICROBIANA EN AMBIENTES HIPOGEOS

En los ambientes hipogeos, el desarrollo de *biofilms* está favorecido por una circulación limitada de aire, una temperatura estable a lo largo del año, y un elevado nivel de humedad. Estos *biofilms* están compuestos por una gran variedad de microorganismos entre los que podemos mencionar algas y cianobacterias. Los microorganismos fotosintéticos se desarrollan debido a la utilización de lámparas artificiales. La disponibilidad de materia orgánica producida por las cianobacterias fotosintéticas y la fijación de N₂ soportan el crecimiento de microorganismos asociados (bacterias y hongos). Este desarrollo contribuye de una manera sinérgica al establecimiento de *biofilms*, fomentando un aumento de la actividad biológica sobre la superficie colonizada (Urzi, 1993; Albertano y Urzi, 1999). Las bacterias y hongos, generalmente son capaces de utilizar la materia orgánica producida por los microorganismos fotótrofos. A su vez, los productos metabólicos de microorganismos heterótrofos suelen estar caracterizados por ácidos orgánicos de bajo peso molecular que pueden llevar a la solubilización progresiva de los minerales del sustrato (Warsheid y Braams, 2000). En ambientes hipogeos, generalmente, la intensidad de la colonización disminuye desde la entrada hacia el interior de las galerías y túneles. El principal efecto negativo es la proliferación primaria de microorganismos fotótrofos tales como cianobacterias y algas verdes, musgos, y algunas plantas cerca de las fuentes de luz (Albertano y col., 1994; Hernández-Mariné y Canals, 1994; Ariño y col., 1996, 1997; Pantazidou, 1997; Hernández-Mariné y col., 2001). Aunque la irradiación disponible para la actividad fotosintética en ambientes hipogeos suele ser baja, el crecimiento de microorganismos fotótrofos continúa debido a que son capaces de aclimatarse a estas condiciones al ajustar la fotosíntesis y pigmentos a la composición espectral y a la intensidad de luz existente (Albertano y col., 1991; Bruno y Albertano, 1999). Debido a esta capacidad de adaptación, las cianobacterias son uno de los microorganismos responsables de la formación de *biofilms* en

catacumbas (Albertano y col., 2003) a las que se asocian bacterias heterótrofas, además de otros organismos como algas verdes, diatomeas, y musgos.

El establecimiento de una microflora heterótrofa sobre superficies rocosas es también posible sin la participación de organismos fotótrofos. En este caso los microorganismos utilizarían materia orgánica presente en morteros, frescos y paredes de cuevas con unas condiciones microclimáticas estables (humedad y temperatura) que caracterizan los ambientes hipogeos (Albertano y Urzì, 1999). La deposición de partículas y compuestos orgánicos volátiles sobre la superficie de piedras, como resultado de la contaminación atmosférica, por ejemplo como la biomasa orgánica contribuyen un suplemento nutritivo (Palmer y col., 1991). Las comunidades microbianas de las cuevas y catacumbas normalmente dependen de la entrada de materia orgánica que es transportada desde la superficie disuelta en el agua de infiltración. El contenido de carbono orgánico en las aguas de goteo de algunas cuevas, como la de Altamira (Santillana del Mar, Cantabria, España), es variable, desde <5 mg C/litro a 2200 mg C/litro, dependiendo de las estaciones del año. En esta, la materia orgánica disuelta en el suelo, contiene ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y productos de la degradación de la lignocelulosa (Groth y Saiz-Jimenez, 1999; Laiz y col., 1999). Sin embargo, en la Cueva de los Ciervos (Porto Badisco, Italia) la entrada de materia orgánica es más elevada debido a los excrementos de los murciélagos. Los excrementos se distribuyen por toda la cueva apareciendo a veces como áreas negras o manchas en las paredes y en el suelo. Por el contrario, en esta cueva el agua contiene bajos niveles de materia orgánica disuelta como se deduce de la escasa vegetación del suelo que está por encima de la cueva y la percolación del agua a través de 15 m de roca (Laiz y col., 2000; Groth y col., 2001).

En las catacumbas romanas de San Calixto y Santa Domitila, las aguas están enriquecidas en nitratos procedentes de los suelos

agrícolas que están por encima de las catacumbas y que fácilmente se infiltran a través de los diferentes materiales volcánicos que constituyen las catacumbas (Sanchez-Moral y col., 2005).

Un ejemplo del crecimiento de microorganismos heterótrofos en ausencia de organismos fotótrofos, lo tenemos en la Cueva de los Ciervos (Laiz y col., 2000; Groth y col., 2001). En esta cueva, las cianobacterias y algas están ausentes debido a la falta de luz, sin embargo, las actinobacterias han colonizado prácticamente toda la cueva, se les encuentra en las estalactitas activas, sobre y bajo las paredes de las rocas, y en los suelos de la cueva. Este crecimiento se sostiene por la presencia de materia orgánica procedente de los excrementos de los murciélagos distribuidos por toda la cueva.

Hoy en día, se cree que las actinobacterias, están implicadas en la formación de *biofilms* y pueden causar cambios significativos en las propiedades físico-químicas de la estructura mineral (Warscheid y Braams, 2000). Debido a su amplio espectro de utilización de nutrientes son capaces de crecer utilizando compuestos difíciles de degradar como hidrocarburos aromáticos y alifáticos (Saiz-Jimenez, 1997; Zanardini y col., 2000), macromoléculas complejas como la lignina (Ball y col., 1989) y sustancias húmicas (Groth y Saiz-Jimenez, 1999).

La primera evidencia que las actinobacterias eran "agentes biodeteriorantes" fue presentada por el Instituto Central de la Restauración (ICR, Italia) en los años 60. El papel de actinobacterias en el deterioro de los frescos en los ambientes hipogeos fue señalado por Agarossi y col. (1985), Giacobini y col. (1988), y Monte y Ferrari (1993).

Agarossi y col. (1985) estudiaron la Basílica subterránea neopitagórica de Porta Maggiore en Roma (siglo I d.C.). La basílica, descubierta en 1917, tiene una de las colecciones más relevantes de estucos decorativos del mundo romano. Los estucos fueron dañados

por las continuas aguas de goteo y las vibraciones causadas por un ferrocarril cercano. También encontraron un pronunciado biodeterioro de la superficie del estuco, donde los organismos cultivables más abundantes fueron *Streptomyces*, con micelio blanco, y *Nocardia*. Los autores correlacionaron la frecuencia de algunos grupos de microorganismos con la alta humedad. En lugares con niveles más bajos de humedad, el contenido de actinobacterias fue más bajo y los colonizadores diferían de los encontrados en otros lugares húmedos. Los colonizadores primarios, las bacterias que oxidan el azufre comenzaban a atacar las paredes del estuco, favoreciendo el desarrollo de actinobacterias y hongos, que causaron la formación de capas inestables y eflorescencias blancas.

Giacobini y col. (1988) describieron una serie de daños en los frescos de ambientes subterráneos y aislaron alrededor de 200 cepas de actinobacterias de las pinturas murales localizadas en criptas, cuevas y tumbas, pero solo 60 fueron clasificadas debido a dificultades taxonómicas. Las especies más frecuentes pertenecían al género *Streptomyces* y algunas del género *Nocardia*.

Monte y Ferrari (1993) consideraron que la colonización por microorganismos de pinturas murales fue el resultado selectivo, competitivo e inhibitorio entre los diferentes microorganismos bajo distintas condiciones ambientales. Los pigmentos excretados por algunas actinobacterias eran los responsables del color violeta encontrado en las paredes de las tumbas de Tarquinia, Italia (Agarossi, 1992). Se observaron cepas similares en una de las tumbas de la Necrópolis de Carmona (Mausoleo Circular), en la que se aisló una cepa de *Streptomyces* productora de pigmentos violetas (datos no publicados).

Pantazidou y col., (1997) encontraron que la microflora que coloniza las rocas de la Catacumba de Milos consistía en hongos, donde abundaban las especies de *Penicillium* y *Fusarium*, bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Streptomyces*, y cianobacterias.

Las especies de *Streptomyces* se encontraron en las muestras de mortero y restos de la decoración del fresco. Estos autores (Pantazidou y col., 1997) también mostraron la capacidad de las cepas aisladas de *Streptomyces* para solubilizar carbonato cálcico y producir ácidos orgánicos.

Laiz y col. (1999) estudiaron la microbiología de las aguas de goteo de la Cueva de Altamira y comprobaron que las comunidades microbianas estaban compuestas por un 27% de bacterias Gram-positivas y un 73% de bacterias Gram-negativas (principalmente coliformes). La alta humedad (>95%), temperatura relativamente baja y estable (alrededor de 13°C) y pH del agua cercano a la neutralidad se cree fueron los factores que influyeron en la viabilidad de las bacterias y que favorecieron el crecimiento de actinobacterias en las superficies de las paredes de las cuevas sobre otras bacterias heterótrofas presentes en las aguas de goteo.

Groth y col. (1999a) investigaron el crecimiento de las actinobacterias en dos cuevas kársticas españolas con arte rupestre, las Cuevas de Altamira y de Tito Bustillo. Se identificaron aproximadamente 350 actinobacterias mediante métodos morfológicos, fisiológicos y quimiotaxonómicos en la Cueva de Altamira. La mayoría de las actinobacterias que crecían en la superficie rocosa del techo y paredes eran colonias de 1 a 10 mm de diámetro visibles a simple vista. Los géneros *Amycolatopsis*, *Aureobacterium*, *Brevibacterium*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, y la familia *Micrococcaceae* estaban bien representados. En la Cueva de Tito Bustillo, la superficie de la roca estaba colonizada por un gran número de colonias pequeñas, amarillas o blancas, de aproximadamente 1 a 2 mm. Los aislamientos encontrados en las paredes pertenecieron fundamentalmente al género *Streptomyces*.

Un estudio de las bacterias que colonizan las estalactitas de la Cueva de los Ciervos (Laiz y col., 2000) dieron lugar a resultados similares a los encontrados en la investigación de Groth y col. (1999a)

en cuevas españolas. De hecho, se aislaron especies de *Agromyces*, *Amycolatopsis*, *Arthrobacter*, *Nocardiosis*, *Rhodococcus*, y *Streptomyces*. Posteriormente, Groth y col. (2001), estudiando las comunidades microbianas heterótrofas de los espeleotemas (estalactitas activas y concreciones de la pared), paredes y techo de galerías, y los suelos de la cueva, encontraron que estaban dominadas por actinobacterias. Los datos que se obtuvieron sugirieron que en algunos lugares de la cueva (suelos alterados y paredes de pasajes estrechos) la colonización de actinobacterias y su crecimiento se inició tras el descubrimiento de la cueva y fue debido al impacto antropogénico, pero la presencia de estos microorganismos en las estalactitas activas y concreciones de las paredes parecía ser un proceso natural. Además, entre los géneros de actinobacterias representados, apareció una alta diversidad de cepas entre las que destacaban los aislamientos pertenecientes al género *Agromyces*. Como se confirmó por el aislamiento y descripción de dos nuevos géneros de actinobacterias, *Beutenbergia* y *Knoellia*, de muestras del suelo de una cueva de China (Groth y col., 1999b, 2002), la riqueza de especies desconocidas en los biotopos de cuevas es alta y un gran número de microorganismos y especialmente de actinobacterias están aún por describir.

1.2. OBJETIVO DE LA TESIS

El objetivo principal de esta investigación es llevar a cabo una revisión taxonómica del género *Agromyces* y describir nuevas especies aisladas de ambientes hipogeos. De esta manera se podría analizar el papel potencial de estos microorganismos en ambientes hipogeos y evaluar su posible implicación en procesos de biodeterioro del Patrimonio Cultural.

1.3. EL GENERO *AGROMYCES*

El género *Agromyces*, actualmente clasificado dentro del filo *Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, orden *Actinomycetales*, familia *Microbacteriaceae*, fue establecido en 1969 por Gledhill y Casida con la especie tipo *Agromyces ramosus*, caracterizada por agrupar aislamientos filamentosos y ramificados del suelo, que se fragmentan dando lugar a células con formas cocoides e irregulares (difteroides), y presentan reacción catalasa negativa. Muestra una reacción oxidasa negativa aunque posee citocromos b, c y aa₃ (Jones y col., 1970). La cepa fue más tarde caracterizada por poseer un peptidoglicano del grupo B, B2γ:[(L-DAB)-D-Glu-D-DAB] (Schleifer y Kandler, 1972; Döpfer y col., 1982), y la menaquinona MK-12 como mayoritaria, con predominio de ácidos grasos del tipo *iso* y *anteiso*, y lípidos polares de membrana tales como difosfatidilglicerol, fosfatidilglicerol y un glicolípido (Collins, 1982). Horwitz y Casida (1975, 1978a,b) realizaron estudios de inducción de la fase L de *Agromyces ramosus* en medios de cultivo. La forma L presenta una morfología diferente a la forma bacteriana, mostrando una apariencia de "huevo frito" y tamaño celular mayor. Ambos investigadores demostraron que a bajas concentraciones de NaCl aparece la forma bacteriana y a altas concentraciones de NaCl, o en presencia de glicina o penicilina aparece la forma L. En presencia de Mg la forma L revierte a la forma bacteriana. Concluyendo que en el suelo podría existir un ciclo natural entre ambas formas dependiendo de las concentraciones de sales existentes. También en el suelo, *Agromyces ramosus* contribuye al mantenimiento de bajos niveles de CO atmosférico mediante su oxidación a CO₂ (Bartholomew y Alexander, 1979). En 1992, Zgurskaya y col. (1992) describieron 14 aislamientos del suelo que presentaban características quimiotaxonómicas y morfológicas típicas del género *Agromyces* pero crecían rápidamente en medio simple y mostraban reacciones catalasa y oxidasa positivas. Los autores clasificaron aquellos aislamientos en 2 nuevas especies con un total de 4 subespecies: *Agromyces cerinus* subesp. *cerinus*, *Agromyces cerinus*

subesp. *nitratu*s, *Agromyces fucosus* subesp. *fucosus* y *Agromyces fucosus* subesp. *hippuratus*, y redefinieron el género. Más tarde, Suzuki y col. (1996) encontraron que el grado de homología por hibridación de los ADN extraídos de las dos subespecies de *Agromyces fucosus* era del 45-47%, por debajo del nivel normalmente recomendado para considerar dos cepas como pertenecientes a una misma especie (70%; Wayne y col., 1987). Suzuki y col. (1996) describieron *Agromyces mediolanus*, que incluía a especies anteriormente clasificadas como "*Corynebacterium mediolanum*" (Mamoli, 1939), "*Flavobacterium dehydrogenans*" (Breed, 1948), y otros aislamientos de suelo (Aoki y col., 1982), que carecen de una fase de crecimiento micelial. Recientemente, el género ha aumentado con las especies *Agromyces luteolus*, *A. rhizosphaerae* y *A. bracchium* aislados de la rizosfera de plantas de Japón (Takeuchi y Hatano, 2001), *A. aurantiacus* procedente de una muestra de suelo de China (Li y col., 2003), *A. albus* aislada de las hojas e inflorescencias de una planta (*Androsace* sp., de la familia *Primulaceae*) en Rusia (Dorofeeva y col., 2003), y *A. ulmi* aislada del tocón de un olmo, *Ulmis nigra*, en España (Rivas y col., 2004).

Los miembros del género *Agromyces* se caracterizan por tener colonias circulares, convexas y lisas, que normalmente penetran en el agar. Las hifas ramificadas se rompen en fragmentos inmóviles, con formas cocoidal e irregular (difteroide). No se observa micelio aéreo ni esporas excepto *Agromyces aurantiacus* que forma micelio aéreo en agar glicerol-asparagina (Li y col., 2003). Las células son aeróbicas o microaerófilas. Las pruebas catalasa y oxidasa con tetrametil-*p*-fenilendiamina son variables dependiendo de las diferentes especies. Son bacterias mesofílicas, con crecimiento óptimo a 24-30°C, aunque algunas cepas crecen a 37°C. Las cepas utilizan un amplio rango de fuentes de C y N, y crecen en medio que contiene nitrógeno orgánico e inorgánico. El peptidoglicano es del tipo B, B2γ:[(L-DAB)-D-Glu-D-DAB], (Schleifer y Kandler, 1972; Döpfer y col., 1982) basado en DAB (mayoritariamente el isómero L; Sasaki y col., 1998) y contiene los aminoácidos glicina, glutamato, DAB y alanina. La galactosa, glucosa y

manosa aparecen en la pared celular de la mayoría de las cepas; la ribosa, ramnosa, fucosa, xilosa y tivelosa varían en diferentes especies. Los ácidos micólicos están ausentes. La menaquinona predominante es MK-12, y las menaquinonas secundarias son MK-11 o MK-13, dependiendo de las especies. Los lípidos polares presentes son difosfatidilglicerol, fosfatidilglicerol y glicolípidos; el grupo acil es acetilo y los ácidos grasos predominantes son los ramificados *iso* y *anteiso* que pueden aparecer en un 94%. También presentan un alto contenido en G+C en sus genomas (entre 68 y 75 mol%) (Zgurskaya y col., 1992; Suzuki y col., 1996; Takeuchi y col., 2001; Li y col., 2003; Dorofeeva y col., 2003; Rivas y col., 2004). Se encontraron ácidos teicoicos de la pared celular y polímeros aniónicos relacionados en algunas especies y subespecies (Naumova y col., 2001). El contenido en poliamina en algunas especies de *Agromyces* investigadas es más bajo que en la mayoría de las especies de la familia *Microbacteriaceae* y consiste en pequeñas cantidades (0.21-0.28 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$), siendo la putrescina el componente predominante (Alterburger y col., 1997).

El hábitat natural de los *Agromyces* parece ser suelos de diferentes orígenes (Gledhill y Casida, 1969; Zgurskaya y col., 1992; Suzuki y col., 1996; Li y col., 2003), rizosferas, hojas e inflorescencias de plantas (Takeuchi y Hatano, 2001; Li y col., 2003; Dorofeeva y col., 2003; Rivas y col., 2004). Recientemente, estos microorganismos han sido identificados en muestras de ADN recogidas de la piel del Hombre de Hielo Tirolés, de más de 5.000 años de antigüedad (Rollo y col., 2000); en muestras del aire de una planta procesadora de patatas donde aparecen abundantes representantes de la especie *Agromyces ramosus*, procedentes del parénquima de los tubérculos de la patata (Dutkiewicz y col., 2002a,b), y en quistes de plantas donde se detectan principalmente *Agromyces ramosus* y *Agromyces cerinus* subesp. *cerinus* (Nour y col., 2003).

Basándonos en trabajos de identificación bacteriana en los ambientes hipogeos en los que se cita la presencia de especies pertenecientes al género *Agromyces* (Laiz y col., 2000; Groth y col.,

2001) se decidió hacer una revisión taxonómica de este género, hasta ahora vinculado a ambientes diferentes a los hipogeos, y aislar e identificar nuevas cepas de este género que habían sido detectadas en ambientes hipogeos.

Para la descripción de nuevas especies se siguieron recomendaciones previamente descritas (Rosselló-Mora y Amann, 2001; Stackebrandt y col., 2002). Se emplearon técnicas fenotípicas y genotípicas. La información genotípica deriva de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) presentes en la célula, mientras que la información fenotípica deriva de las proteínas y sus funciones, diferentes marcadores quimiotaxonómicos (ácidos grasos, ácidos micólicos, lípidos polares, quinonas, poliaminas, componentes de la pared celular, exopolisacáridos), y un amplio rango de características metabólicas (Vandamme y col., 1996)

A nivel global, la descripción de nuevas especies contribuye a mejorar el conocimiento de los organismos que comparten nuestro planeta y su papel en la biosfera. Por ejemplo, las actinobacterias son una fuente importante de antibióticos, proporcionando dos tercios (más de 4000) de los antibióticos naturales (no sintéticos) (Okami, 1986, Okami y Hotta, 1988; Lazzarini y col., 2000). Además de la actividad antibiótica, estos agentes presentan otras actividades: antiviral, antitumoral, inmunológica y agrobiológica (actividad herbicida) (Sanglier y col., 1993; Bèhal, 2003). Todos ellos, son compuestos con gran valor comercial (Lemriss y col., 2003).

CAPITULO 2
MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

2.1. MUESTREO

Se seleccionaron la Cueva de los Ciervos, la Catacumba Romana de Domitila y la Cueva de los Murciélagos. En los tres lugares se obtuvieron aislamientos pertenecientes al género *Agromyces* que fueron identificados con la secuenciación del ADNr 16S. Se observaron diferencias significativas entre los valores de similitud de las secuencias de especies de *Agromyces* ya descritas y nuestros aislados. En base a estas diferencias, se seleccionaron algunos aislados cuya similitud en el gen ARN ribosómico 16S era inferior al 97% ya que este valor ha sido utilizado como indicativo de la posibilidad de corresponder a especies diferentes (Roselló-Mora y Amann, 2001; Stackebrandt y col., 2002).

Cueva de los Ciervos

La Cueva de los Ciervos se forma en Calcarenitas del Oligoceno a 26 m sobre el nivel del mar, en el canal de Otranto, a 370 m de Porto Badisco, Italia. Fue descubierta oficialmente el 1 de febrero de 1970. La cueva se formó por la acción de las aguas subterráneas, con numerosas concavidades visibles en el techo provocadas por el efecto de las turbulencias y remolinos de agua. La cueva está formada por una galería principal orientada al NE-SO, desde la que se ramifican 3 cavidades en dirección SO-NE. La extensión total es de 1550 m. La galería central contiene pinturas de arte rupestre de color rojo, mostrando figuras estilizadas de hombres y animales (Figura 2.1). Las pinturas negras, realizadas con guano, representan figuras geométricas y cruciformes, difíciles de interpretar (Figura 2.2). Parece ser que la cueva era un lugar sagrado donde se celebraban ceremonias religiosas.

Se recogieron muestras procedentes del suelo del exterior de la cueva, a pocos metros de la entrada; del suelo del interior de la cueva; de las paredes de la cueva y de las estalactitas (Figura 2.3).

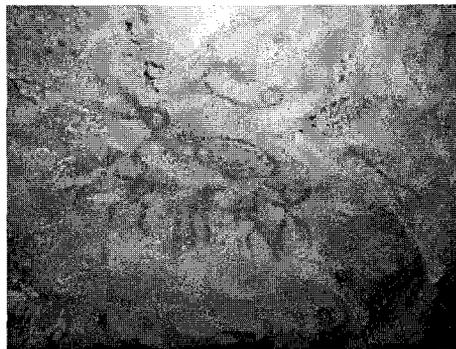


Fig. 2.1. Figuras estilizadas de hombres y animales pintados en rojo.

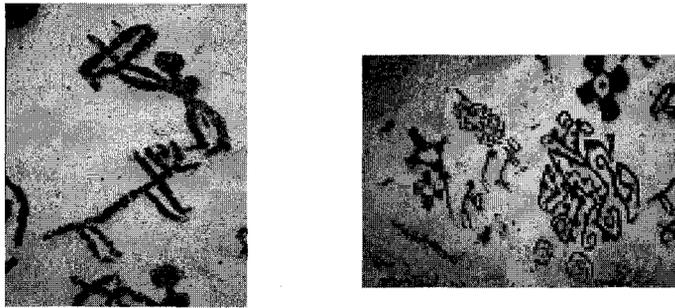
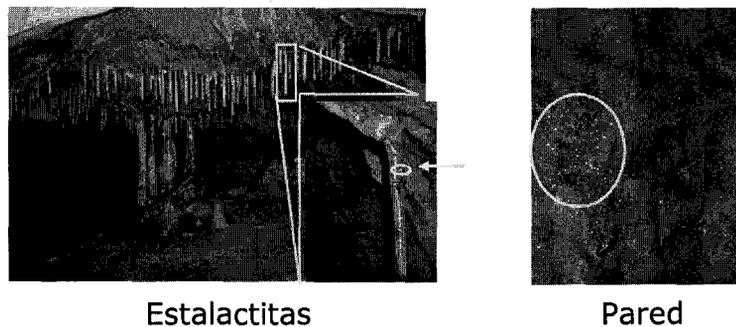


Fig. 2.2. Figuras geométricas y cruciformes pintadas con guano.



Estalactitas

Pared

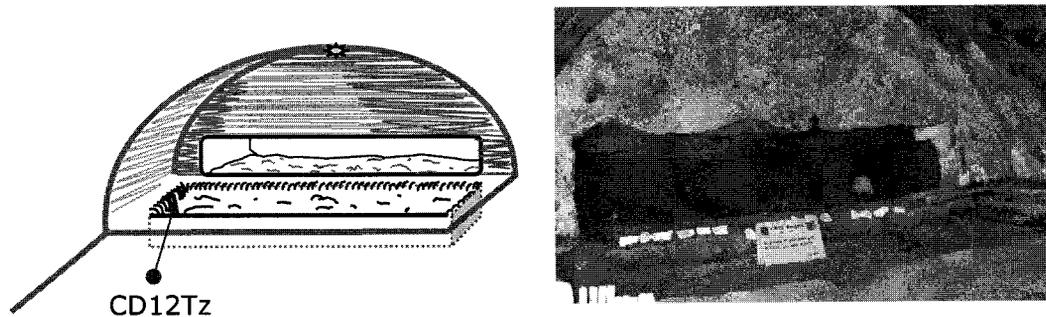
Fig. 2.3. Puntos de muestreo en estalactitas y pared de la cueva.

Catacumba Romana de Domitila

La Catacumba Romana de Domitila es una de las más de sesenta catacumbas que se encuentran en Roma (Italia). Están formadas por galerías subterráneas que parecen verdaderos laberintos con tres niveles de cámaras funerarias, llegando a alcanzar muchos kilómetros. En los muros de la catacumba, y sobre una base de morteros, aparecen pinturas murales.

Se tomaron muestras de diferentes puntos de la pared de la Catacumba de Domitila, entre ellos, del primer arcosolio situado a la izquierda después de la entrada (Figura 2.4.A) y del cubículo de los "Pequeños Apóstoles" (Figura 2.4.B).

A.



B.

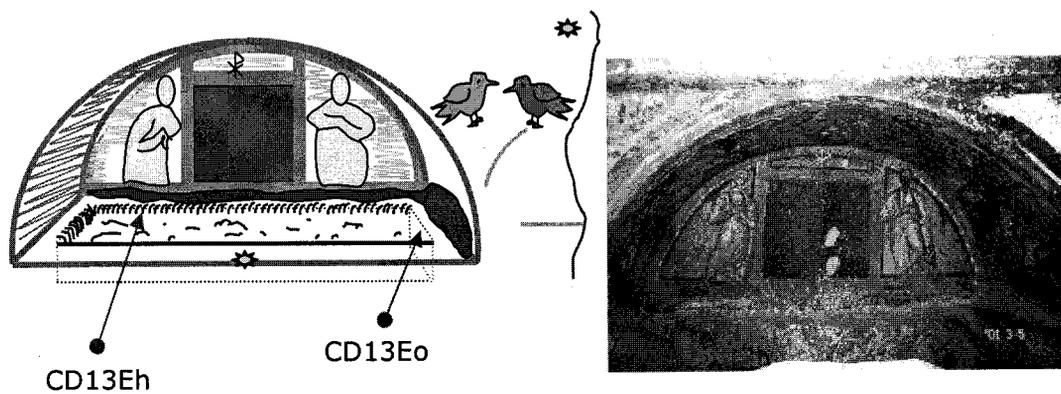


Fig. 2.4. Puntos de muestreo en la piedra excavada (A) y pared (B) de la Catacumba Romana de Domitila.

Cueva de los Murciélagos

La Cueva de los Murciélagos está ubicada a 4 kilómetros del pueblo de Zuheros, en Córdoba (España) y a 980 metros sobre el nivel del mar. Presenta aproximadamente 800 metros de longitud. Habitada

desde el Paleolítico Medio, se pueden observar desde pinturas rupestres a las típicas formaciones kársticas de estalactitas y estalagmitas. En esta cueva se han encontrado diferentes tipos de pinturas pertenecientes a las culturas prehistóricas, de los períodos neolítico, calcolítico y edad de los metales.

Se tomaron muestras procedentes de *biofilms* de la pared de la cueva (Figura 2.5).

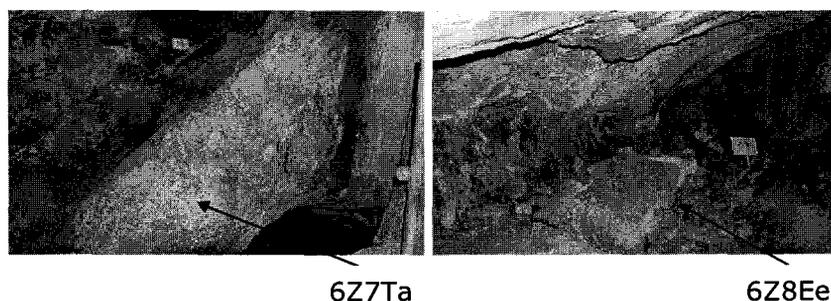


Figura 2.5. Puntos de muestreo en la pared de la cueva

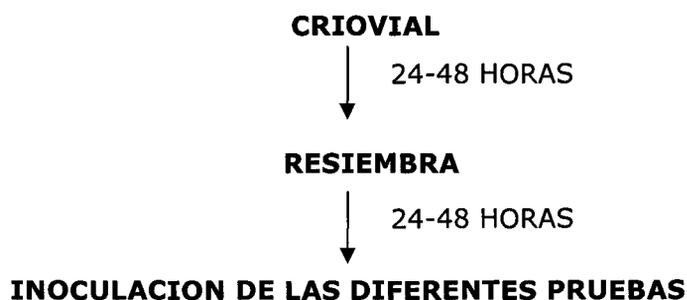
Las muestras se recogieron utilizando una espátula estéril y tubos de microcentrífuga estériles para las áreas grandes o bien, utilizando bastoncillos de algodón estériles suspendidos en medio orgánico 79 (OM79) diluído 1:10, para las áreas pequeñas con microorganismos. Inmediatamente, las muestras se mantuvieron en frío, a aproximadamente 4°C, hasta la llegada al laboratorio donde se procedió a procesar las muestras.

2.2. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras recogidas en tubos de microcentrífuga se suspendieron en solución salina (NaCl al 0.9% [p/v]) e inocularon en

placas con los medios de cultivo PY-BHI Agar y Agar Nutritivo (NA), y las muestras recogidas con los bastoncillos de algodón estériles se distribuyeron directamente en dichos medios de cultivo. Las placas se incubaron a 28°C desde 48 horas hasta 8 semanas para permitir el crecimiento de las bacterias de crecimiento lento. Las colonias individuales se aislaron al azar e inocularon en los medios de cultivo PY-BHI Agar, NA, y Triptona-Soja Agar (TSA). Una vez obtenidos los cultivos a partir de colonias individuales, se confirmó al microscopio la pureza de cada aislamiento. A continuación, los aislamientos se conservaron a -80°C en medio con glicerol (1:1) o en crioviales (Microbank, Quimigranel, España) donde pueden permanecer durante años.

Para la realización de las pruebas fisiológicas, quimiotaxonómicas y moleculares se siguió el siguiente esquema:



La biomasa del criovial se inoculó en medio líquido o en medio sólido, y se incubó durante 24 a 48 horas. Se comprobó al microscopio la pureza del cultivo y a continuación se efectuó una resiembra en medio líquido o en medio sólido. A las 24-48 horas se volvió a comprobar, en el microscopio, la pureza del cultivo. A partir de este último cultivo se realizaron las inoculaciones para las diferentes pruebas fisiológicas, quimiotaxonómicas y moleculares. Todas las pruebas se realizaron por duplicado o triplicado a partir de cultivos diferentes y se incubaron a 28°C, excepto que se indique lo contrario.

2.3. PRUEBAS MORFOLOGICAS Y FISIOLÓGICAS

2.3.1. Caracterización morfológica

La morfología celular y dimensiones celulares se examinaron mediante microscopía de contraste de fase, utilizando un microscopio Zeiss Axioscope 2 equipado con software analizador de imágenes Axio Vision 2.05. Se realizaron preparaciones a partir de medio OM79 sólido y líquido. A partir del medio sólido se recogió biomasa y se mezcló con una gota de solución salina (NaCl al 0.9% [p/v]) colocada sobre el portaobjetos. A partir del medio líquido se colocó directamente una gota sobre el portaobjetos. En ambos casos, las muestras sobre el portaobjetos se cubrieron con cubreobjetos. Se determinaron las dimensiones bacterianas a partir un cultivo de 24 horas.

La morfología de las colonias de los cultivos de 3 a 14 días, crecidos en medio OM79, se estudió con un estéreo microscopio.

2.3.2. Caracterización del cultivo

Temperatura de crecimiento

Los microorganismos se inocularon por duplicado en medio sólido OM79 a diferentes temperaturas, 6, 10, 15, 20, 28, 37 y 40°C. Previamente a las inoculaciones, las placas se incubaron a las diferentes temperaturas para que el medio de cultivo tuviese la temperatura adecuada de incubación. Diariamente se comprobó el crecimiento de todos los microorganismos durante 15 días, con el objetivo de conocer la temperatura óptima de crecimiento y el intervalo de temperatura en el que existía crecimiento.

Requerimientos de oxígeno y dióxido de carbono

Los requerimientos de oxígeno y dióxido de carbono se estudiaron con los sistemas de incubación GENbag anaer y GENbag microaer (BioMerieux, Marcy Létoile, France). Estos sistemas permiten obtener rápidamente una atmósfera adaptada al cultivo de bacterias anaerobias y microaerófilas.

Los microorganismos se inocularon por duplicado en medio OM79 y se comprobó diariamente el crecimiento en los dos sistemas durante 15 días.

Tolerancia a sales

Los microorganismos se inocularon por duplicado en medio sólido OM79 con diferentes concentraciones de NaCl, 2, 4, 6, 8 y 10% (p/v). Diariamente se comprobó el crecimiento de los microorganismos durante 15 días, con el objetivo de conocer la concentración óptima de crecimiento y el intervalo de concentración salina en el que se producía el crecimiento.

Tolerancia al pH

Los microorganismos se inocularon por duplicado en medio líquido OM79 ajustado a diferentes valores de pH, de 4 a 10.5. Así mismo se incubaron controles de cada pH sin inocular. El pH se ajustó utilizando soluciones HCl 1M o Na₂CO₃ al 20% (p/v). Durante 10 días se comprobó diariamente el crecimiento de los microorganismos y también se comprobó la estabilidad del pH utilizando los controles sin inocular. A partir de aquellos medios de cultivo en los que no se observó crecimiento de microorganismos, se inocularon placas con medio sólido OM79 para comprobar y confirmar que no existía crecimiento a dicho pH.

Resistencia a los antibióticos

La susceptibilidad a antibióticos se estudió utilizando discos de antibióticos (Oxoid) en placas con medio sólido OM79 que se inocularon con suspensiones de células. Se comprobó el crecimiento de microorganismos a las 24 y 48 horas. Se observó si existía crecimiento alrededor del disco, lo que implicaría que la cepa era resistente a esos antibióticos, o si existía un halo sin crecimiento alrededor de los discos, entonces el microorganismo inoculado era sensible al antibiótico ensayado.

2.3.3. Caracterización bioquímica

Prueba de la Oxidasa (Cowan y Steel, 1965)

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. Este enzima cataliza la oxidación de un colorante redox (presente en el reactivo), cambiando su color de amarillo a púrpura oscuro. El enzima, en presencia de oxígeno atmosférico, cataliza la oxidación del reactivo (fenilendiamina oxidasa) formando un compuesto púrpura oscuro, el indofenol.

El reactivo utilizado para esta prueba fue una solución al 1% de tetrametil-*p*-fenilendiamina. Se añadió una gota de esta solución a un disco de papel de filtro y se extendió una suspensión celular sobre esta solución. Las bacterias oxidasa positivas desarrollaban color púrpura antes de 20 segundos, y las bacterias oxidasa negativas no desarrollaban color púrpura en dicho intervalo de tiempo.

Para interpretar los resultados se utilizó un control positivo (*Pseudomonas aeruginosa*) y un control negativo (*Escherichia coli*).

Prueba de la Catalasa (Lanyi, 1987)

Sirve para comprobar la presencia del enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. Este enzima está encargada de degradar el peróxido de hidrógeno que se produce como consecuencia de la reducción de radicales libres de oxígeno y cuya acumulación es tóxica.



El reactivo utilizado fue una solución de H_2O_2 al 30% (v/v) (Merck, Alemania). Se inoculó con una colonia monoespecífica de 18-24 horas sobre un portaobjetos limpio de vidrio y se añadió una gota de esta solución sobre las células. Las bacterias catalasa positivas inmediatamente formaban burbujas.

Los controles empleados fueron *Staphylococcus aureus* como control positivo y *Staphylococcus faecalis* como control negativo.

Actividades Enzimáticas

Para el estudio de las actividades enzimáticas se empleó el sistema API ZYM (BioMerieux, Marcy Létoile, France) que consiste en un micrométodo semicuantitativo de investigación de actividades enzimáticas. Este sistema permite estudiar rápida y simultáneamente 19 actividades enzimáticas a partir de pequeñas cantidades de muestra. La galería consta de 20 pocillos cuyo fondo está constituido por un soporte que contiene un sustrato enzimático con su tampón. Este soporte está destinado a favorecer el contacto entre el enzima y el sustrato generalmente insoluble. Los pocillos se inoculan con una suspensión densa, que rehidrata los sustratos. Las reacciones producidas durante el periodo de incubación se traducen en cambios de color que se revelan mediante la adición de reactivos.

Los microorganismos se inocularon por duplicado en las galerías y se incubaron durante 4 horas a 37°C. Entonces, se añadieron los reactivos ZYM A y ZYM B, y se observó el desarrollo de color en cada pocillo, traducándose en la presencia o ausencia de actividad enzimática.

Reducción del Nitrato (Lanyi, 1987)

La reducción del nitrato normalmente se realiza en medio nutritivo que contiene el sustrato (medio NR), y se emplean dos reactivos, NIT 1 y NIT 2 (BioMerieux) y polvo de zinc (BioMerieux). Los productos principales de la reducción del nitrato son nitrito (1) o gas nitrógeno (2):



Si se añade el reactivo NIT 1 a un cultivo en el que se reduce el nitrato de acuerdo con la ecuación (1), se desarrolla un color rojo. En esta reacción se produce nitrito. La reacción del gas nitrógeno de acuerdo con la ecuación (2) indica una ruptura completa del nitrato o desnitrificación. El nitrógeno forma una burbuja en el tubo donde se encuentra el cultivo, y no se desarrolla color después de añadir el reactivo NIT 1. Como la ausencia de color puede deberse a que no se produce reducción del nitrato o bien, porque se ha producido una rotura completa del nitrato, el resultado debe confirmarse con la adición de polvo de zinc al tubo para reducir el nitrato que hubiese en el medio. Si se desarrolla color rojo después de añadir zinc, el organismo es incapaz de reducir nitrato y la reacción es negativa. Alternativamente, si el nitrato ha sido completamente reducido, no aparecerá color rojo tras la adición de zinc y la reacción será positiva.

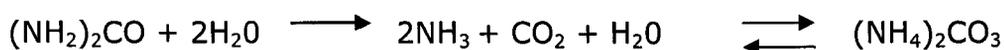


Se inocularon 5 tubos con 3-5 ml de medio NR de cada organismo. Durante 5 días consecutivos se realizó el mismo procedimiento. Se añadieron 100 µl de cada reactivo, NIT 1 y NIT 2, hasta observar el desarrollo de color y en caso de ausencia de color se añadió el polvo de zinc.

Se utilizaron tanto controles positivos (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) como un control negativo (*Acinetobacter calcoaceticus*).

Prueba de la Ureasa (Lanyi, 1987)

La urea es hidrolizada por la ureasa bacteriana, enzima amidasa, en amonio y dióxido de carbono, los cuales forman carbonato de amonio en el medio de cultivo utilizado.

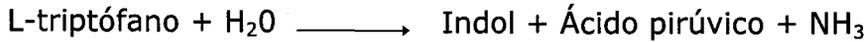


Esta prueba se realiza utilizando un medio con una concentración baja de peptona y pequeñas cantidades de glucosa. La fermentación de ácidos producidos por la glucosa, neutralizan las sustancias alcalinas de la peptona pero no la gran cantidad de amonio formado cuando la urea es atacada. La glucosa sirve como fuente de energía aumentando la producción de ureasa.

Se inocularon por duplicado los tubos con 2-3 ml de medio ureasa y se incubaron durante 24-48 horas. Los resultados positivos se observaron con un intenso color rojo-violeta (*Proteus mirabilis* y *Klebsiella aerogenes*, controles positivos) y los resultados negativos con un color amarillo (*Escherichia coli*, control negativo).

Prueba del Indol (Smibert y Krieg, 1994)

Mediante esta prueba se detecta la liberación de indol en un cultivo bacteriano. Dicha liberación se debe a la degradación del aminoácido triptófano mediante el enzima triptofanasa.



Para la realización de esta prueba las bacterias se cultivaron durante 24-48 horas en tubos con 3 ml de medio indol. Para la posterior detección del indol se empleó el reactivo de Kovacs. Las bacterias que contenían el enzima triptofanasa, al añadir al medio 0.5 ml del reactivo de Kovacs, formaban un anillo de color rojo en la superficie del medio de cultivo y la prueba se consideraba positiva. Si esto ocurría después de 24 horas, la prueba se consideraba completa, pero si era negativa se incubaba otras 24 horas.

Los controles empleados fueron *Escherichia coli* (control positivo) y *Enterobacter aerogenes* (control negativo).

Prueba del Hipurato (Smibert y Krieg, 1994)

El ácido hipúrico (*N*-benzoilglicina) es un compuesto orgánico aromático que puede ser hidrolizado enzimáticamente originando ácido benzoico y glicina.



La reacción puede demostrarse al detectar la glicina, que forma un complejo coloreado de color azul con el reactivo ninhidrina.

Se inocularon suspensiones bacterianas en 0.4 ml de solución hipurato y se incubaron durante 2 horas a 37°C. En ese momento se añadieron 0.2 ml del reactivo ninhidrina. Sin agitar, se incubaron las suspensiones durante 10 minutos a 37°C. Transcurridos los 10 minutos, se observó un color púrpura intenso en las reacciones positivas y un débil color púrpura o nada de color en las reacciones negativas.

Los controles utilizados fueron *Streptococcus agalactiae* (control positivo) y *Streptococcus pyogenes* (control negativo).

Hidrólisis de Adenina, Hipoxantina, Xantina y Tirosina (Gordon y col., 1974)

Esta prueba sirve para comprobar la hidrólisis de bases púricas y sus derivados como la adenina, hipoxantina y xantina, y del aminoácido tirosina catalizada por sus enzimas hidrolíticas.

Se empleó medio de agar nutritivo y soluciones de adenina, hipoxantina, xantina y tirosina. Diez ml de cada suspensión autoclavada se mezcló con 100 ml de agar nutritivo y se añadió en placas. Se inocularon los microorganismos y se incubaron a 28°C durante 14 a 21 días, hasta la desaparición de los cristales bajo y alrededor del área de crecimiento del organismo, como se puede observar en la Figura 2.6. En este caso el resultado era positivo. Si había crecimiento bacteriano sin desaparición de cristales, entonces el resultado era negativo.

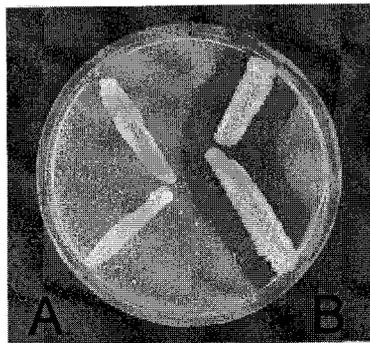


Fig. 2.6. No Hidrólisis (A) e hidrólisis (B) de tirosina.

Hidrólisis de Gelatina (Smibert y Krieg, 1994)

Los enzimas proteolíticos extracelulares de las bacterias hidrolizan las proteínas a polipéptidos, péptidos y aminoácidos. La gelatina es una proteína, que en solución acuosa forma un gel sólido a temperatura ambiente pero cambia a líquido por encima de 25-28°C.

Tolera el calor a 100-121°C sin coagularse, y a diferencia de otras proteínas puede ser esterilizada por autoclavado. La hidrólisis de gelatina puede demostrarse en medio OM79 suplementado con un 2% de gelatina. Se ha utilizado una modificación del protocolo de Smibert y Krieg (1994) porque sólo se añade un 2% de gelatina y no el 12% ya que de esta manera la prueba es más sensible.

Se inocularon los organismos por duplicado y se incubaron a 28°C durante 3 y 4 días. Antes de la lectura de los resultados, los cultivos se enfriaron (4°C) de 2 a 3 horas. La prueba fue positiva cuando el medio inoculado era líquido y el medio control era sólido. Aquellos medios que permanecían sólidos se volvieron a incubar y a observar en días sucesivos para confirmar el resultado negativo.

Los controles utilizados fueron *Pseudomonas aeruginosa*, como control positivo, y *Escherichia coli*, como control negativo.

Hidrólisis de Tween 80 (Lanyi, 1987)

El Tween 80 es monooleato de sorbitán polietileno. Este compuesto mantiene a las bacterias en suspensión homogénea. Siendo soluble en agua, el Tween 80 es un sustrato ideal para demostrar la actividad lipolítica. Los organismos lipolíticos rompen el ácido oléico, dando lugar a la formación de sales de calcio que produce áreas opacas alrededor de las colonias.

Los organismos se inocularon por duplicado en placas con medio Tween 80 y se incubaron a 28°C durante 14 a 21 días. El resultado positivo consistía en la aparición de un área turbia alrededor de las colonias.

Los controles utilizados fueron *Pseudomonas aeruginosa* (control positivo) y *Bordetella bronchiseptica* (control negativo).

Hidrólisis de Esculina (Smibert y Krieg, 1994)

La esculina contiene un carbohidrato unido a un compuesto aromático. Esta prueba se realiza para distinguir organismos que hidrolizan la esculina en esculetina y glucosa, la primera reacciona con sales de hierro originando un compuesto de color negro.

Se crecieron las bacterias en tubos de agar inclinado que contenían medio de esculina y se incubaron durante 7 días hasta observar la aparición del color marrón oscuro indicativo de una reacción positiva.

Enterococcus faecalis se utilizó como control positivo y *Streptococcus mitis* como control negativo.

Hidrólisis de Almidón (Cowan y Steel, 1965)

Los polisacáridos, como el almidón, son demasiado largos para ser transportados al interior de la célula. Los microorganismos excretan amilasas que hidrolizan esos polímeros hasta oligosacáridos o monosacáridos que pueden usarse como sustratos para crecer. La hidrólisis de almidón es analizada en medios que contienen almidón en placa Petri. Después de incubar se inundan las placas con lugol que al reaccionar con el almidón intacto forma un complejo de color púrpura.

Las bacterias se inocularon por duplicado en placas con medio NA con un 1% de almidón de patata. Hay que indicar la importancia de utilizar un medio simple como es el agar nutritivo que no contiene glucosa, ya que las bacterias prefieren consumir glucosa antes que almidón, que es más difícil de degradar. Las incubaciones se realizaron a 28°C durante 5 días o bien hasta observar un buen crecimiento del organismo. A continuación se añadió la solución de lugol, observándose zonas incoloras alrededor del área de crecimiento del organismo como se observó en el control positivo (*Flavobacterium indologenes*). Las zonas de color púrpura alrededor de la biomasa

indicaban un resultado negativo (*Pseudomonas aeruginosa*, control negativo).

Hidrólisis de Caseína (Cowan y Steel, 1965)

Esta prueba determina la hidrólisis de la proteína caseína. Esta hidrólisis se realizó en medio de cultivo que contiene leche descremada. Si los microorganismos hidrolizan esta proteína, se observa perfectamente una zona de diferente color alrededor de la biomasa, como se muestra en la Figura 2.7.

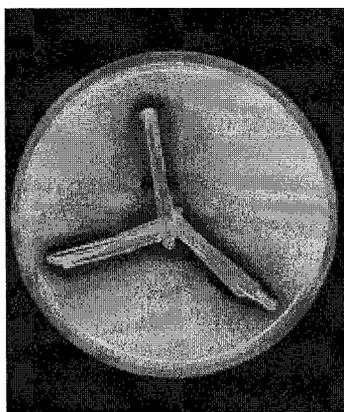


Fig. 2.7. Ejemplo demostrando la hidrólisis de caseína por la cepa CD13Eh-36.

Los microorganismos se inocularon en placas con medio de caseína y se incubaron a 28°C durante 7 días o 14 días, hasta observar un buen crecimiento del organismo y una zona de diferente color alrededor y bajo el área de crecimiento. Los controles utilizados fueron *Bacillus subtilis* (control positivo) y *Mycobacterium phlei* (control negativo).

Hidrólisis de Ácidos Orgánicos (Cowan y Steel, 1965)

Los ácidos orgánicos son descompuestos primero en ácidos de menor tamaño y dióxido de carbono. Seguidamente, si el medio es incubado aeróbicamente, estos ácidos se oxidan y se forma más cantidad de dióxido de carbono. Los ácidos son añadidos al medio



como sales de sodio. El dióxido de carbono liberado forma carbonatos con los iones alcalinos, provocando un cambio en el pH dirigido a la alcalinidad. Este cambio es detectado por el indicador rojo fenol que adquiere color rojo cuando el medio es alcalino.

Se empleó el medio de ácidos orgánicos para la inoculación de las bacterias. El uso de ácidos orgánicos, como fuente de carbono por un cultivo, se demostró por el color del indicador rojo fenol después de la incubación durante 4 semanas a 28°C. El control empleado fue el medio de cultivo con las diferentes sales de sodio sin inocular. Aquellos cultivos que no presentaban cambio de color, se interpretaban como resultados negativos. Los resultados positivos los presentaban aquellos cultivos de color rojo debido al cambio de pH originado por la descomposición de los ácidos orgánicos.

Metabolismo de Hidratos de Carbono

Para el estudio del metabolismo oxidativo de los hidratos de carbono se empleó la galería API 50 CH (BioMerieux, Marcy Létoile, France). Esta galería está compuesta por 50 micropocillos. El primer pocillo, sin principio activo, sirve como control negativo. Los siguientes pocillos contienen una cantidad definida de sustrato deshidratado, perteneciente a la familia de los hidratos de carbono y derivados (heterósidos, polialcoholes, ácidos urónicos). Se empleó el medio API 50 CHB/E para la inoculación de las galerías. Durante la incubación, el catabolismo de los glúcidos produce ácidos orgánicos que hacen cambiar el color del indicador de pH, de un color rojo a un color amarillo. Los resultados obtenidos constituyen el perfil bioquímico de la cepa estudiada. La inoculación de las galerías se realizó por duplicado y la lectura de cada una de ellas se hizo diariamente durante 10 días, hasta observar que no se producían cambios adicionales de color.

Prueba del Rojo de Metilo (Lanyi, 1987)

Esta prueba es utilizada para distinguir dos rutas diferentes de la fermentación de la glucosa. En el medio con agua peptona, fosfato y glucosa, las bacterias rojo de metilo positivas producen ácido en cantidades suficientes para mantener el pH por debajo de 4.5 durante varios días. Las bacterias rojo de metilo negativas, en presencia de oxígeno, continúan metabolizando los ácidos producidos a sustancias neutras y causan un cambio en el pH inicial hacia un valor de 6.0. El reactivo rojo de metilo es un indicador ideal para mostrar esta diferencia, siendo rojo a $\text{pH} < 4.5$ y amarillo a $\text{pH} > 6.0$.

Se inocularon por duplicado las cepas en tubos con medio RM-VP y se incubaron de 2 a 4 días a 28°C . Posteriormente, se añadió una gota del reactivo rojo de metilo. Cuando aparecía el color rojo, la reacción era positiva (*Escherichia coli*, control positivo) y si el color era amarillo, la reacción era negativa (*Serratia marcescens*, control negativo).

Prueba de Voges-Proskauer (Lanyi, 1987)

Esta prueba está basada en la detección de acetoína (acetilmetilcarbinol) producida en el curso de la ruptura de la glucosa. Mediante la utilización de los reactivos A y B de Voges-Proskauer (Difco) a un tubo de cultivo con medio RM-VP, cualquier acetilmetilcarbinol presente es oxidado y forma diacetilmetilcarbinol. Este último compuesto reacciona con la creatina (del medio) para formar un compuesto de color rojo. La presencia de este compuesto se detecta visualmente y se interpreta como una prueba positiva.

Se inocularon por duplicado las cepas en tubos con medio RM-VP y se incubaron de 2 a 4 días a 28°C . Posteriormente, se añadieron 0.6 ml del reactivo A y 0.2 ml del reactivo B por ml de cultivo. La aparición de color rojo se interpretó como resultado positivo (*Enterobacter*

cloacae, control positivo). Si no se desarrollaba color se debía a un resultado negativo (*Escherichia coli*).

Prueba del Sulfuro de Hidrógeno (Lanyi, 1987)

Determinadas bacterias producen sulfuro de hidrógeno mediante la liberación enzimática de grupos sulfidrilos a partir de aminoácidos que contienen grupos -SH. El sulfuro de hidrógeno es un gas incoloro que al ponerse en contacto con el acetato de plomo produce sulfuro plumboso, un precipitado negro insoluble. Para esta prueba se utilizaron tiras de acetato de plomo (BBL) muy sensibles para detectar rastros de H₂S. El sulfuro de hidrógeno reacciona con el acetato de plomo de las tiras formando sulfuro plumboso, que produce un precipitado negro sobre la tira.

Los microorganismos se inocularon en tubos con 4 ml de medio de sulfuro de hidrógeno. Tras la inoculación, se colocó una tira con acetato de plomo en el interior de cada tubo. Se incubaron y se examinaron diariamente durante 7 días. Los resultados positivos correspondían con los cultivos que presentaban tiras de color oscuro (*Proteus vulgaris*, control positivo) y los resultados negativos correspondían a los cultivos que presentaban tiras sin cambio de color (*Escherichia coli* ATCC 25922, control negativo).

2.4. PRUEBAS QUIMIOTAXONOMICAS

2.4.1. Composición de la pared celular

La composición de la pared celular se utiliza para la caracterización y clasificación de organismos Gram-positivos. La mayoría de las bacterias tienen una cubierta rígida llamada peptidoglicano (o mureína), formada por dos derivados de azúcares *N*-acetilglucosamina y *N*-acetilmurámico, y un pequeño grupo de

aminoácidos que incluyen L-alanina, D-alanina, D-glutámico, lisina y ácido 2,6-diaminopimérico (DAP), entre otros. Estos componentes forman una estructura que se repite a lo largo de la pared. La composición y estructura del peptidoglicano parece ser constante entre las bacterias Gram-negativas, sin embargo es muy variable entre las bacterias Gram-positivas por lo que se utiliza como característica taxonómica.

El primer paso en el análisis de la pared celular de las bacterias Gram-positivas es la determinación de DAP. Si no se detectan los isómeros de DAP, entonces se analizan los aminoácidos con la fracción de la pared celular purificada.

Análisis del ácido diaminopimérico (DAP) de hidrolizados celulares (Hasegawa y col., 1983)

Hidrólisis celular: Aproximadamente se recogieron 3 mg de biomasa y se hidrolizaron con 1 ml de HCl 6 N en tubos de microcentrífuga obteniéndose una suspensión homogénea. Los tubos se autoclavaron durante 15 minutos a 121°C. Después de su enfriamiento, se centrifugó el hidrolizado durante 10 minutos en una microcentrífuga a 14000 x g. Se transfirió el sobrenadante a tubos de vidrio y se eliminó el HCl con flujo de aire a 40°C (Pierce Instrument) durante 20-30 minutos. Una vez eliminado el HCl se resuspendió el sedimento en una gota de agua destilada y se eliminó el agua mediante secado. Finalmente el hidrolizado se resuspendió en 20 µl de agua destilada.

Cromatografía en capa fina (TLC): De cada muestra se aplicó 3 µl en la base del papel de filtro o en placa de celulosa (Merck). Como estándar se empleó, 1 µl de ácido DL-diaminopimérico 0.01 M (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., U.S.A.). Este compuesto consiste en una mezcla de isómeros del DAP. También se emplearon cepas que contienen meso-, LL-DAP y DL-DAP. Para la cromatografía se empleó el solvente Rhuland. El desarrollo de la cromatografía tuvo lugar

durante 3 horas. Las manchas se visualizaron con el empleo del pulverizador con reactivo ninhidrina y calentamiento durante 2 minutos a 100°C. Los isómeros aparecían como manchas verde-oscuras con R_f 0.29 (isómero LL) y R_f 0.24 (isómeros meso y DD).

Análisis de aminoácidos del peptidoglicano (Schleifer y Kandler, 1972)

Preparación del peptidoglicano: Se recogió abundante biomasa y se mezcló con agua empleando bolitas de vidrio de 0.10-0.11 mm de diámetro. La mezcla se homogenizó durante 10 minutos en un homogeneizador (Edmund Bühler, Tübingen, Alemania). El homogeneizado se mezcló con agua y se filtró en un filtro G-1 Schott (Alemania). El filtrado se vertió en tubos de centrifuga y se centrifugó a 4°C durante 20 minutos, a 2000 rpm. Se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 4°C, 20000 rpm, 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se homogeneizó en un homogeneizador Ultra-Turrax T25 (IKA Labortechnik, Alemania). Se centrifugó a 4°C, 2000 rpm, 10 minutos. Se añadieron 10 ml de tampón fosfato pH 7.9 y tripsina. Se homogeneizó todo y se vertió en tubos de vidrio cerrados que se incubaron toda la noche a 37°C. Posteriormente se lavaron las muestras con agua destilada y se centrifugaron a 10°C, 20000 rpm, 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 10 ml de agua destilada para homogeneizar y el contenido se depositó en un recipiente de vidrio, al que se añadió 1 ml de SDS 20%. El contenido se centrifugó durante 10 minutos, a 10°C, 20000 rpm. El sobrenadante se eliminó y se repitió el lavado del precipitado 3 veces. Finalmente el tubo de vidrio contenía el precipitado lavado que se tapó con un papel parafinado y se conservó a -20°C durante toda la noche. Posteriormente, se recogió 1 mg de dicho contenido y se depositó en una ampolla de vidrio, se añadieron 0.2 ml de HCl 4 N y la ampolla se cerró y mantuvo a temperatura ambiente hasta su uso.

Análisis: Se abrió una ampolla, se añadió carbón activo y se mezcló. El contenido se depositó en un tubo de microcentrífuga y se centrifugó durante 5 minutos. Se eliminó el HCl con flujo de aire a

40°C (Pierce Instrument) de 20-30 minutos. Se lavó el contenido con agua y se volvió a secar. Se repitió el lavado y secado otra vez más. Se añadieron 300 µl de agua destilada a cada muestra seca y se agitó en un vortex. Cada muestra se aplicó en la base del papel de filtro o en placa de celulosa (Merck). Como estándar se emplearon los aminoácidos, DAB, Gly, Glu, Asp, Orn, Lys. Para la cromatografía se empleó el solvente Rhuland. El desarrollo de la cromatografía tuvo lugar durante 8 horas. Las manchas se visualizaron con el empleo de un pulverizador con reactivo ninhidrina y calentamiento durante 2 minutos a 100°C.

Los razones molares de los aminoácidos se determinaron por cromatografía de gases y espectrometría de masas-cromatografía de gases de los *N*-heptafluorobutiril isobutil ésteres de los aminoácidos como describió MacKenzie (1987). Los derivados *N*-heptafluorobutiril isobutil ésteres de los aminoácidos se prepararon por esterificación bajo catálisis ácida a 120°C durante 20 minutos en isobutanol-HCl 3 *N* seguida de una acilación con anhídrido heptafluorobutírico a 150°C por 10 minutos. El cromatógrafo de gases utilizado fue el modelo GC-14A (Shimadzu Corp., Tokio, Japón) equipado con un detector de ionización de llama y un integrador. Para los análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas se empleó un equipo de masa CG-SM-QP2000 (Shimadzu Corp., Tokio, Japón).

Análisis del grupo acilo (Uchida y Aida, 1984)

El grupo acilo del peptidoglicano de la pared celular bacteriana es un derivado del ácido glicólico y su análisis se realizó determinando cuantitativamente el ácido glicólico de los hidrolizados celulares empleando un método colorimétrico.

Para este análisis, se realizó la hidrólisis celular a partir de 10 mg de biomasa seca depositada en un tubo de vidrio con 100 µl de HCl 6 *N* a 100°C durante 2 horas. A continuación, se realizó el fraccionamiento del hidrolizado. Para ello, se transfirió el lisado con

una pipeta Pasteur a una microcolumna con resina de intercambio iónico Dowex 1-X8. Se aclararon el tubo y la pipeta con 0.4 ml de agua destilada y se añadió el lavado a la columna. La columna se lavó 2 veces con 1 ml de agua destilada y una vez con 1 ml de solución HCl 0.5 *N*. Se eliminó el eluido de color marrón. La fracción del ácido orgánico se recogió con 2 ml de HCl 0.5 *N*. Se empleó 1 ml de la alícuota del eluido para determinar la cantidad de ácido glicólico en el siguiente paso. Se añadieron 100 µl de la solución de la muestra a otro tubo de vidrio y cuidadosamente se añadieron 2 ml del reactivo DON. El tubo se cerró y se calentó en agua a 100°C durante 10 minutos. La solución que desarrolló el color fue diluida con 1.9 ml de ácido sulfúrico 2 *N* en un baño frío, y a continuación se midió la intensidad de color a 530 nm con un espectrofotómetro modelo 901 (Laboratorios Büchi-Technik AG, Flawil, Suiza). Aquellas muestras que mostraban color púrpura-rojo correspondían a bacterias con un grupo acilo en la pared celular del tipo glicolil. Las muestras que no mostraban color correspondían con bacterias con un grupo acilo en la pared celular del tipo acetilo.

La solución estándar empleada se preparó por dilución 100 veces a partir de una solución stock que contenía 76 mg de ácido glicólico (0.98 mg de glicolato sódico) en 10 ml de agua destilada. La preparación contenía 100 nmol de ácido glicólico en 100 µl de solución. Se preparó una curva estándar de ácido glicólico en el rango de 10-60 nmol del ácido.

Ácidos micólicos (Minnikin y col., 1975)

Los ácidos micólicos son ácidos grasos presentes en la pared celular de algunas bacterias y su presencia o ausencia se comprobó mediante cromatografía de capa fina. En primer lugar se realizó una metanolisis a partir de 100 mg de biomasa seca y extracción con metanol:tolueno:ácido sulfúrico concentrado (5:5:0.2 para un volumen de 10.2 ml). La metanolisis se llevó a cabo durante 16 horas a 50°C. Después de un enfriamiento se añadieron 2 ml de *n*-hexano a la

mezcla de extracción. A continuación se realizó el análisis de los extractos. Se añadieron 100 µl de cada extracto a una placa con gel de sílice (Polygram Sil G, Aldrich, U.S.A.). Los cromatogramas se desarrollaron con éter de petróleo:dietiléter (85:15, v/v). Los ácidos micólicos de bajo peso molecular se detectaron con vapor de yodo y los cromatogramas se redesarrollaron con metanol:agua (5:2, v/v). Los ácidos grasos, diferentes de los ácidos micólicos, se eluyeron de las placas. La detección final de manchas se realizó pulverizando la placa con el reactivo de ácido crómico y calentando a 150°C durante 5 minutos, de modo que los ácidos micólicos daban reacción coloreada.

2.4.2. Lípidos

Ácidos grasos

El análisis de los ácidos grasos se realizó según el protocolo indicado por el fabricante del sistema de identificación MIDI (Newark, Delaware, U.S.A.). Las células se cultivaron en medio TSAB, a 28°C, durante 24-48 horas, dependiendo de la cepa empleada. Se recogieron aproximadamente 40 mg de biomasa en un tubo de vidrio y se procedió a su saponificación. Para ello, se añadió 1 ml del reactivo 1, agitándose en un vortex durante 5-10 segundos y colocándose a continuación durante cinco minutos en un baño con agua a 100°C. Se agitó durante 5-10 segundos y se colocó en el baño durante 25 minutos. Después de los 30 minutos de saponificación, los tubos se colocaron en un baño con agua a temperatura ambiente para enfriarlos. Se procedió al segundo paso de metilación. Se añadieron 2 ml del reactivo 2, agitándose en un vortex durante 5-10 segundos y se colocaron durante 10 minutos en un baño a 80°C, enfriándose rápidamente pasado ese tiempo. El siguiente paso fue la extracción. Se añadieron 1.25 ml del reactivo 3, agitándose suavemente durante 10 minutos. Se eliminó la fase inferior y se conservó la fase superior. El cuarto y último paso consistía en añadir 3 ml del reactivo 4, agitándose suavemente durante 5 minutos, y después se recogieron 2/3 de la fase orgánica (fase superior) del tubo. Las muestras se

analizaron utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 (Hewlett-Packard, Palo Alto, California, U.S.A.) equipado con un detector de ionización de llama y una columna capilar de sílice [25 m x 0.20 mm x 0.33 μm , fenil metil silicona (Ultra-2 Hewlett-Packard)]. El gas portador fue hidrógeno. Las condiciones de temperatura fueron desde 170°C a 260°C, con una rampa de 5°C min^{-1} . Las temperaturas del inyector y del detector fueron 260°C y 280°C, respectivamente.

Menaquinonas

Las menaquinonas fueron extraídas como describieron Collins y col. (1977). La extracción se realizó utilizando cloroformo:metanol (2:1, v/v). La purificación se obtuvo por cromatografía de capa fina utilizando silicagel y empleando un solvente revelador compuesto por hexano-dietiléter (55:5, v/v). Las bandas correspondientes a las menaquinonas se visualizaron utilizando luz UV. Se recogió la zona correspondiente a cada banda y se diluyó con el solvente acetonitrilo-isopropanol (65:35, v/v). Estas bandas se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El sistema HPLC Shimadzu modelo LC-9A estaba compuesto por un desgasificador modelo DGU-3A, un horno modelo CTO-10AC, un autoinyector modelo SIL-9A y un detector espectrofotométrico de UV conectado a un integrador modelo C-R4AX. Las menaquinonas se eluyeron de una columna RP18 (25 cm x 4.6 mm [diámetro interno]) utilizando una solución de acetonitrilo:isopropanol (65:35, v/v) con un flujo de 1.3 ml/min a una temperatura de 20°C. La detección se efectuó a una longitud de onda de 269 nm.

Lípidos polares (Minnikin y col., 1979; Collins y Jones, 1980)

Los lípidos polares fueron extraídos a partir de 50 mg de biomasa seca. La extracción se realizó con una solución de cloroformo:metanol:solución acuosa de NaCl al 0.3% (50:100:40 para un volumen de 6.75 ml) durante 4 horas a temperatura ambiente. A continuación se añadió cloroformo (1.75 ml) y una solución acuosa de

NaCl al 0.3% (1.75 ml) para obtener un sobrenadante después de la centrifugación. Se eliminó la capa superior acuosa y la capa inferior se evaporó con nitrógeno a temperatura inferior a 37°C. Los patrones de lípidos polares se obtuvieron por cromatografía en capa fina bidimensional de los extractos lipídicos empleando placas (20 x 20 cm) con gel de sílice (0.5 mm) impregnadas en acetato sódico (Merck Silica gel H). Los cromatogramas se desarrollaron en la primera dimensión con cloroformo:metanol:agua (65:25:4 por volumen) y en la segunda dimensión con cloroformo:ácido acético:metanol:agua (80:18:12:5 por volumen). Se pulverizó con ácido molibdofosfórico al 10% con etanol y se calentó a 125°C durante 15 minutos.

2.4.3. Azúcares totales (Saddler y col., 1991; Hasegawa y col., 1983)

Los azúcares totales de la célula se determinaron como acetatos de alditol por cromatografía de gases-espectrometría de masas como describió Saddler y col. (1991) utilizando una columna capilar de sílice FFAP (25 m por 0.25 mm [diámetro interno]) y un programa de temperatura de 220 a 230°C, con una rampa de 1°C/min. Los distintos azúcares se diferencian por sus tiempos de retención. El cromatógrafo de gases utilizado fue el modelo GC-14A (Shimadzu Corp., Tokio, Japón) equipado con un detector de ionización de llama y un integrador. Para los análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas se empleó un modelo GCMS-QP2000 (Shimadzu Corp., Tokio, Japón).

Los azúcares totales, también se determinaron por cromatografía en capa fina siguiendo el método de Hasegawa y col. (1983) con algunas modificaciones. Para esta técnica se emplearon placas de celulosa y dos soluciones estándares de azúcares. Una de las soluciones contenía 4 mg de cada azúcar (galactosa, glucosa, arabinosa y ribosa) en 2 ml de agua destilada, y la otra solución contenía los azúcares manosa, xilosa y ramnosa. Se añadieron 5 µl de cada muestra y 3 µl de los estándares a la placa de celulosa. La cromatografía se realizó con solvente *n*-butanol:acetona:agua (2:5:1

por volumen) durante 3-4 horas. Las manchas se visualizaron al pulverizar la placa con revelador de azúcares y calentando a 100°C durante 5 minutos.

2.5. PRUEBAS MOLECULARES

Extracción de ADN genómico (Marmur, 1961)

El ADN genómico bacteriano se extrajo siguiendo el método descrito por Marmur (1961) con algunas modificaciones.

Las muestras (1-2 mg) se transfirieron a tubos de microcentrífuga y se resuspendieron en 400 µl de tampón TNE. La mezcla se homogeneizó empleando un agitador vortex Heidolph Reax 2000 (Heidolph, Schwabach, Alemania). A continuación, se lisaron las células mecánicamente mediante tres ciclos de congelación/descongelación (-80°C/65°C). La congelación se realizó en un ultra congelador Reuco (Reuco Scientific Inc. Asheville, Carolina del Norte, U.S.A.) a -80°C y la descongelación se realizó con un termoagitador Thermomixer 5436 (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) a 65°C con una agitación de 50 rpm. A continuación se añadieron detergentes. Cincuenta µl de *N*-lauril sarcosina al 20% mezclando bien la suspensión y 100 µl de Dodecilsulfato de Sodio (SDS) al 10% mezclando bien e invirtiendo suavemente los tubos. Se añadieron 20 µl de una solución de lisozima (10 mg/ml) y se incubó durante 30 minutos a 37°C. La lisozima colabora en la ruptura de la pared celular bacteriana de peptidoglicano. Transcurridos los 30 minutos, se añadieron 100 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y se incubó durante 3 horas a 50°C. La proteinasa K digiere las proteínas celulares. Tras esta incubación, se añadieron 65 µl de solución CTAB/NaCl, se mezcló suavemente e incubó durante 10 minutos a 65°C. Esta solución ayuda a disociar proteínas y facilitar la eliminación de algunos polisacáridos y otros compuestos. En el siguiente paso se



realizó una doble extracción con fenol y cloroformo para eliminar las proteínas y otros compuestos celulares. Se añadieron 750 μ l de fenol saturado en tampón TE (pH 8.0). Se mezcló suavemente invirtiendo los tubos durante 5 minutos y se centrifugó a 6000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. La fase superior (acuosa) donde se encuentra el ADN se transfirió a un nuevo tubo. La parte inferior (fenólica) donde se encontraban proteínas y restos celulares se desechó. Cuando se observaba una abundante interfase de color blanco entre la fase acuosa y la fase fenólica, se repitió la extracción con fenol. A la fase acuosa con ADN se añadieron 750 μ l de solución cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, v/v) y se mezcló suavemente invirtiendo los tubos durante 10 minutos. Se centrifugó a 6000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. La fase superior (acuosa) se transfirió a un nuevo tubo y se volvió a repetir la extracción con cloroformo:isoamil alcohol. Finalmente se procedió a la precipitación del ADN. Se añadieron 0.1 volúmenes de acetato sódico 3M y se mezcló suavemente. Se añadieron 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -20°C , se mezcló lentamente y se incubó en hielo durante 10-20 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 14000 x g durante 20 minutos a 4°C . Se eliminó el sobrenadante con cuidado de no resuspender el precipitado de ADN. El precipitado de ADN se lavó con 500 μ l de etanol al 70% (v/v) a temperatura ambiente y se centrifugó a 14000 x g durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se volvió a repetir el lavado con 500 μ l de etanol al 70%. Finalmente se dejó secar el precipitado de ADN a temperatura ambiente durante 30-40 minutos. El precipitado seco de ADN se resuspendió en 50 μ l de tampón TE (pH 8.0) durante toda la noche a 4°C . Para eliminar las moléculas de ARN se realizó una incubación de las muestras de ADN con RNasa A pancreática (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, concentración final) durante 2 horas a 37°C .

Se midió la concentración y calidad del ADN extraído espectrofotométricamente a 260 y 280 nm a partir de una dilución 1/100 de la solución de ADN obtenida utilizando un espectrofotómetro modelo U-1800 (Hitachi, Tokio, Japón) (Ausubel y col., 1992).

Amplificación del gen ARNr 16S

Un paso decisivo para identificar los aislamientos obtenidos es la secuenciación del gen ARN ribosómico 16S (Rosselló-Mora y Amann, 2001).

La amplificación se llevó a cabo por la "*Polymerase Chain Reaction (PCR)*". La mezcla de la reacción de amplificación (50 μ l) contenía: 1 μ l de ADN genómico (10-100 ng) , 5 μ l de tampón para PCR 10x Biotaq (Biolone, Randolph, Massachussets, U.S.A.), 1 μ l de una mezcla de los 4 nucleóticos (dNTP) Biotaq (10 mM), 1 μ l de cada uno de los cebadores 27F y 1522R (Tabla 2.1) (50 μ M) y 0.2 μ l de la ADN polimerasa Biotaq equivalente a 1 unidad. Se completó hasta 50 μ l con agua estéril libre de ADNasas y ARNasas (Sigma).

Para la amplificación de las secuencias del ADNr 16S se empleó un termociclador (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer) con el siguiente programa: Un ciclo de desnaturalización de 2 minutos a 95°C seguido de 35 ciclos con los pasos de: 15 segundos de desnaturalización a 95°C, 15 segundos de reasociación de oligonucleótidos a 55°C y 2 minutos de elongación a 72°C. Todo ello seguido por un ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos, finalizando a 4°C.

Tabla 2.1. Cebadores empleados para la amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S.

Cebador*	Secuencia	Referencia
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	Hicks y col., 1992
519F	5'-CAGCAGCCGCGGTAATAC-3'	Lane y col., 1985
907R	5'-AATTCCTTTGAGTTT-3'	Weisburg y col., 1991
1522R	5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'	Giovannoni, 1991

*F, se refiere al cebador sentido ("*foward*"); R, cebador antisentido ("*reverse*"); los prefijos (por ejemplo 27) se refieren a la localización del cebador en el gen del ARNr 16S utilizando *E. coli* como referencia.

Geles de agarosa

Para comprobar que la amplificación por PCR fue satisfactoria se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) con los productos de la reacción. Para ello se empleó un baño con tampón TAE 0.5x y una fuente de alimentación modelo EPS 600 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J., U.S.A.). Se mezclaron 5 µl de producto más 1 µl del colorante SYBR Green I (Molecular Probes, Eugene, U.S.A.). Paralelamente se utilizó un marcador λ /*Hind* III (Promega, U.S.A.) para verificar que las bandas electroforéticas correspondían con el tamaño esperado de 1500 pares de bases. La electroforesis se desarrolló durante 30 minutos a 85 voltios. El gel de agarosa se observó en un transiluminador de luz UV (Vilber Lourmat, Francia).

Purificación de los productos de PCR

Previamente a la secuenciación de los productos de PCR, se eliminaron los nucleóticos, cebadores y restos de enzima para que no influyeran en la reacción de secuenciación. Para ello se empleó el *kit* de purificación Jetquick (Genomed, Löhne, Alemania) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Secuenciación

Los fragmentos amplificados del ADN de las cadenas sentido y antisentido se secuenciaron en un secuenciador capilar modelo ABI 3700 (Applied Biosystems, Foster City, California, U.S.A.). Las secuenciaciones se llevaron a cabo en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, CSIC, Madrid). Para la secuenciación se emplearon los cebadores 27F, 519F, 907R y 1522 R (Tabla 2.1) obteniéndose las secuencias correspondientes a las dos hebras del fragmento de ADN estudiado. Las cuatro secuencias obtenidas sirvieron para obtener la secuencia del gen amplificado (aproximadamente 1500 bases) utilizando el programa Phred/Phrap/Consed (Gordon y col., 1998).

Identificación de secuencias

La homología de las secuencias se realizó utilizando el algoritmo BLAST (Altschul y col., 1990). Este algoritmo de búsqueda utiliza una secuencia de fragmentos cortos de la secuencia analizada para encontrar secuencias homólogas entre bases de datos de ADN. Se empleó la interfase disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> en el NCBI (National Centre for Biotechnology Information).

Análisis de datos

Los alineamientos de las secuencias del gen ARNr 16S obtenidas y sus relaciones filogenéticas se realizaron por el método de *neighbor joining* utilizando el software ARB (Ludwig y col., 2004). El software

ARB es un paquete integrado para el manejo de secuencias y su análisis filogenético que permite una edición manual de los alineamientos considerando la estructura secundaria de las moléculas de ARN analizadas.

El método de *neighbor joining* construye un árbol encontrando progresivamente las secuencias más próximas que minimizan la longitud de las ramas (Saitou y Nei, 1987).

Hibridación

El grado de asociación del ADN entre las cepas aisladas y las especies de *Agromyces* previamente descritas se determinó siguiendo un método de desnaturalización térmica recientemente descrito por Gonzalez y Saiz-Jimenez (2005). El método se basa en determinar las diferencias en las temperaturas de desnaturalización del ADN genómico monoespecífico (homodúplex) y ADN híbrido (heterodúplex) obtenido de la hibridación de ADN genómicos de las dos cepas que se desean comparar.

El parámetro empleado para la estimación de la asociación del ADN, ΔT_m , fue la diferencia entre la T_m de la cepa referencia y la T_m del ADN híbrido. La T_m es la temperatura de fusión o el punto de desnaturalización térmica que corresponde con la temperatura a la cual el 50% del ADN se encuentra en estado de doble hebra y el 50% en estado monocatenario (desnaturalizado, como hebra simple). Es una medida de la estabilidad de los híbridos. Para estimar la ΔT_m , primero, el ADN genómico total purificado (5 μg de ADN) y las mezclas de ADN de especies relacionadas se desnaturalizaron y renaturalizaron a la temperatura óptima de renaturalización ($[T_{or}]$ De Ley y col., 1970). T_{or} puede ser estimada a partir del contenido G+C (mol%) de las cepas bajo estudio empleando la ecuación $T_{or}=0.51(\%GC)+47.0$, existiendo un rango de seguridad de unos 15°C alrededor del valor de T_{or} estimado (De Ley y col., 1970) . Las condiciones térmicas consistían en un paso de desnaturalización de 99°C durante 10

minutos, seguido por un período de reasociación de 8 horas a T_{or} . A este paso le siguieron pasos sucesivos de 60 minutos, cada uno a 10°C por debajo del paso anterior, hasta la temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Los ADN heterodúplex y ADN homodúplex se mantuvieron a 4°C hasta que se realizó el experimento de desnaturalización térmica. La desnaturalización térmica se llevó a cabo en una solución de SSC 0.1x (De Ley y col., 1970). El pH de esta solución a la temperatura de desnaturalización es estable, alrededor de 8.0, que es el pH óptimo para la fluorescencia máxima del colorante utilizado (SYBR Green I).

La desnaturalización térmica se cuantificó a partir de medidas de fluorescencia, utilizando un termociclador de PCR de tiempo real (iQ-iCycler, Bio-Rad, Hercules, California) y el software asociado. Se empleó el colorante SYBR Green I (Molecular Probes, Eugene, O., U.S.A.) que muestra una fluorescencia máxima con excitación y emisión a las longitudes de onda de 497 y 520 nm, respectivamente. Este colorante es específico para el marcado de ADN de doble híbrido. Se añadió la solución de SYBR Green I (concentración final 1:100000) a todos los pocillos que contenían soluciones de ADN en una placa de PCR de 96 pocillos. El experimento comenzó con un periodo de 15 minutos a temperatura ambiente (25°C), seguido por una rampa de $25\text{-}100^{\circ}\text{C}$ a $0.2^{\circ}\text{C}/\text{s}$. Las medidas de fluorescencia se realizaron en cada paso durante esta rampa. Las curvas de fusión se llevaron a cabo al menos por duplicado. Las diferencias de valores de T_m del ADN genómico total de las soluciones de ADNs homodúplex y heterodúplex fueron calculadas de acuerdo a las temperaturas que correspondían al 50% de disminución de la fluorescencia inicial. Los valores de ΔT_m entre el ADN homodúplex y heterodúplex de 5°C o más se consideraron que correspondían a especies microbianas diferentes. (Wayne y col., 1987; Rosselló-Mora y Amann, 2001).

Medida del contenido G+C

El contenido G+C (mol%) de ADN se determinó siguiendo el método fluorométrico descrito por Gonzalez y Saiz-Jimenez (2002) basado en la temperatura de desnaturalización térmica del ADN genómico de las cepas analizadas.

El ADN de doble cadena se tiñó específicamente con el colorante SYBR Green I (Molecular Probes, Eugene, Ore., U.S.A.), y su desnaturalización térmica se siguió por medida de la disminución de la fluorescencia empleando un termociclador de PCR de tiempo real (Bio-Rad, Hercules, California). El contenido G+C (mol%) se estimó considerando la relación existente entre el contenido G+C y la temperatura de fusión (T_m) según la expresión: $\%GC = 1.98 T_m - 106.91$.

La desnaturalización térmica se llevó a cabo en una solución de SSC 0.1x (De Ley y col., 1970) conteniendo 5 μ g de ADN genómico de la cepa a analizar. La fluorescencia la generaba el colorante SYBR Green I utilizando una concentración final de 1:100000 en un ciclo que comenzó con un periodo de 15 minutos a temperatura ambiente (25°C), seguido por una rampa de 25-100°C a 0.2°C/s. La temperatura de máxima desnaturalización se determinó como el punto con máxima derivada negativa a la curva de desnaturalización.

2.6. MEDIOS DE CULTIVO

Agar Nutritivo (Difco, Detroit, Michigan, U.S.A.)

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	5.0 g
Agua destilada	1000ml

Caldo de triptona-soja (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra)

Caseína digerida por enzimas pancreáticas	17.0 g
Harina de soja digerida por enzimas	3.0 g
NaCl	5.0 g
K ₂ HPO ₄	2.5 g
Glucosa	2.5 g
Agua destilada	1000ml

Caldo de triptona-soja BBL (Becton Dickinson and Company, Cockeysville, U.S.A.)

Caseína digerida por enzimas pancreáticas	17.0 g
Harina de soja digerida por enzimas	3.0 g
NaCl	5.0 g
K ₂ HPO ₄	2.5 g
Dextrosa	2.5 g
Agua destilada	1000ml

Caldo nutritivo (Difco, Detroit, Michigan, U.S.A.)

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	5.0 g
Agua destilada	1000ml

Medio ácidos orgánicos

NaCl	1.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1.0 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g

Ácido orgánico (sales de sodio)	2.0 g
Agar	20.0 g

Disolver en 800 ml de agua destilada. Disolver las sales de sodio en 200 ml de agua destilada y añadir a los 800 ml de medio. Ajustar el pH a 6.8, añadir 4 ml de solución rojo fenol al 0.2% y esterilizar en autoclave a 115°C durante 20 minutos. (*Nota:*) Los ácidos orgánicos utilizados como sales de sodio incluyen: acetado, aconitato, benzoato, citrato, malato, succinato y tartrato.

Medio almidón

Agar nutritivo (NA)	23.0 g
Almidón de patata	10.0 g

Disolver en 800 ml de agua destilada y ajustar el pH a 6.8. Completar hasta 1000 ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Medio API 50 CHB/E (BioMerieux, Marcy Létoile, France)

Sulfato amónico	2.0 g
Extracto de levadura	0.5 g
Triptona (origen bovino/porcino)	1.0 g
Fosfato disódico	3.22 g
Fosfato monopotásico	0.12 g
Solución de oligoelementos	10.0 ml
Rojo fenol	0.17 g
Agua destilada	1000 ml
pH 7.4-7.8 a 20-25°C	

Medio Ba1

Acetato bórico	2.5 g
Extracto de levadura	4.0 g
Agar	15.0 g

Disolver en 800 ml de agua destilada y ajustar el pH a 8.0 empleando NaOH. Completar hasta 1000 ml de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Medio B4

Acetato cálcico	2.5 g
Extracto de levadura	4.0 g
Glucosa	10.0 g
Agar	15.0 g

Disolver en 800 ml de agua destilada y ajustar el pH a 8.0 empleando NaOH. Completar hasta 1000 ml de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Medio caseína

Agar nutritivo (NA), doblemente concentrado	500 ml
Leche descremada (Difco)	500 ml

Preparar el medio NA con doble cantidad de agar y esterilizar a 121°C durante 20 minutos.

Disolver 50.0 g de leche descremada en polvo en 400 ml de agua destilada y ajustar hasta 500 ml con agua destilada. Esterilizar la leche descremada a 115°C durante 10 minutos.

Mantener los dos medios a 60°C y añadir los 500 ml de leche descremada a los 500 ml de NA. Mezclar.

Medio esculina

Bacto-peptona (Difco)	15.0 g
Esculina	1.0 g
Citrato férrico	0.5 g
Agar	15.0 g

Disolver en 800 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.0 y completar hasta 1000 ml con agua destilada.

Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 115°C durante 20 minutos.

Medio glicerol (1:1)

K ₂ HPO ₄	12.6 g
KH ₂ PO ₄	3.6 g
Citrato de sodio	0.9 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g

(NH ₄) ₂ SO ₄	0.9 g
Glicerol	88.0 g

Disolver en 800 ml de agua destilada y completar hasta 1000 ml con agua destilada.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Medio indol

Bacto-peptona (Difco)	10.0 g
NaCl	5.0 g
L-triptófano	1.0 g

Disolver en 800 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.2-7.3 y completar hasta 1000 ml con agua destilada.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Medio M2

Acetato cálcico	10.0 g
Acetato magnésico	20.0 g
Bacto casitona (Difco)	10.0 g
K ₂ CO ₃ · 1/2H ₂ O	2.0 g
Agar	18.0 g

Disolver en 800 ml de agua destilada y ajustar el pH a 8.0 empleando NaOH. Completar hasta 1000 ml de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Medio Mg

Acetato magnésico	2.5 g
Extracto de levadura	4.0 g
Glucosa	10.0 g
Agar	15.0 g

Disolver en 800 ml de agua destilada y ajustar el pH a 8.0 empleando NaOH. Completar hasta 1000 ml de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Medio NA

Agar nutritivo 23.0 g

Agua destilada 1000ml

Disolver y ajustar el pH a 6.8. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Medio NH

Acetato amónico 2.5 g

Extracto de levadura 4.0 g

Glucosa 10.0 g

Agar 15.0 g

Disolver en 800 ml de agua destilada y ajustar el pH a 8.0 empleando NaOH. Completar hasta 1000 ml de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Medio NR

Caldo nutritivo 8.0 g

KNO₃ 1.0 g

Disolver en 800 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.3-7.4 y completar hasta 1000 ml con agua destilada.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Medio OM79 (Prauser y Falta, 1968)

Dextrosa 10.0 g

Bacto-peptona (Disco) 10.0 g

Hidrolizado de caseína 2.0 g

Extracto de levadura 2.0 g

NaCl 6.0 g

Disolver en 800 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.5 y completar hasta 1000 ml con agua destilada.

Para preparar medio sólido se añaden 10 g/l de agar.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Medio PY-BHI Agar (Yokota y col., 1993)

Peptona	10.0 g
Extracto de levadura	2.0 g
Agar infusión cerebro-corazón	2.0 g
NaCl	2.0 g
D-glucosa	2.0 g

Disolver en 800 ml de agua destilada y ajustar a pH 7.0. Completar hasta 1000 ml con agua destilada.

Medio RM-VP

Bacto- peptona (Difco)	7.0 g
K ₂ HPO ₄	5.0 g
Glucosa	5.0 g

Disolver en 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7.5 y distribuir de 2-3 ml en tubos de vidrio. Esterilizar en autoclave a 115°C durante 20 minutos.

Medio sulfuro de hidrógeno

Agar infusión cerebro-corazón (BHI)	52.0 g
Cisteína	1.0 g

Disolver en 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7 y distribuir 4 ml en tubos de vidrio. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Medio Sr2

Nitrato de estroncio	1.0 g
Glucosa	5.0 g
Agar	20.0 g

Disolver en 800 ml de agua destilada y ajustar el pH a 8.0 empleando NaOH. Completar hasta 1000 ml de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Medio TSA

Caldo de triptona-soja 30.0 g

Disolver en 800 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.5 y completar hasta 1000 ml con agua destilada. Para preparar medio sólido se añaden 20 g/l de agar. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Medio TSAB

Caldo de triptona-soja (BBL) 30.0 g

Disolver en 800 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.5 y completar hasta 1000 ml con agua destilada.

Para preparar medio sólido se añaden 20 g/l de agar (BBL).

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Medio Tween 80

Bacto-peptona (Difco) 10.0 g

NaCl 5.0 g

CaCl₂·H₂O 0.1 g

Agar 9.0 g

Disolver en 800 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.4 y completar hasta 1000 ml con agua destilada.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Esterilizar el compuesto Tween 80 a 121°C durante 20 minutos separadamente.

Enfriar el medio a 45-50°C, y añadir Tween 80 estéril para obtener una concentración final de 1%.

Medio ureasa

Bacto-peptona (Difco) 1.0 g

NaCl 5.0 g

K₂HPO₄ 2.0 g

Agar 9.0 g

Disolver en 800 ml de agua destilada, ajustar el pH a 6.8 y completar hasta 1000 ml con agua destilada.

Añadir 6 ml de solución rojo fenol al 0.2% (p/v) y esterilizar en autoclave a 115°C durante 20 minutos.

Una vez autoclavado, se añaden 100 ml de la solución urea+glucosa esterilizada por filtración a los 1000 ml de medio autoclavado.

2.7. REACTIVOS Y SOLVENTES

Reactivo 1

NaCl	45.0 g
Metanol	150 ml
Agua destilada	150 ml

Mezclar el agua y el metanol. Disolver el NaCl en la solución con agitación.

Reactivo 2

HCl 6 N	325 ml
Metanol	275 ml

Añadir el ácido al metanol con agitación.

Reactivo 3

Hexano	200 ml
Metil-terbutil-éter (MTBE)	200 ml

Añadir el MTBE al hexano con agitación.

Reactivo 4

NaOH	10.8 g
Agua destilada	900 ml

Disolver el NaOH en agua con agitación.

Reactivo ácido crómico

$K_2Cr_2O_7$	5.0 g
--------------	-------

Disolver el $K_2Cr_2O_7$ en 5 ml de agua destilada y añadir hasta 100 ml de H_2SO_4 concentrado. Completar con agua destilada hasta 1000 ml.



Reactivo ácido molibdofosfórico al 10% (p/v)

Ácido molibdofosfórico	10.0 g
------------------------	--------

Disolver el ácido en etanol absoluto y añadir etanol hasta completar 100 ml.

Reactivo A de Voges-Proskauer (Difco)

Alfa-naftol	5.0 g
Etanol absoluto	100 ml

Reactivo B de Voges-Proskauer (Difco)

KOH	40.0 g
Agua destilada	100 ml

Reactivo DON

2,7-hidroxinaftaleno	0.02 g
Ácido sulfúrico (96%)	100 ml

Reactivo de Kovacs

<i>p</i> -Dimetilaminobenzaldehido	3.0 g
Pentanol o Butanol	75.0 ml
HCl concentrado	25.0 ml

Disolver el aldehido en alcohol a 50-55°C. Enfriar y añadir el ácido concentrado. Proteger de la luz y mantener en el refrigerador.

Reactivo Ninhidrina

Ninhidrina	35.0 g
Acetona	50 ml
Butanol	50 ml

Mezclar la acetona y el butanol y añadir la ninhidrina. Proteger de la luz y mantener en el refrigerador.

Reactivo NIT 1 (BioMerieux)

Ácido sulfanílico	0.4 g
Acetato sódico	30.0 g
Agua destilada	70.0 ml

Reactivo NIT 2 (BioMerieux)

<i>N,N</i> -dimetil-1-naftilamina	0.6 g
Acetato sódico	30.0 g
Agua destilada	70.0 ml

Reactivo ZYM A (BioMerieux)

Tris(hidroximetil)-aminometano	25.0 g
HCl al 37%	11.0 ml
Laurilsulfato Na	10.0 g
Agua destilada	100 ml

Reactivo ZYM B (BioMerieux)

Fast Blue BB	0.35 g
2-metoxietanol	100 ml

Revelador de azúcares

Ácido ftálico	1.6 g
Agua	4.0 ml
Butanol	48.0 ml
Acetona	48.0 ml
Anilina	1.0 ml

Solvente Rhuland

Piridina	10.0 g
Metanol	80.0 ml
HCl 10 <i>N</i>	2.50 ml
Agua	17.5 ml

2.8. SOLUCIONES Y TAMPONES

Solución acetato de sodio 3 M (pH 5.25)

Acetato de sodio trihidratado 40.81 g

Disolver el acetato de sodio trihidratado en 200 ml de agua destilada y ajustar el pH a 5.25 empleando ácido acético glacial. Añadir agua destilada hasta un volumen final de 250 ml. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Solución adenina

Adenina 6.0 g

Disolver en 100 ml de agua destilada.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Solución CTAB/NaCl

NaCl 4.1 g

Bromuro de *N*-cetil-*N,N,N*-trimetilamonio (CTAB) 10.0 g

Disolver el NaCl en 80 ml de agua destilada. Añadir lentamente el CTAB mientras se agita. Si fuese necesario, calentar a 65°C para disolver y ajustar hasta un volumen final de 100 ml.

Solución EDTA 0.5 M (pH 8.0)

EDTA 186.1 g

Disolver el EDTA en 800 ml de agua destilada y ajustar el pH a 8.0 empleando NaOH para disolver el EDTA. Añadir agua destilada hasta un volumen final de 1000 ml. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Solución etanol al 70% (v/v)

Etanol absoluto 70.0 ml

Agua destilada 30.0 ml

Solución HCl 4 N

HCl 12 N	33.3 ml
Agua destilada	66.7 ml

Añadir el HCl al agua y mezclar bien hasta homogeneizar.

Solución HCl 6 N

HCl 12 N	50.0 ml
Agua destilada	50.0 ml

Añadir el HCl al agua y mezclar bien hasta homogeneizar.

Solución hipoxantina

Hipoxantina	6.0 g
-------------	-------

Disolver en 100 ml de agua destilada.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Solución hipurato

Hipurato de sodio	1.0 g
-------------------	-------

Disolver en 100 ml de agua destilada.

Solución lisozima

Disolver 10 mg de lisozima en 1 ml de tampón TE (pH 7.5). Mantener la solución a -20°C.

Solución lugol

Iodo	0.33 g
Yoduro potásico (IK)	0.67 g

Disolver en 100 ml de agua destilada.

Solución Na₂CO₃ al 20% (p/v)

Na ₂ CO ₃	20.0 g
---------------------------------	--------

Disolver el Na₂CO₃ en agua destilada y ajustar hasta un volumen final de 100 ml.

Solución de NaCl 5 M

NaCl 292.2 g

Disolver el NaCl en 800 ml de agua destilada y ajustar el volumen a 1000 ml. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Solución NaCl al 0.3% (p/v)

NaCl 3.0 g

Disolver en 1000 ml de agua destilada.

Solución NaCl al 0.9% (p/v)

NaCl 9.0 g

Disolver en 1000 ml de agua destilada.

Solución *N*-lauril sarcosina al 20% (p/v)

N-lauril sarcosina sódica 20.0 g

Disolver y ajustar el volumen hasta 100 ml con agua destilada.

Solución proteinasa K

Disolver 20 mg de proteinasa K en 1 ml de tampón TE (pH 7.5). Incubar a 45°C durante 1 hora. Mantener la solución a -20°C.

Solución de ARNasa

Disolver 20 mg de ARNasa libre de ADNasa en 200 µl de tampón TE (pH 7.5). Mantener a -20°C.

Solución rojo de metilo

Rojo de metilo 0.25 g

Etanol 100 ml

El rojo de metilo es un indicador de pH que produce color rojo a pH<4.5 y amarillo a pH>4.5.

Solución rojo fenol al 0.2% (p/v)

Rojo fenol 0.2 g

0.1 N NaOH 8.0 ml

Agua destilada 92.0 ml

El rojo fenol es un indicador de pH que produce color rojo a $\text{pH} > 6.8$ y amarillo a $\text{pH} < 6.8$.

Solución SDS al 10% (p/v)

Dodecilsulfato de sodio (SDS) 10.0 g

Agua destilada 90.0 ml

Añadir el SDS al agua y calentar a 68°C para disolver. Ajustar el pH a 7.2 empleando HCl concentrado y añadir agua destilada hasta 100 ml.

Solución SDS al 20% (p/v)

Dodecilsulfato de sodio (SDS) 20.0 g

Agua destilada 90.0 ml

Añadir el SDS al agua y calentar a 68°C para disolver. Ajustar el pH a 7.2 empleando HCl concentrado y añadir agua destilada hasta 100 ml.

Solución SSC 0.1x

Añadir 0.5 ml de la solución SSC 20x a 99.5 ml de agua destilada.

Solución SSC 20x

NaCl 17.5 g

$\text{Na}_3\text{Citrato} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 8.8 g

Disolver en 80 ml de agua destilada y ajustar a pH 7.0 empleando HCl 1 M. Completar con agua destilada hasta 100 ml.

Solución tetrametil-*p*-fenilendiamina al 1% (p/v)

Tetrametil-*p*-fenilendiamina 1.00 g

Disolver en 99 ml de agua destilada.

Solución tirosina

Tirosina 4.8 g

Disolver en 100 ml de agua destilada.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Solución Tris-HCl 1 M (pH 8.0 o 7.5)

Base Tris(hidroximetil)-aminometano 121 g

Disolver la base tris(hidroximetil)-aminometano en 800 ml de agua destilada y ajustar el pH a 8.0 o 7.5 empleando HCl concentrado. Ajustar el volumen hasta 1000 ml con agua destilada. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Solución urea+glucosa

Urea 20.0 g

Glucosa 10.0 g

Agua destilada 100 ml

Esterilizar por filtración.

Solución xantina

Xantina 6.0 g

Disolver en 100 ml de agua destilada.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Tampón fosfato pH 7.9

KH_2PO_4 9.078 g/l=A 4.5 ml

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 11.876 g/l=B 95.5 ml

Preparar las soluciones A y B por separado. Añadir 4.5 ml de la solución A en 95.5 ml de la solución B para obtener un pH de 7.9.

Tampón TAE 50x

Base Tris(hidroximetil)-aminometano 242 g

Ácido acético glacial 57.1 ml

EDTA 37.2 g

Ajustar el volumen a 1000 ml de agua destilada. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

Tampón TAE 0.5x

Añadir 10 ml de TAE 50x a 990 ml de agua destilada.

Tampón TE (pH 8.0 o pH 7.5)

Tris-HCl 1 M (pH 8.0 o pH 7.5)	1.0 ml
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	0.2 ml
Agua destilada	98.8 ml

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Tampón TNE

Tris-HCl 1 M (pH 8.0)	1.0 ml
NaCl 5M	2.0 ml
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	0.2 ml
Agua destilada	96.8 ml

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

CAPITULO 3

RECLASIFICACION DE *Agromyces fucosus* subesp. *hippuratus* como *Agromyces hippuratus* y nueva descripción de *Agromyces fucosus*

RECLASIFICACIÓN DE *Agromyces fucosus* subesp. *hippuratus* COMO *Agromyces hippuratus* Y NUEVA DESCRIPCIÓN DE *Agromyces fucosus*

Durante el estudio para identificar las cepas de *Agromyces* aisladas de cuevas y catacumbas, se realizaron análisis filogenéticos basados en las secuencias del gen del ARNr 16S de *A. fucosus* subesp. *fucosus* VKM Ac-1345^T (1473pb; AY158025) y *A. cerinus* subesp. *nitratum* VKM Ac-1351^T (1465 pb; AY277619) secuenciadas durante este estudio, así como las secuencias del gen del ARNr 16S de otras cepas de *Agromyces* disponibles en las bases de datos de ADN del NCBI. Los resultados mostraron que *A. fucosus* subesp. *fucosus* VKM Ac-1345^T y *A. fucosus* subesp. *hippuratus* VKM Ac-1352^T mostraban diferencias en sus secuencias del gen ARNr 16S presentando un 97.8% de similitud en este gen. Las similitudes de las secuencias del gen ARNr 16S entre las cepas tipo de diferentes especies de *Agromyces* descritas hasta el momento estaban en el rango del 96.5-98.5% para secuencias por encima de 1400 pb. La Figura 3.1 muestra la existencia de una distancia filogenética importante entre las cepas descritas como *A. fucosus* subesp. *fucosus* y *A. fucosus* subesp. *hippuratus* y otras especies del género *Agromyces*.

Se determinó el grado de relación entre los ADNs de *A. fucosus* subesp. *fucosus* VKM Ac-1345^T y *A. fucosus* subesp. *hippuratus* VKM Ac-1352^T con medida de la diferencia entre el punto de desnaturalización térmica de los ADN homodúplex y ADN heterodúplex (ΔT_m). Se encontró una ΔT_m de 5.6°C entre *A. fucosus* subesp. *fucosus* y *A. fucosus* subesp. *hippuratus*, que estaba ligeramente por encima del valor de 5°C recomendado como umbral para diferenciar cepas pertenecientes a especies distintas (Rosselló-Mora y Amann, 2001). Este resultado era acorde con los valores de similitud entre los ADNs (45-47%) presentados para estas cepas por Suzuki y col. (1996). Estos datos sugerían que *A. fucosus* subesp. *fucosus* y *A. fucosus* subesp. *hippuratus* podrían pertenecer a diferentes especies.

En base a los datos publicados previamente, no fue posible concluir sin ambigüedades si *A. fucosus* subesp. *hippuratus* representaba una especie separada dentro del género *Agromyces*, porque su relación con *A. cerinus* subesp. *nitratus* no estaba clara. Nuestro análisis filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S mostró que *A. fucosus* subesp. *hippuratus* VKM Ac-1352^T era diferente de *A. cerinus* subesp. *nitratus* VKM Ac-1351^T y *A. cerinus* subesp. *cerinus* VKM Ac-1340^T (Figura 3.1), mostrando en ambos casos un 98.5% de similitud entre sus secuencias del gen del ARNr 16S para estas cepas, respectivamente. Las comparaciones entre el ADN genómico de *A. fucosus* subesp. *hippuratus* VKM Ac-1352^T y *A. cerinus* subesp. *nitratus* VKM Ac-1351^T revelaron una ΔT_m de 9.6°C, sugiriendo que estas cepas pertenecían a especies diferentes ya que la ΔT_m era superior a los 5°C recomendados (Rosselló-Mora y Amann, 2001). Los análisis similares realizados con las cepas tipo de *A. cerinus* subesp. *cerinus* y *A. cerinus* subesp. *nitratus* revelaron una ΔT_m baja (4.1°C) y confirmaron la estrecha similitud entre sus ADNs, como presentaron Zgurskaya y col. (1992) y Suzuki y col. (1996).

A nivel fenotípico, *A. fucosus* subesp. *hippuratus* difería de *A. fucosus* subesp. *fucosus* y de las subespecies de *A. cerinus* con respecto a la composición de los ácidos teicoicos de la pared celular,

polímeros que contienen carbohidratos solubles en agua unidos covalentemente a peptidoglicanos por enlaces fosfodiéster y que aparecen en muchas bacterias Gram-positivas (Baddiley, 1972; Naumova y col., 2001). *A. fucosus* subesp. *hippuratus* contenía 1,5-poli(ribitol fosfato) con sustituyentes tetrasacáridos (Gnilozub y col., 1994; Naumova y col., 2001) mientras *A. fucosus* subesp. *fucosus* contenía 1,3-poli(glicerol fosfato) con sustituyentes β -*N*-acetilglucosamina (Malysheva, 1994). *A. cerinus* subesp. *cerinus* contenía el ácido poli(arabitol fosfato) teicoico, y *A. cerinus* subesp. *nitratus* contenía el polímero poli(ribofuranosilribitol fosfato) en la pared celular (Shashkov y col., 1993, 1995; Malysheva, 1994; Naumova y col., 2001). Estos datos confirmarían una diferenciación fenotípica entre *A. fucosus* subesp. *hippuratus* y otras especies reconocidas (Zgurskaya y col., 1992; Suzuki y col., 1996; Takeuchi y Hatano, 2001; Li y col., 2003; Dorofeeva y col., 2003). Además, los representantes de las subespecies de *A. fucosus* se separaron por diferir en la composición de poliamina (Altenburger y col., 1997); por ejemplo, *A. fucosus* subesp. *fucosus* contenía putrescina y 1,3-diaminopropano mientras que *A. fucosus* subesp. *hippuratus* contenía putrescina y espermidina.

Los perfiles de ácidos grasos de las cepas tipo de *A. fucosus* subesp. *fucosus* y *A. fucosus* subesp. *hippuratus* mostraron sólo ligeras diferencias en sus porcentajes de ácidos grasos *iso*- y *anteiso*-15:0 a 17:0, aunque ello parecía ser de poco valor para la diferenciación de especies dentro del género *Agromyces* (Tabla 3.1.).

Tabla 3.1. Composición de ácidos grasos de *A. fucosus* subesp. *hippuratus* y *A. fucosus* subesp. *fucosus*.

Ácidos grasos	<i>A. fucosus</i> subesp. <i>hippuratus</i>	<i>A. fucosus</i> subesp. <i>fucosus</i>
<i>iso</i> -C _{14:0}	0.9 %	0.6 %,
<i>n</i> -C _{14:0}	0.2 %	0.4 %
<i>iso</i> -C _{15:0}	10.5 %	6.4 %
<i>anteiso</i> -C _{15:0}	51.7 %	47.2 %
<i>n</i> -C _{15:0}	0.1 %	0.1 %
<i>iso</i> -C _{16:0}	14.3 %	14.6 %
<i>n</i> -C _{16:0}	1.5 %	1.0 %
<i>iso</i> -C _{17:0}	1.9 %	2.3 %
<i>anteiso</i> -C _{17:0}	18.1 %	27.5 %
<i>n</i> -C _{18:0}	0.1 %	0.2 %

Basándonos en el análisis de la secuencia del gen del ARNr 16S, los valores de similitud entre los ADNs y diferencias en las características fenotípicas obtenidas en este y en estudios anteriores (Zgurskaya y col., 1992; Suzuki y col., 1996; Takeuchi y Hatano, 2001; Dorofeeva y col., 2003), se propuso reclasificar *A. fucosus* subesp. *hippuratus* como una nueva especie, *Agromyces hippuratus* (cepa tipo VKM Ac-1352^T), y corregir la descripción previa de *A. fucosus* (Zgurskaya y col., 1992).

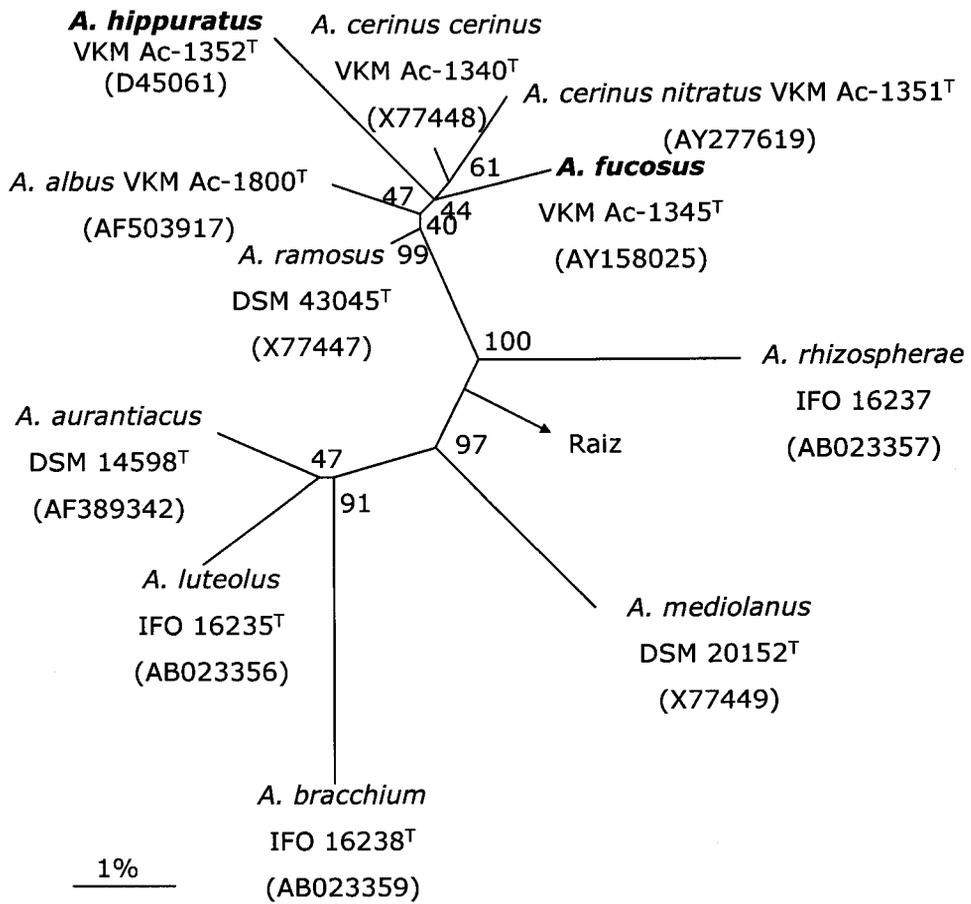


Fig. 3.1. Árbol filogenético que muestra las relaciones entre las secuencias del gen del ARNr 16S de las especies de *Agromyces*. Se muestran las cepas utilizadas y los números de acceso para sus secuencias. Los números *bootstrap* representan porcentajes obtenidos a partir de 1000 pruebas. Se indica el 1% de diferencias en las secuencias de nucleótidos.

3.1. DESCRIPCIÓN DE LA NUEVA ESPECIE *Agromyces hippuratus*

Agromyces hippuratus (hip.pu.ra´tus. N.L. n. *hippuratus* hipurato; N.L. masc. adj. *hippuratus* relacionado con hipurato, asociado a la habilidad de descomponer hipurato).

Basónimo: *Agromyces fucosus* subesp. *hippuratus* Zgurskaya y col. 1992.

La descripción está basada en los datos fenotípicos de Zgurskaya y col. (1992), Gnilozub y col. (1994), Malysheva (1994), Groth y col. (1996), Suzuki y col. (1996), Altenburger y col. (1997), y Dorofeeva y col. (2003), además de los aportados en este estudio.

Las colonias en medio nutritivo son opacas, enteras, convexas y normalmente penetran en el agar. Produce un pigmento carotenoide amarillo. Hifas ramificadas (diámetro, 0.2-0.6 μm) que se rompen en fragmentos inmóviles, irregulares y con forma difteroide y bacilar. Aerobios, catalasa y oxidasa positivas. El crecimiento óptimo tiene lugar entre 26-30°C. Las cepas son capaces de crecer a 7°C; mientras lo hace débilmente o no crecen a 37°C. Utilizan para el crecimiento como fuentes de carbono la D-arabinosa, celobiosa, D-fructosa, D-galactosa, D-glucosa, maltosa, D-manosa, melecitosa, melibiosa, L-ramnosa, salicina, sacarosa, trehalosa y D-xilosa. No utilizan como fuentes de carbono en el mismo medio el adonitol, dulcitol, meso-inositol, lixosa, D-manitol, metil- β D-arabinopiranosido y L-sorbosa. Produce ácido a partir de D-arabinosa, glicerol y L-ramnosa; y no lo produce a partir de celobiosa, inulina, lactosa, maltosa, rafinosa, D-ribosa, salicina o trehalosa. La producción de ácido a partir de L-arabinosa y sacarosa es variable. Utiliza fumarato, hipurato, malato y piruvato. No se observan reacciones alcalinas con ascorbato, citrato, gluconato, oxalato, propionato, salicilato, succinato y tartrato; algunas cepas muestran reacción positiva con *trans*-aconitato. El nitrato es

reducido a nitrito. Produce tirosinasa. Hidroliza esculina, hipoxantina y almidón. No descompone o hidroliza adenina, elastina, guanina, pectina, testosterona, urea y xantina. No hidroliza normalmente la caseína. Es indol negativo. No hay crecimiento en medio suplementado con 5% de NaCl, 0.01% de azida sódica o 0.0175% de telurito de potasio. La menaquinona mayoritaria es MK-12 con cantidades menores de MK-13. El contenido en poliamina es bajo; putrescina y espermidina son compuestos predominantes (datos para la cepa tipo). Los azúcares de la pared celular son ramnosa, galactosa y trazas de manosa. La pared celular contiene el ácido 1,5-poli(ribitol fosfato) teicoico. El contenido G+C del ADN es de 71 mol%. Aislado del suelo.

La cepa tipo es VKM Ac-1352^T (=JCM 9086^T). El número de acceso para la secuencia del gen del ARNr 16S de esta cepa es D45061.

3.2. DESCRIPCION REVISADA DE *Agromyces fucosus*

La descripción está basada en datos fenotípicos de Zgurskaya y col. (1992), Malysheva (1994), Groth y col. (1996), Suzuki y col. (1996), Alterburger y col. (1997), y Dorofeeva y col. (2003), además de los aportados en este estudio.

Las colonias en medio nutritivo son opacas, enteras y convexas y ocasionalmente penetran en el agar. Produce un pigmento carotenoide amarillo. Las hifas ramificadas (diámetro, 0.2-0.6 µm) se rompen en fragmentos inmóviles, irregulares, con forma difteroide y bacilar. Catalasa y oxidasa positivas. El crecimiento óptimo tiene lugar entre 26-30°C. Las cepas son capaces de crecer a 7°C; no crecen o crecen débilmente a 37°C. Utiliza para el crecimiento como fuentes de carbono la D-arabinosa, celobiosa, D-fructosa, D-galactosa, D-glucosa, maltosa, D-manosa, melecitosa, metil-D-glucosido, L-ramnosa,

salicina, sacarosa, trehalosa y D-xilosa. No utilizan como fuentes de carbono en el mismo medio el dulcitol, eritritol, lixosa, D-manitol, metil- β D-arabinopiranosido y L-sorbosa. Algunas cepas, incluyendo la cepa tipo, utilizan melibiosa para el crecimiento, mientras el adonitol y *meso*-inositol no son utilizados por la mayoría de las cepas, incluyendo la cepa tipo. La mayoría de las cepas (reacciones de la cepa tipo son positivas o variables) normalmente producen ácido a partir de L-arabinosa, celobiosa, glicerol, inulina, lactosa, maltosa, L-ramnosa, salicina, sacarosa y D-xilosa. Utiliza acetato, malato y piruvato. Las reacciones alcalinas con fumarato y propionato son variables (la cepa tipo es positiva). Algunas cepas utilizan citrato y succinato (la cepa tipo es negativa). No utiliza ascorbato, *trans*-aconitato, gluconato, oxalato, salicilato y tartrato. Producción de H₂S variable; la cepa tipo muestra una reacción positiva. Hidroliza arbutina, esculina y almidón. No descompone o hidroliza adenina, elastina, guanina, pectina, testosterona, urea y xantina. Algunas cepas, incluyendo la cepa tipo, no descomponen hipurato, hipoxantina, Tween 40 y tirosina. La caseína es normalmente hidrolizada. Es indol negativo. La reducción del nitrato es negativa o débil. No hay crecimiento en medio suplementado con 5% de NaCl, 0.01% de azida sódica o 0.0175% de telurito de potasio. La menaquinona mayoritaria es MK-12; la segunda más común es MK-13. El contenido en poliamina es bajo; putrescina y 1,3-diaminopropano son los componentes predominantes (datos de la cepa tipo). Los azúcares de la pared celular son galactosa, ramnosa, fucosa y menores cantidades de manosa (cepa tipo); la glucosa puede aparecer pero la fucosa está ausente en la mayoría de cepas. La pared celular contiene el ácido 1,3-poli(glicerol fosfato) teicoico. El contenido G+C de ADN es 70-72 mol%. Aislado del suelo.

La cepa tipo es VKM Ac-1345^T (=DSM 8597^T). El número de acceso para la secuencia del gen del ARNr 16S de esta cepa es AY158025.

CAPITULO 4

***Agromyces* DE LA CUEVA DE LOS CIERVOS**

***Agromyces* DE LA CUEVA DE LOS CIERVOS**

A partir de las muestras recogidas del suelo y pared de la Cueva de los Ciervos se aislaron 12 cepas pertenecientes al género *Agromyces* según el análisis de las secuencias de sus genes del ARNr 16S (Tabla 4.1). Ocho de los aislamientos se identificaron como *A. cerinus* subesp. *cerinus* y *A. cerinus* subesp. *nitratus* con un 99 y 100% de similitud con las especies tipo. El resto de los aislamientos presentaban entre un 96 y un 98% de similitud con *A. ramosus*. De estos últimos aislamientos se seleccionaron dos, 20-5 y 23-23, para ser estudiados como posibles especies nuevas, ya que presentaban un 96% de similitud en el gen del ARNr 16S con especies descritas del género *Agromyces*. Una similitud por debajo del 97%, se considera indicativa de posible pertenencia a especies distintas (Rosselló-Mora y Amann, 2001; Stackebrandt y col., 2002). Los estudios dieron lugar a la descripción de dos nuevas especies, *Agromyces salentinus* y *Agromyces neolithicus*.

Tabla 4.1. Aislamientos de la Cueva de los Ciervos.

Origen	Cepas	Homólogo más próximo*	Similitud entre genes ARNr 16S (%)
Pared del interior de la cueva	2-12	<i>A. cerinus</i> subesp. <i>cerinus</i>	99
	18-4	<i>A. cerinus</i> subesp. <i>cerinus</i>	99
Suelo del interior de la cueva	18-28	<i>A. cerinus</i> subesp. <i>nitratum</i>	99
	19-17	<i>A. cerinus</i> subesp. <i>cerinus</i>	99
	19-20	<i>A. cerinus</i> subesp. <i>nitratum</i>	100
	23-23	<i>A. ramosus</i>	96
	24-6	<i>A. cerinus</i> subesp. <i>cerinus</i>	99
	24-14	<i>A. cerinus</i> subesp. <i>nitratum</i>	99
	25-20	<i>A. cerinus</i> subesp. <i>nitratum</i>	100
Suelo del exterior de la cueva	20-2	<i>A. ramosus</i>	97
	20-3	<i>A. ramosus</i>	98
	20-5	<i>A. ramosus</i>	96

*Asignación de especies realizada con anterioridad a la descripción de nuevas especies propuestas en este trabajo.

Los dos aislamientos seleccionados se compararon con las especies más cercanas filogenéticamente según sus secuencias del gen del ARNr 16S. Estas cepas fueron *A. fucosus*, *A. cerinus* subesp. *cerinus*, *A. cerinus* subesp. *nitratus* y *A. ramosus*.

Un amplio rango de características fisiológicas distinguían las cepas 20-5 y 23-23. Estas características incluían la descomposición de gelatina y urea; reducción del nitrato; producción de ácido a partir de diferentes compuestos tales como β -gentibiosa, inulina, manitol, melibiosa, *N*-acetil-glucosamina, ramnosa, ribosa, salicina, trehalosa, D-turanosa y D-xilosa; utilización de acetato; susceptibilidad al ácido nalidíxico, kanamicina, estreptomycinina y sulfonamida; y las actividades de α -galactosidasa, β -galactosidasa, β -glucosidasa, β -glucuronidasa, α -manosidasa y α -quimotripsina (Tabla 4.2).

Las diferencias respecto a la composición de azúcares totales, aminoácidos de la pared celular, menaquinonas principales, lípidos polares, tipo acil y ácidos grasos predominantes se muestran en la Tabla 4.3. Las diferencias más significativas estaban en los azúcares totales de las células y en las menaquinonas. Los azúcares ramnosa, arabinosa y ribosa únicamente estaban presentes en la cepa 20-5, y la manosa solo estaba presente en la cepa 23-23. Las menaquinonas MK-11 y MK-10 aparecían en la cepa 20-5 y estaban ausentes en la cepa 23-23.

Tabla 4.2. Características que diferencian las cepas 20-5, 23-23 y las especies más cercanas del género *Agromyces*.

Características ^a	1	2	3	4 ^b	5	6 ^b
Contenido G+C (%)	72.3	65.3	70.6	68.9	70.9	70.5
Descomposición o hidrólisis de:						
Caseína	+	+	+	-	+	-
Gelatina	-	+	+	-	-	-
Hipurato	+	+	+	ND	+	-
Hipoxantina	-	-	+	-	+	(+)
Tirosina	+	+	+	-	+	+
Urea	+	-	-	-	-	-
Xantina	-	-	+	-	-	-
Producción de ácido a partir de:						
L-Arabinosa	+	+	+	+	-	-
β -Gentibiosa	(+)	-	-	ND	-	ND
Inulina	+	-	(+)	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-	-	+
Maltosa	+	+	+	-	+	+
Manitol	-	+	-	(+)	-	-
Melibiosia	-	+	-	- ^c	-	-
N-Acetil-glucosamina	-	(+)	+	ND	+	ND
Rafinosa	(+)	+	+	+	-	-
Ramnosa	+	-	+	+	+	+
Ribosa	+	-	-	-	-	-
Salicina	+	-	+	-	(+)	+
Sacarosa	+	(+/-)	+	- ^c	-	ND
Trehalosa	+	-	(+)	-	-	-
D-Turanosa	+	-	-	+/- ^c	-	ND
D-Xilosa	+	-	-	-	-	-
Utilización de:						
Acetato	+	-	+	+	+	+
Aconitato	-	-	-	-	-	+
Citrato	-	-	-	-	-	+
Malato	-	-	-	+	-	+
Succinato	-	-	-	+	-	-
Pruebas bioquímicas						
Reducción del nitrato	-	+	-	+/-	+	-
Catalasa	+	+	+	-	+	+
Oxidasa	+/-	+/-	+	-	+/-	+
Microaeróbica	(+)	+	+	+	+	ND

Tabla 4.2. (Continuación).

Características ^a	1	2	3	4 ^b	5	6 ^b
Susceptibilidad antibiótica						
Ácido nalidíxico (30 µg)	+	-	-	-	-	-
Ampicilina (10 µg)	+	+	-	+	-	+
Ciprofloxacina (5 µg)	+	+	+	+	-	(+)
Kanamicina (30 µg)	+	-	+	+	+	+
Meticilina (5 µg)	+	+	-	ND	-	ND
Norfloxacina (10 µg)	+	+	-	-	-	-
Penicilina G (10 UI)	+	+	-	+	-	-
Polimixina B (300 UI)	+	+	-	+	+	(+)
Estreptomina (10 µg)	+	-	+	+	+	+
Sulfonamida (200 µg)	+	-	-	-	-	-
Actividad enzimática						
α -galactosidasa	-	+	-	-	+	+
β -galactosidasa	+	-	+	-	+	+
β -glucosidasa	+	-	+	+	+	+
β -glucuronidasa	-	+	-	-	-	-
α -manosidasa	-	+	-	-	-	-
α -quimotripsina	-	+	-	-	-	-

1, Cepa 20-5; 2, Cepa 23-23; 3, *A. fucosus* IMET 11529^T; 4, *A. ramosus* IMET 11027^T; 5, *A. cerinus* subesp. *nitratus* IMET 11532^T; 6, *A. cerinus* subesp. *cerinus* IMET 11525^T.

^a -, negativo; +, positivo; (+) débilmente positivo; +/-, variable; (+/-), débil y variable; ND, No determinado.

^b Datos de Groth y col. (1996) salvo que se indique otra referencia.

^c Datos de Gledhill y Casida (1969).

Tabla 4.3. Características quimiotaxonómicas de las cepas 20-5 y 23-23.

Características	Cepa 20-5	Cepa 23-23
Azúcares celulares totales ^{a,d}	Ra, Glc, Ga, Ara, Ri	Glc, Ga, Ma
Aminoácidos de la pared celular ^b	DAB, Glu, Gli, Ala	DAB, Gli, Glu, Ala
Menaquinonas principales ^d	MK-12, MK-11, MK 10, MK 13	MK-13, MK-12
Lípidos polares ^{c,d}	DPG, PG, GL, 4PL	DPG, PG, 2PL, GL
Tipo acilo	Acetilo	Acetilo
Ácidos grasos predominantes		
<i>iso</i> -C _{15:0}	6.00 %	12.8 %
<i>anteiso</i> -C _{15:0}	52.0 %	37.8 %
<i>iso</i> -C _{16:0}	12.9 %	13.0 %
<i>anteiso</i> -C _{17:0}	24.8 %	31.9 %

^a Ara, arabinosa; Ga, galactosa; Glc, glucosa; Ma, manosa; Ra, ramnosa; Ri, ribosa.

^b Ala, alanina; DAB, ácido diaminobutírico; Glu, ácido glutámico; Gli, glicina.

^c DPG, difosfatidilglicerol; PG, fosfatidilglicerol; GL, glicolípido desconocido; PL, fosfolípido desconocido.

^d En orden de abundancia.

El contenido G+C en las dos cepas 20-5 y 23-23 fueron 72.3 y 65.3, respectivamente.

Las comparaciones entre los ADN genómicos mostraron diferencias significativas entre ambas cepas, 20-5 y 23-23 (9°C; que corresponde a aproximadamente el 45% de similitud) y las especies de *Agromyces* más cercanas, *A. ramosus* (14°C, en ambos casos; que

corresponde al 20% de similitud), *A. cerinus* subesp. *nitratus* (16 y 11°C; que corresponden al 10 y 35%, respectivamente), *A. cerinus* subesp. *cerinus* (15 y 11°C; que corresponden al 15 y 35% de similitud, respectivamente). Así, los resultados de la hibridación entre los ADNs mostraron diferencias por encima del límite recomendado de especie (5°C; Stackebrandt y col., 1994) entre las cepas 20-5 y 23-23, y las especies descritas del género *Agromyces*.

En la Figura 4.1 se muestra un dendrograma mostrando las relaciones filogenéticas entre los miembros del género *Agromyces* y los dos aislamientos, cepas 20-5 y 23-23.

Basándonos en los resultados de las pruebas fenotípicas y genotípicas presentadas en este estudio, se propusieron los dos aislamientos estudiados, cepas 20-5 y 23-23, como dos nuevas especies del género *Agromyces*, *A. salentinus* y *A. neolithicus*, respectivamente.

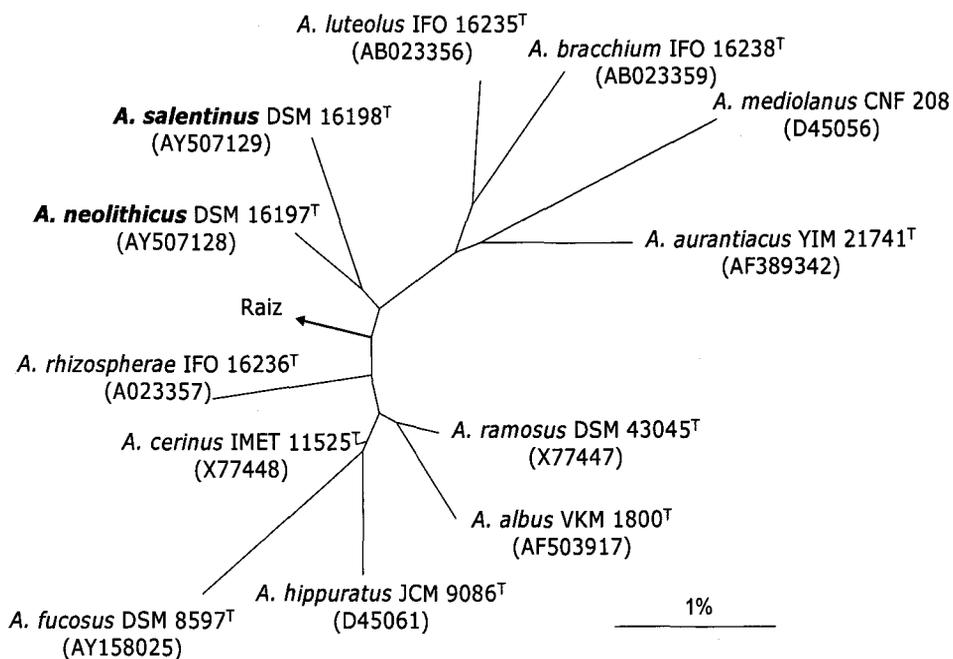


Fig. 4.1. Árbol filogenético que muestra las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Agromyces* y las dos cepas aisladas 20-5 y 23-23, correspondientes a *A. salentinus* y *A. neolithicus*, respectivamente. Se muestran las cepas utilizadas y entre paréntesis los números de acceso para las secuencias de sus genes ARNr 16S.

4.1. DESCRIPCION DE *Agromyces salentinus*

Agromyces salentinus (sa.len.ti' nus. N.L. masc. adj. *salentinus*, referente a la Península Salentina, localización de la Cueva de los Ciervos, lugar donde se aisló el organismo).

Las células forman hifas ramificadas (0.5-0.7 μm de diámetro, 1.5-3.0 μm de longitud) que se rompen en fragmentos inmóviles, con formas bacilar y diferoide (Figura 4.2). Bacteria Gram-positiva, aeróbica y microaerofílica. Crece entre 10 y 37°C (óptimamente entre 20-28°C), en un intervalo de pH entre 5-9.5 y en medio suplementado con el 4% de NaCl. No crece en medio suplementado con el 6% de NaCl. Las colonias son circulares, convexas, lisas y amarillas (Figura 4.3). El diámetro de la colonia es aproximadamente de 1 mm. No reduce el nitrato. Produce sulfuro de hidrógeno. La reacción catalasa es positiva. La producción de indol y las pruebas de Voges-Proskauer y rojo de metilo son negativas. La prueba de la oxidasa es variable. Hidroliza la caseína, esculina, hipurato, almidón, tirosina y urea mientras que no descompone la adenina, gelatina, hipoxantina, Tween 80 y xantina. Produce ácido a partir de almidón, amigdalina, D,L-arabinosa, arbutina, celobiosa, esculina, fructosa, L-fucosa, galactosa, β -gentibiosa, glucosa, glicerol, glicógeno, inulina, lactosa, maltosa, manosa, rafinosa, ramnosa, ribosa, salicina, sacarosa, trehalosa, D-turanosa y D-xilosa. Utiliza acetato pero no aconitato, benzoato, citrato, DL-tartrato, malato y succinato. Es resistente a lincomicina (2 μg), y sensible al ácido nalidíxico (30 μg), ampicilina (10 μg), cloranfenicol (30 μg), ciprofloxacina (5 μg), estreptomina (10 μg), imipenem (10 μg), kanamicina (30 μg), metilina (5 μg), norfloxacina (10 μg), novobiocina (5 μg), ofloxacina (10 μg), oxitetraciclina (30 μg), penicilina G (10 UI), polimixina B (300 UI), rifampicina (5 μg), rifampicina (30 μg), sulfonamida (200 μg), tetraciclina (30 μg) y vancomicina (30 μg). Presenta diferentes actividades enzimáticas tales como cistina arilamidasa, esterasa (C4), esterasa lipasa (C8), fosfatasa

ácida, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, leucina arilamidasa, *N*-acetil- β -glucosaminidasa, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa y valina arilamidasa. No presenta actividades de las enzimas α -fucosidasa, α -galactosidasa, β -glucuronidasa, lipasa (C14), α -manosidasa, α -quimotripsina y tripsina. Las menaquinonas predominantes son MK-12 y MK-11. La composición de aminoácidos de la pared celular incluye ácido diaminobutírico, glicina, ácido glutámico y alanina. Los azúcares totales de la célula son ramnosa, glucosa, galactosa, arabinosa y ribosa. Los lípidos polares mayoritarios son difosfatidilglicerol, fosfatidilglicerol, un glicolípido desconocido y cuatro fosfolípidos desconocidos. El grupo acilo es acetilo. Los ácidos grasos predominantes son *anteiso*-C_{15:0} y *anteiso*-C_{17:0}. Los ácidos micólicos están ausentes. El contenido G+C es 72.3%. El organismo fue aislado del suelo del exterior, a pocos metros de la entrada de la cueva.

La cepa tipo es 20-5^T (=HKI 0320^T =DSM 16198^T =NCIMB 13990^T). El número de acceso para la secuencia del gen del ARNr 16S de esta cepa es AY507129.

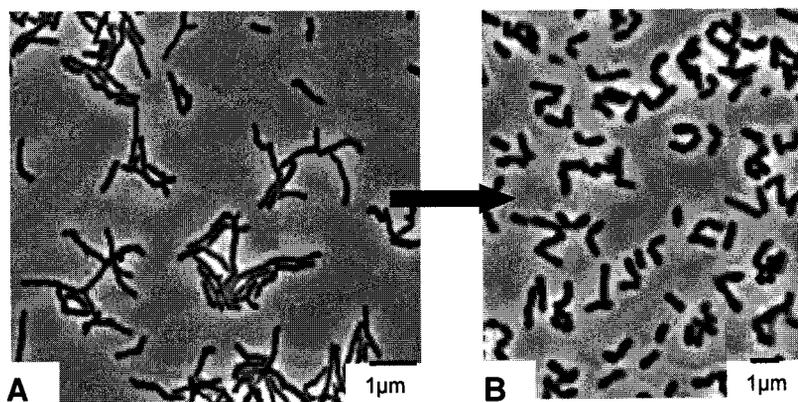


Fig. 4.2. Micrografía en contraste de fase de hifas ramificadas de la cepa 20-5 (A) que se rompen en fragmentos inmóviles de distintas longitudes (B).

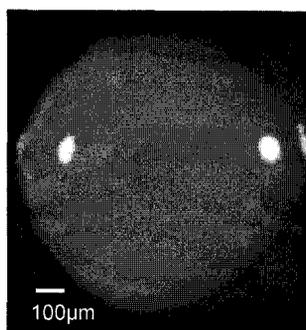


Fig. 4.3. Colonia de la cepa 20-5. Es una colonia circular, lisa, convexa y de color amarillo. Crecimiento en medio sólido OM79 durante 14 días.

4.2. DESCRIPCIÓN DE *Agromyces neolithicus*

Agromyces neolithicus (neo.li'ti.cus. N.L. adj. *neolithicus*, referente a las pinturas neolíticas de la Cueva de los Ciervos, de cuyo suelo se aisló el organismo).

Las células forman hifas ramificadas (0.3-0.5 μm de diámetro, 1.5-4.0 μm de longitud) que se rompen en fragmentos inmóviles, con formas bacilar y difteroide (Figura 4.4). Bacteria Gram-positiva, aeróbica y microaerófila. Crece entre 15 y 37°C (óptimamente a 28°C), en un intervalo de pH entre 5-9.5. Crece en medio suplementado con el 2% de NaCl y no en medio suplementado con el 4% de NaCl. Las colonias son circulares, convexas, lisas y de color beige (Figura 4.5). El diámetro de la colonia es aproximadamente de 1 mm. Reduce el nitrato. Produce sulfuro de hidrógeno. La reacción catalasa es positiva. Indol, Voges-Proskauer y rojo de metilo negativos. La prueba de la oxidasa es variable. Hidroliza caseína, esculina, gelatina, hipurato, almidón y tirosina mientras que no descompone la adenina, hipoxantina, Tween 80, urea y xantina. Produce ácido a partir del almidón, D,L-arabinosa, arbutina, celobiosa, esculina, fructosa, L-fucosa, galactosa, glucosa, glicerol, glicogeno, maltosa, manosa, manitol, melibiosa y rafinosa. No utiliza acetato,

aconitato, benzoato, citrato, DL-tartrato, malato ni succinato. Las células son sensibles a ampicilina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), imipenem (10 µg), metilicina (5 µg), norfloxacina (10 µg), novobiocina (5 µg), ofloxacina (10 µg), oxitetraciclina (30 µg), penicilina G (10 UI), polimixina B (300 UI), rifampicina (5 µg), rifampicina (30 µg), tetraciclina (30 µg) y vancomicina (30 µg). Las células son resistentes a kanamicina (30 µg), lincomicina (2 µg), estreptomina (10 µg), sulfonamida (200 µg) y al ácido nalidíxico (30 µg). Presenta diferentes actividades enzimáticas tales como cistina arilamidasa, esterasa (C4), esterasa lipasa (C8), fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, α -glucosidasa, leucina arilamidasa, α -manosidasa, *N*-acetil- β -glucosaminidasa, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa y valina arilamidasa. No presenta actividades de las enzimas α -fucosidasa, α -galactosidasa, β -glucosidasa, β -glucuronidasa, lipasa (C14), α -quimotripsina y tripsina. Las menaquinonas predominantes son MK-13 y MK-12. La composición de aminoácidos de la pared celular incluye ácido diaminobutírico, glicina, ácido glutámico y alanina. Los azúcares totales de la célula son glucosa, galactosa y manosa. Los lípidos polares mayoritarios son difosfatidilglicerol, fosfatidilglicerol, un glicolípido desconocido y dos fosfolípidos desconocidos. El grupo acil es acetilo. Los ácidos grasos predominantes son *anteiso*-C_{15:0} y *anteiso*-C_{17:0}. Los ácidos micólicos están ausentes. El contenido G+C es 65.3%. El organismo fue aislado del suelo de interior de la cueva.

La cepa tipo es 23-23^T (=HKI 0321^T =DSM 16197^T =NCIMB 13989^T). El número de acceso para la secuencia del gen del ARNr 16S de esta cepa es AY507128.

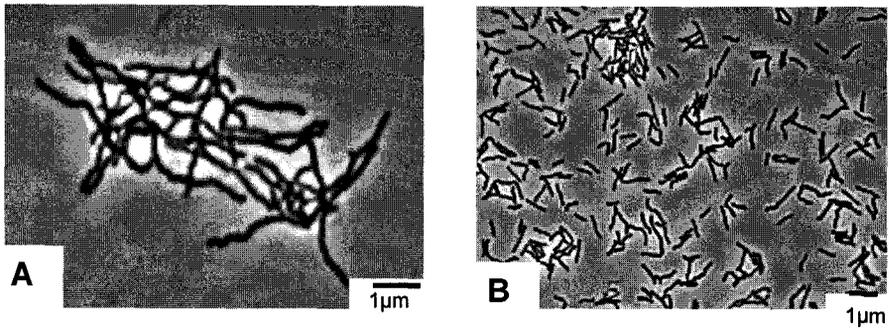


Fig. 4.4. Micrografía en contraste de fase de hifas ramificadas de la cepa 23-23 (A) que se rompen en fragmentos inmóviles de distintas longitudes (B).

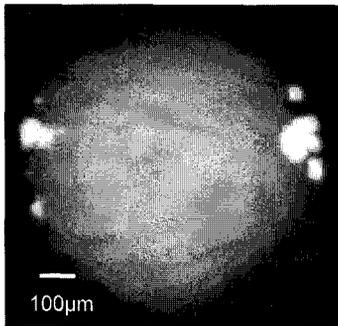


Fig. 4.5. Colonia de la cepa 23-23 circular, lisa, convexa y de color beige. Crecimiento en medio sólido NA durante 3 días.

CAPITULO 5

***Agromyces* DE LA CATACUMBA DE DOMITILA**

***Agromyces* DE LA CATACUMBA DE DOMITILA**

En las muestras de la Catacumba de Domitila se obtuvieron 12 aislamientos pertenecientes al género *Agromyces* como se determinó a partir de sus secuencias del gen del ARNr 16S (Tabla 5.1). Cuatro de los aislamientos fueron clasificados como pertenecientes a *A. cerinus* subesp. *cerinus* y *A. cerinus* subesp. *nitratus* presentando un 99% de similitud entre sus secuencias del gen del ARNr 16S; otras cuatro tenían como homólogo más cercano a *A. fucosus* con un 96 y 99% de similitud entre sus genes ARNr 16S; dos tenían como homólogo más cercano a *A. ramosus* con un 97 y 98% de similitud entre los genes ARNr 16S ; y otros dos tenían como homólogo más cercano a *A. mediolanus* con un 97% de similitud entre sus genes ARNr 16S. Se seleccionaron aquellos aislamientos con $\leq 97\%$ de similitud en los genes ARNr 16S con la especie descrita más próxima del género *Agromyces*. Estas cepas fueron CD12Tz-055, CD12Tz-058, CD13Eh-1, CD13Eh-5 y CD13Eh-36. Este estudio dió lugar a la descripción de tres nuevas especies, *Agromyces italicus*, *Agromyces humatus* y *Agromyces lapidis*.

Tabla 5.1. Aislamientos de la Catacumba Romana de Domitila

Origen	Cepas	Homólogo más próximo*	Similitud entre genes ARNr 16S (%)
Piedra excavada de la tumba	CD12Tz-055	<i>A. fucosus</i>	97
	CD12Tz-058	<i>A. fucosus</i>	96
	CD12Tz-061	<i>A. fucosus</i>	99
	CD12Tz-076	<i>A. cerinus</i> subesp. <i>cerinus</i>	99
Pared de la tumba	CD13Eh-1	<i>A. mediolanus</i>	97
	CD13Eh-5	<i>A. ramosus</i>	97
	CD13Eh-12	<i>A. ramosus</i>	98
	CD13Eh-30	<i>A. fucosus</i>	98
	CD13Eh-36	<i>A. mediolanus</i>	97
	CD13Eh-38	<i>A. cerinus</i> subesp. <i>nitratus</i>	99
	CD13Eh-39	<i>A. cerinus</i> subesp. <i>nitratus</i>	99
	CD13Eo-049	<i>A. cerinus</i> subesp. <i>cerinus</i>	99

*Asignación de especies realizada con anterioridad a la descripción de nuevas especies propuestas en este trabajo.

Las cinco cepas seleccionadas se compararon con las especies más cercanas filogenéticamente utilizando las secuencias del gen ARNr 16S. Estas cepas fueron *Agromyces albus*, *Agromyces cerinus* subesp. *cerinus*, *Agromyces fucosus*, *Agromyces mediolanus*, *Agromyces neolithicus*, *Agromyces ramosus* y *Agromyces salentinus*.

Las características morfológicas y fisiológicas se resumen en la descripción de especie y en la Tabla 5.2. Las cinco cepas se distinguían por una variedad de características tales como el crecimiento a 10°C y en medio suplementado con 4% de NaCl (p/v); hidrólisis de gelatina, hipoxantina y xantina; reducción del nitrato; reacción de la oxidasa; tolerancia al oxígeno; producción de ácido a partir de amigdalina, D-arabinosa, celobiosa, L-fucosa, inulina, lactosa, metil- α D-manopiranosido, manitol, N-acetilglucosamina, D-rafinosa, ramnosa, salicina, sacarosa, trehalosa, D-turanosa y D-xilosa; utilización de

malato y succinato; actividades de β -glucuronidasa, *N*-acetil- β -glucosaminidasa, α -manosidasa y α -quimotripsina; y la susceptibilidad al ácido nalidíxico, kanamicina, norfloxacina, penicilina G, polimixina B y estreptomicina.

Las diferencias respecto a las composiciones de los azúcares celulares totales, menaquinonas, y lípidos polares se muestran en la Tabla 5.3. Las diferencias más significativas están en la composición de azúcares totales, destacando la presencia de ribosa en las cepas CD12Tz-055, CD12Tz-058, CD13Eh-1, y la presencia de ramnosa en las cepas CD12Tz-058 y CD13Eh-5.

Las comparaciones de las secuencias de los genes del ARNr 16S de las cepas CD12Tz-055, CD12Tz-058, CD13Eh-1, CD13Eh-5 y CD13Eh-36 mostraron una próxima relación filogenética con *A. ramosus*, *A. cerinus* subesp. *cerinus*, *A. salentinus*, *A. neolithicus*, *A. albus*, *A. mediolanus* y *A. fucosus*, respectivamente, con porcentajes de similitud entre 94 y 98%. Las cepas CD13Eh-1 y CD13Eh-36 mostraron alta similitud (99%), al igual que las cepas CD12Tz-055 y CD13Eh-1 (97%). La especie *Agromyces salentinus* estaba relacionada con la cepa CD13Eh-5 (98%).

Los estudios de homología entre ADN genómicos mostraron que los aislamientos CD13Eh-1 y CD13Eh-36 se correspondían con una misma especie, al igual que el aislamiento CD12Tz-058 y *Agromyces fucosus*, ya que los resultados de ΔT_m eran inferiores a 5°C (>70% de similitud; Rosselló-Mora y Amann, 2001). Sin embargo, las comparaciones llevadas a cabo entre las tres cepas aisladas CD12Tz-055, CD13Eh-1 y CD13Eh-5, así como también con sus vecinos filogenéticos más cercanos mostraron diferencias importantes. En todos los casos, las diferencias en las temperaturas de desnaturalización entre ADN genómicos homodúplex y heterodúplex fueron >7.7°C (aproximadamente <51% de similitud ADN-ADN) que está por encima de los 5°C recomendados para la delimitación de especies (Stackebrandt y Goebel, 1994).

Las relaciones filogenéticas basadas en el gen ARNr 16S entre los miembros del género *Agromyces* y las tres nuevas cepas aisladas CD12Tz-055, CD13Eh-1 y CD13Eh-5 se muestran en la Figura 5.1.

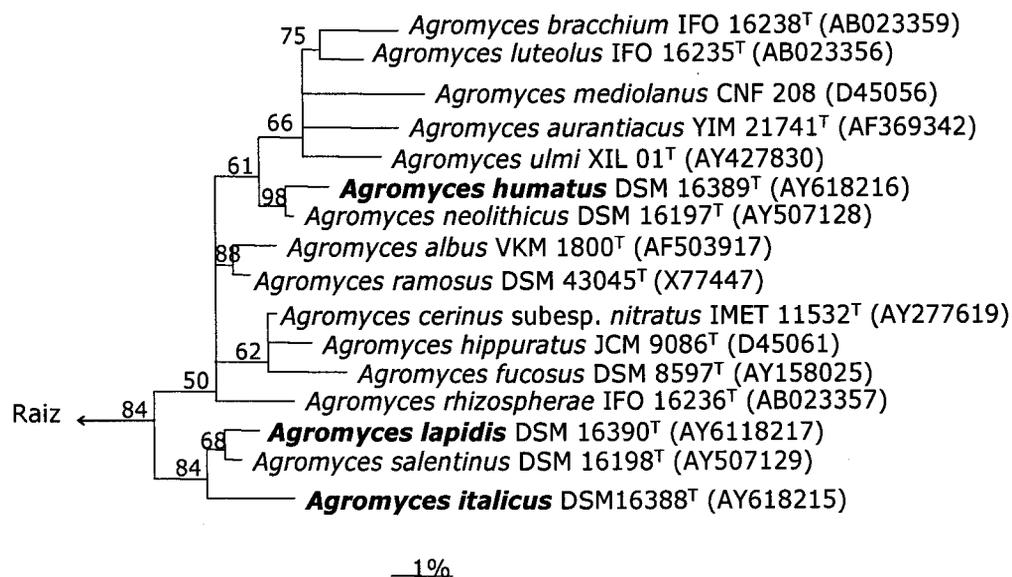


Figura 5.1. Árbol filogenético que muestra las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Agromyces* y las tres cepas aisladas (CD12Tz-055, CD13Eh-1 y CD13Eh-5). Se muestran las cepas utilizadas y en paréntesis los números de acceso de las secuencias. Se indica la diferencia correspondiente al 1%.

Tabla 5.2. Características que diferencian las cepas CD12Tz-055, CD12Tz-058, CD13Eh-1, CD13Eh-5 y CD13Eh-36, y las especies más cercanas del género *Agromyces*.

Características ^a	1	2	3	4	5	6	7 ^b	8	9	10	11 ^b	12
Contenido G+C (%)	70.4	70.9	70.8	70.6	73.0	69.0	70.5	70.6	72.3	65.3	68.9	72.3
Crecimiento												
10°C	(+)	+	(+)	-	+	(+)	(+)	+	(+)	-	+	+
4.0 NaCl (p/v)	+	(+)	+	-	+	(+)	-	+	+	-	(+)	(+)
Descomposición o hidrólisis de:												
Caseína	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
Gelatina	+/-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
Hipurato	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Hipoxantina	-	+	+	(+)	-	-	(+)	+	+	-	-	-
Tirosina	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Urea	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Xantina	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Pruebas bioquímicas												
Reducción del nitrato	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+/-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Oxidasa	+/-	+/-	+	-	+	+	+	+	+/-	+/-	-	+/-
Microaeróbico	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	(+)

Tabla 5.2. (Continuación).

Características ^a	1	2	3	4	5	6	7 ^b	8	9	10	11 ^b	12
Producción de ácido a partir de:												
Amigdalina	+	+	(+)	-	+	-	+	+	+	-	+	(+)
D-Arabinosa	+	+	+	-	+	+*	+	+	(+)*	+	+	+
Celobiosa	+	+	+	+/-	+	-	+	+	+	+	-	+
L-Fucosa	+	+	+	-	+	-	(+)	+	-	+	+	+
Galactosa	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	-	+
D-Glucosa	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	-	+
Glicerol	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	-	-	+	+	-	-	(+)	-	-	+	+
Lactosa	-	+	(+)	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Metil- α D-manopiranosido	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Metil- α D-glucopiranosido	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	(+)	-
N-Acetilglucosamina	+	-	-	+/-	+	-	-	+	-	(+)*	+	-
D-Rafinosa	(+)	-	-	+	+	+*	-	+	-	+	+	(+)
Ramnosa	-	+	-	+	+	+	+	+*	+	-	+	+
Ribosa	-	-	-	-	-	+*	-	-	+	-	-	+
Salicina	+	+	+	-	+	-	+	+	(+)	-	-	+
Sacarosa	+	(+)	-	+	+	(+)	-	+	+	(+/-)	+	+

Tabla 5.2. (Continuación).

Características ^a	1	2	3	4	5	6	7 ^b	8	9	10	11 ^b	12
Producción de ácido a partir de:												
Trehalosa	-	(+)	-	-	-	-	-	(+)*	+	-	-	+
D-Turanosa	-	(+)	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	+
D-Xilosa	-	+	+	-	+	+*	-	-	-	-	-	+
Utilización de:												
Aconitato	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Malato	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-
Succinato	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
Actividad enzimática												
α Galactosidasa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
β -Galactosidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
β -Glucuronidasa	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>N</i> -Acetil- β -glucosaminidasa	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+
α -Manosidasa	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
α -Quimotripsina	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Susceptibilidad a antibióticos												
Ácido nalidíxico (30 μ g)	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Ampicilina (10 μ g)	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

Tabla 5.2. (Continuación).

Características ^a	1	2	3	4	5	6	7 ^b	8	9	10	11 ^b	12
Susceptibilidad a antibióticos												
Ciprofloxacina (5 µg)	+	+	+	+	+	+	+/-	+	-	+	+	+
Kanamicina (30 µg)	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
Meticilina (5 µg)	+	+	+	+	+	-	ND	-	-	+	ND	+
Norfloxacina (10 µg)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
Novobiocina (5 µg)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
Penicilina G (10 UI)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Polimixina B (300 UI)	-	+	-	+	+	+	+/-	-	-	+	+	+
Estreptomina (10 µg)	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Sulfonamida (200 µg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

1, Cepa CD12Tz-055; 2, Cepa CD12Tz-058; 3, Cepa CD13Eh-1; 4, Cepa CD13Eh-5; 5, Cepa CD13Eh-36; 6, *A. albus* (VKM 1800^T); 7, *A. cerinus* subsp. *cerinus* (IMET 11525^T); 8, *A. fucosus* (IMET 11529^T); 9, *A. mediolanus* (VKM 1388^T); 10, *A. neolithicus* (DSM 16197^T); 11, *A. ramosus* (IMET 11027^T); 12, *A. salentinus* (DSM 16198^T).

^a -, negativo; +, positivo; (+) débilmente positivo; +/-, variable; (+/-), débil y variable; ND, No determinado; *, tardío.

^b Datos de Groth y col. (1996).

Tabla 5.3. Características quimiotaxonómicas de las cepas CD12Tz-055, CD12Tz-058, CD13Eh-1, CD13Eh-5 y CD13Eh-36.

Características	1	2	3	4	5
Azúcares celulares totales ^{a,d}	Glu, Ga, Ma, Ri	Ra, Glu, Ga, Ma, Ri	Ga, Ri, Glu, Ma	Glu, Ga, Ra, Ma	Glu, Ga, Ma
Aminoácidos de la pared celular ^{b,d}	DAB, Glc, Gli, Ala	DAB, Glc, Gli, Ala	DAB, Glc, Gli, Ala	DAB, Glc, Gli, Ala	DAB, Glc, Gli, Ala
Menaquinonas mayoritarias ^d	12, 13	12, 13	12, 13	13, 12	12, 13
Lípidos polares ^{c,d}	DPG, PG, PL, 2GL	DPG, PG, PL, 2GL	DPG, PG, 2 PL, GL	DPG, PG, PL, 2GL	DPG, PG, 2PL, 2GL
Tipo acilo	Acetilo	Acetilo	Acetilo	Acetilo	Acetilo
Ácidos grasos predominantes (%)					
<i>iso</i> -C _{15:0}	10.5	5.80	14.2	5.40	3.10
<i>anteiso</i> -C _{15:0}	48.1	61.5	50.9	41.5	61.0
<i>iso</i> -C _{16:0}	16.5	15.2	14.7	15.5	18.3
C _{16:0}	5.90	1.50	1.70	1.30	1.80
<i>anteiso</i> -C _{17:0}	13.0	12.3	15.3	34.0	12.2

1, Cepa CD12Tz-055; 2, Cepa CD12Tz-058; 3, Cepa CD13Eh-1; 4, Cepa CD13Eh-5; 5, Cepa CD13Eh-36.

^a Ga, galactosa; Glc, glucosa; Ma, manosa; Ra, ramnosa; Ri, ribosa.

^b Ala, alanina; DAB, ácido diaminobutirico; Glu, ácido glutámico; Gli, glicina.

^c DPG, difosfatidilglicerol; PG, fosfatidilglicerol; GL, glicolípido desconocido; PL, fosfolípido desconocido.

^d En orden de abundancia.

Las cepas obtenidas se distinguían fácilmente entre sí y de las especies de *Agromyces* válidamente publicadas por un amplio rango de propiedades fenotípicas (Tabla 5.2) y composición de azúcares totales (Tabla 5.3). Los datos de homología entre ADN genómicos de las cepas CD12Tz-055, CD13Eh-1 y CD13Eh-5, y sus parientes más cercanos dentro del género *Agromyces*. Basado en las diferencias observadas a partir de estas pruebas fenotípicas y genotípicas, se propusieron las tres cepas estudiadas como nuevas especies del género *Agromyces*, *A. italicus* (cepa CD13Eh-1^T), *A. humatus* (cepa CD13Eh-5^T) y *A. lapidis* (cepa CD12Tz-055^T).

5.1. DESCRIPCION DE *Agromyces italicus*

Agromyces italicus (i.ta'li.cus. L. masc. adj. *italicus* de Italia, origen del aislamiento).

Bacteria Gram-positiva, microaerófila a aeróbica que forma hifas ramificadas (0.4-0.6 µm de diámetro, 1.5-2.3 µm de longitud) que se rompen en fragmentos inmóviles, con forma de bacilo y difteroide (irregular) (Figura 5.2). Las colonias son circulares, convexas, lisas y de color crema (Figura 5.3). El diámetro de la colonia es aproximadamente de 1 mm. El crecimiento aparece entre los 10 y 37°C (crecimiento óptimo a 28°C) y a pH 5-9.5. El NaCl es tolerado hasta el 4% (p/v); pero no a 6% (p/v). Reduce el nitrato. Produce sulfuro de hidrógeno. Las reacciones catalasa y oxidasa son positivas. La producción de indol y las pruebas de Voges-Proskauer y rojo de metilo son negativas. Hidroliza almidón, caseína, esculina, gelatina, hipurato, hipoxantina, tirosina y xantina mientras que no hidroliza la adenina, Tween 80 y urea. Produce ácido a partir de almidón, amigdalina, D,L-arabinosa, arbutina, celobiosa, esculina, fructosa, L-fucosa, galactosa, glucosa, glicerol, glicógeno, lactosa, maltosa, manosa, salicina y D-xilosa. Utiliza acetato pero no aconitato,

benzoato, citrato, malato, succinato y DL-tartrato. Es sensible a la ampicilina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), imipenem (10 µg), meticilina (5 µg), novobiocina (5 µg), penicilina G (10 UI), rifampicina (5 µg), rifampicina (30 µg), tetraciclina (30 µg) y vancomicina (30 µg). Es resistente al ácido nalidíxico (30 µg), estreptomicina (10 µg), kanamicina (30 µg), lincomicina (2 µg), norfloxacina (10 µg), ofloxacina (10 µg), oxitetraciclina (30 µg), polimixina B (300 UI) y sulfonamida (200 µg). Presenta diferentes actividades enzimáticas tales como cistina arilamidasa, esterasa (C4), esterasa lipasa (C8), fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, leucina arilamidasa, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa y valina arilamidasa. No presenta actividades de las enzimas α -fucosidasa, α -galactosidasa, β -glucuronidasa, lipasa (C14), α -manosidasa, *N*-acetil- β -glucosaminidasa, α -quimotripsina y tripsina. Las menaquinonas predominantes son MK-12 y MK-13. Los aminoácidos de la pared celular son ácido diaminobutírico, glicina, ácido glutámico y alanina. Los azúcares totales de la célula son galactosa, ribosa, glucosa y manosa. Los lípidos polares mayoritarios son difosfatidilglicerol, fosfatidilglicerol, un glicolípido desconocido y dos fosfolípidos desconocidos. El grupo acil es acetilo. Los ácidos grasos predominantes son *anteiso*-C_{15:0} y *anteiso*-C_{17:0}. El contenido G+C es 70.8%. El organismo fue aislado de la pared de la tumba localizada en el Cubículo de los Pequeños Apóstoles, en la Catacumba de Domitila, Roma, Italia.

La cepa tipo es CD1^T (=HKI 0325^T =DSM 16388^T =NCIMB 14011^T =CIP 108740^T). El número de acceso para la secuencia del gen del ARNr 16S de esta cepa es AY618215.

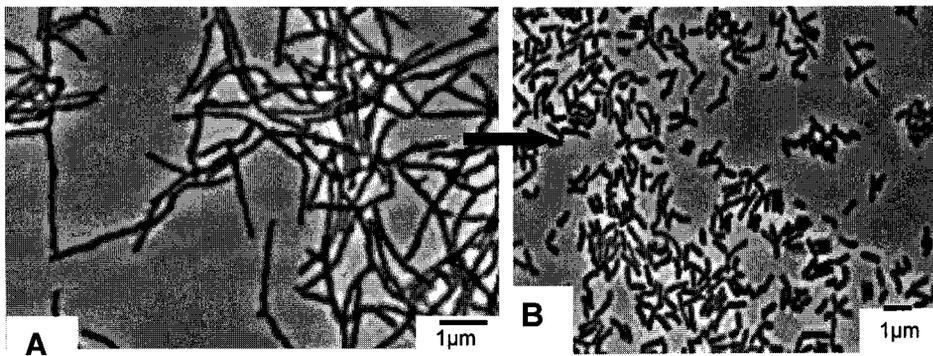


Fig. 5.2. Micrografía en contraste de fase de hifas ramificadas de la cepa CD13Eh-1 (A) que se rompen en fragmentos inmóviles de distintas longitudes (B).

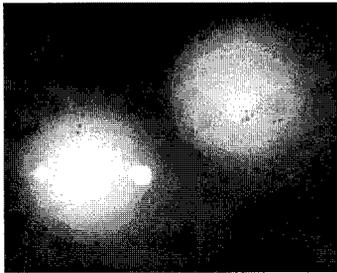


Fig. 5.3. Colonia circular, lisa, convexa y de color crema de la cepa CD13Eh-1. Crecimiento en medio sólido OM79 durante 14 días.

5.2. DESCRIPCIÓN DE *Agromyces humatus*

Agromyces humatus (hu.ma'tus. L. masc. part. adj. *humatus* de enterrado).

Bacteria Gram-positiva, que forma hifas ramificadas (0.3-0.5 μm de diámetro, 1.8-3.2 μm de longitud) que se rompen en fragmentos inmóviles, con forma bacilar y difteroide (Figura 5.4). Las colonias son circulares, convexas, lisas y amarillas (Figura 5.5). El diámetro de la colonia es aproximadamente de 1 mm. El crecimiento aparece entre los 15 y 37°C (crecimiento óptimo a 28°C) y a pH 5-9.5. El NaCl es tolerado hasta el 2% (p/v); pero no a 4% (p/v). Reduce el nitrato. Produce sulfuro de hidrógeno. La reacción de la catalasa es positiva. La prueba de la oxidasa es negativa. La producción de indol y las pruebas de Voges-Proskauer y rojo de metilo son negativas. Hidroliza almidón, caseína, esculina, gelatina, hipurato, hipoxantina y tirosina mientras que no hidroliza la adenina, Tween 80, urea y xantina. Produce ácido a partir de almidón, L-arabinosa, arbutina, esculina, fructosa, galactosa, glucosa, glicerol, glicógeno, inulina, maltosa, manitol, manosa, rafinosa, ramnosa y sacarosa. La producción de ácido a partir de celobiosa y *N*-acetilglucosamina es variable. Utiliza acetato, malato y succinato, pero no aconitato, benzoato, citrato y DL-tartatro. Es sensible a la ampicilina (10 μg), ciprofloxacina (5 μg), cloranfenicol (30 μg), estreptomycin (10 μg), imipenem (10 μg), metilicina (5 μg), novobiocina (5 μg), polimixina B (300 UI), rifampicina (5 μg), rifampicina (30 μg), tetraciclina (30 μg) y vancomicina (30 μg). Es resistente al ácido nalidíxico (30 μg), kanamicina (30 μg), lincomicina (2 μg), norfloxacina (10 μg), ofloxacina (10 μg), oxitetraciclina (30 μg), penicilina G (10 UI) y sulfonamida (200 μg). Presenta diferentes actividades enzimáticas tales como cistina arilamidasa, esterasa (C4), esterasa lipasa (C8), fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, α -fucosidasa, β -galactosidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, β -glucuronidasa, leucina arilamidasa,

naftol-AS-BI-fosfohidrolasa y valina arilamidasa. No presenta actividades de las enzimas α -galactosidasa, lipasa (C14), α -manosidasa, *N*-acetil- β -glucosaminidasa, α -quimotripsina y tripsina. Las menaquinonas predominantes son MK-13 y MK-12. Los aminoácidos de la pared celular son ácido diaminobutírico, glicina, ácido glutámico y alanina. Los azúcares totales de la célula son glucosa, galactosa, ramnosa y manosa. Los lípidos polares mayoritarios son difosfatidilglicerol, fosfatidilglicerol, dos glicolípidos desconocidos y un fosfolípido desconocido. El grupo acil es acetilo. Los ácidos grasos predominantes son *anteiso*-C_{15:0} y *anteiso*-C_{17:0}. Los ácidos micólicos están ausentes. El contenido G+C es 70.6%. El organismo fue aislado de la pared de la tumba localizada en el Cubículo de los Pequeños Apóstoles, en la Catacumba de Domitila, Roma, Italia.

La cepa tipo es CD5^T (=HKI 0327^T =DSM 16389^T =NCIMB 14012^T =CIP 108741^T). El número de acceso para la secuencia del gen del ARNr 16S de esta cepa es AY618216.

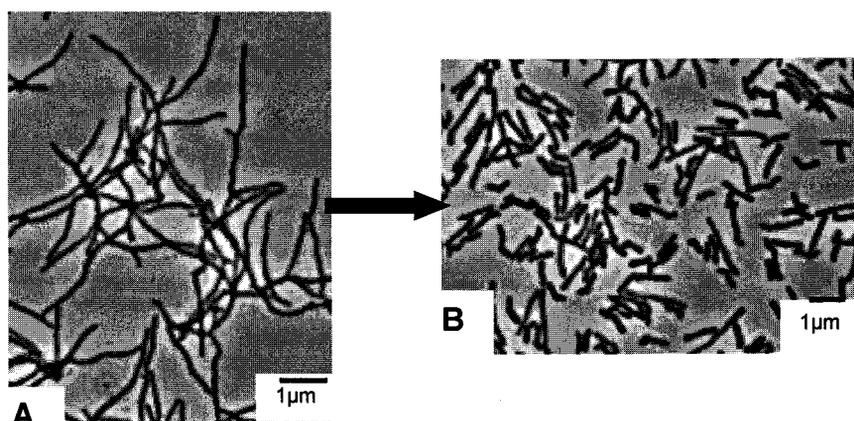


Fig. 5.4. Micrografía en contraste de fase de hifas ramificadas de la cepa CD13Eh-5 (A) que se rompen en fragmentos inmóviles de distintas longitudes (B).

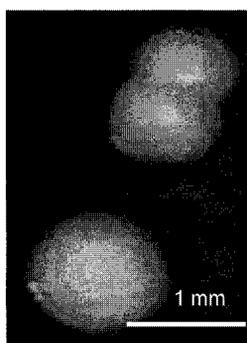


Fig. 5.5. Colonia circular, lisa, convexa y de color amarillo de la cepa CD13Eh-5. Medio sólido NA durante 3 días.

5.3. DESCRIPCION DE *Agromyces lapidis*

Agromyces lapidis (la.pi´dis. L. gen. n. *lapidis* de piedra).

Bacteria Gram-positiva, microaerófila a aeróbica que forma hifas ramificadas (0.4-0.6 μm de diámetro, 1.8-3.0 μm de longitud) que se rompen en fragmentos inmóviles, con forma bacilar y difteroide (Figura 5.6). Las colonias son circulares, convexas, lisas y amarillas (Figura 5.7). El diámetro de la colonia es aproximadamente de 1 mm. El crecimiento aparece entre los 10 y 37°C (crecimiento óptimo a 28°C) y a pH 5-9.5. El NaCl es tolerado hasta los 4% (p/v); pero no a 6% (p/v). Reduce el nitrato. Produce sulfuro de hidrógeno. La reacción de la catalasa es positiva. La prueba de la oxidasa es variable. Indol, Voges-Proskauer y rojo de metilo negativo. Hidroliza almidón, caseína, esculina, hipurato y tirosina, y no hidroliza adenina, hipoxantina, Tween 80, urea ni xantina. La hidrólisis de gelatina es variable. Produce ácido a partir de almidón, amigdalina, D-arabinosa, arbutina, celobiosa, esculina, fructosa, L-fucosa, galactosa, glicerol, glicógeno, glucosa, inulina, metil- α D-manopiranosido, maltosa, manosa, *N*-acetilglucosamina, D-rafinosa, salicina y sacarosa. Utiliza acetato pero no aconitato, benzoato, citrato, malato, succinato y DL-tartato. Es sensible al ácido nalidíxico (30 μg), ampicilina (10 μg), ciprofloxacina (5

μg), cloranfenicol (30 μg), imipenem (10 μg), meticilina (5 μg), novobiocina (5 μg), penicilina G (10 UI), rifampicina (5 μg), rifampicina (30 μg), tetraciclina (30 μg) y vancomicina (30 μg). Es resistente a estreptomocina (10 μg), kanamicina (30 μg), lincomicina (2 μg), norfloxacinina (10 μg), ofloxacinina (10 μg), oxitetraciclina (30 μg), polimixina B (300 UI) y sulfonamida (200 μg). Presenta diferentes actividades enzimáticas tales como cistina arilamidasa, esterasa (C4), esterasa lipasa (C8), fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, leucina arilamidasa, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa, α -quimotripsina y valina arilamidasa. No presenta actividades de las enzimas α -fucosidasa, α -galactosidasa, β -glucuronidasa, lipasa (C14), α -manosidasa, *N*-acetil- β -glucosaminidasa y tripsina. Las menaquinonas predominantes son MK-12 y MK-13. Los aminoácidos de la pared celular son ácido diaminobutírico, glicina, ácido glutámico y alanina. Los azúcares totales de la célula son glucosa, galactosa, manosa y ribosa. Los lípidos polares mayoritarios son difosfatidilglicerol, fosfatidilglicerol, dos glicolípidos desconocidos y un fosfolípido desconocido. El grupo acil es acetilo. Los ácidos grasos predominantes son *iso*-C_{16:0} y *anteiso*-C_{15:0}. Los ácidos micólicos están ausentes. El contenido G+C es 70.4%. El organismo fue aislado de la piedra excavada de la Catacumba de Domitila, Roma, Italia.

La cepa tipo es CD55^T (=HKI 0324^T =DSM 16390^T =NCIMB 14013^T =CIP 108739^T). El número de acceso para la secuencia del gen del ARNr 16S de esta cepa es AY6118217.

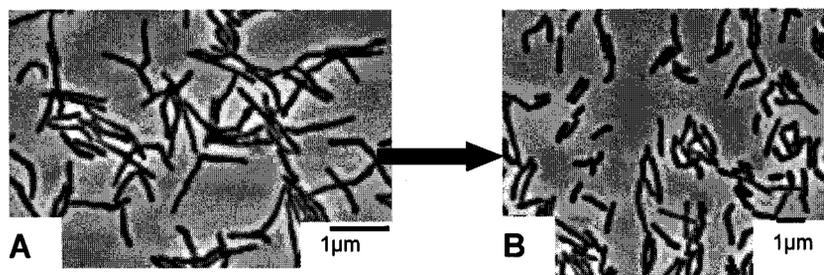


Fig. 5.6. Micrografía en contraste de fase de hifas ramificadas de la cepa CD12Tz-055 (A) que se rompen en fragmentos inmóviles de distintas longitudes (B).

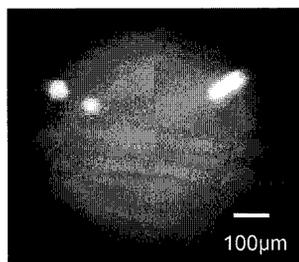


Fig. 5.7. Colonia circular, lisa, convexa y de color amarillo de la cepa CD12Tz-055. Crecimiento en medio sólido OM79 durante 14 días.

CAPITULO 6

***Agromyces* DE LA CUEVA DE LOS MURCIELAGOS**

***Agromyces* DE LA CUEVA DE LOS MURCIELAGOS**

A partir de un *biofilm* de la pared de la Cueva de los Murciélagos se obtuvieron dos aislamientos, 6Z7Ta-033 y 6Z8Ee-006, pertenecientes al género *Agromyces* según confirmó el análisis de sus secuencias del gen del ARNr 16S (Tabla 6.1), ambos mostraron alta similitud con *A. fucosus* con un 98 y 99% de similitud en ese gen. Se seleccionó el aislamiento que presentaba un 98% de similitud porque se observaron diferencias quimiotaxonómicas importantes con *A. fucosus*, por lo que se estudió en detalle para confirmar si pertenecía o no a la especie *A. fucosus*.

Tabla 6.1. Aislamientos de la Cueva de Los Murciélagos

Origen	Cepas	Homólogo más próximo*	Similitud entre genes ARNr 16S (%)
Pared del interior de la cueva	6Z7Ta-033	<i>A. fucosus</i>	98
	6Z8Ee-006	<i>A. fucosus</i>	99

*Asignación de especies realizada con anterioridad a la descripción de nuevas especies propuestas en este trabajo.

La cepa 6Z7Ta-033 fue seleccionada y se comparó con las especies más cercanas filogenéticamente según el gen del ARNr 16S. Estas cepas fueron *A. fucosus*, *A. ramosus*, *A. albus*, *A. cerinus* subesp. *cerinus* y *A. cerinus* subesp. *nitratu*s.

Un amplio rango de características distinguía la cepa 6Z7Ta-033 de las especies más cercanas filogenéticamente (Tabla 6.2). Con la especie *A. fucosus* se diferenciaba en la producción de ácido a partir de la lactosa, metil- α D-glucopiranosido, manitol y D-xilosa; utilización de malato y succinato; la reacción de la oxidasa y la sensibilidad a la kanamicina. La cepa 6Z7Ta-033 no presentaba fucosa ni ribosa entre los azúcares totales de la célula. Con *A. ramosus* se diferenciaba en la hidrólisis de caseína, hipoxantina, tirosina y xantina; producción de ácido a partir de la celobiosa, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, manosa, salicina y D-xilosa; reducción del nitrato, reacciones de la catalasa y oxidasa; y la sensibilidad a la ampicilina, kanamicina, penicilina G y polimixina B. En la composición de azúcares totales también se diferenciaba ya que la cepa 6Z7Ta-033 no presentaba xilosa ni ribosa, presentes en *A. ramosus*. La cepa 6Z7Ta-033 difería con *A. albus* en la hidrólisis de hipoxantina, tirosina, urea y xantina; tolerancia al oxígeno; producción de ácido a partir de adonitol,

amigdalina, celobiosa, D,L-fucosa, glicerol, inulina, lactosa, metil- α D-manopiranosido, ribosa y salicina; y la sensibilidad a ampicilina, kanamicina, ácido nalidíxico y polimixina B. Con *A. cerinus* subesp. *nitratius* difería en la hidrólisis de xantina; producción de ácido a partir de L-arabinosa, inulina, lactosa, manitol, rafinosa, sacarosa y D-xilosa; utilización de malato y succinato; reducción del nitrato; sensibilidad a ciprofloxacina, kanamicina y polimixina B; y actividad de β -galactosidasa, *N*-acetil- β -glucosaminidasa y α -fucosidasa. También existían diferencias en la composición de azúcares totales, ya que la cepa 6Z7Ta-033 presentaba ramnosa, ausente en *A. cerinus* subesp. *nitratius*. Sin embargo, los azúcares xilosa y ribosa estaban presentes en *A. cerinus* subesp. *nitratius* y no en la cepa 6Z7Ta-033. Finalmente, con *A. cerinus* subesp. *cerinus* también existían diferencias en la hidrólisis de caseína, hipurato y xantina; producción de ácido a partir de D,L-arabinosa, inulina, manitol, rafinosa y D-xilosa; y sensibilidad a ampicilina y kanamicina. *A. cerinus* subesp. *cerinus* presentaba xilosa, ribosa y tivelosa, ausentes en la cepa 6Z7Ta-033.

Tabla 6.2. Características que diferencian la cepa 6Z7Ta-033 de las especies más cercanas del género *Agromyces*.

Características ^a	1	2	3 ^b	4	5	6 ^b
Color de la colonia	A	A	B	B	A	A
Contenido G+C (%)	71.2	70.6	68.9	69.0	70.9	70.5
						Ra Ga
Azúcares celulates totales ^c	Ra Ga Ma Glc	Ra Ga Ma Fu Glc Ri ^d	Ra Ga Ma Xi Glc Ri ^d	ND	Ga Ma Glc Xi Ri ^d	Ma Xi Ri Ti, Glc ^d
Crecimiento a 37°C	Tr	+	+	+	(+)*	ND
Hidrólisis de:						
Caseína	+	+	-	+	+	-
Gelatina	+/-	+	-	+	-	-
Hipurato	+	+	+	+	+	-
Hipoxantina	+	+	-	-	+	(+)
Tirosina	+	+	-	-	+	+
Urea	-	-	-	+	-	-
Xantina	+	+	-	-	-	-
Pruebas bioquímicas						
Reducción del nitrato	-	-	+/-	-	+	-
Catalasa	+	+	-	+	+	+
Oxidasa	+/-	+	-	+	+/-	+
Microaeróbico	+	+	+	-	+	- ^e
Producción de ácido a partir de:						
Adonitol	-	-	- ^f	+	-	- ^f
Amigdalina	+	+	+ ^f	-	+	+ ^f
L-Arabinosa	+	+	+	+	-	-
Celobiosa	+	+	-	-	+	+
D-Fucosa	-	-	- ^f	(+)	-	- ^f
L-Fucosa	+	+	+ ^f	-	+	(+) ^f
Galactosa	+	+	-	(+)	+	+
D-Glucosa	+	+	-	(+)	+	+
Glicerol	+	+	+	-	+	+
Inulina	+	(+)	+	-	-	-
Lactosa	(+)	-	-	-	-	+
Metil- α D-manopiranosido	+	+	- ^f	-	-	- ^f
Metil- α D-glucopiranosido	-	+	- ^f	-	-	- ^f
Maltosa	+	+	-	+	+	+

Tabla 6.2. (Continuación)

Características ^a	1	2	3 ^b	4	5	6 ^b
Producción de ácido a partir de:						
Manitol	+	-	(+)	+	-	-
Manosa	+	+	-	(+)	+	+
Melibiosa	-	-	- ^f	(+)	-	- ^f
<i>N</i> -Acetilglucosamina	+/-	+	+ ^f	-	+	- ^f
D-Rafinosa	+	+	+	+*	-	-
Ribosa	-	-	-	+*	-	-
Salicina	+	+	-	-	+	+
Sucrosa	+	+	+	(+)	-	+
Trehalosa	-	(+)*	-	-	-	-
D-Xilosa	+	-	-	+*	-	-
Utilización de:						
Aconitato	-	-	-	-	-	+
Citrato	-	-	-	-	-	+
Malato	+	-	+	+	-	+
Succinato	+	-	+	+	-	-
Actividad enzimática						
α -Galactosidasa	-	-	- ^f	-	+	+ ^f
β -Galactosidasa	+	+	- ^f	+	+	+ ^f
α -Glucosidasa	+	+	- ^f	+	+	+ ^f
<i>N</i> -Acetil- β -glucosaminidasa	+	+	- ^f	+	-	- ^f
α -Fucosidasa	-	-	- ^f	-	+	- ^f
Susceptibilidad antibiótica						
Ampicilina (10 μ g)	-	-	+	+	-	+
Ciprofloxacina (5 μ g)	+	+	+	+	-	+/-
Kanamicina (30 μ g)	-	+	+	+	+	+
Ácido nalidíxico (30 μ g)	-	-	- ^f	+	-	- ^f
Novobiocina (5 μ g)	+	+	- ^f	+	+	+ ^f
Penicilina G (10 UI)	-	-	+	-	-	-
Polimixina B (300 UI)	-	-	+	+	+	+/-
Tetraciclina (30 μ g)	+	+	- ^f	+	+	+ ^f

1, Cepa 6Z7Ta-033; 2, *A. fucosus* IMET 11529^T, 3, *A. ramosus* IMET 11027^T, 4, *A. albus* VKM 1800^T, 5, *A. cerinus* subesp. *nitratus* IMET 11532^T y 6, *A. cerinus* subesp. *cerinus* IMET 11525^T.

^a A: amarilla; B: blanca; -, negativo; +, positivo; (+) débilmente positivo; +/-, variable; *, tardío; tr, trazas; ND, No determinado.

^b Datos de Groth y col. (1996) salvo que se indique otra referencia.

^c Ga, galactosa; Glc, glucosa; Ma, manosa; ra, ramnosa; ri, ribosa; ti, tivelosa; xi, xilosa.

^d Datos de Zurskaya y col. (1992).

^e Datos de Dorofeeva y col. (2003).

^f Datos de este estudio.

Las comparaciones entre las secuencias del gen del ARNr 16S de la cepa 6Z7Ta-033 y de las especies previamente descritas mostraron relaciones filogenéticas próximas con *A. fucosus* (98% de similitud), *A. ramosus* (98% de similitud), *A. albus* (97% de similitud), *A. cerinus* subesp. *nitratus* (97% de similitud), y *A. cerinus* subesp. *cerinus* (97% de similitud).

La hibridación entre el ADN genómico de la cepa 6Z7Ta-033 y el ADN genómico de cada uno de sus vecinos filogenéticos más cercanos, mostró diferencias superiores al nivel recomendado para la separación de especies (Wayne y col., 1997). En todos los casos, los valores de ΔT_m fueron $>5.8^\circ\text{C}$ (aproximadamente $<51\%$ de similitud entre los ADN genómicos; Rosselló-Mora y Amann, 2001). El valor de G+C obtenido para la cepa 6Z7Ta-033 está dentro del rango de contenido G+C de especies descritas del género *Agromyces*.

En la Figura 6.1 se muestra un árbol filogenético basado en los genes del ARNr 16S, mostrando las relaciones entre los miembros del género *Agromyces* y la cepa 6Z7Ta-033, correspondiente con la nueva especie *Agromyces subbeticus*.

Las características genómicas y fenotípicas determinadas también sitúan a la cepa 6Z7Ta-033 como miembro del género (Gledhill y Casida, 1969; Zgurskaya y col., 1992). Basándonos en los resultados de las pruebas presentadas en este estudio, se propuso a la cepa 6Z7Ta-033, como una nueva especie dentro del género *Agromyces*, *Agromyces subbeticus*.

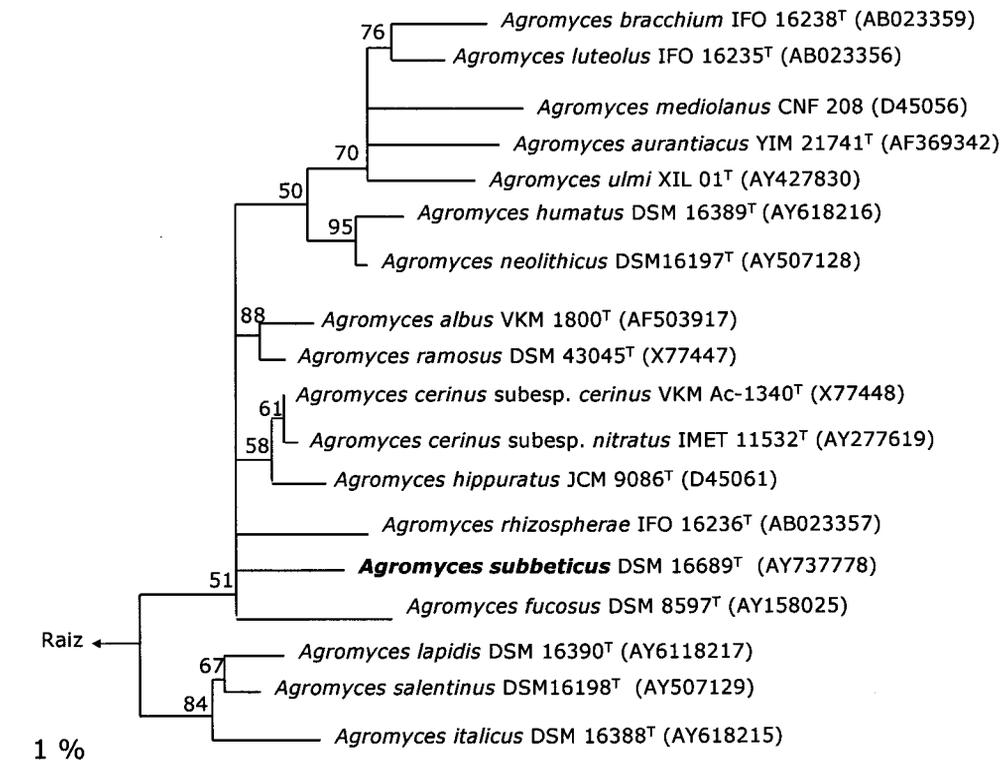


Fig. 6.1. Árbol filogenético que muestra las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Agromyces* y la cepa 6Z7Ta-033 (*Agromyces subbeticus*). Se muestran las cepas utilizadas y entre paréntesis los números de acceso para las secuencias del gen ARNr 16S y la distancia correspondiente a las diferencias.

6.1. DESCRIPCIÓN DE *Agromyces subbeticus*

Agromyces subbeticus (*sub.be'ti.cus*. N.L. masc. adj. *subbeticus*, referente a la Cordillera Subbetica en el Sur de España, donde se localiza la Cueva de los Murciélagos).

Bacteria Gram-positiva, aeróbica y microaerofílica. Las células forman hifas ramificadas (0.3-0.5 μm de diámetro, 2.5-4.0 μm de longitud) que se rompen en fragmentos inmóviles, con formas bacilar y difteroide (Figura 6.2). Las colonias son circulares, convexas, lisas y amarillas (Figura 6.3). El diámetro de la colonia es aproximadamente de 1 mm. Crece entre 6 y 37°C (óptimamente a 28°C), y a valores de pH entre 5 y 9.5. Crece en medio suplementado con el 4% de NaCl, pero no crece con el 6% de NaCl. No reduce el nitrato. Produce sulfuro de hidrógeno. La reacción catalasa es positiva. Indol, Voges-Proskauer y rojo de metilo negativo. La prueba de la oxidasa es variable. Hidroliza almidón, caseína, esculina, hipurato, hipoxantina, tirosina y xantina mientras que no descompone la adenina, Tween 80 y urea. La hidrólisis de la gelatina es variable. Produce ácido a partir de almidón, amigdalina, D,L-arabinosa, arbutina, celobiosa, esculina, fructosa, L-fucosa, galactosa, glucosa, glicerol, glicógeno, inulina, lactosa, metil- α D-manopiranosos, maltosa, manitol, manosa, rafinosa, ramnosa, salicina, sacarosa y D-xilosa. Utiliza acetato, malato y succinato, pero no aconitato, benzoato, citrato y DL-tartrato. Es resistente al ácido nalidíxico (30 μg), ampicilina (10 μg), kanamicina (30 μg), lincomicina (2 μg), meticilina (5 μg), norfloxacin (10 μg), penicilina G (10 UI), polimixina B (300 UI) y sulfonamida (200 μg). Es sensible al cloranfenicol (30 μg), ciprofloxacina (5 μg), estreptomycin (10 μg), imipenem (10 μg), novobiocina (5 μg), ofloxacina (10 μg), oxitetraciclina (30 μg), rifampicina (5 μg), rifampicina (30 μg), tetraciclina (30 μg) y vancomicina (30 μg). Presenta diferentes actividades enzimáticas tales como cistina arilamidasa, esterasa (C4), esterasa lipasa (C8), fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, β -

galactosidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, leucina arilamidasa, *N*-acetil- β -glucosaminidasa, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa y valina arilamidasa. No presenta actividades de las enzimas α -fucosidasa, α -galactosidasa, β -glucuronidasa, lipasa (C14), α -manosidasa, α -quimotripsina y tripsina. Las menaquinonas predominantes son MK-12 y MK-13. La composición de aminoácidos de la pared celular incluye ácido diaminobutírico, glicina, ácido glutámico y alanina. Los azúcares totales de la célula son ramnosa, glucosa, galactosa y manosa. Los lípidos polares mayoritarios son difosfatidilglicerol, fosfatidilglicerol, dos glicolípidos desconocidos y un fosfolípido desconocido. El grupo acilo es acetilo. La composición de ácidos grasos era del 45.6% *anteiso*-C_{15:0}, 20.4% *anteiso*-C_{17:0}, 16.3% *iso*-C_{15:0}, 12.4% *iso*-C_{16:0}, 3.6% *iso*-C_{17:0} y 1% C_{16:0}. Los ácidos micólicos estaban ausentes. El contenido G+C es 71.2%. El organismo fue aislado de un *biofilm* de la pared de la Cueva de los Murciélagos, Zuheros, Córdoba, España.

La cepa tipo es 6Z7Ta-033^T (=HKI 0340^T =DSM 16689^T =NCIMB 14025^T). El número de acceso para la secuencia del gen del ARNr 16S de esta cepa es AY737778.

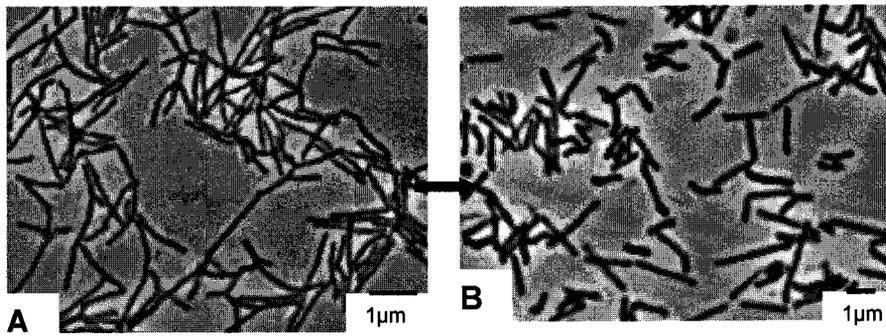


Fig. 6.2. Micrografía en contraste de fase de hifas ramificadas de la cepa 6Z7Ta-033 (A) que se rompen en fragmentos inmóviles de distintas longitudes (B).

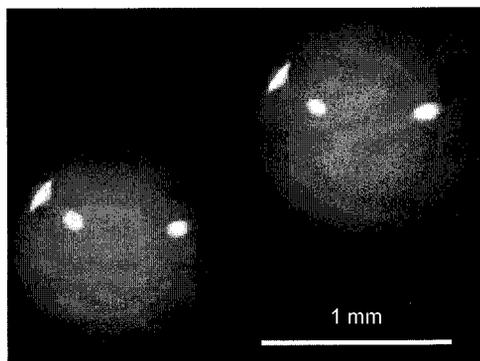


Fig. 6.3. Colonia circular, lisa, convexa y de color crema de la cepa 6Z7Ta-033. Crecimiento en medio sólido OM79 durante 14 días.

CAPITULO 7

**DESCRIPCION MODIFICADA DEL GENERO
Agromyces (EX ZGURSKAYA Y COL., 1992)**

Descripción modificada del género *Agromyces* (ex *Zgurskaya* y col., 1992)

La última descripción propuesta a continuación está basada en la descripción realizada por Zgurskaya y col. (1992) con las siguientes modificaciones (Tabla 7.1). La susceptibilidad a los antibióticos kanamicina y ácido nalidíxico es dependiente de las especies analizadas. El crecimiento en medio con un suplemento del 4% en NaCl es dependiente de las especies analizadas. La galactosa, glucosa y manosa aparecen en la mayoría de las paredes celulares. La ribosa y ramnosa en menor proporción. La xilosa, fucosa, tivelosa y arabinosa raramente están presentes. Las menaquinonas mayoritarias son MK-12 y MK-13. En menor proporción aparecen las menaquinonas MK-10 y MK-11. Miembros de este género *Agromyces* no están restringidos a suelos o inflorescencias, también están presentes en ambientes hipogeos. El contenido de G+C se encuentra en el rango de 65 a 72 mol%. La especie tipo es *A. ramosus*^T.

Tabla 7.1. Características que diferencian las especies del género *Agromyces*.

Características ^a	1	2	3	4	5	6	7 ^b	8	9	10 ^b	11	12	13 ^c	14 ^c	15 ^c	16 ^d	17	18 ^e	
Contenido G+C (%)	72.3	65.3	70.8	70.6	70.4	71.2	68.9	70.6	70.8	70.5	70.9	72.3	71.1	71.2	70.0	72.8	69.0	72.0	
Crecimiento																			
4.0 NaCl (p/v)	(+)	-	+	-	+	(+)	(+)	+	nd	-	(+)	+	+	+	+	nd	(+)	nd	
6°C	-	-	-	-	-	(+)*	nd	+*	nd	nd	tr*	-	nd	nd	nd	nd	tr*	-	
10°C	+	-	(+)	-	(+)	+*	+ ^g	+	nd	(+)	(+)*	(+)	-	-	-	nd	(+)	-	
37°C	+	+	tr*	tr*	+	tr	+	+	(+)	nd	(+)*	+	-	-	-	nd	+	+	
pH 5.0	(+)*	+*	+*	(+)*	+*	+*	nd	+*	nd	nd	+*	+*	nd	nd	nd	nd	-	nd	
Hidrólisis de:																			
Almidón	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	
Caseína	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	- _f	- _f	- _f	nd	+	nd	
Gelatina	-	+	+	+	+/-	+/-	-	+	nd	-	-	-	+	+	+	-	+	-	
Hipurato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	nd	nd	nd	nd	+	nd	
Hipoxantina	-	-	+	(+)	-	+	-	+	-	(+)	+	+	-	-	-	nd	-	nd	
Tirosina	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	nd	nd	nd	nd	-	nd	
Urea	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	+	-	
Xantina	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	- _f	- _f	- _f	nd	-	nd	
Pruebas bioquímicas																			
Reducción del nitrato	-	+	+	+	+	-	+/-	-	+	-	+	-	-	-	-	nd	-	-	
Producción del H ₂ S	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	+	+	+	nd	nd	nd	-	+	+	
Catalasa	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	
Oxidasa	+/-	+/-	+	-	+/-	+/-	-	+	+ ^f	+	+/-	+/-	+ ^f	(+) ^f	+ ^f	nd	+	-	
Microaeróbico	(+)	+	+	-	+	+	+	+	- _f	- _f	+	+	- _f	- _f	- _f	- _f	-	nd	

Tabla 7.1. (Continuación).

Características ^a	1	2	3	4	5	6	7 ^b	8	9	10 ^b	11	12	13 ^c	14 ^c	15 ^c	16 ^d	17	18 ^e	
Utilización de:																			
Acetato	+	-	+	+	+	+	+	+	nd	+	+	+	nd	nd	nd	nd	+	nd	
Aconitato	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+	-	-	nd	nd	nd	nd	-	nd	
Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	nd	nd	nd	nd	-	nd	
Malato	-	-	-	+	-	+	+	-	nd	+	-	-	nd	nd	nd	nd	+	+/-	
Succinato	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	+	nd	
Producción de ácido a partir de:																			
Adonitol	-	-	-	-	-	-	- ^g	-	nd	nd	-	-	-	-	-	-	+	nd	
Almidón	+	+	+	+	+	+	nd	+	nd	nd	+	-	-	+	+	nd	(+)	nd	
Amigdalina	(+)	-	(+)	-	+	+	+	+	- ^f	+ ⁱ	+	+	-	-	+	-	-	+	
D-Arabinosa	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+*	(+)*	-	-	-	-	+*	nd	
L-Arabinosa	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+/-	+	nd	
Celobiosa	+	+	+	(+/-)	+	+	-	+	nd	+ ^h	+	+	-	+	+	+	-	+	
D-Fucosa	-	-	-	-	-	-	nd	-	nd	nd	-	-	-	-	-	-	(+)	nd	
L-Fucosa	+	+	+	-	+	+	+	+	nd	(+)	+	-	-	-	-	-	-	nd	
Galactosa	+	+	+	+	+	+	-	+	nd	+ ^h	+	+	-	-	+	+	(+)	+	
β -Gentibiosa	(+)	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	-	-	-	+/-	+	-	-	+	
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	+ ⁱ	+	+	-	-	-	+	-	+	
Glicógeno	+	+	+	+	+	+	nd	+	nd	nd	+	-	-	+	+	+	(+)	+	
D-Glucosa	+	+	+	+	+	+	-	+	nd	+	+	+	+	+	+	nd	(+)	+	
Inulina	+	-	-	+	+	+	+	(+)	-	-	-	-	- ^f	+ ^f	- ^f	+	-	+	
Lactosa	-	-	(+)	-	-	(+)	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	
Metil- α D-manopiranosido	-	-	-	-	+	+	-	+	nd	-	-	-	-	-	-	nd	-	+	

Tabla 7.1. (Continuación).

Características ^a	1	2	3	4	5	6	7 ^b	8	9	10 ^b	11	12	13 ^c	14 ^c	15 ^c	16 ^d	17	18 ^e
Producción de ácido a partir de:																		
Metil- α D-glucopiranosidp	-	-	-	-	-	-	-	+	nd	-	-	-	-	-	-	nd	-	+
Manitol	-	+	-	+	-	+	(+)	-	- ^f	-	-	-	(+)	-	+	+	+	-
Manosa	+	(+)	+	+	+	+	-	+	nd	+ ⁱ	+	+	+	+	+	nd	+	+
Melibiosa	-	+	-	-	-	-	- ^g	-	nd	- ⁱ	-	-	(+)	-	+	nd	(+)	+
N-Acetilglucosamina	-	(+)*	-	(+/-)	+	(+/-)	+	+	nd	-	+	-	-	-	+	nd	-	+
D-Rafinosa	(+)	+	-	+	(+)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+*	+
Ramnosa	+	-	-	+	-	+	+	+*	+	+	+	+	(+)	-	(+)	-	+	+
Ribosa	+	-	-	-	-	-	-	-	nd	- ⁱ	-	+	-	-	+	-	+*	+
Salicina	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	(+)	-	+	+	-	-	+
Sacarosa	+	(+/-)	-	+	+	+	+	+	nd	-	-	+	nd	nd	nd	nd	(+)	+
L-Sorbosa	-	-	-	-	-	-	nd	-	nd	nd	-	(+)	-	-	-	-	-	+
Trehalosa	+	-	-	-	-	-	-	(+)*	- ^c	-	-	+	+	-	+	-	-	+
D-Turanosa	+	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	(+)	-	-	+	+/-	-	nd
D-Xilosa	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+*	+
Actividad enzimática																		nd
α -Fucosidasa	-	-	-	-	-	-	nd	-	nd	nd	+	-	nd	nd	nd	nd	-	nd
α -Galactosidasa	-	+	-	-	-	-	-	-	nd	+	+	-	nd	nd	nd	nd	-	nd
β -Galactosidasa	+	-	+	+	+	+	-	+	nd	+	+	+	nd	nd	nd	nd	+	nd
β -Glucosidasa	+	-	+	+	+	+	nd	+	nd	nd	+	+	nd	nd	nd	nd	+	nd

Tabla 7.1. (Continuación).

Características ^a	1	2	3	4	5	6	7 ^b	8	9	10 ^b	11	12	13 ^c	14 ^c	15 ^c	16 ^d	17	18 ^e	
Actividad enzimática																			nd
<i>β</i> -Glucuronidasa	-	+	-	+	-	-	-	-	nd	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd
<i>N</i> -Acetil- <i>β</i> -glucosaminidasa	+	+	-	-	-	+	-	+	nd	-	-	+	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd
<i>α</i> -manosidasa	-	+	-	+	-	-	-	-	nd	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd
<i>α</i> -quimotripsina	-	+	-	-	+	-	-	-	nd	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd
Susceptibilidad a antibióticos																			
Ácido nalidíxico (30 µg)	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd
Ampicilina (10 µg)	+	+	+	+	+	-	+	-	nd	+	-	+	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd
Ciprofloxacina (5 µg)	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	+/-	-	-	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd
Estreptomina (10 µg)	+	-	-	+	-	+	+	+	nd	+	+	-	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd
Kanamicina (30 µg)	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd
Meticilina (5 µg)	+	+	+	+	+	-	nd	-	nd	nd	-	-	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd
Norfloxacina (10 µg)	+	+	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd
Novobiocina (5 µg)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd
Penicilina G (10 UI)	+	+	+	-	+	-	+	-	nd	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd
Polimixina B (300 UI)	+	+	-	+	-	-	+	-	nd	+/-	+	-	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd
Sulfonamida (200 µg)	+	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd

Tabla 7.1. (Continuación).

Características ^a	1	2	3	4	5	6	7 ^b	8	9	10 ^b	11	12	13 ^c	14 ^c	15 ^c	16 ^d	17	18 ^e	
Azúcares celulares totales ^j	Ra Glc Ga Ara Ri	Glc Ga Ma	Ga Ri Glc Ma	Glc Ga Ra Ma	Glc Ga Ma Ri	Ra Ga Ma Glc	Ra ^h Ga Ma Xi Glc Ri	Ra ^h Ga Ma Fu Glc Ri	Ga ^h Glc Ma Ri Xi Ra Ti Fu	Ra ^h Ga Ma Xi Ri Ti Glc	Ga ^h Ma Glc Xi Ri		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Menaquinonas mayoritarias ^j	12 11 10 13	13	12 13	13 12	12 13	12 13	12 ⁱ 13 10	12 ⁱ 13 10	12 ⁱ 13 10	12 ⁱ 13 10	12 ⁱ 13 10	12 ⁱ 11 10	12 ^c 11	12 ^c 11	12 ^c 13 11	12 13 11	12 ^f 11	12 11 10	
Origen	S	S	Pa	Pa	Pi	Pa	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	H,I	T	

1, *A. salentinus* (DSM 16198^T); 2, *A. neolithicus* (DSM 16197^T); 3, *A. italicus* (DSM 16388^T); 4, *A. humatus* (DSM 16389^T); 5, *A. lapidis* (DSM 16390^T); 6, *A. subbeticus* (DSM 16689^T); 7, *A. ramosus* (IMET 11027^T); 8, *A. fucosus* (IMET 11529^T); 9, *A. hippuratus* (JCM 9086^T); 10, *A. cerinus* subesp. *cerinus* (IMET 11525^T); 11, *A. cerinus* subesp. *nitratu*s (IMET 11532^T); 12, *A. mediolanus* (VKM 1388^T); 13, *A. luteolus* (IFO 16235^T); 14, *A. rhizosphaerae* (IFO 16236^T); 15, *A. bracchium* (IFO 16238^T); 16, *A. aurantiacus* (YIM 21741^T); 17, *A. albus* (VKM 1800^T); 18, *A. ulmi* (XIL 01^T).

^a -, negativo; +, positivo; (+), débilmente positivo; +/-, variable; *, tardío; tr, trazas; nd, no determinado; Ara, arabinosa; Ga, galactosa; Glc, glucosa; Ma, manosa; Ra, ramnosa; Ri, ribosa; Ti, tivelosa; Xi, xilosa; S, suelo; Pa, pared; Pi, piedra; R, rizosfera; H,I, hojas e inflorescencias; T, tocón de árbol.

^b Datos de Groth y col. (1996) salvo que se indique otra referencia.

^c Datos de Takeuchi y Hatano (2001) salvo que se indique otra referencia.

^d Datos de Li y col. (2003) salvo que se indique otra referencia.

^e Datos de Rivas y col. (2004).

^f Datos de Dorofeeva y col. (2003)

^g Datos de Gledhill y Casida (1969).

^h Datos de Zgurskaya y col. (1992).

ⁱ Datos de Suzuki y col. (1996).

^j En orden de abundancia.

CAPITULO 8

BIOMINERALIZACION CAUSADA POR *AGROMYCES*

BIOMINERALIZACION CAUSADA POR *Agromyces*

El papel de las actinobacterias en los procesos biogeoquímicos, particularmente en el deterioro de las obras de arte en cuevas y catacumbas es de particular interés por el efecto que pudieran tener sobre el Patrimonio Cultural (Groth y Saiz-Jimenez, 1999; Groth y col., 1999a), ya que el crecimiento de actinobacterias es un peligro para las pinturas rupestres al estar relacionadas con procesos constructivos (precipitación mineral) y destructivos (disolución del sustrato) en los ambientes hipogeos (Sanchez-Moral y col., 2003a).

Cañaveras y col. (1999) sugirieron que las bacterias podían jugar un papel en la formación de depósitos cristalinos tipo *moonmilk* en la Cueva de Altamira, ya que comprobaron la presencia de comunidades microbianas, predominantemente compuestas por actinobacterias, asociadas con depósitos de hidromagnesita y aragonito, así como la capacidad de muchos aislamientos para precipitar carbonato cálcico en cultivos de laboratorio.

La capacidad de las actinobacterias de cuevas y catacumbas para producir precipitados minerales se ha descrito en varios trabajos (Laiz y col., 1999; Groth y col., 2001; Sanchez-Moral y col., 2003a). En el laboratorio se ha demostrado que estos microorganismos generan microhabitats que favorecen los procesos de biomineralización, tales como la precipitación, transformación y preservación de formas polimórficas de carbonato cálcico (calcita, aragonito, vaterita) y también de otras fases cristalinas compuestas por sulfatos o fosfatos, encontrados en los ambientes naturales y en cultivos de laboratorio (Sanchez-Moral y col., 2003b, 2004).

Con el objetivo de conocer el papel de los *Agromyces* en los ciclos biogeoquímicos, se realizaron experimentos de bioinducción de cristales en el laboratorio empleando diferentes medios de cultivo (Tabla 8.1). Los medios de cultivo utilizados variaban la fuente de carbono y composición de sales, al igual que ocurre en el medio natural donde existe una elevada variedad de fuentes de carbono (Saiz-Jimenez y Hermosin, 1999a,b) y de depósitos cristalinos, incluyendo carbonatos, cloratos, nitratos y sulfatos (Cañaveras y col., 2001). En los medios de cultivo B4, M2, Ba1, Mg y NH la fuente de carbono era el acetato, de forma que aquellas bacterias con capacidad de precipitar cristales darían lugar a carbonatos. Empleando los medios de cultivo CTA-N y Sr2 se esperaba encontrar precipitados cristalinos compuestos por sulfatos o fosfatos.

Después de una semana de incubación la mayoría de las cepas de *Agromyces* formaron cristales distribuidos por toda la placa, asociados a las colonias bacterianas. Se llevaron a cabo análisis morfológicos y estructurales de los cristales recogidos asociados a las colonias de un cultivo de 20 días. La composición mineral de los precipitados se identificó en el Departamento de Geología del Museo Nacional de Ciencias Naturales del CSIC, empleando espectroscopia FT-IR, microscopía electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos-X (DRX) y espectroscopía de energías dispersadas (EDS).

Tabla 8.1. Cepas aisladas de la Cueva de los Ciervos y Catacumba Romana de Domitila, y su producción de fases cristalinas empleando distintos medios de cultivo.

Cepas	Homólogo más próximo*	Medios de cultivo						
		B4	M2	Ba1	CTA-N	Mg	NH	Sr2
2-12	<i>A.cerinus</i> subesp. <i>cerinus</i>	+	+	-	+	-	+	-
18-4	<i>A.cerinus</i> subesp. <i>cerinus</i>	+	+	-	+	-	+	-
18-28	<i>A.cerinus</i> subesp. <i>nitratus</i>	+	+	-	+	-	+	-
19-17	<i>A.cerinus</i> subesp. <i>cerinus</i>	+	+	ND	+	-	+	ND
19-20	<i>A.cerinus</i> subesp. <i>nitratus</i>	+	+	ND	+	-	+	ND
23-23	<i>A. neolithicus</i>	+	+	-	+	-	+	-
24-6	<i>A.cerinus</i> subesp. <i>cerinus</i>	+	+	ND	+	-	+	ND
24-14	<i>A.cerinus</i> subesp. <i>nitratus</i>	+	+	ND	+	-	+	ND
25-20	<i>A.subbeticus</i>	+	+	-	+	-	+	-
20-2	<i>A. salentinus</i>	+	+	ND	+	-	+	ND
20-3	<i>A. lapidis</i>	+	+	ND	+	-	+	ND
20-5	<i>A. salentinus</i>	+	+	ND	+	-	+	ND
CD13Eh-1	<i>A. italicus</i>	+	+	-	+	-	+	-
CD13Eh-5	<i>A. humatus</i>	+	+	-	+	-	+	-
CD13Eh-12	<i>A. lapidis</i>	+	+	+	+	-	+	-
CD13Eh-30	<i>A. fucosus</i>	+	+	+	+	-	+	-
CD13Eh-36	<i>A. italicus</i>	+	+	-	+	-	+	ND
CD13Eh-38	<i>A.cerinus</i> subesp. <i>nitratus</i>	+	+	-	+	-	+	ND
CD13Eh-39	<i>A.cerinus</i> subesp. <i>nitratus</i>	+	+	-	+	-	+	ND

*Asignación de especies realizada con posterioridad a la descripción de las nuevas especies propuestas en este estudio. ND: No determinado.

En la Tabla 8.1 se observa que el 100% de las cepas estudiadas producían cristales en medio B4 (Boquet y col., 1973), correspondientes a formas polimórficas de carbonato cálcico [(calcita, aragonito, vaterita) (Figura 8.1)]. Sanchez-Moral y col. (2003b) observaron en las Catacumbas de San Calixto distintos tipos de cristales de carbonato cálcico (CaCO_3), unos en forma de cristales aciculares de aragonito y otros con forma de semiesfera de vaterita, idénticos a los producidos en el laboratorio. Parece ser que la habilidad para producir formas polimórficas de carbonato cálcico está ampliamente extendida entre las actinobacterias ambientales (Groth y col., 2001). También el 100% de los aislamientos producían cristales en medio M2, correspondientes a calcita magnésica ($\text{CaCO}_3\text{-Mg}$) (Gonzalez-Muñoz y col., 2000). En medio Ba1, sólo los aislamientos de la Catacumba de Domitila, CD13Eh-12 y CD13Eh-30, producían cristales de witherita (BaCO_3) (Figura 8.2). La presencia de bario como uno de los elementos traza más abundantes de la roca de las catacumbas (1200-7200 ppm) confirmaría la capacidad de estos aislamientos de producir cristales de carbonato bórico en este ambiente hipogeo (Sanchez-Moral y col., 2003a). Se conoce que el bario es un elemento altamente tóxico para las bacterias, hongos, musgos y algas (Baldi y col., 1996). Sin embargo, la actividad bacteriana o meteorización físico-química moviliza el bario desde la roca, particularmente si el bario está asociado a carbono orgánico necesario para el crecimiento, precipitando bario como witherita. La witherita es un mineral poco frecuente, principalmente porque se altera fácilmente hasta barita (BaSO_4). Esto se produce cuando los sulfatos de diversos minerales se disuelven junto con la witherita y el sulfato se combina con el bario formando barita. La presencia de witherita en las catacumbas es poco probable, ya que se transforma en barita espontáneamente. En las catacumbas, el yeso y sulfatos están presentes comúnmente en la forma de minerales secundarios, también disueltos en las aguas de goteo (Sanchez-Moral y col., 2003b). En los medios CTA-N y NH todas las bacterias producían cristales de fosfato. Estos cristales correspondían a estruvita ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Figura 8.3) como se demostró en trabajos previos (Gonzalez-Muñoz y col., 1993;

Groth y col., 2001). La presencia de estruvita en los cultivos de cepas aisladas de las catacumbas y la presencia de cantidades apreciables de fósforo y magnesio en la roca volcánica de dichas catacumbas nos lleva a considerar que algunos minerales de fosfatos encontrados en las catacumbas podrían tener un origen biológico (Sanchez-Moral y col., 2003a). Sin embargo, no se observó producción de cristales en los medios Mg y Sr² por ninguna de las cepas estudiadas.

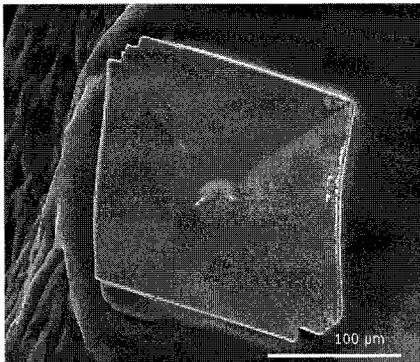


Fig. 8.1. Imagen al microscopio electrónico de un cristal poliédrico y romboidal de calcita producido por la cepa 19-20.

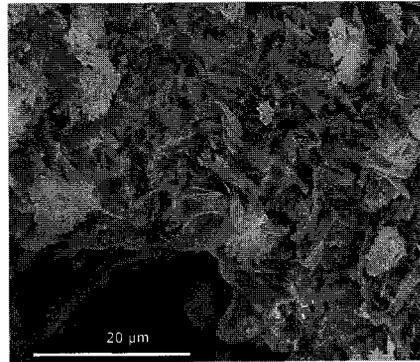


Fig. 8.2. Imagen al microscopio electrónico de agregados cristalinos de witherita producido por la cepa CD13Eh-12.

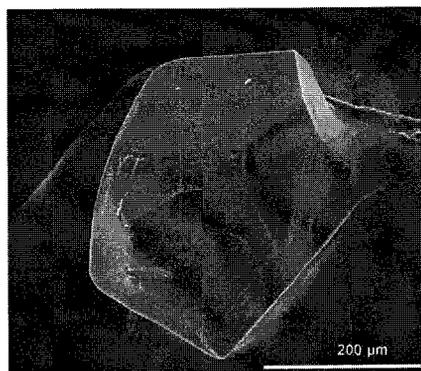


Fig. 8.3. Imagen al microscopio electrónico de un cristal orto-rómbico de estruvita producido por la cepa 24-14.

Se concluye que un elevado número de *Agromyces* mostró la habilidad de producir diferentes tipos de cristales de carbonatos y fosfatos, dependiendo de las fuentes de carbono y sales presentes en el medio de cultivo. Esto indica la contribución geomicrobiológica de las especies de *Agromyces* en la precipitación de fosfatos y de carbonatos de calcio, magnesio y bario en los sustratos de cuevas y catacumbas. Además, las transformaciones biológicas para eliminar productos tóxicos tales como el bario, y su incorporación en el medio ambiente como biominerales son de gran importancia.

Esto podría abrir nuevas perspectivas en el papel que nuevas especies de *Agromyces* pueden jugar en la formación de cristales, en los ciclos biogeoquímicos, y en la conservación de ambientes hipogeos.

CAPITULO 9
CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

- El estudio microbiológico de ambientes hipogeos ha permitido aislar y describir 7 nuevas especies del género *Agromyces* (*A. hippuratus*, *A. neolithicus*, *A. salentinus*, *A. italicus*, *A. humatus*, *A. lapidis* y *A. subbeticus*) y redescubrir la especie tipo *A. fucosus*.
- El número de especies del género *Agromyces* se ha incrementado considerablemente con este estudio, desde las 10 especies anteriormente descritas hasta las 17 especies actuales. Las especies descritas en este trabajo representan un 47% del total de las especies válidas. Ello sugiere una amplia distribución de este género en ambientes hipogeos.

Las relaciones entre las distintas especies de *Agromyces* se indican en el siguiente árbol filogenético:

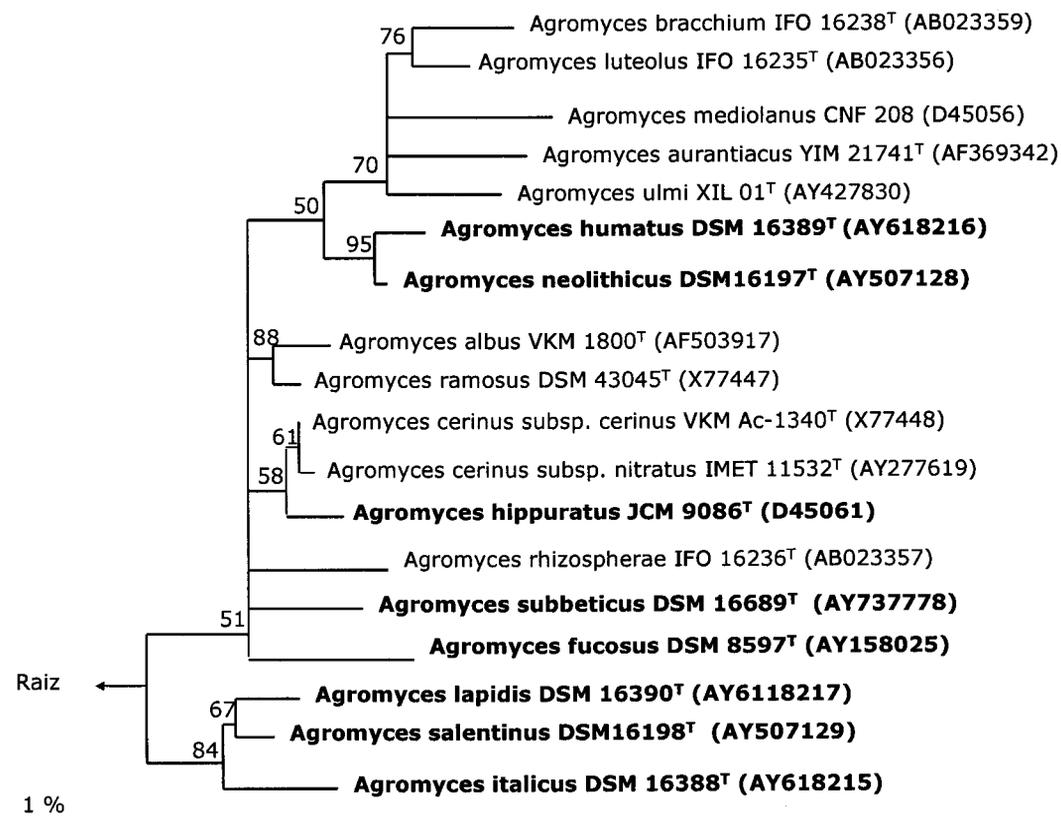


Fig. 9.1. Árbol filogenético que muestra las nuevas especies de *Agromyces* descritas en este trabajo

- Las especies de *Agromyces* son capaces de inducir la precipitación de calcio, magnesio y bario en el laboratorio, lo que sugiere la importancia de especies del género *Agromyces* en procesos de biomineralización típicos en ambientes hipogeos de interés cultural.

ABSTRACT

ABSTRACT

In this study were isolated from hypogean environments 26 strains of *Agromyces*. The taxonomical study permitted the description of 7 new species (*A. hippuratus*, *A. neolithicus*, *A. salentinus*, *A. italicus*, *A. humatus*, *A. lapidis* y *A. subbeticus*) and an emended description of *Agromyces fucosus*. All these species are described below.

DESCRIPTION OF *Agromyces hippuratus* sp. nov.

Agromyces hippuratus (hip.pu.ra'tus. N.L. n. *hippuratus* hippurate; N.L. masc. adj. *hippuratus* pertaining to hippurate, relating to the ability to decompose hippurate).

Basonym: *Agromyces fucosus* subsp. *hippuratus* Zgurskaya et al., 1992.

The description is based on phenotypical data of Zgurskaya et al. (1992), Gnilyub y col. (1994), Malysheva (1994), Groth et al. (1996), Suzuki et al. (1996), Alterburger et al. (1997) and Dorofeeva et al. (2003). Colonies on nutrient media are opaque, entire, convex and usually penetrate into the agar media. Produces a yellow carotenoid pigment. Branching hyphae (width, 0.2-0.6 μm) break into diphtheroid and rod-like, irregular, non-motile fragments. Aerobic, catalase- and oxidase-positive. Mesophilic; optimum growth is at 26-30°C. Strains are able to grow at 7°C; weak or no growth occurs at 37°C. D-Arabinose, cellobiose, D-fructose, D-galactose, D-glucose, maltose, D-mannose, melezitose, melibiose, L-rhamnose, salicin, sucrose, trehalose and D-xylose are used for growth as sole carbon sources in a salt medium supplemented with 0.1% (w/v) yeast extract (Zgurskaya et al., 1992). Adonitol, dulcitol, meso-inositol, lyxose, D-mannitol, methyl- β -D-arabinopyranoside and L-sorbose are not used as sole carbon sources in the same medium. Acids are produced from D-arabinose, glycerol and L-rhamnose; no acid production from cellobiose, inulin, lactose, maltose, raffinose, D-ribose, salicin or trehalose. Acid production from L-arabinose and sucrose is variable. Fumarate, hippurate, malate and pyruvate are utilized. No alkaline reactions with ascorbate, citrate, gluconate, oxalate, propionate, salicylate, succinate and tartrate are observed; some strains show positive reaction with *trans*-aconitate. Nitrate is reduced to nitrite and tyrosinase is produced. Aesculin, hypoxanthine and starch are hydrolysed. Adenine, elastin, guanine, pectin, testosterone, urea and

xanthine are not decomposed or hydrolysed. Casein is usually not hydrolysed. Indole test is negative. No growth occurs on media supplemented with 5% NaCl, 0.01% sodium azide or 0.0175% potassium tellurite. The major menaquinone is MK-12 with a minor amount of MK-13. Polyamine content is low; putrescine and spermidine are predominant compounds (data for the type strain only). Cell wall sugars are rhamnose, galactose and trace mannose. Cell wall contains 1,5-poly(ribitol phosphate) teichoic acid. The C+C content of the DNA is about 71 mol%. Isolated from soil.

The type strain is VKM Ac-1352^T (=JCM 9086^T). The GenBank accession number for the 16S rRNA gene sequence of this strain is D45061.

EMENDED DESCRIPTION OF *Agromyces fucosus*

The description is based on phenotypical data of Zgurskaya et al. (1992), Malysheva (1994), Groth et al. (1996), Suzuki et al. (1996), Altenburger et al. (1997) and Dorofeeva et al. (2003).

Colonies on nutrient media are opaque, entire and convex, and occasionally penetrate into the agar media. Produces a yellow carotenoid pigment. Branching hyphae (width, 0.2-0.6 μm) break into diphtheroid and rod-like, irregular, non-motile fragments. Catalase and oxidase positive. Mesophilic; optimum growth is at 26-30°C. Strains are able to grow at 7°C; no or weak growth occurs at 37°C. D-Arabinose, cellobiose, D-fructose, D-galactose, D-glucose, maltose, D-mannose, melezitose, methyl-D-glucoside, L-rhamnose, salicin, sucrose, trehalose and D-xylose are used for growth as sole carbon sources in a salt medium supplemented with 0.1% (w/v) yeast extract (Zgurskaya et al., 1992). Dulcitol, erythritol, lyxose, D-mannitol, methyl- β -D-arabinopyranoside and L-sorbose are not used as sole carbon sources in the same medium. Some strains, including the type strain, use melibiose for growth, whereas adonitol and *meso*-inositol

are not used by most of the strains, including the type strain. Acids are usually produced from L-arabinose, cellobiose, glycerol, inulin, lactose, maltose, L-rhamnose, salicin, sucrose and D-xylose by most strains (reactions of the type strain are positive or variable). Acetate, malate and pyruvate are utilized. Alkaline reactions with fumarate and propionate are variable (type strain is negative). Ascorbate, *trans*-aconitate, gluconate, oxalate, salicylate and tartrate are not utilized. Production of H₂S is variable; the type strain shows a positive reaction. Arbutin, aesculin and starch are hydrolysed; adenine, elastin, guanine, pectin, testosterone, urea and xanthine are not decomposed or hydrolysed. Hippurate, hypoxanthine, Tween 40 and tyrosine are decomposed by some strains, including the type strain. Casein is usually not hydrolysed. Indole test is negative. Nitrate reduction test is negative or weak reaction is observed. No growth occurs on media supplemented with 5% NaCl, 0.01% sodium azide or 0.0175% potassium tellurite. The major menaquinone is MK-12; the second most common component is MK 13. Polyamine content is low; putrescine and 1,3-diaminopropane are the predominant compounds (data for the type strain only). Cell wall sugars are galactose, rhamnose, fucose and minor mannose (type strain); glucose may occur but fucose is lacking in other strains. Cell wall contains 1,3-poly(glycerol phosphate) teichoic acid. The G+C content of the DNA is 70-72 mol%. Isolated from soil.

The type strain is VKM Ac-1345^T (=DSM 8597^T). The GenBank accession number for the 16S rRNA gene sequence of this strain is AY158025.

DESCRIPTION OF *Agromyces salentinus* sp. nov.

Agromyces salentinus (sa.len.ti'nus. N.L. masc. adj. *salentinus* referring to Salentine Peninsula, the location of Grotta dei Cervi, the area from which the organism was isolated).

Cells form branching hyphae (width 0.5-0.7 μm) that break up into irregular diptheoid and rod-like non-motile fragments. Gram-positive, aerobic and microaerophilic, growing between 10 and 37°C (optimal growth at 20-28°C). Colonies are circular, convex, smooth and yellow. Colony diameter is about 1 mm. Nitrate reduction is negative. Produce hydrogen sulfide. Catalase reaction is positive. Voges-Proskauer, methyl red and indole tests gave negative results. Oxidase test is variable. Casein, aesculin, hippurate, starch, tyrosine and urea are hydrolysed. Adenine, gelatin, hypoxanthine, Tween 80 and xanthine are not decomposed or hydrolysed. Acid is produced from starch, amygdalin, D,L-arabinose, arbutin, cellobiose, aesculin, fructose, L-fucose, galactose, β -gentibiose, glucose, glycerol, glycogen, inulin, lactose, maltose, mannose, raffinose, rhamnose, ribose, salicine, sucrose, trehalose, D-turanose and D-xylose. Grows in up to 4% NaCl. Acetate is utilized but aconitate, citrate, benzoate, DL-tartrate, malate and succinate are not utilized. It is susceptible to ampicillin (10 μg), ciprofloxacin (5 μg), chloramphenicol (30 μg), imipenem (10 μg), kanamycin (30 μg), methicillin (5 μg), nalidixic acid (30 μg), norfloxacin (10 μg), ofloxacin (10 μg), novobiocin (5 μg), oxytetracycline (30 μg), penicillin G (10 IU), polymyxin B (300 IU), rifampicin (30 μg), rifampicin (5 μg), streptomycin (10 μg), sulfonamide (200 μg), tetracyclin (30 μg), vancomycin (30 μg), and sensitive to lincomycin (2 μg). It produces alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), cystine arylamidase, acid phosphatase, β -galactosidase, β -glucosidase, α -glucosidase, leucine arylamidase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, valine arylamidase, *N*-acetyl- β -glucosaminidase, but not α -fucosidase, α -galactosidase, β -glucuronidase, lipase (C14), α -mannosidase, α -chymotrypsin and

trypsin. Predominant menaquinones are MK-12 and MK-11. Amino acid composition of the cell wall includes diaminobutyric acid, glutamic acid, glycine and alanine. Whole cell sugars are rhamnose, glucose, galactose, arabinose and ribose. Major polar lipids are diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, and unknown glycolipid and four unknown phospholipids. Acyl type is acetyl. Predominant fatty acids are anteiso-C_{15:0} and anteiso-C_{17:0}. The G+C content of the DNA is 72.3 mol%. Isolated from soil.

The type strain is 20-5^T (=HKI 0320^T = DSM 16198^T = NCIMB 13990^T). The GenBank accession number for the 16S rRNA gene sequence of this strain is AY507129.

DESCRIPTION OF *Agromyces neolithicus* sp. nov.

Agromyces neolithicus (neo.li'thi.cus. N.L. masc. adj. *neolithicus* referring to the origin of the neolithic paintings in Grotta dei Cervi, the source of the soil from which the organism was isolated).

Cells form branching hyphae (width 0.4-0.6 µm) that break up into irregular diphtheroid and rod-like non-motile fragments. Gram-positive, aerobic and microaerophilic, growing between 15 and 37°C (optimal growth at 28°C). Colonies are circular, convex, smooth and beige. Colony diameter is about 1 mm. Nitrate reduction is positive. Produce hydrogen sulfide. Catalase reaction is positive. Voges-Proskauer, methyl red and indole tests gave negative results. Oxidase test is variable. Casein, aesculin, gelatin, hippurate, starch and tyrosine are hydrolysed. Adenine, hypoxanthine, Tween 80, urea and xanthine are not decomposed or hydrolysed. Acid is produced from starch, D,L-arabinose, arbutin, cellobiose, aesculin, fructose, L-fucose, galactose, glucose, glycerol, glycogen, maltose, mannose, mannitol, melibiose and raffinose. Grows in up to 4% NaCl. Acetate, aconitate, citrate, benzoate, DL-tartrate, malate and succinate are not utilized. It

is susceptible to ampicillin (10 μg), ciprofloxacin (5 μg), chloramphenicol (30 μg), imipenem (10 μg), methicillin (5 μg), norfloxacin (10 μg), novobiocin (5 μg), ofloxacin (10 μg), oxytetracycline (30 μg), penicillin G (10 IU), polymyxin B (300 IU), rifampicin (30 μg), rifampicin (5 μg), tetracyclin (30 μg), vancomycin (30 μg), and sensitive to kanamycin (30 μg), lincomycin (2 μg), streptomycin (10 μg), sulfonamide (200 μg) and nalidixic acid (30 μg). It produces alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), cystine arylamidase, acid phosphatase, β -galactosidase, α -glucosidase, leucine arylamidase, α -mannosidase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, valine arylamidase, *N*-acetyl- β -glucosaminidase, but not α -fucosidase, α -galactosidase, β -glucosidase, β -glucuronidase, lipase (C14), α -chymotrypsin and trypsin. No growth occurs in 4% NaCl. Predominant menaquinones are MK-13 and MK-12. Amino acid composition of the cell wall includes diaminobutyric acid, glutamic acid, glycine and alanine. Whole cell sugars are glucose, galactose and mannose. Major polar lipids are diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, two unknown phospholipids and an unknown glycolipid. Predominant fatty acids are anteiso-C_{15:0} and anteiso-C_{17:0}. The G+C content of the DNA is 65.3 mol%. Isolated from soil.

The type strain is 23-23^T (=HKI 0321^T = DSM 16197^T = NCIMB 13989^T). The GenBank accession number for the 16S rRNA gene sequence of this strain is AY507128.

DESCRIPTION OF *Agromyces italicus* sp. nov.

Agromyces italicus (i.ta'licus. L. masc. adj. *italicus* from Italy, the origin of the type strain).

Gram-positive, aerobic to microaerophilic actinomycete that forms branching hyphae (width 0.4-0.6 μm) which break up into irregular diphtheroid and rod-like, non-motile fragments. Colonies are circular, convex, smooth and cream. Colony diameter is about 1 mm. Growth occurs between 10 and 37°C (optimal growth at 28°C) and at pH 5-9.5. NaCl is tolerated up to 4% (w/v), but not at 6% (w/v). Nitrate reduction is positive. Produce hydrogen sulfide. Catalase and oxidase reactions are positive. Voges-Proskauer, methyl red and indole tests gave negative results. Casein, aesculin, gelatin, hippurate, hypoxanthine, starch, tyrosine and xanthine are hydrolysed. Adenine, Tween 80 and urea and are not decomposed or hydrolysed. Acid is produced from starch, D,L-arabinose, amygdalin, arbutin, cellobiose, aesculin, fructose, L-fucose, galactose, glucose, glycerol, glycogen, lactose, maltose, mannose, salicin and D-xylose. Acetate is utilized but aconitate, citrate, benzoate, DL-tartrate, malate and succinate are not utilized. It is susceptible to ampicillin (10 μg), ciprofloxacin (5 μg), chloramphenicol (30 μg), imipenem (10 μg), methicillin (5 μg), novobiocin (5 μg), penicillin G (10 IU), rifampicin (30 μg), rifampicin (5 μg), tetracyclin (30 μg) and vancomycin (30 μg), but not to kanamycin (30 μg), lincomycin (2 μg), norfloxacin (10 μg), ofloxacin (10 μg), oxytetracycline (30 μg), polymyxin B (300 IU), streptomycin (10 μg), sulfonamide (200 μg) and nalidixic acid (30 μg). It produces alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), cystine arylamidase, acid phosphatase, β -galactosidase, β -glucosidase, α -glucosidase, leucine arylamidase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, valine arylamidase, but not α -fucosidase, α -galactosidase, β -glucuronidase, lipase (C14), α -mannosidase, *N*-acetyl- β -glucosaminidase, α -chymotrypsin and trypsin. Predominant menaquinones are MK-12 and MK-13. Cell-wall amino acids are diaminobutyric acid, glycine, glutamic

acid and alanine. Whole cell sugars are galactose, ribose, glucose and mannose. Major polar lipids are diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, two unknown phospholipids and an unknown glycolipid. Acyl type is acetyl. Predominant fatty acids are anteiso-C_{15:0} and anteiso-C_{17:0}; mycolic acids are absent. G+C content is 70.8 mol%. Isolated from the wall of a tomb located in the Little Apostle cubicle, Domitilla Catacomb, Rome, Italy.

The type strain is CD1^T (=HKI 0325^T =DSM 16388^T =NCIMB 14011^T =CIP 108740^T). The GenBank accession number for the 16S rRNA gene sequence of this strain is AY618215.

DESCRIPTION OF *Agromyces humatus* sp. nov.

Agromyces humatus (hu.ma'tus. L. masc. part. adj. *humatus* buried).

Gram-positive, aerobic actinomycete that forms branching hyphae (width 0.3-0.5 µm) which break up into irregular diphtheroid and rod-like, non-motile fragments. Colonies are circular, convex, smooth and yellow. Colony diameter is about 1 mm. Growth occurs between 15 and 37°C (optimal growth at 28°C) and at pH 5-9.5. NaCl is tolerated up to 2% NaCl (w/v), but not a 4% (w/v). Nitrate reduction is positive. Produce hydrogen sulfide. Catalase reaction is positive. Oxidase test is negative. Voges-Proskauer, methyl red and indole tests gave negative results. Casein, aesculin, gelatin, hippurate, hypoxanthine, starch and tyrosine are hydrolysed. Adenine, Tween 80, urea and xanthine are not decomposed or hydrolysed. Acid is produced from starch, L-arabinose, arbutin, aesculin, fructose, galactose, glucose, glycerol, glycogen, inulin, maltose, mannitol, mannose, raffinose, ramnose and saccharose. Acid production from cellobiose and *N*-acetylglucosamine is variable. Acetate, malate and succinate are utilized but aconitate, citrate, benzoate and DL-tartrate are not utilized. It is susceptible to ampicillin (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), chloramphenicol (30 µg), streptomycin

(10 µg), imipenem (10 µg), methicillin (5 µg), novobiocin (5 µg), polymyxin B (300 IU), rifampicin (30 µg), rifampicin (5 µg), tetracyclin (30 µg) and vancomycin (30 µg), but not to nalidixic acid (30 µg), kanamycin (30 µg), lincomycin (2 µg), norfloxacin (10 µg), ofloxacin (10 µg), oxytetracycline (30 µg), penicillin G (10 IU) and sulfonamide (200 µg). It produces cystine arylamidase, esterase (C4), esterase lipase (C8), alkaline phosphatase, acid phosphatase, α -fucosidase, β -galactosidase, α -glucosidase, β -glucosidase, β -glucuronidase, leucine arylamidase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase and valine arylamidase but not α -galactosidase, lipase (C14), α -mannosidase, *N*-acetyl- β -glucosaminidase, α -chymotrypsin and trypsin. Predominant menaquinones are MK-13 and MK-12. Cell-wall amino acids are diaminobutyric acid, glycine, glutamic acid and alanine. Whole cell sugars are glucose, galactose, rambnose and mannose. Major polar lipids are diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, an unknown phospholipid and two unknown glycolipids. Acyl type is acetyl. Predominant fatty acids are anteiso-C_{15:0} and anteiso-C_{17:0}; mycolic acids are absent. G+C content is 70.6 mol%. Isolated from the wall of a tomb located in the Little Apostle cubicle, Domitilla Catacomb, Rome, Italy.

The type strain is CD5^T (=HKI 0327^T =DSM 16389^T =NCIMB 14012^T =CIP 108741^T). The GenBank accession number for the 16S rRNA gene sequence of this strain is AY618216.

DESCRIPTION OF *Agromyces lapidis* sp. nov.

Agromyces lapidis (la.pi' dis. L. gen. N. *lapidis* of a stone).

Gram-positive, aerobic to microaerophilic actinomycete that forms branching hyphae (width 0.4-0.6 μm) which break up into irregular diphtheroid and rod-like, non-motile fragments. Colonies are circular, convex, smooth and yellow. Colony diameter is about 1 mm. Growth occurs between 10 and 37°C (optimal growth at 28°C) and at pH 5-9.5. Na Cl is tolerated up to 4% (w/v), but not at 6% (w/v). Nitrate reduction is positive. Produce hydrogen sulfide. Catalase reaction is positive. Oxidase test is variable. Voges-Proskauer, methyl red and indole tests gave negative results. Casein, aesculin, starch, hippurate and tyrosine are hydrolysed. Adenine, hypoxanthine, Tween 80, urea and xanthine are not decomposed or hydrolysed. Hidrolysis of gelatin is variable. Acid is produced from starch, amygdalin, D-arabinose, arbutin, cellobiose, aesculin, fructose, L-fucose, galactose, glycerol, glucose, glycogen, inulin, methyl- α D-mannoside, maltose, mannose, *N*-acetylglucosamine, raffinose, salicin and sucrose. Acetate is utilized but aconitate, citrate, benzoate, DL-tartrate, malate and succinate are not utilized. It is susceptible to nalidixic acid (30 μg), ampicillin (10 μg), ciprofloxacin (5 μg), chloramphenicol (30 μg), imipenem (10 μg), methicillin (5 μg), novobiocin (5 μg), penicillin G (10 IU), rifampicin (30 μg), rifampicin (5 μg), tetracyclin (30 μg) and vancomycin (30 μg), but not to kanamycin (30 μg), lincomycin (2 μg), norfloxacin (10 μg), ofloxacin (10 μg), oxytetracycline (30 μg), polymyxin B (300 IU), streptomycin (10 μg), sulfonamide (200 μg). It produces alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), cystine arylamidase, acid phosphatase, β -galactosidase, β -glucosidase, α -glucosidase, leucine arylamidase, naphtol-AS-BI-phosphohydrolase, α -chymotrypsin and valine arylamidase, but not α -fucosidase, α -galactosidase, β -glucuronidase, lipase (C14), α -mannosidase, *N*-acetyl- β -glucosaminidase and trypsin. Predominant menaquinones are MK-12 and MK-13. Cell-wall amino acids are diaminobutyric acid, glycine,

glutamic acid and alanine. Whole cell sugars are glucose, galactose, ribose and mannose. Major polar lipids are diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, an unknown phospholipid and two unknown glycolipids. Acyl type is acetyl. Predominant fatty acids are anteiso-C_{15:0} and anteiso-C_{17:0}; mycolic acids are absent. G+C content is 70.4 mol%. Isolated from a carved stone wall of the Domitilla Catacomb, Rome, Italy.

The type strain is CD55^T (=HKI 0324^T =DSM 16390^T =NCIMB 14013^T =CIP 108739^T). The GenBank accession number for the 16S rRNA gene sequence of this strain is AY618217.

DESCRIPTION OF *Agromyces subbeticus* sp. nov.

Agromyces subbeticus (sub.be'ti.cus. N. L. masc. adj. *subbeticus*, referring to the Subbetic Mountain Range, Southern Spain, where "Cave of Bats" is located).

Gram-positive, aerobic and microaerophilic actinomycete. Cells form branching hyphae, (0.3-0.5 µm width by 2.5-4.0 µm length) which break up into irregular rod-shaped and diphtheroid fragments. Colonies are circular, convex, smooth, and intense yellow. Colony diameter is about 1 mm. Growth occurs between 6 and 37°C (optimally at 28°C) and at pH values between 5 and 9.5. NaCl is tolerated up to 4%. Nitrate reduction is negative. Produce hydrogen sulfide. Catalase reaction is positive. Oxidase test is variable. Voges-Proskauer, methyl red and indole tests gave negative results. Casein, aesculin, hippurate, hypoxanthine, starch, tyrosine and xanthine are hydrolysed. Adenine, Tween 80 and urea and are not decomposed or hydrolysed. Hydrolysis of gelatin is variable. Acid is produced from starch, D,L-arabinose, amygdalin, arbutin, cellobiose, aesculin, fructose, L-fucose, galactose, glucose, glycerol, glycogen, inulin, lactose, methyl- α D-mannoside, maltose, mannitol, mannose, raffinose, rhamnase, salicin, sucrose and D-xylose. Acetate, malate and succinate is utilized but aconitate,

citrate, benzoate and DL-tartrate are not utilized. It is susceptible to nalidixic acid (30 μg), ampicillin (10 μg), kanamycin (30 μg), lincomycin (2 μg), methicillin (5 μg), norfloxacin (10 μg), penicillin G (10 IU), polymyxin B (300 IU) and sulfonamide (200 μg), but not to chloramphenicol (30 μg), ciprofloxacin (5 μg), streptomycin (10 μg), imipenem (10 μg), novobiocin (5 μg), ofloxacin (10 μg), oxytetracycline (30 μg), rifampicin (5 μg), rifampicin (30 μg), tetracyclin (30 μg) and vancomycin (30 μg). It produces cystine arylamidase, esterase (C4), esterase lipase (C8), alkaline phosphatase, acid phosphatase, β -galactosidase, α -glucosidase, β -glucosidase, leucine arylamidase, *N*-acetyl- β -glucosaminidase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase and valine arylamidase, but not α -fucosidase, α -galactosidase, β -glucuronidase, lipase (C14), α -mannosidase, α -chymotrypsin and trypsin. Predominant menaquinones are MK-12 and MK-13. Cell-wall amino acids are diaminobutyric acid, glycine, glutamic acid and alanine. Whole cell sugars are rhamnose, glucose, galactose and mannose. Polar lipids are diphosphatidylglycerol, an unknown phospholipid and two unknown glycolipids. Acyl type is acetyl. Predominant fatty acids are anteiso- $\text{C}_{15:0}$ and anteiso- $\text{C}_{17:0}$; mycolic acids are absent. G+C content is 71.2%. The organism was isolated from a blue-grey cyanobacterial biofilm covering the walls of "Cave of Bats", Zuheros, Cordoba, Spain.

Type strain is Z33^T (=HKI 0340^T =DSM 16689^T =NCIMB 14025^T). The GenBank accession number for the 16S rRNA gene sequence of this strain is AY737778.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- **Agarossi, G. (1992).** Biodeterioramento in ambienti ipogei: esperienze e considerazioni. En F. Guidobaldi (ed), *Studi e ricerche sulla conservazione delle Opere d'Arte dedicati alla memoria di Marcello Paribeni*. C.N.R.
- **Agarossi, G., Ferrari, R. y Monte, M. (1985).** Microbial biodeterioration in the hypogea: the subterranean Neo-Phytagorean Basilica of Porta Maggiore in Rome. In G. Felix (ed), *Proceedings of the 5th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*: 597-605. Lausanne: Presses Polytechniques Romandes.
- **Albertano, P. y Urzì, C. (1999).** Structural interactions among epilithic cyanobacteria and heterotrophic microorganism in Roman hypogea. *Microb Ecol* 38: 244-252.

- **Albertano, P., Luongo, L. y Grillo Caiola, M. (1991).** Observation on cell structure of microorganisms of an epilithic phototrophic community competing for light. *Nova Hedwigia* 53: 369-381.
- **Albertano, P., Kováčik, L. y Grilli Caiola, M. (1994).** Preliminary investigations on epilithic cyanophytes from a Roman Necropolis. *Arch Hydrobiol, Algological Studies* 75: 71-74.
- **Albertano, P., Bruno, L., D'Ottavi, D., Moscone, D. y Palleschi, G. (2000).** The effect of photosynthesis on pH variation in cyanobacterial biofilms from Roman catacombs. *J Appl Phycol* 12: 379-384.
- **Albertano, P., Moscone, D., Palleschi, G., Hermosin, B., Saiz-Jimenez, C., Sanchez-Moral, S., Hernández-Mariné, M., Urzì, C., Groth, I., Schroeckh, V., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Gallon, J.R., Graziottin, F., Bisconti, F. y Giuliani, R. (2003).** Cyanobacteria attack rocks (CATS): Control and preventive strategies to avoid damage caused by cyanobacteria and associated microorganisms in Roman hypogean monuments. En C. Saiz-Jimenez (ed), *Molecular Biology and Cultural Heritage*. Balkema, Lisse, pp. 151-162.
- **Alterburger, P., Kämper, P., Akimov, V.N., Lubitz, W. y Busse, H.-J. (1997).** Polyamine distribution in actinomycetes with group B peptidoglycan and species of the genera *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, and *Tsukamurella*. *Int J Syst Bacteriol* 47: 270-277.
- **Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J Biol Mol* 215: 403-410.

- **Aoki, K., Shinke, R. Y Nishira, H. (1982).** Identification of aniline-assimilating bacteria. *Agric Biol Chem* 46: 2563-2570.
- **Ariño, X., Hernández-Mariné, M. y Saiz-Jimenez, C. (1996).** *Ctenocladus circinnatus* (Chlorophyta) in stuccoes from archaeological sites of southern Spain. *Phycologia* 35: 183-189.
- **Ariño, X., Hernández-Mariné, M. y Saiz-Jimenez, C. (1997).** Colonization of Roman tombs by calcifying cyanobacteria. *Phycologia* 36: 366-373.
- **Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K. (1992).** Current Protocols in Molecular Biology. New York, *Wiley-Interscience*, vol. 1.
- **Baddiley, J. (1972).** Teichoic acids in cell walls and membranes of bacteria. *Essays Biochem* 8: 35-77.
- **Baldi, F., Pepi, M., Burrini, D., Kniewald, G., Scali, D. y Lanciotti, E. (1996).** Dissolution of barium from barite in sewage sludges and cultures of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Appl Environ Microbiol* 62: 2398-2404.
- **Ball, A.S., Betts, W.B. y McCarthy, A.J. (1989).** Degradation of lignin-related compounds by actinomycetes. *Appl Environ Microbiol* 55: 1642-1644.
- **Bartholomew, G.W. y Alexander, M. (1979).** Microbial metabolism of carbon monoxide in culture and in soil. *Appl Environ Microbiol* 37: 932-937.
- **Běhal, V. (2003).** Alternative sources of biologically active substances. *Folia Microbiol* 48: 563-571.

- **Boquet, E., Bordonat, A. y Ramos-Cormenzana, A. (1973).** Production of calcite crystals by soil bacteria is a general phenomenon. *Nature* 246: 527-528.
- **Breed, R.S. (1948).** Family XII. *Bacteriaceae* Cohn. En R.S. Breed, E.G.D. Murray y A.H. Hitchens (eds), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 6th ed. Baltimore, Williams y Wilkins Co., p. 613.
- **Bruno, L. y Albertano, P. (1999).** Photoacclimation of sciaphilous epilithic cyanobacteria isolated from roman hypogea. *Arch Hydrobiol, Algological Studies* 94: 89-103.
- **Cañaveras, J.C., Hoyos, M., Sanchez-Moral, S., Sanz-Rubio, E., Bedoya, J., Soler, V., Groth, I., Schumann, P., Laiz, L., Gonzalez, I. y Saiz-Jimenez, C. (1999).** Microbial communities associated with hydromagnesite and leedle-fiber aragonite deposits in a karstic cave (Altamira, Northern Spain). *Geomicrobiol J* 16: 9-25.
- **Cañaveras, J.C., Sanchez-Moral, S., Soler, V. y Saiz-Jimenez, C. (2001).** Microorganisms and microbially induced fabrics in cave walls. *Geomicrobiol J* 18: 223-240.
- **Collins, M.D. (1982).** Lipid composition of *Agromyces ramosus*. *FEMS Microbiol Lett* 14: 187-189.
- **Collins, M.D. y Jones, D. (1980).** Lipids in the classification and identification of coryneform bacteria containing peptidoglycans base on 2,4-diaminobutyric acid. *J Appl Bacteriol* 48: 459-470.
- **Collins, M.D., Pirouz, T., Goodfellow, M. y Minnikin, D.E. (1977).** Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *J Gen Microbiol* 100: 221-230.

- **Cowan, S.T. y Steel, K.J. (1965).** Manual for the Identification of Medical Bacteria. Cambridge, Cambridge University Press.
- **De Ley, J., Cattoir, H. y Reynaerts, A. (1970).** The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur J Biochem* 12: 133-142.
- **Döpfer, H., Stackebrandt, E. y Fiedler, F. (1982).** Nucleic acid hybridization studies on *Microbacterium*, *Curtobacterium*, *Agromyces* and related taxa. *J Gen Microbiol* 128: 1697-1708.
- **Dorofeeva, L.V., Krausova, V.I., Evtushenko, L.I. y Tiedje, J.M. (2003).** *Agromyces albus* sp. nov., isolated from a plant (*Androsace* sp.). *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 1435-1438.
- **Dutkiewicz, J., Krysinska-Traczyk, E., Skórska, C., Cholewa, G. y Sitkowska, J. (2002a).** Exposure to airborne microorganisms and endotoxin in a potato processing plant. *Ann Agric Environ Med* 9: 225-235.
- **Dutkiewicz, J., Skórska, C., Krysinska-Traczyk, E., Cholewa, G., Sitkowska, J., Milanowski, J. y Góra, A. (2002b).** Precipitin response of potato processing workers to work-related microbial allergens. *Ann Agric Environ Med* 9: 237-242.
- **Ghiorse, W.C. (1997).** Subterranean life. *Science* 275: 789-790.
- **Giacobini, C., De Cicco M.A., Tiglie, I. y Accardo, G. (1988).** Actinomycetes and biodeterioration in the field of fine art. En D.R. Houghton, R.N. Smith y H.O.W. Eiggins (eds), *Biodeterioration* 7. New York, Elsevier, pp. 418-423

- **Giovannoni, S.J. (1991).** The polymerase chain reaction. En E. Stackebrandt y M. Goodfello (eds), *Sequencing and Hybridization Techniques in Bacterial Systematics*. New York, John Wiley, pp. 177-201.
- **Gnilozub, V.A., Streshinskaia, G.M., Evtushenko, L.I., Naumova, I.B. y Shashkov, A.S. (1994).** 1,5-Poly(ribitol phosphate) with tetrasaccharide substituents in the cell wall of *Agromyces fucosus* subsp. *hippuratus*. *Biokhimiya* 59: 1892-1899.
- **Gonzalez, J.M. (2003).** Overview on existing molecular techniques with potential interest in cultural heritage. En C. Saiz-Jimenez (ed), *Molecular Biology and Cultural Heritage*. Balkema, Lisse, pp. 3-14.
- **Gonzalez, J.M. y Saiz-Jimenez, C. (2002).** A fluorimetric method for the estimation of G+C mol% content in microorganisms by thermal denaturation temperatura. *Environ Microbiol* 4: 770-773.
- **Gonzalez, J.M. y Saiz-Jimenez, C. (2005).** A simple fluorometric method for the estimation of DNA-DNA relatedness between closely related microorganisms by thermal denaturation temperatures. *Extremophiles* 9: 75-79.
- **Gonzalez-Muñoz, M.T., Arias, J.M., Montoya, E. y Rodriguez-Gallego, M. (1993).** Struvite production by *Myxococcus coralloides* D. *Chemosphere* 10: 1881-1887.
- **Gonzalez-Muñoz, M.T., Chekroun, K.B., Aboud, A.B., Arias, J.M. y Rodriguez-Gallego, M. (2000).** Bacterially induced Mg-calcite formation: role of Mg²⁺ in development of crystal morphology. *J Sed Res* 70: 559-564.

- **Gordon, R.E., Barnett, D.A., Handerhan, J.E. y Pang, C.H-N. (1974).** *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the Nocardin Strain. *Int J Syst Bacteriol* 24: 54-63.
- **Gordon, D., Abajian, C. y Green, P. (1998).** *Consed*: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res* 8: 195-202.
- **Gledhill, W.E. y Casida, L.E. (1969).** Predominant catalase-negative soil bacteria. III. *Agromyces*, gen. nov., microorganisms intermediary to *Actinomyces* and *Nocardia*. *Appl Microbiol* 18: 340-349.
- **Groth, I. y Saiz-Jimenez, C. (1999).** Actinomycetes in hypogean environments. *Geomicrobiol J* 16: 1-8.
- **Groth, I., Schumann, P., Weiss, N., Martin, K. y Rainey, F.A. (1996).** *Agrococcus jenensis* gen. nov., sp. nov., a new genus of actinomycetes with diaminobutyric acid in the cell wall. *Int J Syst Bacteriol* 46: 234-239.
- **Groth, I., Vettermann, R., Schuetze, B., Schumann, P. y Saiz-Jimenez, C. (1999a).** Actinomycetes in karstic caves of Northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). *J Microbiol Meth* 36: 115-122.
- **Groth, I., Schumann, P., Schuetze, B., Augsten, K., Kramer, I. y Stackebrandt, E., (1999b).** *Beutenbergia cavernae* gen. nov., sp. nov., an L-lysine-containing actinomycete isolated from a cave. *Int J Syst Bacteriol* 49: 1733-174.
- **Groth, I., Schumann, P., Laiz, L., Sanchez-Moral, S., Cañaveras, J.C. y Saiz-Jimenez, C. (2001).** Geomicrobiological study of the Grotta dei Cervi, Porto Badisco, Italy. *Geomicrobiol J* 18: 241-258.

- **Groth, I., Schumann, P., Schuetze, B., Augsten, K. y Stackebrandt, E., (2002).** *Knoellia sinensis* gen. nov., sp. nov., and *Knoellia subterranea* sp. nov., two novel actinobacteria isolated from a cave. *Int J Syst Bacteriol* 75: 123-136.
- **Gurtner, C., Heyrman, J., Piñar, G., Lubitz, W., Swings, J. y Rölleke, S. (2000).** Comparative analyses of the bacterial diversity on two different biodeteriorated wall paintings by DGGE and 16S rDNA sequence analysis. *Int Biodeter Biodegr* 46: 229-239.
- **Hasegawa, T., Takizawa, M. y Tanida, S. (1983).** A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J Gen Appl Microbiol* 29: 1319-1322.
- **Hernández-Mariné, M. y Canals, T. (1994).** *Herpyzonema pulverulentum* (Mastigocladaceae) a new cavernicolous atmospheric and lime-ecrusted cyanophyte. *Arch Hydrobiol, Algological Studies*. 75: 123-136.
- **Hernández-Mariné, M., Roldán, M., Clavero, E., Canals, A. y Ariño, X. (2001).** Phototrophic biofilm morphology in dim light. The case of the Pigmolto sinkhole. *Arch Hydrobiol, Algological Studies* 123: 237-253.
- **Hicks, R.E., Amann, R.I. y Stahl, D.A. (1992).** Dual staining of natural bacterial plankton with 4',6-diamidino-2 phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom-level 16S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol* 58: 2158-2163.
- **Horwitz, A.H. y L.E. Casida, JR. (1975).** L-Phase variants of *Agromyces ramosus*. *Anton Leeuw* 41: 153-171.

- **Horwitz, A.H. y L.E. Casida, JR. (1978a).** Survival and reversion of a stable L form in soil. *Can J Microbiol* 24: 50-55.
- **Horwitz, A.H. y L.E. Casida, JR. (1978b).** Effects of magnesium, calcium, and serum on reversion of stable L-forms. *J Bacteriol* 136: 565-569.
- **Jones, D., Watkins, J. y Meyer, D. J. (1970).** Cytochrome composition and effect of catalase on growth of *Agromyces ramosus*. *Nature* 226: 1249-1250.
- **Laiz, L., Groth, I., Gonzalez, I. y Saiz-Jimenez, C., (1999).** Microbiological study of the dripping waters in Altamira cave (Santillana del Mar, Spain). *J Microbiol Meth* 36:129-138.
- **Laiz, L., Groth, I., Schumann, P., Zezza, F., Felske, A., Hermosin, B. y Saiz-Jimenez, C. (2000).** Microbiology of the stalactites from Grotta dei Cervi, Porto Badisco, Italy. *Int Microbiol* 3: 25-30.
- **Laiz, L., Gonzalez, J.M. y Saiz-Jimenez, C. (2003).** Microbial communities in caves: ecology, physiology, and effects on paleolithic paintings. En R.J. Koestler, V.H. Koestler, A.E. Charola y F.E. Nieto-Fernández (eds), *Biology and Conservation: Biodeterioration of Works of Art*. New York, The Metropolitan Museum of Art, pp. 210-225.
- **Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., y Pace, N.R., (1985).** Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proc Natl Acad Sci* 82: 6955-6959.

- **Lanyi, B. (1987)**. Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. In R.R. Colwell y R. Grigorova (eds), *Methods in Microbiology*. London, Academic Press, pp. 1-67.
- **Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G. y Marinelli, F. (2000)**. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Anton Leeuw* 78: 399-405.
- **Lemriss, S., Laurent, F., Couble, A., Lancelin, J.M., Saintpierre-Bonaccio, D., Rifai, S., Fassouane, A. y Boiron, P. (2003)**. Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Can J Microbiol* 49: 669-674.
- **Li, W.-J., Zhang, Li-P., Xu, P., Cui, X.-L., Xu, L.-H., Zhang, Z., Schumann, P., Stackebrandt, E. y Jiang, C.-L. (2003)**. *Agromyces aurantiacus* sp. nov., isolated from a Chinese primeval forest. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 303-307.
- **Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Kumar, Y., Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S. Ginhart, A.W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lüßmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A. y Schleifer, K.H. (2004)**. ARB: a software environment for sequence data. *Nucl Acids Res* 32: 1363-1371.
- **MacKenzie, S.L. (1987)**. Gas chromatographic analysis of amino acids as the N-heptafluorobutyryl isobutyl esters. *J Assoc Off Anal Chem* 70: 151-160.

- **Malysheva, V.A. (1994).** *Teichoic and lipoteichoic acids of Agromycetes*. PhD thesis, Lomonosov Moscow State University.
- **Mamoli, L. (1939).** Ubre biochemische dehydrierungen in der cortingruppe. *Ber Dtsche Chem Ges* 72: 1863-1865.
- **Marmur, J. (1961).** A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *Mol Biol* 3:208-218.
- **Minnikin, D.E., Alshamaony, L. y Goodfellow, M. (1975).** Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia*, and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of whole-organism methanolysates. *J Gen Microbiol* 88: 200-204.
- **Minnikin, D.E., Collins, M.D. y Goodfellow, M. (1979).** Fatty acid and polar lipid composition in the classification of *Cellulomonas*, *Oerskovia* and related taxa. *J Appl Bacteriol* 47: 87-95.
- **Monte, M. y Ferrari, R. (1993).** Biodeterioration in subterranean environments. *Aerobiologia* 9: 141-148.
- **Naumova, J.B., Shashkov, A.S., Tulskaya, E.M., Streshinskaya, G.M., Kozlova, Y.I., Potekhina, N.V., Evtushenko, L.I. y Stackebrandt, E. (2001).** Cell wall teichoic acids, structural diversity, species specificity in the genus *Nocardiopsis*, and chemotaxonomic perspective. *FEMS Microbiol Rev* 25: 269-283.
- **Nour, S.M., Lawrence, J.R., Zhu, H., Swerhone, G.D.W., Welsh, M., Welacky, T.W. y Topp, E. (2003).** Bacteria associated with cysts of the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). *Appl Environ Microbiol* 69: 607-615.

- **Okami, Y. (1986).** Marine microorganisms as a source of bioactive agents. *Microb Ecol* 12: 65-78.
- **Okami, Y. y Hotta, K. (1988).** Search and discovery of new antibiotics. In M. Goodfellow, S.T. Williams y M. Mordarski (eds), *Actinomycetes in Biotechnology*. London, Academic Press Ltd., pp. 33-67.
- **Pantazidou, A., Roussomoustakaki, M. y Urzì, C. (1997).** The microflora of Milos Catacombs. In A. Sinclair (ed), *Archaeological Science 1995 Liverpool July 4-6th*. Oxford, Oxbow Books, pp. 321-325.
- **Palmer, R.J., Siebert, J. y Hirsch, P. (1991).** Biomass and organic acids in sandstone of a weathering building: production by bacterial and fungal isolates. *Microb Ecol* 21: 253-266.
- **Piñar, G., Laiz, L., Lubitz, W. y Sáiz-Jiménez, C. (2002).** Estudio comparativo de comunidades bacterianas en monumentos mediante técnicas moleculares y microbiológicas. En C. Sáiz-Jiménez y H. A. Videla (eds), *Biodeterioro de Monumentos de Iberoamérica*. Sevilla, España, pp. 57-80.
- **Piñar, G., Schabereiter-Gurtner, C., Lubitz, W. y Rölleke, S. (2003).** Analysis of the microbial diversity present on the wall paintings of Castle of Herberstein by molecular techniques. En C. Saiz-Jimenez (ed), *Molecular Biology and Cultural Heritage*. Balkema, Lisse, pp. 35-46.
- **Prauser, H. y Falta, R. (1968).** Phagensensibilität, Zellwand-ZU.S.A.mmensetzung und Taxonomie von Actinomyceten. *Z Allg Microbiol* 8: 39-46.

- **Rheims, H., Sproer, C., Rainey, F.A. y Stackebrandt, E. (1996).** Molecular biological evidence for the occurrence of uncultured members of the actinomycete line of descent in different environments and geographical locations. *Microbiology* 142: 2863-2870.
- **Rivas, R., Trujillo, M.E., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E. y Velazquez, E. (2004).** *Agromyces ulmi* sp. nov., xylanolytic bacteria from *Ulmis nigra* in Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 1987-1990.
- **Rollo, F., Luciani, S., Canapa, A. y Marota, I. (2000).** Analysis of bacterial DNA in skin and muscle of the tyrolean iceman offers new insight into the mummification process. *Am J Phys Anthropol* 111: 211-219.
- **Rosselló-Mora, R. y Amann, R. (2001).** The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 25: 36-67.
- **Saddler, G.S., Tavecchia, P., Lociuro, S., Zanol, M., Colombo, L. y Selva, E. (1991).** Analysis of madurose and other actinomycete whole cell sugars by gas chromatography. *J Microbiol Meth* 14: 185-191.
- **Saitou, N. y Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-426.
- **Saiz-Jimenez, C. (1997).** Biodeterioration vs biodegradation: the role of microorganisms in the removal of pollutants deposited on historic buildings. *Int Biodeter Biodegr* 40: 225-232.

- **Saiz-Jimenez, C. y Hermosin, B. (1999a).** The nature of the organic matter present in dripping waters from Altamira cave. *J Ann Appl Pyrol* 49: 337-347.
- **Saiz-Jimenez, C. y Hermosin, B. (1999b).** Thermochemolysis of the black deposits coating the ceiling and walls of Cueva del Encajero, Quesada, Spain. *J Anal Appl Pyrol* 49: 349-357.
- **Sanchez-Moral, S., Bedoya, J., Luque, L., Cañaveras, J.C., Jurado, V., Laiz, L. y Saiz-Jimenez, C. (2003a).** Biomineralización of different crystalline phases by bacteria isolated from catacombs. En C. Saiz-Jimenez (ed), *Molecular Biology and Cultural Heritage*. Balkema, Lisse, pp. 179-185.
- **Sanchez-Moral, S., Cañaveras, J.C., Laiz, L., Saiz-Jimenez, C., Bedoya, J. y Luque, L. (2003b).** Biomediated precipitation of calcium carbonate metastable phases in hypogean environments. *Geomicrobiol J* 20: 491-500.
- **Sanchez-Moral, S., Luque, L., Cañaveras, J.C., Laiz, L., Jurado, V., Hermosin, B. y Saiz-Jimenez, C. (2004).** Bioinduced barium precipitation in Saint Callixtus and Domitilla Catacombs. *Ann Microbiol* 54: 1-12.
- **Sanchez-Moral, S., Luque, L., Cuezva, S., Soler, V., Benavente, D., Laiz, L., Gonzalez, J.M. y Saiz-Jimenez, C. (2005).** Deterioration of building materials in Roman catacombs: The influence of visitors. *Sci Total Environ* (en prensa).
- **Sanglier, J.J., Haag, H., Huck, T.A. y Fehr, T. (1993).** Novel bioactive compounds from Actinomycetes: a short review (1988-1992). *Res Microbiol* 144: 633-642.

- **Sasaki, J., Chijimatsu, M. y Suzuzi, K. (1998).** Taxonomic significance of 2,4-diaminobutyric acid isomers in the cell wall peptidoglycan of actinomycetes and reclassification of *Clavibacter toxicus* as *Rathayibacter toxicus* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 48: 403-410.
- **Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jimenez, C., Piñar, G., Lubitz, W. y Rölleke, S. (2002a).** Altamira cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities. *FEMS Microbiol Lett* 211: 7-11.
- **Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jimenez, C., Piñar, G., Lubitz, W. y Rölleke, S. (2002b).** Phylogenetic 16S rRNA analysis reveals the presence of complex and partly unknown bacterial communities in Tito Bustillo cave, Spain, and on its Paleolithic paintings. *Environ Microbiol* 4: 392-400.
- **Schleifer, K.H. y Kandler, O. (1972).** Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* 36: 407-477.
- **Shashkov, A.S., Malysheva, V.A., Naumova, I.B., Streshinskaya, G.M. y Evtushenko, L.I. (1993).** Poly(ribofuranosylribitol phosphate) in cell wall of *Agromyces cerinus* subsp. *nitratu*s VKM Ac-1351^T. *Bioorg Khim* 19: 433-438.
- **Shashkov, A.S., Streshinskaya, G.M., Gnilozub, V.A., Evtushenko, L.I. y Naumova, I.B. (1995).** Poly(arabitol phosphate) teichoic acid in the cell wall of *Agromyces cerinus* subsp. *cerinus* VKM Ac-1340^T. *FEMS Lett* 371: 163-166.
- **Smibert, R.M. y Krieg, N.R. (1994).** Phenotypic characterization. In P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood y N.R. Krieg (eds), *Methods for General and Molecular*

Bacteriology. Washington, American Society for Microbiology, pp. 607-654.

- **Stackebrandt, E. y Goebel, B.M. (1994)**. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44: 846-849.
- **Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A.D., Kämpfer, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C. y Whitman, W.B. (2002)**. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 1043-1047.
- **Suzuki, K., Sasaki, J., Uramoto, M., Nadase, T. y Komagata, K. (1996)**. *Agromyces mediolanus* sp. nov., nom. rev., comb. nov., a species for "*Corynebacterium mediolanum*" Mamoli 1939 and for some aniline-assimilating bacteria which contain 2,4-diaminobutyric acid in the cell wall peptidoglycan. *Int J Syst Bacteriol* 46: 88-93.
- **Takeuchi, M. y Hatano, J. (2001)**. *Agromyces luteolus* sp. nov., *Agromyces rhizosphaerae* sp. nov. and *Agromyces bracchium* sp. nov., from the mangrove rhizosphere. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 1529-1537.
- **Uchida, K. y Aida, K. (1984)**. An improved method for the glycolate test for simple identification of the acyl type of bacteria cell walls. *J Gen Appl Microbiol* 30: 131-134.
- **Urzi, C. (1993)**. Interactions of some microbial communities in the biodeterioration of marble and limestone. En R. Guerrero y C. Pedros-Alio (eds), *Trends in Microbial Ecology*. Barcelona, Spanish Society for Microbiology, pp. 667-672.

- **Urzi, C., De Leo, F., Donato, P. y La Cono, V. (2003).** Multiple approaches to study the structure and diversity of microbial communities colonizing artistic surfaces. En C. Saiz-Jimenez (ed), *Molecular Biology and Cultural Heritage*. Balkema, Lisse, pp. 187-194.
- **Vadamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. Y Swings, J. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 60: 407-438.
- **Warsheid, Th. y Braams, J. (2000).** Biodeterioration of stone: a review. *Int Biodeter Biodegr* 46: 343-368.
- **Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P. y Truper, H.G. (1987).** Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* 37: 463-464.
- **Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. y Lane, D.J. (1991).** 16s ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173: 697-703.
- **Yokota, A., Takeuchi, M., Sakane, T. y Weiss, N. (1993).** Proposal of six new species of the genus *Aureobacterium* and transfer of *Flavobacterium esteraromaticum* Omelianski to the genus *Aureobacterium* as *Aureobacterium esteraromaticum* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 43: 555-564.
- **Zanardini, E., Abbrusciano, P., Ghedini, N., Realini, M. y Sorlini, C., (2000).** Influence of atmospheric pollutants on the biodeterioration of stone. *Int Biodeter Biodegr* 45: 35-42.
- **Zgurskaya, H.I., Evtushenko, L.I., Akimov, V.N., Voyevoda, H.V., Dobrovolskaya, T.G., Lysak, L.V. y**

-
- **Zgurskaya, H.I., Evtushenko, L.I., Akimov, V.N., Voyevoda, H.V., Dobrovolskaya, T.G., Lysak, L.V. y Kalakoutskii, L.V. (1992).** Emended description of the genus *Agromyces* and description of *Agromyces cerinus* subsp. *cerinus* sp. nov., subsp. nov., *Agromyces cerinus* subsp. *nitratus* sp. nov., subsp. nov., *Agromyces fucosus* subsp. *fucosus* sp. nov., subsp. nov., and *Agromyces fucosus* subsp. *hippuratus* sp. nov., subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 42: 635-641.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Resolución del Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

D. VALME JURADO LOBO

titulada REVISIÓN TAXONOMICA DEL GÉNERO AGRONYCES

GLEDHILL Y CASIDA, 1969, Y DESCRIPCIÓN DE NUEVAS

ESPECIES AISLADAS DE AMBIENTES HIPOGEOOS"

ACORDÓ otorgarle la calificación de SOBRESALIENTE

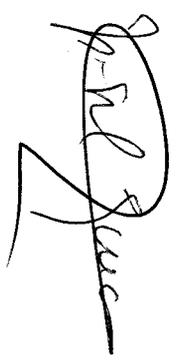
CUM LAUDE POR UNANIMIDAD.

Sevilla, 30 de Septiembre de 2005

El Vocal,



El Secretario,



El Doctorado,

